

蛇床子素对 L02 细胞的毒性作用及其机制研究

陈婕, 李杨蕾, 鲍依琪, 陆红* (浙江中医药大学药学院, 杭州 311402)

摘要: 目的 探究蛇床子素(osthole, Ost)对 L02 细胞的毒性损伤和作用机制, 为中药蛇床子及其制剂的安全合理应用提供实验依据。方法 以不同浓度 Ost 作用于 L02 细胞, MTT 法检测细胞活性; 乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒测定细胞 LDH 释放率; Hoechst 33342 染色法检测细胞核形态; Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡; Western blot 检测 Bcl-2、Bax、pro-caspase-3、cleaved-caspase-3(p17)、p-Histon H3(Ser10)的表达。结果 L02 细胞在 Ost 作用下活性下降, LDH 释放率提高, 且呈浓度依赖; Hoechst 33342 染色荧光下可见细胞核皱缩碎裂; Annexin V/PI 双染法结果表明凋亡率随浓度提高而上升。与对照组比较, 50, 100, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ost 作用 24 h 后, Bcl-2、pro-caspase-3、p-Histon H3(Ser10)表达水平降低, Bax、cleaved-caspase-3 表达水平升高。结论 Ost 对 L02 细胞有毒性损伤作用, 呈一定的时间和浓度依赖性, 可促进细胞凋亡, 抑制细胞增殖。

关键词: 蛇床子素; L02 细胞; 毒性损伤; 细胞凋亡

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2018)06-0859-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.06.016

引用本文:陈婕, 李杨蕾, 鲍依琪, 等. 蛇床子素对 L02 细胞毒性作用及其机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(6): 859-863.

Study on Toxic Effects and Mechanism of Osthole on L02 Cells

CHEN Jie, LI Yanglei, BAO Yiqi, LU Hong* (College of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311402, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the toxic effect of osthole(Ost) on L02 cells and explore its mechanism, which could provide an experimental evidence for the safe and rational application of *Fructus cnidii* and its preparation. **METHODS** Different concentrations of Ost were applied to L02 cells, MTT assay was used to detect cell activity; the release rate of lactate dehydrogenase(LDH) was analyzed using LDH kits; Hoechst 33342 staining was used to detect cell nucleus morphology; Annexin V/PI staining was used to detect apoptosis; Western blot was utilized to detect the expression of Bcl-2, Bax, pro-caspase-3, cleaved-caspase-3(p17) and p-Histon H3(Ser10). **RESULTS** The activity of L02 cells decreased under the action of Ost, while the release rate of LDH increased and appeared to be concentration dependent. The cell nucleus treated by Ost were shrunken and fragmented under Hoechst 33342 fluorescence staining. The results of double staining of Annexin V/PI showed that the apoptosis rate increased with the increase of Ost concentration. Compared with the control group, after Ost(50, 100, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) treatment for 24 h, the expression levels of Bcl-2, pro-caspase-3 and p-Histon H3(Ser10) decreased, and the expression levels of Bax and cleaved-caspase-3 increased. **CONCLUSION** Ost has toxic effects on L02 cells, which appears a time and concentration dependent manner, as a result it will promote apoptosis and inhibit cell proliferation.

KEY WORDS: osthole; L02 cells; toxicity; cell apoptosis

蛇床子是伞形科植物蛇床 *Cnidium monnieri* (L.) Cuss. 的干燥成熟果实, 味辛、苦, 性温, 有小毒, 有燥湿祛风、杀虫止痒、温肾壮阳之功效, 用于治疗阴痒带下、湿疹瘙痒、湿痹腰痛、肾虚阳痿、宫冷不孕等症^[1]。临床上常外治阴道滴虫、阴道炎、外阴湿疹等妇科疾病。蛇床子有多种内服方剂^[2-4], 如蛇床子丸、疏肝益阳胶囊、骨立饮、秃鸡散、钟乳姜蒺汤、刘刺史丸、延寿固本丹等。蛇床子素(osthole, Ost)是从蛇床子中提取的一种天然香豆素衍生物, 具有广泛的生物活性和药理

