

PEP-1 超氧化物歧化酶对大鼠脑缺血再灌注后 Bcl-2 的影响

汪 健^{1,2} 周发明¹ 陈 涛¹ 席刚明¹ 邓晓玲¹ 赵 斌¹

(1 湖北医药学院附属人民医院神经内科 湖北 十堰 442000 2 武汉大学基础医学院 湖北 武汉 430070)

摘要 目的 观察细胞穿透肽-铜、锌超氧化物歧化酶(PEP-1-SOD1)预处理对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的改善作用及其脑保护机制。方法 线栓法建立大鼠局灶性脑缺血 6h 后再灌注损伤模型,进行神经行为评分,并通过 HE 染色在光镜下观察神经细胞损伤变化,免疫组化法检测 B 细胞淋巴瘤基因-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)蛋白的阳性表达。结果 盐水对照组(缺血再灌注组或模型组)神经障碍显著高于假手术组($P<0.05$),与模型组相比,PEP-1-SOD1 预处理组可降低神经障碍评分($P<0.05$);光镜下,假手术组神经细胞结构正常,PEP-1-SOD1 预处理组和缺血再灌注组均有不同程度的缺血再灌注损伤,PEP-1-SOD1 预处理组较缺血再灌注组损伤轻;假手术组 Bcl-2 蛋白表达极弱,缺血再灌注组和 PEP-1-SOD1 预处理组在脑缺血再灌注后 6h 在缺血半暗带周围出现 Bcl-2 蛋白阳性表达,24h 达到高峰,48h 表达开始减少。与假手术组相比,PEP-1-SOD1 预处理组和缺血再灌注组 Bcl-2 蛋白阳性细胞数显著增多($P<0.05$);与缺血再灌注组相比,PEP-1-SOD1 预处理组 Bcl-2 蛋白阳性细胞数显著增多($P<0.05$)。结论 PEP-1-SOD1 对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤有保护作用,PEP-1-SOD1 可通过上调 Bcl-2 蛋白的表达发挥脑保护作用。

关键词 脑缺血再灌注; 穿透肽-铜、锌超氧化物歧化酶; B 细胞淋巴瘤基因-2

中图分类号 Q95-3 R743 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2011)13-2423-04

Effects of PEP-1 Superoxide Dismutase on B-cell lymphoma-2 in Rats after Cerebral Ischemia and Reperfusion

WANG Jian^{1,2}, ZHOU Fa-ming¹, CHEN Tao¹, XI Gang-ming¹, DENG Xiao-ling¹, ZHAO Bin¹

(1 Affiliated People's Hospital of Hubei Medical College, Department of Neurology, Shiyan 442000, China;

2 Basic Medical College of Wuhan University, Wuhan 430070, China)

ABSTRACT Objective: To observe the cell penetrating peptide-copper, zinc superoxide dismutase (PEP-1-SOD1) preconditioning on focal cerebral ischemia-reperfusion injury in the brain and its protective mechanism to improve. **Methods:** Suture technique in rats 6h after focal cerebral ischemia-reperfusion injury model, the neural behavior scores, and by HE histological changes of nerve cell damage, immune staining B-cell lymphoma gene-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) protein expression. **Results:** Saline control group (ischemia-reperfusion group or model group) neurological disorders were significantly higher than sham operation group ($P<0.05$), compared with model group, PEP-1-SOD1 pretreatment could reduce the neurological deficits score ($P<0.05$); light microscope, the sham operation group of neurons was normal, PEP-1-SOD1 pretreatment group and the ischemia reperfusion group had different levels of ischemia-reperfusion injury, PEP-1-SOD1 pretreatment group than in the ischemia-reperfusion group of light damage; sham group the expression of Bcl-2 protein in very weak, ischemia-reperfusion group and PEP-1-SOD1 pretreatment group 6h after cerebral ischemia-reperfusion in the ischemic penumbra appears around the Bcl-2 protein expression, 24 h reached a peak, 48h expression started to decrease; compared with the sham group, PEP-1-SOD1 pretreatment group and the ischemia-reperfusion group Bcl-2 protein positive cells was significantly increased ($P<0.05$); compared with the ischemia-reperfusion group, PEP-1-SOD1 pretreatment group Bcl-2 protein positive cells was significantly increased ($P<0.05$). **Conclusions:** PEP-1-SOD1 on focal cerebral ischemia-reperfusion injury had a protective effect, PEP-1-SOD1 could increase the expression of Bcl-2 proteins play a role in cerebral protection.

