

rmhTNF 联合顺铂抑制人胃癌细胞增殖的作用机制

袁明亮¹, 季万胜², 初国艳³, 林云¹, 杨丙信¹, 高志星²
(1. 潍坊医学院, 山东 潍坊 261053; 2. 潍坊医学院附属医院, 山东 潍坊 261031;
3. 利津县第二人民医院, 山东 东营 257447)

摘要: [目的] 探讨 rmhTNF 联合顺铂抑制人胃癌细胞增殖的作用机制。[方法] 不同浓度 rmhTNF (50, 100, 200 IU/ml) 单独或联合顺铂 (4 μg/ml) 作用于人胃癌细胞系 MKN45 和 SGC7901, 细胞增殖/毒性检测试剂盒 (CCK-8 试剂盒) 测定细胞抑制率; 巢式逆转录多聚酶链反应 (RT-PCR) 测定细胞中 p53β 和 caspase-3 mRNA 的表达变化。[结果] CCK-8 法结果显示, MKN45 胃癌细胞中联合组细胞抑制率高于单独组, 且随 rmhTNF 浓度的增加而增加, 差异有统计学意义; 而 SGC7901 胃癌细胞无此现象且单独 rmhTNF 对 SGC7901 胃癌细胞增殖抑制不明显, 差异无统计学意义 ($F=1.01, P>0.05$)。单独 rmhTNF 组中 MKN45 胃癌细胞抑制率随药物浓度增加而增加, 差异有统计学意义 ($F=35.40, P<0.001$)。RT-PCR 结果显示, 在 MKN45 胃癌细胞系中单独组和联合组 caspase-3 mRNA 表达均增加, 且联合组均高于单独组并随 rmhTNF 浓度的增加而增加, 组间差异有统计学意义 ($F=93.889, P<0.05$); p53β 在单独 rmhTNF 组中未见明显改变, 差异无统计学意义 ($F=0.006, P>0.05$), rmhTNF 联合顺铂作用时可明显上调 p53β 的表达, 并且随 rmhTNF 浓度的增加而增加, 差异有统计学意义 ($F=18.577, P<0.001$)。在 SGC7901 胃癌细胞中未见 p53β 表达; 而 caspase-3 mRNA 的表达趋势与 MKN45 相同, 组间差异有统计学意义 ($F=1409.656, P<0.05$)。Person 相关性分析显示, p53β 与 caspase-3 表达呈正相关 ($r=0.766, P<0.001$), 细胞抑制率与 caspase-3 的表达呈正相关 ($r=0.978, P<0.001$)。[结论] rmhTNF 和顺铂对胃癌细胞系 MKN45 的协同抑制作用机制可能是通过 p53β 上调 caspase-3。

关键词: rmhTNF; 顺铂; 胃癌; p53β; caspase-3

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2015)08-0702-06

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2015.08.A015

The Mechanism of rmhTNF Combined with Cisplatin Inhibit the Proliferation of Human Gastric Cancer Cells

YUAN Ming-liang¹, JI Wan-sheng², CHU Guo-yan³, et al.

(1. Weifang Medical University, Weifang 261000, China;

2. Affiliated Hospital of Weifang Medical University, Weifang 261000, China;

3. Lijin Second People's Hospital, Dongying 257447, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the mechanism of rmhTNF combined with cisplatin inhibit the proliferation of human gastric cancer cells. [Methods] Different concentrations rmhTNF (50, 100, 200 IU/ml) alone or in combination with cisplatin (4 μg/ml) was used intervene in human gastric cancer cell line SGC7901 and MNK45. the inhibition rate of gastric cancer cell lines was determined by cell proliferation/toxicity testing kits (CCK-8) assay. The change of p53β and caspase-3 mRNA expression in MKN45 and SGC7901 were determined by Nested reverse transcription polymerase chain reaction (nRT-PCR). [Results] CCK-8 assay showed that in MKN45 gastric cancer cell line the inhibition rate of monotherapy groups were higher than that in the combination groups, and with the increase of rmhTNF concentration increased, the difference was statistically significant, but there is no such phenomenon in SGC7901 gastric cancer cells and when different concentrations of rmhTNF intervene in it alone the cell proliferation inhibition was not obvious, the difference was not statistically significant ($F=1.01, P>0.05$). In MKN45 gastric cancer cells the inhibition rate of rmhTNF monotherapy groups with the increase of rmhTNF concentration increased, the difference was statistically significant ($F=35.40, P<0.001$). RT-PCR showed that in MKN45 gastric cancer cell lines the expression level of caspase-3 mRNA in monotherapy and combination groups were all increased and the combination groups were more than monotherapy

