

右旋硫辛酸对人肝癌 HepG2 细胞生长增殖及其相关机制研究

刘晶*, 黄严伟, 周波, 宋清清

(南京工业大学, 南京 211800)

摘要 研究天然抗氧化剂右旋硫辛酸对人肝癌 HepG2 细胞生长、增殖的影响及其相关机制。采用 MTT 检测细胞增殖情况,活性氧试剂盒分析细胞内 ROS 水平。流式细胞术和 Hoechst 33258 染色观察细胞凋亡和形态变化。Western blot 检测凋亡、自噬以及相关通路蛋白表达,包括 Bax、Bcl-2、caspase 3、PARP、ATG5、ATG7、LC3、Beclin1、mTOR、P70S6K、P38、P53、ERK、Akt、MEK 等。结果表明,经不同浓度不同时间药物处理,右旋硫辛酸可抑制 HepG2 细胞增殖,提高细胞内 ROS 水平,并呈时间和剂量依赖性。右旋硫辛酸通过上调促凋亡蛋白 Bax,激活 caspase 家族,从而激活凋亡效应蛋白 caspase 3 和 PARP,同时右旋硫辛酸还可上调自噬相关蛋白 ATG5、ATG7、Beclin1、LC3 水平,抑制磷酸化 mTOR 和 P70S6K,激活自噬。通路研究表明:右旋硫辛酸可上调磷酸化的 P38 和 JNK 促凋亡通路促进凋亡,抑制磷酸化 Akt、ERK 的表达。添加自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤后,明显抑制自噬发生。因此,右旋硫辛酸可能通过调控 P38/AMPK-JNK, PI3K/Akt 和 Ras/Raf/MEK/ERK 途径激活自噬,诱导细胞凋亡。

关键词 右旋硫辛酸; HepG2; 凋亡; 自噬; 肝癌

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2017)03-0348-07

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20170316

引用本文 刘晶, 黄严伟, 周波, 等. 右旋硫辛酸对人肝癌 HepG2 细胞生长增殖及其相关机制研究[J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(3): 348–354.

Cite this article as: LIU Jing, HUANG Yanwei, ZHOU Bo, et al. Effect of R-(+)-lipoic acid on growth, proliferation and related mechanism in human HepG2 cells[J]. J China Pharm Univ, 2017, 48(3):348 – 354.

Effect of R-(+)-lipoic acid on growth, proliferation and related mechanism in human HepG2 cells

LIU Jing*, HUANG Yanwei, ZHOU Bo, SONG Qingqing

Nanjing TECH University, Nanjing 211800, China

Abstract To study the effect of antioxidants R-(+)-lipoic acid (R-LA) on cells growth, proliferation and related mechanisms in human HepG2 cells lines. MTT was used to measure cells growth and proliferation. Reactive oxygen species (ROS) kit was used to analyze ROS level. Cell apoptosis and cell morphological changes were observed by flow cytometry and Hoechst 33258 test. Protein expression levels of apoptosis, autophagy and related pathway were analyzed through Western blot, including Bax, Bcl-2, caspase 3, PARP, ATG5, ATG7, LC3, Beclin1, mTOR, P70S6K, P38, P53, ERK and Akt etc. Results showed that cell growth and proliferation were inhibited in a dose- and time-dependent manner after being treated by lipoic acid. R-LA could increase ROS production, pro-apoptosis proteins Bax levels, activated caspase family and PARP. Meanwhile, R-LA could up-regulate the levels of autophagy-related proteins including ATG5, ATG7, Beclin1 and LC3, and down-regulate phospho-mTOR and P70S6K levels. Signal pathway results showed that R-LA could up-regulate phospho-P38 and phospho-JNK levels, and decrease phospho-Akt and phospho-ERK. When adding 3-methyladenine, autophagy was inhibited. Thus, R-LA might activate autophagy and induce apoptosis by P38/AMPK-JNK, PI3K/AKT and Ras/Raf/MEK/ERK pathways.