Key words: Cerebral ischemia-reperfusion; The cell penetrating peptide-copper; Zinc superoxide dismutase; B-cell lymphoma-2

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3 R743 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)13-2423-04

前言

脑缺血再灌注后损伤的发病机制较复杂,其所致病理损伤包括细胞坏死和凋亡。细胞凋亡与脑缺血再灌注损伤关系密切

切,是神经元迟发性死亡的主要形式^[1]。研究提示与凋亡密切相关的 Bcl-2 蛋白等参与了这种迟发性死亡,它们表达的量决定了细胞的生存,Bcl-2 表达增高,细胞凋亡减少。而超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是清除细胞内自由基,保护细胞免受氧化应激损伤的关键酶之一^[2]。SOD1 是细胞中高水平表达的 SOD,是 SOD 的主要形式。PEP-1 是人工合成的细胞穿透肽,能以非能量、非受体依赖性的方式把蛋白质、肽段、寡核苷酸等跨膜转入各种细胞的细胞浆和细胞核内^[3],并具有高效、安全、无毒、对血清不敏感等优点。SOD1 是通过基因工程制备的一种铜-锌超氧化物歧化酶,其主要作用是催化超氧阴

作者简介 汪健(1965-)男,主任医师,副教授。武汉大学基础医学院生物医学工程硕士研究生。研究方向 脑血管疾病,中枢神经系统变性疾病。Email:wang.jian.3535@163.com , 电话 :13972453535 (收稿日期 2010-12-20 接受日期 2011-01-15)

离子 O² 发生歧化反应,使细胞免受 O² 所引起的氧化应激损伤。由于外源性 SOD1 是生物大分子物质,在生物体内无特异性受体和通道,也不能依靠内吞作用等入胞方式进入细胞内,其生物学作用的发挥受到很大的限制。研究人员利用基因工程技术得到 PEP-1-SOD1 融合蛋白^[4],可以转导进入缺血/再灌注损伤后的大鼠中枢神经系统。通过研究 Bcl-2 蛋白表达的变化,探讨其对神经元的保护作用及作用机制,为临床治疗提供一条思路。

1 材料和方法

1.1 研究对象

随机选择成年 SPF 级健康雄性 Wistar 大鼠 42 只,体重 250-300g,由湖北医药学院实验动物中心提供。随机分为假手术组 6 只,盐水对照缺血再灌注组(再分为再灌注后 6h、24h、48h 各 6 只),PEP-1-SOD1 用药组(分组同盐水组)。

1.2 材料与试剂

PEP-1-SOD1 由湖北医药学院附属人民医院临床医学研究所制备,兔抗鼠多克隆抗体 Bcl-2 购自 Beyotime Biotechnology 公司,山羊抗鼠 IgG 购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 模型制作 依 Koizumi 线栓法^[5]成功制作大鼠左侧大脑中动脉阻塞再灌注(MCAO)模型后,选用直径 0.2mm 尼龙渔线,将头端蘸天然硅胶,直径约 0.25mm,蘸硅胶长度约 5mm,在手术显微镜下阻塞左侧大脑中动脉。大鼠称重后用 10%水合氯醛 0.3ml / 100g 腹腔注射麻醉,仰卧位固定消毒,颈前部正中切口,钝性分离并暴露左侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉,同时保护伴行迷走神经。用电刀分别烧断甲状腺上动脉、枕动脉,4-0 丝线结扎颈外动脉远端,用蛙心夹夹闭颈总动脉和颈内动脉,在颈外动脉靠近颈总动脉分叉处剪一小口,将头端蘸天然硅胶渔线(用火将头端烧钝圆)从小口处轻轻插入颈外动脉,经分叉处将预先放置于颈外动脉根部的 6-0 丝线缚紧,移去蛙心夹,并将尼龙线向颈内动脉轻轻推入至颈内动脉颅内段,当尼龙线插入深度距颈总动脉分叉 18-20mm 处轻微遇阻力时即停止,表示尼龙线已插至 Willis 环。MCAO 2h 后,拔出尼龙线,恢复再灌注。以动物清醒后右前肢不能完全伸展、爬行时向右侧

