

辛伐他汀通过内质网应激途径诱导 K562 细胞凋亡

胥国强¹, 黄文芳^{2*}, 刘 华², 杨永长², 刘 文¹

(1. 重庆医科大学 检验系, 重庆 400016; 2. 四川省人民医院 检验科, 四川 成都 610072)

摘要: 探讨内质网应激在辛伐他汀诱导 K562 细胞凋亡中的作用。采用荧光显微镜观察凋亡细胞的形态变化, AnnexinV-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率, 激光扫描共聚焦显微镜检测细胞内 Ca^{2+} 浓度, RT-PCR 检测葡萄糖调节蛋白 78 (glucose regulated protein 78, GRP78)、钙蛋白酶 (calpain) 基因 mRNA 表达水平, Western blotting 检测 GRP78、calpain、caspase-3, -6, -7, -9, -12 蛋白水平。结果显示, 10、20、30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 辛伐他汀 (simvastatin, Sim) 作用 K562 细胞 72 h 后, 细胞出现典型的凋亡形态, 凋亡率分别为 12.41%、19.08% 和 23.41%; 细胞内 Ca^{2+} 浓度增加, 荧光强度分别为 43、54 和 64; GRP78、calpain 基因 mRNA 表达上调; calpain、caspase-3, -6, -7, -9, -12 蛋白剪切活化、GRP78 蛋白表达增强。以上结果表明, 内质网作为细胞凋亡的重要途径参与了辛伐他汀诱导 K562 细胞的凋亡。辛伐他汀将可能被用于临床治疗白血病。

关键词: 辛伐他汀; 内质网; 应激; K562 细胞; 凋亡

中图分类号: R963 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2008)04-0371-07

Simvastatin-induced apoptosis of K562 cells is mediated by endoplasmic reticulum stress

XU Guo-qiang¹, HUANG Wen-fang^{2*}, LIU Hua², YANG Yong-chang², LIU Wen¹

(1. Department of Laboratory Medicine of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;
2. Clinical Laboratory of Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China)

Abstract: To explore the apoptotic effect of simvastatin on K562 cells through endoplasmic reticulum stress, morphological change of apoptotic cells was observed by Hoechst33258 fluorescent staining under fluorescent microscope. Apoptosis rate of cells was determined with annexinV-FITC/PI double staining by flow cytometry; Intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) was measured by laser scanning confocal microscope (LSCM); The expression levels of glucose regulated protein 78 (GRP78) and calpain gene mRNA were determined by RT-PCR; The expression levels of caspase-3, -6, -7, -9, -12, calpain and GRP78 proteins were evaluated by Western blotting. In this study, K562 cells treated with simvastatin for 72 h exhibited typical morphological change of apoptosis cells. After 72 h exposed to 10, 20, 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ simvastatin, the apoptotic rates of K562 cells were 12.41%, 19.08% and 23.41%, respectively. Simvastatin induced the increase of $[Ca^{2+}]_i$ in K562 cells, fluorescent intensities were 43, 54, and 64, respectively. The expression levels of GRP78 and calpain gene mRNA were up-regulated. The cleavage and activation of caspase-3, -6, -7, -9, -12 and upregulation of GRP78 expression were determined by Western blotting. These findings suggest that endoplasmic reticulum is an important pathway of apoptosis in cells and participates simvastatin-induced apoptosis in K562 cells. It is implied that simvastatin may be suitable for clinical usage in the treatment of myeloma patients.

Key words: simvastatin; endoplasmic reticulum; stress; K562 cells; apoptosis

收稿日期: 2007-10-08.

基金项目: 四川省卫生厅基金资助项目(060119).

