

Chk1 和 Chk2 高表达人胃癌 BGC823 细胞的建立与鉴定

王莉^{1,2}, 曾颖^{1△}, 夏红¹, 刘芳¹, 苏波¹, 凌晖¹, 苏琦^{1*}

(1. 南华大学肿瘤研究所, 湖南省肿瘤细胞与分子病理学重点实验室, 湖南 衡阳 421001;

2. 山东省邹平县人民医院肿瘤科)

摘要: 细胞周期检测点 Chk1 和 Chk2 在参与 G2/M 期起着重要作用, 本研究构建 Chk1/2 的真核表达载体和建立高表达 Chk1/2 基因人胃癌 BGC823 细胞, 进一步证明 Chk1/2 高表达对 BGC823 细胞 G2/M 期的影响。根据 NCBI GenBank Chk1/2 基因全序列, 在 cDNA 两端各设计一条对应引物, 并引入各自的酶切位点。从人胃癌细胞中提取 mRNA 作为模板合成 Chk1/2 cDNA 第一链, 并扩增目的基因全表达序列片断, 双酶切后定向克隆至 pcDNA3.1 真核表达载体, 经氨苄青霉素筛选阳性重组质粒, 菌液 PCR 及测序对重组质粒进行鉴定。用脂质体将重组质粒转染 BGC823 细胞, 经 G418 筛选后, RT-PCR 及 Western blot 检测表达产物。结果显示, 菌落特异性 PCR 表明克隆的基因片断分别为 1.4 kb 和 1.6 kb, 经测序与 NCBI BLAST 分析证实为 Chk1 和 Chk2 基因。稳定转染空载体 pcDNA3.1 的细胞克隆株和稳定转染重组质粒的 BGC823 细胞, 经 RT-PCR 及 Western blot 鉴定, Chk1/2 在 BGC823 细胞中的表达较对照组与空载体组明显增加 ($P < 0.05$)。流式细胞术检测显示, Chk1 转染组 G2/M 细胞较对照组与空载体组明显增加 ($P < 0.05$), 而 Chk2 转染组 G2/M 细胞无明显差异 ($P > 0.05$)。上述结果表明, 成功构建 pcDNA3.1/Chk1 与 pcDNA3.1/Chk2 真核表达载体和 Chk1 与 Chk2 高表达的 BGC823 细胞, Chk1 高表达可阻滞 BGC823 细胞于 G2/M。

关键词: Chk1/2 基因; 真核表达载体; 转染; 人胃癌 BGC823 细胞

中图分类号: R331, R329.2

文献标识码: A

Construct and identify gastric cancer BGC823 cells of overexpression of Chk1 and Chk2

WANG Li, ZENG Ying, XIA Hong, LIU Fan, SU Bo, LING Hui, SU Qi

(Cancer Research Institute, Center for Gastric Cancer Research of Hu'nan Province,

Hu'nan Province Key Laboratory of Cancer Cellular and Molecular Pathology,

University of South China, Hengyang 421001, Hunan, China)

Abstract: Cell cycle checkpoint Chk1 and Chk2 play an important role in the G2/M phase, this study constructs the eukaryotic expression vector of Chk1/2 and establishes human gastric cancer BGC823 cells of overexpression Chk1/2 gene, further proves the effect of G2/M phase in BGC823 cells of overexpression of Chk1/2. According to the whole sequence of NCBI GenBank Chk1/2 gene, a corresponding primer was designed on each end of cDNA, and the respective enzyme cutting sites were introduced. mRNA was extracted from human gastric cancer cells as the first chain of a template synthesis of Chk1/2 cDNA, and fully expressed sequence amplification purpose gene fragments, after the double enzyme directional cloning to pcDNA3.1 eukaryotic expression vector, the ampicillin screening positive recombinant plasmid, microbial PCR and sequencing to identify recombinant plasmid. The recombinant plasmid was transfected into BGC823 cells with liposomes, and the expression of Chk1/2 were detected by RT-PCR and Western blot after G418 screening. The colony specific PCR showed that the cloned gene fragment was 1.4 KB and 1.6 KB respectively, which was confirmed by sequencing and NCBI-BLAST analysis as Chk1 and Chk2 genes. The cell clones and stable transfection recombinant plasmid BGC823 cells were stable transfected with pcDNA3.1, and the expression of Chk1/2 in BGC823 cells was significantly increased by RT-PCR and Western blot ($P < 0.05$). Flow cytometry detect showed that G2/M cells in overexpression of Chk1 obviously increased

收稿日期: 2018-05-14; 修回日期: 2018-07-15

基金项目: 国家自然科学基金 (81374013, 30600285, 81641112)。

* 通信作者, E-mail: suqi1945@163.com. △曾颖为并列第一作者。

than in control and vector ($P < 0.05$), and G2/M cells in overexpression of Chk2 had no difference in control and vector ($P > 0.05$). The above results indicate that it is the successfully constructed pcDNA3.1/Chk1 and pcDNA3.1/Chk2 eukaryotic expression vectors and overexpression of Chk1 and Chk2 BGC823 cells that can block BGC823 cells in G2/M.