转圈为模型成功标准。假手术组除尼龙线插入深度 5mm 外,其余过程相同。实验中保持大鼠体温(37±0.5)℃至苏醒。按 Longa 神经功能评分法以麻醉清醒后评分 2 分或以上的大鼠认为模型制作成功,纳入实验分组,将出血较多、呼吸困难、取脑时发现蛛网膜下腔出血及提前死亡的大鼠剔除。

1.3.2 给药方法及脑片制备 PEP-1-SOD1 用药组在缺血前 30min 及再灌注后立即腹腔注射 PEP-1-SOD1 融合蛋白 500μg/100g^[6],对照组以相同剂量的生理盐水注射。42 只动物模型经常规麻醉,心脏灌注,断头取脑,多聚甲醛固定,自视交叉后向后取 5mm 脑组织,常规梯度酒精脱水,二甲苯透明、浸蜡、包埋固定制蜡块,连续冠状切片,厚度为 5μm。然后根据 SP 法进行免疫组化染色(Bcl-2 阳性细胞的胞浆染成棕黄色)。应用 HPIAS-2000 显微图像处理系统采集图片,每张切片随机取 5 个高倍镜视野(400×),计数 Bcl-2 阳性细胞数,取其平均值。

1.4 统计学分析

计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS15.0 软件进行统计处理,数据采用 t 检验, P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 神经功能缺损评分

显示盐水组神经障碍显著高于假手术组(P<0.01);与盐水对照组相比,PEP-1-SOD1 用药组可降低神经障碍评分(P<0.05),见表 1。

2.2 Bcl-2 免疫组化结果

Bcl-2 阳性神经元细胞的胞浆中有棕黄色颗粒。假手术组大鼠脑组织皮层内胞浆中可见散在神经元阳性细胞。缺血再灌注组和 PEP-1-SOD1 预处理组阳性细胞数从 6h 开始增多,24h 达到高峰,48h 开始减少。PEP-1-SOD1 预处理组阳性细胞数较缺血再灌注组阳性细胞数增多。由表 2 可见,各组大鼠脑组织 Bcl-2 阳性细胞数不同,从假手术组到缺血再灌注组再到 PEP-1-SOD1 预处理组逐渐增多,三组之间比较差异均有统计学意义(P<0.05),缺血再灌注组和 PEP-1-SOD1 预处理组在不同时间点两两之间差异有统计学意义(P<0.05)。

表 1 神经行为评分
Table 1 Neurobehavioral scores

组别 Group	6h	24h	48h
假手术组 Sham-operation group	0	0	0
盐水组 Brine group	1.86± 0.22	2.87± 0.30	2.77± 0.34
用药组 Drug group	1.25± 0.18	1.64± 0.23	1.51± 0.20

注:用药组与盐水对照组比较 P<0.05 (Note: Compared drug group and brine group, P<0.05)

表 2 各组大鼠脑组织内 Bcl-2 的表达($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Expression of Bcl-2 in the brain of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	Bcl-2 阳性细胞数(个)	Bcl-2 positiveness cell count	
	6h	12h	24h
假手术组 Sham-operation group	3.5± 1.4	3.8± 1.3	3.6± 1.3
盐水对照组 Brine control group	18.4± 1.9	23.9± 1.7	20.5± 1.6
用药组 Drug group	31.8± 2.2	37.7± 1.6	32.8± 1.7

注:三组之间比较 P<0.05,盐水对照组和 PEP-1-SOD1 预处理组在不同时间点两两之间比较 P<0.05 (Note: Compared among the three groups, P<0.05; compared brine control group and PEP-1-SOD1 group at different time, P<0.05)