Key words R-(+)-lipoic acid; HepG2 cells; apoptosis; autophagy; liver cancer

右旋硫辛酸(R-LA)是 α -硫辛酸的右旋光学异构体,是唯一的具脂溶性和水溶性的天然抗氧化剂,通过清除体内氧自由基,维持体内氧代谢平衡,可减轻或抑制氧化损伤^[1]。临幊上硫辛酸已广泛应用于治疗肝病、肾脏和神经疾病、糖尿病及糖尿病周围神经病变、肥胖症、湿疹、帕金森病、心脏病等疾病^[2]。但有研究显示,高剂量的硫辛酸也可提高氧化应激水平,发挥促氧化的作用,引起心肌细胞内活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)增多,导致心肌细胞变性、纤维化等心脏毒性^[3]。近几年对硫辛酸研究越来越多,研究热点都集中在它对肿瘤的治疗作用及相关作用机制,包括肝癌^[4]。硫辛酸可下调cyclin A水平,上调P27和P21水平,抑制肝癌细胞生长和增殖。同时增加活性氧的产生,激活P53并上调Bax,释放细胞色素C,激活caspase家族,激活促凋亡通路JNK和抑制抑凋亡通路Akt,从而诱导肝癌细胞凋亡^[5]。本研究将在此基础上,进一步研究右旋硫辛酸对人肝癌HepG2细胞的生长、增殖、自噬和凋亡的相关分子机制。

1 材料

1.1 药品与试剂

右旋硫辛酸(南京海融医药科技有限公司);DMEM培养基,胎牛血清(美国Gibco公司);胰酶(含EDTA)、MTT粉末、Annexin V-FITC/PI凋亡试剂盒、活性氧(ROS)分析试剂盒(南京凯基生物技术股份有限公司);Hoechst 33258染料、RIPA(中国碧云天生物技术有限公司); β -actin(武汉Elabscience公司);Bax(上海Abcam公司);Bcl-2、ATG5、ATG7、Beclin1、ERK、p-Akt₃₀₈、p-Akt₄₇₃、P38、JNK、caspase 3(美国Cell Signaling Technology公司);3-甲基腺嘌呤(美国MCE公司); β -巯基乙醇(美国Sigma-Aldrich公司);PMSF(中国BioSHARP公司);PVDF膜(美国Millipore Billerica公司)蛋白测定试剂盒(南京建成生物工程公司);化学发光显色液(美国Life Technologies公司);其他试剂均为市售分析纯。

1.2 细胞株

人肝癌HepG2细胞购自中国科学院上海细胞库。

1.3 仪器

荧光显微镜Olympus BX51(日本Olympus公司);酶标仪Elx-800型(美国Baker公司);倒置显

微镜CDM-201(日本Nikon公司);电泳仪Mini Trans-Blot(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 人肝癌HepG2细胞的培养

HepG2细胞用DMEM培养基(10%FBS+1%的双抗)培养,37℃、5%CO₂培养箱中培养,每天换液,用PBS清洗2次,胰酶消化传代3次之后种板。

2.2 MTT检测细胞增殖

取对数生长期细胞,PBS清洗2次,用含EDTA的胰酶消化5 min,血球计数板计数后,每孔5 000个细胞的浓度种在96孔板,6个复孔,细胞贴壁24 h后,分别用1,1.5,2 mmol/L硫辛酸进行给药处理,另设对照组,37℃培养基继续培养12,24,48 h。每孔加5 mg/mL MTT 10 μL于培养箱中培养4 h后去掉培养基,每孔加DMSO 150 μL,摇床放置10 min,用酶标仪在波长为492 nm处检测吸收度。

2.3 细胞ROS检测

细胞贴壁后,每孔3×10⁵个细胞的浓度种在6孔板中,1.5 mmol/L硫辛酸药物处理12,24,48 h,另设对照组。用PBS稀释10 mmol/L的AM酯原液,往细胞悬液中加入1~10 μmol/L的AM酯工作液,37℃孵育30 min,用PBS清洗2次,流式细胞仪检测ROS水平。

2.4 细胞凋亡检测

取对数期细胞接种于6孔板,细胞浓度为每孔3×10⁵个,贴壁24 h,用1.5 mmol/L右旋硫辛酸处理12,24,48 h。用不含EDTA的胰酶消化,含1%PBS终止消化,PBS洗两次,2 000 r/min离心5 min,加缓冲液500 μL重悬,加PI和FITC各5 μL,避光反应15 min,1 h之内上机检测。

另取对数期细胞用胰酶消化,接种于24孔板,细胞贴壁后加1.5 mmol/L硫辛酸处理12,24,48 h。用4%多聚甲醛固定10 min,PBS清洗2次,加Hoechst 33258染料5 μL染色15 min,PBS清洗3次,每次5 min,采用倒置荧光显微镜(400×)观察细胞凋亡情况。

2.5 Western blot分析

对数期HepG2细胞接种于6孔板,每孔3×10⁵个细胞,贴壁24 h之后,硫辛酸处理12,24,48 h,PBS清洗2次,每孔加RIPA(含100×PMSF、1 000×Aprotenin、100×Na₃VO₄、1 000×Leupeptin)100 μL在冰上裂解30 min,刮下细胞12 000 r/min

