

白藜芦醇对肝癌细胞增殖和凋亡影响及其机制*

戴维奇 徐凌 王锋 卫巍 沈杰 黄银实 杨丽娟 何姗姗 郭传勇[△]

(同济大学附属第十人民医院消化内科 上海 200072)

摘要 目的:研究白藜芦醇(resveratrol, Res)对肝癌细胞 LM3 周期及凋亡的影响并探讨其可能的分子机制。方法:分别用 50、100、150、200 μ mol/L 浓度的 Res 作用 LM3 肝癌细胞 24、48 和 72h, CCK-8 测定 Res 对细胞的增殖作用,分别以相同剂量的 DMSO 及无处理的 LM3 细胞为随机和空白对照,观察 150 μ mol/L Res 作用 72 小时对肿瘤细胞周期及凋亡的影响,Real time-PCR 及 Western blot 分析 Res 对 LM3 细胞中 Bak 和 Bcl-2 mRNA 及蛋白表达的影响。结果:Res 体外能明显抑制肝癌细胞 LM3 的生长增殖,在一定范围内呈现作用浓度($F=101.183$, $P<0.001$)和时间依赖性($F=192.371$, $P<0.001$);150 μ mol/L Res 作用 72 小时后能显著减缓肝癌细胞 LM3 的周期转换($P<0.001$),并诱导明显的细胞凋亡效应($P<0.001$)。进一步的检测发现 Res 作用 LM3 细胞后, Bak mRNA ($P=0.002$, 0.007)及蛋白($P=0.004$, 0.01)表达增强,而 Bcl-2 mRNA ($P=0.027$, 0.007)及蛋白($P=0.001$, 0.001)表达出现显著下降。结论:Res 可能通过对 Bak 及 Bcl-2 表达的调节来抑制肝癌细胞 LM3 的增殖,并诱导其细胞凋亡。

关键词 肿瘤;周期;Bcl-2;Bak

中图分类号:R735.7, R285.6 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)01-16-04

Effects of Resveratrol on Cell Cycle and Apoptosis of Hepatocellular Carcinoma Cells and its Possible Mechanism*

DAI Wei-qi, XU Ling, WANG Feng, WEI Wei, SHEN Jie, HUANG Yin-shi, YANG Li-juan, HE Shan-shan, GUO Chuan-yong[△]

(Tong Ji University, Department of Gastroenterology, Tenth People's Hospital, Shanghai, 200072)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of resveratrol (Res) on cell cycle and apoptosis of hepatocellular carcinoma LM3 cells and the possible molecular mechanisms. **Methods:** Cell counting kit-8(CCK-8) assay was used to examine the effect on cell proliferation of hepatocellular carcinoma LM3 cells treated by Res with the concentration of 50 μ mol/L for 24 and 72 hours; LM3 cells were treated by DMSO or no treatment as randomized and blank control, and then were detected. The expression of Bak and Bcl-2 mRNA and protein in LM3 cells treated by Res were evaluated by Real-time PCR and western blot, respectively. **Results:** Res inhibited the proliferation of LM3 cells in time-dependent manner($F=101.183$, $P<0.001$) and concentration-dependent manner ($F=192.371$, $P<0.001$) in vitro. It was found that Res could accelerate cells cycle transition and induce apoptosis after treatment by Res at 150 μ mol/L for 72 hours. The expression of Bak mRNA ($P=0.002$, 0.007) and protein ($P=0.004$, 0.01) were obviously up-regulated on treated LM3 cells, while the expression of Bcl-2 mRNA($P=0.027$, 0.007) and protein ($P=0.001$, 0.001) decreased remarkably. **Conclusion:** Res can not only inhibit proliferation of LM3 cells but also induce cellular apoptosis through accommodating the expression of Bak and Bcl-2.