收稿日期: 2014-12-19; 修回日期: 2015-02-07

基金项目: 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金 (BS2010SW034)

通讯作者: 高志星, E-mail: gzx8229@ sina.com

groups and with the increase of rmhTNF concentration increased, the difference was statistically significant ($F=93.889, P<0.05$); p53 β has no significant change in monotherapy groups of rmhTNF, the difference was not statistically significant ($F=0.006, P>0.05$). Combined intervention can significantly up regulated p53 β and p53 β increases with rmhTNF concentration, the difference was statistically significant ($F=18.577, P<0.001$). In SGC7901 gastric cancer cells the expression of p53 β mRNA was not observed, the trend expression of caspase-3 mRNA was same with MKN45, the difference was statistically significant ($F=1409.656, P<0.005$). Person correlation analysis showed that, the expression of p53 β and caspase-3 was positively correlated ($r=0.766, P<0.001$), inhibition rate was positively correlated with the expression of caspase-3 ($r=0.978, P<0.001$). [Conclusion] The synergistic inhibitory mechanisms about rmhTNF combined with cisplatin on gastric cancer cell line MKN45 may through activating p53 β to up regulate caspase-3.

Key words: rmhTNF; cisplatin; gastric cancer; p53 β ; caspase-3

发展中国家每年胃癌死亡率和诊断率均占世界 70%^[1]。手术、放疗和化疗仍是其主要治疗方法^[2]。然而化疗的效果不令人满意,可能与胃癌细胞多重耐药有关^[3]。

肿瘤坏死因子(TNF- α)是一种内生性抗肿瘤细胞因子。但目前临床需大剂量使用才能达到抗肿瘤效应,从而也带来局部和全身毒副作用。研究发现 rmhTNF 与化疗药联合作用时可表现出明显的协同抗肿瘤作用以及减少药物毒副反应^[4,5],然而其生物学机制仍不明确。肿瘤细胞中 p53 β 异构体的过量表达将抑制其生长同时增加肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[6,7]。本研究将 rmhTNF、顺铂单独或联合作用于人胃癌细胞系 MKN45 和 SGC7901,观察其对胃癌细胞的抑制率以及细胞中 p53 β 和 caspase-3 mRNA 的表达变化情况,分析 p53 β 与 caspase-3 的相关性,探讨 p53 β 和 caspase-3 在 rmhTNF 联合顺铂协同抑制肿瘤细胞增殖中的作用。

1 材料与方 法

1.1 材 料

顺铂购自德州德药制药有限公司。CCK-8 购于日本同仁化学研究所。胎牛血清购于浙江天杭生物科技有限公司, RPMI1640 培养基及胰蛋白酶购自济南凯晨生物技术有限公司。Trizol 试剂、M-MULV 第一链 cDNA 合成试剂盒和 PCR 引物购于上海生工生物技术有限公司。PCR 扩增试剂(Premix Taq)来自大连宝生物公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

人胃癌细胞 MKN45 和 SGC7901 由第四军医大

学提供,生长于完全 RPMI1640 培养基中(含有 10% 胎牛血清、100U/ml 青链霉素),置于 5%CO₂、37℃、饱和湿度的培养箱中培养。每 1~2d 更换 1 次新鲜培养液。48~72h 用 0.25% 的胰蛋白酶消化传代细胞 1 次,所有实验用对数生长期细胞。

1.2.2 CCK-8 法检测药物对胃癌细胞的增殖抑制率

用无胎牛血清的 1640 培养基将对数生长期的细胞制成密度为 $2 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4$ 个/ml 的细胞悬液,每孔 100 μ l 接种 96 孔板。将其置入培养箱中培养 24h 后弃去旧培养液,加入同体积含不同药物及浓度的完全培养基(实验组分别为:①顺铂 4 μ g/ml,②rmhTNF 50IU/ml,③rmhTNF 100IU/ml,④rmhTNF 200IU/ml,⑤顺铂 4 μ g/ml + rmhTNF 50IU/ml,⑥顺铂 4 μ g/ml + rmhTNF 100IU/ml;对照组:不加药物;空白组:不加细胞和药物),每组用 4 个复孔。在培养箱中培养 24h 后弃去培养液,用培养液将 CCK-8 稀释成体积分数为 10% 的混合液加入其中。在培养箱中继续孵育 2h 后在酶标仪(450nm)下测每孔吸光度值,取每组平均值并计算细胞抑制率(IC), $IC = (A_{\text{对照组}} - A_{\text{实验组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。实验重复 3 次。

