

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.07.001

· 基础研究 ·

敲低 HSP60 对结肠癌 SW480 细胞增殖能力的影响及其机制探究*

余群¹ 徐仁华² 王鹤霖¹ 郭建影¹ 邓海腾^{1△}

(1 清华大学生命科学学院 北京 100084; 2 滨州医学院护士学院 山东 烟台 264003)

摘要 目的:研究热休克蛋白 60 (HSP60) 敲低对结肠癌 SW480 细胞增殖的影响,并进一步探究其作用机制。**方法:**通过含 HSP60 shRNA 载体的慢病毒感染加上流式细胞仪无菌分选的方法构建结肠 SW480 HSP60 基因稳定 RNA 干扰(RNAi)单克隆细胞系,利用 Western blot 和 q-PCR 验证结肠癌细胞中 HSP60 的敲低效率;使用 CCK-8 试剂检测结肠癌细胞增殖能力,并用流式细胞仪检测其 HSP60 敲低对细胞周期的影响。**结果:**Western blot 和 q-PCR 结果验证了 HSP60 在结肠癌细胞中的敲低效率,与对照组细胞相比,实验组细胞 HSP60 的 mRNA 水平和蛋白水平均降低了 60%以上。CCK-8 实验结果表明,敲低 HSP60 后 SW480 细胞的增殖能力下降了约 70%;流式细胞周期实验显示敲低 HSP60 后 SW480 细胞中 G0/G1 期、S 期、G2/M 期的分布比例变化不大。**结论:**敲低 HSP60 能够显著抑制 SW480 细胞的增殖能力,而 SW480 细胞周期并没有发生明显变化,推测 HSP60 的敲低引起的线粒体损伤导致细胞生长速度变慢。

关键词:热休克蛋白 60;结肠癌细胞;细胞增殖;细胞周期

中图分类号:R-33;R735.3+5 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)07-1201-05

The Effects of HSP60 Knockdown on the Proliferation of Colon Cancer SW480 and its Mechanism*

YU Qun¹, XU Ren-hua², WANG He-lin¹, GUO Jian-ying¹, DENG Hai-teng^{1△}

(1 School of Life Sciences, Tsinghua University, 100084, Beijing, China;

2 School of Nursing, Binzhou Medical University, Yantai, Shandong, 264003, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of HSP60 knockdown on the proliferation of colon cancer SW480 cells. **Methods:** Lentivirus containing the HSP60-directed shRNAs was used to construct a stable monoclonal HSP60 knockdown cell line in SW480. The HSP60 knockdown efficiency was determined by western blotting and the CCK-8 assay was used to analyze cell proliferation rates, while flow cytometry was used to determine the cell cycle in HSP60-knocked down cells. **Results:** We established a stable cell line in which HSP60 expression was silenced in SW480 cells as confirmed by western blotting and q-PCR. CCK-8 assay showed that HSP60 knockdown significantly inhibited the cell proliferation, whereas it had little effect on the cell cycle progression. **Conclusion:** HSP60 knockdown inhibits the cell proliferation in SW480 cells. so we speculate that the reduce of SW480 growing is due to mitochondrial damage.

Key words: HSP60; Colon cancer; Cell proliferation; Cell cycle

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.3+5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)07-1201-05

前言

热休克蛋白 60(60kDa heat shock protein, HSP60)是热休克蛋白家族的一员,最早于 1973 年被人们发现,热休克蛋白根据分子量被分为小分子热休克蛋白、HSP40、HSP60、HSP70、HSP90 和 HSP110 六大类^[1]。热激、缺氧、局部缺血、辐射等胁迫因素均能够诱导热休克蛋白的表达^[2,3]。HSP60 主要存在于线粒体中,早期人们认识到的主要功能是帮助蛋白质正确折叠的分子伴侣^[4],该蛋白在原核生物和真核生物中有高度同源性,细菌

中的同源蛋白 GroEL 由 14 个亚基组成,而每个亚基分子又由 3 个结构域组成,包括一个赤道结构域、顶端结构域和一个中间结构域,哺乳动物中 HSP60 的结构与之类似^[5,6]。近年来,人们发现 HSP60 与多种肿瘤密切相关,通过检测组织和体液中的 HSP60 表达水平可以帮助人们诊断癌症以及评估预后^[7,8]。HSP60 的表达量在不同癌症中有所不同,例如,HSP60 的表达水平在胶质母细胞瘤、星形胶质细胞瘤、前列腺癌、大肠癌等癌症中升高,而在支气管腺癌、膀胱癌等癌症中却是降低的^[9-12]。最新的研究显示,在胶质母细胞瘤中 HSP60 是高表达的,敲低