Key words: Carcinoma; cycle; Bcl-2; Bak

Chinese Library Classification(CLC): R735.7, R285.6 Document code: A

Article ID:1673-6273(2012)01-16-04

前言

原发性肝癌(primary liver cancer, PLC)包括肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)、肝胆管细胞癌(cholangiocarcinoma)、肝细胞及胆管混合癌等几种类型, PLC 是我国高发肿瘤,位于恶性肿瘤病死率第二位,这其中又以乙型肝炎病毒感染后的肝细胞癌为主^[1]。因此,针对能够明显抑制原发性肝细胞肿瘤的药物研究就显得十分重要。

白藜芦醇(Resveratrol, Res)是 1940 年首次从毛叶藜芦的根部分离得到的非黄酮类多酚化合物。Res 在新鲜葡萄皮中含量较高,在中药植物虎杖中含量最为丰富。因 Res 具有抗炎、抗

氧化、抑制血小板聚集、保护心血管、螯合自由基等作用,长期以来一直广泛用于心血管病的防治中。最近研究表明 Res 可显著抑制多种人类肿瘤细胞的生长增殖^[2-6]。本研究主要通过白藜芦醇处理肝癌细胞株 LM3,观察白藜芦醇对肝癌细胞增殖及凋亡的影响,检测相关基因及蛋白的变化情况,以期阐明白藜芦醇抗肿瘤的可能机制。

1 材料与方法

1.1 细胞和主要试剂

人肝细胞癌细胞株 LM3(购自美国 ATCC 公司),Res(纯度>99.9%)(Sigma)用二甲基亚(DMSO)溶解后配成 100mmol/L

* 基金项目 国家自然科学基金(81072005)。上海市科委基金(09410705400)

作者简介 戴维奇(1985-),男,硕士生, E-mail: dai_yue@163.com

[△]通讯作者 郭传勇 E-mail: guochuan-yong@hotmail.com

(收稿日期:2011-07-12 接受日期:2011-08-06)

的储存浓度 ,CCK-8 试剂盒购自 Dojindo 公司 ;引物序列由上海生工生物工程公司合成 ;兔抗人 B 细胞淋巴瘤因子 2(B-cell leukemia/lymphoma 2, Bcl-2) 抗体、兔抗人 Bcl-2 同源拮抗物 (Bcl-2 homologous antagonist/killer, Bak) 抗体及鼠抗人β-actin 抗体均购自 Santa Cruz 公司 ,Bradford 蛋白含量检测试剂盒购自南京凯基生物公司。

1.2 细胞增殖活性检测

1.2.1 LM3 细胞培养及 Res 处理 将 LM3 细胞置于含 10% 小牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素的 High glucose DMEM 培养基中 ,移入 CO₂ 培养箱内 ,于 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养。取对数生长期细胞用胰蛋白酶消化 ,按照 1× 10³ 个细胞 / 孔接种到 96 孔板 ,细胞贴壁后 ,按照 50、100、150、200μmol / L 浓度梯度加入 Res ,每个浓度重复 3 孔 ,分别设置 24、48、72 h 作为实验终止时间点。以未添加 Res 的 LM3 作为对照细胞。

1.2.2 CCK-8 法检测 在不同浓度 Res 作用不同时间后的 LM3 细胞培养液中加入 10μl CCK-8 试剂(5 g/L) ,继续培养 4 h 后吸去上清液 ,酶标仪测定光密度值(OD450nm)。按公式细胞增殖抑制率(%)=(1-Res 作用细胞 OD / 对照细胞 OD)× 100% 计算细胞增殖抑制率。以 Res 浓度为横坐标 ,细胞增殖抑制率为纵坐标 ,绘制 LM3 细胞在不同浓度 Res 作用下的量-效曲线。

1.3 细胞周期和凋亡检测

1.3.1 制备 Res 作用 72h 后的 LM3 细胞 用 150μmol/L Res 作用 LM3 细胞 72h 后 ,收集细胞(Res 加药组) ,PBS 洗涤 2 次 ,加入 70% 乙醇固定 ,4℃ 过夜。以未经任何处理的 LM3 细胞作为空白对照组 ,以相同剂量 DMSO 处理的 LM3 细胞作为阴性对照组。

