

论 著
(基础研究)尖吻蝮蛇毒组分 I 对人口腔鳞状细胞癌 HN4 细胞
凋亡及自噬的影响

黄婷婷, 柴 琳, 王振杰, 俞 玲

【摘要】 目的 探索尖吻蝮蛇毒组分 I(AAVC-I)在人口腔鳞状细胞癌中促进细胞凋亡的作用及对自噬的影响。**方法** 将所培养的人口腔鳞癌 HN4 细胞随机分为 4 组:对照组, AAVC-I 低浓度组(2.5 $\mu\text{g/mL}$), AAVC-I 中浓度组(5 $\mu\text{g/mL}$), AAVC-I 高浓度组(10 $\mu\text{g/mL}$)。将尖吻蝮蛇毒组分 I 冻干粉溶于培养基中,在肿瘤细胞的对数生长期加入不同浓度 AAVC-I,对照组给予相应剂量的溶剂,24 h 后取标本,MTT 检测肿瘤细胞的抑制率,流式细胞仪检测细胞凋亡情况,Western blot 及免疫组织化学染色法检测 Caspase-3 蛋白的表达情况,采用 JC-1 试剂盒检测线粒体膜电位,免疫荧光法检测自噬微管相关蛋白轻链 3(LC3)蛋白的表达。**结果** 与对照组相比,给予 AAVC-I 低、中、高不同浓度干预后,肿瘤细胞的增殖受抑制($P<0.05$),细胞凋亡率增加($P<0.01$),肿瘤细胞 Caspase-3 表达量增加($P<0.05$),线粒体膜电位下降($P<0.05$),免疫荧光显示 LC3 的表达量增加($P<0.05$),并呈浓度依赖性。**结论** AAVC-I 可以抑制口腔鳞状细胞癌 HN4 细胞的增殖,可能机制为线粒体膜电位改变及 Caspase-3 蛋白的表达增加有关,同时 AAVC-I 增加自噬活性。

【关键词】 尖吻蝮蛇毒组分 I;口腔鳞状细胞癌 HN4 细胞;半胱氨酸蛋白酶-3;凋亡;自噬

【中图分类号】 R739.85 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-271X(2020)01-0009-06

【DOI】 10.3969/j.issn.1672-271X.2020.01.003

Effect of component I from Agkistrodon Acutus Venom on apoptosis and autophagy of human oral cancer
HN4 cellsHUANG Ting-ting¹, CHAI Lin², WANG Zhen-jie¹, YU Ling¹

(1. Department of Pathophysiology, 2. School of Stomatology, Wannan Medical College, Wuhu 241002, Anhui, China)

【Abstract】 Objective To explore the role of component I from Agkistrodon Acutus Venom (AAVC-I) on apoptosis and the influence on autophagy of oral squamous cell carcinoma (OSCC). **Methods** HN4 cells were randomly divided into four experimental groups: control group, low AAVC-I (2.5 $\mu\text{g/mL}$), medium AAVC-I (5 $\mu\text{g/mL}$) and high AAVC-I (10 $\mu\text{g/mL}$). Component I of Agkistrodon Acutus Venom was dissolved in the medium. Different concentrations of AAVC-I were added to the logarithmic growth phase of tumor cells. Control group was given the corresponding dose of solvent. After 24 hours, the survival index of tumor cells was detected by MTT. Cell apoptosis was detected by flow cytometry. The expression of Caspase-3 was detected by Western blot and immunohistochemical staining. Mitochondrial membrane potential was detected by JC-1 Kit. And the expression of LC3 was detected by immunofluorescence. **Results** Compared with the control group, the growth and proliferation of the tumor cells and mitochondrial membrane potential were inhibited ($P<0.05$). Cell apoptosis rate, the expression of Caspase-3, and the expression of LC3 were increased ($P<0.01$). **Conclusion** Component I of Agkistrodon Acutus Venom can promote the apoptosis of HN4 cells, and affect autophagic activity, which may be associated with chang-

基金项目: 皖南医学院重点科研项目培育基金(WK2015Z08)
作者单位: 241002 芜湖, 皖南医学院病理生理教研室(黄婷婷、王振杰、俞玲), 口腔医学院(柴琳)
通信作者: 柴琳, E-mail: 869319562@qq.com

es of mitochondrial membrane potential and the increased expression of Caspase-3.

