

• 基础研究 •

白藜芦醇对人子宫内膜癌细胞系 AN3CA 增殖和凋亡效应
及其机制探讨 *王清莹 姜飞洲 庄玉玉 万小平[△]

(上海交通大学附属国际和平妇幼保健院 上海 200030)

摘要 目的 探讨白藜芦醇(resveratrol, Res)对人子宫内膜癌细胞 AN3CA 的增殖抑制和凋亡诱导效应及可能存在的机制。方法: 应用噻唑蓝(MTT)法检测 Res 对 AN3CA 的增殖影响; 流式细胞术检测 Res 对细胞周期分布和凋亡影响; 荧光实时定量 PCR 检测 Res 对细胞 Bcl-2、Bax 和 MMP-9mRNA 表达水平的影响; Western Blot 方法检测 Res 对 PCNA、Bcl-2、Bax 及 ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白表达水平的影响。结果: Res 对子宫内膜癌细胞 AN3CA 具有显著的生长抑制作用($P < 0.01$) , 呈时间 - 剂量依赖性; 不同浓度 Res 处理细胞 G0/G1 期比例显著增加伴随 S 期细胞数的减少; 细胞凋亡率明显增高, 200 μ mol/l Res 处理 48h 凋亡率可达 30.96% $\pm$ 2.041% ($P < 0.01$)。与对照组相比, Res 能抑制 PCNA 的蛋白表达量, 增加 Bax 和降低 Bcl-2 转录和蛋白水平的表达量。Res 在短时间内(0.5-1h)激活 ERK1/2 的磷酸化表达但随着作用时间延长(4-48h)其表现为抑制效应。结论: Res 具有抑制 AN3CA 细胞增殖, 诱导细胞 G0/G1 期阻滞和凋亡的效应。Res 诱导凋亡可能是通过上调 Bax, 下调 Bcl-2 发挥作用, 其抗癌作用机制可能与 ERK1/2 通路失调相关。

关键词 白藜芦醇; 子宫内膜癌; ERK1/2 通路; 增殖; 凋亡

中图分类号: R737.33 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2011)13-2401-04

Effects of Resveratrol on Proliferation and Apoptosis of Endometrial
Carcinoma AN3CA Cells and Its Mechanism*

WANG Qing-ying, JIANG Fei-zhou, ZHUANG Yu-yu, WAN Xiao-ping

(Shanghai Jiao Tong University Affiliated the International Peace Maternity and Child Health Hospital of the China
Welfare Institute, Shanghai 200030, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of resveratrol (Res) on proliferation and apoptosis of endometrial cancer cell lines AN3CA and explore the involved mechanism in vitro. **Methods:** AN3CA cells were treated with different concentrations of resveratrol for various periods. The cell growth inhibitory rate was examined by MTT assay. The cell cycle arrest and apoptosis induction of resveratrol in AN3CA cells were detected by flow-cytometry analysis. We utilized real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) to identify expression level of Bcl-2, Bax and MMP-9 mRNA. The protein expression level of PCNA, Bcl-2, Bax, ERK1/2 and p-ERK1/2 were detected by Western-blot. **Results:** Resveratrol has significantly anti-proliferation effect on AN3CA cells which is in time- and concentration-dependent manners. It increases the G0/G1 phase cell population, whereas a concomitant decrease of cell numbers in S phase ($P < 0.01$). In addition, resveratrol treatment could induce cellular apoptosis that the rate of apoptosis increased to 30.96% $\pm$ 2.041% (200 μ mol/l Res). Compared with the control, resveratrol treatment caused a decrease in the levels of PCNA and Bcl-2, whereas the level of Bax expression was upregulated. In a short time (0.5-1h), resveratrol can activate ERK1/2 phosphorylation but with the time prolonged, it showed inhibition of the expression of p-ERK. **Conclusion:** It seems that resveratrol has the antitumor action including inhibition of cell proliferation, blocking cells at the G0/G1 phase and inducing apoptosis. It regulated expression level of apoptosis-related Bcl-2 family protein. The antitumor effect of resveratrol is possibly mediated by ERK1/2 pathway.