Key words: Chk1/2 gene; eukaryotic expression vector; transfection; human gastric cancer BGC823 cells

胃癌是全球最常见的恶性肿瘤之一,在我国每年发生率与死亡率分别为 15.82% 与 17.70%,仅次于肺癌而位于第二,手术仍然是胃癌的唯一治疗方法,而辅助化疗与放疗可以改善切除后的胃癌的预后^[1-3]。破坏 DNA 的化疗和放疗可激活细胞检查点功能,这些检查点容易使 DNA 修复和促进未修复细胞死亡。大部分肿瘤抑癌基因与癌基因突变损伤细胞检查点,而 G1/S 和 G2/M 期检查点失活在细胞癌变过程中起着至关重要的作用。目前,已经研发许多特异性抑制 G2/M 检查点的化合物已成为肿瘤治疗的新策略,其靶点是 Chk1^[4-6]。

本实验室已经证明,二烯丙基二硫(diallyl disulfide, DADS)可抑制人胃癌细胞增殖和阻滞 G2/M,与激活 p38、抑制 ERK/AP-1,上调组蛋白乙酰化、p21 WAF1 等有关^[7-9]。沉默 Chk1 可废除胃癌 BGC823 细胞 G2/M 阻滞^[10]。本研究建立稳定高表达 Chk1/2 的 BGC823 细胞,为进一步研究 Chk1/2 功能奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料 人胃癌细胞株 BGC823 购自中国科学院上海细胞研究所。大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 、真核表达质粒 pcDNA3.1 由本实验室保存。RNA 提取试剂盒购自 Omega 公司;反转录 cDNA 第一链合成试剂盒购自 Promega 公司;Taq Plus PCR Mastermix 购自北京天根公司;BamHI 和 HindIII 限制性内切酶购自深圳晶美公司;质粒小量抽提纯化试剂盒和胶回收试剂盒购自江苏碧云天公司;T4 DNA 连接酶购自上海生工;Lipofectamine 2000 脂质体、G418、PRIMI640 均购自 Invitrogen 公司;BCA 蛋白定量试剂盒为 Pierce 公司产品;ECL 发光剂 LumiGLO Reagent 为 Cell Signaling Technology 产品;Chk1 与 Chk2 兔多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司。

1.2 引物合成 Chk1 与 Chk2 克隆引物分别由上海生工公司合成,根据 GenBank 中公布的人 Chk1 与 Chk2 cDNA 序列合成引物:Chk1: 5'-CGGAAGC TT ATGGCAGTGGCCTTTG-3'; R5'-CGGCGAAT TCT-CATGTGGCAGGA-3'; Chk2: 5'-CGCCAGCTTAT-GTCTCGGGAG TC-3'; R5'-CGGAAT TCTCACAACA-

CAGCAGCACAC-3'。引物 5'端引入 EcoRI 酶切位点 GAATTC,3'端引入 HindIII 酶切位点 AAGCTT。

1.3 总 RNA 的提取 按照 Omega 公司 RNA 提取试剂盒说明书进行。

1.4 PCR 扩增 根据 Promega 公司 cDNA 第一链合成试剂盒说明书,以提取的总 RNA 为模板在特异克隆引物下采用高保真 DNA 聚合酶扩增 Chk1 与 Chk2 全长 cDNA 片段。PCR 扩增条件:Chk1:第一链 cDNA 产物 2 μ L,特异引物各 1 μ L,Taq Plus Mastermix 10 μ L;反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,58 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 40 s,扩增 29 个循环。Chk2:第一链 cDNA 产物 2 μ L,特异引物各 0.8 μ L,Taq Plus Mastermix 10 μ L;反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 50 s,扩增 30 个循环。