离心 10 min, 取上清液, Bradford 法测蛋白浓度, 加上样缓冲液(含 6% β -巯基乙醇)100 °C 煮 5 min。冻 -20 °C 备用。采用 SDS-PAGE 恒压电泳 60 V (40 min), 120 V(120 min), 100 V 转膜 2 h, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 1:1 000 稀释一抗 4 °C 孵育过夜, TBST 洗 3 次, 每次 5 min, 二抗 1:5 000 稀释孵育 1 h, BD 成像仪拍照。

2.6 数据分析

实验数据用 SPSS 19.0、Excel 进行统计分析, 所有的实验和数据处理均重复 3 次。

3 结果

3.1 右旋硫辛酸抑制人肝癌 HepG2 细胞生长和增殖

通过 MTT 法测定不同浓度的右旋硫辛酸作用人肝癌 HepG2 细胞 12, 24, 48 h 后细胞生长增殖情况。经测定, 相比于对照组, 1.5 mmol/L 给药组细胞活性均下降, 12, 24, 48 h 给药组细胞活性分别为 72.3%、64% 和 58.4%, 随着给药浓度的升高和药物作用时间的延长, 细胞的生长和增殖均受到抑制, 且变化显著, 呈浓度时间依赖(图 1)。

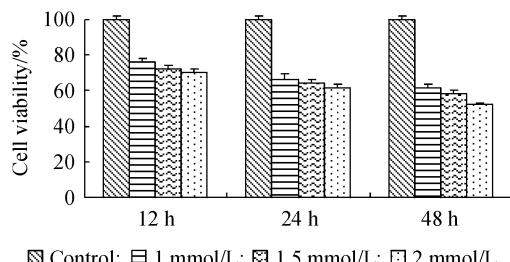


Figure 1 Viabilities of HepG2 cells treated by R-(+)-lipoic acid (R-LA) for 12, 24, 48 h were analyzed by MTT assay ($\bar{x} \pm s, n=3$)

* $P < 0.05$ vs control group

3.2 右旋硫辛酸提高人肝癌细胞 HepG2 内 ROS 水平

1.5 mmol/L 右旋硫辛酸作用人肝癌 HepG2 细胞 12, 24, 48 h 之后, 采用 ROS 分析试剂盒经流式细胞仪检测细胞内 ROS 水平, 结果如图 2 所示。对照组细胞内 ROS 水平约 0.29%, 而 12, 24, 48 h 给药组细胞内 ROS 水平分别为 61.72%、78.29% 和 90.68%, 相比于对照组, 给药后细胞体内 ROS 生成显著增多, 呈时间依赖性。

3.3 右旋硫辛酸诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡

采用 AnnexinV-FITC/PI 凋亡试剂盒和 Hoechst 33258 荧光染色对右旋硫辛酸作用 HepG2 细胞 12, 24, 48 h 后的凋亡水平进行分析。结果显示, 对照组凋亡率仅为 5.34%, 12 h 给药处理后, 凋亡率约为

20%, 随着药物处理时间的延长, HepG2 细胞凋亡率显著增加, 48 h 给药组凋亡率高达 51.8% (图 3-A)。

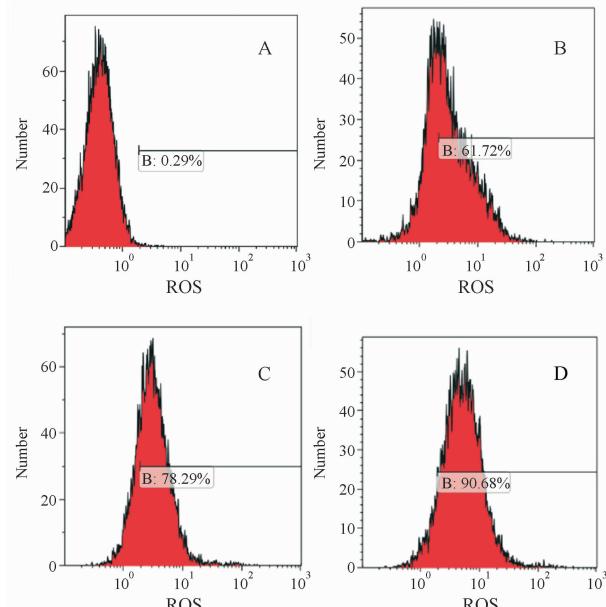


Figure 2 Reactive oxygen species (ROS) levels in HepG2 cells treated by R-LA was analyzed by ROS analysis kit
A: Control; B: 12 h; C: 24 h; D: 48 h

