

# 雷公藤红素促进 RIP1 蛋白的去泛素化增强 TNF- $\alpha$ 对结肠癌细胞的凋亡诱导活性的研究

徐焯, 郁峰, 崔焯辉, 陈诚豪, 都志军(浙江省立同德医院肛肠科, 杭州 310012)

**摘要:** 目的 探讨中药活性成分雷公藤红素对 TNF- $\alpha$ 体外抗结肠癌活性的影响并研究其机制。方法 用雷公藤红素联合 TNF- $\alpha$ 体外治疗结肠癌细胞系 SW480, MTT 法检测 SW480 细胞的细胞活力。SW480 细胞用雷公藤红素联合 TNF- $\alpha$ 治疗后, Annexin V/PI 染色法检测细胞的凋亡, Western blot 法检测细胞 caspase-8、caspase-9 和 caspase-3 的活化和对 CYLD 蛋白表达的影响, 并用免疫共沉淀法检测 SW480 细胞 RIP1 蛋白的泛素化水平。结果 雷公藤红素联合 TNF- $\alpha$ 对结肠癌细胞系 SW480 的细胞活力抑制率和凋亡诱导活性均显著高于雷公藤红素及 TNF- $\alpha$ 单治疗组。雷公藤红素联合 TNF- $\alpha$ 对 SW480 细胞 caspase-8、caspase-9 和 caspase-3 的活化显著高于雷公藤红素及 TNF- $\alpha$ 单治疗组, 且两者联合治疗后, caspase-8 的活化时间显著早于 caspase-9 和 caspase-3。SW480 细胞用雷公藤红素联合 TNF- $\alpha$ 治疗后, 其 RIP1 蛋白的泛素化水平显著低于雷公藤红素及 TNF- $\alpha$ 单治疗组。进一步研究发现, 雷公藤红素能显著诱导 SW480 细胞 CYLD 蛋白的表达, 而 TNF- $\alpha$ 对 CYLD 的表达水平无影响, 当用小干扰 RNA 沉默 CYLD 的表达后, 雷公藤红素对 TNF- $\alpha$ 的协同效应丧失。结论 雷公藤红素通过促进 RIP1 蛋白的去泛素化增强 TNF- $\alpha$ 对结肠癌细胞的凋亡诱导活性。

**关键词:** 雷公藤红素; TNF- $\alpha$ ; 结肠癌; RIP1; CYLD; 去泛素化; 凋亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2017)01-0043-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.01.011

## Celastrol Enhances the TNF- $\alpha$ -induced Apoptosis by Promoting the Deubiquitination of RIP1 in Colon Cancer

XU Ye, YU Feng, CUI Junhui, CHEN Chenghao, DU Zhijun(Department of Anus-intestines, Tongde Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310012, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To investigate the role of celastrol in TNF- $\alpha$ -induced cell death in colon cancer. **METHODS** SW480 cells were treated with TNF- $\alpha$  combined with celastrol. After that, MTT assay was performed to measure the cell death; Annexin V/PI staining was performed to detect the cell apoptosis; Western blot analysis was performed to evaluate the cleavage of caspase-8, caspase-9, caspase-3, and the expression of CYLD; Co-immunoprecipitation was performed to detect the deubiquitination of RIP1 protein. **RESULTS** Combination with celastrol significantly promoted the cell death and apoptosis induced by TNF- $\alpha$  treatment in SW480. Combination with celastrol significantly promoted the cleavage of caspase-8, caspase-9, and caspase-3 induced by TNF- $\alpha$  treatment. Meanwhile, the activation of caspase-8 is earlier than the activation of caspase-9 and caspase-3. The results of co-immunoprecipitation and western blot indicated that the deubiquitination of RIP1 in TNF- $\alpha$ -treated SW480 cells were significantly enhanced due to the combination of celastrol. In addition, the results of western blot assay demonstrated that the expression of CYLD could be significantly up-regulated due to the celastrol treatment. Moreover, the transfection of CYLD siRNA abolished the synergistic effect on TNF- $\alpha$ -induced cell death in SW480 cells. **CONCLUSION** Celastrol enhances the TNF- $\alpha$ -induced apoptosis by promoting the deubiquitination of RIP1 in colon cancer.