* 通讯作者 Tel: 13981752286, Fax: 86-28-87394056, E-mail: huangwf2002@21cn.com

目前,只有异基因骨髓移植是根治慢性髓细胞白血病(chronic myelogenous leukemia, CML)的有效手段。但是只有约 25% 的患者可以找到人类白细胞抗原(human leucocyte antigen, HLA)相合的骨髓供者,所以对 CML 的治疗仍然存在困难。他汀类药物是一类胆固醇合成抑制剂,广泛用于临床治疗高胆固醇血症。辛伐他汀(simvastatin, Sim)是他汀类药物的一种,研究表明 Sim 能抑制 K562 细胞增殖并诱导其凋亡,还能抑制并诱导 C6 神经胶质瘤细胞^[1]、小肺癌细胞^[2]、头颈鳞状癌细胞^[3]、乳腺癌细胞^[4]的凋亡,但其机制尚不完全明确。最近研究发现内质网作为新的凋亡途径参与细胞凋亡,它不同于经典的凋亡途径:死亡受体途径和线粒体途径^[5,6]。本研究以人白血病细胞 K562 为研究对象,用内质网应激诱导剂毒胡萝卜素(thapsigargin, TG)作为阳性对照^[7],初步探讨辛伐他汀诱导 K562 细胞发生凋亡是否与内质网应激有关,为白血病治疗提供一定的理论依据。

材料与方法

药物与试剂 K562 细胞为本室常规培养; Sim 购自中国药品生物制品检定所; RPMI 1640 培养基购自 GIBCO; 胎牛血清购自 GM; AnnexinV-FITC/PI 试剂盒、毒胡萝卜素、兔抗人 GRP78、caspase-12, -7, -6 多克隆抗体、鼠抗人 caspase-9 单克隆抗体均购自晶美生物工程有限公司; 鼠抗人 caspase-3 单克隆抗体、HRP 标记的第二抗体(山羊抗鼠和兔 IgG)购自 Santa Cruz; calpain、 β -actin 购自博士德公司; Hoechst 33258、Western blotting 常规试剂均为 Sigma 公司产品; Fluo-3/AM 购自 Anaspec。

细胞培养 K562 细胞于含 10% 胎牛血清、青霉素、链霉素各 $100 \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 RPMI 1640 培养液中, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱常规培养 72 h。实验分为阴性对照组、阳性对照组($1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TG)和实验组(加不同浓度的 Sim), 实验重复 3 次。

荧光显微镜观察 取对照组和实验组的 K562 细胞, 分别制备单涂片, 甲醇-冰乙酸(3:1)固定 5 min, PBS 洗 2 遍, 滴加细胞核染料 Hoechst 33258 ($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵箱染色 30 min, PBS 冲洗, 荧光显微镜下观察并拍照。

细胞凋亡率检测 采用 AnnexinV-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率。按照试剂盒说明进行: 10、20、30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Sim 和 $1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TG 作用 72 h 后, 收集对照组和实验组细胞, 用 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 预冷的 PBS

洗细胞 2 次, 结合缓冲液重新悬细胞 $250 \text{ } \mu\text{L}$, 调细胞数为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。取细胞悬液 $100 \text{ } \mu\text{L}$ 于 5 mL 流式管中, 加入 Annexin V/FITC $5 \text{ } \mu\text{L}$ 和 PI 溶液 $10 \text{ } \mu\text{L}$, 混匀后室温孵育 15 min, 加入 PBS $400 \text{ } \mu\text{L}$, 流式细胞仪分析。

细胞内 Ca^{2+} 浓度测定 取对数生长期细胞, 调整细胞数为 $1 \times 10^5/\text{mL}$, 加入浓度分别为 10、20、30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Sim 和 $1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TG, 培养 72 h, 收集实验组和对照组细胞, PBS 洗 2 次, 加入 Fluo-3/AM ($5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 30 min, PBS 洗 2 次后用 LSCM 扫描, 观察细胞内的荧光强度。

RT-PCR 检测 GRP78 和 calpain mRNA 表达 取对数生长期细胞, 调整细胞数为 $1 \times 10^5/\text{mL}$, 加入浓度分别为 10、20、30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Sim 和 $1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TG, 培养 72 h, 收集实验组和对照组细胞, Trizol 法提取总 RNA, 取 RNA $2 \text{ } \mu\text{g}$ 进行逆转录, 其操作步骤按照试剂盒说明书。将逆转录产物 cDNA 用不同引物进行 PCR 反应。GRP78 引物: 上游 5'-TAGCGTATGGTGCTGCTGTC-3', 下游 5'-TTTGTACAGGGTCTTTCACC-3', 变性温度 $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min, 退火温度 $57 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min, 延伸温度 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min, 30 个循环。Calpain 引物: 上游 5'-AGGATGAGACGAGGAGGAT-3', 下游 5'-TTTCAGAAAAGACCCGGATG-3', 变性温度 $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min, 退火温度 $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min, 延伸温度 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min, 30 个循环。GAPDH 引物: 上游 5'-GGCCTCCAAGGAGTAAGACC-3', 下游 5'-AGGGGTCTACATGGCAACTG-3', 变性温度 $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min, 退火温度 $57 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min, 延伸温度 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min, 30 个循环。扩增产物经 2.5% 琼脂糖凝胶电泳后, 用凝胶分析系统进行分析并照像。