使用 Hoechst 33258 染料染色, 采用倒置荧光显微镜观察 1.5 mmol/L 右旋硫辛酸对人肝癌 HepG2 细胞的形态影响(图 3-B), 与对照组相比, 加药处理后, 细胞形态变化明显, 出现细胞核呈致密浓染或呈碎块状致密浓染, 并呈现亮蓝色, 伴有凋亡小体生成等凋亡的形态学特征, 同样随着药物作用时间的延长, 这些凋亡的形态学特征越加明显, 进一步证实右旋硫辛酸诱导 HepG2 细胞凋亡。

倒置显微镜下直观的观察细胞形态和数量变化(图 3-C), 对照组细胞贴壁牢固, 呈长梭状或三角形, 经右旋硫辛酸给药处理后, 相比于对照组细胞, 给药组细胞数量明显减少, 一般呈圆形状, 细胞间间隔增大, 细胞体积变小, 48 h 尤为明显。

3.4 右旋硫辛酸激活自噬, 诱导凋亡

右旋硫辛酸对人肝癌 HepG2 细胞凋亡和自噬相关蛋白分析, 结果如图 4 所示。与对照组相比, 给药 12, 24, 48 h 后, 促凋亡蛋白 Bax 表达升高, 抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达基本无变化, 激活 caspase 3, 上调 cleaved-caspase 3 和 PARP 蛋白量。同时给药组自噬相关蛋白 ATG5, ATG7, LC3, Beclin1 蛋白量明显高于对照组。另外右旋硫辛酸抑制了磷酸化 mTOR 和磷酸化 p70S6K 的表达, 激活自噬。

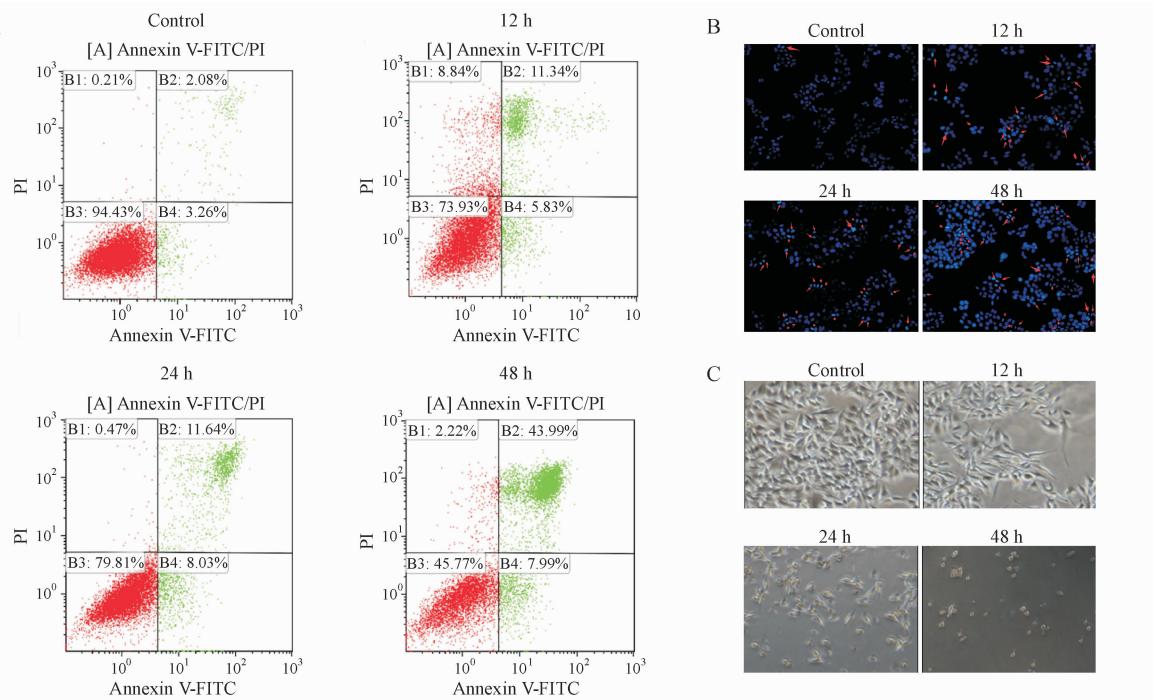


Figure 3 Effects of R-LA on apoptosis, morphology and number of HepG2 cells ($n=3$)

A: Cell apoptosis rate; B: Cell morphology changes ($\times 40$); C: Cells number ($\times 200$)