**KEY WORDS:** celastrol; TNF- $\alpha$ ; colon cancer; RIP1; CYLD; deubiquitination; apoptosis

结肠癌是威胁人类健康的最常见的恶性肿瘤之一, 发病率和致死率都非常高<sup>[1]</sup>。目前结肠癌的常规治疗手段包括手术治疗、放疗及化疗, 尽管手术治疗往往能显著延长患者的生存时间, 然而对于那些不宜进行手术的晚期结肠癌患者, 化疗或生物药物治疗是治疗患者的重要手段<sup>[2-3]</sup>。肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )是一种由活化的巨噬细胞分泌的多功能细胞因子, 在细胞的凋亡通路中发挥重

要的作用。TNF- $\alpha$ 能显著诱导肿瘤细胞发生凋亡, 然而在临床治疗中, 为了获得令人满意的抗肿瘤效应, TNF- $\alpha$ 所用的剂量往往较大, 然而患者却常常不能耐受大剂量 TNF- $\alpha$ 所造成的不良反应<sup>[4]</sup>。因此, 寻找 TNF- $\alpha$ 的增敏药物以降低 TNF- $\alpha$ 的有效治疗浓度并提高肿瘤细胞对它的敏感性具有十分重要的意义。

雷公藤红素是一种从中药雷公藤中提取的天

作者简介: 徐焯, 女, 硕士, 主治医师

Tel: (0571) 89972372

E-mail: tongdexuye2@163.com

然活性物质,目前临床上主要用于治疗神经退行性疾病和风湿性疾病<sup>[5-6]</sup>。最近的研究发现雷公藤红素还具有一定抗肿瘤活性,对多种来源的肿瘤细胞均有良好的抑制作用,如乳腺癌、肝癌和肺癌等<sup>[7-9]</sup>。然而其对结肠癌的辅助治疗作用却很少报道,本实验的目的在于研究雷公藤红素是否能协同增强 TNF- $\alpha$ 对结肠癌的杀伤活性和机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

噻唑蓝(MTT,批号:M2128);雷公藤红素(批号:C0869);TNF- $\alpha$ (批号:T6674);Annexin V/PI 凋亡检测试剂盒(美国 Sigma-Aldrich,批号:APOAF)。细胞蛋白提取液、受体相互作用蛋白激酶 1(RIP1)抗体、RIP1 泛素蛋白抗体、活化型 caspase-8 抗体、CYLD 抗体和  $\beta$ -actin 抗体均购于美国 Cell Signaling。蛋白 G 免疫共沉淀琼脂糖珠(美国 Santa Cruz)。CYLD siRNA(广州锐博生物科技有限公司)。Lipofectamine 2000(美国 Invitrogen)。增强型化学发光底物(ECL)试剂盒(美国 Pierce,批号:32106)。

### 1.2 细胞培养

人结肠癌细胞系 SW480(美国 ATCC)。细胞系培养在含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中,在 37 °C 恒温培养箱中培养,通入 5% CO<sub>2</sub>。

### 1.3 细胞活力检测

将 SW480 细胞按每孔  $5 \times 10^3$  接种在 96 孔板上,分为对照组、雷公藤红素组、TNF- $\alpha$  组和雷公藤红素+TNF- $\alpha$  组。对照组为 SW480 细胞不加药物培养 48 h,雷公藤红素组为在 SW480 细胞中加入  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的雷公藤红素培养 48 h, TNF- $\alpha$  组为在 SW480 细胞中加入  $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 TNF- $\alpha$  培养 48 h,雷公藤红素+TNF- $\alpha$  组为在 SW480 细胞中加入  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的雷公藤红素和  $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 TNF- $\alpha$  培养 48 h。药物处理完毕后在培养体系中加入  $20 \mu\text{L } 5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  MTT 再培养 4 h,弃去上清,往孔中加入  $150 \mu\text{L}$  二甲亚砜,在 570 nm 波长下用酶标仪检测 OD 值,相对细胞活力用以下公式计算:相对细胞活力 =  $\text{OD}_{\text{治疗组}} / \text{OD}_{\text{对照组}}$ 。

### 1.4 细胞凋亡实验

将 SW480 细胞按每孔  $1 \times 10^6$  接种在 6 孔板上,分为对照组、雷公藤红素组、TNF- $\alpha$  组和雷公藤红素+TNF- $\alpha$  组。对照组为 SW480 细胞不加药物培养 48 h,雷公藤红素组为在 SW480 细胞中

加入  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的雷公藤红素培养 48 h, TNF- $\alpha$  组为在 SW480 细胞中加入  $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 TNF- $\alpha$  培养 48 h,雷公藤红素+TNF- $\alpha$  组为在 SW480 细胞中加入  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的雷公藤红素和  $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 TNF- $\alpha$  培养 48 h。药物处理完毕后将细胞用生理盐水洗涤 2 次,按照凋亡试剂盒说明书步骤将 PI(碘化丙啶)和 Annexin-V 加入细胞中孵育 20 min,采用流式细胞术检测肿瘤细胞的凋亡。