1.5 构建真核表达载体 将扩增的 Chk1 和 Chk2 PCR 产物和 pcDNA3.1 均用 EcoR I 和 Hind III 双酶切,并用琼脂糖凝胶电泳回收纯化。将目的片段与载体用 T4 DNA 连接酶进行连接,构建成重组真核表达载体 pcDNA 3.1/Chk1 与 pcDNA3.1/Chk2。重组载体用 EcoR I 和 Hind III 酶切鉴定和菌液 PCR 鉴定正确后,由上海生工进行测序鉴定,鉴定后大量扩增重组质粒 pcDNA 3.1/Chk1 与 pcDNA3.1/Chk2。

1.6 细胞转染 于转染前 24 h 按 0.5×10^5 cells/well 将 BGC823 细胞接种于 24 孔板中,待细胞至 90% ~ 95% 汇片。稀释 0.8 μ g 质粒 DNA 于无血清 Opti-MEM 培养液中,总体积 50 μ L,轻轻混匀。混匀 LipofectamineTM 2000,取 2 μ L 于无血清 Opti-MEM 培养液中至总体积 50 μ L 混匀,室温孵育 5 min。混合质粒和 LipofectamineTM2000,轻轻混匀,孵育 205 min。将 100 μ L 复合物加入 24 孔板,混匀。细胞于 37 $^{\circ}$ C、5% 的 CO₂ 培养箱内孵育 5 h 后换成 10% 小牛血清 PRMI 1640 完全培养基。24 h 后细胞以 1 : 10 比例传代,48 h 后加 400 μ g/mL G418 筛选阳性细胞,3 天换一次筛选培养液,培养 2 周,可见阳性细胞克隆。挑取单克隆细胞,培养后进行鉴定。

1.7 RT-PCR 检测 分别提取转染 pcDNA 3.1/Chk1、pcDNA3.1/Chk2 与 pcDNA 3.1 质粒的 BGC823 细胞和 BGC823 细胞总 RNA,进行 RT-PCR,具体反应体系和条件同上,琼脂糖凝胶电泳观

察结果。

1.8 Western Blot 检测 收集转染 pcDNA 3.1/Chk1、pcDNA3.1/Chk2 与 pcDNA 3.1 质粒的 BGC823 细胞,冰 PBS 洗 2 次,以 1×10^6 个细胞浓度加入细胞裂解液 75 μ L,冰上裂解 20 min,采用 BCA 蛋白定量测定法检测蛋白浓度,每一样品取 20 μ g,以 5 : 1 倍的体积与 5 $\times$ SDS 加样缓冲液混合,100 $^{\circ}$ C 加热 5 min,样品经 10%SDS-PAGE 胶电泳分离,然后转至硝酸纤维素膜上,5%的脱脂牛奶室温封闭 3 h,TBST 洗膜 3 次,一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,加入 1 : 2 000 二抗室温孵育 30~60 min,ECL 发光显影,扫描仪测定印迹区带的光密度值。

1.9 流式细胞仪测定 收集转染 pcDNA 3.1/Chk1、pcDNA3.1/Chk2 与 pcDNA 3.1 的 BGC823 细胞于 50 mL 培养瓶中,1 000 r/min 离心 5 min,弃去培养液,5 mL PBS 洗 2 次,离心,去 PBS,加入 70% 乙醇固定 24 h,流式细胞仪分析 DNA 含量,检测群体细胞中 G1、S、G2/M 期细胞百分率。

1.10 统计学处理 结果采用 SPSS12.0 统计软件包进行数据处理,数据比较采用 *t* 检验,率的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 真核表达载体 pcDNA3.1/Chk1 与 pcDNA3.1/Chk2 的构建 提取约 5×10^6 人胃癌 BGC823 细胞的总 RNA,图 1-A 清晰可见 28S 和 18S 两条,可用于下一步实验。以 cDNA 为模板,PCR 扩增,1%琼脂糖电泳鉴定结果显示,已分别扩增分子量为 1400 bp 和 1600 bp 左右的 PCR 产物带,与测序推测值 1431 bp 和 1632 bp 相符(图 1-B)。对可能有 Chk1 和 Chk2 插入质粒的 DH5 α 受体菌行 PCR 扩增,电泳可见约 1.4 kb 和 1.6 kb 两条带,与预计大小一致。Chk1 有 3 个阳性菌落,Chk2 有 8 个阳性菌落(图 1-C)。取菌落 PCR 鉴定为阳性的克隆转化菌,提取重组质粒 pcDNA3.1/Chk1 与 pcDNA3.1/Chk2,用 BamHI、HindIII 双酶切,分别得到约 6900 bp 与 1400 bp、6900 bp 与 1600 bp 的两条带,结果与序列推测值一致(图 1-D)。序列经 NCBI Blast 分析,Chk1 序列同源为 100%,编码氨基酸同源为 100%;Chk2 序列同源为 99%,编码氨基酸同源为 100%(图 1-E)。