3.5 右旋硫辛酸对凋亡和自噬通路的调控

右旋硫辛酸作用人肝癌 HepG2 细胞 12, 24, 48 h 后, 使用 Western blot 检测凋亡信号转导通路中的相关蛋白表达量(图 5), 与对照组相比较, 给药组增加了磷酸化的 MEK、p-38, JNK 蛋白量, 下调了磷酸化蛋白 Akt、ERK 水平, 说明右旋硫辛酸可能通过增加促凋亡通路 MEK、JNK、p38, 抑制抑凋亡通路 Akt, ERK 等共同调控细胞凋亡和自噬。

3.6 右旋硫辛酸对自噬抑制剂的影响

使用右旋硫辛酸和自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤共同作用人肝癌 HepG2 细胞, 药物处理 12、24、48 h 后, Western blot 分析如下(图 6), 右旋硫辛酸单独作用上调自噬相关蛋白水平, 3-甲基腺嘌呤则抑制了 LC3, ATG5, ATG7 的表达, 右旋硫辛酸和 3-甲基腺嘌呤共同作用时下调了 LC3, ATG5, ATG7 蛋白量。

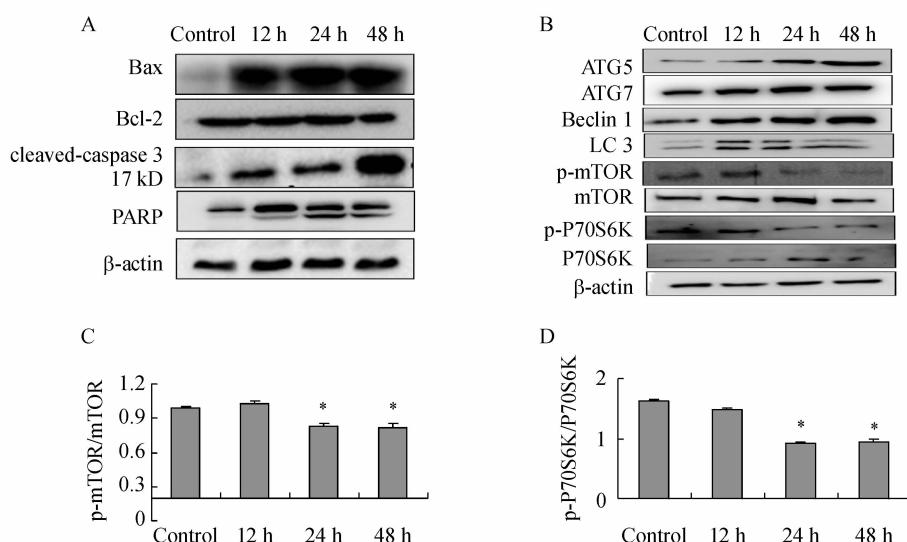


Figure 4 Effects of R-LA on cell apoptosis and autophagy relate proteins ($\bar{x} \pm s, n=3$)

A: Apoptosis protein expression level; B: Autophagy related protein expression level; C&D: Proteins grey value ratio

* $P < 0.05$ vs control group

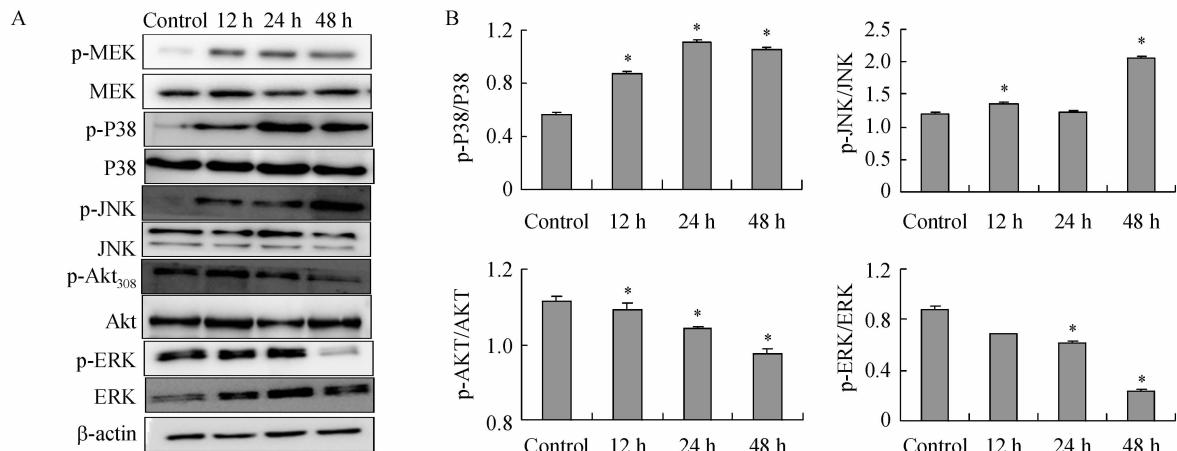


Figure 5 Signal pathway proteins were analyzed by Western blot ($\bar{x} \pm s, n=3$)