### 1.5 免疫共沉淀

将 SW480 细胞接种在细胞培养瓶中,待细胞铺满培养瓶后进行实验。实验分为对照组、雷公藤红素组、TNF- $\alpha$  组和雷公藤红素+TNF- $\alpha$  组。对照组为 SW480 细胞不加药物培养 48 h,雷公藤红素组为在 SW480 细胞中加入  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的雷公藤红素培养 48 h, TNF- $\alpha$  组为在 SW480 细胞中加入  $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 TNF- $\alpha$  培养 48 h,雷公藤红素+TNF- $\alpha$  组为在 SW480 细胞中加入  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的雷公藤红素和  $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 TNF- $\alpha$  培养 48 h。药物处理完毕后对 SW480 细胞进行计数,取  $2 \times 10^6$  的各组细胞用免疫沉淀缓冲液进行裂解,缓冲液的成分如下:  $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl(pH 7.4), 1% NP-40 细胞裂解液,  $150 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl,  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDTA, 1% 混合蛋白酶抑制剂(Sigma-Aldrich)。SW480 细胞在裂解液下处理 15 min 后,将其在  $12\,000 \times g$  下离心 10 min,收取上清液并在其中加入 RIP1 抗体孵育过夜,之后加入蛋白 G 琼脂糖珠孵育 2 h。孵育完成后将其在  $1\,200 \times g$  速度下离心 5 min,将琼脂糖珠离心至管底,之后将上清小心吸去,琼脂糖珠用免疫沉淀缓冲液洗涤 2 次后加入 Western blot 上样缓冲液,沸水浴煮 5 min 备用,用于检测与 RIP1 结合的泛素蛋白。

### 1.6 Western blot 实验

将 SW480 细胞接种在细胞培养瓶中,待细胞铺满培养瓶后进行实验。实验分为对照组、雷公藤红素组、TNF- $\alpha$  组和雷公藤红素+TNF- $\alpha$  组。对照组为 SW480 细胞不加药物培养 48 h,雷公藤红素组为在 SW480 细胞中加入  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的雷公藤红素培养 48 h, TNF- $\alpha$  组为在 SW480 细胞中加入  $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 TNF- $\alpha$  培养 48 h,雷公藤红素+TNF- $\alpha$  组为在 SW480 细胞中加入  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的雷公藤红素和  $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 TNF- $\alpha$  培养 48 h。药物处理完毕后将细胞用生理盐水洗涤 2 遍并提取总蛋白质。将蛋白提取液或免疫共沉淀处理样品用

12.5% SDS-PAGE 进行电泳分离。分离完毕后通过电转方法将蛋白质从分离胶上转到 PVDF 膜上, 用 RIP1 泛素蛋白抗体, cleaved caspase-8 抗体, cleaved caspase-9 抗体, cleaved caspase-3 抗体, CYLD 抗体或  $\beta$ -actin 抗体孵育过夜, 之后再用带辣根过氧化物酶的二抗孵育 2 h, 蛋白条带用 ECL 试剂盒显色发光。蛋白灰度值分析用 Image J 软件处理, 目标蛋白的相对表达水平用它们的蛋白灰度值与  $\beta$ -actin 灰度值的比值表示, 实验重复 3 次, 以 3 次实验得出的平均相对灰度值进行比较分析, 以  $t$  检验进行两组间的差异分析。

### 1.7 统计学方法

实验重复 3 次, 实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示并用 SPSS 15.0 统计分析软件进行处理,  $P$  值计算采用

非配对双边  $t$  检验进行分析,  $P < 0.05$  认为有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 雷公藤红素促进 TNF- $\alpha$ 对乳腺癌细胞的凋亡诱导效应

MTT 的实验结果表明  $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 TNF- $\alpha$  单独治疗仅能轻微抑制结肠癌细胞系 SW480 的细胞活力, 然而在培养体系中加入  $2 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的雷公藤红素后, TNF- $\alpha$  对 SW480 细胞的杀伤活性显著提高; 类似地, 凋亡检测实验结果表明雷公藤红素可显著增强 TNF- $\alpha$  对 SW480 细胞的凋亡诱导效应, 结果见图 1。这些结果提示了雷公藤红素对 TNF- $\alpha$  的抗肿瘤活性有增敏作用, 且这种增敏作用的产生机制可能和凋亡途径有关。

