

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.08.006

白藜芦醇对氧糖剥夺 / 再灌注损伤的 PC12 细胞的保护作用 及其作用机制 *

刘 宣¹ 王海嵘¹ 刘佳福¹ 陈向军² 卢孔渺¹ 潘曙明^{1△}

(1 上海交通大学医学院附属新华医院急救中心 上海 200092; 2 复旦大学医学院附属华山医院神经内科 上海 200040)

摘要 目的:探讨白藜芦醇对氧糖剥夺 / 再灌注(OGD/R)损伤的 PC12 细胞的保护作用及其机制。**方法:**体外培养 PC12 细胞,分为对照组,白藜芦醇组, OGD/R 组及 OGD/R+ 白藜芦醇组。以改良的噻唑蓝法测定细胞活性,采用 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞的凋亡率,用双氢罗丹明(DHR)检测细胞内活性氧簇(ROS)的水平,采用蛋白印迹法(western blot)分析 SIRT1 的蛋白表达情况。**结果:**与对照组相比,经过 OGD/R 损伤后,细胞活力显著降低。而在 OGD/R 的同时给予 10 $\mu\text{mol/L}$ 的白藜芦醇处理,可以明显提高细胞活力。流式细胞仪检测发现,10 $\mu\text{mol/L}$ 的白藜芦醇可以显著地减少 OGD/R 引起的细胞凋亡,抑制细胞内的 ROS 产生。western blot 的结果提示,与对照组比较,白藜芦醇可提高 SIRT1 的蛋白表达水平。**结论:**白藜芦醇可以通过抑制 ROS 的产生和上调 SIRT1 的表达等机制而发挥其对抗氧糖剥夺 / 再灌注损伤的神经保护性作用。

关键词:白藜芦醇;氧糖剥夺 / 再灌注;细胞凋亡;ROS 生成;SIRT1

中图分类号:R743,Q593.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)08-1423-05

Protective Effect of Resveratrol on the Injury of PC12 Cells Induced by OGD/R and Its Mechanisms*

LIU Xuan¹, WANG Hai-rong¹, LIU Jia-fu¹, CHEN Xiang-jun², LU Kong-miao¹, PAN Shu-ming^{1△}

(1 Department of Emergency, Xinhua Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai, 200092, China;

2 Department of Neurology, Huashan Hospital, Fudan University School of Medicine, Shanghai, 200040, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the protective effect of resveratrol (RSV) on the injury of PC12 cells induced by oxygen glucose deprivation / reperfusion (OGD/R) and its mechanisms. **Methods:** PC12 cells cultured in vitro were divided into control group, RSV group, OGD/R group and OGD/R+RSV group. The cell viability was assessed by the modified MTT method. Annexin V-FITC/PI double staining was used to detect apoptosis rate. DHR123 was used to measure cellular ROS levels. Western blot was used to study the expression level of SIRT1. **Results:** Compared to the normal control group, the cell viability decreased significantly after OGD/R and giving 10 $\mu\text{mol/L}$ RSV during OGD/R could significantly increase cell viability. Based on the results of flow cytometry, we found 10 $\mu\text{mol/L}$ RSV markedly inhibited OGD /R-induced apoptosis and reduced intracellular ROS generation. Result of Western blot showed that RSV could increase the expression of SIRT1 compared with control group. **Conclusion:** RSV was found to have a neuroprotective effect against OGD/R-induced injury by attenuating ROS production and up-regulating the expression level of SIRT1.

Key words: Resveratrol; OGD/R; Apoptosis; ROS generation; SIRT1

Chinese Library Classification(CLC): R743, Q593.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)08-1423-05

前言

早期的溶栓治疗是目前公认的改善急性缺血性脑卒中预后有效的药物治疗手段,但伴随产生的脑缺血 / 再灌注损伤却是溶栓治疗中不容忽视的一大问题。研究表明,氧化应激反应参与脑缺血 / 再灌注损伤的发生与发展^[1]。有学者提出在溶栓治疗的同时采用抗氧化治疗,或许将有利于提高溶栓治疗的安全性和有效性^[2]。近年来,白藜芦醇(resveratrol, RSV)作为一种