1.2.3 RT-PCR 检测 p53 β 和 Caspase-3 mRNA 表达

用完全培养基将对数生长期的 MKN45 和 SGC7901 胃癌细胞制成密度为 1×10^4 个/ml 的细胞悬液,每孔 2ml 均匀接种到 6 孔板中。于培养箱中培养 48h 后加入药物,对照组不加药物,实验组药物及浓度同 CCK-8 实验,培养 24h 后按 Trizol 试剂盒的说明书提取总 RNA。用 M-MuLV 第一链 cDNA 合成试剂盒合成 cDNA。引物序列如下:内参照 β -肌动蛋白(β -actin)上游 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3',下游 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3;

caspase-3 上游 5'-CATGGAAGCGAATCAATGGACT3', 下游 5'-CTGTACCAGACCGAGATGTCA-3'; p53 β 第一次引物序列上游 5'-GTCAGTCCATGGAGGAGC-CGCA-3', 下游 5'-GACGCACACCTATTGCAAGCAA-GGGTTC-3', 第二次引物上游 5'-ATGGAGGAGC-CGCAGTCAGAT-3', 下游 5'-TTGAAAGCTGGTCTG-GTCCTGA-3'。用上述引物扩增, 反应条件为: 94℃预变性 5min、94℃变性 30s、53~58℃退火 30s、72℃延伸 50s, 35 个循环, 72℃延伸 7min。反应终产物经 2%琼脂糖制成的凝胶、100V 电压电泳 25 min 后用溴乙锭(EB)染色。凝胶成像分析系统观察电泳结果并用自带图像分析软件读取电泳条带光灰度值。目的 RNA 的相对含量用该目的 RNA 的灰度值比对应的内参(β -actin)灰度值。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计软件分析数据, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异采用单因素方差分析、SNK(Student-Newman-Keuls)检验和 t 检验, 两变量间相关性采用 Pearson 直线相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 rmhTNF 和顺铂对人胃癌细胞系增殖的影响

CCK-8 法结果显示在 MKN45 胃癌细胞株中, 不同浓度 rmhTNF (50IU/ml、100IU/ml) 联合顺铂 (4 μ g/ml) 干预细胞时细胞抑制率分别为 36.64% $\pm$ 1.29%和 45.04% $\pm$ 0.53%, 均明显高于单独 rmhTNF (50IU/ml、100IU/ml) 组的细胞抑制率 (15.30% $\pm$ 1.85%、18.51% $\pm$ 1.26%) 和单独顺铂 (4 μ g/ml) 组的细胞抑制率 (25.39% $\pm$ 2.112%); 且随 rmhTNF 浓度 (50IU/ml、100IU/ml) 的增加而增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。见 Table 1。

而在 SGC7901 胃癌细胞株中, 不同浓度 rmhTNF (50IU/ml、100IU/ml、200IU/ml) 单独作用 SGC7901 胃癌细胞时抑制率分别为 10.74% $\pm$ 1.29%、10.66% $\pm$ 0.96% 和 11.95% $\pm$ 1.44%, 差异无统计学意义 ($F = 1.011, P = 0.41852$)。即在单独 rmhTNF 组中, MKN45 胃癌细胞抑制率随药物浓度增加而增加, 差异有统计学意义 ($F =$

35.397, $P < 0.001$)。相同药物浓度下, MKN45 细胞抑制率大于 SGC7901 细胞, 差异有统计学意义。说明顺铂与 rmhTNF 联合对 MKN45 细胞有协同抑制作用, 而 SGC7901 细胞未体现此现象且对顺铂和 rmhTNF 的敏感性低于 MKN45。

2.2 rmhTNF 和顺铂对人胃癌细胞系中 p53 β 、caspase-3 mRNA 的影响

RT-PCR 结果显示, 在 MKN45 胃癌细胞系中单独 rmhTNF (50IU/ml、100IU/ml、200 IU/ml) 组和联合组 (rmhTNF 50IU/ml+顺铂 4 μ g/ml, rmhTNF 100IU/ml+顺铂 4 μ g/ml) caspase-3 mRNA 的相对表达量依次为 0.0308 $\pm$ 0.0014、0.0420 $\pm$ 0.0012、0.0360 $\pm$ 0.0036、0.0518 $\pm$ 0.0021、0.0581 $\pm$ 0.0023, 随 rmhTNF 浓度的增加而增加, 且联合组均大于单独组, 组间差异有统计学意义 ($F = 93.889, P < 0.001$); p53 β 在单独 rmhTNF 组中的相对表达量 (0.0161 $\pm$ 0.0033、0.0159 $\pm$ 0.0058、0.0164 $\pm$ 0.0031) 与空白对照组 (0.0162 $\pm$ 0.0026) 比较无明显差异 ($F = 0.006, P = 0.99924$); rmhTNF 与顺铂 (4 μ g/ml) 联合作用时可明显上调 p53 β 的表达, 并且随 rmhTNF 浓度的增加而增加, 差异有统计学意义 ($F = 18.577, P < 0.001$)。

