

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.11.012

CD47-siRNA 通过调控 ROS 诱导食管癌细胞 SEG-1 凋亡*

吴 兵 李世升 肖商荣 马书元 张亚飞[△]

(陕西省核工业 215 医院内镜科 陕西 咸阳 712000)

摘要 目的: 探讨 CD47-siRNA 对食管癌细胞 SEG-1 凋亡的影响及其机制研究。**方法:** Western blot 法检测食管癌细胞 SEG-1 中 CD47 蛋白、促凋亡蛋白 Bax 和抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达; CCK-8 法检测食管癌细胞 SEG-1 细胞活力; DCFDA 细胞 ROS 检测试剂盒检测食管癌细胞 SEG-1 中 ROS 水平。**结果:** CD47-siRNA 转染组食管癌细胞 SEG-1 中 CD47 蛋白明显低于空载对照组($P < 0.05$); CD47-siRNA 转染组食管癌细胞 SEG-1 细胞活力显著低于空载对照组($P < 0.05$); CD47-siRNA 转染组食管癌细胞 SEG-1 中促凋亡蛋白 Bax 表达显著高于空载对照组 ($P < 0.05$), 抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达低于空载对照组 ($P < 0.05$); CD47-siRNA 转染食管癌细胞 SEG-1 组 ROS 水平明显高于空载对照组($P < 0.05$); 与 CD47-siRNA 转染组比较, CAT (ROS 抑制剂, 5 mM/L, 6 h) 预处理增加了细胞活力; 与 CD47-siRNA 转染组比较, CAT (ROS 抑制剂, 5 mM/L, 6 h) 预处理显著降低食管癌细胞 SEG-1 中 Bax 蛋白表达以及增加抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达。**结论:** CD47-siRNA 转染通过上调食管癌细胞 SEG-1 内 ROS 水平促进食管癌细胞 SEG-1 凋亡。

关键词: CD47-siRNA 转染; 食管癌细胞 SEG-1; 凋亡; 活性氧簇

中图分类号: R-33; R735.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2019)11-2061-05

CD47-siRNA Induces the Apoptosis of Esophageal Cancer Cells SEG-1 by Regulating ROS*

WU Bing, LI Shi-sheng, XIAO Shang-rong, MA Shu-yuan, ZHANG Ya-fei[△]

(Endoscopy Department, No. 215 Hospital of Shaanxi Nuclear Industry, Xianyang, Shaanxi, 712000, China)

ABSTRACT Objective: To detect the effects of CD47-siRNA on the apoptosis of esophageal cancer cells SEG-1 and its mechanism.

Methods: Western blot was used to detect the CD47 protein, pro-apoptosis Bax and anti-apoptosis Bcl-2; Cell Counting Kit-8 (CCK-8) was used to detect cell viability; DCFDA cellular ROS detection kit was used to detect the ROS level of esophageal cancer cells SEG-1.

Results: CD47 protein in CD47-siRNA transfected group was significantly lower than Vector-NC group ($P < 0.05$). The cell viability in CD47-siRNA transfected group was significantly lower than Vector-NC group ($P < 0.05$). The expression of pro-apoptotic protein Bax in CD47-siRNA transfected group was significantly higher than Vector-NC group ($P < 0.05$), and the expression of anti-apoptotic protein bcl-2 was lower than Vector-NC group ($P < 0.05$). The ROS level in CD47-siRNA transfected group was significantly higher than Vector-NC group ($P < 0.05$). Compared with CD47-siRNA transfected group, pretreatment with CAT (ROS inhibitor, 5 mm /L, 6 h) increased the cell viability. Compared with CD47-siRNA transfected group, pretreatment with CAT (ROS inhibitor, 5 mm/L, 6 h) significantly reduced the expression of Bax protein and increased the expression of Bcl-2 protein. **Conclusion:** CD47-siRNA can promote the apoptosis of esophageal cancer cells SEG-1 through increasing the level of ROS in esophageal cancer cells SEG-1.