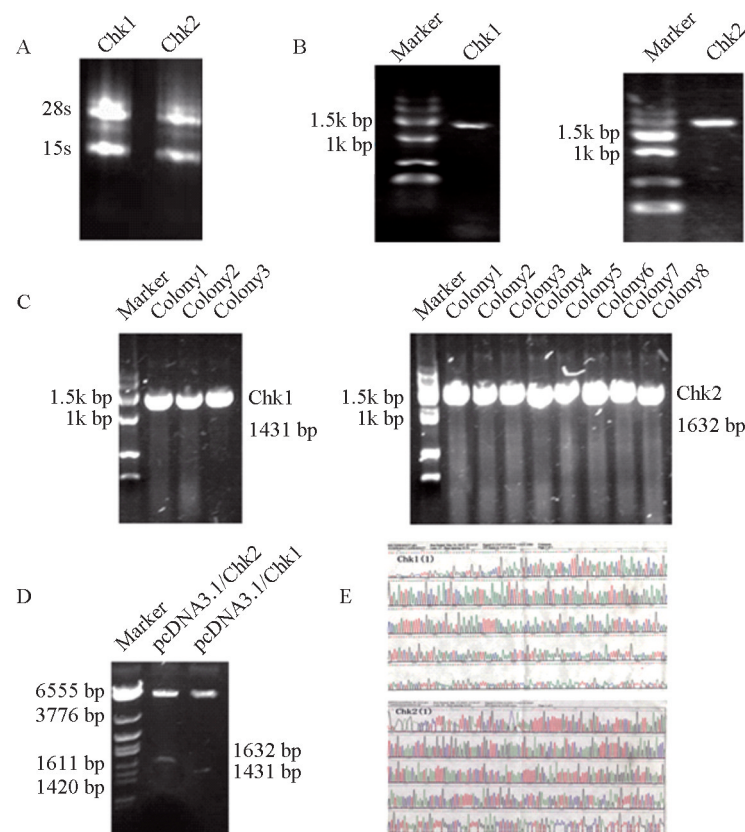


图 1 真核表达载体 pcDNA3.1/Chk1 与 pcDNA3.1/Chk2 的构建

A:人胃癌 BGC823 细胞总 RNA 电泳图谱;B:pcDNA3.1/Chk1 与 pcDNA3.1/Chk2 RCR 扩增;C:转染 pcDNA3.1/Chk1 与 pcDNA3.1/Chk2 阳性克隆菌落;D:重组质粒双酶切鉴定;E:重组质粒测序结果。

2.2 建立高表达 Chk1/2 基因人胃癌 BGC823 细胞

2.2.1 BGC823 细胞的稳定转染 分别将空载体 pcDNA3.1、pcDNA3.1/chk1 与 pcDNA3.1/chk2 转染 BGC823 细胞,经 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 筛选 2 周后获得阳性克隆(图 2-A),随机挑取阳性克隆作进一步鉴定。

2.2.2 Chk1 和 Chk2 基因在 BGC823 细胞中的表达 提取 BGC823 细胞和转染细胞总 RNA,1.0% 琼脂

糖凝胶电泳显示,28S 和 18S 条带非常浓而亮(图 2-B)。RT-PCR 与 Western Blot 显示,空载体组 Chk1 和 Chk2 mRNA 与蛋白表达水平较对照组差异无显著性($P>0.05$),而转 Chk1 组和转 Chk2 组 Chk1 和 Chk2 mRNA 与蛋白表达分别较对照组与空载体组明显增加($P<0.05$)(图 2-C,图 2-D)。表明转染成功。