1.3.2 流式细胞仪检测 ① 细胞周期测定 :收集三组 LM3 细胞 ,PBS 洗涤 2 次 ,加入 70% 乙醇固定 ,4℃ 过夜。加入 50 g/mL 碘化丙啶 (propidium iodide ,PI) 250 μL ,1mg/mL RNase 10μL ,避光 30 min ,流式细胞仪测定细胞周期。② 细胞凋亡检测 :首先用 150 μmol/L Res 处理 LM3 细胞 72h 后 ,收集细胞 ,PBS 洗 2 次 ,加入 70% 乙醇固定 ,4℃ 过夜。用 1× binding Buffer 调节细胞浓度为 1× 10⁶/mL ,取 100 L 细胞加入 5μl Annexin-V 和 5μl PI ,混匀后避光室温反应 15 min ,加 400μl binding Buffer ,流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.4 Real-time PCR

以 150 μmol/L Res 作用 LM3 细胞为实验组 ,未经任何处理的 LM3 细胞作为空白对照组 ,相同剂量 DMSO 处理的 LM3 细胞作为阴性对照组 ,培养 72 小时后 ,分别收集 3 组细胞 ,提取总 RNA 并且逆转录其 cDNA ,利用 SYBR Green 通过实时定量 PCR ,检测凋亡相关基因 Bcl-2 ,Bak 的 mRNA 表达情况。荧光定量 PCR 的反应条件是 95℃ 10 min ,95℃ 15 s ,60℃ 1 min ,扩增 35 个循环 ,具体引物如表 1。

表 1 Real-time PCR 各引物序列
Table 1 Primers for Real-time PCR

Gene	Sequence(5'→3')	Aamplified fragment
Bak(HGNC:949)	Forward	GAGATGGTCACCTTACCTCTGC
	Reverse	TCATAGCGTCGGTTGATGTCTG
Bcl-2(HGNC:990)	Forward	CATGTGTGTGGAGAGCGTCAA
	Reverse	GCCGGTTTCAGGTACTCAGTCA
β-actin(HGNC:132)	Forward	CTGGAACGGTGAAGGTGACA
	Reverse	AAGGGACTTCCTGTAAACAATGCA

1.5 Western blot

同上处理细胞 72 小时后 ,分别提取出 3 组细胞的蛋白 ,经蛋白定量以后 ,进行 SDS-PAGE 胶电泳、转膜、抗体封闭、洗膜、孵育一抗和二抗 ,运用 ECL-PLUS 试剂盒曝光后显影 ,后期经过 Bio-Rad 公司数码成像分析系统软件对图片进行扫描 ,以 β-actin 作为内参照 ,应用 Quantity One 软件进行半定量分析。

1.6 统计学方法

应用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。CCK-8 数据经双因素方差分析和 LSD-t 检验 ,对不同浓度 Res 作用不同时间的样本均数进行两两多重比较 ;细胞凋亡、周期及 Western blot 结果均经单因素方差进行各组的比较分析 ,Real Time-PCR 检测结果经 2- $\Delta\Delta$ ct 处理后再经单因素方差进行分析。P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Res 对 LM3 增殖活力的影响

CCK-8 法检测结果显示 ①不同浓度 Res(50、100、150 和 200μmol/L)对肝癌 LM3 细胞增殖抑制率不同(F=192.371 P<0.001) ;② Res 不同作用时间(24、48 和 72h)对肝癌细胞增殖抑制率不同(F=101.183 P<0.001) ;③ 在作用 24 小时时 ,所有 4 个 Res 作用浓度对 LM3 细胞抑制作用不明显甚至有促进其增殖的情况发生。④ 各组在同一时间或同一浓度范围内 ,组间两两差异均有统计学意义 (P<0.001)。可见 Res 体外对 LM3 细胞有明显抑制作用 ,并在一定范围内基本呈现明显的浓度、时间依赖性。从图 1 中可见 150 μmol/L Res 作用 72 小时后随着药物浓度增高抑制率的斜率出现下降 ,说明单位浓度下抑制效率开始降低 ,因此认为 150 μmol/L Res 作用 72 小时对 LM3 细胞的抑制作用最明显 ,此后的实验均以此为作用截止点。