[Key words] component I from *Agkistrodon Acutus* Venom; oral squamous cell carcinoma HN4 cells; Caspase-3; apoptosis; autophagy

0 引 言

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC),简称口腔癌,恶性程度较高,约占颌面部恶性肿瘤的90%以上^[1]。口腔癌的发病率在世界范围内呈上升趋势,虽然治疗上已经取得了许多重要进展,然而口腔癌的发病率和死亡率仍居高不下,患者的生存质量及预后情况不理想^[2]。因此,寻求一种新的、有效的治疗方法是目前治疗口腔鳞状细胞癌的研究热点。自噬和凋亡是两个重要的细胞过程,是细胞对各种应激所致的细胞损伤做出应答。自噬是一种依赖溶酶体的降解途径,是一种普遍存在的生命现象^[3],它是细胞降解的重要途径^[4-5]。自噬还参与多种病理生理过程。有研究表明,自噬的活性与肿瘤的发生密切相关^[6-7]。因此,研究自噬发生的机制并有目的的干预,进而有效地控制自噬水平,对研究肿瘤的治疗方法将会是一个新的突破。细胞凋亡是指机体细胞在受到内源性或外源性信号刺激时,凋亡控制基因程序被激活,经过多条信号通路传递的自杀性保护过程。线粒体凋亡途径是细胞凋亡的重要途径之一,是由线粒体介导的内源性凋亡途径。有研究发现,高水平的自噬可能引起线粒体等细胞器的过度降解,并促进细胞死亡^[8-9]。

尖吻蝮蛇毒组分 I(component I from *Agkistrodon Acutus* Venom, AAVC-I)是将皖南五步蛇粗毒经过 Cellulose DE-52 离子交换和 Sephadex G-75 分子筛两步层析后获得的一种抑瘤组分,酸性蛋白质,相对分子质量为 27 kD,研究表明 AAVC-I 具有明显的抑制肿瘤细胞增殖和促进凋亡的效应^[10]。并且 AAVC-I 在肺癌细胞及白血病细胞中可以通过线粒体凋亡途径促进肿瘤细胞的凋亡^[6-7]。本研究探讨 AAVC-I 对人口腔鳞状癌细胞的促凋亡作用及对自噬的影响,为今后口腔鳞癌的进一步研究和新药研发提供有利的依据和参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料 人口腔鳞状细胞癌 HN4 细胞来自于皖南医学院病理生理教研室。胎牛血清购于美国 Sigma 公司。AAVC-I 来自于皖南医学院蛇毒研究所。MTT 试剂盒购于南京凯基生物科技发展有

限公司。 β -actin 抗体和活化的半胱氨酸蛋白酶-3 (Cleaved Caspase-3) 抗体购于美国 Cell Signaling Technology 公司。线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购于碧云天生物技术有限公司。自噬微管相关蛋白轻链 3 (LC3) 抗体购于 Abcam 公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及给药 将 AAVC-I 冻干粉溶于培养基中,配制不同浓度的 AAVC-I。将培养的 HN4 细胞分为 4 组:对照组,AAVC-I 低浓度组,AAVC-I 中浓度组,AAVC-I 高浓度组。AAVC-I 低、中、高浓度组分别给予 2.5、5、10 $\mu\text{g/mL}$ AAVC-I 处理,对照组在同一时间给予相等剂量的溶剂(2 mL 的培养基)。

1.2.2 HN4 细胞培养 将人口腔鳞状癌 HN4 细胞复苏后接种于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 细胞培养箱中培养,并进行常规传代,取对数生长期细胞进行相关实验。

1.2.3 MTT 检测肿瘤细胞的抑制率 MTT 法测定 HN4 细胞增殖活性,取对数生长期 HN4 细胞,接种于 96 孔板。按 1.2.1 方案分组,每组 6 个复孔。培养 24 h,去上清。每孔加入配制好的 MTT 50 μL ,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 4 h,去上清,每孔加入 150 μL 二甲基亚砜(DMSO),振荡 10 min,在酶联检测仪上 570 nm 波长处检测光密度(OD)值,重复 3 次。