Key words: CD47-siRNA; Esophageal cancer cells SEG-1; Apoptosis; Reative oxygen species

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R735.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)11-2061-05

前言

食管癌是常见的消化道肿瘤,其典型的症状为进行性咽下困难,先是难咽干的食物,继而是半流质食物,最后水和唾液也无法咽下^[1,2]。食管癌的发病率和死亡率在各国之间的差异很大。据统计,我国是世界上食管癌高发国家之一,每年平均病死约 15 万人,男多于女,且发病年龄多在 40 岁以上^[3]。目前临床对食管癌的治疗以手术治疗为首选,但其具体发病机制仍未深

入阐明。CD47 也被称为整合素相关蛋白(integrin-associated protein, IAP)。CD47 广泛表达在细胞表面,可与细胞信号调节蛋白 α 、血小板反应蛋白以及整合素相互作用,介导细胞增殖、凋亡等一系列生命活动^[4,5]。此外,CD47 是“自我”信号,能够逃避免疫细胞的识别^[6]。有文献证实,肿瘤细胞可借助细胞表面的 CD47 此特性,逃避免疫系统对其的吞噬^[7]。亦有学者发现,CD47 在肿瘤干细胞中的呈高表达状态^[8]。基于以上背景,我们猜想敲除 CD47 是否能在食管癌中发挥抗肿瘤的效应呢? 其作

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81701501)

作者简介:吴兵(1967-),大学本科,主治医师,研究方向:消化道疾病的诊治,电话:15619278386

[△] 通讯作者:张亚飞(1971-),大学本科,副主任医师,研究方向:消化道疾病的内镜微创诊治,电话:18991015799, E-mail: Plum_Lei@126.com

(收稿日期:2018-11-28 接受日期:2018-12-23)

用机制又是什么呢?我们将通过一定的基础实验进行验证。

1 材料与方法

1.1 材料

主要试剂:胎牛血清为赛默飞产品,购买于上海中乔新舟生物科技有限公司;CCK-8 试剂为美国 Sigma 产品;DMEM 为中国碧云天产品;细胞冻存液为 Hyclone 产品;DCFDA 细胞 ROS 检测试剂盒为美国 Abcam 产品;食管癌细胞系 SEG-1 购买于上海江林生物科技有限公司;CD47-siRNA 慢病毒质粒由宝日生物技术(北京)有限公司构建。

1.2 CCK-8 法检测检测食管癌细胞 SEG-1 的细胞活力

CCK-8 Cell Counting Kit-8(简称 CCK-8)试剂可用于简便而准确的检测细胞活力。收集对数生长期的细胞,通过细胞计数板制备细胞悬液并进行细胞计数。将细胞单悬液均匀接种到 96 孔板中:根据合适的铺板细胞数,每孔约 100 μ L 细胞悬液,可做 3 个重复的样本。将 96 孔板置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养:细胞接种后贴壁大约需要培养 2-4 小时。加入 10 μ L CCK8:由于每孔加入 CCK8 量比较少,有可能因试剂沾在孔壁上而带来误差,建议在加完试剂后轻轻敲击培养板使其混匀。或者直接配置含 10% CCK8 的培养基,以换液的形式加入。培养 1-4 小时:细胞种类不同,形成的 Formazan 的量也不一样。如果显色不够的话,可以继续培养,以确认最佳条件。最后,在酶标仪上以 490 nm 的波长情况下检测 96 孔板各孔的吸光值。细胞存活率=(实验组 OD 均值 / 对照组 OD 均值) $\times$ 100%。

1.3 蛋白免疫印迹(Western blot)法检测 CD47、Bcl-2、Bcl-x1 蛋白的表达水平

本研究中实验分组为 Control(空白对照组)、Vector-NC 组(空载体对照组)、CD47siRNA 组。根据蛋白浓度取适量蛋白量,上样缓冲液:蛋白浓度以 4:1 的比例均匀混合,置于水浴锅中煮浴 5 min,经 SDS-PAGE 电泳,以 80 V 的恒压电泳 30 min 左右,然后调整到 120V 恒压至溴酚蓝刚出胶底,停止电泳。然后转至 PVDF 膜上,根据相应蛋白转模条件进行转模,之后用含 5%脱脂牛奶的封闭液进行封闭 2 h,孵育一抗,4 $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜。次日,用 TBST 洗膜 10 min $\times$ 3 次,二抗孵育 2 h,再次用 TBST 洗膜 10 min $\times$ 3 次,用化学发光法进行显色。以 β -actin 为内参重复以上操作三次,然后在凝胶系统成像仪上进行显色成像。最后用图像扫描分析软件进行图像扫描统计,统计蛋白表达情况。

1.4 DCFDA 染色流式细胞仪检测细胞内 ROS 水平

将细胞以 $1-2 \times 10^6$ 的密度均匀种植于在六孔板中,待细胞铺满板底 50%-60%左右,将 CD47-siRNA 转染细胞处理,置于培养箱中继续培养 24 h。然后收集细胞,制成单细胞悬液,通过细胞计数板稀释细胞密度为 1.5×10^6 ,按照说明加入 20 μ L 的 DCFDA,置于 5% CO_2 、37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 30 min,之后不需要洗涤细胞,直接通过流式细胞仪以 E $\times$ 485 nm/Em535 nm 进行检测。