Key words: Resveratrol; Endometrial carcinoma; Proliferation; Extracellular regulated kinase1/2; Apoptosis

Chinese Library Classification (CLC): R737.33 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)13-2401-04

前言

子宫内膜癌是女性生殖系统常见的恶性肿瘤,近年来发病

率呈明显上升趋势。目前临床上对子宫内膜癌的治疗包括手术治疗、辅助化学药物治疗或激素治疗,但因化疗药物本身费用昂贵,易形成耐药且毒性作用严重,激素药物仅仅对部分 I 型

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81072139)

作者简介: 王清莹 (1985-) 女, 硕士, 主要研究方向: 妇科肿瘤。电话: 15000395206 E-mail: sunshine_1985@163.com

[△]通讯作者: 万小平 E-mail: wanxiaoping61@126.com

(收稿日期: 2011-03-13 接受日期: 2011-04-10)

子宫内膜癌有效。因此,寻找高效低毒的治疗药物至关重要。白藜芦醇属于非黄酮类多酚化合物,是植物在遇到真菌感染、紫外线照射等不利条件时产生的植物防御素,其广泛存在于葡萄、花生、虎杖等多种食用和药用植物中^[1]。白藜芦醇药理作用广泛,具有植物雌激素样作用、心血管保护、抗炎、免疫调节、抗菌抗病毒等多种功能。近年来随着研究的深入,其在肿瘤治疗方面的作用备受关注。研究发现白藜芦醇在肿瘤的起始、增殖、发生、转移等各个阶段抑制肿瘤生长和诱导肿瘤细胞凋亡且作为天然小分子化合物其毒副作用小,然而关于白藜芦醇拮抗肿瘤的作用机制至今尚未完全阐明。本实验旨在研究 Res 对高转移低分化子宫内膜腺癌细胞株 AN3CA 的生长和凋亡的影响,并对其作用机制进行初步探讨,为今后白藜芦醇作为潜在的抗肿瘤药物应用于子宫内膜癌临床治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

白藜芦醇(Sigma 公司,纯度 99%)用 DMSO(二甲基亚砜)溶解,20℃避光保存。实验前以含 10% 胎牛血清的 DMEM/F-12 培养液稀释成不同浓度,使 DMSO 终浓度<0.1%。噻唑蓝(MTT)、碘化丙啶(PI)购自 Sigma 公司,DMEM/F-12 培养基购自 Hyclone 公司,胎牛血清购自杭州四季青公司;Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒购自凯基生物公司;TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司;荧光实时定量 SYBR®PrimeScript RT-PCR 试剂盒购自 Takara 公司;PCR 引物由上海生工生物公司合成,Bcl-2、Bax、ERK1/2 和 p-ERK1/2 兔抗人多克隆抗体购自 CST 公司,PCNA 鼠抗人多克隆抗体、GAPDH 兔抗人多克隆抗体购自武汉博士德生物工程公司,其它试剂均为国产分析纯。电泳仪、转膜仪及酶标仪(Bio-Rad 美国),流式细胞仪(FC500 MCL,美国),PCR 仪(eppendorf realplex4,德国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人子宫内膜癌细胞 AN3CA 为本实验室保存。用含 10%胎牛血清 DMEM/F-12 培养液,加入 100U/mL 青霉素、100U/mL 链霉素,置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养,取处于对数生长期的细胞进行实验。

1.2.2 MTT 检测 Res 对细胞增殖抑制作用 将细胞以 1×10^5 个/mL 密度接种于 96 孔板,每孔 100 μ L,培养 24 h 后,用不同浓度 Res(12.5、25、50、100、200 μ mol/L)处理细胞 12、24、48、72h。实验设 6 复孔和不含药物含 DMSO 液的阴性对照组和不含细胞和药物的空白对照组。终止培养前每孔加 20 μ L MTT(5mg/ml),培养 4 h 后弃上清,加 DMSO 150 μ L/孔,低速振荡,酶标仪 490nm 测定吸光度值(OD 值)。细胞增殖抑制率(%)=[1-(实验组 OD 值-空白对照孔 OD 值)/(阴性对照组 A 值-空白对照孔 OD 值)] $\times 100\%$ 。

1.2.3 流式细胞仪测定细胞周期 将细胞接种于 6 孔板,待细胞贴壁换为无血清培养液继续培养 24 h,加入含不同浓度的白藜芦醇(12.5、25、50、100、200 μ mol/L)的 10%胎牛血清的 DMEM 培养液,同时加入使其终浓度为,培养 48 h 后收集细胞, PBS 洗涤两次,4℃70%乙醇固定过夜。PBS 洗涤后制成 0.5mL 细胞悬液,用含 RNAase 酶的 PI 工作液染色,4℃避光 30min,流式细胞仪分析细胞周期。