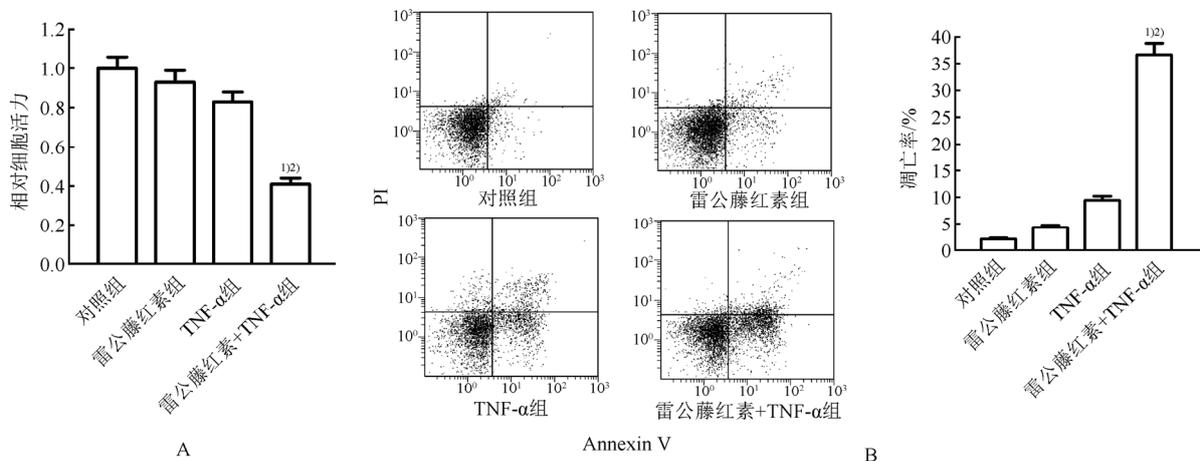


图 1 雷公藤红素增强 TNF- $\alpha$  的抗肿瘤活性

A-雷公藤红素增强 TNF- $\alpha$  对 SW480 细胞的杀伤活性; B-雷公藤红素增强 TNF- $\alpha$  对 SW480 细胞的凋亡诱导效应; 与雷公藤红素组相比, <sup>1)</sup> $P < 0.05$ ; 与 TNF- $\alpha$  组相比, <sup>2)</sup> $P < 0.05$ 。

Fig. 1 Celastrol improved the anti-tumor effect of TNF- $\alpha$ .

A-celastrol increased the cell death induced by TNF- $\alpha$  in SW480 cells; B-celastrol enhanced the apoptosis induced by TNF- $\alpha$  in SW480; compared with the celastrol group, <sup>1)</sup> $P < 0.05$ ; compared with the TNF- $\alpha$  group, <sup>2)</sup> $P < 0.05$ .

### 2.2 雷公藤红素联合 TNF- $\alpha$ 诱导结肠癌细胞发生 caspase-8 依赖的凋亡

TNF- $\alpha$  与肿瘤细胞表面的 TNFR1 受体结合后, 能激活 caspase-8 依赖的凋亡途径<sup>[10]</sup>。将 SW480 细胞用 TNF- $\alpha$  和雷公藤红素处理 48 h 后, Western blot 实验结果表明雷公藤红素能协同 TNF- $\alpha$  诱导 caspase-8、caspase-9 和 caspase-3 的活化; 另外, TNF- $\alpha$  联合雷公藤红素处理 SW480 细胞后, caspase-8 的活化显著早于 caspase-9 和 caspase-3 的活化, 结果见图 2。这些结果表明了雷公藤红素能协同 TNF- $\alpha$  诱导结肠癌细胞发生 caspase-8 依赖

的凋亡。

### 2.3 雷公藤红素促进 TNF- $\alpha$ 依赖的 RIP1 去泛素化

鉴于在 TNF- $\alpha$  激活 caspase-8 的过程中, RIP1 蛋白的去泛素化是一个关键的步骤<sup>[11]</sup>, 因此采用免疫共沉淀联合 Western blot 技术检测 SW480 细胞在经过 TNF- $\alpha$  和雷公藤红素联合治疗后, 肿瘤细胞中的 RIP1 泛素化水平。实验结果表明雷公藤红素能显著促进 TNF- $\alpha$  依赖的 RIP1 去泛素化, 结果见图 3。提示雷公藤红素增强 TNF- $\alpha$  对结肠癌细胞的凋亡诱导活性的机制是依赖于 RIP1 蛋白的去泛素化。