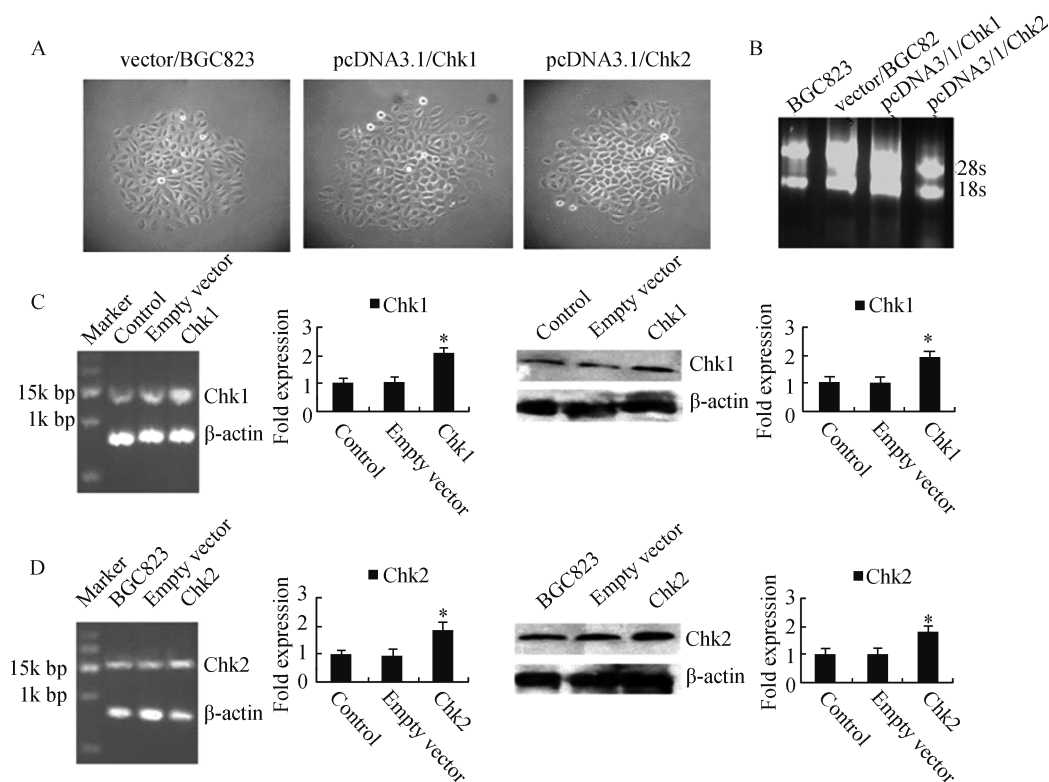


图 2 建立高表达 Chk1/2 基因人胃癌 BGC823 细胞

A:G418 筛选 2 周后阳性克隆(40 $\times$);B:BGC823 细胞和转染细胞总 RNA 电泳图谱;
C:Chk1 转染细胞 mRNA 和蛋白表达;D:Chk2 转染细胞 mRNA 和蛋白表达。

2.2.3 流式细胞术检测 Chk1 和 Chk2 高表达对 BGC823 细胞周期的影响 流式细胞术检测显示, Chk1 转染组 G₂/M 细胞 32.40%较对照组 14.27%与空载体组 14.97%明显增加($P<0.05$)(表 1),而 Chk2 转染组 G₂/M 细胞 19.37%较对照组 14.17%与空载体组 17.63%无明显差异($P>0.05$)(表 2)。表明调控 BGC823 细胞 G₂/M 转换可能主要是 Chk1。

表 1 Chk1 高表达对 BGC823 细胞周期的影响(%)

组别	G ₁	S	G ₂ /M
BGC823 组	46.93 $\pm$ 9.58	38.8 $\pm$ 9.14	14.27 $\pm$ 1.07
空载体组	40.83 $\pm$ 1.44	44.2 $\pm$ 1.74	14.97 $\pm$ 1.21
转 Chk1 组	34.27 $\pm$ 6.12	33.33 $\pm$ 4.47	32.4 $\pm$ 1.85 ^a

与空载体组和 BGC823 组比较, ^a $P<0.05$

表 2 Chk2 高表达对 BGC823 细胞周期的影响(%)

组别	G ₁	S	G ₂ /M
BGC823	50.67 $\pm$ 7.30	35.4 $\pm$ 7.15	14.17 $\pm$ 1.74
空载体组	37.03 $\pm$ 4.30	45.37 $\pm$ 3.99	17.63 $\pm$ 2.49
转 Chk2 组	50.4 $\pm$ 7.63	30.2 $\pm$ 7.57	19.37 $\pm$ 0.67

3 讨 论

DNA 损伤信号的完整功能对保持基因组完整性和预防肿瘤发展至关重要。在对 DNA 损伤的反应(DDR)中,检查点可以被激活以阻止细胞周期的进展,直到损伤修复。在 DNA 损伤信号网络中,监视这些基因组途径的中心是 Chk1。它能促进细胞