肿瘤细胞的抑制率(%)=(1-实验组平均 OD 值/对照组平均 OD 值) \times 100%

1.2.4 免疫蛋白印迹法(Western blot)检测 给予 AAVC-I 24 h 后,收集细胞用胰酶消化细胞,离心半径 8 cm、1000 r/min,离心 5 min,使用细胞裂解液裂解细胞,离心,提取总蛋白。用 15%SDS-PAGE 胶电泳分离所提取的蛋白,将蛋白转到聚偏二氟乙烯膜(PVDF)膜上,将带有目标蛋白的膜裁好并加入 5% 脱脂牛奶 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h,然后根据抗体说明书孵育一抗和内参过夜,第 2 天用 TBST 缓冲液漂洗 10 min \times 3 次,用辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗孵育 2 h,再用 TBST 漂洗 10 min \times 3 次,ECL 发光液试剂盒暗室曝光。蛋白水平用 UN-SCAN-IT 软件(Silk Scientific Inc., Orem, UT, USA)处理分析。

1.2.5 免疫组织化学染色法检测 Caspase-3 的表达量 制作细胞爬片。药物作用 24 h 后,取适量 0.5%

聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100),处理 20 min, 3% H₂O₂室温放置 10 min,吸取液体立即滴加适量山羊血清封闭液,然后在 37 ℃温箱中封闭 30 min。一抗孵育 4 ℃冰箱中过夜,PBS 清洗 2 min×3 遍。二抗 37 ℃孵育 30 min,PBS 清洗 2 min×3 遍后,滴加链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(SABC)试剂,37 ℃温育 30 min,PBS 清洗 2 min×3 遍。最后,二氨基联苯胺(DAB)显色及梯度酒精脱水。

1.2.6 JC-1 法检测线粒体膜电位 根据试剂盒说明书,设置阳性对照组,配制 JC-1 染色工作液。药物作用 24 h 后,每孔加入 1 mL JC-1 染色工作液,充分混匀,在细胞培养箱 37 ℃孵育 20 min。然后吸除上清,每孔取适量的 JC-1 缓冲液(1×)清洗 2 遍。

1.2.7 免疫荧光法检测 LC3 蛋白的表达量 制作细胞爬片。取适量破膜液完全破膜,滴加牛血清白蛋白(BSA)孵育 30 min 进行血清封闭,加一抗 4 ℃孵育,加二抗避光孵育 50 min。取适量 DAPI 染液滴加在片子上,避光室温孵育 10 min。洗涤 3 次,每次 5 min。等片子稍甩干后,用抗荧光淬灭封片剂封片。

1.2.8 流式细胞仪检测细胞凋亡 给予 AAVC-I 24 h 后收集细胞。用不含乙二胺四乙酸(EDTA)的胰酶消化后离心,收集细胞。先用冷 PBS 洗涤细胞,1000×g 离心 5 min,弃上清,加入 400 μL Annexin V 结合液轻轻重悬细胞并进行细胞计数。再加入 5 μL Annexin V-FITC,轻轻混匀 2~8 ℃孵育 15 min;加入 10 μL 碘化丙啶染色液,轻轻混匀 2~8 ℃孵育 5 min。立即上流式细胞仪检测,重复 3 次。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 18.0 软件进行统计学处理,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 AAVC-I 对 HN4 细胞增殖的影响 不同浓度的 AAVC-I 作用 24 h 后,随着 AAVC-I 浓度的增加,AAVC-I 低、中、高浓度组 HN4 细胞的增殖抑制率呈上升趋势。AAVC-I 低、中、高浓度组与对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),但 AAVC-I 低浓度组与 AAVC-I 中浓度组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

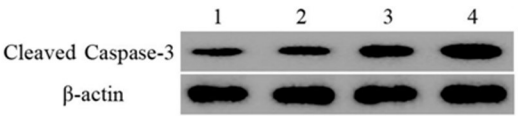
2.2 Western blot 法检测 Cleaved Caspase-3 的蛋白表达 AAVC-I 处理 HN4 细胞 24 h 后,随着 AAVC-I 浓度增加,Cleaved Caspase-3 表达增加,提示细胞凋亡增加。组间两两比较差异均有统计学

意义($P < 0.05$)。见图 1,表 2。

表 1 不同浓度 AAVC-I 对 HN4 细胞增殖的抑制作用($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	OD	抑制率 (%)
对照组	6	1.04±0.06	-
AAVC-I 低浓度组	6	0.86±0.04*	16.81±1.91
AAVC-I 中浓度组	6	0.82±0.04*	21.31±1.75
AAVC-I 高浓度组	6	0.69±0.04** [#]	33.37±1.81 [#]

与对照组比较,* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$;与 AAVC-I 中浓度组比较,[#] $P < 0.05$