活性^[5-9], 但在开发应用的同时亦不可忽视其毒性作用。

有文献报道, 蛇床子水煎液可致斑马幼鱼脏器形态改变^[10]。大鼠长期给药后, 其肾脏有萎缩或退行性变化^[11]。代谢组学研究发现蛇床子提取物给药组与对照组大鼠尿样代谢产物谱存在明显差别^[12]。经蛇床子醇提物灌胃后, 大鼠肝脏指数发生显著变化^[13], 提示 Ost 可能对肝脏有毒性作用。急性毒性试验发现, Ost 对小鼠有一定毒性^[14], 可致肝脏局部坏死^[15]。

作者简介: 陈婕, 女, 硕士生 Tel: (0571)61768143 E-mail: 15990100720@163.com

*通信作者: 陆红, 女, 硕士, 教授 Tel: (0571)61768143 E-mail: luhong@zcmu.edu.cn

目前的研究多集中于 Ost 的药理作用和提取工艺, 对其毒理作用的探究较少。本研究以不同浓度 Ost 作用于人正常肝细胞(L02 细胞)建立细胞毒性模型, 探究 Ost 的毒性作用及其机制, 为中药蛇床子的开发和安全应用提供参考。

1 材料

1.1 试剂

蛇床子素(Adamas, 纯度: 99%; 批号: P1095235); RPMI1640 培养液(GIBCO); 胎牛血清(杭州四季青, 批号: 20170221); 胰蛋白酶-EDTA 消化液(0.25%, Solarbio, 批号: B0017030100); 四甲基偶氮唑蓝(MTT, Sigma, 批号: 822A054); 二甲基亚砜(DMSO, Sigma); Hoechst 33342 染色液(批号: C1025)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号: P0012)、细胞裂解液(RIPA, 批号: P0013B)、蛋白酶抑制剂(PMSF, 批号: ST505)、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(批号: C1063)和 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(批号: P0015L)均购自碧云天; 乳酸脱氢酶(LDH)活力定量试剂盒(普利莱, 批号: E1020); β -actin(SANTA CRUZ, 批号: sc-47778); pro-caspase-3 抗体(8G10, #9665, CST); Bcl-2 抗体(#4223, CST); Bax 抗体(#5023, CST); cleaved-caspase-3(p17) (D175) 抗体(R&D Systems AF835); p-Histon H3(Ser10)-R (sc-8656-R, SANTA CRUZ); 化学发光(ECL)液(Bio-Rad, 批号: 170-5060)。

1.2 仪器

UNIVERSAL320/320R 台式(常温/冷冻)离心机(德国 Hettich); 多功能酶标仪(美国 Thermo Scientific); HEPA CLASS100 型细胞 CO₂ 培养箱(美国 Thermo); Ti-U 荧光倒置显微镜(日本 Nikon); Guava easy Cyte 流式细胞仪(德国 Merck); Mini-PROTEAN165-8004 电泳仪、ChemiDoc XPS 全自动凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad)。

1.3 细胞

L02 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所。

2 方法

2.1 细胞培养

L02 细胞用含 10% FBS, 1%青-链霉素的 RPMI1640 完全培养液培养, 置 37 °C, 5% CO₂ 的培养箱中, 饱和湿度条件下进行常规培养。观察