周期阻滞与 DNA 损伤修复,调节转录和诱导细胞凋亡。Chk1 直接磷酸化 CDC25 磷酸酶、P53、RAD51、FANCE 和 E2F 等多个底物,调节其活性、稳定性或亚细胞定位。Chk1 的特征底物有助于细胞周期的阻滞和 DNA 修复,以应对 DNA 损伤^[5-6]。

目前主要使用的抗癌疗法,要么直接破坏 DNA,要么破坏细胞分裂。这些攻击会触发细胞周期检查点的激活,保护细胞实现正确完成细胞周期阶段的机制,修复损伤,或最终在无法修复的情况下自杀^[11]。Chk1 是在 DDR 过程中细胞周期检查点的保守的蛋白激酶,激活对 DDR 或停止复制的蛋白激酶 ATR 是 Chk1 的唯一调控因子。Chk1 的时空调节在 DDR 与正常细胞周期进程中很重要。Chk1 通过基因毒性应激来调节细胞周期检查点,防止 DNA 损伤细胞进入有丝分裂,并协调 DNA 修复的各个方面^[12]。近年来,运用细胞周期检查点作为肿瘤治疗的靶点,已经成为研究的热点,许多针对 Chk1 的强力抑制剂已经发展成为抗癌药物,其中一些抑制剂正在临床试验中^[11-13]。

研究表明,pectenotoxin-2 可通过增加 ATM 和 Chk1/2 磷酸化介导 cdc25C 磷酸化,下调 cyclin B1 与 cdc2 表达,明显抑制乳腺癌细胞增殖和阻滞 G2/M^[14]。小分子 Chk1 抑制剂 LY2603618 可增加 DNA 损伤介导 Chk1 磷酸化,阻滞肺癌细胞于 G2/M^[15]。NSC746364 通过激活 ATR/Chk1 通路、下调 cyclin B1 和激活 caspase-3 诱导人肺癌细胞 G2/M 期阻滞与凋亡^[16]。近年来,发现不少中药提取物可上调或活化 Chk1 诱导 G2/M 阻滞,如 gossypin 可活化 Chk1 磷酸化 Cdc25C 诱导恶性胶质瘤 U251 细胞 G2/M 阻滞^[17]。斑蝥素上调 Chk1 引起结直肠癌 colo 205 细胞 G2/M 阻滞^[18]。鬼臼素的系列衍生物可激活肿瘤细胞 ATM 与 Chk1,导致有效的 DNA 损伤^[19]。Scoulerine 通过增加 Chk1、Chk2 和 H3 磷酸化诱导肿瘤细胞 G2/M 期阻滞与抑制增殖^[20]。

我们已经证实,DADS 可通过磷酸化 ATR,激活 Chk1 与下调 CDC25C 和 cyclin B1,阻滞胃癌 MGC803 细胞于 G2/M^[21]。沉默 Chk1 可消除 DADS 诱导 BGC823 细胞 G2/M 期阻滞,但沉默 Chk2 作用不明显^[6]。然而,阐明 DADS 阻滞人胃癌细胞 G2/M 阻滞的作用靶点是 Chk1 或 Chk2,必须建立高表达 Chk1/Chk2 胃癌细胞。本研究采用基因重组技术构建真核表达载体 pcDNA3.1/Chk1 与 pcDNA3.1/Chk2,并转染 BGC823 细胞,成功建立高表达 Chk1/Chk2 胃癌 BGC823 细胞,并且,Chk1 高表达,而不是 Chk2,可阻滞 BGC823 细胞于 G2/M。但是,确定