1.5 统计学方法

本研究中采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析。实验均需独立重复至少 3 次,实验数据均采用(平均 $\pm$ 标准差)表示。多

组间的差异采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 CD47-siRNA 对食管癌细胞 SEG-1 中 CD47 蛋白的影响

SEG-1 细胞转染 CD47-siRNA 慢病毒质粒 48 h 后,分别将正常食管癌细胞组和 CD47-siRNA 转染组提取细胞蛋白并检测细胞中 CD47 蛋白的表达量,结果与正常食管癌细胞组(灰度值:118)相比较,CD47-siRNA 转染(灰度值:56)对细胞中的 CD47 蛋白有明显的抑制效应(图 1, $P < 0.05$)。

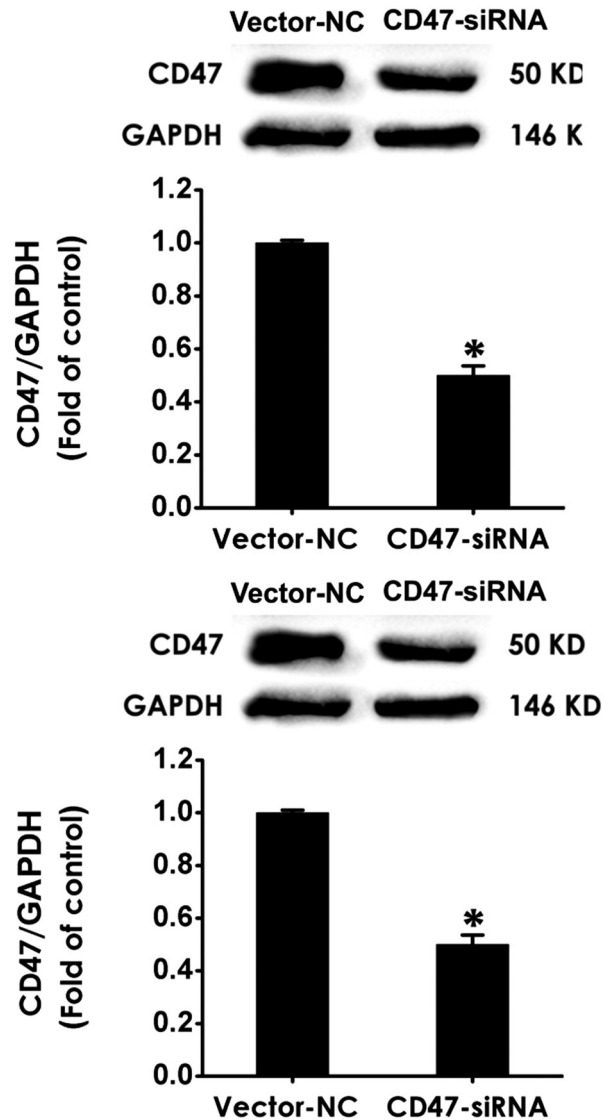


图 1 CD47-siRNA 转染对食管癌细胞 SEG-1 中 CD47 蛋白的影响
Fig.1 Effect of CD47-siRNA on the level of CD47 protein in esophageal cancer cells SEG-1

2.2 CD47-siRNA 对食管癌细胞 SEG-1 活力的影响

为了检测 CD47-siRNA 转染对食管癌细胞 SEG-1 活力的影响,我们通过 CCK-8 法检测 CD47-siRNA 转染处理食管癌细胞 SEG-1 后的细胞活力。结果显示,与对照组(活力值:2.12)相比较,CD47-siRNA 转染(活力值:1.378)能够明显降低食管癌细胞 SEG-1 活力(图 2, $P < 0.05$)。

2.3 CD47-siRNA 对食管癌细胞 SEG-1 凋亡的影响

接着,我们通过 WB 检测不同浓度 CD47-siRNA 转染处理食管癌细胞 SEG-1 后的细胞凋亡情况。结果如图 2 所示: CD47-siRNA 转染(Bax 灰度值:122,Bcl-2 灰度值:67)处理食管癌细胞 SEG-1 后,与对照组相(Bax 灰度值:78,Bcl-2 灰度值:121)比较,促凋亡相关蛋白 Bax 表达明显降低(图 3A, $P<0.05$),而抗凋亡蛋白 Bcl-2 显著增加(图 3B, $P<0.05$)。以上结果提示 CD47-siRNA 转染能够抑制食管癌细胞 SEG-1 凋亡。