在 SGC7901 胃癌细胞中未见 p53 β 表达而 caspase-3 mRNA 的表达趋势与 MKN45 相同, 差异有统计学意义 ($F = 1409.656, P < 0.001$)。在相同条件干预下 SGC7901 胃癌细胞中 caspase-3 表达量明显少于

Table 1 The cell inhibition of rmhTNF and cisplatin alone or in combination group on gastric cancer cells (24 h, n=3)

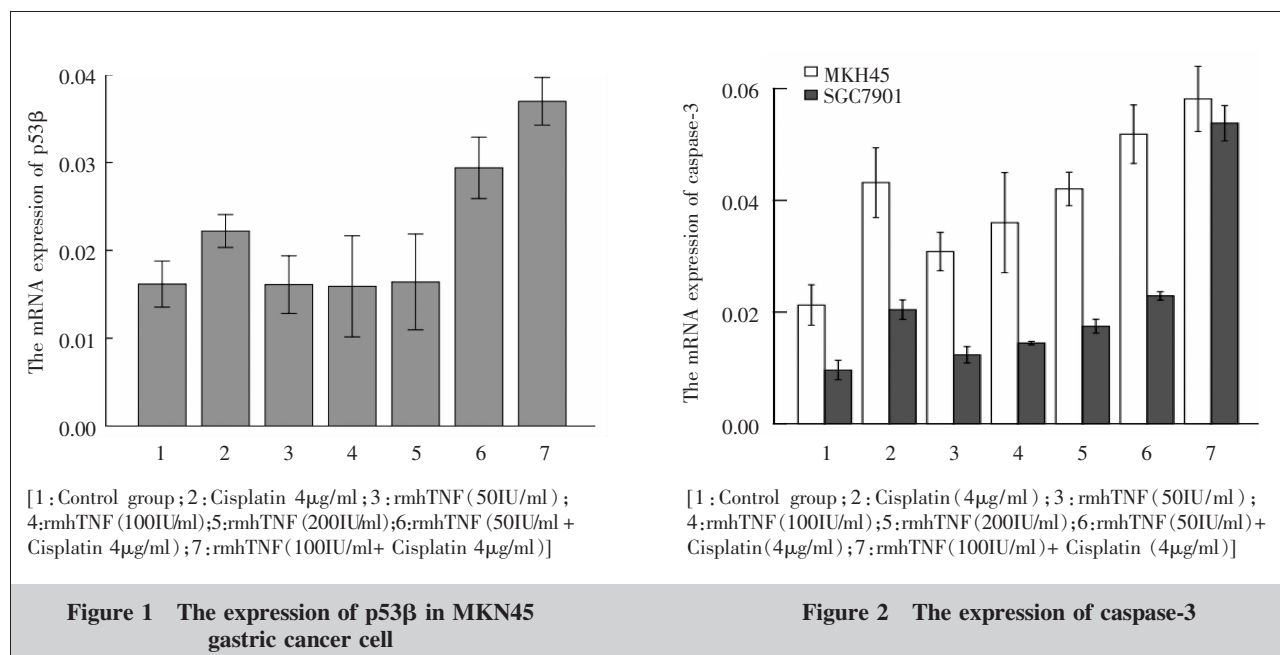
Group	MKN45(%)	SGC7901(%)
Cisplatin (4 μ g/ml)	25.39 $\pm$ 2.11 ^a	17.74 $\pm$ 1.14 ^h
rmhTNF		
50IU/ml	15.30 $\pm$ 1.85 ^b	10.74 $\pm$ 1.29 ⁱ
100IU/ml	18.51 $\pm$ 1.26 ^c	10.66 $\pm$ 0.96 ^j
200IU/ml	25.47 $\pm$ 1.36 ^d	11.95 $\pm$ 1.44 ^k
rmhTNF (50IU/ml) + Cisplatin (4 μ g/ml)	36.64 $\pm$ 1.29 ^e	18.60 $\pm$ 1.67 ^l
rmhTNF (100IU/ml) + Cisplatin (4 μ g/ml)	45.04 $\pm$ 0.53 ^f	19.35 $\pm$ 1.24 ^m
F	170.829	30.019
P	0.00001	0.000002

