

异柠檬酸脱氢酶 1 对替莫唑胺干预下 U87 细胞 细胞凋亡的影响*

王举波¹, 权瑜¹, 吕健¹, 董丹凤^{2**}

(1. 西安交通大学第二附属医院 神经外科, 陕西 西安 710004; 2. 西安交通大学第一附属医院 肿瘤内科, 陕西 西安 710061)

[摘要] 目的: 探讨人异柠檬酸脱氢酶 1 (*mIDH1*) 基因突变对替莫唑胺 (TMZ) 干预下脑胶质瘤 U87 细胞凋亡的影响。方法: 用基因重组技术构建真核表达载体 *mIDH1/wIDH1*, 转染技术构建目的基因的 U87 细胞的稳转细胞系, 采用流式细胞术检测 TMZ 干预 24 h 后的细胞凋亡率; 构建裸鼠移植瘤模型, 采用免疫组织化学法 (Western blot) 检测 *mIDH1* 对 TMZ 干预 U87 细胞 24 h 时及 TMZ 连续灌胃 5 d 时裸鼠移植瘤相关凋亡蛋白 Caspase-3、Caspase-9、Bax 及 Bcl-2 的表达水平。结果: 成功构建胶质瘤稳转细胞系, 流式细胞术结果显示, *mIDH1* 能提高 TMZ 作用后 U87 细胞的凋亡率, 也能上调 TMZ 干预 24 h 时 U87 细胞及 TMZ 连续灌胃 5 d 时裸鼠移植瘤中 Caspase-3、Caspase-9、Bax 蛋白表达水平, 下调 Bcl-2 蛋白表达水平 ($P < 0.05$)。结论: *mIDH1* 通过上调 TMZ 作用的 U87 细胞、裸鼠移植瘤组织的 Caspase-3、Caspase-9、Bax 表达、下调 Bcl-2 表达促进胶质瘤细胞凋亡。

[关键词] 胶质瘤细胞; 异柠檬酸脱氢酶 1; 凋亡; 细胞; 凋亡相关蛋白; 替莫唑胺

[中图分类号] R739.41 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)08-0892-06

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.08.005

Effect of Isocitrate Dehydrogenase 1 on Temozolomide-Induced Apoptosis of Glioma U87 Cells

WANG Jubo¹, QUAN Yu¹, LV Jian¹, DONG Danfeng²

(1. Department of Neurosurgery, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi, China;
2. Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of human isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) gene mutation (mutIDH1) on the apoptosis of glioma U87 cells induced by temozolomide (TMZ). **Methods:** Human wild type IDH1 cDNA was amplified by PCR and cloned into pCMV expression vector. Mutated IDH1 (mutIDH1) was generated using a mutagenesis kit. The recombinant vectors expressing IDH1 or mutIDH1 gene were transfected into U87 cells to establish stable cell lines. Flow cytometry was used to detect the TMZ-induced U87 cell apoptosis. Glioma-bearing nude mice were treated with TMZ for 5 days. Immunohistochemistry and Western blot were used to detect the expression levels of caspase-3, Caspase-9, Bax and Bcl-2 in glioma. **Results:** IDH1 or mutIDH1 were stably expressed in U87 cells. The mutation of IDH1 enhanced TMZ-induced apoptosis compared to wild type IDH1. Moreover, the mutation of IDH1 upregulated expression levels of proapoptotic protein such as Caspase-3, Caspase-9, Bax, while downregulated Bcl-2 expression level ($P < 0.05$). **Conclusion:** mutIDH1 can synerize TMZ-induced apoptosis by up-regulating Caspase-3, Caspase-9 and Bax expression in vivo, and down-regulating Bcl-2 expression.