1.2.4 Annexin /PI 双标法 FCM 检测细胞凋亡 按 Annexin

/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明书操作。细胞培养收集同上,用 PBS 洗涤细胞两次,500 μ L 的 Binding Buffer 悬浮细胞,分别加 5 μ L Annexin V-FITC 和 PI 混匀后,室温避光反应 5~15min;在流式细胞仪上测定凋亡细胞百分率。

1.2.5 荧光实时定量 PCR 检测 Bcl-2、Bax 和 MMP-9mRNA 的表达量 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA,按 RT 试剂盒说明书的方法将其反转录成 cDNA,以其为模板行 PCR 扩增。Bcl-2 上游引物序列 5'ATGTGTGTGGAGAGCGTCAACC-3',下游引物序列 5'TGAGCAGAGTCTTCAGAGACAGCC-3',扩增片段长度 196bp。bax 上游引物序列 5'GCTGTTGGGCTGGATCCAAG-3',下游引物序列 5'TCAGCCCATCTTCTTCCAGA-3',扩增片段长度 139 bp。MMP-9 上游引物序列 5'TGGGGGGCAACTCGGC-3',下游引物序列 5'GGAATGATCTAAGCCCAG-3',扩增片段长度 224 bp。以 GAPDH 作为内参照,其上游引物序列 5'C-AAGGTCATCCATGACAACCTTG-3',下游引物序列 5'GTCC-ACCACCCTGTTGCTGTAG-3',扩增片段长度 373 bp。PCR 反应条件:95℃预变性 5s,95℃30s、58℃30s、72℃1min,共 40 次循环;最后解离 95℃15s、60℃1 min、95℃15s,采用 2- $\Delta\Delta$ Ct 法分析目的基因 mRNA 相对表达量。

1.2.6 Western blot 检测 Bcl-2、Bax、ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白的表达量 根据实验要求培养细胞,加入适量含 PMSF 的 RIPA 裂解液,于冰上裂解 30min,4℃,10 000 rpm/min 离心 15 min,取上清,用 BCA 法测定蛋白浓度。加上样缓冲液,100℃变性 5min。每孔 40 μ g 蛋白上样,SDS-PAGE 电泳分离蛋白,将蛋白电转移至 PVDF 膜上。5%脱脂奶粉封闭,加入一抗,4℃过夜,洗膜后加入二抗,室温反应 1 h,洗膜后进行化学发光,显影,定影,结果扫描储存。

1.2.7 统计学处理 数据用 SPSS16.0 软件进行统计学分析,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为具有统计学意义, $P < 0.01$ 为有显著性统计学意义。

2 结果

2.1 Res 对 AN3CA 细胞增殖抑制的影响

白藜芦醇对 AN3CA 细胞具有增殖抑制作用。Res 在较低浓度时,12.5 μ mol/L Res 处理细胞 48 h 可抑制细胞生长,抑制率为 11.582 ± 2.461 ($P < 0.01$),25 μ mol/L Res 处理细胞 24 h 即可抑制细胞生长($P < 0.01$)。Res 在较高浓度时(50-200 μ mol/L),对细胞增殖抑制作用更为明显,处理 12 h 即表现为显著的抑制效应($P < 0.01$)。200 μ mol/L Res 浓度作用 72 h,细胞抑制率高达 $80.728 \pm 0.096\%$ 。白藜芦醇抑制子宫内膜癌细胞 AN3CA 的增殖呈剂量和时间依赖性。见图 1。

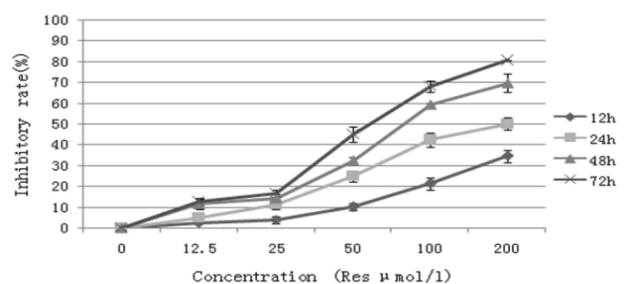


图 1 白藜芦醇对 AN3CA 增殖抑制影响

Fig.1 Inhibitory effect of resveratrol on proliferation of AN3CA

2.2 流式细胞仪检测 Res 对 AN3CA 细胞周期分布的影响

与对照组相比 Res 作用于 AN3CA 细胞 48h 后 随着药物浓度的增加 G0/G1 期的细胞比例显著增加($P < 0.01$)并伴随 S 期细胞数明显减少 ($P < 0.01$) , 差异具有显著统计学意义 , G2/M 期细胞比例无变化($P > 0.05$)。见图 2。