* 基金项目:国家自然科学基金项目(NSFC 31270871);中华人民共和国科技部(2014CBA02005&2014AA020907)

作者简介:余群(1991-),硕士研究生,主要研究方向:HSP60 在结肠癌中的作用研究

△ 通讯作者:邓海腾,电话:010-62789415, E-mail: dht@mail.tsinghua.edu.cn

(收稿日期:2016-10-11 接受日期:2016-10-30)

HSP60 导致了细胞生长速度下降;而在肾透明细胞癌中 HSP60 则是低表达的,过表达 HSP60 之后细胞生长速度明显变慢^[13,14]。结肠癌是一种极为常见的恶性肿瘤,人们一直积极寻找其治疗方法和用于早期诊断的生物标志物^[15,16]。目前已知 HSP60 在结肠癌中是高表达的,本课题通过慢病毒转染加上流式无菌分选的方法构建结肠癌 SW480 HSP60 基因稳定 RNA 干扰(RNAi)单克隆细胞系,并利用检测细胞生长速度、细胞周期的方法初步探索 HSP60 在 SW480 细胞中的作用,为后续的机制研究建立基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料和试剂

SW480 和 293T 细胞系,含 HSP60 shRNA 的慢病毒载体 pLentilox3.7,辅助质粒 VSVG、RSV-REV 和 pRRE,大肠杆菌 DH5 α 均由本实验室保存。胎牛血清、DMEM 培养基购自 Wisent 公司;胰蛋白酶购自 Gibco 公司;鼠抗 HSP60 单克隆抗体,鼠抗 β -actin 单克隆抗体均购自 CST 公司。本实验所用引物均由上海生工合成。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 细胞培养 在培养皿中加入含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,接种适量 SW480 细胞后置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 培养箱中培养。当细胞贴壁生长至 80%或以上时,使用胰蛋白酶消化传代培养。

1.2.2 慢病毒包装及感染 将适量的含 HSP60 shRNA 的慢病毒载体 pLentilox3.7,辅助质粒 VSVG、RSV-REV 和 pRRE 与转染试剂 PEI(1 mg/mL)混合成转染复合物,共同转染至 293T 细胞中进行病毒包装,6 h 后给细胞换液,培养 24 h 后向 293T 细胞中补加 10 mL 含 5% FBS 的 DMEM 培养基,培养至 48 h 后收集上清,并按步骤浓缩病毒颗粒。将目的细胞提前一天铺至 12 孔板,待细胞长至 30%时加入适量浓缩后的慢病毒颗粒以及 polybrene(终浓度 8 μ g/mL)进行感染,6 h 后更换新鲜培养基,培养 48 h 后将细胞置于荧光显微镜下观察,有绿色荧光的细胞即为稳转细胞。

1.2.3 流式细胞无菌分选 将感染成功的细胞消化重悬于含 1% FBS 的 PBS 中,通过 BD FACSAria III 无菌分选阳性单细胞至 96 孔板,培养一周以上。挑选适量的单克隆细胞株,进行

扩大培养,进行后续敲低效率验证。

1.2.4 Western blot 及 q-PCR 验证 western blot 步骤 使用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,BCA 试剂盒测定浓度,以每孔 10 μ g 的蛋白上样量跑 SDS 电泳,浓缩胶浓度为 5%,分离胶浓度为 12%,先用 80 V 跑浓缩胶,然后用 120 V 跑分离胶。半干转膜,15 V,90 min。5%脱脂牛奶室温封闭 1 h,一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜,二抗室温孵育 1 h,然后加曝光底物曝光。q-PCR 步骤:使用 Trizol 试剂提细胞总 RNA,然后使用 promega 的反转录试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA,用 q-PCR mix 加好反应体系,上机完成实验。所有 q-PCR 引物序列信息均来自 primer bank,HSP60 q-PCR 引物为上游 5'- ATGCTTCGGTTACCCACAGTC -3' 和下游 5'-AGCCCGAGTGAGATGAGGAG-3',GAPDH 引物为上游 5'- GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3' 和下游 5'-GGCT-GTTGTCACTTCTCATGG-3'。

1.2.5 CCK-8 测细胞增殖 将待测细胞以合适数量(3000 个/孔)接种到 96 孔板中,每种细胞各设置 3 个复孔。接种 24 h 之后,按照 CCK-8 试剂盒说明书要求加入 CCK-8 试剂,37 $^{\circ}$ C 反应 2 h 后测 450 nm 处的吸光值,根据吸光值来反应细胞增殖能力。