Western blotting 检测 caspase-3, -6, -7, -9, -12, calpain, GRP78 蛋白水平 10、20、30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Sim 和 $1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TG 作用 K562 细胞 72 h 后, 收集实验组和对照组细胞, PBS 洗 2 次, 加入细胞裂解液 ($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris, $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 1% NP-40, 0.5% 去氧胆酸钠, 0.1% SDS, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PMSF), 充分裂解后, $10\ 000 \sim 14\ 000 \times g$ 离心 3~5 min, 收集上清液, 用考马斯亮蓝 G250 蛋白测定试剂盒检测蛋白质浓度。每个样品 ($25 \text{ } \mu\text{g}$) 与等体积的 2 倍上样 buffer 混匀, 煮沸 5 min, 12% SDS-PAGE 电泳分离后, 将蛋白质转移到 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉 (TBS, 0.1% Tween-20) 封闭 1 h 后, 与第一抗体 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜, 然后加入 HRP 标记的第二抗体, 孵育 1 h, ECL 化学发光剂显色发光, 暗室 X-ray 胶片显

影。

统计学分析 所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析统计,以 $P < 0.05$ 为有显著性统计意义, $P < 0.01$ 为有非常显著性统计意义。

结果

1 凋亡细胞形态观察

对照组和实验组 K562 细胞经 Hoechst 33258 染色后,在荧光显微镜下观察细胞形态,正常对照组大部分细胞核染色均匀,呈正常结构,而实验组均有不同程度的凋亡细胞,细胞变小,核染色质浓缩、聚集、边缘化,细胞核呈致密浓染,见图 1。

2 细胞凋亡率变化

AnnexinV-FTTC/PI 双染法检测显示,不同浓度 Sim 和 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TG 能诱导 K562 细胞凋亡,在一定范围内呈浓度依赖关系。 $10, 20, 30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Sim 和 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TG 作用 K562 细胞 72 h 后,凋亡率分别为 12.41%、19.08%、23.41% 和 26.52% ,

与对照组比较,差异有显著性统计学意义 ($P < 0.01$),见表 1、图 2。

3 辛伐他汀和毒胡萝卜素对 Ca^{2+} 浓度的影响

$10, 20, 30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Sim 和 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TG 作用 K562 细胞 72 h 后,细胞内荧光强度均有不同程度的升高,具有浓度依赖性。荧光强度代表了细胞内 Ca^{2+} 浓度,荧光越强, Ca^{2+} 浓度越高。与对照组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 2、图 3。

4 GRP78 和 calpain mRNA 表达水平

RT-PCR 结果显示, $10, 20, 30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Sim 和 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TG 作用 K562 细胞 72 h 后,对照组和实验组 K562 细胞 GRP78/GAPDH mRNA 比值分别为 $1.09 \pm 0.21, 1.32 \pm 0.23, 1.59 \pm 0.19, 1.77 \pm 0.22$ 和 2.4 ± 0.24 , calpain/GAPDH mRNA 比值分别为 $1.14 \pm 0.21, 1.38 \pm 0.20, 1.52 \pm 0.23, 1.58 \pm 0.25$ 和 1.85 ± 0.24 。实验组与对照组比较,GRP78 和 calpain 基因 mRNA 表达水平均上调, $P < 0.01$, 见图 4、5。

Table 1 Effects of simvastatin and thapsigargin on apoptosis rate in K562 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Group	72 h Apoptosis rate/%
Control	4.2 ± 0.19
Sim $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$12.41 \pm 0.32^{**}$
20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$19.08 \pm 0.26^{**}$
30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$23.41 \pm 0.36^{**}$
TG $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$26.52 \pm 0.41^{**}$

** $P < 0.01$ vs control

Table 2 Effects of simvastatin and thapsigargin on intracellular $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in K562 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Group	Fluorescent intensity
Control	36 ± 2.7
Sim $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$43 \pm 2.9^{**}$
20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$54 \pm 2.7^{**}$
30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$64 \pm 2.6^{**}$
TG $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$73 \pm 2.8^{**}$