[Key words] glioma cells; mutated isocitrate dehydrogenase 1; apoptosis; apoptosis-related protein; temozolomide

*[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目(81801121); 西安交通大学基本科研业务自由探索项目(xjj2018136)

** 通信作者 E-mail: 5195861@qq.com

网络出版时间: 2019-08-27 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190827.1841.005.html>

脑胶质瘤是发病率最高、且最具危险性的颅内原发恶性肿瘤,尽管近年来外科技术及各种综合治疗方法不断更新,但仍然难以改变其高居不下的致死率及致残率^[1-4]。肿瘤细胞增殖同时存在细胞死亡^[5],主要包括坏死与凋亡,后者是细胞自身增殖调控的重要方式,是由几条经典凋亡通路控制的程序性死亡^[6],与肿瘤的进展关系密切^[7-8],研究胶质瘤细胞的凋亡与增殖特性具有重要的临床价值^[9]。柠檬酸脱氢酶 1 (isocitrate dehydrogenase1, IDH1) 在胶质瘤中有着广泛的突变率,且突变型患者具有相对较好的预后^[10-11],但目前国内外对突变型胶质瘤患者良好预后的机制鲜有报道,本研通过研究异柠檬酸脱氢酶 1 (mutant isocitrate dehydrogenase1, mIDH1) 基因过表达对替莫唑胺 (temozolomide, TMZ) 干预下人脑恶性胶质瘤细胞系 U87 凋亡的影响,探讨 mIDH1 影响胶质瘤患者预后的原因,为临床治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

U87 人脑恶性胶质瘤细胞系由西安交通大学医学院中心实验室提供, Caspase-3 及 Caspase-9 兔抗人单克隆抗体购买于 Santa Cruze 公司, 胎牛血清购自四季青公司, 脂质体 Lip2000 系购自 Sigma 公司, Western blot 试剂盒购自上海锐赛公司; 研究所用的相关基本试剂及试验耗材均购自西安交通大学实验耗材供应中心, 基本操作仪器由西安交通大学环境重点实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 U87 细胞用含有双抗 (青霉素、链霉素各 100 000 IU/L)、10% 胎牛血清的 DMEM 培养基在 37 ℃ 培养箱、5% CO₂ 条件下培养, 定时换液、传代。

1.2.2 真核表达载体构建与目的基因细胞稳定转染 采用 Primer5 软件设计 IDH1 PCR 扩增引物, 模板为 Pcmv-IDH1、参考文献进行扩增, PCR 产物大小为 225 ~ 1 466 bp; 采用限制性内切酶 BamH I 和 SacI 进行双酶切, 回收酶切片段, T4 DNA 连接酶对载体与双酶切产物进行重组, 构建 (wild isocitrate dehydrogenase1, wIDH1) 真核表达载体, 利用点突变试剂盒突变技术构建 mIDH1 真核表达载体。U87 细胞接种培养融合率达 60% ~ 70% 时, 以脂质体 Lip2000 转染细胞, G418 筛选, 直至稳定的单细胞克隆株出现, 对单细胞克隆株传代培养,

冻存留种。

1.2.3 mIDH1 对体外 U87 细胞凋亡的影响 采用流式细胞术, 转染成功的 U87 细胞传代培养 24、48 h, 适量 0.25% 的胰酶消化液消化细胞, 收集细胞, 室温, 800 r/min 离心 5 min; 再次重悬细胞并计数, 室温, 800 r/min 离心 5 min; 弃去上清液, 加入 binding buffer 400 μL 重悬细胞; 加入 Annexin V-RFP 5 μL, 室温避光孵育 15 min; 30 min 内检测 (激发光波长 545 nm, 发射波长 > 575 nm)。

1.2.4 TMZ 对 mIDH1 过表达胶质瘤细胞凋亡的影响 采用流式细胞术, 转染成功的 U87 细胞传代培养, 加入 0.25% 胰酶消化、计数细胞, 种入 6 孔培养板; 按照 0、50 及 100 mg/L 的 TMZ 浓度计算需要补加入的培养基和 TMZ 溶液量, 将二者混合后缓慢加入培养孔中, 设置 3 个复孔, 培养 24 h; 胰酶消化, 收集细胞, 加入 binding buffer 400 μL, 重悬细胞; 加入 Annexin V-RFP 5 μL, 避光孵育 15 min, 30 min 内检测 (激发光波长采用 545 nm, 发射波长 > 575 nm)。