1.2.6 细胞周期测定 提前将细胞接种于 6 孔板,每种细胞各设置 4 个复孔,待细胞长至 60%-80%时,按照步骤收细胞,用 PI 染色,上流式测定细胞周期。

1.3 统计学分析

使用 SPSS10.0 软件处理数据,计量数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较用 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 时认为差异有统计学意义(用 * 在图中标注)。

2 结果

2.1 慢病毒包装

将慢病毒载体转入 293T 细胞中,培养 48-72 h 后将细胞置于荧光显微镜下观察。分别用来包装 control、KN-1、KN-2 慢病毒的 293T 细胞均在荧光显微镜下发出了绿色荧光(图 1),这表明慢病毒在 293T 细胞中成功组装,并表达了主载体上的 GFP 蛋白。转染 72 h 后收病毒上清,并进一步进行病毒浓缩,用于后续感染 SW480 细胞。

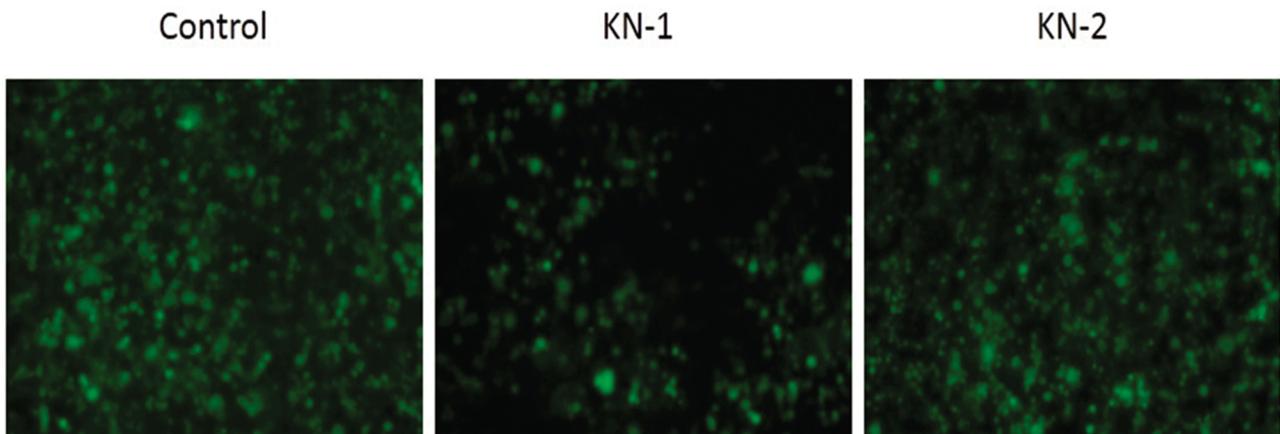


图 1 共转染 72 h 后的 293T 细胞出现了大量绿色荧光(100 \times)

Fig. 1 After 72 h EGFP expression in 293T cells which were co-transfected (100 \times)

2.2 SW480 细胞的流式单克隆分选

将慢病毒感染成功的 SW480 control、KN-1、KN-2 细胞消化下来，分别用流式细胞仪分选单克隆细胞。图 2 为 SW480 control 细胞的分选条件，可以看到细胞明显分为 GFP 阴性和阳性两群，选取荧光强度中等的阳性细胞群，分选单细胞至 96

孔板，KN-1 和 KN-2 细胞也按相同条件进行分选。单细胞在 96 孔板后培养一周以上，待细胞密度达到 50%以上时，挑选部分 GFP 阳性单克隆细胞，逐步扩大培养至 24 孔板、12 孔板、6 孔板以及 10 cm 培养皿，并通过 Western blot 和 q-PCR 检测来筛选出最终的单克隆稳转细胞系。