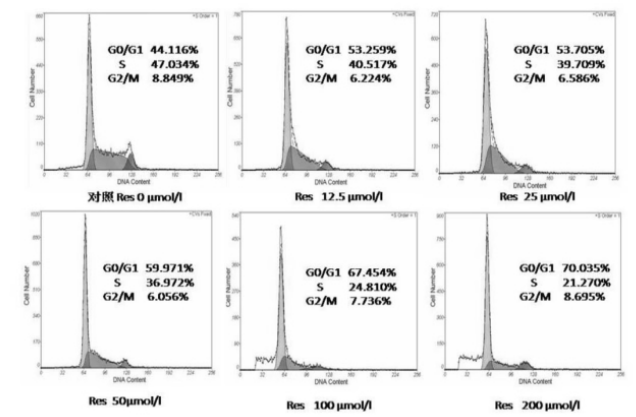


图 2 不同浓度的白藜芦醇处理 48 小时后流式细胞仪分析的细胞周期图
Fig.2 Cells cycle phase distribution of AN3CA treated with resveratrol of different concentrations analyzed by flow cytometry after 48h treatment

2.3 Res 对 AN3CA 细胞凋亡的影响

随着药物浓度的增加 早期凋亡率从 2.14%(对照组)上升至 22.63%(200μmol/l Res) 晚期凋亡率从 0.15%(对照组)上升至 8.38%(200μmol/l Res)。与对照组相比 Res 诱导 AN3CA 细胞凋亡率增加 具有统计学意义($P < 0.05$ $P < 0.01$)。白藜芦醇诱导 AN3CA 细胞凋亡存在剂量依赖性 在较高浓度时作用明显且其诱导细胞凋亡是以增加细胞早期凋亡率为主要作用方式(见图 3)。

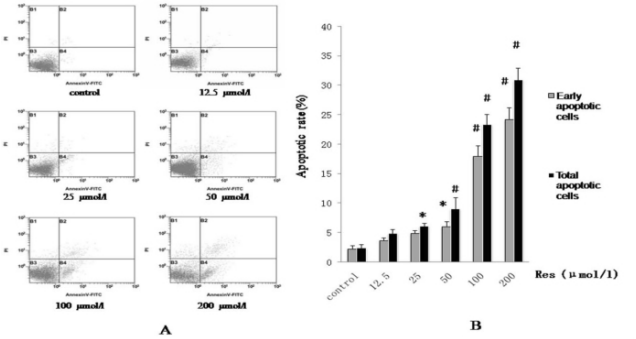


图 3 白藜芦醇对 AN3CA 细胞凋亡的影响。A.不同浓度的白藜芦醇作用 AN3CA 细胞 48 小时后流式细胞仪分析图 B.白藜芦醇诱导的 AN3CA 细胞早期凋亡和总凋亡率(* $P < 0.05$ # $P < 0.01$)
Fig.3 Effect of resveratrol on apoptotic rate in AN3CA cells. A. AN3CA cells treated with resveratrol of different concentrations for 48h analyzed by flow cytometry B. The average rate of early apoptotic cells and total apoptotic cell after exposure to resveratrol with different concentrations. (* $P < 0.05$ # $P < 0.01$)

2.4 Res 对 AN3CA 细胞中 Bcl-2,Bax,MMP-9mRNA 表达的影响

不同浓度白藜芦醇处理 48h 后与对照相比较 AN3CA 细胞中 Bcl-2 mRNA 的表达水平逐渐下降 ($P < 0.01$) Bax mRNA

的表达水平在 Res12.5μmol/l 以上,随着药物浓度的升高而显著增加,差异具有统计学意义($P < 0.05$) MMP-9mRNA 的表达水平无明显变化($P > 0.05$)(见图 4)。