1.2.5 TMZ 对 mIDH1 过表达细胞凋亡相关蛋白表达的影响 采用 Western blot 法, 转染成功的 U87 细胞细胞胰酶消化, 离心收集, 用 50 mg/L 的 TMZ 培养液重悬细胞并传代; 培养 24 h 时, 置于冰上, RIPA 裂解液裂解 15 ~ 30 min。收集细胞, 超声粉碎, 4 ℃ 12 000 r/min 离心 15 min; 吸取上清液, 蛋白定量分装保存。SDS 蛋白质聚丙烯酰胺凝胶电泳及转膜, 取待测蛋白样品 40 μg 上样, 进行半干式法转膜, TBST 漂洗 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h; 加入封闭液稀释配制的一抗, 4 ℃ 孵育过夜; 分别加入以牛奶封闭的 HRP 标记的二抗 (1:5 000), 室温孵育 2 h; TBST 溶液洗膜、显色, 显影定影; 凝胶成像系统扫描记录目的蛋白的表达强弱, 用光密度表示, 目的蛋白与 β-actin 比值来表示相对表达水平, 全自动凝胶成像系统对结果拍照并分析。

1.2.6 TMZ 对裸鼠移植瘤凋亡相关蛋白表达的影响 采用免疫组织化学法, 皮下注射法构建裸鼠移植瘤模型, 计算裸鼠体表面积 (S), $S = \text{体型系数} (0.06) \times 2/3 \text{ 体质量}$, 根据裸鼠的体表面积及 TMZ 用药参考确定 TMZ 给药剂量, 将 TMZ 用 DMEM 配成混悬液, 按裸鼠体表面积每日灌胃给药, 连续 5 d, 实验终末处死裸鼠, 留取移植瘤标本, 石蜡包埋, 做 5 μm 石蜡组织切片、烘干、二甲苯及梯度酒精脱蜡, 3% H₂O₂ 浸泡, 加入柠檬酸缓冲液暴露抗原结合位点, 加一抗 (利用 PBS 代替一抗作空白对

照),4℃过夜,加入二抗,37℃孵育30 min,滴上适量的SABC,37℃孵育30 min,滴加显色剂,中性树胶封片,显微镜下观察瘤细胞内见棕黄色或者棕褐色颗粒为阳性细胞。按阳性细胞面积计分:不表达记0分、<10%记1分、10%~50%记2分、51%~80%记3分、>80%记4分,按着色强度计分:不表达记0分、弱表达记1分、中度表达记2分、强表达记3分;两者积分乘积为0表示阴性、>1为阳性,1~3表示弱阳性、4~7表示阳性、8~12为强阳性。

1.3 统计学方法

所有数据均用SPSS 16.0统计软件进行处理与分析。计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据比较采用单因素方差分析,两两比较采用 t 检验;计量资料有率(%)表示,数据比较采用 χ^2 检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 mIDH1 稳定转染 U87 细胞系构建

如图1所示,mIDH1基因稳定转染U87细胞

后,经G418单克隆筛选,最终筛选出稳转细胞单克隆株,因目的基因与荧光报告基因有共同的启动子,故而目的基因得到稳定表达,荧光显微镜下可见稳定表达的EGFP荧光报告基因。

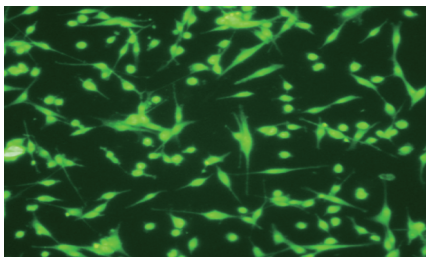


图1 U87 稳定转染细胞内 EGFP 表达(40×)

Fig.1 Expression of EGFP in U87 stable cell line

2.2 U87 细胞凋亡率

如图2,将mIDH1、wIDH1及对照组稳定转染U87细胞常规培养进行细胞凋亡检测,结果显示,与对照组比较,mIDH1组细胞凋亡率无显著改变,经培养24及48 h时3组细胞的细胞凋亡率均接近于1%,差异无统计学意义($P > 0.05$);因未检测到mIDH1/wIDH1对体外培养细胞的凋亡有明显影响,故未再对体内凋亡蛋白进行检测。

