

- [5] LUO X M, ZHANG Y, HUANG D D, et al. Content determination of total flavonoids in extracts from *Ficus Carica* by UV-visible spectrophotometry [J]. *Chin Pharm(中国药房)*, 2015, 26(15): 2111-2113.
- [6] XU M J, NI J, CHEN Y, et al. Simplification of determination method for total flavonoids in *Lycium barbaru* L. and establishing kinetic model for water extraction process [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊)*, 2015, 33(2): 330-333.
- [7] LU L N, ZHAO W C, LI D, et al. Study on the anti-tumor activity of ethanol extracts of *Clematis huchouensis* Tamura on K562 and MGC-803 *in vitro* [J]. *J Zhejiang Tradit Chin Med Univ(浙江中医药大学学报)*, 2012, 36(7): 845-848.
- [8] ZHANG D T, ZHANG X, HAO X J, et al. Effects of total flavonoids of *Lycium barbarum* L. on proliferation and apoptosis of human gastric cancer cell lines SGC-7901 [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药)*, 2014, 25(11): 2634-2637.
- [9] LI B, HU G S, HU L L, et al. Isolation and determination of biflavonoids in *Ginkgo biloba* leaves [J]. *Chin Tradit Herb Drug(中草药)*, 2014, 45(17): 2552-2555.

收稿日期: 2015-10-16

MCL-1 siRNA 通过线粒体凋亡途径部分逆转耐顺铂结肠癌细胞系 SW480 的耐药性

徐烨, 郁峰, 崔俊辉, 陈诚豪, 都志军(浙江省立同德医院肛肠科, 杭州 310012)

摘要: 目的 探讨顺铂耐药结肠癌细胞的 MCL-1 表达水平与顺铂耐药性的关系。方法 用 MTT 法检测顺铂耐药结肠癌细胞系 SW480(SW480-R)对顺铂的敏感性。通过检测 siRNA 下调 SW480-R 细胞 MCL-1 的表达作用观察其对细胞耐药性的影响。Western blot 试验检测 SW480-R 细胞 Bcl-2 家族蛋白及线粒体来源促凋亡因子的表达水平。Annexin V/PI 染色检测 SW480-R 细胞的凋亡。结果 SW480-R 细胞相比于常规 SW480 细胞对顺铂的敏感性显著下降, Western blot 结果表明 SW480-R 细胞的 MCL-1 水平显著上调而其他 Bcl-2 蛋白家族成员(Bcl-2, Bcl-xl, BIM, BAK, BAX)表达水平变化不明显。体外转染 MCL-1 siRNA 能逆转 SW480-R 细胞的耐药性, 提高顺铂对 SW480-R 的杀伤活性。在 SW480-R 细胞中, MCL-1 siRNA 能促进线粒体来源的促凋亡因子(细胞色素 C、凋亡诱导因子、Smac/DIABLO)在顺铂治疗下从线粒体中释放到细胞质中, 进而诱导耐药肿瘤细胞发生凋亡。结论 MCL-1 的高表达可能是结肠癌细胞产生顺铂耐药性的重要机制, MCL-1 基因沉默能通过线粒体凋亡途径逆转耐顺铂结肠癌细胞系 SW480 的耐药性。

关键词: MCL-1; 结肠癌; SW480-R; 顺铂; 凋亡

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2016)07-0883-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.07.012

MCL-1 siRNA Reverses the Chemoresistance of Cisplatin-resistant SW480 Cells via the Pathway of Mitochondrial Apoptosis

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 relationship between the expression of MCL-1 and the cisplatin-resistance in cisplatin-resistant colon cancer cells. **METHODS** MTT assay was performed to evaluate the sensitivity of cisplatin-resistant SW480(SW480-R) cells to cisplatin. RNA interference was used to down-regulate the expression of MCL-1, detecting the role of MCL-1 siRNA in chemoresistance in SW480-R. Western blot analysis was performed to measure the expression of BCL-2 family proteins and mitochondria-derived pro-apoptotic proteins. The apoptosis of SW480-R cells was determined by Annexin V/PI staining. **RESULTS** The sensitivity of SW480-R to cisplatin was significantly reduced compared with the routine SW480 cells. The results of Western blot assay indicated the level of MCL-1 was significantly up-regulated in SW480-R, whereas the other Bcl-2 family proteins (Bcl-2, Bcl-xl, BIM, BAK, and BAX) were not influenced obviously. Transfection of MCL-1 siRNA *in vitro* could reverse the drug-resistance in SW480-R, enhancing the anti-tumor effect of cisplatin. Furthermore, the MCL-1 siRNA promoted the release of mitochondria-derived pro-apoptotic factors (cytochrome C, Smac/DIABLO, apoptosis inducing factor) into cytoplasm in SW480-R cells treated with cisplatin, leading to the induction of apoptosis. **CONCLUSION** Overexpression of MCL-1 is one of the most important mechanisms for the induction of chemoresistance in colon cancer. Knockdown of MCL-1 can reverse the chemoresistance of cisplatin-resistant SW480 cells via the pathway of mitochondrial apoptosis.