培养液的颜色变化和细胞生长的速度, 及时换液, 待细胞生长至对数生长期(融合度达 70%~80%)时用于实验。

2.2 MTT 法检测细胞活力

取生长状态良好的对数期 L02 细胞, PBS 清洗 2 次, 0.25%胰酶消化 2 min, 加 5 mL 完全培养基终止消化, 1 000 r·min⁻¹离心 5 min。加适量培养基反复吹打至细胞分散成单细胞悬液, 细胞计数。加培养液调整细胞密度至每毫升 5×10⁴ 个后接种于 96 孔板, 每孔 100 μ L。置培养箱内孵育至细胞融合度达 70%~80%时, 弃旧培养液。以 DMSO 溶解 Ost, 配制成浓度为 200 mmol·L⁻¹母液, -4 °C 保存, 临用以培养液稀释。设 3 个调零孔, 给药组分别加入不同浓度 Ost(0, 50, 100, 150, 200, 250 和 300 μ mol·L⁻¹), 另设一溶剂对照组(0.15% DMSO), 共 8 组, 每组设 6 个复孔, 将稀释好的药液加入 96 孔板内, 每孔 100 μ L, 分别作用 12, 24 和 48 h。吸弃含药的培养液, 每孔加新的培养液 100 μ L, 加 MTT 溶液(5 mg·mL⁻¹, pH 7.4) 20 μ L, 4 h 后吸弃上清, 每孔加 150 μ L DMSO, 微量振荡器(37 °C)振荡 10 min, 酶标仪测定 570 nm 处各孔 A 值, 实验重复 3 次。计算细胞存活率和 IC₅₀。细胞存活率(%)=(A_{给药组}-A_{空白})/(A_{对照组}-A_{空白})×100%。

2.3 LDH 释放实验

收集生长状态良好的对数期 L02 细胞, 消化成单细胞悬液并计数, 以每毫升 2×10⁵ 个接种于 24 孔板, 每孔 1 mL, 按“2.1”项下条件培养至对数期, 弃旧培养液, 分别加入不同浓度 Ost(0, 50, 100, 150 和 200 μ mol·L⁻¹), 作用 24 h。消化细胞, 按照 LDH 试剂盒说明进行操作, 于 440 nm 处读取样本 A 值, 根据标准曲线算出酶活力单位。LDH 释放率(%)=细胞培养基中测定的酶活力单位/(细胞裂解液中测定的酶活力单位+细胞培养基中测定的酶活力单位)×100%。

2.4 Hoechst 33342 染色法检测细胞核形态

收集生长状态良好的对数期细胞, 消化制成单细胞悬液并计数, 以每毫升 5×10⁵ 个接种于 12 孔板中, 每孔 2 mL, 按“2.1”项下条件培养至对数期, 弃旧培养液, 分别加入不同浓度 Ost(0, 50, 100 和 200 μ mol·L⁻¹), 作用 24 h, 弃培养液, 用 PBS 洗 2 遍, 加入 0.5 mL 10 μ g·mL⁻¹ Hoechst 33342 染色液, 37 °C 染色 15 min, 荧光倒置显微镜下观察细胞核形态。

2.5 AnnexinV/PI 双染法流式细胞仪检测细胞凋亡

收集生长状态良好的对数期细胞，消化制成单细胞悬液并计数，以每毫升 1×10^6 个接种于 6 孔板中，每孔 2.5 mL，按“2.1”项下条件培养至对数期。弃旧培养液，分别加入不同浓度 Ost(0, 50, 100 和 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)，作用 24 h，收集 6 孔板中的细胞，用 PBS 洗涤 2 次，取 10×10^4 重悬的细胞， $1\ 000 \times g$ 离心 5 min，弃上清，收集细胞。按 AnnexinV-FITC 细胞凋亡检测试剂盒说明操作，加入荧光溶液，混匀。避光孵育，采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

2.6 Western blot 检测蛋白表达

不同浓度 Ost(0, 50, 100 和 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)作用于 L02 细胞 24 h 后，提取各组细胞的蛋白，BCA 法测定蛋白浓度。取蛋白样品，上样 $40 \mu\text{g}$ ，经 12% SDS-PAGE 胶电泳分离，湿式电转法(200 mA，约 2 h)转移至 PVDF 膜，根据 marker 选择目的条带。把剪好的 PVDF 膜置于封闭液中室温 TBST(含 5% 脱脂奶粉)封闭 2 h， $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵一抗过夜。洗膜(3 次，每次 15 min)，二抗室温孵育 2 h，洗膜(3 次，每次 15 min)，滴加 ECL 发光液，显影，Mini-PROTEAN 凝胶成像系统采集图像。用 Image J 软件进行半定量分析。

2.7 统计分析

采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析统计，以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多样本均数比较采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD-T 法， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 Ost 对 L02 细胞活力的影响