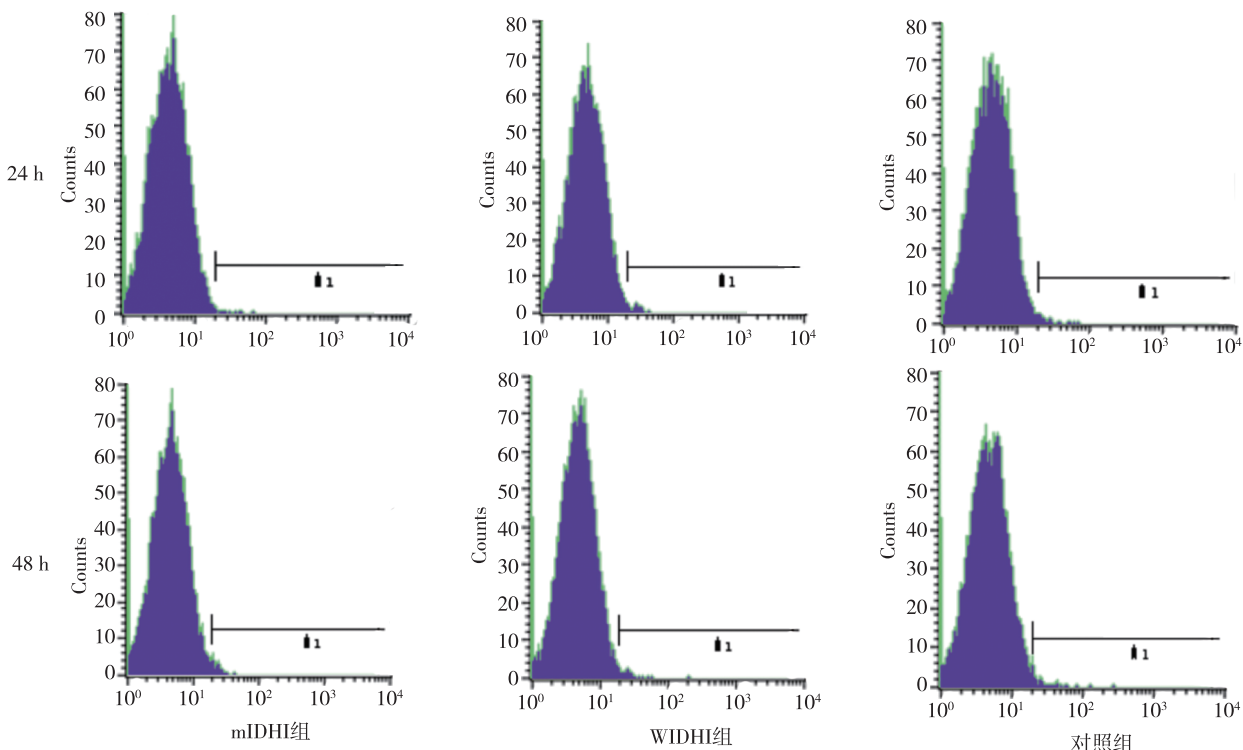


图2 3组U87细胞培养24 h及48 h的细胞凋亡率

Fig.2 Apoptotic rate of the three cell line cultured for 24 hand 48 h

2.3 TMZ 干预后 U87 细胞凋亡率

流式细胞检测结果显示,TMZ干预浓度为

50 mg/L时,mIDH1过表达组U87细胞即表现出较高的凋亡率,且随TMZ浓度的升高,细胞凋亡比例

升高,与其它两组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),wIDH1 组细胞凋亡率显著低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 不同浓度 TMZ 作用下三组细胞的凋亡率(%)
Tab. 1 The effect of different concentrations of TMZ on cellular apoptosis

TMZ 干预浓度 (mg/L)	U87 细胞的凋亡率(%)		
	对照组	mIDH1 组	wIDH1 组
0	1.05 ± 0.32	1.12 ± 0.41	1.07 ± 0.23
50	25.76 ± 3.55	43.34 ± 3.72 ⁽¹⁾	18.54 ± 3.16 ⁽¹⁾⁽²⁾
100	49.33 ± 4.65	74.24 ± 4.87 ⁽¹⁾	40.52 ± 4.83 ⁽¹⁾⁽²⁾