A: Signal pathway protein expression level; B: Proteins grey value ratio

* $P < 0.05$ vs control group

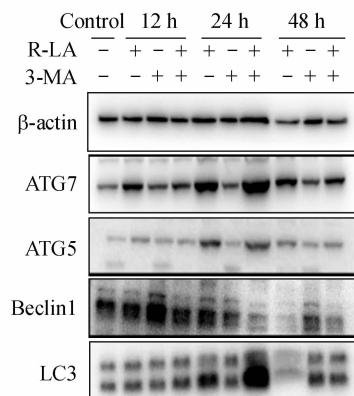


Figure 6 Expression of autophagy related proteins in HepG2 cells treated by 3-methyladenine (3-MA) and R-LA were analyzed by Western blot ($\bar{x} \pm s, n=3$)

4 讨 论

线粒体依赖途径是细胞凋亡最主要的传导途径,而 JNK、Akt 是主要的信号转导通路,从线粒体中释放细胞色素 C 是启动凋亡关键步骤^[6–7]。MAPK 最初是从脂肪细胞中纯化而来,在细胞周期、生长、分化、凋亡过程中扮演一个及其重要的角色^[8–9]。ERK, P38 和 JNK 均属于 MAPK 家族中的 3 个重要成员,通过磷酸化或 MAPK 磷酸酶激活^[10]。P38 是 MAPK 家族中相当重要的成员之一,可通过细胞外刺激,如氧化应激、促炎性细胞因子、紫外线、热休克等因素激活^[11]。本实验中,右旋硫辛酸处理人肝癌 HepG2 细胞 12, 24, 48 h 之后,导致细胞内 ROS 增加,激活磷酸化 p-P38 促进凋亡,P38 不仅增强 cleaved-caspase 3 效应分子,最终执行细胞凋亡^[19]。

凋亡,而且对 Bcl-2 家族诱导的凋亡也有影响。细胞内 ROS 升高阻碍了线粒体代谢,刺激 P38 磷酸化相关酶,使 P38 磷酸化达^[12–13]。通过刺激 DNA 损伤的上游中介可导致线粒体功能障碍通过刺激促凋亡蛋白 Bcl-2 家族成员表达^[14],从而把 Bax 从细胞质转移到线粒体中形成二聚体,直接影响膜通透性滤性 MPTP 的开放,使线粒体通透性改变达^[15–16]。线粒体功能障碍会导致细胞内凋亡因子的释放,激活 caspase 3,caspase 3 激活下游 PARP,使 DNA 片段化,最终导致凋亡。除了 P38 MAPK 外,MEK、ERK、JNK 也参与 ROS 的产生和细胞因子诱导的细胞损伤^[17–18]。总之,P38、JNK-MAPK 信号级联已经作为细胞凋亡的一个调控靶点,这些途径相互作用,激活 cleaved-caspase 3 效应分子,最终执行细胞凋亡^[19]。

自噬不仅是细胞的一种基本生理活动及在应激状态下的自我保护机制,同时也被认为是一种与凋亡并列的细胞程序性死亡机制^[20]。在肿瘤中自噬是一把双刃剑,一方面为维持平衡,自噬回收细胞组件,为肿瘤细胞高代谢需求提供能量;一方面自噬减少细胞不稳定和损伤来防止肿瘤发生^[21]。研究表明,多种信号转导通路参与调节自噬过程,这些信号转导通路中有多条途径在进化高度保守的哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 处汇集,mTOR 起着非常重要的负反馈调节作用^[22–23]。在酵母和哺乳动物中的研究都证明,ROS 在多种条件下都是自噬的重要调节因子^[24]。饥饿是诱导自噬活化的最为重要的生