3 讨论

研究显示,氧自由基是启动凋亡的重要因子,过量的氧自由基可以攻击膜中的不饱和脂肪酸,导致细胞膜和各种细胞器膜发生脂质过氧化反应,细胞出现结构破坏、功能障碍。因此,清除自由基是缺血性脑血管病有效治疗靶点之一^[7]。铜、锌超氧化物歧化酶(SOD1)是体内重要的氧自由基清除剂,是高水平表达的SOD形式,是清除细胞内超氧阴离子的关键酶,可以将超氧阴离子歧化生成 H_2O_2 ,后者在 H_2O_2 酶的作用下分解为 H_2O 和 O_2 而彻底解毒,通过广泛参与中枢神经系统炎症、缺血等一系列病理过程,对神经元产生保护作用^[8]。脑组织血液循环中断后,随着脑细胞的坏死和凋亡,产生各种自由基,随着脑缺血再灌注的恢复,可激活需氧的黄嘌呤氧化酶和环加氧酶,在微血管内皮细胞内引发了两个主要的自由基生成途径,致使自由基大量生成^[9]。内源性SOD1无法清除短时间内大量产生的氧自由基,而外源性SOD1分子量过大,不能自由通过血脑屏障,应用受到限制。近年来研究发现,某些蛋白质的某些区域具有将外源性蛋白导入细胞内的特性,这些区域称为蛋白转导域(Protein Transduction Domain, PTD),如HIV-1 Tat、果蝇触角足蛋白(Antp)、HSV VP22蛋白^[10-12]。目前的研究认为这种蛋白转导域介导的生物大分子跨膜转运的机制并非通过受体、通道或内吞方式进入细胞内^[13-15]。已有研究显示Tat-GFP、Tat-GDH、Tat-SOD、Tat-CAT融合蛋白高效地导入哺乳动物细胞内和皮肤组织^[16-23]。但是,Tat-PTD介导的蛋白转导需要融合蛋白在导入前进行变性,才能使融合蛋白进入细胞内。变性的Tat融合蛋白进入细胞内后,在HSP90家族成员将靶蛋白重折叠为天然有活性的构象。因此导入蛋白的生物活性依赖于HSP90分子伴侣的重折叠效率^[24]。这对一些生物大分子转导后的生物效应产生了影响。Morris MC研究小组^[25]设计了一种称为PEP-1的转导肽(KETWWETWWTEWSQPKKKRKV),由21个氨基酸残基组成,分为三部分:富含色氨酸的疏水区(KETWWETWWTEW)、连接区(SQP)和富含赖氨酸的亲水区(KKKRKV)。Won Sik Eum等^[26]将SOD基因与Pep-1在细菌表达载体中融合产生遗传性框内读码的Pep-1-SOD融合蛋白,在体外培养的星形细胞中观察到融合蛋白以时间和剂量依赖方式进入细胞,保持酶活性达48h,且转导不要求细胞固定、融合蛋白无需变性。同时他们还观察了Pep-1-SOD对氧应激下细胞生存能力的影响,结果表明用Pep-1-SOD处理暴露于百草枯的星形细胞时,细胞生存能力显著增加。此外,他们通过动物试验也验证了Pep-1-SOD有穿透小鼠皮肤的能力,并且在短暂性前脑缺血的沙鼠动物模型中观察到融合蛋白能穿透血脑屏障,使受损的神经元细胞存活能力显著增加,表明Pep-1-SOD对神经系统缺血性损伤有保护作用。Pep-1-SOD的成功转导为保护缺血损伤所致的神经元细胞损害提供了一个新的途径,这对运用抗氧化酶治疗氧化损伤性疾病具有重要意义。

Bcl-2家族是目前研究较为深入的与凋亡密切相关的基因,在细胞凋亡的调节过程中具有重要作用,它以细胞器膜(如线粒体、内质网和核膜)的整合膜蛋白形式存在,既能阻抑坏死又能阻抑凋亡,而这两种死亡又是脑缺血损伤的主要形式。研究认为Bcl-2抗细胞凋亡的作用机制可能有以下几种^[27]:(1)通过抑制氧化脂质和超氧根离子抗细胞凋亡;(2)通过调节内质网

Ca^{2+} 的释放抗细胞凋亡;(3)通过直接或间接影响传递细胞死亡信号的蛋白质功能或特性发挥抗凋亡作用。而且有研究表明,在脑缺血的模型中,缺血灶及周边区神经细胞的Bcl-2表达较早,并可减少大约50%的梗死面积。