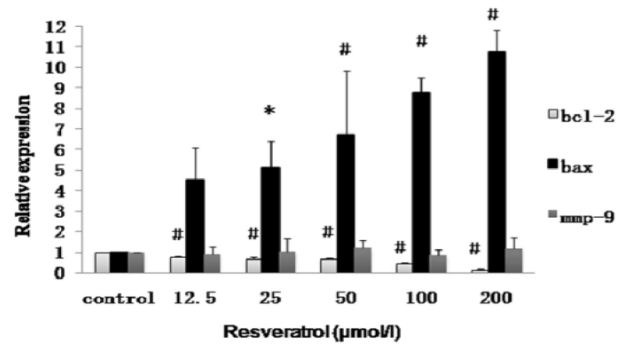


图 4 Bcl-2,Bax,MMP-9mRNA 的相对表达水平(* $P < 0.01$ # $P < 0.01$)
Fig.4 Relative expression level of Bcl-2, Bax, MMP-9mRNA (* $P < 0.01$ # $P < 0.01$)

2.5 Res 对 AN3CA 细胞中 PCNA Bcl-2 Bax p-ERK1/2 ERK1/2 蛋白表达量的影响

用不同浓度 Res 处理 AN3CA 细胞 , 检测 PCNA bcl-2 , bax 的蛋白的表达情况。与对照组比较 ,PCNA 蛋白的表达量明显下降(见图 5A)且呈剂量依赖性 随着药物浓度的增加 ,促凋亡蛋白 bax 的表达量显著增加而抗凋亡蛋白 bcl-2 的表达量则明显降低(见图 5B)。为观察 ERK1/2 在白藜芦醇处理 AN3CA 细胞中的作用 ,我们采用不同处理浓度的 Res 及不同作用时间检测 ERK 和 p-ERK 的蛋白表达量。用 100μmol/l Res 处理细胞 ,在较短的时间内其能显著增加 ERK 磷酸化的表达量 ,尤其在作用 1h 时最为显著 ;在作用 4h 左右 p-ERK 表达降至基础水平 ;其后随着作用时间的延长 p-ERK 表达水平明显下降而 t-ERK 表达无显著变化(见图 5C) ;而用不同浓度的 Res 处理细胞 48h ,低浓度的 Res(12.5-25μmol/l)作用后 ,细胞内 p-ERK 表达水平无明显变化 ,高浓度的 Res (50-100μmol/l) 作用 ,p-ERK 表达量显著下降(见图 5D)。

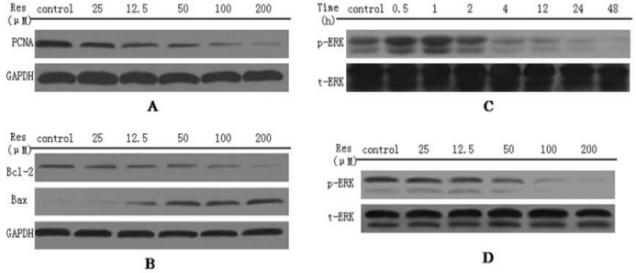


图 5 Western blot 检测 Res 对蛋白表达量的影响。A 不同浓度的 Res 对 PCNA 蛋白表达量的影响 B 不同浓度的 Res 对凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 表达量的影响 C 100μmol/l Res 处理细胞后不同时间点检测 ERK 和 p-ERK 的蛋白表达量 D 不同浓度的 Res 对 ERK 和 p-ERK 的蛋白表达量的影响

Fig.5 Effect of Res on the protein expression level detected by Western-blot. A. Effect of Res with different concentration on PCNA expression. B. Effect of Res on the expression level of apoptosis-related Bcl-2 and Bax protein. C. ERK and p-REK protein expression after exposure to100μmol/l Res for different time. D. Effect of Res with different concentration on ERK and p-REK expression.

3 讨论

近年来,天然物质尤其是广泛存在于水果、蔬菜、天然香料等各种食物中的小分子物质引起研究人员的广泛关注。研究中发现这些天然成分因子对肿瘤具有预防和治疗作用。白藜芦醇其抗肿瘤活性及机制目前研究的较为广泛,被认为是最有希望的自然抗癌药之一。