天然的抗氧化物,其在缺血性心脑血管疾病中所发挥的保护作用及其作用机制正日益受到多方关注^[3-5]。因此,本研究采用 PC12 细胞建立氧糖剥夺 / 再灌注模型,以此模拟脑缺血 / 再灌注的病理过程,旨在探讨白藜芦醇对氧糖剥夺 / 再灌注损伤的神经元细胞是否能起到保护作用及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要仪器及试剂

* 基金项目:上海市公共卫生人才培养计划(GWDTR201219)

作者简介:刘宣(1988-),女,硕士研究生,主要研究方向:脑缺血再灌注损伤的机制,E-mail: shliuxuan@gmail.com

△通讯作者:潘曙明,E-mail: drshumingpan@gmail.com

(收稿日期:2013-09-12 接受日期:2013-10-10)

二氧化碳培养箱(HERACELL 150i, 美国 Thermo 公司), 倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司), 高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司), 流式细胞仪(FACS Calibur, 美国 BD 公司), 全波长酶标仪(美国 BioTek 公司), 白藜芦醇、MTT、DHR、DMSO(美国 sigma 公司), DMEM 培养基、新生胎牛血清、0.25%胰酶、DPBS(美国 Gibco 公司), AnnexinV-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(美国 BD 公司), SIRT1 单克隆抗体(美国 CST 公司), β -actin 抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 抗体、RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(中国碧云天公司)。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 细胞培养 高分化的 PC12 细胞购于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基, 于 37℃、5%CO₂ 条件下培养, 选取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 氧糖剥夺/再灌注(OGD/R)模型的建立及实验分组 倾去 DMEM 高糖培养基, 用预热的 DPBS 漂洗细胞 3 次, 加入无血清的 DMEM 无糖培养基, 置于厌氧培养箱中培养 12 h, 随后更换为预热的高糖 DMEM 培养基, 并置于 37℃、5%CO₂ 的培养箱内进行常氧培养 24 h, 以此作为 OGD/R 模型。细胞随机分成以下 4 组: ①对照组(control): 细胞常规培养; ②白藜芦醇组(RSV): 细胞常规培养, 培养基中始终含有一定浓度的白藜芦醇; ③ OGD/R 组: 细胞进行 OGD/R 处理; ④ OGD/R+RSV 组: 细胞进行 OGD/R 处理, 且培养基中始终含有一定浓度的白藜芦醇。用倒置显微镜下观察各组细胞的形态学变化。

1.2.3 细胞活力的测定 采用改良噻唑蓝法(modified thiazole blue test, MTT) 测定细胞活力。先检测不同浓度的白藜芦醇(2.5、5、10、20、40 μ mol/L)对常规培养的 PC12 细胞活力有无影响(干预 24 h)。在此基础上, 再选取对 PC12 细胞活力无影响的白藜芦醇的浓度, 观察该浓度范围下的白藜芦醇对 OGD/R 损伤处理后 PC12 细胞是否具有保护作用。具体方法: 将细胞以 7000 个/每孔接种于 96 孔板, 待贴壁后, 再进行加药处理, 每组设 5 个复孔。处理结束后, 各组细胞分别加入 20 μ L 的 MTT 标记液(5 mg/mL)培养 4 h, 随后再加入 150 μ L 的 10%SDS, 在培养箱中培养过夜, 待紫色结晶充分溶解后, 在酶联免疫检测仪测定每孔的吸光度 A 值, 检测波长为 562 nm。按公式: 细胞活力(%)= 实验组 A 值 / 对照组 A 值 $\times$ 100%, 求出各组细胞的活力。重复 3 次。

1.2.4 细胞凋亡率的测定 采用 AnnexinV-FITC/PI 双染法测定细胞凋亡率。用 0.25%胰酶消化细胞, 1000 rpm 离心 5 min, 弃上清。用 4℃ 预冷 DPBS 洗涤 2 次, 1000 rpm 离心 5 min, 弃上清, 用制备好的缓冲液 100 μ L 将细胞制备成悬液, 然后加入 5 μ L FITC 和 5 μ L PI 混匀后, 室温下避光孵育 15 min, 再加入 400 μ L 的缓冲液, 1 h 内用流式细胞仪检测。重复 3 次。