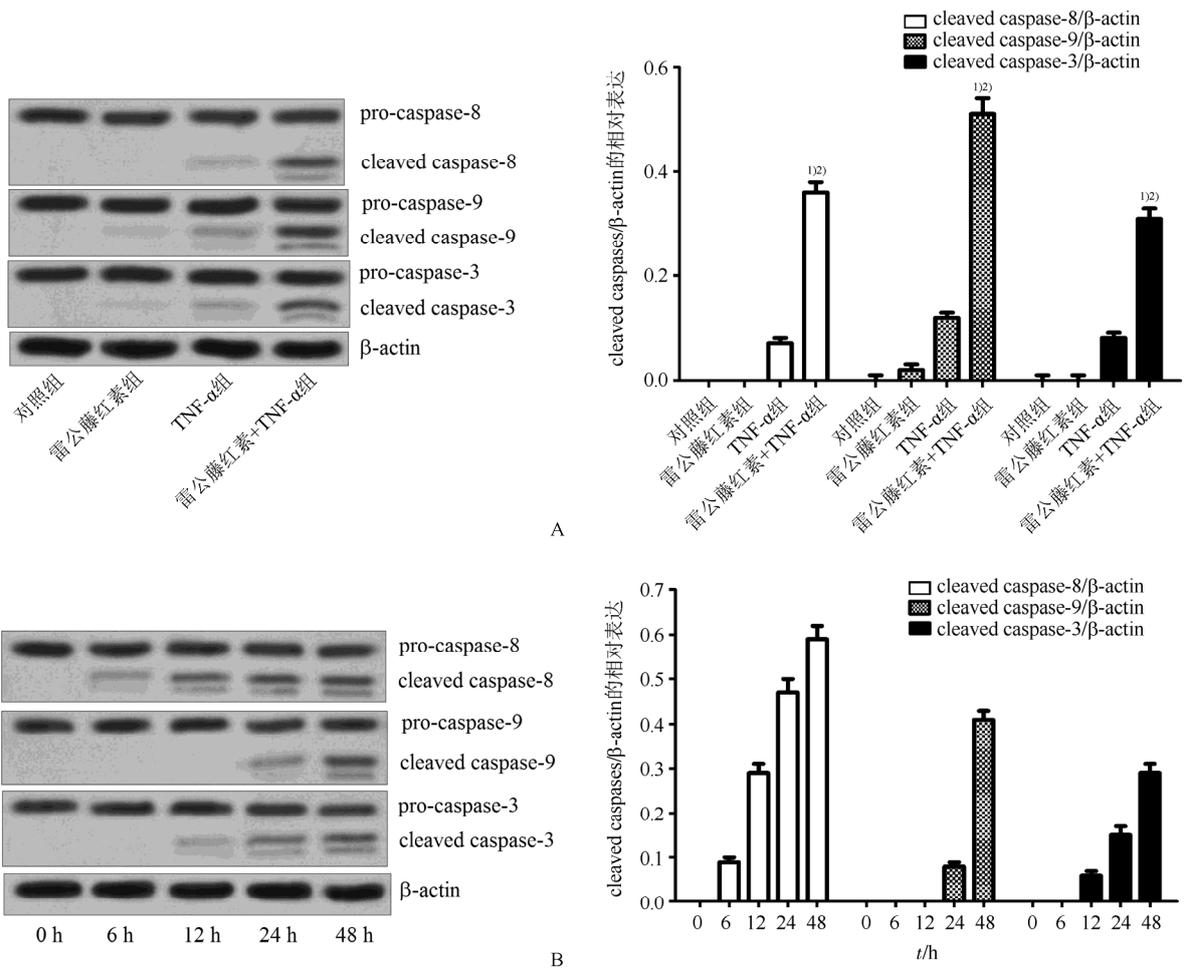


图2 TNF-α联合雷公藤红素诱导SW480细胞发生caspase-8依赖的凋亡

A-雷公藤红素促进TNF-α对caspase-8、caspase-9和caspase-3的活化；B-TNF-α联合雷公藤红素处理SW480细胞后，caspase-8的活化显著早于caspase-9和caspase-3的活化。与雷公藤红素组相比，<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ；与TNF-α组相比，<sup>2)</sup> $P < 0.05$ 。

Fig. 2 Combination with celastrol and TNF-α induced caspase-8-dependent apoptosis

A-celastrol improved the activation of caspase-8, caspase-9, and caspase-3 induced by TNF-α; B-the activation of caspase-8 was significantly earlier than caspase-9 and caspase-3 with SW480 cells treated by TNF-α plus celastrol; compared with the celastrol group, <sup>1)</sup> $P < 0.05$ ; compared with the TNF-α group, <sup>2)</sup> $P < 0.05$ .