注:⁽¹⁾与对照组比较, $P < 0.05$;⁽²⁾与 mIDH1 组比较, $P < 0.05$

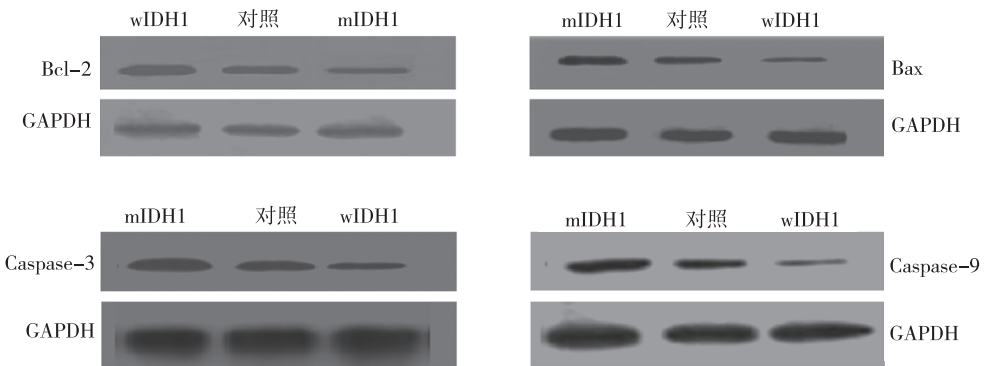


图 3 TMZ 干预后 U87 细胞凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2、Caspase-3 及 Caspase-9 表达(Western blot)

Fig. 3 The effect of TMZ on the expression levels of apoptosis-associated proteins
表 2 TMZ 干预后 U87 细胞凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2、Caspase-3 及 Caspase-9 表达

组别	细胞凋亡相关蛋白			
	Bcl-2	Bax	Caspase-3	Caspase-9
对照组	0.89 ± 0.19	0.43 ± 0.17	0.55 ± 0.16	0.52 ± 0.14
mIDH1 组	0.33 ± 0.14 ⁽¹⁾	0.88 ± 0.21 ⁽¹⁾	0.83 ± 0.24 ⁽¹⁾	0.69 ± 0.14 ⁽¹⁾
wIDH1 组	0.92 ± 0.21 ⁽²⁾	0.27 ± 0.14 ⁽¹⁾⁽²⁾	0.26 ± 0.15 ⁽¹⁾⁽²⁾	0.25 ± 0.16 ⁽¹⁾⁽²⁾

注:⁽¹⁾与对照组比较, $P < 0.05$;⁽²⁾与 mIDH1 组比较, $P < 0.05$ 。

2.5 TMZ 干预后裸鼠移植瘤 Bcl-2、Bax、Caspase-3 及 Caspase-9 蛋白表达

免疫组织化学结果显示, mIDH1 组移植瘤中 Bcl-2 蛋白表达水平显著低于对照组和 wIDH1 组,

表 3 TMZ 作用后细胞相关凋亡蛋白免疫组化染色计分(分)
Tab. 3 Immunohistochemical scores of TMZ-mediated apoptosis-associated protein expression

组别	细胞凋亡相关蛋白			
	Bcl-2	Bax	Caspase-3	Caspase-9
对照组	10.2 ± 1.3	8.9 ± 1.2	10.3 ± 1.4	10.2 ± 1.3
mIDH1 组	3.5 ± 0.6 ⁽¹⁾	9.8 ± 1.2	10.7 ± 1.6	3.5 ± 0.6 ⁽¹⁾
wIDH1 组	10.5 ± 1.4 ⁽²⁾	2.8 ± 0.4 ⁽¹⁾⁽²⁾	2.1 ± 0.4 ⁽¹⁾⁽²⁾	10.5 ± 1.4 ⁽²⁾

注:⁽¹⁾与对照组比较, $P < 0.05$;⁽²⁾与 mIDH1 组比较, $P < 0.05$ 。

2.4 TMZ 干预后 U87 细胞 Bcl-2、Bax、Caspase-3 及 Caspase-9 蛋白表达

转染 mIDH1、wIDH1 及空载体的胶质瘤 U87 细胞经 TMZ 干预后,Western blot 结果显示,与对照组比较,mIDH1 组脑胶质瘤 U87 细胞的 Bcl-2 蛋白表达水平降低, Bax、Caspase-3 及 Caspase-9 蛋白表达水平升高,wIDH1 组脑胶质瘤 U87 细胞 Bax、Caspase-3 及 Caspase-9 蛋白表达水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$), Bcl-2 则差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 3、表 2。