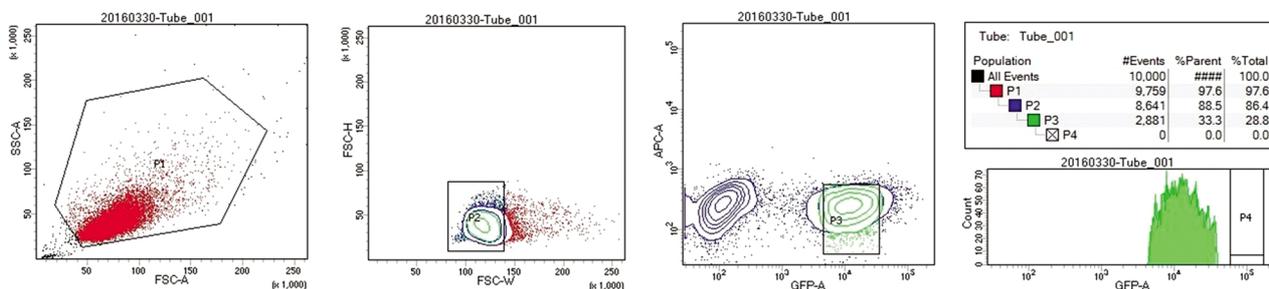


图 2 流式细胞仪单克隆分选参数设定

Fig. 2 Settings of sorting monoclonal cells by flow cytometry

2.3 SW480 HSP60 稳定敲低单克隆细胞系的筛选及鉴定

最终我们从 Control、KN-1 和 KN-2 细胞中各筛选了一株单克隆细胞系，并用显微镜进行观察。可以看到稳转细胞系在形态上发生了明显改变，与 Control 细胞相比，转入了 HSP60

shRNA 的 SW480 细胞变小、变尖，更接近梭形，而在荧光显微镜观察下，三株单克隆细胞系均有着很强的绿色荧光，证明慢病毒载体成功整合到细胞基因组中并能够稳定表达 GFP，也表明了单克隆细胞系的稳定性和均一性(图 3)。

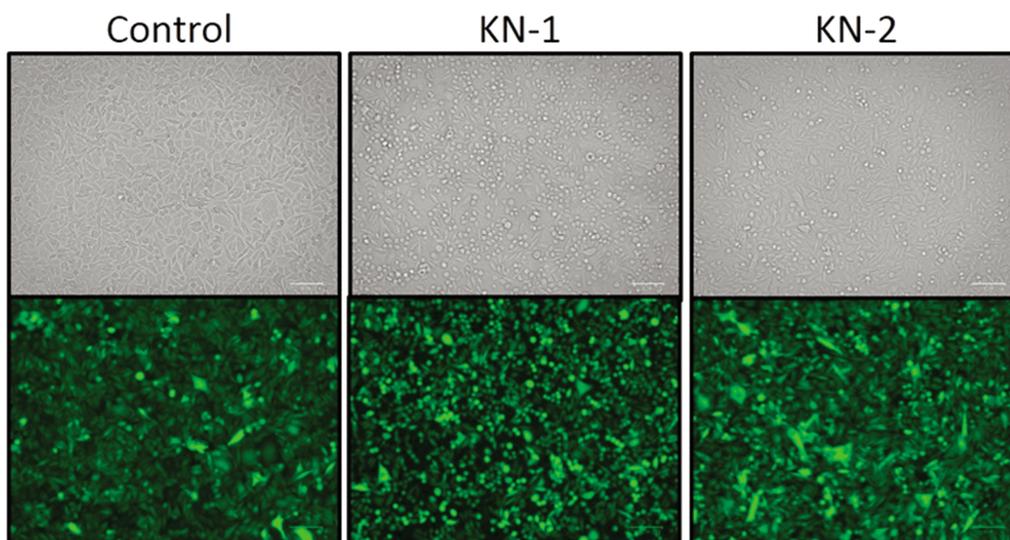


图 3 SW480 单克隆细胞的显微镜观察(100×)

Fig. 3 Microscopy of monoclonal SW480 cells (100×)

接下来我们利用 Western blot 和 q-PCR 来验证 SW480 细胞中 HSP60 的敲低效果。我们对 Western blot 结果进行了灰度分析，发现 Control 细胞与野生型 SW480 细胞中的 HSP60 蛋白表达量基本一致，而 KN-1 和 KN-2 细胞中的 HSP60 蛋白表达水平下降了 60%以上，这表明 KN-1 和 KN-2 细胞中 HSP60 的敲低效率良好(图 4)。q-PCR 结果显示，与 Control 细胞相比，KN-1 和 KN-2 细胞的 HSP60 mRNA 水平也下降了大约 60%，这与 Western blot 的结果一致(图 5)。上述结果证明我们成功构建了结肠癌 SW480 细胞的 HSP60 稳定敲低单克隆细胞系。

2.4 敲低 HSP60 对 SW480 增殖的影响

用构建好的 SW480 control、KN-1 和 KN-2 单克隆细胞系进行细胞增殖实验，观察敲低 HSP60 对细胞增殖的影响。提前

铺好等量的细胞，利用 CCK-8 来测定生长 24 h 之后在 450 nm 处的吸光值，吸光值高能够间接反应活细胞数目多、增殖速度快。Control 细胞的 OD 值在 0.25 左右，而 KN-1 和 KN-2 细胞的 OD 值只有 0.8 左右，下降了大约 70%，这表明敲低 HSP60