KEY WORDS: MCL-1; colon cancer; SW480-R; cisplatin; apoptosis

作者简介: 徐烨, 女, 硕士, 主治医师

Tel: (0571) 89972372

E-mail: tongdexuye@163.com

结肠癌是常见发生于结肠部位的消化道恶性肿瘤, 发病率在胃肠道肿瘤中排第 3 位, 致死率非常高^[1-2]。顺铂(cis-diamine dichloroplatinum, CDDP)是治疗多种肿瘤(包括结肠癌)的一线化疗药物, 研究表明顺铂属于细胞毒性药物, 通过损伤肿瘤细胞的 DNA 从而诱导肿瘤细胞进入凋亡程序^[3-4]。然而, 肿瘤细胞在化疗过程中往往会产生耐药性, 而这一过程的 1 个重要机制就是肿瘤细胞能通过改变自身凋亡相关蛋白的表达谱使细胞逃避诸如 DNA 损伤等信号诱导的细胞凋亡^[5]。Bcl-2 蛋白家族是调控细胞凋亡的重要因子, 肿瘤细胞往往通过改变 Bcl-2 蛋白家族的表达谱保护细胞逃避凋亡程序。另外, 研究还发现肿瘤细胞 Bcl-2 蛋白表达谱的改变和化疗耐药有关, 抗凋亡蛋白的高度表达能直接导致肿瘤细胞对化疗药物的抵抗性^[6-7]。因此本研究探讨结肠癌细胞在发生顺铂耐药后, 其 Bcl-2 家族蛋白表达是否发生变化, 并以此为靶点研究逆转结肠癌耐药的新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

噻唑蓝(MTT, 批号: M5655)、CDDP(批号: P4394)和 Annexin V/PI(批号: APOAF)凋亡检测试剂盒均购于美国 Sigma-Aldrich; DMEM 培养基、胎牛血清均购于美国 Gibco; 细胞蛋白提取液、MCL-1、Bcl-2、Bcl-xl、BIM、BAK、BAX、细胞色素 C(Cyto-C)、Smac/DIABLO、凋亡诱导因子(AIF)、caspase-9、caspase-3 和 β -actin 抗人抗体均购于美国 Cell Signaling; MCL-1 siRNA(上海吉玛生物), 正向引物: 5'-CCCGCCGAAUUCAUUA AUUUUU-3', 反向引物: 5'-UAAAUUAAUGA AUUCGGCGGGU-3'; Lipofectamine 2000(美国 Invitrogen); ECL 试剂盒(美国 Pierce, 批号: 32106)。

1.2 细胞培养

人结肠癌细胞系 SW480 购于美国 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% CO₂。顺铂耐药的 SW480 细胞系(SW480-R)采用梯度顺铂暴露法自行培养获得^[8]。先将 SW480 细胞培养在 0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CDDP 中培养 12 周, 之后每 3 周将顺铂浓度提高 0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。当顺铂浓度提高到 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 后, 将该 SW480 细胞持续培养在含 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CDDP 的培养基中, 待总培养时间达到

12 个月后, SW480-R 细胞构建完成。后续实验开始前, 将 SW480-R 细胞移至无 CDDP 培养基中培养 2 周, 消除残留 CDDP 对实验的干扰。

1.3 细胞活力检测

将肿瘤细胞按每孔 5×10^3 个接种在 96 孔板上, 按照实验设计将 50 $\text{pmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 MCL-1 siRNA 用 Lipofectamine 2000 试剂转染入肿瘤细胞中, 培养 48 h, 然后更换新鲜培养基。将 SW480 细胞和 SW480-R 细胞分别用 0~10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 顺铂及 0~35 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 顺铂处理 48 h。之后加入 20 mL MTT (5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)培养 4 h, 移除孔内培养基, 加入 100 μL 二甲亚砜, 570 nm 处测定 OD 值。细胞活力结果用实验组与对照组的 OD 值比值表示。顺铂的 IC₅₀ 根据细胞活力曲线获得。