1.2.5 细胞内 ROS 水平的测定 倾去 DMEM 高糖培养基, 用无血清的 DMEM 高糖培养基洗 2 次, 加入用培养基稀释至终浓度为 5 μ mol/L 的 DHR, 避光于 37℃ 孵育 1 h 后, 0.25%胰酶消化并离心收集细胞, 1000 rpm 离心 5 min, 用 DPBS 洗涤 1

次, 并以 DPBS 重悬细胞。流式细胞仪分别检测各组罗丹明 123(rh123)的平均荧光强度(Mean fluorescent intensity, MFI)以反映 ROS 水平。激发波长: 488 nm; 发射波长: 525 nm, 每个样品测定 10,000 个活细胞。重复 3 次。

1.2.6 蛋白印迹法(western blot)检测 SIRT1 的表达 从收集的细胞中提取总蛋白并定量, 按照不同组分将等量蛋白分别添加在不同泳道(30 μ g)。加入等量的 5 $\times$ 上样缓冲液, 100℃ 煮沸变性后上样行聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳结束后, 采用湿转移法将凝胶中的蛋白转移至 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 一抗孵育过夜(SIRT1 单抗, 1:1000; β -actin 单抗, 1:1000)。TBST 漂洗 3 次, 每次 10 min。然后用辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 1 h。用标准电化学发光法测定蛋白的表达水平。重复 3 次。

1.3 统计学处理

实验数据经 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析, 并使用 Graphpad 5.0 进行图表绘制。数据用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间显著性检验采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 白藜芦醇对细胞形态的影响

对照组和 10 μ mol/L 白藜芦醇组相比, 细胞形态和密度无明显差异, 细胞呈梭形或多角形, 外形饱满。经过 OGD/R 处理后, 细胞密度明显降低, 细胞突起有不同程度的缩短, 同时较多的细胞皱缩成圆形, 细胞间连接减少。而 OGD/R+10 μ mol/L 白藜芦醇组细胞密度较之于 OGD/R 组有所增加, 圆形细胞数量减少, 细胞形态趋于正常, 见图 1。

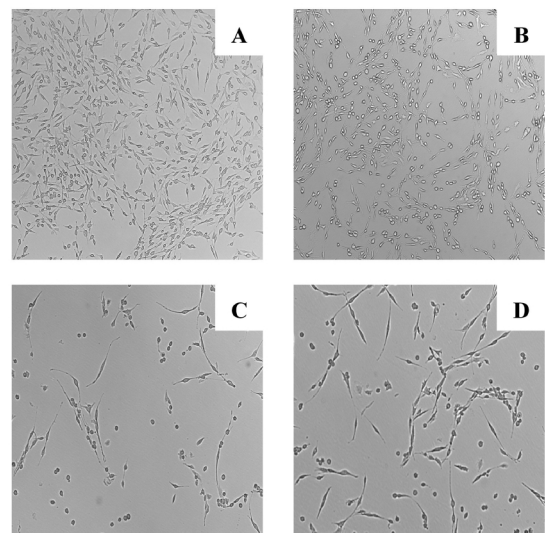


图 1 倒置显微镜观察不同处理条件下 PC12 细胞的形态变化(100 $\times$)

Fig.1 Morphology of PC12 cells after different treatments observed by inverted microscope (100 $\times$)

注: A 为 control 组, B 为 10 μ mol/L RSV 组, C 为 OGD/R 组, D 为 OGD/R+10 μ mol/L RSV 组

2.2 白藜芦醇对细胞活力的影响

2.5~20 μ mol/L 的白藜芦醇分别作用于常规培养的 PC12 细胞 24 h 后, 细胞活力依次为 (98.51 $\pm$ 3.52)%、(101.00 $\pm$ 2.92)%、(101.17 $\pm$ 4.08)%、(91.31 $\pm$ 3.88)%, 和对照组相比, 差