DADS 阻滞人胃癌细胞 G2/M 阻滞的靶点是 Chk1 尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] TORRE LA, BRAY F, SIEGEL RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] ORDITURA M, GALIZIA G, SFORZA V, et al. Treatment of gastric cancer [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(7): 1635-49.
- [3] CHEN W, ZHENG R, BAADE PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-32.
- [4] BUCHER N, BRITTEN CD. G2 checkpoint abrogation and checkpoint kinase-1 targeting in the treatment of cancer [J]. Br J Cancer, 2008, 98(3): 523-8.
- [5] YUAN R, VOS HR, VAN ES RM, et al. Chk1 and 14-3-3 proteins inhibit atypical E2Fs to prevent a permanent cell cycle arrest [J]. EMBO J, 2018, 37(5): e97877.
- [6] ZHANG Y, HUNTER T. Roles of Chk1 in cell biology and cancer therapy [J]. Int J Cancer, 2014, 134(5): 1013-23.
- [7] YUAN JP, WANG GH, LING H, et al. Diallyl disulfide-induced G2/M arrest of human gastric cancer MGC803 cells involves activation of p38 MAP kinase pathways [J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(18): 2731-4.
- [8] LING H, ZHANG LY, SU Q, et al. Erk is involved in the differentiation induced by diallyl disulfide in the human gastric cancer cell line MGC803 [J]. Cell Mol Biol Lett, 2006, 11(3): 408-23.
- [9] SU B, XIANG SL, SU J, et al. Diallyl disulfide increased histone acetylation and p21WAF1 expression in human gastric cancer cells in vivo and in vitro [J]. Biochem & Pharmacol, 2012, 1(7): 1-10.
- [10] LING H, LU LF, WEN L, et al. Interference of Chk1/2 by RNA regulates G2/M arrest and expressions of cell cycle related proteins induced by diallyl disulfide [J]. Prog Biochem Biophys, 2010, 37(2): 184-9.
- [11] VISCONTI R, DELLA MONICA R, GRIECO D. Cell cycle checkpoint in cancer: a therapeutically targetable double-edged sword [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2016, 35(1): 153.
- [12] GOTO H, KASAHARA K, INAGAKI M. Novel insights into Chk1 regulation by phosphorylation [J]. Cell Struct Funct, 2015, 40(1): 43-50.
- [13] MCNEELY S, BECKMANN R, BENICE LIN AK. CHEK again: revisiting the development of CHK1 inhibitors for cancer therapy [J]. Pharmacol Ther, 2014, 142(1): 1-10.
- [14] MOON DO, KIM MO, NAM TJ, et al. Pectenotoxin-2 induces G2/M phase cell cycle arrest in human breast cancer cells via ATM and Chk1/2-mediated phosphorylation of cdc25C [J]. Oncol Rep, 2010, 24(1): 271-6.
- [15] WANG FZ, FEI HR, CUI YJ, et al. The checkpoint 1 kinase inhibitor LY2603618 induces cell cycle arrest, DNA damage response and autophagy in cancer cells [J]. Apoptosis, 2014, 19(9): 1389-98.

(下转第 477 页)

参考文献:

- [1] MARKUS H. Stroke: causes and clinical features[J]. *Medicine*, 2012,40(9):484-9.
- [2] DOYLE K P, BUCKWALTER M S. Does B lymphocyte-mediated autoimmunity contribute to post-stroke dementia? [J]. *Brain Behav Immun*, 2017,64:1-8.
- [3] TOMARI S, TANAKA T, IHARA M, et al. Risk factors for post-stroke seizure recurrence after the first episode[J]. *Seizure*, 2017, 52:22-6.
- [4] JORGENSEN T S, WIUM-ANDERSEN I K, WIUM-ANDERSEN M K, et al. Incidence of depression after stroke, and associated risk factors and mortality outcomes, in a large cohort of danish patients[J]. *JAMA Psychiatry*, 2016,73(10):1032-40.
- [5] LI Z Y, WU Y F, XU X C, et al. Autophagy as a double-edged sword in pulmonary epithelial injury: a review and perspective[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2017,313(2):L207-17.
- [6] 石瑶, 郭倩, 周也涵, 等. 白藜芦醇通过 Sirtuins 1 通路促进自噬减轻大鼠脑缺血/再灌注损伤[J]. *基础医学与临床*, 2015, 35(4):496-501.
- [7] 耿武军, 陈成宇, 张民远, 等. Wnt/ β -catenin 信号通路通过下调自噬改善大鼠脑缺血再灌注损伤[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2018,26(3):222-6.
- [8] XIE C J, GU A P, CAI J, et al. Curcumin protects neural cells against ischemic injury in N2a cells and mouse brain with ischemic stroke[J]. *Brain and Behavior*, 2018,8(2):e00921.
- [9] SUN H, ZHONG D, WANG C, et al. MiR-298 exacerbates ischemia/reperfusion injury following ischemic stroke by targeting act1[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018,48(2):528-39.
- [10] WANG P, LIANG J, LI Y, et al. Down-regulation of miRNA-30a alleviates cerebral ischemic injury through enhancing beclin 1-mediated autophagy[J]. *Neurochem Res*, 2014,39(7):1279-91.
- [11] YU S, ZHAO J, WANG X, et al. 4-Hydroxybenzyl alcohol confers neuroprotection through up-regulation of antioxidant protein expression[J]. *Neurochem Res*, 2013,38(7):1501-16.
- [12] DENTON D, XU T, KUMAR S. Autophagy as a pro-death pathway[J]. *Immunol Cell Biol*, 2015,93(1):35-42.
- [13] GONG J, MUNOZ A R, CHAN D, et al. STAT3 down regulates LC3 to inhibit autophagy and pancreatic cancer cell growth[J]. *Oncotarget*, 2014,5(9):2529-41.
- [14] BUDINI M, BURATTI E, MORSELLI E, et al. Autophagy and its impact on neurodegenerative diseases; new roles for TDP-43 and C9orf72[J]. *Front Mol Neurosci*, 2017,10:170.
- [15] ZHANG Z, MIAH M, CULBRETH M, et al. Autophagy in neurodegenerative diseases and metal neurotoxicity[J]. *Neurochem Res*, 2016,41(1-2):409-22.
- [16] MA S, WANG Y, CHEN Y, et al. The role of the autophagy in myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015,1852(2):271-6.
- [17] KUWANO K, ARAYA J, HARA H, et al. Cellular senescence and autophagy in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) [J]. *Respir Investig*, 2016,54(6):397-406.
- [18] 廖梓豆, 陈慧. 丁苯酞在大鼠脑缺血—再灌注损伤中的神经保护机制的研究[J]. *中南医学科学杂志*, 2016,44(3):275-8.
- [19] DAFRE A L, SCHMITZ A E, MAHER P. Methylglyoxal-induced AMPK activation leads to autophagic degradation of thioredoxin 1 and glyoxalase 2 in HT22 nerve cells[J]. *Free Radic Biol Med*, 2017,108:270-9.
- [20] CHHABRA R, GRABRUCKER A M, VERATTI P, et al. Characterization of lysosome-destabilizing DOPE/PLGA nanoparticles designed for cytoplasmic drug release[J]. *Int J Pharm*, 2014,471(1-2):349-57.
- [21] HOUCK S A, REN H Y, MADDEN V J, et al. Quality control autophagy degrades soluble ERAD-resistant conformers of the misfolded membrane protein GnRHR[J]. *Mol Cell*, 2014,54(1):166-79.
- [22] BERTH S, CAICEDO H H, SARMA T, et al. Internalization and axonal transport of the HIV glycoprotein gp120[J]. *ASN Neuro*, 2015,7(1).
- [23] TRAN A T, RAMALINGA M, KEDIR H, et al. Autophagy inhibitor 3-methyladenine potentiates apoptosis induced by dietary tocotrienols in breast cancer cells[J]. *Eur J Nutr*, 2015,54(2):265-72.
- [24] SHENG Y, SUN B, GUO W T, et al. 3-Methyladenine induces cell death and its interaction with chemotherapeutic drugs is independent of autophagy[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 432(1):5-9.

(本文编辑:蒋湘莲)

(上接第 472 页)

- [16] CHUNG YL, PAN CH, LIOU WH, et al. NSC746364, a G-quadruplex-stabilizing agent, suppresses cell growth of A549 human lung cancer cells through activation of the ATR/Chk1-dependent pathway [J]. *J Pharmacol Sci*, 2014, 124(1):7-17.
- [17] SHI L, CHEN J, WANG YY, et al. Gossypin induces G2/M arrest in human malignant glioma U251 cells by the activation of Chk1/Cdc25C pathway [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2012, 32(2):289-96.
- [18] HUANG WW, KO SW, TSAI HY, et al. Cantharidin induces G2/M phase arrest and apoptosis in human colorectal cancer colo 205 cells through inhibition of CDK1 activity and caspase-dependent signaling pathways [J]. *Int J Oncol*, 2011, 38(4):1067-73.
- [19] KAMAL A, SURESH P, RAMAIAH MJ, et al. Synthesis and biological evaluation of 4 β -sulphonamido and 4 β -(4'-sulphonamido)benzamide] podophyllotoxins as DNA topoisomerase-II α and apoptosis inducing agents [J]. *Bioorg Med Chem*, 2012, 20(6):2054-66.
- [20] HABARTOVA K, HAVELEK R, SEIFRTOVA M, et al. Scoulerine affects microtubule structure, inhibits proliferation, arrests cell cycle and thus culminates in the apoptotic death of cancer cells [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):4829.
- [21] LING H, LU LF, HE J, et al. Diallyl disulfide selectively causes Checkpoint kinase-1 mediated G2/M arrest in human MGC803 gastric cancer cell line [J]. *Oncol Rep*, 2014, 32(5):2274-82.

(本文编辑:蒋湘莲)