1.4 线粒体分离

SW480-R 细胞收集后用冰预冷的生理盐水洗 1 次并将其重悬在地高辛裂解缓冲液中(150 μg 地高辛溶解于 1 mL 500 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的蔗糖溶液中), 在 12 000 $\times g$ 下 4 °C 离心 30 min, 沉淀即为线粒体, 而上清则为细胞质。取线粒体沉淀和上清液各一滴, 用 0.02% 詹纳斯绿 B 染液盖上盖片染 20 min。10 $\times$ 100 倍油镜下观察, 线粒体被詹纳斯绿 B 染成蓝绿色^[9]。经过观察发现染色后线粒体沉淀部分有大量蓝绿色颗粒状线粒体, 而上清液部分无蓝绿色颗粒状线粒体。

1.5 Western blot 试验

将 SW480 或 SW480-R 细胞用生理盐水洗涤 2 遍后用蛋白提取液提取总蛋白质, 总蛋白质用于 MCL-1、Bcl-2、Bcl-xl、BIM、BAK、BAX、caspase-9 和 caspase-3 的检测。SW480-R 细胞经过线粒体分离后, 线粒体部分再用蛋白提取液进行处理, 裂解线粒体并提取其蛋白, 上清细胞质部分可直接用于 Western blot 试验, 分离的线粒体和细胞质蛋白提取液用于细胞色素 C(Cyto-C)、Smac/DIABLO 和凋亡诱导因子(AIF)的检测。在进行 Western blot 实验时, 蛋白提取液用 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 MCL-1、Bcl-2、Bcl-xl、BIM、BAK、BAX、Cyto-C、Smac/DIABLO、AIF、caspase-9、caspase-3 或 β -actin 单克隆抗体孵育过夜, 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。目的蛋白的相对表达用目标蛋白灰度值与 β -actin 灰度值的比值

表示, 蛋白灰度值分析用 Image J 软件处理。

1.6 细胞凋亡试验

将 SW480-R 细胞按每孔 5×10^4 个接种在 6 孔板上, 按照实验设计将 $50 \text{ pmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MCL-1 siRNA 用 Lipofectamine 2000 试剂转染入细胞中, 培养 48 h, 然后更换新鲜培养基再加 CDDP 培养 48 h。之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碘化丙啶(PI)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, 凋亡率用 annexin-V 阳性、PI 阴性细胞数占总细胞数的百分比表示。

1.7 统计学方法

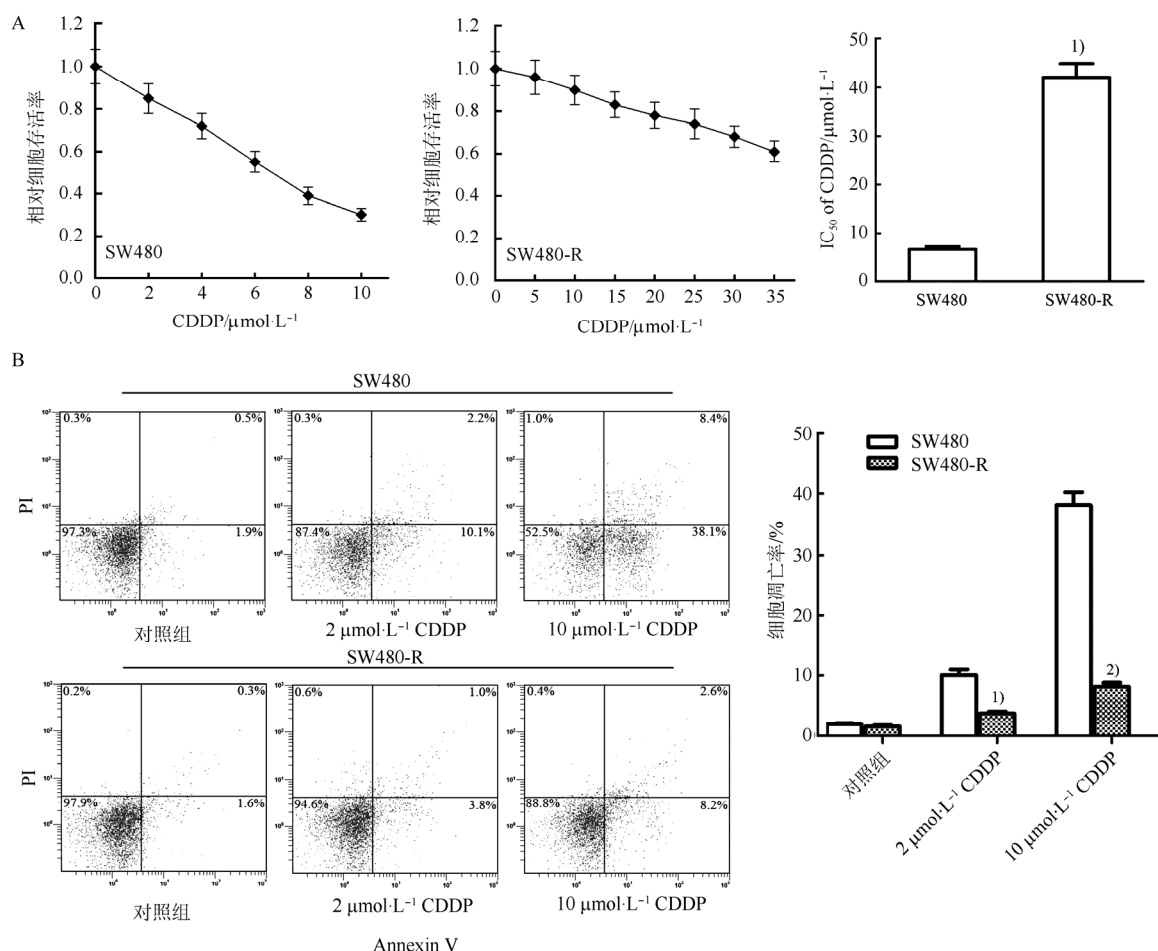
实验重复 3 次, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示并用 SPSS 15.0 统计分析软件进行处理, P 值计算采用非配对双边 t 检验进行分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MCL-1 的过表达可能是 SW480 细胞顺铂耐药的重要机制