Caspase-9 蛋白表达水平显著高于对照组和 wIDH1 组,差异有统计学意义($P < 0.05$);wIDH1 组 Bax、Caspase-3 蛋白表达水平显著低于对照组和 mIDH1 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 4、表 3。

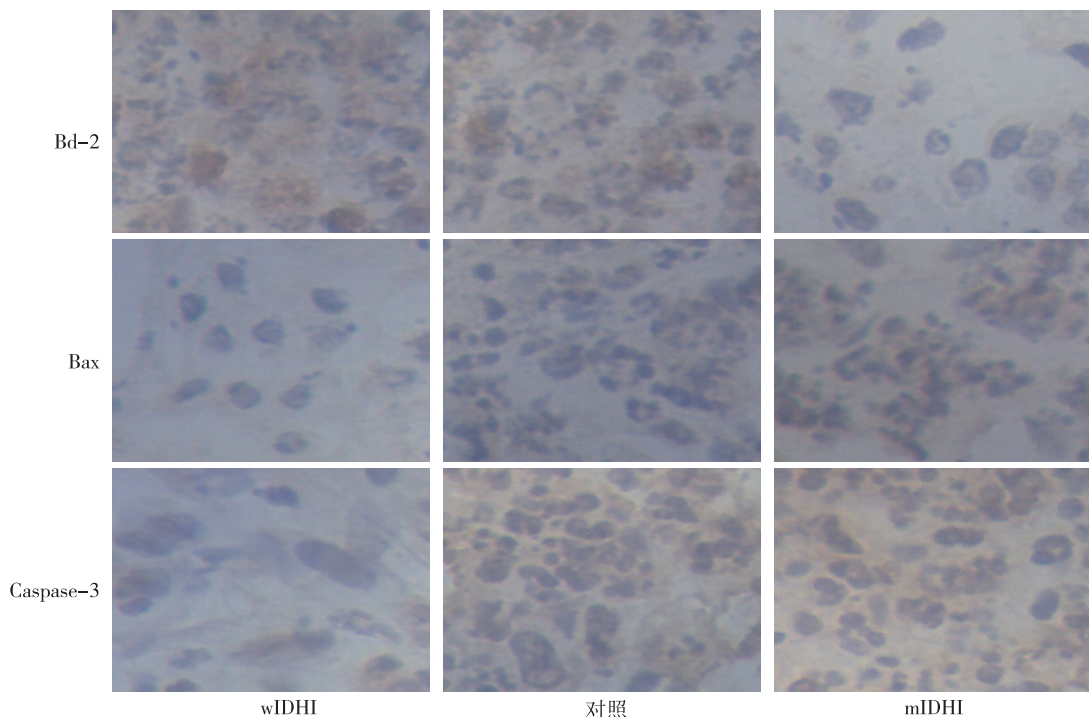


图4 TMZ干预后移植瘤 Bcl-2、Bax 及 Caspase-3 表达(免疫组织化学法, ×400)

Fig. 4 The effect of mutIDH1 expression on TMZ-mediated apoptosis-associated protein expression

3 讨论

肿瘤的形成是细胞增殖过度与细胞凋亡减少的累积效应^[12],抗凋亡作用不仅在肿瘤的形成中起重要作用,而且与肿瘤的放化疗敏感性有着密切的关系^[13]。细胞的凋亡调控是在凋亡与抗凋亡因素的共同作用下完成的,是一个多因素参与的复杂过程,调控基因分为凋亡基因和抗凋亡基因,前者如野生型 *p53*、*Bax*、*FAS/Apo-1*、*Bcl-xs* 等,后者如 *Bcl-2*、*Bcl-xl* 等。新生肿瘤的产生,往往伴随抗凋亡基因表达上调及凋亡基因表达的下调。*Bcl-2* 是目前研究最深入的凋亡调控基因,属于抗凋亡基因^[14],其功能蛋白定位于线粒体外膜、核膜和粗面内质网上,具有膜通透活性适配子双重功能^[15]。