图 4 Western blot 检测稳转细胞中的 HSP60 蛋白表达水平

Fig. 4 Western blot detection of HSP60 protein expression level in SW480 stable cell lines

之后 SW480 细胞的增殖能力受到了明显抑制, 细胞生长速度变得非常缓慢(图 6)。

2.5 敲低 HSP60 对 SW480 细胞周期的影响

接下来我们利用碘化丙啶(PI)对细胞进行染色的方法检测了 SW480 的细胞周期, 以此来验证是否是由于细胞周期变

化引起了 SW480 细胞的生长速度变慢。结果显示, 与 Control 细胞相比, KN-1 和 KN-2 细胞的 G0/G1 期、S 期、G2/M 期周期分布变化不大(图 7), 这表明敲低 HSP60 并没有明显影响 SW480 的细胞周期分布所以, HSP60 可能是通过别的途径影响了 SW480 细胞的生长速度。

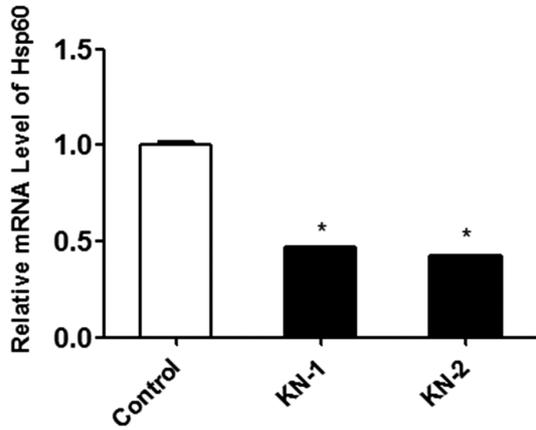


图 5 q-PCR 检测细胞中 HSP60 mRNA 的水平

Fig. 5 q-PCR detection of HSP60 mRNA level in SW480 stable cell lines

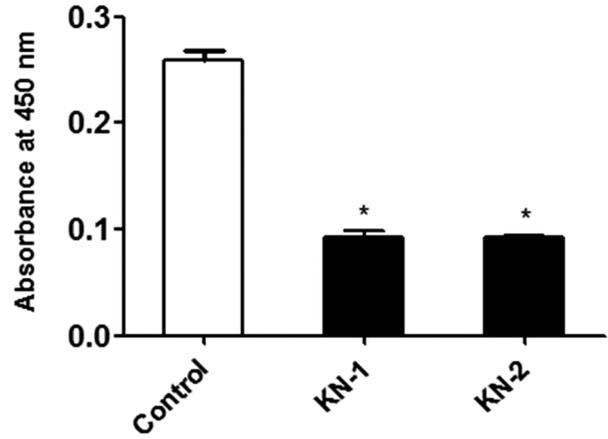


图 6 HSP60 沉默细胞的增殖能力

Fig. 6 Growth curve of HSP60 knockdown SW480 and the control cells

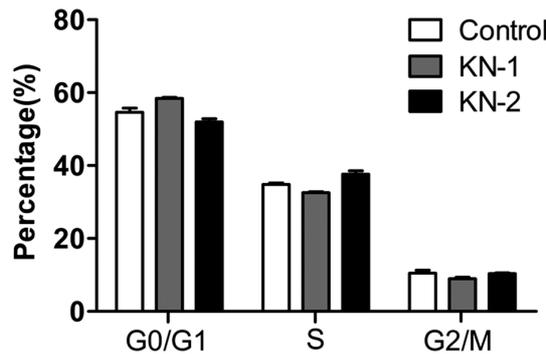
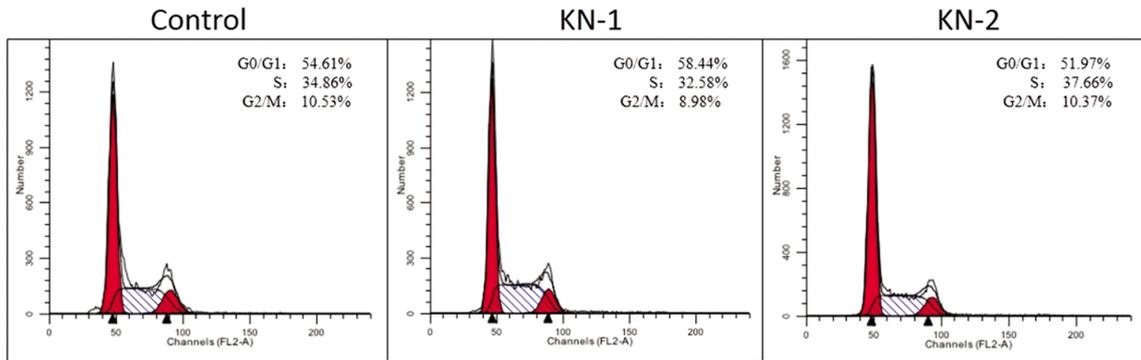