2.4 CD47-siRNA 对食管癌细胞 SEG-1 内 ROS 水平的影响

为了观察 CD47-siRNA 转染对食管癌细胞 SEG-1 内 ROS 水平的影响,我们通过流式细胞仪检测食管癌细胞 SEG-1 中 ROS 水平,结果如图 3 所示:与对照组(mean 值:345)相比, CD47-siRNA 转染(mean 值:621)能够增加食管癌细胞 SEG-1 内 ROS 水平(图 4, $P<0.05$)。

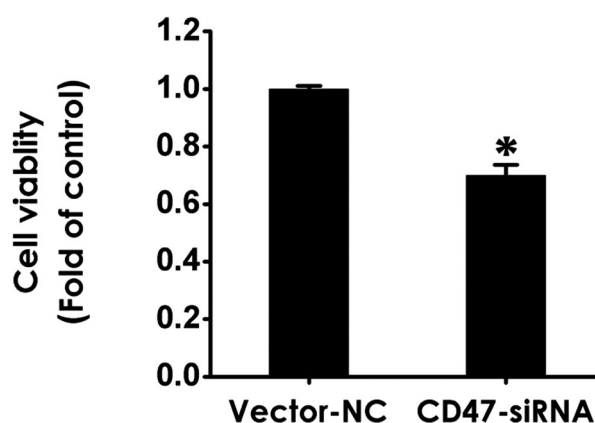


图 2 CD47-siRNA 转染对食管癌细胞 SEG-1 活力的影响

Fig.2 Effect of CD47-siRNA on cell viability in esophageal cancer cells SEG-1

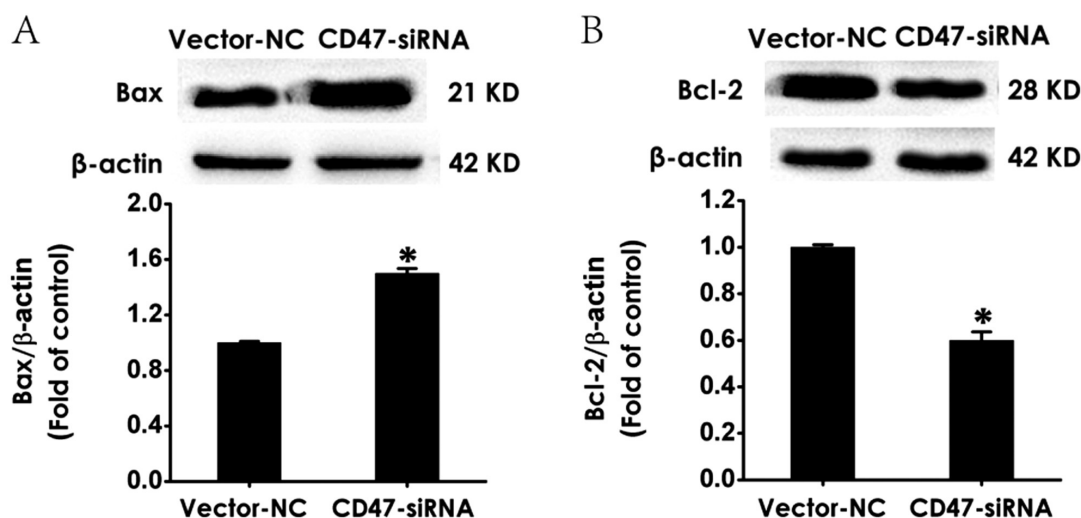


图 3 CD47-siRNA 转染对食管癌细胞 SEG-1 中 Bax 蛋白和 Bcl-2 蛋白表达的影响

Fig.3 Effect of CD47-siRNA on the expressions of Bax and Bcl-2 proteins in esophageal cancer cells SEG-1