异无统计学意义 ($P>0.05$)。说明白藜芦醇的浓度在 2.5~20 $\mu\text{mol/L}$ 之间时对 PC12 细胞活力无影响,即无毒剂量。而当白藜芦醇浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$, 可使细胞活力降低为 $(87.04 \pm 4.23)\%$, 与对照组相比, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。因此, 在之后建立 OGD/R 模型时, 给予白藜芦醇处理的浓度范围为 2.5~20 $\mu\text{mol/L}$, 见图 2。

给予 PC12 细胞 OGD/R 损伤处理后, 可造成细胞活力的显著降低, 降为 $(63.80 \pm 2.23)\%$, ($P<0.01$)。而在 OGD/R 的同时给予 2.5~20 $\mu\text{mol/L}$ 的白藜芦醇处理, 细胞活力有上升趋势, 且

当白藜芦醇浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞活力最高, 可达到 $(78.30 \pm 2.68)\%$, 与 OGD/R 组相比, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 见图 3。

2.3 白藜芦醇对细胞凋亡率的影响

10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇组细胞的凋亡率为 $(1.95 \pm 0.21)\%$, 与对照组 $(2.25 \pm 0.21)\%$ 相比, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), OGD/R 组凋亡率相较于对照组有显著上升 ($P<0.05$), 升高为 $(14.55 \pm 2.19)\%$, 而 OGD/R+10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇组凋亡率比 OGD/R 组有明显下降 ($P<0.05$), 降低至 $(5.25 \pm 1.62)\%$, 见图 4。

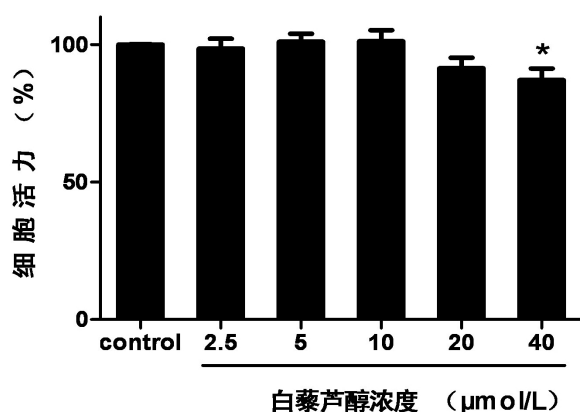


图2 白藜芦醇对 PC12 细胞活力的影响(n=3)

Fig.2 Effect of RSV on PC12 cells viability (n=3)

注: * $P<0.05$ 与对照组比较。

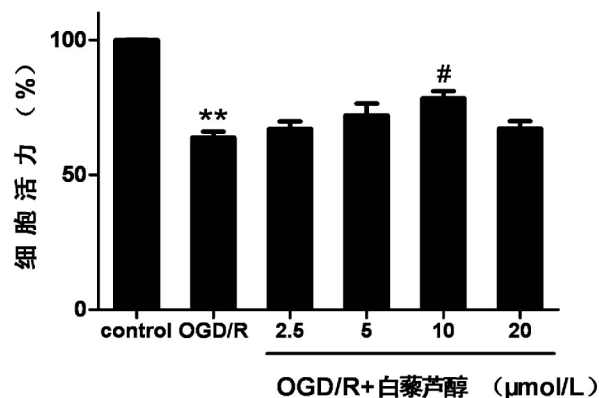


图3 白藜芦醇对 OGD/R 处理的 PC12 细胞活力的影响(n=3)

Fig.3 Effect of RSV on PC12 cells viability during OGD/R (n=3)