理因素,饥饿同时可刺激线粒体产生 ROS,特别是 H₂O₂。H₂O₂ 直接氧化 ATG4 活性位点附近的第 81 位半胱氨酸残基,使之失活,从而阻止 ATG4 催化 LC3 脱脂化,有利于自噬小体形成。除了直接影响 ATG4 活性,ROS 还可增加 Beclin 1 的表达。Beclin1 是自噬的启动者,上调 Beclin1 可促进自噬活化。反之,自噬活化促进过氧化物酶通过选择性自噬进行降解,导致 ROS 堆积,使得 ROS 和自噬之间形成正反馈调节环。PI3K/Akt 通路在细胞凋亡,细胞周期过程,细胞存活和分化中扮演非常重要的角色,一旦 PI3K 激活,通过激活位点 Thr308,473 磷酸化其下游 Akt,被激活的 Akt 分子继续调节下游底物 mTOR,参与细胞调节过程。右旋硫辛酸抑制 mTOR 在位点 Ser2448 磷酸化,Akt 活性下降抑制了细胞周期调控因子 p27 磷酸化,阻碍磷酸化的 p27 与细胞周期蛋白作用,进而抑制周期蛋白活性,阻碍细胞增殖,使细胞周期停滞,从而诱导自噬,PI3K/Akt 和 Ras/Raf/MEK/ERK 在调节肿瘤细胞增殖方面有协同关系,Ras/Raf/MEK/ERK 可调节分裂周期。右旋硫辛酸可调控 PI3K/Akt 和 Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路,下调 mTOR,导致脱磷酸化,使 LC3 I 向 LC3 II 转换,在哺乳动物中常用 LC3 II 研究自噬的表达。另外磷酸化的 ERK,阻碍 TSC1/TSC2 复合体形成,激活 mTOR 的亚型 mTORC1,mTORC1 可磷酸化 ATG13 和自噬 bcln1 调节器 1 (AMBRA1),抑制自噬激活酶 ULK 复合体,另外 mTORC1 也可通过 ATG14 调节 VPS34,调节 LC3,诱导自噬^[25~28]。1.5 mmol/L 右旋硫辛酸导致人肝癌 HepG2 细胞内 ROS 大量堆积,上调自噬相关蛋白 Atg5、Atg7、LC3 II、Beclin 1 蛋白水平,通过 Akt,ERK,mTOR,P70S6K 蛋白调控,激活自噬。3-甲基腺嘌呤(3-MA)是 PI3K 的选择性抑制剂,使用 3-MA 后从上游阻碍自噬发生,减少 LC3 II 的表达,最终抑制自噬。

基于以上结果,右旋硫辛酸可能通过调控 MAPK/p38、JNK 通路、上调促凋亡蛋白,下调抑凋亡蛋白诱导 HepG2 细胞凋亡。通过调控 PI3K/Akt 和 Ras/Raf/MEK/ERK 通路激活自噬,从而为治疗肝癌开发新的治疗途径。但是细胞内自噬和凋亡之间的关系错综复杂,还需后期进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Flavia N, Mike FQ, Cristina S. Lipoic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species[J]. *Plant Physiol Bioch*, 2002, **40**(25): 463~470.
- [2] Zhang JY, Ji SZ. The research progress of lipoic acid[J]. *Mod Chem Ind* (现代化工), 2012, **32**(5): 32~33.
- [3] Al-Rasheed NM, Al-Rasheed NM, Attia HA, et al. Adverse cardiac responses to alpha-lipoic acid in a rat-diabetic model: possible mechanisms[J]. *Physiol Biochem*, 2013, **69**(4): 761~78.
- [4] Kim JI, Cho SR, Lee CM, et al. Induction of ER stress-mediated apoptosis by α-lipoic acid in A549 cell lines Korean[J]. *Thorac Cardiov Surg*, 2012, **45**(1): 1~10.
- [5] Simbula G, Columbano A, Ledda-Columbano GM, et al. Increased ROS generation and p53 activation in α-lipoic acid-induced apoptosis of hepatoma cells[J]. *Apoptosis*, 2007, **12**(1): 113~123.
- [6] Feng QF, Bi L, Yan XJ, et al. Inhibition of tetramethypyrazine on proliferation of HepG2 cells and its effects on the pathway of mitochondrial apoptosis[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2015, **46**(3): 350~354.
- [7] Krueger A, Baumann S, Peter H. Flice inhibitory proteins: regulators of death receptor mediated apoptosis[J]. *Mol Cell Biol*, 2001, **21**(21): 8247~8254.
- [8] Park JY, Song JY, Kim HM, et al. p53-Independent expression of wildtype p53-induced phosphatase 1 (Wip1) in methylmethane sulfonate-treated cancer cell lines and human tumors[J]. *Cell Biol*, 2012, **44**(5): 896~904.
- [9] Schwabe RF, Brenner, DA. Mechanisms of liver injury. I. TNF-alpha-induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways [J]. *AM J Physiol-Gastr L*, 2006, **290**(4): 583~589.
- [10] Boldt S, Weidleand UH, W Kolch et al. The role of MAPK pathways in the action of chemotherapeutic drugs[J]. *Carcinogenesis*, 2002, **23**(11): 1831~1838.
- [11] Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway[J]. *Cell Res*, 2005, **15**: 11~18.
- [12] Park GB, Choi Y, Kim YS, et al. ROS-mediated JNK/p38-MAPK activation regulates Bax translocation in sorafenib-induced apoptosis of EBV-transformed B cells[J]. *Int J Oncol*, 2014, **44**(3): 977~985.
- [13] Park GB, Kim YS, Lee HK, et al. Reactive oxygen species and p38 MAPK regulate Bax translocation and calcium redistribution in salubrin-induced apoptosis of EBV-transformed B cells[J]. *Cancer Lett*, 2011, **313**(2): 235~248.
- [14] Yan TT, Zhao Y, Zhang X, et al. Astaxanthin inhibits acetaldehyde-induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells by modulating Akt/CREB and p38MAPK/ERK signaling pathways[J]. *Mar Drugs*, 2016, **14**(3): 56.
- [15] Dong YJ, Gao WJ. Bcl-2, Bax, caspase 3 in the role of apoptosis