在本研究中,盐水对照组和PEP-1-SOD1用药组的Bcl-2蛋白表达主要位于缺血侧大脑半球颞、顶叶皮质以及基底节、海马等部位,与脑梗死部位一致。从6h开始到48h,用药组Bcl-2的表达在24h时最高,与对照组比较有显著性差异($P < 0.05$),48h时仍高于对照组($P < 0.05$)。从大鼠的神经功能计分结果可以看出,从6h开始到48h时PEP-1-SOD1用药组神经功能计分低于对照组($P < 0.05$),说明行为学从6h开始改善直到48h,与Bcl-2的表达一致。由以上结果推测,PEP-1能有效介导SOD1转导进入大鼠脑组织,转导后的融合蛋白活性至少可以维持48h,PEP-1-SOD1在脑缺血再灌注后,能促进凋亡抑制基因Bcl-2在急性期的表达,从而抑制细胞凋亡,减轻脑损伤,达到脑保护作用。本研究仅从行为学和Bcl-2变化角度探讨了PEP-1-SOD1对脑缺血后再灌注损伤的保护作用和机制,实际上凋亡是脑细胞缺血缺氧再灌注处理后损伤的基本事件之一,有诸多因素影响和制约,其机制错综复杂,仍需更广泛更深入的研究。

参考文献(References)

- [1] Sen S. Programmed cell death: concept, mechanism and control. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. 1992;67:287-319
- [2] 金惠铭.病理生理学.北京:人民卫生出版社,2000,150-162
JIN Hui-ming. Pathological physiology. Beijing: people's medical publishing house, 2000, 150-162
- [3] Lindgren M, Hallbink M, Prochiantz A, et al. Cell-penetrating peptides. Trends pharmacol Sci, 2000, 21(3):99-103
- [4] 丁鹏,王家宁,杨波,等. PEP-1-SOD1融合蛋白的表达及纯化[J]. 中国生物制品学杂志, 2006, 19(3):240-243
DING Peng, WANG Jia-ning, YANG Bo, et al. Expression and Purification of PEP-1-SOD1 Fusion Protein [J]. Chinese Journal of Biologicals, 2006, 19(3):240-243
- [5] Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, et al. Experimental studies of ischemic brain edema: A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area[J]. Jpn J Stroke, 1986, 8:1-8
- [6] Eum WS, Kim DW, Hwang IK, et al. In vivo protein transduction: biologically active intact pep-1-superoxide dismutase fusion protein efficiently protects against ischemic insult[J]. Free Radic Biol Med, 2004, 37, 1656-1669
- [7] 洪浩, 刘国卿. 缺血性脑血管疾病治疗的抗氧化应激策略[J]. 中国药理学通报, 2004, 20(1):19-24
HONG Hao, LIU Guo-qing. Strategies against oxidative stress for therapy of ischemic cerebrovascular diseases. Chinese Pharmacological Bulletin, 2004, 20(1):19-24
- [8] 王志平, 孙红斌. 氧自由基与缺血性卒中[J]. 西南军医, 2010, 12(3):534-536
WANG Zhi-ping, SUN Hong-bin. Oxygen free radicals and ischemic stroke. Journal of Military Surgeon in Southwest China, 2010, 12(3):534-536
- [9] Hwang IK, Eum WS, Yoo KY, et al. Copper chaperone for Cu,Zn-SOD supplement potentiates the Cu,Zn-SOD function of neuroprotective