Note: ①The single factor analysis of variance results: a, e, f ($F = 136.954, P = 0.00001$); b, c, d ($F = 35.397, P = 0.00048$); h, l, m ($F = 1.041, P = 0.40903$); i, j, k ($F = 1.011, P = 0.41852$). ②SNK test of rmhTNF intervention MKN45 cells for 24 h alone: b and d ($q = 13.28, P < 0.05$); c and d ($q = 9.09, P < 0.05$); b and c ($q = 4.19, P < 0.05$). ③ t -test between SGC7901 and MKN45: a and h ($t = 5.527, P = 0.00524$); b and i ($t = 3.510, P = 0.02467$); c and j ($t = 8.568, P = 0.00102$); d and k ($t = 5.932, P = 0.00405$); e and l ($t = 14.822, P = 0.00012$); f and m ($t = 33.07, P = 0.000005$). ④SNK test and t -test between combination and single group in MKN45 cell: a and e ($q = 13.08, P < 0.01$); a and f ($q = 19.65, P < 0.01$); e and f ($q = 8.4, P < 0.01$); b and e ($t = -16.423, P = 0.00008$); c and f ($t = -33.558, P = 0.000005$).

Table 2 The expression of p53 β , caspase-3 in MKN45 and SGC7901 gastric cancer cell lines ($\bar{x}\pm s$, n=3)

Group	p53 β	caspase-3	
	MKN45	MKN45	SGC7901
0	0.0162 $\pm$ 0.0026 ^a	0.0212 $\pm$ 0.0015 ^a	0.0096 $\pm$ 0.0007 ^h
Cisplatin(4 μ g/ml)	0.0222 $\pm$ 0.0019 ^p	0.0432 $\pm$ 0.0025 ^b	0.0204 $\pm$ 0.0007 ⁱ
rmhTNF			
50IU/ml	0.0161 $\pm$ 0.0033 ^q	0.0308 $\pm$ 0.0014 ^c	0.0123 $\pm$ 0.0006 ^j
100IU/ml	0.0159 $\pm$ 0.0058 ^r	0.0360 $\pm$ 0.0036 ^d	0.0145 $\pm$ 0.0001 ^k
200IU/ml	0.0164 $\pm$ 0.0031 ^s	0.0420 $\pm$ 0.0012 ^e	0.0175 $\pm$ 0.0005 ^l
rmhTNF(50IU/ml)+ Cisplatin (4 μ g/ml)	0.0294 $\pm$ 0.0020 ^u	0.0518 $\pm$ 0.0021 ^f	0.0229 $\pm$ 0.0003 ^m
rmhTNF(100IU/ml)+ Cisplatin (4 μ g/ml)	0.0370 $\pm$ 0.0027 ^v	0.0581 $\pm$ 0.0023 ^g	0.0538 $\pm$ 0.0013 ⁿ
F	14.062	93.889	1409.656
P	0.00003	0.00001	0.00010

Note: ①The single factor analysis of variance results; o, p, u, v ($F=18.577$ $P=0.00003$); o, q, r, s ($F=0.006$ $P=0.99924$). ②Two independent sample t-test; q and u ($t=-4.800$, $P=0.00865$); r and v ($t=-5.741$, $P=0.00456$); b and l ($t=15.081$, $P=0.00011$); c and j ($t=21.339$, $P=0.00003$); d and k ($t=10.342$, $P=0.00049$); e and l ($t=32.667$, $P=0.000005$); f and m ($t=23.485$, $P=0.00002$); g and n ($t=2.810$, $P=0.04831$). ③SNK test in MKN45 of caspase-3; b and e ($q=0.93$ $P>0.05$), the others $P<0.05$; ④SNK test in SGC7901 of caspase-3 between all the groups $P<0.05$.