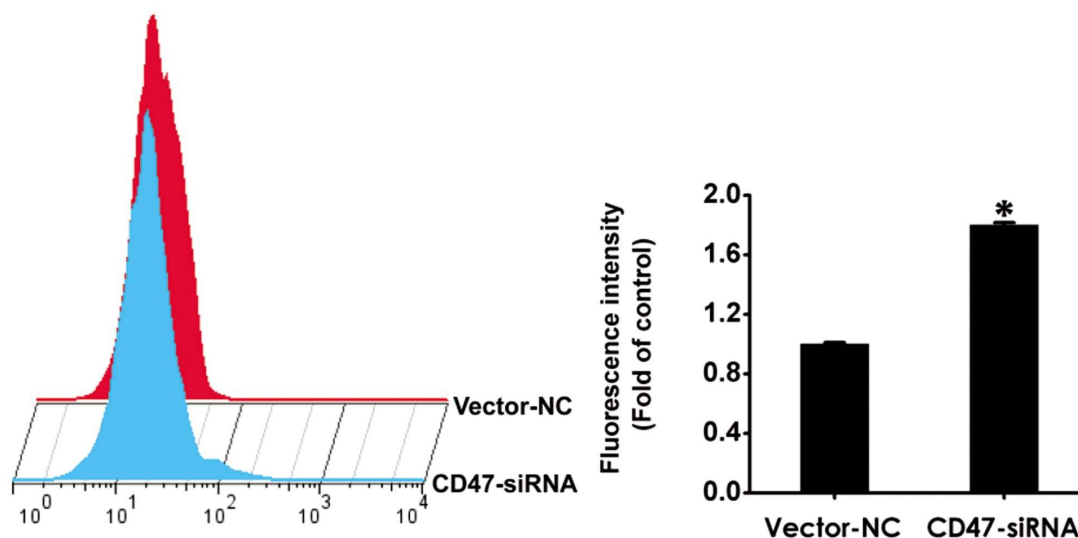


图 4 CD47-siRNA 转染对食管癌细胞 SEG-1 内 ROS 水平的影响

Fig.4 Effect of CD47-siRNA on the level of ROS in esophageal cancer cells SEG-1

2.5 CAT 对食管癌细胞 SEG-1 活力的影响

CAT 是一种常用的 ROS 抑制剂。为了检测 CD47-siRNA 转染对食管癌细胞 SEG-1 的影响,我们通过 CCK-8 检测了食管癌细胞 SEG-1 的细胞活力情况。CAT(活力值:2.378)预处理

可逆转 CD47-siRNA 转染(活力值:1.378)对食管癌细胞 SEG-1 活力的降低作用(图 5, $P<0.05$)。以上结果说明 ROS 可能介导 CD47-siRNA 转染对食管癌细胞 SEG-1 活力的抑制作用。

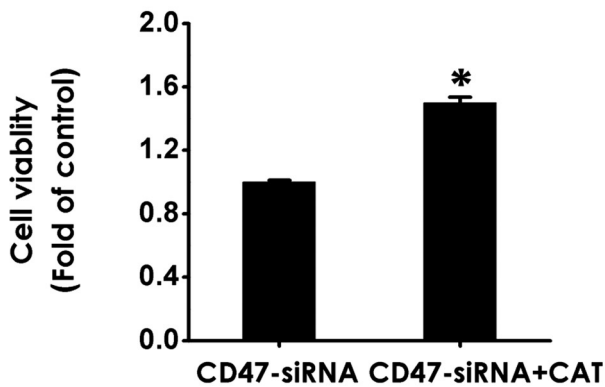


图 5 CAT 对食管癌细胞 SEG-1 中 ROS 水平的影响

Fig.5 Effect of CAT on the level of ROS in esophageal cancer cells SEG-1

2.6 CAT 对食管癌细胞 SEG-1 凋亡的影响

为了进一步明确 ROS 对 CD47-siRNA 转染诱导的食管癌细胞 SEG-1 凋亡的影响,我们又通过 WB 检测食管癌细胞 SEG-1 中促凋亡蛋白 Bax 和抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达。结果如图 6 所示,抑制 ROS 水平即预处理 CAT(Bax 灰度值:65,Bcl-2 灰度值:90)可逆转 CD47-siRNA 转染 (Bax 灰度值:132,Bcl-2 灰度值:57)对食管癌细胞 SEG-1 凋亡的促进作用(图 6, $P<0.05$)。以上结果说明 ROS 可能介导 CD47-siRNA 转染对食管癌细胞 SEG-1 凋亡的促进作用。