MTT 法检测 SW480 细胞和 SW480-R 细胞的细胞活力, 结果发现 SW480-R 细胞对 CDDP 的敏

感性(其 IC_{50} 约为 $43.1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)显著低于常规 SW480 细胞(其 IC_{50} 约为 $6.6 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 见图 1A。流式细胞术结果表明, SW480 细胞和 SW480-R 细胞用相同浓度(2 或 $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的顺铂处理后, SW480-R 细胞的凋亡率显著低于 SW480 细胞, 见图 1B, 表明 SW480-R 细胞能抵抗顺铂诱导的凋亡。为了研究其可能的机制, 用 Western blot 试验检测了 SW480 细胞和 SW480-R 细胞凋亡相关蛋白的表达水平, 结果发现相比于 SW480 细胞, SW480-R 细胞的 MCL-1 表达水平显著提高, 而其他 Bcl-2 蛋白家族成员(Bcl-2、Bcl-xl、BIM、BAK、BAX)及 caspase-9 和 caspase-3 的表达水平变化不明显, 见图 1C, 提示 MCL-1 的过表达可能和 SW480 的顺铂耐药有关。为了验证这一假设, 通过基因沉默技术在 SW480-R 细胞中转染 MCL-1 小干扰 RNA, 结果细胞中的 MCL-1 表达水平显著降低, 见图 2A。同时, 转染 MCL-1 siRNA 后, 发现顺铂($0 \sim 40 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)对 SW480-R 的杀伤活性相比于对照 siRNA 组显著提高, 见图 2B。这些结果提示 MCL-1 的过表达可能是 SW480 细胞顺铂耐药的重要机制。