2.2 Res 对 LM3 细胞周期的影响

150 μmol/L 的 Res 持续作用 72 小时后 ,G₀/G₁ 期细胞为

66.09± 4.80% S 期细胞为 18.20± 3.43% , 与 DMSO 随机对照 (G₀/G₁ 29.63 ± 4.78% S 57.97 ± 4.62%) 和 空 白 对 照 (G₀/G₁ 34.58± 1.07% S 56.08± 1.09%) 均有显著差异 (P< 0.001) , 表现为 LM3 细胞聚集于 G₀/G₁ 期 , 同时 S 期细胞数目明显减少 , 细胞周期进程减慢 , 说明一定浓度的 Res 能抑制肝癌细胞的周期转换 , 使之增殖减缓(图 3)。

2.3 Res 对 LM3 细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测各组细胞凋亡结果显示 , 与随机对照组 (凋亡率 10.37± 1.04%) 和空白对照组 (凋亡率 11.30± 0.70%) 比较 , 白藜芦醇实验组 (凋亡率 58.47± 3.31%) 能显著诱导肝癌细胞株 LM3 细胞凋亡 (P<0.001)(图 3)。

2.4 Res 作用后肝癌细胞 LM3 中 Bak 及 Bcl-2 表达的改变

150 μmol/L 的 Res 持续作用 72 小时后 , 肝癌细胞 LM3 的 Bak 基因 mRNA 的表达(图 3A) , 与随机对照组(DMSO)和空白对照组处理后的相比较显著上调 (2.27± 0.56 Vs 0.73± 0.12 , 1.03± 0.31 P=0.002 , 0.007) , Bcl-2 基因 mRNA 的表达与随机和空白对照组处理后则出现大幅降低 (0.44± 0.15 Vs 0.84± 0.22 , 1.01± 0.13 P=0.027 , 0.007)(图 4A) ; 同时 Western blot 检测相关蛋白的表达发现 , Res 处理后肝癌细胞 Bak 蛋白的表达与两对照组比较也出现明显增强(1.35± 0.16 Vs 0.92±

0.06 , 1.02± 0.10 P = 0.004 , 0.01) , 而 Bcl-2 蛋白则表达下降 (0.66± 0.05 Vs 0.95± 0.04 , 1.01± 0.10 ; P = 0.001 , 0.001)(图 4B)。

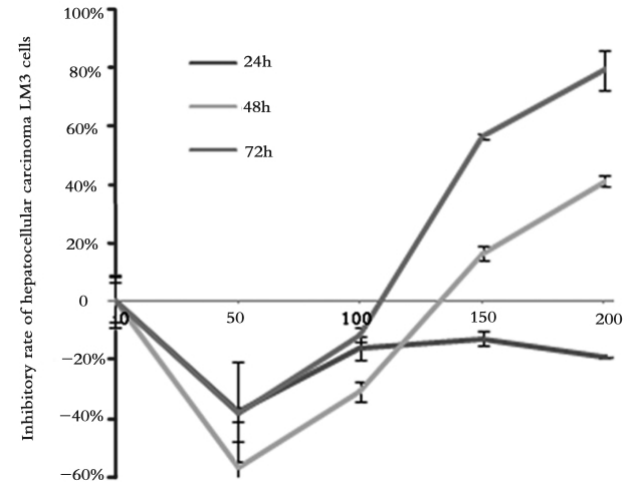


图 1 Res 不同浓度不同时间对肝癌细胞 LM3 的增殖抑制作用
Fig.1 Inhibitory rate of hepatocellular carcinoma LM3 cells after treatment by Res in different concentration for different time