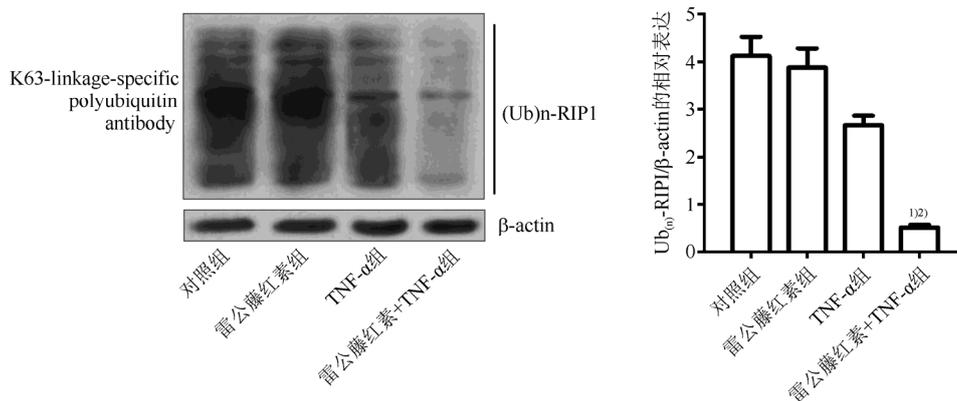


图3 雷公藤红素促进SW480细胞中TNF-α依赖的RIP1的去泛素化( $n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

与雷公藤红素组相比，<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ；与TNF-α组相比，<sup>2)</sup> $P < 0.05$ 。

Fig. 3 Celastrol promoted the deubiquitination of RIP1 induced by TNF-α in SW480 cells ( $n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Compared with the celastrol group, <sup>1)</sup> $P < 0.05$ ; compared with the TNF-α group, <sup>2)</sup> $P < 0.05$ .

## 2.4 雷公藤红素通过上调去泛素化酶 CYLD 的表达水平增强 SW480 细胞对 TNF- $\alpha$ 的敏感性

在 RIP1 蛋白的去泛素化过程中, 去泛素化酶 CYLD 发挥关键的作用<sup>[12]</sup>。Western blot 实验结果表明雷公藤红素能显著上调结肠癌细胞中 CYLD 的表达水平, 而 TNF- $\alpha$  则不影响 CYLD 的表达, 提示雷公藤红素发挥对 TNF- $\alpha$  的协同作用的机制可能和上调 CYLD 的表达水平有关。将 SW480 细

胞用 CYLD siRNA 进行转染沉默 CYLD 基因后, 再用 TNF- $\alpha$  联合雷公藤红素进行治疗, 结果表明 CYLD siRNA 能显著抑制雷公藤红素联合 TNF- $\alpha$  对 SW480 细胞 RIP1 蛋白的去泛素化作用, 同时抑制两者联合对 SW480 细胞的杀伤活性和凋亡诱导效应, 结果见图 4。这些结果证实了雷公藤红素提高结肠癌细胞对 TNF- $\alpha$  的敏感性的机制是其能上调结肠癌细胞中 CYLD 去泛素化酶的表达水平。