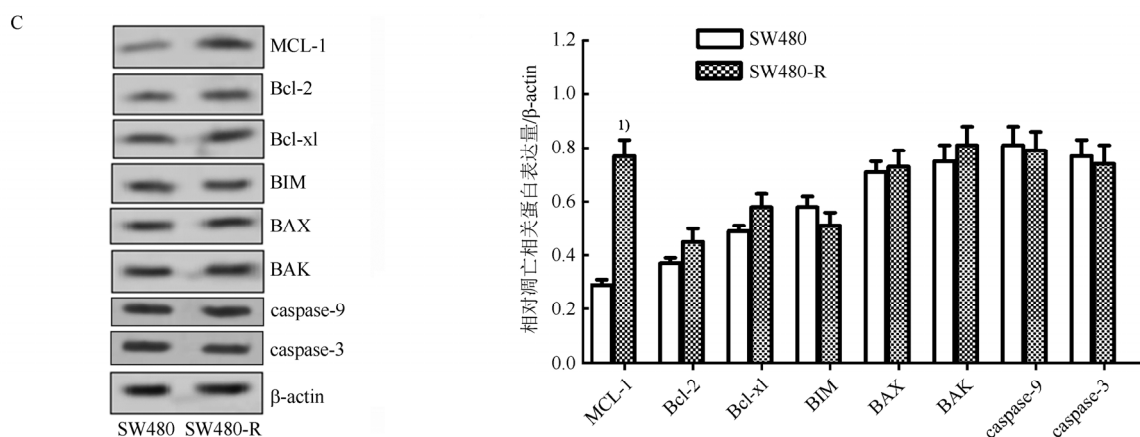


图1 MCL-1 在 SW480-R 细胞中过表达

A-SW480 和 SW480-R 细胞的细胞活力; B-SW480 和 SW480-R 细胞的凋亡率; C-SW480 和 SW480-R 细胞 Bcl-2 家族蛋白的相对表达水平; 与 SW480 细胞比较, ¹⁾ $P < 0.05$ 。

Fig. 1 MCL-1 was overexpressed in SW480-R cells

A-the sensitivity of SW480-R and SW480 cells; B-the apoptotic rate of SW480 and SW480 cells; C-the relative expression of Bcl-2 family proteins in SW480-R and SW480 cells. Compared with the SW480 cells, ¹⁾ $P < 0.05$.

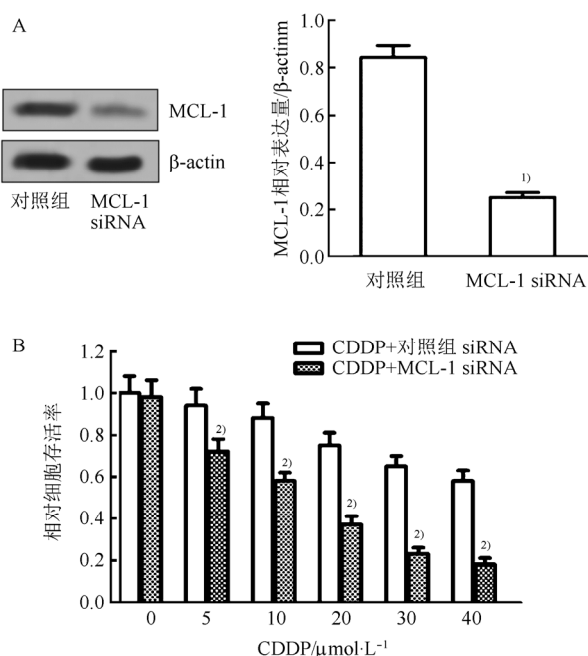


图2 MCL-1 siRNA 显著提高 SW480-R 细胞对顺铂的敏感性

A-SW480-R 细胞的 MCL-1 表达水平; B-SW480-R 细胞的细胞活力; 与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$; 与相应浓度 CDDP+对照组 siRNA 比较, ²⁾ $P < 0.05$ 。

Fig. 2 MCL-1 siRNA increased the sensitivity of SW480 cells to cisplatin.

A-the expression of MCL-1 in SW480-R cells; B-the cell viability of SW480-R cells; compared with the control group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with CDDP+control siRNA group, ²⁾ $P < 0.05$.

2.2 MCL-1 siRNA 通过促进线粒体途径的凋亡抑制 SW480-R 细胞的顺铂耐药性

为了进一步探讨 SW480-R 细胞中 MCL-1 的

功能, 将 SW480-R 细胞用 CDDP ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 MCL-1 siRNA 联合治疗后, 通过流式细胞术检测其凋亡。发现 CDDP 联合 MCL-1 siRNA 治疗组的细胞凋亡率相比于 CDDP 单治疗组显著提高, 结果见图 3。表明在 SW480-R 细胞中沉默 MCL-1 的表达能显著增强顺铂对耐药肿瘤细胞的凋亡诱导能力。同时, 通过对凋亡通路的研究发现, CDDP ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 单独治疗 SW480-R 细胞后, 细胞质中的凋亡活性物质增加不明显。而将细胞用 MCL-1 siRNA 沉默 MCL-1 基因后, CDDP 显著诱导凋亡活性物质(Cyto-C、AIF、Smac/DIABLO)从线粒体中释放到细胞质中, 进而诱导 SW480-R 细胞 caspase-9 及 caspase-3 的活化, 使肿瘤细胞发生凋亡, 结果见图 4。