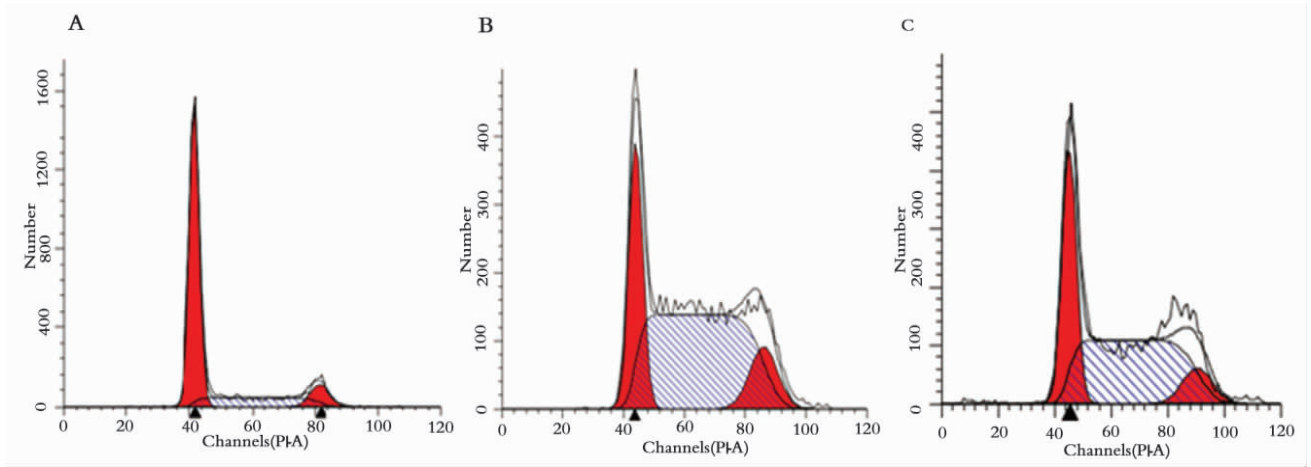


图 2 Res 处理后肝癌细胞 LM3 周期影响 :A :白藜芦醇加药组 B :DMSO 随机对照组 C :空白对照组

Fig.2 Effects on apoptosis of hepatocellular carcinoma LM3 cells after treatment by Res.

A: Treated with Res; B: Treated with DMSO; C: No treatment

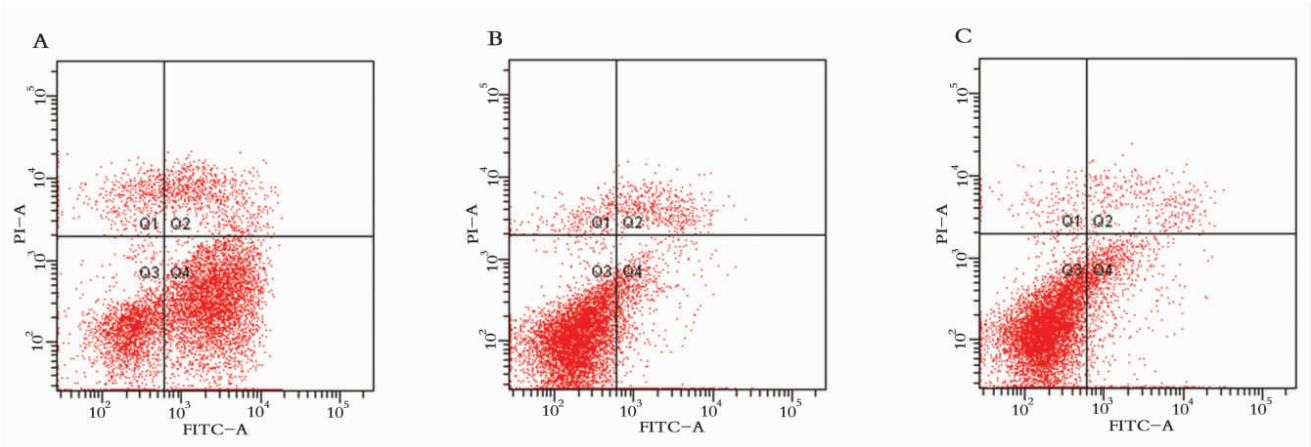


图 3 Res 处理后肝癌细胞 LM3 凋亡影响 :A :白藜芦醇加药组 B :DMSO 随机对照组 C :空白对照组

Fig.3 Effects on cell cycle of hepatocellular carcinoma LM3 cells after treatment by Res :A: Treated with Res; B: Treated with DMSO; C: No treatment