- effects against ischemic neuronal damage in the gerbil hippocampus [J]. *Free Biol Med*, 2005, 39(3):392
- [10] Fawells S, Seery J, Daikh Y. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 91:664-668
- [11] Vives E, Brodin P, Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(25):16010-16017
- [12] Prochiantz A. Messenger proteins: homeoproteins, TAT and others [J]. *Current Opin Cell Biol*, 2000, 12:400-406
- [13] Derossi D, Calvet S, Trembleau A, et al. Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(30):18188-18193
- [14] Derossi D, Joliet AH, Chassaing G, et al. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(14):10444-10450
- [15] Park J, Ryu J, Kim KA, et al. Mutational analysis of a human immunodeficiency virus type 1 Tat protein transduction domain which is required for delivery of an exogenous protein into mammalian cells [J]. *J Gen Virol*, 2002, 83(Pt 5):1173-1181
- [16] Park J, Kim KA, Ryu J, et al. Generation and characterization of cell-permeable green fluorescent protein mediated by the basic domain of human immunodeficiency virus type 1 Tat [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2000, 10:797-804
- [17] Ryu J, Han K, Park J, et al. Enhanced uptake of a heterologous protein with an HIV-1 Tat protein transduction domains (PTD) at both termini [J]. *Mol Cells*, 2003, 16(3):385-391
- [18] Han K, Jeon MJ, Kim SH, et al. Efficient intracellular delivery of an exogenous protein GFP with genetically fused basic oligopeptides [J]. *Mol Cells*, 2001, 12(2):267-271
- [19] Han K, Jeon MJ, Kim KA, et al. Efficient intracellular delivery of GFP by homeodomains of *Drosophila* Fushi-terazu and Engrailed proteins [J]. *Mol Cells*, 2000, 10(6):728-732
- [20] Yoon HY, Lee SH, Cho SW, et al. TAT-mediated delivery of human glutamate dehydrogenase into PC12 cells [J]. *Neurochem Int*, 2002, 41(1):37-42
- [21] Kwon HY, Eum WS, Jang HW, et al. Transduction of Cu,Zn-superoxide dismutase mediated by an HIV-1 Tat protein basic domain into mammalian cells [J]. *FEBS Lett*, 2000, 485(2-3):163-167
- [22] Jin LH, Bahn JH, Eum WS, et al. Transduction of human catalase mediated by an HIV-1 TAT protein basic domain and arginine-rich peptides into mammalian cells [J]. *Free Radic Biol Med*, 2001, 31(11):1509-1519
- [23] Eum WS, Choung IS, Li MZ, et al. HIV-1 Tat-mediated protein transduction of Cu,Zn-superoxide dismutase into pancreatic beta cells in vitro and in vivo [J]. *Free Radic Biol Med*, 2004, 339-349
- [24] Schwarze SR, Hruska KA, Dowdy SF. Protein transduction: unrestricted delivery into all cells? [J]. *Trends Cell Biol*, 2000, 10(7):290-295
- [25] Morris MC, Depollier J, Mery J, et al. A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(12):1173-1176
- [26] Won Sik Eum, Dae Won Kim, In Koo Hwang, et al. (2004) In Vivo Protein Transduction: Biologically Active Intact Pep-1-Superoxide Dismutase Fusion Protein Efficiently Protects Against Ischemic Insult [J]. *Free Radic Biol*, 2004, 137(10):1656-1669
- [27] Kluck RM, Bossy-Wetzler E, Green DR, et al. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for bcl-2 regulation of apoptosis [J]. *Science*, 1997, 275:1132-1136

(上接第 2404 页)

- [14] Kalra N, Roy P, Prasad S, et al. Resveratrol induces apoptosis involving mitochondrial pathways in mouse skin tumorigenesis [J]. *Life Sci*, 2008, 82(7-8):348-358
- [15] Zhou HB, Chen JJ, Wang WX, et al. Anticancer activity of resveratrol on implanted human primary gastric carcinoma cells in nude mice [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(2):280-284
- [16] Bishayee A, Dhir N. Resveratrol-mediated chemoprevention of diethylnitrosamine-initiated hepatocarcinogenesis: inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis [J]. *Chem Biol Interact*, 2009, 179(2-3):131-144
- [17] Alkhalaf M, Jaffal S. Potent antiproliferative effects of resveratrol on human osteosarcoma SJSA1 cells: novel cellular mechanisms involving the ERKs/p53 cascade [J]. *Free Radic Biol Med*, 2006, 41(2):318-325
- [18] Alkhalaf M. Resveratrol-induced growth inhibition in MDA-MB-231 breast cancer cells is associated with mitogen-activated protein kinase signaling and protein translation [J]. *Eur J Cancer Prev*, 2007, 16(4):334-341
- [19] Shih A, Davis F, Lin H-Y, et al. Resveratrol induces apoptosis in thyroid cancer cell lines via a MAPK- and p53-dependent mechanism [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(3):1223-1232
- [20] Niles RM, McFarland M, Weimer MB, et al. Resveratrol is a potent inducer of apoptosis in human melanoma cells [J]. *Cancer Lett*, 2003, 190(2):157-163
- [21] Stewart J, O'Brian C. Resveratrol antagonizes EGFR-dependent Erk1/2 activation in human androgen-independent prostate cancer cells with associated isozyme-selective PKC α inhibition [J]. *Invest New Drugs*, 2004, 22(2):107-117