3 讨论

食管癌是常见的恶性肿瘤,由食管鳞状上皮或腺上皮的异

常增生所形成的恶性病变^[9]。其发展一般经过上皮不典型增生、原位癌、浸润癌等阶段。食管鳞状上皮不典型增生是食管癌的重要癌前病变,由不典型增生到癌变一般需要几年甚至十几年。CD47 是一种广泛表达在各类细胞表面且分子量为 50 KDa 的膜糖蛋白,亦属于免疫球蛋白超家族的成员之一。Oldenborg 等人证实 CD47 是细胞表面一个重要的“self”标记,是调节巨噬细胞吞噬作用的一个重要信号^[4,10]。CD47 可以与巨噬细胞表面 SIRP α 结合,磷酸化其 ITIM,随后招募 SHP-1 蛋白,产生一系列的级联反应抑制巨噬细胞的吞噬作用^[5,11]。肿瘤细胞有一系列躲避人体免疫系统追杀的方案,包括分泌免疫抑制因子、下调 MHCI 表达,以及上调 PD-L1 抑制 CD8⁺T 细胞活性^[12]。大量研究表明,几乎所有的肿瘤细胞和组织都高表达 CD47,是对应正常细胞和组织的 3 倍^[9],如体外实验中,高表达 CD47 的胃癌细胞,其细胞增殖能力明显增强;在小鼠模型中,CD47 高表达表达出很强的成瘤能力^[13]。肿瘤细胞通过借助 CD47 这个“self”信号传达抑制性信号,降低巨噬细胞活性从而逃避巨噬细胞的吞噬^[14]。更重要的是,有研究者已通过抗 CD47 抗体应用在不同肿瘤的基础实验研究中,并且发现抗 CD47 抗体的应用能够激活 T 淋巴细胞和巨噬细胞活性从而降低肿瘤细胞不断增殖和转移^[15],比如抗 CD47 抗体在急性淋巴白血病中应用能够降低其转移能力^[16];抗 CD47 抗体在乳腺癌中应用增强吞噬细胞的作用^[17]。在本次研究中,我们敲除食管癌细胞 SEG-1 中的 CD47 后发现,CD47siRNA 转染可诱导食管癌细胞 SEG-1 凋亡,其机制可能与调控 ROS 水平相关。

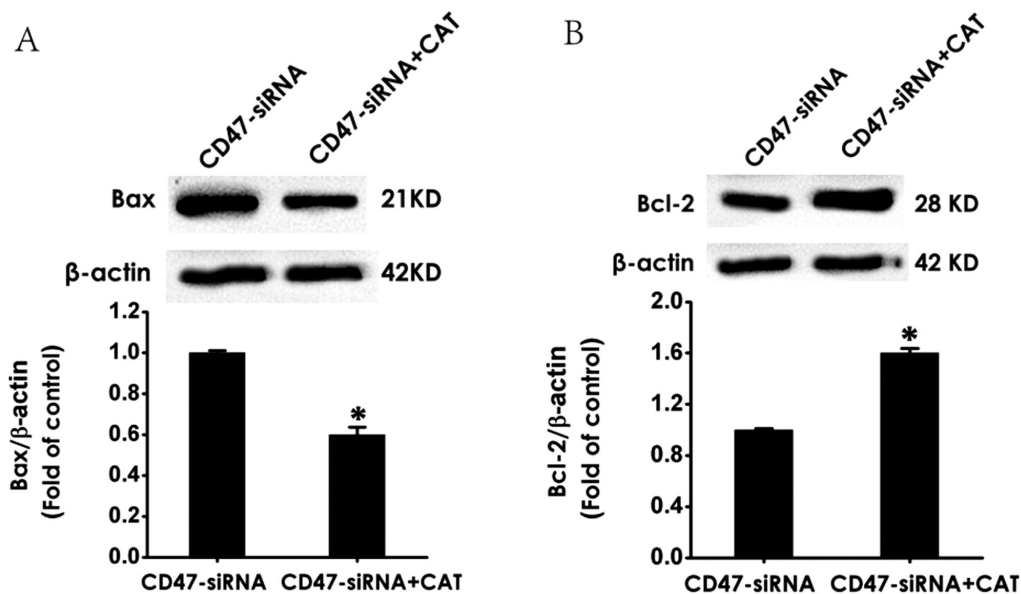


图 6 CAT 对食管癌细胞中 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响

Fig.6 Effect of CAT on the expressions of Bax and Bcl-2 proteins in esophageal cancer cells SEG-1

细胞凋亡是由一系列基因控制的细胞自主的有序死亡,凋亡受到抑制是肿瘤发生发展的重要基础。因为细胞凋亡受到抑制使细胞无序生长从而促进肿瘤的发生。凋亡细胞通常被吞噬细胞所吞噬,上述已提及 CD47 高表达会降低吞噬细胞活性^[18,19]。此外,细胞凋亡基因分为促进凋亡基因和抑制凋亡基因^[12]。Bax 基因是人体最主要的促凋亡基因,其编码的蛋白广泛分布于多种细胞^[20,21]。而 Bcl-2 基因编码的蛋白具有抑制细胞凋亡