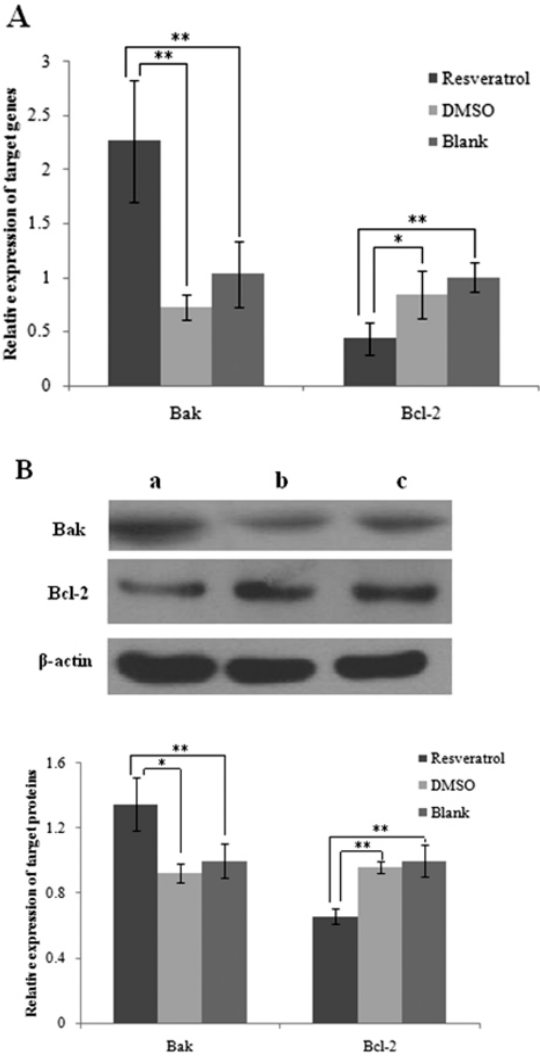


图4 Res 处理后肝癌细胞 Bak 及 Bcl-2 表达

A :LM3 肝癌细胞株经 150 μ mol/L 白藜芦醇处理 72 小时后 Bak 和 Bcl-2 在 mRNA 水平上的改变 B :LM3 肝癌细胞株经 150 μ mol/L 白藜芦醇处理 72 小时后 Bak 和 Bcl-2 在蛋白水平上的改变。a:Res 处理组 b :DMSO 处理组 c :阴性对照组。*P < 0.05; **P < 0.01

Fig. 4 Expression of Bak and Bcl-2 in hepatocellular carcinoma LM3 cells after treatment by Res :

A: Change for Bak and Bcl-2 mRNA in hepatocellular carcinoma LM3 cells treated with 150 μ mol/L Res for 72 hours B: Change for Bak and Bcl-2 protein in hepatocellular carcinoma LM3 cells treated with 150 μ mol/L Res for 72 hours. a: Treated with Res; b: Treated with DMSO; c: No treatment. *P < 0.05; **P < 0.01

3 讨论

PLC 为最常见的消化道恶性肿瘤之一 ,其发生进展涉及基因突变、基因异常表达、信号网络调节等多个不同机制。常规的用药及放疗因副作用等方面的制约效果不佳 ,而近年来发现天然植物提取物 Res 能通过多种途径对多种肿瘤细胞(包括肝癌)有显著抑制作用^[7]。研究拟通过 Res 作用后 LM3 细胞周期和凋亡调控基因及其蛋白的表达改变 ,探讨 Res 对肝癌细胞生物学特性的影响 ,为进一步阐明 Res 抗肿瘤机制提供实验依