文献报道,白藜芦醇能够抑制多种肿瘤细胞的增殖效应^[3-10]。在本研究中,通过采用不同药物浓度和不同作用时间处理人子宫内膜癌 AN3CA 细胞,我们观察到白藜芦醇能够显著抑制细胞的增殖。200 μ mol/l Res 作用细胞 72h 抑制率可高达 80.728 $\pm$ 0.096%,这种抗增殖效应具有量效性和时效性。为进一步验证其增殖抑制效应,我们检测了 PCNA 的蛋白表达水平。PCNA 为 DNA 聚合酶 δ 的辅助蛋白,参与 DNA 合成,其表达与细胞增殖及周期密切相关,可作为评价细胞增殖状态的一个指标^[11]。本实验结果显示,与对照组相比,PCNA 在 Res 处理组表达量显著下降,并呈剂量依赖性。白藜芦醇的细胞抗增殖作用除与抑制 DNA 合成相关还可能是通过干扰细胞周期来实现的。本实验中观察到白藜芦醇可引起细胞 G0/G1 期比例增加,S 期细胞数减少。研究报道白藜芦醇可以将细胞阻滞在 G0/G1^[6,7],S^[8,9],G2/M 期^[10]。由此可见,白藜芦醇对肿瘤细胞周期阻滞作用并不相同,推断可能和细胞的类型、药物的浓度以及作用时间相关。

白藜芦醇发挥抗肿瘤作用的另一机制在于诱导细胞凋亡。本实验中,白藜芦醇能诱导 AN3CA 细胞的凋亡,总凋亡率由 2.42 $\pm$ 0.64% 上升至 30.96 $\pm$ 2.04%。细胞凋亡是指在一定条件下细胞按特定程序进行的主动死亡的过程。凋亡是基因精密调节和一系列酶促反应控制的多步骤复杂过程。目前研究已证实癌基因 Bcl-2 家族在该过程中发挥重要调节作用。Bcl-2 家族成员在结构上具有同源氨基酸序列,功能上可分为两大亚类包括凋亡抑制蛋白如 Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-B 等以及凋亡诱导蛋白如 Bax, Bak, Bad 等。Wang 等^[12]对乳腺癌 MCF-7 细胞的研究中发现 Res 诱导细胞凋亡同时能够上调 bax 和下调 Bcl-2 的表达。为了探索在子宫内膜癌 AN3CA 细胞是否具有同样的现象,我们用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测其在转录和蛋白水平的表达量,结果发现白藜芦醇能够增加 Bax 的表达水平而减少 Bcl-2 的表达量,该结果与文献报道的在其他肿瘤包括前列腺癌^[7],食道癌^[13],皮肤癌^[14],胃癌^[15],肝癌^[16]等研究结果相一致。白藜芦醇诱导 AN3CA 细胞凋亡可能是通过上调 bax 和下调 Bcl-2 介导的。

ERK 属于丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)家族成员,既往认为 ERK1/2 异常激活能刺激细胞持续生长并促进细胞存活,它与肿瘤的恶性增殖密切相关,然而近年来有研究认为迅速激活 ERK1/2 能够诱导细胞凋亡。在骨肉瘤 SJSA1^[17]和乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的^[18]研究中发现 Res 能够快速活化 ERK1/2,应用抑制剂 PD98059 阻断 ERK1/2 激活能够拮抗 Res 对细胞的增殖抑制效应。Shih^[19]等研究发现激活的 ERK1/2 诱导 P53 的 15 位丝氨酸磷酸化,其介导了 Res 诱导甲状腺癌细胞的凋亡。在黑色素瘤细胞 A375 细胞中同样观察到 Res 诱导细胞凋亡伴随 ERK 的活化^[20]。然而有趣的是,最近在肝癌细胞 Huh-7 的研究中发现 Res 可以抑制 p-ERK 的表达,应用抑制剂 U0126 能

增加 Res 诱导的细胞凋亡^[9]。Jubilee 等^[21]研究发现 Res 抑制前列腺癌 PC-3 细胞增殖并且能够抑制 EGF 激活 ERK1/2 的效应。目前对 Res 的抗肿瘤效应与 ERK1/2 的关系尚未阐明。在本实验中,我们发现应用 Res 处理 AN3CA 细胞能够在短时间内迅速激活 ERK1/2,其后随着作用时间的延长 Res 能够抑制 p-ERK 基础表达水平,运用不同浓度的 Res 作用 48h 后则表现为抑制作用并且呈剂量依赖性,其与肿瘤的具体机制仍需进一步研究。