研究报道,上调抗凋亡因子的表达,可在一定程度上抑制过氧化物和自由基增加所诱导的细胞凋亡^[16]。目前认为,*Bcl-2*/*Bax* 比值决定细胞是否凋亡。在最近一项关于侵袭性垂体瘤的研究中发现 *Bcl-2* 下调与细胞凋亡增加有关,且 *Bcl-2*、*Bax* 的表达水平与 *Caspase-3*、*Caspase-9* 的表达水平有关,在胶质瘤细胞系的相关研究中也类似发现^[17]。*Caspase* 家族成员的激活是细胞凋亡过程中的重要事件^[18]。*Caspase-3* 是其中的一个关键酶,对许多蛋白的降解都起到了重要的参与作用,

Caspase-9 主要发生于凋亡起始期,由药物化疗激活,进而激活下游 *Caspase-3*,导致凋亡。*Bcl-2* 与 *Bax* 基因是凋亡调控的两个重要基因,*Bcl-2* 的激活抑制细胞色素 C 的释放,从而抑制 *Caspase* 激活而抑制凋亡^[19]。在细胞外凋亡途径中,死亡配体与受体,激活死亡信号,活化 *Caspase-8*,细胞色素 C 释放或者通过直接作用于 *Caspase-3* 及其它下游 *Caspase* 活化凋亡途径。在细胞内途径中,细胞内的一切异常改变都可作为死亡通知信号,诱发细胞死亡,这些改变可导致线粒体释放细胞色素 C 与 *Caspase-9* 结合形成凋亡复合体而进一步被激活,其下游的 *Caspase-3* 等被激活而导致细胞凋亡。TMZ 在体内转化为活性产物,导致 DNA 甲基化加成物的错配修复,发挥细胞毒作用,启动内源性凋亡途径^[20]。

本研究发现,TMZ 作用于体外胶质瘤细胞后, *mIDH1* 组 U87 细胞 *Bcl-2* 表达下调, *Bax*、*Caspase-3*、*Caspase-9* 表达均有不同程度的上调,其凋亡率较 *wIDH1* 组及对照组高, *mIDH1* 通过改变凋亡相关蛋白的表达水平对 TMZ 的抗肿瘤效应起到了协同叠加作用,从而提高了化疗敏感性,这与调控 *Bcl-2* 水平增强化疗敏感性的文献报道相符^[14]。而 *wIDH1* 组 U87 细胞 *Bcl-2* 表达有所上调, *Bax*、*Caspase-3*、*Caspase-9* 表达均有不同程度的下调,与 *mIDH1* 组表现相反,在一定程度上表现出化疗抵

抗性。同样, TMZ 干预移植瘤模型后, mIDH1 组移植瘤样本中 Bcl-2 的表达下调, Bax 表达上调, Caspase-3 及 Caspase-9 表达上调, 在干预中表现出协同作用。wIDH1 组则表现出一定的拮抗作用, 究其原因可能是 wIDH1 通过正常的三羧酸循环维持良好的能量代谢水平及还原底物, 避免细胞氧化损伤导致的凋亡^[20]。而 mIDH1 通过异常代谢途径, 不能为提供正常的细胞供能及抗氧化还原底物, 以对抗过度的氧化应激, 细胞微环境的改变导致内源途径激活, 加之能量代谢不足, 经典的 MAPK 和 Akt 途径中的 Bad 磷酸化不足, 使 Bad 去磷酸化而活化, 活化下游的 Bax 基因, 促使细胞色素 C 的释放, 最终诱发细胞凋亡。

综上, 本研究发现 mIDH1 通过上调 TMZ 作用后 U87 细胞及裸鼠移植瘤组织的 Caspase-3、Caspase-9、Bax 表达、下调 Bcl-2 表达促进胶质瘤细胞凋亡, 增强治疗敏感性, 协同 TMZ 抗肿瘤, 增加化疗敏感性, 改善胶质瘤患者预后。

4 参考文献

[1] OHANSEN M D, URUP T, HOLST C B, et al. Outcome of bevacizumab therapy in patients with recurrent glioblastoma treated with angiotensin system inhibitors [J]. *Cancer Invest*, 2018, 36(9-10): 512-519.