据。结果显示 ,Res 可以剂量 - 时间依赖的方式拮抗肝癌细胞 LM3 细胞的增殖 ,并发现在一定浓度维持一定时间的情况下 , Res 能使肝癌 LM3 细胞聚集于 G₀/G₁ 期 ,同时降低 S 期细胞比例 ,说明肝癌细胞周期进程明显减缓 ,而凋亡则明显增多。进一步的研究发现 Res 能显著增多 Bak 基因的表达 ,明显下调 Bcl-2 基因。这些结果提示对 Bak、Bcl-2 的表达调控可能是 Res 抑制肿瘤细胞增殖、促进凋亡的分子机制之一。

肿瘤最突出的特征之一是细胞数量的增加 ,细胞增殖加速和死亡延缓均可影响细胞的最终命运。Bcl-2 家族是调控线粒体致凋亡发生的主要调节因子 ,包括 Bcl-2、Bak、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl2-associated X protein, Bax)等十几种成员 ,其主要通过形成同质或异质二聚体进一步募集下游信号通路来促进或抑制细胞的凋亡^[8]。现阶段的大部分研究均认为该家族对细胞周期及增殖并无影响 ,而仅发挥凋亡的调控功能 ,但随着研究的深入发现该家族成员也可以通过某些通路影响细胞的周期调节 ,如 Bak 可以通过与 p27KIP1 等抑制周期蛋白复合物的相互作用以达到调节细胞周期的目的^[9] ,有研究证实 Bak 可以通过在肿瘤细胞中核转位表达将细胞死亡信号传递给核内的周期调节因子 ,从而诱导细胞在 G₁ 期停滞^[10,11]。同样凋亡抑制基因 Bcl-2 也可改变细胞周期调节蛋白 ,如细胞分裂周期蛋白 2 (Cell division control protein2, Cdc2)及细胞周期素依赖性蛋白激酶 2(Cyclin-Dependent Kinase 2, CDK2)的核 - 胞浆转运来影响细胞周期的状态^[12] ,此外 Bcl-2 蛋白通过转录后的磷酸化修饰来调控细胞周期素依赖性蛋白激酶 1(Cyclin-Dependent Kinase 1, CDK1)的表达 ,从而影响 G₀/G₁ 期向 S 期的转换^[13-15]。本研究发现 Res 作用肝癌 LM3 细胞后可以引起细胞周期及凋亡的一系列改变 ,而这种改变可能与 Bcl-2 家族相互拮抗作用的两种成员 Bak 和 Bcl-2 的表达失衡有关 ,其具体的机制还有待于进一步验证。

参考文献(References)

[1] Robert GG, Ghassan KAA, Myron JT. Integrating Recent Data in Managing Adverse Events in the Treatment of Hepatocellular Carcinoma [J]. Gastroenterology and hepatology, 2010, 8(9):4-15

[2] 徐凌, 王锋, 徐选福等. 白藜芦醇通过下调 microRNA-151 表达抑制肝癌细胞株 HepG2 细胞活性的研究 [J]. 上海交通大学学报(医学版), 2010, 30(7):774-778

Xu Ling, Wang Feng, Xu Xuan-fu, et al. Inhibition of hepatocellular carcinoma HepG2 cell line through down-regulation of expression of microRNA-151 by resveratrol [J]. Journal of Shanghai Jiaotong University Medical Science, 2010, 30(7):774-778

[3] Burns J,Gardner PT, O'Neil J, et al. Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2000, 48(2):220-330

[4] Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, et al. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease [J]. Clin Chim Acta, 1995, 235(2): 207-219

[5] Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, et al. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer:preclinical and clinical studies [J]. Anticancer Res, 2004, 24(5A):2783-2840

(下转第 26 页)