MKN45 细胞,差异有统计学意义。见 Table 2, Figure 1~2。

不同药物或药物浓度作用胃癌细胞 MKN45 和 SGC7901 24h 后 β -actin、p53 β 、caspase-3 mRNA 的琼脂糖凝胶电泳见 Figure 3。

2.3 胃癌细胞中 p53 β 与 caspase-3 及 caspase-3 与细胞增殖抑制率的相关性分析

结果显示在 MKN45 胃癌细胞中 p53 β 与 caspase-3 表达呈正相关($r=0.766$, $P<0.001$)。在 MKN45 和 SGC7901 细胞中,细胞抑制率与 caspase-3 的表达呈正相关($r=0.978$, $P<0.001$; $r=0.829$, $P<0.001$)。见 Figure 4~6。

3 讨论

p53 是肿瘤抑制基因,其作为转录因子以四聚体的形式通过 p53 敏感元件结合到 DNA 上调节基因的表达^[8,9],从而调节肿瘤的发生、发展。p53 β 是野生型 p53 在转录后经选择性剪接及修饰产生的 9 种异构体中的一种。Khoury 等^[10]发现在肺癌细胞株 H1299 中 p53 β 可以增强 p53 调节细胞凋亡,由于 p53 β 因羧基端缩短当其激活时可以与 p53 形成复合体调节 p53 的转录活性,从而作用于下游分子,抑制肿瘤细胞的生长^[10,12]。然而也不排除 p53 β 可独立