注: ** $P<0.01$ 与对照组比较, # $P<0.05$ 与 OGD/R 组比较。

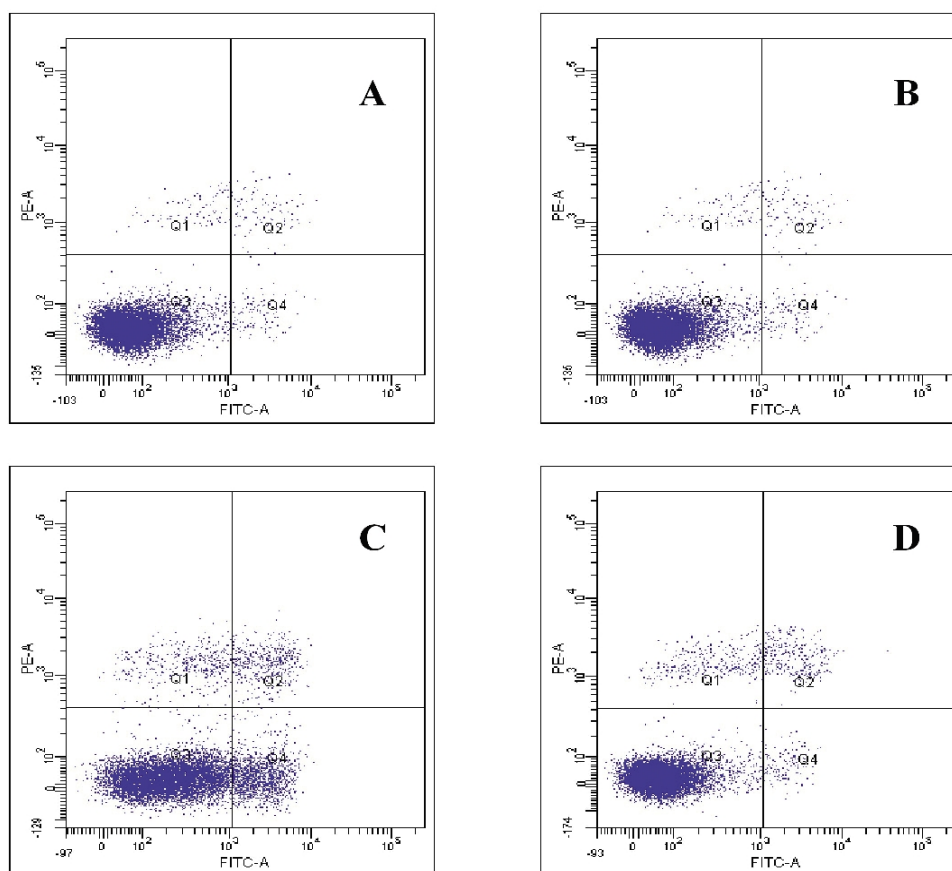


图4 流式细胞仪检测各组细胞凋亡的结果(n=3)

Fig.4 Apoptotic rates of PC12 cells assessed by flow cytometry in different groups (n=3)

注: A 为 control 组, B 为 10 $\mu\text{mol/L}$ RSV 组, C 为 OGD/R 组, D 为 OGD/R+10 $\mu\text{mol/L}$ RSV 组。

2.4 白藜芦醇对细胞内 ROS 水平的影响

流式细胞仪检测细胞内荧光强度发现,对照组细胞内的平均荧光强度为 (548.5 ± 26.1) , 与 $10 \mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇组 (504.5 ± 10.6) 相比较无显著性差异 ($P > 0.05$); 经 OGD/R 处理后, 平均荧光强度 (781.4 ± 24.7) 较对照组明显升高 ($P < 0.05$), 表明 OGD/R 损伤时 PC12 细胞内 ROS 的生成增加, 而合用 $10 \mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇后, PC12 细胞的平均荧光强度较 OGD/R 组有显著降低, 低至 (605.0 ± 22.6) , ($P < 0.05$)。表明白藜芦醇对 OGD/R 诱导细胞内 ROS 的生成具有抑制作用。见图 5。

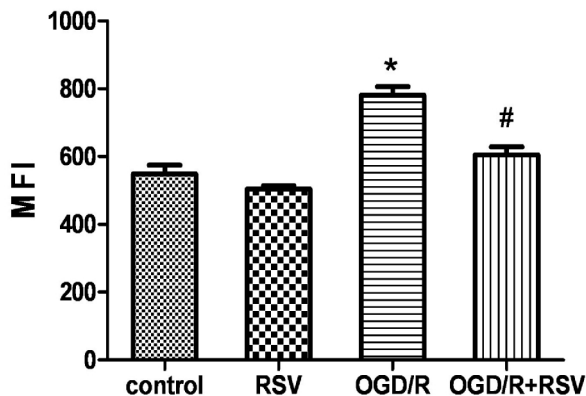


图 5 流式细胞仪检测各组 PC12 细胞的 ROS 水平 (n=3)