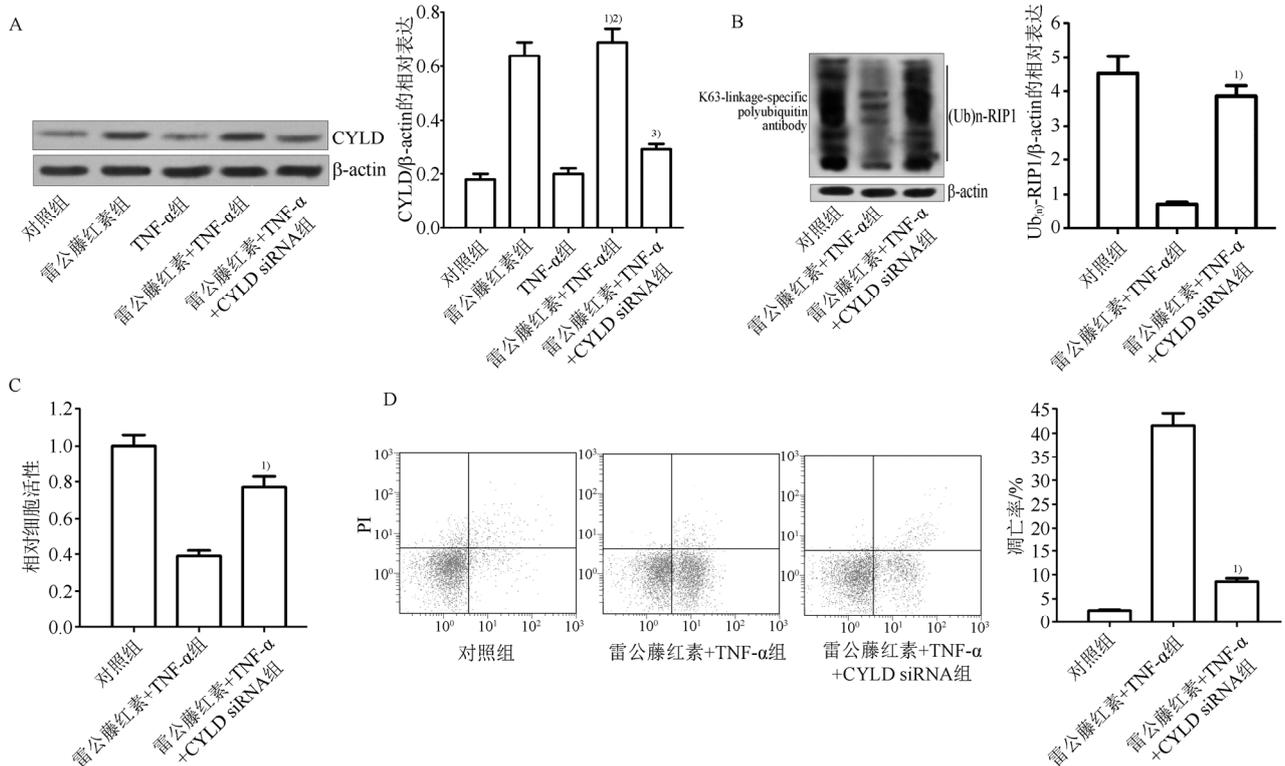


图 4 雷公藤红素通过上调 CYLD 的表达促进 TNF- $\alpha$  依赖的凋亡

A-雷公藤红素上调 SW480 细胞 CYLD 的表达水平; B-转染 CYLD siRNA 抑制雷公藤红素联合 TNF- $\alpha$  诱导的 RIP1 的去泛素化; C-转染 CYLD siRNA 抑制雷公藤红素联合 TNF- $\alpha$  对 SW480 细胞的杀伤活性; D-转染 CYLD siRNA 抑制雷公藤红素联合 TNF- $\alpha$  对 SW480 细胞的凋亡诱导活性; 与雷公藤红素组相比, <sup>1)</sup> $P < 0.05$ ; 与 TNF- $\alpha$  组相比, <sup>2)</sup> $P < 0.05$ ; 与 TNF- $\alpha$  + 雷公藤红素组相比, <sup>3)</sup> $P < 0.05$ 。

Fig. 4 Celastrol promoted TNF- $\alpha$ -induced apoptosis through up-regulating the expression of CYLD

A-celastrol but not the TNF- $\alpha$  up-regulated the expression of CYLD; B-transfection of CYLD siRNA inhibited the deubiquitination of RIP1 induced by the combination with TNF- $\alpha$  plus celastrol; C-transfection of CYLD siRNA inhibited the cell death induced by the combination with TNF- $\alpha$  plus celastrol; D-transfection of CYLD siRNA inhibited the apoptosis induced by the combination with TNF- $\alpha$  plus celastrol; compared with the celastrol group, <sup>1)</sup> $P < 0.05$ ; compared with the TNF- $\alpha$  group, <sup>2)</sup> $P < 0.05$ ; compared with the TNF- $\alpha$  plus celastrol group, <sup>3)</sup> $P < 0.05$ .

## 3 讨论

在 TNF- $\alpha$  诱导的凋亡通路中, RIP1 蛋白的去泛素化是其中的关键步骤。当 TNF- $\alpha$  与其受体结合后, 细胞中的 RIP1 蛋白会发生去泛素化, 继而形成 RIP1 依赖的死亡受体复合物, 该复合物能进一步活化 caspase-8 最终导致凋亡的发生<sup>[11]</sup>。在本研究中, 为了探究雷公藤红素促进 TNF- $\alpha$  依赖的结肠癌细胞凋亡的机制, 在本研究中运用免疫共沉淀和 Western blot 技术检测结合在 RIP1 蛋白上

的泛素蛋白, 结果证实雷公藤红素能显著促进 TNF- $\alpha$  依赖的结肠癌细胞 RIP1 蛋白的去泛素化, 进而促进肿瘤细胞 caspase-8 的活化和凋亡。