1: 对照组;2-4: 分别为 AAVC-I 低浓度、中浓度、高浓度组

图 1 各组 Cleaved Caspase-3 的蛋白表达量

表 2 Western blot 法检测各组 Cleaved Caspase-3 的蛋白表达量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	Cleaved Caspase-3 蛋白表达量
对照组	6	0.215±0.021
AAVC-I 低浓度组	6	0.293±0.018*
AAVC-I 中浓度组	6	0.513±0.038** [#]
AAVC-I 高浓度组	6	0.629±0.034*** ^{#Δ}

与对照组比较,* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$;与 AAVC-I 低浓度组比较,[#] $P < 0.01$;与 AAVC-I 中浓度组比较,^Δ $P < 0.05$

2.3 免疫组化法检测 Cleaved Caspase-3 的表达 不同浓度 AAVC-I 处理 HN4 细胞 24 h 后 Cleaved Caspase-3 蛋白表达增加,与对照组比较,随着 AAVC-I 浓度的增加 Cleaved Caspase-3 蛋白表达水平上调,组间两两比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2,表 3。

表 3 不同浓度 AAVC-I 处理 HN4 细胞后 Cleaved Caspase-3 蛋白表达量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	Cleaved Caspase-3 蛋白表达量
对照组	6	4.06±0.99
AAVC-I 低浓度组	6	7.14±0.90*
AAVC-I 中浓度组	6	39.83±3.07***
AAVC-I 高浓度组	6	56.68±3.15*** ^{#Δ}

与对照组比较,* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$;与 AAVC-I 低浓度组比较,[#] $P < 0.01$;与 AAVC-I 中浓度组比较,^Δ $P < 0.05$

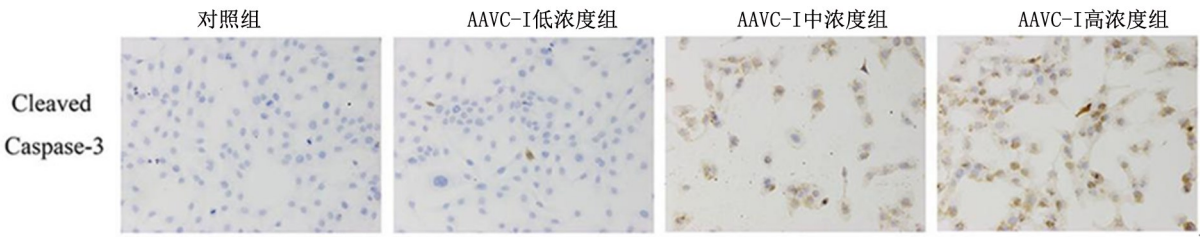


图2 免疫组化法检测各组 Caspase-3 的表达(×200)

2.4 JC-1 法检测线粒体膜电位 不同浓度 AAVC-I 作用 HN4 细胞 24 h 后,与对照组比较, AAVC-I 不同浓度组随着 AAVC-I 浓度的增加,红色荧光逐渐减少,绿色荧光逐渐增加。各组间两两比较差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 4。

2.5 免疫荧光法检测 LC3 蛋白的表达量 不同浓度的 AAVC-I 作用 24 h 后,随着 AAVC-I 浓度的增加细胞数量逐渐减少,免疫荧光法检测 LC3 蛋白的表达量结果显示:与对照组比较, AAVC-I 低、中、高浓度组 LC3 蛋白的表达量逐渐增加($P<0.05$)。见图 3,表 5。

2.6 AAVC-I 处理后 HN4 细胞的凋亡情况 流式细胞仪检测 HN4 细胞凋亡情况显示,随着 AAVC-I 药物浓度的增加,细胞凋亡率也随着药物浓度增加而逐渐增加,并且各组间比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。见图 4,表 6。

表 4 不同浓度 AAVC-I 对 HN4 细胞线粒体膜电位的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	红色荧光/绿色荧光(%)
对照组	6	100
AAVC-I 低浓度组	6	85.67±2.82*
AAVC-I 中浓度组	6	76.50±1.54** [#]
AAVC-I 高浓度组	6	58.67±2.09*** [#] [△]

与对照组比较,* $P<0.05$ 、** $P<0.01$;与 AAVC-I 低浓度组比较,# $P<0.05$ 、## $P<0.01$;与 AAVC-I 中浓度组比较,△ $P<0.01$