图 7 敲低 HSP60 对细胞周期的影响

Fig. 7 The effect of HSP60 knockdown on cell cycle

3 讨论

结肠癌是一种十分常见的恶性肿瘤, 全球每年有超过一百万人患病, 每年造成约 50 万人死亡^[7], 并且这种局面近些年并无有效改善, 每年发病率和致死率有上升的势头。结肠癌的发病比较复杂, 目前并不是十分清楚其发病机制, 但是人们已经知道其成因与环境因素密切相关, 例如日常生活中的饮食、饮水等。高脂肪的饮食被认为是引发结肠癌的一个重要因素, 因

为高脂肪饮食会促使体内的胆汁酸合成增加, 而过多的胆汁酸进入大肠后会带来许多危害, 包括造成细胞 DNA 损伤、突变、诱导细胞凋亡等^[18]。此外, 还有少量的结肠癌患者发病原因被认为与遗传有关。目前结肠癌的主要治疗方式仍为手术切除, 术后再配以化疗, 这样能够将结肠癌早期患者的 5 年存活率维持在一个非常高的水平, 达到了 90%左右, 但是结肠癌晚期患者的生存形势依然比较严峻, 5 年存活率仅仅只有大约 15%^[19]。因此, 除了积极寻找治疗结肠癌的方法外, 如何尽早地

诊断出结肠癌也为了当下的一个重点研究方向^[20]。例如在miRNA 领域,大量研究发现 miRNA 在癌症中表达异常并且存在着明显的差异化,它们当中有的可能是有益的抑癌基因,而有的则是有害的致癌基因,基于此,人们希望能够通过检测这些 miRNA 在体内的表达水平来达到提前诊断癌症以及监测癌症发展过程的目的,已经有研究发现血浆中的 miR-409-3p、miR-7 和 miR-93 等 miRNA 可能是潜在的结肠癌早期诊断标志物^[21]。

作为热休克蛋白家族的一名重要成员,HSP60 被发现与胃癌、胶质母细胞瘤、胰腺癌、肺癌、结肠癌等多种癌症关系密切,在这些癌症组织中 HSP60 的表达量与癌旁组织相比呈现出明显升高或降低,因此 HSP60 也被人们当作一种潜在的癌症标志物。在胃癌中的研究表明,与正常组织相比,在胃癌组织中 HSP60 和 HIF2 α 的 mRNA 水平和蛋白水平均出现明显升高,同时利用 MKN28 等胃癌细胞系进行实验证实了 HSP60 与 HIF2 α 能够发生相互作用,在胃癌细胞中敲低 HSP60 或 HIF2 α 会诱导细胞发生凋亡,并降低细胞的运动能力^[22]。在胶质母细胞瘤中的研究表明,与癌旁组织相比,胶质母细胞瘤中的 HSP60 呈现明显的高表达,在胶质母细胞瘤细胞系 U87 中敲低 HSP60 能够抑制线粒体呼吸链复合物 I 的形成,引起细胞 ROS 水平显著上升,激活了 AMPK 信号通路,进而通过调节 mTOR 信号通路来抑制磷酸化的 4EBP1 和磷酸化的 P70S6K 的蛋白水平,从而减少了细胞的蛋白合成,最终导致了细胞生长速度变慢^[23]。这些研究结果表明 HSP60 通过影响线粒体的功能从而影响了细胞的蛋白合成、增殖、迁移、衰老等一系列生物学过程。

为了揭示 HSP60 在结肠癌发生和发展中的具体功能,本研究利用慢病毒载体系统和流式无菌分选技术,在结肠癌 SW480 细胞中成功构建了 HSP60 沉默的单克隆稳转细胞系,并在蛋白水平和 mRNA 水平上验证了其敲低效率。我们通过 CCK-8 细胞生长实验证明了敲低 HSP60 能够明显降低 SW480 细胞的增殖速度,这表明在结肠癌中 HSP60 有可能也通过调节细胞的代谢通路参与到了肿瘤的发生和发展过程,是一个潜在的结肠癌诊断标志物和治疗靶点。为了进一步探索敲低 HSP60 抑制 SW480 增殖的作用机制,我们利用 PI 染色的方法对稳转细胞进行了流式细胞周期分析,结果我们发现敲低 HSP60 对细胞周期影响不大,这表明 HSP60 的作用机制可能不在于细胞周期。考虑到 HSP60 是线粒体内的重要分子伴侣,同时结合前人的研究成果,我们推测在结肠癌细胞中 HSP60 主要还是影响了线粒体的功能,敲低 HSP60 会破坏线粒体呼吸链的完整性^[24],从而影响了细胞的代谢过程。因此,在本研究的基础上,接下来我们会重点关注敲低 HSP60 对 SW480 细胞线粒体的影响,检测细胞中的 ROS 水平变化以及下游的代谢相关信号通路,并以此为方向来继续探究 HSP60 抑制结肠癌细胞增殖能力的作用机制。