的作用^[22,23]。在本次研究中,我们通过 WB 检测食管癌细胞 SEG-1 中 CD47 蛋白表达,发现 CD47-siRNA 转染可降低食管癌细胞 SEG-1 中 CD47 蛋白。通过 CCK-8 法检测 CD47-siRNA 转染处理食管癌细胞 SEG-1 后的细胞活力,发现 CD47-siRNA 转染可降低食管癌细胞 SEG-1 活力。通过 WB 检测食管癌细胞 SEG-1 中 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达,发现 CD47-siRNA 转染可增加食管癌细胞 SEG-1 中 Bax 蛋白的表达并降低 Bcl-2 蛋白的

表达。上述结果说明 CD47-siRNA 转染能够促进食管癌细胞 SEG-1 凋亡。

活性氧簇(Reactive oxygen species, ROS)是分子氧在还原过程中的一系列中间产物,主要包括超氧自由基($\cdot\text{O}_2^-$)、过氧化氢(H_2O_2)、羟自由基($\cdot\text{OH}$)等^[24,25]。人体内活性氧过剩会对细胞造成伤害,甚至导致细胞死亡,诱发各种心血管疾病、神经性疾病及肿瘤等 200 多种疾病^[26,27]。此外,活性氧在体内过度的堆积还可使组织器官衰老,90%以上的老年性疾病是由其过度堆积引起的^[28-30]。本研究中通过 DCFDA 染色流式细胞仪检测 CD47-siRNA 转染处理食管癌细胞 SEG-1 后的 ROS 水平,发现 CD47-siRNA 转染可增加食管癌细胞 SEG-1 中 ROS 水平。然后,分别通过 CCK-8 和 WB 检测抑制 ROS 水平后,CD47-siRNA 转染对食管癌细胞 SEG-1 细胞活力和凋亡相关蛋白的影响,发现 CAT(ROS 抑制剂)可逆转 CD47-siRNA 转染对食管癌细胞 SEG-1 细胞活力的降低作用,并且减弱 CD47-siRNA 转染对食管癌细胞 SEG-1 凋亡的促进作用。上述结果说明,ROS 介导 CD47-siRNA 转染对食管癌细胞 SEG-1 凋亡的促进作用。

本研究结果显示,CD47-siRNA 转染处理食管癌细胞 SEG-1 后降低食管癌细胞 SEG-1 细胞活力,促进细胞凋亡以及增加细胞中 ROS 水平。而通过 ROS 抑制剂,CAT 预处理食管癌细胞 SEG-1 可逆转 CD47-siRNA 转染对食管癌细胞 SEG-1 凋亡的促进作用,证实 CD47-siRNA 转染通过上调 ROS 水平促进食管癌细胞 SEG-1 凋亡。这一发现为临床靶向攻击 CD47 的治疗应用和食管癌的预防提供了一定的理论基础。

参考文献(References)