Fig.5 ROS levels of PC12 cells assessed by flow cytometry in different groups (n=3)

注: * $P < 0.05$ 与对照组比较, # $P < 0.05$ 与 OGD/R 组比较。

2.5 白藜芦醇对 SIRT1 表达的影响

对照组的 SIRT1 表达水平较低, $10 \mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇组 SIRT1 表达有所上升, OGD/R 组 SIRT1 的表达水平明显增高, 而 OGD/R+ $10 \mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇组 SIRT1 表达水平最高。表明白藜芦醇能够有效地增加 SIRT1 的蛋白表达, 同时我们也发现, PC12 细胞在 OGD/R 损伤处理时, SIRT1 的表达也会上升。见图 6。

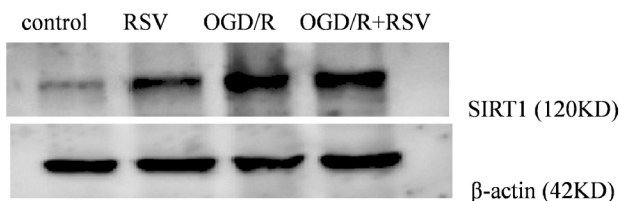


图 6 western blot 检测各组细胞 SIRT1 的蛋白表达水平

Fig.6 Expression level of SIRT1 assessed by western blot in different groups

3 讨论

在我国, 脑卒中已成为导致患者残疾和死亡的主要疾病之一, 每年新发卒中患者高达 150 万以上。急性缺血性脑卒中是其中最常见类型, 占全部脑卒中的 60%~80%。溶栓是治疗急性缺血性卒中的有效方式, 但由此引起的脑缺血 / 再灌注损伤一直是溶栓治疗的一大难题。脑缺血 / 再灌注损伤主要是由氧化应激反应所介导的, 主要表现为血中抗氧化物的含量迅速减

少^[6], 同时促使脑局部的氧化物产生, 从而加重脑局部损伤并扩大梗死范围^[7]。因此, 及时采用一些抗氧化治疗或许有利于提高溶栓治疗的安全性和有效性。

白藜芦醇(resveratrol), 化学名称为 3,4,5- 羟基苯二烯, 是一类广泛存在于葡萄、花生、藜芦、虎杖等植物中的多酚类物质^[8], 是植物为对抗紫外线照射、真菌感染等不利因素产生的一种植物抗毒素。多项研究表明白藜芦醇具有调节脂质、抗炎症、抗肿瘤、以及抗氧化等多种有益于人类健康的重要功能^[9-11]。最近的一项动物实验表明, 白藜芦醇这种天然的抗氧化物可以显著地减少脑缺血再灌注损伤大鼠模型的脑梗死面积, 并有助于改善神经功能的恢复^[12]。

本实验选用大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞 PC12 建立氧糖剥夺 / 再灌注的损伤模型^[13,14], 以此来模拟脑缺血 / 再灌注损伤的病理过程, 探讨白藜芦醇对 OGD/R 损伤处理的神经元细胞是否能起到保护作用。结果发现, $2.5 \sim 20 \mu\text{mol/L}$ 的白藜芦醇可以改善 OGD/R 处理的 PC12 细胞的活力; 其中, 当白藜芦醇的浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 时, 细胞活力最高。为了进一步对白藜芦醇的这种保护作用的机制进行探讨, 我们用流式细胞仪测定了细胞内的 ROS 水平, 结果发现 $10 \mu\text{mol/L}$ 的白藜芦醇可以显著减少 ROS 的产生, 减轻 OGD/R 处理所引发的氧化应激损伤, 从而减少细胞凋亡的发生。