L02 细胞以不同浓度 Ost 作用 12, 24, 48 h 后， IC_{50} 分别为(363.90 ± 31.15)，(290.30 ± 17.32)和(134.47 ± 10.11) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，溶剂对照组存活率与空白对照组比较无显著差异。Ost 作用 48 h 后 50, 100, 150, 200, 250 和 $300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组细胞存活率分别为 (80.59 ± 0.03)%，(61.97 ± 0.05)%，(50.87 ± 0.04)%，(32.28 ± 0.04)%，(26.53 ± 0.05)%，(16.37 ± 0.01)%。作用 48 h，Ost 各浓度组的细胞存活率与空白对照组相比，具有显著性差异($P < 0.01$)。相较于 12 h 和 24 h，给药后 48 h 细胞存活率下降更为明显。结果见图 1。

3.2 Ost 对 L02 细胞 LDH 释放率的影响

不同浓度 Ost 作用于 L02 细胞 24 h 后，随着

药物浓度的升高，细胞 LDH 释放率增加，与空白对照组相比，Ost 150 和 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组有显著性差异($P < 0.01$)，表明 Ost 可诱导 L02 细胞损伤，结果见图 2。

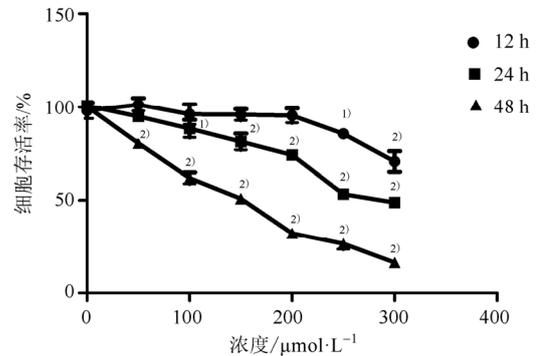


图 1 Ost 在不同浓度和不同时间作用下对 L02 细胞存活率的影响

与空白对照组比较，¹⁾ $P < 0.05$ ，²⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 1 Effect of Ost at different concentrations and indicated time on cell viability in L02 cells

Compared with control group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$.

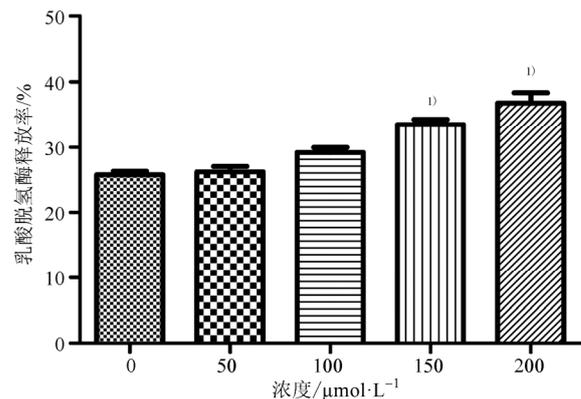


图 2 Ost 对 L02 细胞 LDH 释放率的影响

与空白对照组比较，¹⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 2 Effect of Ost on LDH release in L02 cells

Compared with control group, ¹⁾ $P < 0.01$.

3.3 Ost 对 L02 细胞形态结构的影响

不同浓度 Ost 作用于 L02 细胞 24 h 后，细胞数量随浓度升高减少，贴壁不紧密，形态皱缩变圆，部分脱落。Hoechst 33342 染色后，荧光倒置显微镜观察发现各给药组细胞核固缩、部分破碎、胞质浓缩等凋亡现象，结果见图 3。

3.4 Ost 对 L02 细胞凋亡率的影响

AnnexinV/PI 双染法检测细胞凋亡，流式结果见图 4。随着 Ost 浓度的升高，各组细胞凋亡率逐渐升高；Ost 50, 100 和 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组细胞凋亡率分别为 (15.92 ± 1.65)%，(22.16 ± 3.02)% 和

(27.51 ± 3.69)%, 与对照组相比, 均有显著性差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