去泛素化酶 CYLD 被报道是一种肿瘤抑制因子, 当 TNF- $\alpha$  与相应受体结合后, 凋亡通路被激活, CYLD 被募集到 RIP1 蛋白周围并特异性去除 RIP1 蛋白上的泛素蛋白, 从而激活 RIP1 蛋白依赖的死亡受体复合物和凋亡信号通路<sup>[12-13]</sup>, 因此 CYLD 的表达水平在一定程度上决定了肿瘤细胞

对 TNF- $\alpha$  的敏感性。本研究的实验结果发现雷公藤红素能显著增加结肠癌细胞 CYLD 的表达水平, 这可能是雷公藤红素促进 TNF- $\alpha$  依赖的 RIP1 蛋白去泛素化的机制。当在结肠癌细胞中转染 CYLD siRNA 抑制 CYLD 的表达后, 实验结果发现雷公藤红素对 TNF- $\alpha$  的协同抗肿瘤作用丧失, 这些结果证明了雷公藤红素增强 TNF- $\alpha$  对结肠癌细胞凋亡诱导活性的机制是通过 CYLD/RIP1 途径。

综上所述, 本研究证明了雷公藤红素能显著提高结肠癌细胞对 TNF- $\alpha$  的敏感性。通过机制研究证实了雷公藤红素通过上调去泛素化酶 CYLD 的表达水平促进 TNF- $\alpha$  依赖的 RIP1 蛋白的去泛素化进而诱导结肠癌细胞 caspase-8 的活化和凋亡的发生。这些研究为如何提高 TNF- $\alpha$  的抗肿瘤活性, 减少它的不良反应提供了新的思路和理论依据。

## REFERENCES

- [1] SIEGEL R, NAISHADHAM D, JEMAL A. Cancer statistics, 2013 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2013, 63(1): 11-30.
- [2] TATOKORO M, KOGA F, YOSHIDA S, et al. Potential role of Hsp90 inhibitors in over-coming cisplatin resistance of bladder cancer-initiating cells [J]. *Int J Cancer*, 2012, 131(4): 987-996.
- [3] TIMIRCI-KAHRAMAN O, OZKAN N E, YAYLIM I, et al. Genetic variants in the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and death receptor genes contribute to susceptibility to bladder cancer [J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2015, 19(6): 309-315.
- [4] DONIA M, KJELDSEN J W, SVANE I M. The controversial role of TNF in melanoma [J]. *Oncoimmunology*, 2015, 5(4):

e1107699.

- [5] QIAN L W, ZHOU G Q, CHEN S N, et al. Recent advances in the study of celastrol anti-neurodegenerative diseases [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2011, 28(7): 629-633.
- [6] CHEN S, GU C, CHEN L, et al. Celastrol prevents cadmium-induced neuronal cell death via targeting JNK and PTEN-Akt/mTOR network [J]. *J Neurochem*, 2014, 128(2): 256-266.
- [7] LI P P, HE W, WEI W, et al. Celastrol induces mitochondria-mediated apoptosis in hepatocellular carcinoma bel-7402 cells [J]. *Am J Chin Med*, 2015, 43(1): 137-148.
- [8] MI C, SHI H, JIN X, et al. Celastrol induces the apoptosis of breast cancer cells and inhibits their invasion via downregulation of MMP-9 [J]. *Oncol Rep*, 2014, 32(6): 2527-2532.
- [9] LOIACONO M, MONICA V, SCAGLIOTTI G V, et al. ATF2 contributes to cisplatin resistance in non-small cell lung cancer and celastrol induces cisplatin resensitization through inhibition of JNK/ATF2 pathway [J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(11): 2598-2609.
- [10] SESSLER T, HEALY S, SZEGEZDI E, et al. Structural determinants of DISC function: new insights into death receptor-mediated apoptosis signalling [J]. *Pharmacol Ther*, 2013, 140(2): 186-199.
- [11] WU P, SHI K J, XU C M, et al. The LEF1/CYLD axis and cIAPs regulate RIP1 deubiquitination and trigger apoptosis in selenite-treated colorectal cancer cells [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1085. Doi: 10.1038/cddis.2014.13.
- [12] VANLANGENAKKER N, VANDEN BERGHE T, ZOBEL K, et al. cIAP1 and TAK1 protect cells from TNF-induced necrosis by preventing RIP1/RIP3-dependent reactive oxygen species production [J]. *Cell Death Differ*, 2011, 18(4): 656-665.
- [13] DING Z, LIU Y, SHEN A, et al. Spy1 induces deubiquitinating of RIP1 arrest and confers glioblastoma's resistance to tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ )-induced apoptosis through suppressing the association of CLIPR-59 and CYLD [J]. *Cell Cycle*, 2015, 14(13): 2149-2159.

收稿日期: 2016-05-11