参考文献(References)

- [1] Tissieres A, Mitchell HK, Tracy UM. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs[J]. *J Mol Biol*, 1974, 84(3): 389-398
- [2] Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins [J]. *Ann Med*, 1988, 22: 631-677
- [3] Jaattela, M. Heat shock proteins as cellular lifeguards [J]. *Annu Rev Genet*, 1999, 31(4): 261-271
- [4] Braig K1, Otwinowski Z, Hegde R, et al. The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å [J]. *Nature*, 1994, 371 (6498): 578-586
- [5] Nisemblat S, Parnas A, Yaniv O, et al. Crystallization and structure determination of a symmetrical 'football' complex of the mammalian mitochondrial Hsp60-Hsp10 chaperonins[J]. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, 2014, 70(1): 116-119
- [6] Okamoto T, Ishida R, Yamamoto H et al. Functional structure and physiological functions of mammalian wild-type HSP60 [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2015, 586: 10-19
- [7] Cappello F, Conway de Macario E, Marasa L, et al. Hsp60 expression, new locations, functions and perspectives for cancer diagnosis and therapy[J]. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7(6): 801-809
- [8] Cappello F, David S, Peri G, et al. Hsp60: molecular anatomy and role in colorectal cancer diagnosis and treatment [J]. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2011, 3: 341-351
- [9] Cappello F, Bellafiore M, Palma A, et al. 60KDa chaperonin (HSP60) is over-expressed during colorectal carcinogenesis [J]. *Eur J Histochem*, 2003, 47(2): 105-110
- [10] Cappello F, Rappa F, David S, et al. Immunohistochemical evaluation of PCNA, p53, HSP60, HSP10 and MUC-2 presence and expression in prostate carcinogenesis [J]. *Anticancer Res*, 2003, 23 (2B): 1325-1331
- [11] Ghosh JC, Dohi T, Kang BH, et al. Hsp60 regulation of tumor cell apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(8): 5188-5194
- [12] Hjerpe E, Egyhazi S, Carlson J, et al. HSP60 predicts survival in advanced serous ovarian cancer [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2013, 23(3): 448-455
- [13] Tang H, Chen Y, Liu X, et al. Down-regulation of HSP60 Suppresses the Proliferation of Glioblastoma Cells via the ROS/AMPK/mTOR Pathway[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 283-288
- [14] Tang H, Chen Y, Liu X, et al. Downregulation of HSP60 disrupts mitochondrial proteostasis to promote tumorigenesis and progression in clear cell renal cell carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2016, 7: 38822-38834
- [15] DeSantis CE, Lin CC, Mariotto AB, et al. Cancer treatment and survivorship statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2014, 64: 252-271
- [16] Dienstmann R, Salazar R, Taberero J. Personalizing colon cancer adjuvant therapy: selecting optimal treatments for individual patients [J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(16): 1787-1796
- [17] Purushotham AD, Lewison G, Sullivan R. The state of research and development in global cancer surgery [J]. *Ann Surg*, 2012, 255(3): 427-432
- [18] Bernstein H, Bernstein C, Payne CM, et al. Bile acids as endogenous etiologic agents in gastrointestinal cancer [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2009, 15: 3329-3334
- [19] Laszlo L. Predictive and prognostic factors in the complex treatment of patients with colorectal cancer [J]. *Magy Onkol*, 2010, 54 (4): 383-394

及呼吸系统^[68]。我们的上述的研究证实香烟烟雾暴露至一定时间和强度后会导致大鼠气道发生异常炎症反应,这种反应同时也会导致远隔组织--骨骼肌组织的氧化应激负荷加重,包括骨骼肌组织的脂质、蛋白质和 DNA/RNA 的氧化损伤。

综上所述,烟熏可使大鼠骨骼肌氧化/抗氧化失衡,最终导致骨骼肌氧化应激损伤。COPD 患者普遍存在的骨骼肌功能障碍与氧化应激损伤有密切联系。目前 COPD 抗氧化治疗有不少研究^[19,20],是否会改善 COPD 患者的骨骼肌功能还有待于进一步观察。