3 讨论

MCL-1 是 Bcl-2 蛋白家族中的抗凋亡蛋白成员, 能与 Bcl-2 促凋亡蛋白成员结合, 从而抑制它们的凋亡诱导活性^[10-12]。文献报道 MCL-1 在多种人类恶性肿瘤细胞中均高度表达, 通过保护肿瘤细胞的存活促进肿瘤的发展^[13]。因此 MCL-1 可能成为肿瘤治疗的新靶点。同时, MCL-1 还被报道与肿瘤的化疗耐药有关, 如高表达 MCL-1 的口腔癌患者往往预后不良, 且表现出对多种化疗药物的抵抗^[14]; 高表达 MCL-1 的黑色瘤细胞则往往会形成对蛋白酶体抑制剂硼替佐米的耐药性^[15]。在本研究中, 发现耐顺铂 SW480 细胞株的 MCL-1 表达水平异常升高, 而 caspase-9, caspase-3 及其他

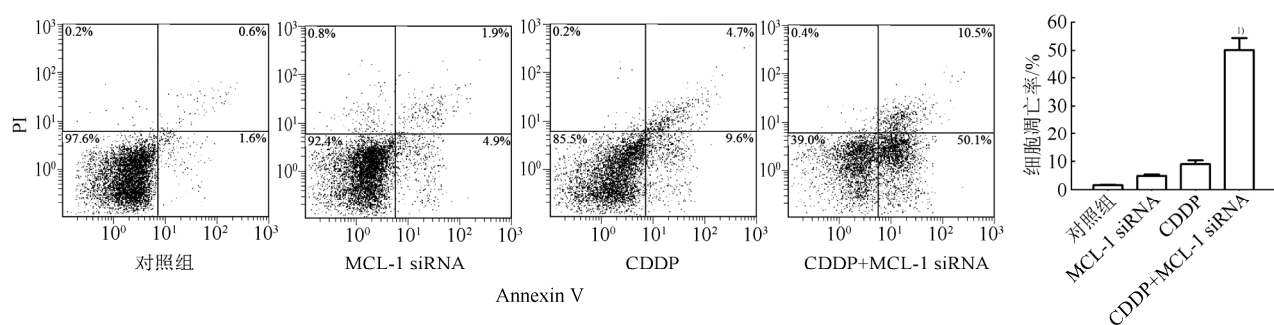


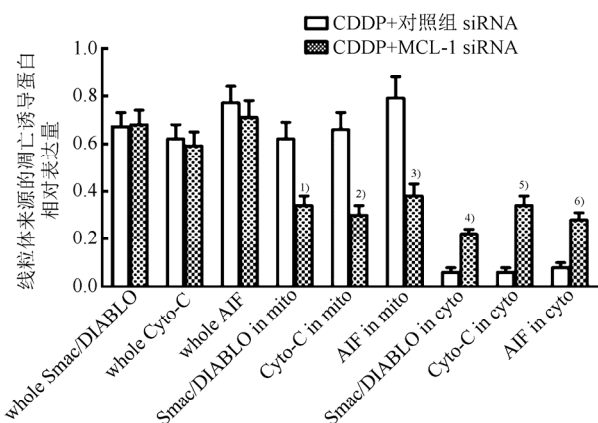
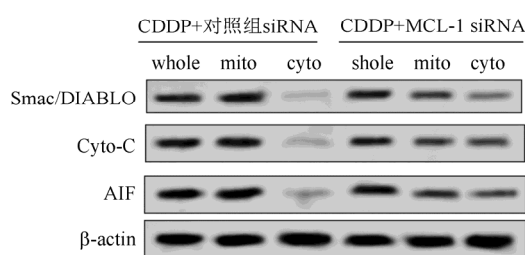
图3 SW480-R 细胞的凋亡率

与 CDDP 单治疗组比较, ¹⁾ $P < 0.05$ 。

Fig. 3 The apoptotic rate of SW480-R cells

Compared with the CDDP single treatment group, ¹⁾ $P < 0.05$.