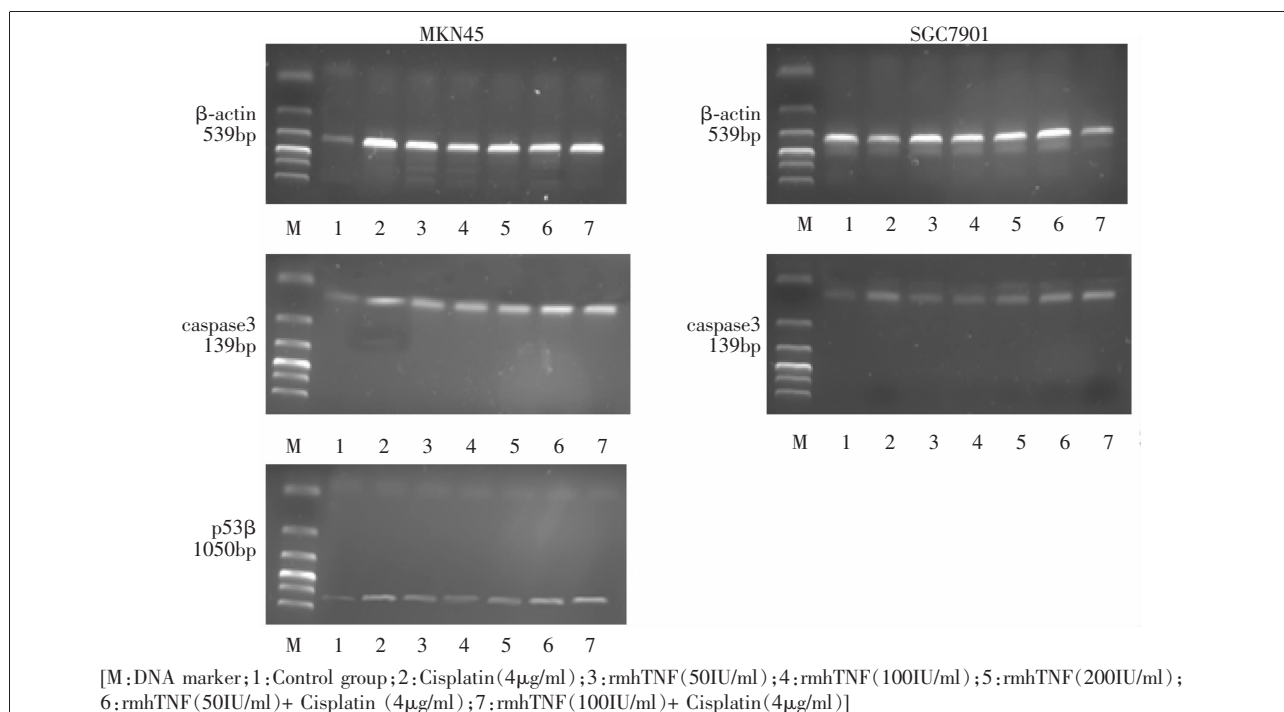


Figure 3 The agarose gel electrophoresis of mRNA

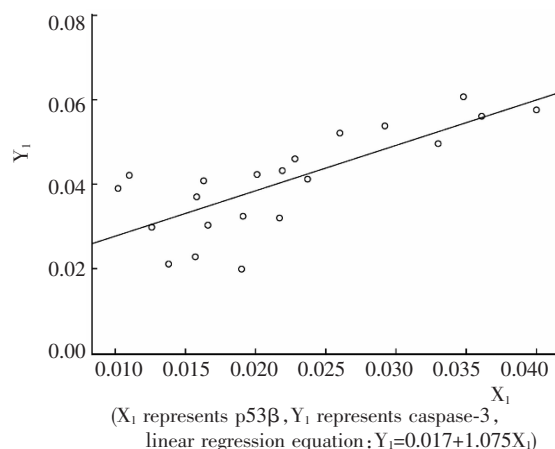


Figure 4 The correlation of p53β with caspase-3 in MKN45 gastric cancer cells

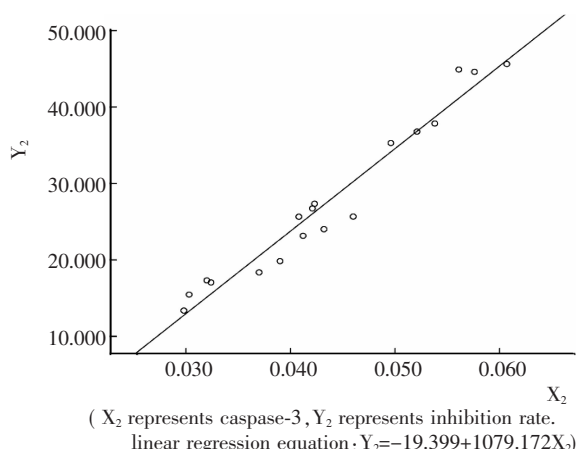
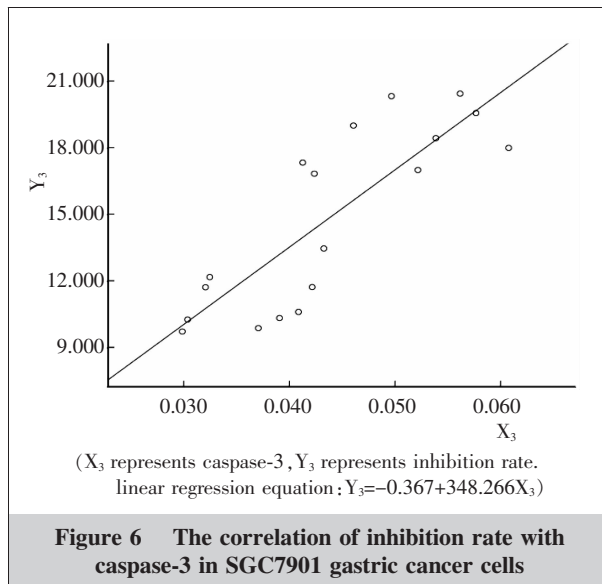


Figure 5 The correlation of the inhibition rate with caspase-3 in MKN45 gastric cancer cells

于 p53 发挥抗肿瘤作用,因为p53β 可以独立于 p53 结合到 p53 敏感元件上进而诱导细胞凋亡^[10]。已经证明在 p53 阴性的 H1299 细胞中 p53β 可增强化疗药物敏感性^[6]。Avery-Kiejda 等^[13]发现,在乳腺癌中 p53β 表达与肿瘤大小呈负相关,与无病生存期呈正相关。但仍没有直接的证据说明 p53β 的确切生物学活性^[14]。

为明确 p53β 是否在顺铂联合 rmhTNF 协同抗

肿瘤中发挥重要作用,本实验采用两种胃癌细胞株即 p53β 表达阳性的 MKN45 和 p53β 表达阴性的 SGC7901 为研究对象。通过 CCK-8 结果发现,在相同条件下 MKN45 细胞对药物的敏感性强于 SGC7901 细胞,这也说明 p53β 可增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性。顺铂与 rmhTNF 联合干预 p53β 阳性的 MKN45 细胞时,从细胞增殖抑制率可以表现出明显的协同抑制肿瘤细胞增殖的作用,联合组



中 p53 β 在 mRNA 水平上的表达高于单独组且随 rmhTNF 浓度的增加而增加, 而 p53 β 阴性的 SGC7901 细胞中未见此现象, 说明 p53 β 在顺铂与 rmhTNF 协同抗肿瘤中发挥重要作用。当 rmhTNF 单独干预 MKN45 细胞时抑制率表现出对 rmhTNF 的剂量依赖性, 但 p53 β 未见明显改变, 而 rmhTNF 对 SGC790 细胞抑制作用不明显。是否由于 rmhTNF 激活了 p53 其它异构体而发挥作用仍有待进一步研究。