参考文献(References)

- [1] Vestbo J, Hurd SS, Agusti AG, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2013, 87(4): 347-365
- [2] Gea J, Pascual S, Casadevall C, et al. Muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease: update on causes and biological findings[J]. *J Thorac Dis*, 2015, 7(10): E418-E438
- [3] De Brandt J, Spruit MA, Derave W, et al. Changes in structural and metabolic muscle characteristics following exercise-based interventions in patients with COPD: a systematic review [J]. *Expert Rev Respir Med*, 2016, 10(5): 521-545
- [4] Zhou J, Liu B, Liang C, et al. Cytokine signaling in skeletal muscle wasting[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2016, 27(5): 335-347
- [5] Kharbanda S, Ramakrishna A, Krishnan S. Prevalence of quadriceps muscle weakness in patients with COPD and its association with disease severity [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2015, 10(9): 1725-1735
- [6] Garcia-Rio, Romero D, Lores V, et al. Dynamic hyperinflation, arterial blood oxygen and airway oxidative stress in stable patients with COPD[J]. *Chest*, 2011, 140(4): 961-969
- [7] Negewo NA, McDonald VM, Gibson PG. Comorbidity in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Respir Investing*, 2015, 53(6): 249-258
- [8] Malerba M, Montuschi P. Non-invasive biomarkers of lung inflammation in smoking subjects[J]. *Curr Med Chem*, 2012, 19(2): 187-196
- [9] Ellegaard PK, Poulsen HE. Tobacco smoking and oxidative stress to DNA: a meta-analysis of studies using chromatographic and immunological methods[J]. *Scand J Clin Lab invest*, 2016, 76(2): 151-158
- [10] Reis GS, Augusto VS, Silverira AP, et al. Oxidative stress biomarkers in patients with pulmonary hypertension [J]. *Pulm Circ*, 2013, 3(4): 856-861
- [11] Antus B, Harnasi G, Drozdovszky O, et al. Monitoring oxidative stress during chronic obstructive pulmonary disease exacerbations using malondialdehyde[J]. *Respirology*, 2014, 19(1): 74-79
- [12] Canyin AM, North SL, Hubbard RC, et al. Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione [J]. *J Appl Physiol*, 1987, 63(2): 152-157
- [13] Rahman I. Regulation of glutathione in inflammation and chronic lung diseases[J]. *Mut Res*, 2005, 579(1): 58-80
- [14] 海春旭, 主编. 自由基医学 [M]. 第四军医大学出版社, 西安: 2004: 270-281
- Hai Chun-xu. *Free Radical Medicine* [M]. Publisher of Forth Military Medical University, Xi'an: 2004: 270-281
- [15] Nozik-Grayck E, Suliman HB, Piantadisi CA. Extracellular superoxide dismutase[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005, 37(12): 2466-2471
- [16] Kinnula VL, Ilumets H, Myllarniemi M, et al. 8-Isoprostane as a marker of oxidative stress in nonsymptomatic cigarette smokers and COPD[J]. *Eur Respir*, 2007, 29(1): 51-55
- [17] Chhabra SK, Gupta M. Exhaled breath condensate analysis in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Indian J Chest Dis Allied Sci*, 2012, 54(1): 27-37
- [18] Zhang X, Pang B, Hou X, et al. Oxidative stress and peripheral muscle dysfunction in rats with emphysema [J]. *Chin Med J*, 2010, 123(1): 40-44
- [19] Cazzola M, Calzetta L, Page C, et al. Influence of N-acetylcysteine on chronic bronchitis or COPD exacerbations: a meta-analysis [J]. *Eur Respir Rev*, 2015, 24(137): 451-461
- [20] Tse HN, Raiteri L, Wong KY, et al. Benefits of high-dose N-acetylcysteine to exacerbation-prone patients with COPD [J]. *Chest*, 2014, 146(3): 611-623
- [21] Wang S1, Xiang J, Li Z, et al. A plasma microRNA panel for early detection of colorectal cancer[J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(1): 152-161
- [22] Tong WW, Tong GH, Kong H, et al. The tumor promoting roles of HSP60 and HIF2 α in gastric cancer cells [J]. *Tumour Biol*, 2016, [Epub ahead of print]
- [23] Kong Y, Trabucco SE, Zhang H. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and the mitochondria theory of aging [J]. *Interdiscip Top Gerontol*, 2014, 39: 86-107

(上接第 1205 页)