149-150

- [10] Lamiaa A. Ahmed, Hesham A, et al. Pharmacological preconditioning with nicorandil and pioglitazone attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2011, 663, (1-3), 51-58
- [11] Xu RF, Li TT, Feng X, et al. Therapeutic effect of hyperoxygenated solution on acute lung injury induced by oleic acid [J]. *J Eur Surg Res*, 2008, 41(1): 37-43
- [12] Vivek S, Derek J. Hausenloy S. The divergent roles of protein kinase C epsilon and delta in simulated ischaemia-reperfusion injury in human myocardium [J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2009, 46, (5) : 758-764
- [13] Shu JL, Yan NW, Yi K. Noninvasive Limb Ischemic Preconditioning Protects Against Myocardial I/R Injury in Rats[J]. *Journal of Surgical Research*, 2010, 164(1): 162-168
- [14] Margarita AS, Carlos AV, Gina S, et al. The signalling pathway of CaMKII-mediated apoptosis and necrosis in the ischemia/reperfusion injury [J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2010, 48(6): 1298-1306
- [15] Bolli R, Becker L, Gross G, et al. Myocardial protection at a cross-roads: The need for translation into clinical therapy. *Circ Res* 2004; 95:125
- [16] Massion PB, Pelat M, Belge C, et al. Regulation of the mammalian heart function by nitric oxide[J]. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2005;142:144
- [17] Bolli R. Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: An overview of a decade of research[J]. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33: 1897
- [18] Corey DA, Sepideh HH, Katja SL, et al. The Role of Cytoprotective Cytokines in Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury [J]. *Journal of Surgical Research*, 2008, 148(2): 164-171
- [19] Vivek S, Derek JH. The divergent roles of protein kinase C epsilon and delta in simulated ischaemia-reperfusion injury in human myocardium [J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2009, 46 (5): 758-764
- [20] Seubert, Darryl C, Zeldin, Kasem ,et al. Role of epoxyeicosatrienoic acids in protecting the myocardium following ischemia/reperfusion injury [J]. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 2007, 82(1-4): 50-59

(上接第 19 页)

- [6] Okunieff P, Swarts S, Keng P, et al. Antioxidants reduce consequences of radiation exposure [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2008, 614: 165-178
- [7] Notas G, Nilli AP, Kampa M, et al. Resveratrol exerts its antiproliferative effect on HepG2 hepatocellular carcinoma cells by inducing cell cycle arrest and NOS activation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1760 (11): 1657-1666
- [8] Sorenson CM. Bcl-2 family members and disease [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1644(2-3): 169-177
- [9] Li J, Wang WL, Yang XK, et al. Inducible overexpression of Bak sensitizes HCC-9204 cells to apoptosis induced by doxorubicin [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2000, 21(9): 769-776
- [10] 李江, 王文亮, 于欣欣, 等. Bak 基因诱导 p27KIP1 基因的过表达使 HCC-9204 细胞在 G1 期停滞 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2001, 9 (Suppl): 27-29
- Li Jiang, Wang Wenliang, Yu Xinxin, et al. Overexpression of p27KIP1 induced by Bak gene leads to the arrest in G₁ phase of HCC-9204 cell line[J]. *Chinese Journal of Hepatology*, 2001, 9(Suppl) : 27-29
- [11] Koyanagi M, Fukada K, Uchiyama T, et al. Long-term exposure to superantigen induces p27Kip1 and Bcl-2 expression in effector memory CD4⁺ T cells [J]. *Cell Immunol*, 2007, 248(2): 77-85
- [12] Basu A, DuBois G, Haldar S. Posttranslational modifications of Bcl2 family members--a potential therapeutic target for human malignancy [J]. *Front Biosci*, 2006, 11: 1508-1521
- [13] Vantieghem A, Xu Y, Assefa Z, et al. Phosphorylation of Bcl-2 in G2/M phase-arrested cells following photodynamic therapy with hypericin involves a CDK1-mediated signal and delays the onset of apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(40): 37718-37731
- [14] Susan J. Zunino, David H. Storms. Resveratrol Alters Proliferative Responses and Apoptosis in Human Activated B Lymphocytes in Vitro [J]. *The Journal of Nutrition*, 2009, 139(8): 1603-1608
- [15] Donna H. Wong, Jesus A. Villanueva, Amanda B. Cress, Antoni J. Duleba. Molecular Human Reproduction[J]. *Mol Hum Reprod*, 2010, 16(4): 251-259