表 5 不同浓度 AAVC-I 处理 HN4 细胞后 LC3 蛋白的表达量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	LC3 蛋白表达量
对照组	6	2.69±0.52
AAVC-I 低浓度组	6	8.00±1.32*
AAVC-I 中浓度组	6	24.66±1.64** [#]
AAVC-I 高浓度组	6	63.88±3.27*** [#] [△]

与对照组比较,* $P<0.05$ 、** $P<0.01$;与 AAVC-I 低浓度组比较,# $P<0.01$;与 AAVC-I 中浓度组比较,△ $P<0.01$

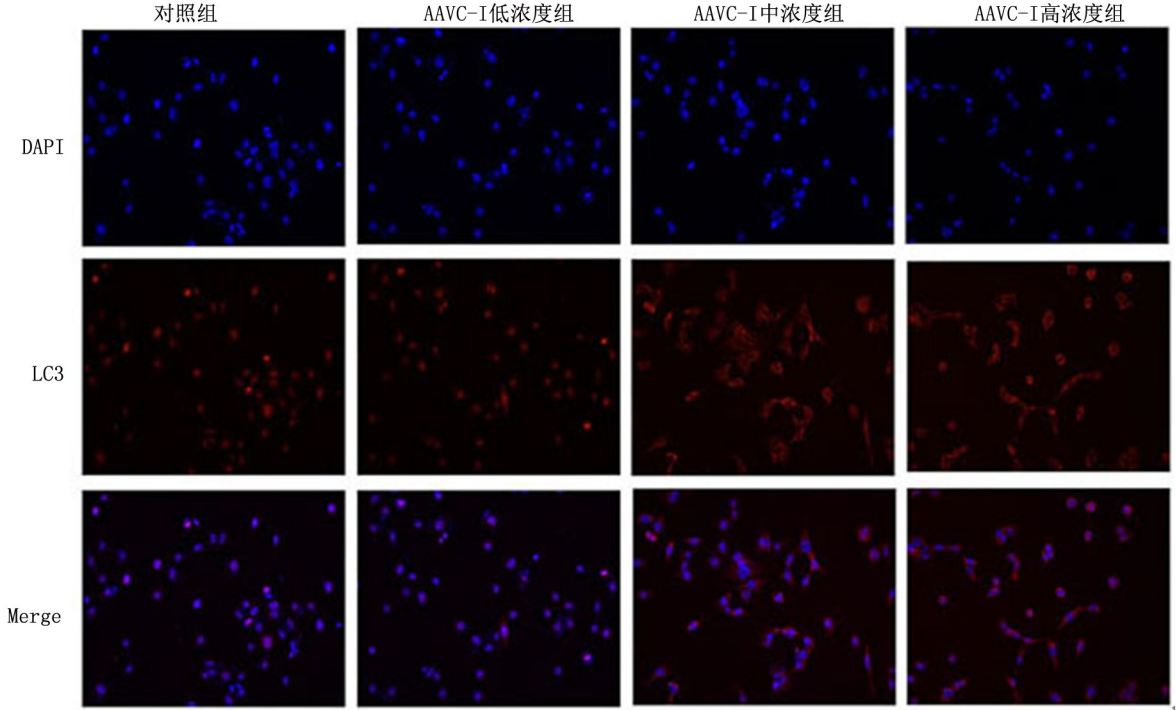
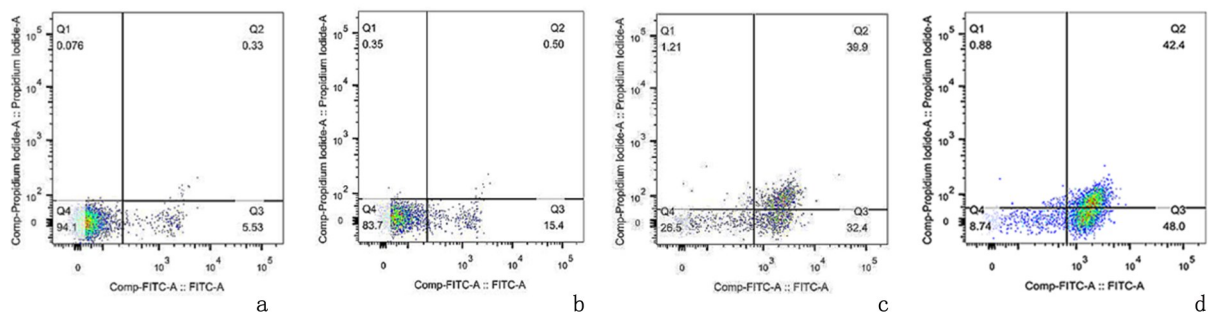