含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(caspase)在细胞凋亡中发挥重要作用, caspase 家族中 caspase-3 是细胞凋亡的标志物, 在很多凋亡通路中都有 caspase-3 的激活^[15,16], 其在 caspase 凋亡通路中起着最终效应器的作用。本实验数据显示在 MKN45 细胞和 SGC7901 细胞中细胞增殖抑制率与 caspase-3 表达呈正相关, 说明顺铂和 rmhTNF 可能是通过凋亡途径来抑制细胞增殖。Caspase 作为 p53 下游分子, 实验发现 p53 β 和 caspase-3 在 mRNA 水平上的表达呈正相关, 且在相同条件下 MKN45 细胞中 caspase-3 量大于 SGC7901 细胞, 推测 p53 β 可以上调 caspase-3。然而在 MKN45 细胞中 rmhTNF 单独干预时在 p53 β 不变的情况下, caspase-3 随 rmhTNF 浓度的增加而增加以及 p53 β 阴性的 SGC7901 细胞中 caspase-3 也表现出剂量依赖性, 说明 rmhTNF 可以独立于 p53 β 而激活 caspase-3。

综上所述可以推测, 在胃癌细胞 MKN45 中顺铂与 rmhTNF 联合抗肿瘤效应可能是通过 p53 β 上调 caspase-3 实现的。

参考文献:

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] Gill RS, Al-Adra DP, Nagendran J, et al. Treatment of gastric cancer with peritoneal carcinomatosis by cytoreductive surgery and HIPEC; a systematic review of survival, mortality, and morbidity [J]. J Surg Oncol, 2011, 104(6): 692-698.
- [3] Zhang D, Fan D. New insights into the mechanisms of gastric cancer multidrug resistance and future perspectives [J]. Future Oncol, 2010, 6(4): 527-537.
- [4] Li YM, Wang M, Wang W, et al. Therapeutic effect of local rmhTNF plus cisplatin inoculation on patients with malignant effusion [J]. Chin J Cancer Biother, 2009, 16(6): 637-639. [李咏梅, 王梅, 王薇. 重组改构肿瘤坏死因子联合顺铂治疗恶性腹腔积液的效果 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2009, 16(6): 637-639.]
- [5] Zhou C, Yang J, Huang AM. The killing effect of rmhTNF- α combined with cisplatin on tumor cells [J]. Oncology Progress, 2014, 12 (5): 474-478. [周超, 杨骏, 黄艾弥. rmhTNF- α 联合顺铂杀伤肿瘤细胞作用研究 [J]. 癌症进展, 2014, 12(5): 474-478.]
- [6] Silden E, Hjelle SM, Wergeland L, et al. Expression of TP53 isoforms p53 β or p53 γ enhances chemosensitivity in TP53(null) cell lines [J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56276.
- [7] Marcel V, Fernandes K, Bourdon JC, et al. Modulation of p53 β and p53 γ expression by regulating the alternative splicing of TP53 gene modifies cellular response [J]. Cell Death Differ, 2014, 21(9): 1377-1387.
- [8] el-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, et al. Definition of a consensus binding site for p53 [J]. Nat Genet, 1992, 1(1): 45-49.
- [9] Bourdon JC, Deguin-Chambon V, Lelong JC, et al. Further characterisation of the p53 responsive element: identification of new candidate genes for trans-activation by p53 [J]. Oncogene, 1997, 14(1): 85-94.
- [10] Khoury MP, Bourdon JC. p53 Isoforms: An Intracellular Microprocessor? [J]. Genes Cancer, 2011, 2(4): 453-465.
- [11] Bourdon JC, Fernandes K, Murray-Zmijewski F, et al. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity [J]. Genes Dev, 2005, 19(18): 2122-2137.
- [12] Lane D, Levine A. p53 research: the past thirty years and the next thirty years [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010, 2(12): a000893.
- [13] Avery-Kiejda KA, Morten B, Wong-Brown MW, et al. The relative mRNA expression of p53 isoforms in breast cancer is associated with clinical features and outcome [J]. Carcinogenesis, 2014, 35 (3): 586-596.
- [14] Marcel V, Dichtel-Danjoy ML, Bourdon JC, et al. Biological functions of p53 isoforms through evolution: lessons from animal and cellular models [J]. Cell Death Differ, 2011, 18 (12): 1815-1824.
- [15] Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis [J]. Cell Death Differ, 1999, 6(2): 99-104.
- [16] Liu D, Tian Z, Yan Z, et al. Design, synthesis and evaluation of 1,2-benzisothiazol-3-one derivatives as potent caspase-3 inhibitors [J]. Bioorg Med Chem, 2013, 21(11): 2960-2967.