综上所述,白藜芦醇对人子宫内膜癌细胞 AN3CA 细胞具有增殖抑制、周期阻滞、诱导凋亡的效应。其凋亡机制可能与上调 Bax,下调 Bcl-2 有关。白藜芦醇的抗肿瘤机制可能和 ERK1/2 信号通路失调相关。细胞信号通路是一个复杂的网络调控机制,本实验仅对 ERK1/2 信号通路中的关键分子 ERK1/2 进行检测,关于在白藜芦醇作用下 ERK 上游及下游分子通路的调节以及与其它信号通路的相互作用机制仍有待进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Harikumar K, Aggarwal B. Resveratrol: a multitargeted agent for age-associated chronic diseases[J]. Cell cycle, 2008,7(8):1020-1037
- [2] Aggarwal B, Shishodia S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer [J]. Biochem pharmacol, 2006,71(10):1397-1421
- [3] Sun C, Hu Y, Liu X, et al. Resveratrol downregulates the constitutational activation of nuclear factor-kappaB in multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and invasion, arrest of cell cycle, and induction of apoptosis[J]. Cancer Genet Cytogenet, 2006,165(1):9-19
- [4] Golkar L, Ding X-Z, Ujiki M, et al. Resveratrol inhibits pancreatic cancer cell proliferation through transcriptional induction of macrophage inhibitory cytokine-1 [J]. J Surg Res, 2007,138(2):163-169
- [5] Hudson TS, Hartle DK, Hursting SD, et al. Inhibition of prostate cancer growth by muscadine grape skin extract and resveratrol through distinct mechanisms[J]. Cancer Res, 2007,67(17):8396-8405
- [6] Parekh P, Motiwale L, Naik N, et al. Downregulation of cyclin D1 is associated with decreased levels of p38 MAP kinases, Akt/PKB and P-ak1 during chemopreventive effects of resveratrol in liver cancer cells [J]. Exp Toxicol Pathol, 2011,63(1-2):167-173
- [7] Benitez DA, Pozo-Guisado E, Alvarez-Barrientos A, et al. Mechanisms involved in resveratrol-induced apoptosis and cell cycle arrest in prostate cancer-derived cell lines[J]. J Androl, 2007,28(2):282-293
- [8] Pizarro JG, Verdaguier E, Ancrenaz V, et al. Resveratrol inhibits proliferation and promotes apoptosis of neuroblastoma cells: role of sirtuin 1 [J]. Neurochem Res, 2011,36(2):187-194
- [9] Liao PC, Ng LT, Lin LT, et al. Resveratrol arrests cell cycle and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma Huh-7 cells [J]. J Med Food, 2010,13(6):1415-1423
- [10] Liang YC, Tsai SH, Chen L, et al. Resveratrol-induced G2 arrest through the inhibition of CDK7 and p34CDC2 kinases in colon carcinoma HT29 cells[J]. Biochem pharmacol, 2003,65(7): 1053-1060
- [11] Maga G, Hubscher U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners[J]. J cell Sci, 2003,116(15):3051-3060
- [12] Wang YZ, Cao B, Li SX, et al. Effect of proliferation, cell cycle, and Bcl-2s of MCF-7 cells by resveratrol[J]. J Asian Nat Prod Res, 2009,11(4):380-390
- [13] Zhou HB, Yan Y, Sun YN, et al. Resveratrol induces apoptosis in human esophageal carcinoma cells[J]. World J Gastroenterol, 2003,9(3):408-411

(下转第 2426 页)