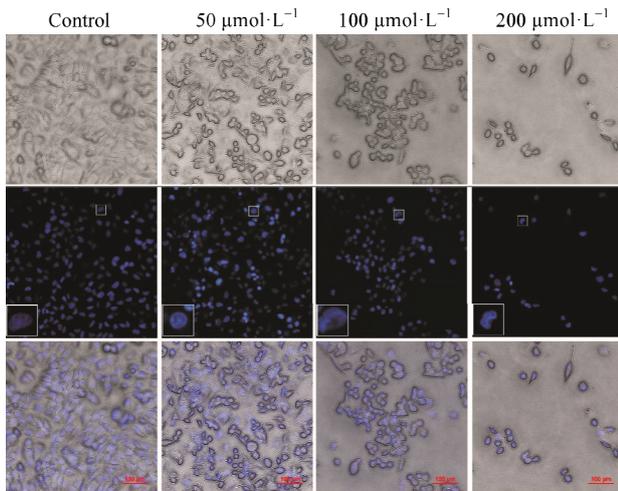


图 3 Ost 对 L02 细胞形态的影响
荧光显微镜观察 Ost 处理 24 h 后 L02 细胞形态及 Hoechst 33342 染色细胞核形态(标尺: 100 μm)

Fig. 3 Effect of Ost on cell morphology of L02 cells
L02 cells after treated with Ost for 24 h and stained with Hoechst 33342 were observed by Fluorescence microscope(scale bar: 100 μm)

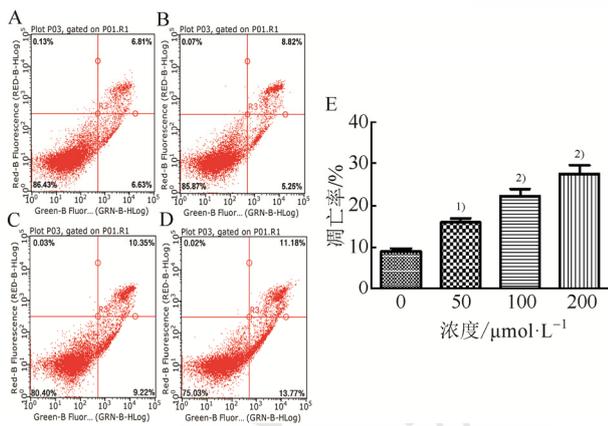


图 4 流式细胞仪检测 L02 细胞凋亡情况
A-对照组; B-50 μmol·L⁻¹组; C-100 μmol·L⁻¹组; D-200 μmol·L⁻¹组; 与空白对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 4 L02 cell apoptosis was detected by flow cytometry
A-control group; B-50 μmol·L⁻¹ group; C-100 μmol·L⁻¹ group; D-200 μmol·L⁻¹ group; compared with control group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

3.5 Ost 对细胞内蛋白水平的影响

与对照组相比, 随着 Ost 浓度升高, Bcl-2、pro-caspase-3 相对表达水平降低; Bax、cleaved-caspase-3(p17)表达升高, 这提示, Ost 可引起细胞凋亡, 很可能是通过线粒体途径发挥作用。100 和 200 μmol·L⁻¹组 p-Histon H3(Ser10)表达水平降低, 说明 Ost 在一定浓度下可抑制 L02 细胞增殖。结果见图 5。

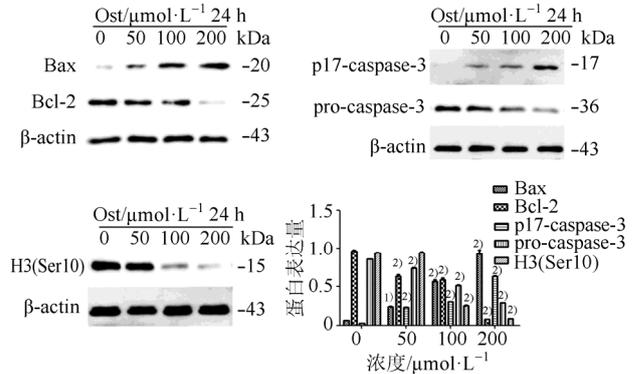


图 5 Western blot 检测 Ost 对 L02 细胞内蛋白相对表达水平的影响
与空白对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 5 Effect of Ost on relative expression levels of proteins in L02 cells by Western blot
Compared with control group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