[2] BATALOV A I, ZAKHAROVA N E, POGOSBEKYAN E L, et al. Non-contrast ASL perfusion in preoperative diagnosis of supratentorial gliomas [J]. *Zh Vopr Neurokhir Im N N Burdenko*, 2018, 82(6): 15-22.

[3] WANG R, ZUO X, WANG K, et al. MicroRNA-485-5p attenuates cell proliferation in glioma by directly targeting paired box 3 [J]. *Am J Cancer Res*, 2018, 8(12): 2507-2517.

[4] AMENG L, MA P, CAI R, et al. Long noncoding RNA ZEB1-AS1 promotes the tumorigenesis of glioma cancer cells by modulating the miR-200c/141-ZEB1 axis [J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(11): 3395-3412.

[5] CHEN J. The cell cycle arrest and apoptotic functions of p53 in tumor initiation and progression [J]. *Cold Spring Harbor perspectives in Medicine*, 2016, 6(3): a026104.

[6] GUO L, WANG X, YANG Y, et al. Methylation of DACT2 contributes to the progression of breast cancer through activating WNT signaling pathway [J]. *Oncology Letters*, 2018, 15(3): 3287-3294.

[7] 尤宇, 李小旭, 王重初, 等. Galectin-3 调控 Wnt 信号通路对脑胶质瘤细胞凋亡的影响 [J]. *现代肿瘤医学*, 2019, 27(6): 934-938.

[8] WANG G, WANG J J, WANG Y Z, et al. Myricetin nanoliposomes induced SIRT3-mediated glycolytic metabolism leading to glioblastoma cell death [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018, 46(sup3): 180-191.

[9] REITER-BRENNAN C, SEMMLER L, KLEIN A. The effects of 2-hydroxyglutarate on the tumorigenesis of gliomas [J]. *Contemp Oncol*, 2018, 22(4): 215-222.

[10] ERIC S L, ROGER E, MC L. Tissue is the issue: biomarkers of prognosis and classification in adult gliomas [J]. *Seminars in Oncology Nursing*, 2018, 34(5): 430-442.

[11] QINGFU X U, KARIM A, YAN Z, et al. Oncogenic MicroRNA-20a is downregulated by the HIF-1 α /c-MYC pathway in IDH1 R132H-mutant glioma [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 499(4): 882-888.

[12] SONG D, LIANG H, QU B, et al. Ivermectin inhibits the growth of glioma cells by inducing cell cycle arrest and apoptosis in vitro and in vivo [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(1): 622-633.

[13] FULDA S, DEBATIN K M. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2004, 4(7): 569-576.

[14] ZHANG X Y, YU J W, ZHAO C H, et al. MiR-181b-5p modulates chemosensitivity of glioma cells to temozolomide by targeting Bcl-2 [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 109(1): 2192-2202.

[15] JENG P S, INOUE-YAMAUCHI A, HSIEH J J, et al. BH3dependent and independent activation of Bax and Bak in mitochondrial apoptosis [J]. *Curr Opin Physiol*, 2018, 3(2): 71-81.

[16] ROOS W P, THOMAS A D, KAINA B. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology [J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, 16(1): 20-33.

[17] LYTTLE R A, JIANG Z, ZHENG X, et al. BCNU down-regulates anti-apoptotic proteins bcl-xL and Bcl-2 in association with cell death in oligodendroglioma-derived cells [J]. *Neurooncol*, 2004, 68(3): 233-241.

[18] ZHANG X, CHEN , CAI G, et al. Carnosic acid induces apoptosis of hepatocellular carcinoma cells via ROS-mediated mitochondrial pathway [J]. *Chem Biol Interact*, 2017, 277(N): 91-100.

[19] 尹智勇, 杨俊元, 祁宏. Bcl-2 蛋白质家族调控细胞凋亡机制的研究进展 [J]. *信阳师范学院学报(自然科学版)*, 2017, 30(2): 340-344.

[20] KALE J, OSTERLUND E J, ANDREWS D W. Bcl-2 family proteins: Changing partners in the dance towards death [J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(1): 65-80.

(2019-04-25 收稿, 2019-08-03 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 张启芳