图3 免疫荧光检测 AAVC-I 处理后 LC3 蛋白的表达量(×200)



a: 对照组; b-d: 分别为 AAVC-I 低浓度、中浓度、高浓度组
图 4 不同浓度 AAVC-I 对 HN4 细胞凋亡的影响

表 6 不同浓度 AAVC-I 处理 HN4 细胞后细胞凋亡情况 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	细胞凋亡率 (%)
对照组	6	3.68±0.74
AAVC-I 低浓度组	6	15.77±0.95*
AAVC-I 中浓度组	6	52.98±5.01**
AAVC-I 高浓度组	6	71.1±5.00**△

与对照组比较, * $P<0.05$; ** $P<0.01$; 与 AAVC-I 低浓度组比较, # $P<0.01$; 与 AAVC-I 中浓度组比较, △ $P<0.01$

3 讨 论

口腔癌状细胞癌是危害人类健康和生命常见的恶性肿瘤之一,严重影响患者的生存质量和精神状态,据报道全球每年新增患者约 10 万人^[11]。目前口腔癌的临床治疗手段并不能完全治愈,只能延缓疾病进程,缓解患者症状^[12],且中晚期患者的 5 年生存率依旧很低^[13-14]。毒蛇作为一种天然的药用资源,具有广泛的生物学活性,其中在抗肿瘤方面具有广阔的应用前景。大量研究表明,从蛇毒粗度中提取的活性成分除了抗凝、促凝、止痛等功效外,还具备传统抗肿瘤药物所具有的功效^[15]。而从皖南地区尖吻蝮蛇提取物(AAVC-I)同样具有抗肿瘤作用,本研究主要探索 AAVC-I 在人口腔鳞癌 HN4 细胞中诱导肿瘤细胞凋亡的作用以及对自噬的影响。

细胞凋亡是细胞为维持内环境稳定,由基因控制的自主而有序的死亡过程。线粒体调节膜电位并控制细胞程序性死亡,当其受到不良刺激,线粒体内膜与外膜接触位点处生成通透性转变孔道,会使线粒体膜通透性提高,引起线粒体跨膜电位不可逆下降,从而导致细胞凋亡^[16-17]。线粒体膜通透性增加也能使诱导凋亡因子(AIF)等分子释放进入细胞质基质,破坏细胞结构。Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)具有促进细胞凋亡的作

用。Bax 具有孔形成能力,并能诱导细胞色素 C 从线粒体释放入胞浆^[17-18],在 dATP 存在时与凋亡蛋白酶激活因子(Apaf-1)结合并激活 Caspase-9,后者继而激活 Caspase-3。Caspase-3 是 Caspase 家族中最重要的凋亡执行者之一,是凋亡途径下游进行底物酶解的关键蛋白酶,被认为是整个凋亡级联反应的关键调节节点^[19-20]。自噬是依赖溶酶体对大分子蛋白质和某些细胞器进行降解再利用的过程,基础水平的自噬对细胞具有保护作用,但高水平自噬也有可能过度降解细胞器,促进细胞凋亡^[21]。结合相关文献及本研究结果显示,AAVC-I 可能通过某些途径上调 Caspase-3 蛋白的表达水平,并具有浓度依赖性,JC-1 检测结果表明 Caspase-3 蛋白的表达水平可能与细胞膜电位的改变有关,同时免疫荧光检测到 LC3 表达增加,表明 AAVC-I 可提高 HN4 细胞的自噬水平,提示 AAVC-I 对口腔鳞癌细胞的促凋亡作用可能是通过降低线粒体膜电位引起 Caspase-3 的表达增加,并提高自噬水平。

综上所述,AAVC-I 对 HN4 细胞有抑制其增殖、诱导其凋亡作用,这可能是通过降低线粒体膜电位进而上调 Caspase-3 蛋白的表达及提高自噬水平实现的。凋亡和自噬两者的相互关系及转换机制还需要详细的研究^[22]。本实验的研究结果可为今后研究口腔鳞癌治疗方法提供有利依据,但是细胞的凋亡过程较为复杂,又有多种基因参与细胞的凋亡,因此 AAVC-I 在人口腔鳞癌细胞中的凋亡诱导机制还有待进一步的研究。

[参考文献]