沉默信息调节蛋白 1 (silent information regulator protein 1, SIRT1) 是一种高度保守的依赖 NAD^+ 的去乙酰化酶, 该酶的类似物首先在酵母中发现, 其在抗氧化应激、抗细胞凋亡、调控基因沉默、调节细胞周期、修复 DNA 损伤、参与能量代谢等方面均发挥重要作用^[15]。有研究认为上调 SIRT1 可以模拟脑缺血预处理的过程, 进而发挥保护细胞的作用^[16,17]。脑缺血预处理是指脑组织在经受一次或多次短暂性脑缺血 / 再灌注后, 脑组织产生的一种较有力的内源性保护机制, 通过降低细胞内包括 P53 在内的多种蛋白的乙酰化程度, 使其对以后较长时间的缺血性损伤产生显著的耐受。缺血预处理能有效地减少梗死面积, 保护细胞功能。本研究发现, 白藜芦醇能有效增加 SIRT1 的蛋白表达, 由此我们可以推测白藜芦可能是通过激活 SIRT1 而发挥内源性的细胞保护作用。

综上所述, 我们的实验从细胞水平验证了白藜芦醇对 OGD/R 处理的 PC12 细胞具有显著的保护作用, 其机制可能是: (1) 通过直接抑制活性氧的产生, 对抗氧化应激反应; (2) 有效地上调 SIRT1, 从而启动细胞的内源性保护机制。然而, 考虑到脑缺血 / 再灌注损伤的机制较为复杂, 本研究只是对白藜芦醇的保护作用及其作用机制的一次初探, 机制研究仍不够深入。因此, 白藜芦醇能否作为一种脑保护药物应用于临床亟需动物实验和临床研究进行进一步地探讨。

参考文献 (References)

- [1] Asahi M, Asahi K, Wang X, et al. Reduction of tissue plasminogen activator-induced hemorrhage and brain injury by free radical spin trapping after embolic focal cerebral ischemia in rats [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2000, 20(3): 452-457
- [2] Amaro S, Chamorro A. Translational Stroke Research of the Combination of Thrombolysis and Antioxidant [J]. Stroke, 2011, 42 (5): 1495-1499

- [3] Singh N, Agrawal M, Doré S. Neuroprotective properties and mechanisms of resveratrol in in vitro and in vivo experimental cerebral stroke models[J]. ACS Chem Neurosci, 2013, 4(8): 1151-1162
- [4] Tomé -Carneiro J, González M, Larrosa M, et al. Resveratrol in primary and secondary prevention of cardiovascular disease: a dietary and clinical perspective[J]. Ann N Y Acad Sci, 2013, 1290: 37-51
- [5] Shen M, Wu Rx, Zhao L, et al. Resveratrol attenuates ischemia/reperfusion injury in neonatal cardiomyocytes and its underlying mechanism[J]. PLoS One, 2012, 7(12): e51223
- [6] Cherubini A, Polldori MC, Bregnocebi M, et al. Antioxidant profile and early outcome in stroke patients[J]. Stroke, 2000, 31(10): 2295-2300
- [7] Love S. Oxidative stress in brain ischemia [J]. Brain pathol, 1999, 9(1): 119-131
- [8] Walle T, Hsieh F, DeLegge Mh, et al. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans [J]. Drug Metab Dispos, 2004, 32(12): 1377-1382
- [9] Gruber J, Tang SY, Halliwell B. Evidence for a trade-off between survival and fitness caused by resveratrol treatment of *Caenorhabditis elegans*[J]. Ann N Y Acad Sci, 2007, 1100: 530-542
- [10] Baur JA, Pearson KJ, Price NL, et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet [J]. Nature, 2006, 444(7117): 337-342
- [11] Clark D, Tuor UI, Thompson R, et al. Protection against Recurrent Stroke with Resveratrol: Endothelial Protection [J]. PLoS One, 2012, 7(10): e47792
- [12] Wang LM, Wang YJ, Cui M, et al. A dietary polyphenol resveratrol acts to provide neuroprotection in recurrent stroke models by regulating AMPK and SIRT1 signaling, thereby reducing energy requirements during ischemia[J]. Eur J Neurosci, 2013, 37(10):1669-1681
- [13] Zhu JR, Tao YF, Lou S, et al. Protective effects of ginsenoside Rb(3) on oxygen and glucose deprivation-induced ischemic injury in PC12 cells[J]. Acta Pharmacol Sin, 2010, 31(3): 273-280
- [14] Zhou XQ, Zeng XN, Kong H, et al. Neuroprotective effects of berberine on stroke models in vitro and in vivo [J]. Neurosci Lett, 2008, 447(1): 31-36
- [15] Sharma A, Gautam V, Costantini S, et al. Interactomic and pharmacological insights on human sirt-1[J]. Front Pharmacol, 2012, 3: 40
- [16] Raval AP, Dave KR, Pé rez-Pinzó n MA. Resveratrol mimics ischemic preconditioning in the brain [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2006, 26(9): 1141-1147
- [17] Raval AP, Lin HW, Dave KR, et al. Resveratrol and ischemic preconditioning in the brain [J]. Curr Med Chem, 2008, 15(15):1545-1551