- effects against ischemic neuronal damage in the gerbil hippocampus [J]. *Free Biol Med*, 2005, 39(3):392
- [10] Fawells S, Seery J, Daikh Y. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells [J]. *Proc Natl Acad Sci Usa*, 1991, 91:664-668
- [11] Vives E, Brodin P, Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(25):16010-16017
- [12] Prochiantz A. Messenger proteins: homeoproteins, TAT and others [J]. *Current Opin Cell Biol*, 2000, 12:400-406
- [13] Derossi D, Calvet S, Trembleau A, et al. Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(30):18188-18193
- [14] Derossi D, Joliet AH, Chassaing G, et al. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(14):10444-10450
- [15] Park J, Ryu J, Kim KA, et al. Mutational analysis of a human immunodeficiency virus type 1 Tat protein transduction domain which is required for delivery of an exogenous protein into mammalian cells [J]. *J Gen Virol*, 2002, 83(Pt 5):1173-1181
- [16] Park J, Kim KA, Ryu J, et al. Generation and characterization of cell-permeable green fluorescent protein mediated by the basic domain of human immunodeficiency virus type 1 Tat [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2000, 10:797-804
- [17] Ryu J, Han K, Park J, et al. Enhanced uptake of a heterologous protein with an HIV-1 Tat protein transduction domains (PTD) at both termini [J]. *Mol Cells*, 2003, 16(3):385-391
- [18] Han K, Jeon MJ, Kim SH, et al. Efficient intracellular delivery of an exogenous protein GFP with genetically fused basic oligopeptides [J]. *Mol Cells*, 2001, 12(2):267-271
- [19] Han K, Jeon MJ, Kim KA, et al. Efficient intracellular delivery of GFP by homeodomains of *Drosophila* Fushi-42A and Engrailed proteins [J]. *Mol Cells*, 2000, 10(6):728-732
- [20] Yoon HY, Lee SH, Cho SW, et al. Tat-mediated delivery of human glutamate dehydrogenase into PC12 cells [J]. *Neurochem Int*, 2002, 41(1):37-42
- [21] Kwon HY, Eum WS, Jang HW, et al. Transduction of Cu,Zn-superoxide dismutase mediated by an HIV-1 Tat protein basic domain into mammalian cells [J]. *FEBS Lett*, 2000, 485(2-3):163-167
- [22] Jin LH, Bahn JH, Eum WS, et al. Transduction of human catalase mediated by an HIV-1 Tat protein basic domain and arginine-rich peptides into mammalian cells [J]. *Free Radic Biol Med*, 2001, 31(11):1509-1519
- [23] Eum WS, Choung IS, Li MZ, et al. HIV-1 Tat-mediated protein transduction of Cu,Zn-superoxide dismutase into pancreatic beta cells in vitro and in vivo [J]. *Free Radic Biol Med*, 2004, 339-349
- [24] Schwarze SR, Hruska KA, Dowdy SF. Protein transduction: unrestricted delivery into all cells? [J]. *Trends Cell Biol*, 2000, 10(7):290-295
- [25] Morris MC, Depollier J, Mery J, et al. A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(12):1173-1176
- [26] Won Sik Eum, Dae Won Kim, In Koo Hwang, et al. (2004) In Vivo Protein Transduction: Biologically Active Intact Pep-1-Superoxide Dismutase Fusion Protein Efficiently Protects Against Ischemic Insult [J]. *Free Radic Biol*, 2004, 137(10):1656-1669
- [27] Kluck RM, Bossy-Wetzler E, Green DR, et al. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for bcl-2 regulation of apoptosis [J]. *Science*, 1997, 275:1132-1136

(上接第 2404 页)

- [14] Kalra N, Roy P, Prasad S, et al. Resveratrol induces apoptosis involving mitochondrial pathways in mouse skin tumorigenesis [J]. *Life Sci*, 2008, 82(7-8):348-358
- [15] Zhou HB, Chen JJ, Wang WX, et al. Anticancer activity of resveratrol on implanted human primary gastric carcinoma cells in nude mice [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(2):280-284
- [16] Bishayee A, Dhir N. Resveratrol-mediated chemoprevention of diethylnitrosamine-initiated hepatocarcinogenesis: inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis [J]. *Chem Biol Interact*, 2009, 179(2-3):131-144
- [17] Alkhalaf M, Jaffal S. Potent antiproliferative effects of resveratrol on human osteosarcoma SJSA1 cells: novel cellular mechanisms involving the ERKs/p53 cascade [J]. *Free Radic Biol Med*, 2006, 41(2):318-325
- [18] Alkhalaf M. Resveratrol-induced growth inhibition in MDA-MB-231 breast cancer cells is associated with mitogen-activated protein kinase signaling and protein translation [J]. *Eur J Cancer Prev*, 2007, 16(4):334-341
- [19] Shih A, Davis F, Lin H-Y, et al. Resveratrol induces apoptosis in thyroid cancer cell lines via a MAPK- and p53-dependent mechanism [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(3):1223-1232
- [20] Niles RM, McFarland M, Weimer MB, et al. Resveratrol is a potent inducer of apoptosis in human melanoma cells [J]. *Cancer Lett*, 2003, 190(2):157-163
- [21] Stewart J, O'Brian C. Resveratrol antagonizes EGFR-dependent Erk1/2 activation in human androgen-independent prostate cancer cells with associated isozyme-selective PKC α inhibition [J]. *Invest New Drugs*, 2004, 22(2):107-117