本研究将 0~300 μmol·L⁻¹的 Ost 作用于 L02 细胞, 细胞活力呈现时间和浓度依赖性降低, 作用 24 h 时 IC₅₀ 为(290.30 ± 17.32)μmol·L⁻¹。随着给药浓度升高, LDH 释放率提高, 150 和 200 μmol·L⁻¹ 给药组与空白对照组相比释放率有显著差异, 说明 Ost 对 L02 细胞有一定的毒性损伤作用。于倒置显微镜下观察细胞形态, 给药后 L02 细胞体积变小, 形态结构损伤增大, 结合 Hoechst 33342 荧光染色可见各给药组细胞核固缩、凝聚, 部分有碎裂。AnnexinV/PI 双染法流式结果显示, 细胞凋亡率随着给药浓度升高而增大。Western blot 检测结果表明, 随着给药浓度的升高, Bcl-2 表达降低, Bax 表达升高, pro-caspase-3 的表达降低、cleaved-caspase-3(p17)表达升高, 表明 Ost 可引起 L02 细胞凋亡, 并且很可能是通过线粒体途径。同时, 高浓度给药组 p-Histon H3(Ser10)表达显著降低, 说明 Ost 在一定浓度下可以抑制 L02 细胞增殖。

细胞凋亡是由基因控制, 以维持内环境稳态为目的而发生的细胞自主有序死亡过程。Bcl-2 和 Bax 分别是 Bcl-2 家族中最具代表性的抑凋亡和促凋亡基因。Bcl-2 蛋白能遏制细胞凋亡, 延长细胞寿命, 参与调控细胞增殖与凋亡的动态平衡; Bax 在接受凋亡信号时, 会形成大量的 Bax-Bax 同源二聚体^[16]导致线粒体功能丧失, 促进线粒体促凋亡因子的释放, 激活下游的 caspase 蛋白, 诱导细胞凋亡^[17-19]。细胞中主要存在 2 条凋亡通路, 即线粒体通路和死亡受体通路, 而这 2 条通路被激活后, 最终的凋亡效应均需经过 caspase-3 来执

行, 因此 caspase-3 是凋亡通路中的关键效应蛋白^[20]。被激活呈活化的 caspase-3 可以酶切多聚二磷酸腺苷聚合酶(ADP-核糖, PARP)片段化, 降解细胞, 并最终导致细胞形态改变, 发生凋亡^[21]。细胞增殖是细胞生命活动的重要特征之一, 组蛋白 H3 氨基末端的磷酸化与细胞有丝分裂过程密切相关^[22]。有研究表明, 组蛋白 H3(Ser10)磷酸化在诱导细胞增殖和恶性转化中有重要作用^[23]。p-Histon H3(Ser10)为有丝分裂的标志蛋白^[24], 其表达的下调能影响有丝分裂进程, 造成周期阻滞, 影响细胞增殖。