A



B

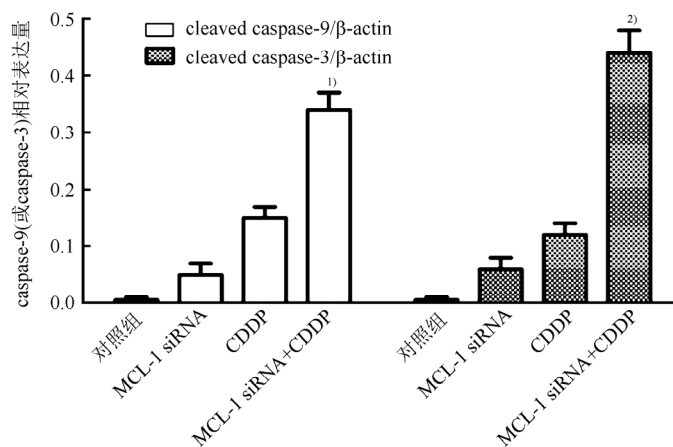
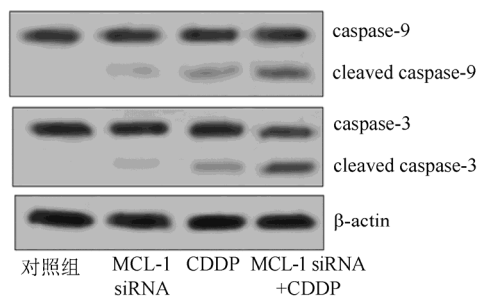


图4 顺铂联合 MCL-1 siRNA 诱导 SW480-R 细胞发生线粒体途径的凋亡

A-SW480-R 细胞中 Smac/DIABLO、细胞色素 C 和 AIF 在线粒体和细胞质中的表达水平; 与线粒体中的 Smac/DIABLO 相对表达水平比较, ¹⁾ $P < 0.05$; 与线粒体中的细胞色素 C 相对表达水平比较, ²⁾ $P < 0.05$; 与线粒体中的 AIF 相对表达水平比较, ³⁾ $P < 0.05$; 与细胞质中的 Smac/DIABLO 相对表达水平比较, ⁴⁾ $P < 0.05$; 与细胞质中的细胞色素 C 相对表达水平比较, ⁵⁾ $P < 0.05$; 与细胞质中的 AIF 相对表达水平比较, ⁶⁾ $P < 0.05$; B-SW480-R 细胞 caspase-9 和 caspase-3 的表达水平; 与 CDDP 单治疗组的活化 caspase-9 相对表达水平比较, ¹⁾ $P < 0.05$; 与 CDDP 单治疗组的活化 caspase-3 相对表达水平比较, ²⁾ $P < 0.05$

Fig. 4 Combination with cisplatin and MCL-1 siRNA induced mitochondrial apoptosis in SW480-R cells.

A-expression of Smac/DIABLO, cytochrome C, and AIF in mitochondria and cytoplasm in SW480-R cells; compared with the relative expression of Smac/DIABLO in mitochondria, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with the relative expression of cytochrome C in mitochondria, ²⁾ $P < 0.05$; compared with the relative expression of AIF in mitochondria, ³⁾ $P < 0.05$; compared with the relative expression of Smac/DIABLO in cytoplasm, ⁴⁾ $P < 0.05$; compared with the relative expression of cytochrome C in cytoplasm, ⁵⁾ $P < 0.05$; compared with the relative expression of AIF in cytoplasm, ⁶⁾ $P < 0.05$; B-expression of caspase-9 and caspase-3 in SW480-R cells; compared with the relative expression of caspase-9 in CDDP single treatment group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with the relative expression of caspase-3 in CDDP single treatment group, ²⁾ $P < 0.05$.

抗凋亡蛋白如 Bcl-2、Bcl-xl 和促凋亡蛋白如 BIM、BAK、BAX 的表达水平变化相对不明显。同时,当耐顺铂 SW480 细胞株的 MCL-1 基因被小干扰 RNA 沉默后,SW480-R 的顺铂耐药性显著降低。这些结果表明结肠癌的顺铂耐药和 MCL-1 的高表达密切相关。

凋亡程序能帮助机体清除过剩及受损的细胞,从而维持机体内环境的稳定。然而,肿瘤细胞却能避开机体的免疫监视,从而逃逸凋亡程序。因此,化疗药物治疗肿瘤的一个重要机制就是诱导肿瘤细胞发生凋亡^[16]。Bcl-2 家族蛋白是细胞中重要的凋亡调节蛋白,能通过调控线粒体膜孔道的开放决定细胞是否进入凋亡程序。Bcl-2 蛋白家族分为抗凋亡蛋白(如 BCL-2、BCL-xL、Mcl-1)和促凋亡蛋白(如 BIM、BAK、BAX)2 个亚型^[17]。促凋亡蛋白的活化能打开线粒体的膜孔道,使凋亡活性物质(如 Smac/DIABLO、AIF 和细胞色素 C)从线粒体释放到细胞质中,进而激活 caspase-9 和 caspase-3,介导线粒体途径的凋亡。而抗凋亡蛋白则能通过 BAX/BAK 途径抑制线粒体膜孔道的开放,从而避免细胞进入凋亡程序^[18]。在本研究中,发现当顺铂耐药 SW480 细胞的抗凋亡蛋白 MCL-1 被沉默后,SW480-R 细胞恢复了对顺铂的敏感性,线粒体内凋亡活性物质的释放被显著激活,进而诱导 caspase-9 和 caspase-3 的活化,使 SW480-R 细胞进入凋亡程序。