[1] Sritippho T, Chotjumlong P, Iamaroom A, et al. Roles of human papillomaviruses and p16 in oral cancer[J]. *Asain Pac J Cancer Prev*, 2015, 15(15): 6193-6200.
[2] Zhu G, Yu C, She L, et al. Metadherin regulation of vascular

- endothelial growth factor expression is dependent upon the PI3K/Akt pathway in squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. *Medicine*, 2015, 94(6): 1-10.
- [3] Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(12):961-967.
- [4] Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulation pathway of cellular dedegradation[J]. *Science*, 2000, 290(5497):1717-1721.
- [5] Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations[J]. *Nat cell Biol*, 2007, 9(10):1102-1109.
- [6] 郑汝琦, 张根葆, 黄璐, 等. 尖吻蝮蛇毒抑瘤组分 I 诱导白血病 K562 细胞凋亡的线粒体机制[J]. *中国实验血液学杂志*, 2013, 21(3):591-595.
- [7] 徐成, 张根葆, 周淑艳, 等. AAVC-I 诱导 A549 细胞凋亡的线粒体机制研究[J]. *皖南医学院学报*, 2017, 36(1):5-15.
- [8] 杨光明, 高鹏, 郑杰. 自噬-程序性死亡的执行者与管理者[J]. *医学综述*, 2010, 16(14):2106-2109.
- [9] Chen N, Debnath J. Autophagy and tumorigenesis[J]. *FEBS Letter*, 2010, 584(7):1427-1435.
- [10] 周兵, 张根葆, 段婷, 等. 尖吻蝮蛇毒抑瘤组分 I 通过促进半胱氨酸 3 表达诱导 K562/A02 细胞凋亡[J]. *中国实验血液学杂志*, 2012, 20(2): 273-276.
- [11] Bose P, Brockton NT, Dort JC. Head and neck cancer: from anatomy to biology[J]. *Int J Cancer*, 2013, 133(9): 2013-2023.
- [12] 殷操, 黄荣彩, 纪焕中, 等. 口腔癌及癌前病变中 PTEN 与 CXCR4 的蛋白表达及相关性研究[J]. *广东牙病防治*, 2015, 23(2):61-65.
- [13] Tkebe T, Takeuchi H, Jimi E, *et al.* Involvement of proteasomes in migration and matrix metalloproteinase-9 production oral squamous cell carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2015, 77(4): 578-585.
- [14] Su SC, Lin CW, Liu YF, *et al.* Exome Sequencing of Oral Squamous Cell Carcinoma Reveals Molecular Subgroups and Novel Therapeutic Opportunities[J]. *Theranostics*, 2017, 7(5): 1088-1099.
- [15] 徐平, 张根葆, 王斐, 等. 尖吻蝮蛇毒抑瘤组分 I 对人肺癌 A549 细胞增殖抑制作用[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2014, 19(5):493-496.
- [16] Galluzzi L, Morselli E, Kepp O, *et al.* Targeting post-mitochondrial effectors of apoptosis for neuroprotection[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1787(5):402-413.
- [17] 韦武亭, 王汉东, 吴永, 等. α -硫辛酸在小鼠创伤性脑损伤中抗神经细胞凋亡的作用[J]. *医学研究生学报*, 2015, 28(6):574-578.
- [18] Deng C, Sun Z, Tong G, *et al.* α -Lipoic acid reduces infarct size and preserves cardiac function in rat myocardial ischemia/reperfusion injury through activation of PI3K/Akt/Nrf2 pathway [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58371. doi: 10.1371/journal.pone.0058371.
- [19] Hardwick JM. Caspase in programmed cell death [M] // Bertino JR. *Encyclopedia of Cancer*. Cambridge: Academic Press, 2002: 369-373.
- [20] 吕磊, 张洁, 殷宇刚, 等. 川穹嗪减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤后心肌细胞凋亡及其机制研究[J]. *东南国防医药*, 2016, 18(4):361-367.
- [21] 丁可, 王汉东. 自噬在创伤性脑损伤中作用的研究进展[J]. *东南国防医药*, 2014, 16(2):181-183.
- [22] 席俊晓, 王荣, 李思源, 等. 自噬与凋亡的相互作用及其对糖尿病血管并发症影响的研究进展[J]. *医学研究生学报*, 2018, 30(11):1-4.

(收稿日期:2019-07-08; 修回日期:2019-12-11)

(责任编辑:叶华珍; 英文编辑:朱一超)