- and their relationships [J]. *Chin J Gerontol* (中国老年医学杂志), 2012, 32(21): 4828–4830.
- [16] kafara P, lecard P, Guillamin M. Lipoic acid decreases Mcl-1, Bcl-xL and up regulates Bim on ovarian carcinoma cells leading to cell death [J]. *J Ovarian Res*, 2015, 8(10): 36.
- [17] Koike N, Takeyoshi I, Ohki S, et al. Effects of adding P38 mitogen-activated protein-kinase inhibitor to celsior solution in canine heart transplantation from non-heart-beating donors [J]. *Transplantation*, 2004, 77(2): 286–292.
- [18] Hashimoto N, Takeyoshi I, Tsutsumi H, et al. Effects of a bradykinin B(2) receptor antagonist on ischemia-reperfusion injury in a canine lung transplantation model [J]. *J Heart Lung Transplant*, 2004, 23(5): 606–613.
- [19] Camera E, Mastrofrancesco A, Fabbri C, et al. Astaxanthin, canthaxanthin and beta-carotene differently affect UVA-induced oxidative damage and expression of oxidative stress-responsive enzymes [J]. *Exp Dermatol*, 2009, 18(3): 222–231.
- [20] Lum JJ, Bauer DE, Kong M, et al. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis [J]. *Cell*, 2005, 120(2): 237–248.
- [21] Zhao F, Huang WW, Zhang Z, et al. Triptolide induces protective autophagy through activation of the CaMKK β -AMPK signaling pathway in prostate cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(5): 5366–5382.
- [22] laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease [J]. *Cell*, 2012, 149(2): 274–293.
- [23] Jung CH, Ro SH, Cao J, et al. mTOR regulation of autophagy [J]. *FEBS*, 2010, 584(7): 1287–1295.
- [24] Scherz-Shouval R, Elazar Z. Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology [J]. *Trends Biochem Sci*, 2011, 36(1): 8–30.
- [25] He CC, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy [J]. *Annu Rev Genet*, 2009, 43(9): 67–93.
- [26] Inoki K, Li Y, Zhu T, et al. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signaling [J]. *Nat Cell Biol*, 2002, 4(9): 648–657.
- [27] Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, et al. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk: implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis [J]. *Cell*, 2005, 121(2): 179–193.
- [28] Peterson TR, Laplante M, Thoreen CC, et al. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival [J]. *Cell*, 2009, 137(5): 673–886.

· 校园信息 ·

“国家禁毒委员会办公室-中国药科大学” 禁毒关键技术联合实验室成立

近日，“国家禁毒委员会办公室-中国药科大学”禁毒关键技术联合实验室在中国药科大学揭牌成立。这是国家禁毒办与国内高校联手成立的首个禁毒关键技术联合实验室。

国家禁毒办副主任、公安部禁毒情报技术中心主任韩旭光，国家禁毒办副主任、公安部禁毒情报技术中心总工程师王优美，我校党委书记徐慧，校长来茂德，中国工程院院士王广基，副校长陆涛，副校长孔令义等出席签约仪式。公安部禁毒情报技术中心毒品分析处相关负责人，我校党委办公室、校长办公室、各院部系、机关负责人和教授代表等参加了会议。

合作期间，中国药科大学将为国家禁毒委员会办公室提供毒情评估、来源回溯、时间认定、快速检测、成瘾诊断和康复治疗等关键技术方面的评价依据。联合实验室的建立将有利于开展我国成瘾药物的深入研究，有利于拓展毒情监测体系，有利于加强禁毒科技人才的培养，对于提升禁毒工作科技化水平，实现我国禁毒工作的科学发展，产生重大而深远的影响。

(本刊编辑部)