- [1] Yu W, Guo Y. Prognostic significance of programmed death ligand-1 immunohistochemical expression in esophageal cancer: A meta-analysis of the literature[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2018, 97(30): e11614
- [2] Zang R K, Ma J B, Liang Y C, et al. MicroRNA-124 inhibits proliferation and metastasis of esophageal cancer via negatively regulating NRPI[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(14): 4532-4541
- [3] 白海鹏,孙维敏,康娜. 食管癌及其治疗的研究进展[J]. *包头医学院学报*, 2014, 30(3): 134-136
- [4] Folkes A S, Feng M, Zain J M, et al. Targeting CD47 as a cancer therapeutic strategy: the cutaneous T-cell lymphoma experience [J]. *Curr Opin Oncol*, 2018, 30(5): 332-333
- [5] Matlung H L, Szilagy K, Barclay N A, et al. The CD47-SIRPalpha signaling axis as an innate immune checkpoint in cancer[J]. *Immunol Rev*, 2017, 276(1): 145-164
- [6] Wu J, Wu H, An J, et al. Critical role of integrin CD11c in splenic dendritic cell capture of missing-self CD47 cells to induce adaptive immunity[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(26): 6786-6791
- [7] Murata Y, Saito Y, Kotani T, et al. CD47-signal regulatory protein alpha signaling system and its application to cancer immunotherapy[J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(8): 2349-2357
- [8] 秦丽,汪延明. CD47 在恶性肿瘤中的表达及相关问题研究现状[J]. *实用医药杂志*, 2016, 33(07): 656-659
- [9] Naveed M, Kubiliun N. Endoscopic Treatment of Early-Stage Esophageal Cancer[J]. *Curr Oncol Rep*, 2018, 20(9): 71
- [10] Battaglin F, Naseem M, Puccini A, et al. Molecular biomarkers in gastro-esophageal cancer: recent developments, current trends and future directions[J]. *Cancer Cell Int*, 2018, 18: 99
- [11] Petrova PS, Viller NN, Wong M, et al. TT-621 (SIRPalphaFc): A CD47-blocking innate immune checkpoint inhibitor with broad anti-tumor activity and minimal erythrocyte binding [J]. *ClinCancer Res*, 2017, 23(4): 1068-1069
- [12] Borst J, Ahrends T, Babala N, et al. CD4(+) T cell help in cancer immunology and immunotherapy [J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18(10): 635-647
- [13] Yoshida K, Tsujimoto H, Matsumura K, et al. CD47 is an adverse prognostic factor and a therapeutic target in gastric cancer [J]. *Cancer Med*, 2015, 4(9): 1322-1333
- [14] Rauh MJ, Ho V, Pereira C, et al. SHIP represses the generation of alternatively activated macrophage[J]. *Immunity*, 2005, 23 (4): 361-374
- [15] 杨赞,张子恒,张朋飞,等. CD47 分子与抗肿瘤免疫[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2018, 34(3): 262-266
- [16] Chao MP, Alizadeh AA, Tang C, et al. Therapeutic antibody targeting of CD47 eliminates human acute lymphoblastic leukemia [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(4): 1374-1384
- [17] 赵立坤,韩思奇. 表阿霉素和抗 CD47 抗体联合治疗乳腺癌的体外实验研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2014, 30(10): 1360-1363
- [18] Wang HS, Pei F, Chen Z, et al. Increased apoptosis of inflamed odontoblasts is associated with CD47 loss [J]. *J Dent Res*, 2016, 95(6): 697-703
- [19] Mohamed MS, Bishr MK, Almutairi FM, et al. Inhibitors of apoptosis: clinical implications in cancer [J]. *Apoptosis*, 2017, 22 (12): 1487-1509
- [20] Ramirez M L G, Salvesen G S. A primer on caspase mechanisms[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2018, 82: 79-85
- [21] Hoetelmans R, van Slooten H J, Keijzer R, et al. Bcl-2 and Bax proteins are present in interphase nuclei of mammalian cells [J]. *Cell Death Differ*, 2000, 7(4): 384-392
- [22] Thomenius M J, Wang N S, Reineks E Z, et al. Bcl-2 on the endoplasmic reticulum regulates Bax activity by binding to BH3-only proteins [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(8): 6243-6250
- [23] Schmitt E, Sane A T, Steyaert A, et al. The Bcl-xL and Bax-alpha control points: modulation of apoptosis induced by cancer chemotherapy and relation to TPCK-sensitive protease and caspase activation[J]. *Biochem Cell Biol*, 1997, 75(4): 301-314
- [24] Donaghy L, Hong H K, Jauzein C, et al. The known and unknown sources of reactive oxygen and nitrogen species in haemocytes of marine bivalve molluscs[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2015, 42(1): 91-97
- [25] Donaghy L, Kraffe E, Le Goic N, et al. Reactive oxygen species in unstimulated hemocytes of the pacific oyster *Crassostrea gigas*: a mitochondrial involvement[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e46594
- [26] Cui Q, Wang JQ, Assaraf YG, et al. Modulating ROS to overcome multidrug resistance in cancer[J]. *Drug Resist Updat*, 2018, 41: 1-25
- [27] Lo YL, Wang W. Formononetin potentiates epirubicin-induced apoptosis via ROS production in HeLa cells in vitro [J]. *Chem Biol Interact*, 2013, 205(3): 188-197
- [28] DeNicola G M, Karreth F A, Humpton T J, et al. Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis[J]. *Nature*, 2011, 475(7354): 106-109
- [29] Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ, et al. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release[J]. *Physiol Rev*, 2014, 94 (3): 909-950
- [30] Scialò F, Fernández-Ayala DJ, Sanz A, et al. Role of Mitochondrial Reverse Electron Transport in ROS Signaling: Potential Roles in Health and Disease[J]. *Front Physiol*, 2017, 8 (428): 978-993