(上接第 1406 页)

- [7] Santamaría I, Velasco G, Cazorla M, et al. Cathepsin L2, a novel human cysteine proteinase produced by breast and colorectal carcinomas[J]. Cancer Research, 1998, 58(8): 1624-1630
- [8] Santos-Rosa H, Kirmizis I A, Nelson C, et al. Histone H3 tail clipping regulates gene expression[J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2008, 16(1): 17-22
- [9] Stoka V, Turk B, Schendel Sharon L, et al. Lysosomal protease pathways to apoptosis cleavage of Bid, not pro-caspases, is the most likely route[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(5): 3149-3157
- [10] Cirman, T, Oresic K, Mazovec G. D, et al. Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of Bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins [J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(5): 3578-3587
- [11] Droga-Mazovec G, Bojic L, Petelin A, et al. Cysteine cathepsins trigger caspase-dependent cell death through cleavage of bid and antiapoptotic Bcl-2 homologues [J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(27): 19140-19150
- [12] Cygler M, J. Mort. Proregion structure of members of the papain superfamily. Mode of inhibition of enzymatic activity [J]. Biochimie, 1997, 79(11): 645-652
- [13] Turk B., D. Turk, V. Turk. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 2000, 1477(1): 98-111
- [14] van der Hoorn R.A, Leeuwenburgh M. A, Bogoy M, et al. Activity profiling of papain-like cysteine proteases in plants [J]. Plant Physiology, 2004, 135(3): 1170-1178
- [15] Altschul S.F, Gish W, Miller W, et al. Basic local alignment search tool[J]. Journal of Molecular Biology, 1990, 215(3): 403-410
- [16] Birney E, Andrews T. D, Bevan P, et al. An overview of Ensembl[J]. Genome Research, 2004, 14(5): 925-928
- [17] Kent W.J, Sugnet C. W, Furey T. S, et al. The human genome browser at UCSC[J]. Genome Research, 2002, 12(6): 996-1006
- [18] Thompson J.D, Gibson T. J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 4876-4882
- [19] Sandra L. Phylogeny for the faint of heart: a tutorial [J]. Trends in Genetics, 2003, 19: 345-351
- [20] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596-1599
- [21] Abascal F, R. Zardoya, D. Posada. ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution[J]. Bioinformatics, 2005, 21(9): 2104-2105
- [22] Ronquist F, J.P. Huelsenbeck, Mr Bayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models[J]. Bioinformatics, 2003, 19(12): 1572-1574
- [23] Guindon S, O. Gascuel. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood [J]. Systematic Biology, 2003, 52(5): 696-704
- [24] Berti P.J, A.C. Storer. Alignment/phylogeny of the papain superfamily of cysteine proteases [J]. Journal of Molecular Biology, 1995, 246(2): 273-283
- [25] Salminen-Mankonen H., J. Morko, E. Vuorio. Role of cathepsin K in normal joints and in the development of arthritis [J]. Current Drug Targets, 2007, 8(2): 315-323