综上所述, Ost 可能通过线粒体途径诱导 L02 细胞凋亡, 并可下调 p-Histon H3(Ser10)的表达, 抑制细胞增殖。本研究初步阐明了 Ost 的毒性作用及机制, 说明 Ost 可能存在一定的肝脏毒性, 为中药蛇床子的开发和安全应用提供了参考。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2015: 附录 315.
- [2] GE J R, ZHENG H X, WAN X M. Expert consensus on the prevention and treatment for primary osteoporosis with traditional Chinese medicine [J]. Chin J Osteoporosis(中国骨质疏松杂志), 2015, 21(9): 1023-1028.
- [3] 张敏建, 常德贵, 贺占举, 等. 勃起功能障碍中西医结合诊疗指南(试行版)[J]. 中华男科学杂志, 2016, 22(8): 751-757.
- [4] QIN G, LI Y, PEI X, et al. Expert consensus of impotence treatment based on liver depression blood stasis and deficiency of kidney [J]. Liaoning J Tradit Chin Med(辽宁中医杂志), 2016, 43(8): 1622-1625.
- [5] LIAO P C, CHIEN S C, HO C L, et al. Osthole regulates inflammatory mediator expression through modulating NF- κ B, mitogen-activated protein kinases, protein kinase C, and reactive oxygen species [J]. J Agric Food Chem, 2010, 58(19): 10445-10451.
- [6] YANG D, GU T, WANG T, et al. Effects of osthole on migration and invasion in breast cancer cells [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2010, 74(7): 1430-1434.
- [7] ZHAO Y J, TANG D Z, CHENG S D, et al. Comparison study of the effect of different doses of osthole on OPG knockout mice and OVX rats [J]. Chin J Osteoporosis(中国骨质疏松杂志), 2015, 21(2): 147-151.
- [8] ZHANG Z R, LEUNG W N, CHEUNG H Y, et al. Osthole: a review on its bioactivities, pharmacological properties, and potential as alternative medicine [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2015: 919616. Doi: 10.1155/2015/919616.
- [9] WANG Q, ZHENG H, ZHOU Y, et al. Effect of osthole on the anti-breast cancer activity of TRAIL and its mechanism [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2016, 33(9): 1141-1147.
- [10] CHEN Y, WANG J, CHEN S, et al. Screening on toxicity of 26 kinds of common orthopedic herbal medicine using Zebrafish model [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med(南京中医药大学学报), 2016, 32(5): 465-469.
- [11] 华桦, 赵军宁, 邓治文. 中药蛇床子的化学、药理毒理及临床应用研究进展[C]. 2010 年全国中药学术研讨会论文集, 2010.
- [12] 王亮, 江涛, 冯毅凡, 等. 代谢组学评价蛇床子提取物对大鼠毒理作用的初步研究[J]. 亚太传统医药, 2010, 6(10): 20-22.
- [13] 华桦, 赵军宁, 鄢良春, 等. 蛇床子毒性效应谱及剂量-反应关系研究[J]. 中药药理与临床, 2012, 28(5): 134-137.
- [14] LI W N, XIAO G, LU D, et al. LD₅₀ determination of osthole in mice [J]. J Mod Med Health(现代医药卫生), 2013, 29(10): 1444-1445.
- [15] 杨兴国, 刘晓龙. 蛇床子素对小鼠急性毒性的研究[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2013(8): 196-198.
- [16] WANG Q Q, ZHANG W L, YUAN X D, et al. Effect of mitochondria in apoptosis [J]. Med Innov China(中国医学创新), 2015(6): 143-146.
- [17] LIN C H, WU M R, LI C H, et al. Editor's highlight: Periodic exposure to smartphone-mimic low-luminance blue light induces retina damage through Bcl-2/Bax-dependent apoptosis [J]. Toxicol Sci, 2017, 157(1): 196-210.
- [18] FAN X, XI H, ZHANG Z, et al. Germ cell apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax in porcine testis under normal and heat stress conditions [J]. Acta Histochem, 2017, 119(3): 198-204.
- [19] LIU Z, DING Y, YE N, et al. Direct activation of Bax protein for cancer therapy [J]. Med Res Rev, 2015, 36(2): 313-341.
- [20] GARG A D, NOWIS D, GOLAB J, et al. Photodynamic therapy: illuminating the road from cell death towards anti-tumour immunity [J]. Apoptosis, 2010, 15(9): 1050-1071.
- [21] ZHONG M, YANG X F, DENG S P. Research progress in intrinsic and extrinsic mechanism of cell apoptosis [J]. Pract J Clin Med(实用医院临床杂志), 2014, 11(2): 170-174.
- [22] LI B, WAN Z, WANG H, et al. The role of histone H3 phosphorylation at Ser10 in regulating proliferation and transformation of human nasopharyngeal carcinoma cells [J]. Tumor(肿瘤), 2014, 34(10): 894-902.
- [23] LI B B, WAN Z, WANG H G, et al. The role of histone H3 phosphorylation at Ser10 in regulating proliferation and transformation of human nasopharyngeal carcinoma cells [J]. Tumor(肿瘤), 2014, 34(10): 894-901.
- [24] WANG B, MA W, XU X, et al. Phosphorylation of histone H3 on Ser10 by auto-phosphorylated PAK1 is not essential for chromatin condensation and meiotic progression in porcine oocytes [J]. J Anim Sci Biotechnol, 2013, 4(1): 13. Doi: 10.1186/2049-1891-4-13.

收稿日期: 2017-11-22
(本文责编: 曹粤锋)