综上所述,本研究证明了 MCL-1 的高度表达式结肠癌的化疗耐药的重要机制之一,下调肿瘤细胞中 MCL-1 的表达水平能通过线粒体凋亡途径提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性。因此靶向 MCL-1 的基因治疗有望成为逆转肿瘤的化疗耐药的新方法。

REFERENCES

- [1] XIAO X H, GONG R S, JIANG J W, et al. Effects of active monomer PP-22 purified from *Paridis Rhizoma* on proliferation and apoptosis of human colorectal cancer SW620 cells [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2015, 32(10): 1175-1180.
- [2] JAFRI S H, MILLS G. Lifestyle modification in colorectal cancer patients: an integrative oncology approach [J]. *Future Oncol*, 2013, 9(2): 207-218.
- [3] CAVALLO F, FELDMAN DR, BARCHI M. Revisiting DNA damage repair, p53-mediated apoptosis and cisplatin sensitivity in germ cell tumors [J]. *Int J Dev Biol*, 2013, 57(2-4): 273-280.
- [4] GABRIEL M, DELFORGE Y, LAMBERT C, et al. Role of the splicing factor SRSF4 in cisplatin-induced modifications of pre-mRNA splicing and apoptosis [J]. *BMC Cancer*, 2015(15): 227.
- [5] OZAKI T, NAKAMURA M, SHIMOZATO O. Novel implications of DNA damage response in drug resistance of malignant cancers obtained from the functional interaction between p53 family and RUNX2 [J]. *Biomolecules*, 2015, 5(4): 2854-2876.
- [6] DANIAL N N. BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(24): 7254-7263.
- [7] CHEN L, BOURGUIGNON L Y. Hyaluronan-CD44 interaction promotes c-Jun signaling and miRNA21 expression leading to Bcl-2 expression and chemoresistance in breast cancer cells [J]. *Mol Cancer*, 2014(13): 52.
- [8] OU Y, ZHAI D, LI X, et al. Downregulation of miR-363 increases drug resistance in cisplatin-treated HepG2 by dysregulating Mcl-1 [J]. *Gene*, 2015, 572(1): 116-122.
- [9] GHAZI-KHANSARI M, MOHAMMADI-BARDBORI A, HOSSEINI M J. Using Janus green B to study paraquat toxicity in rat liver mitochondria: role of ACE inhibitors (thiol and nonthiol ACEi) [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2006(1090): 98-107.
- [10] VARADARAJAN S, BUTTERWORTH M, COHEN G M, et al. Sabutoclax (BI97C1) and BI112D1, putative inhibitors of MCL-1, induce mitochondrial fragmentation either upstream of or independent of apoptosis [J]. *Neoplasia*, 2013, 15(5): 568-578.
- [11] LYU X A, WANG B, CHEN J B, et al. Effect and mechanism of miR-363 on cisplatin-treated breast cancer cells [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2015, 32(9): 1041-1046.
- [12] LIU X M, SHI X J, GUO X D, et al. Feasibility study of donepezil hydrochloride extended-release tablets prepared with gel-forming matrix material [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2015, 32(11): 1346-1349.
- [13] THOMAS L, LAM C, EDWARDS S. Mcl-1 the molecular regulation of protein function [J]. *FEBS Lett*, 2010, 584(14): 2981-2989.
- [14] PALVE V, MALLICK S, TENI T, et al. Overexpression of Mcl-1L splice variant is associated with poor prognosis and chemoresistance in oral cancers [J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e111927.
- [15] NGUYEN M, MARCELLUS R C, SHORE G C, et al. Small molecule obatoclax (GX15-070) antagonizes MCL-1 and overcomes MCL-1-mediated resistance to apoptosis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(49): 19512-19517.
- [16] MAKIN G. Targeting apoptosis in cancer chemotherapy [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2002, 6(1): 73-84.
- [17] BESBES S, MIRSHAHI M, BILLARD C, et al. New dimension in therapeutic targeting of BCL-2 family proteins [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(15): 12862-12871.
- [18] LOPEZ J, TAIT S W. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within [J]. *Br J Cancer*, 2015, 112(6): 957-962.

收稿日期: 2015-12-03