** $P < 0.01$ vs control

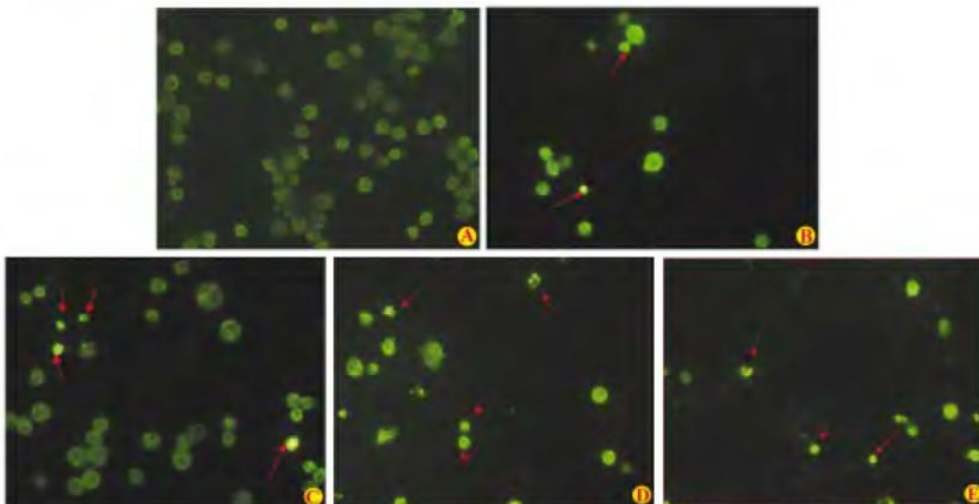


Figure 1 Morphological changes of apoptosis cells (200 ×). A: Control; B: $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ simvastatin (Sim); C: $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Sim; D: $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Sim; E: $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ thapsigargin (TG)

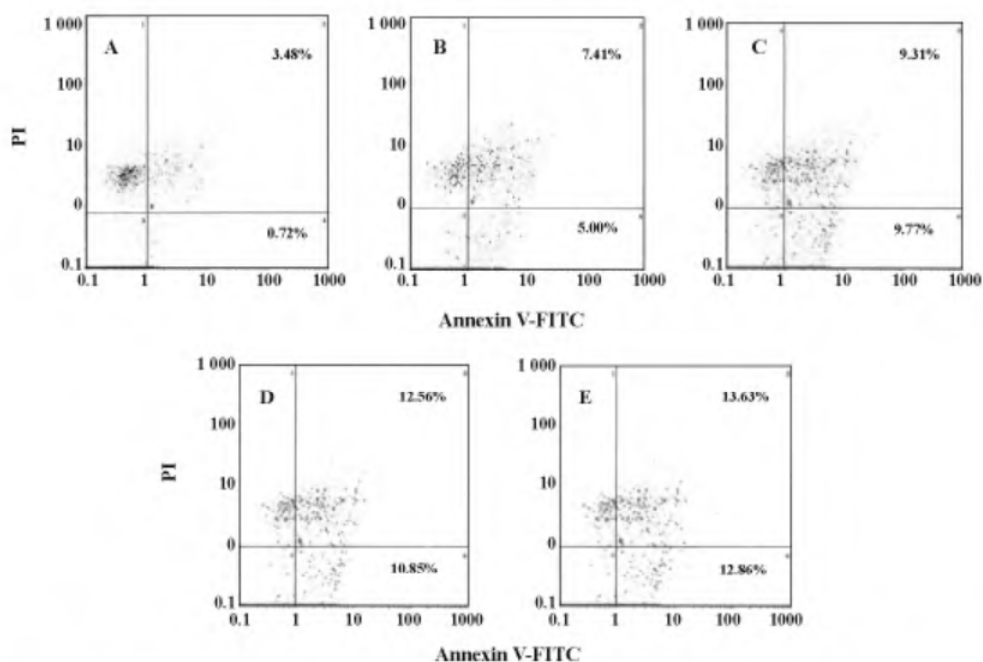


Figure 2 Apoptosis of K562 cells induced with various concentrations of simvastatin and thapsigargin for 72 h. A: Control; B: 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Sim; C: 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Sim; D: 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Sim; E: 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TG

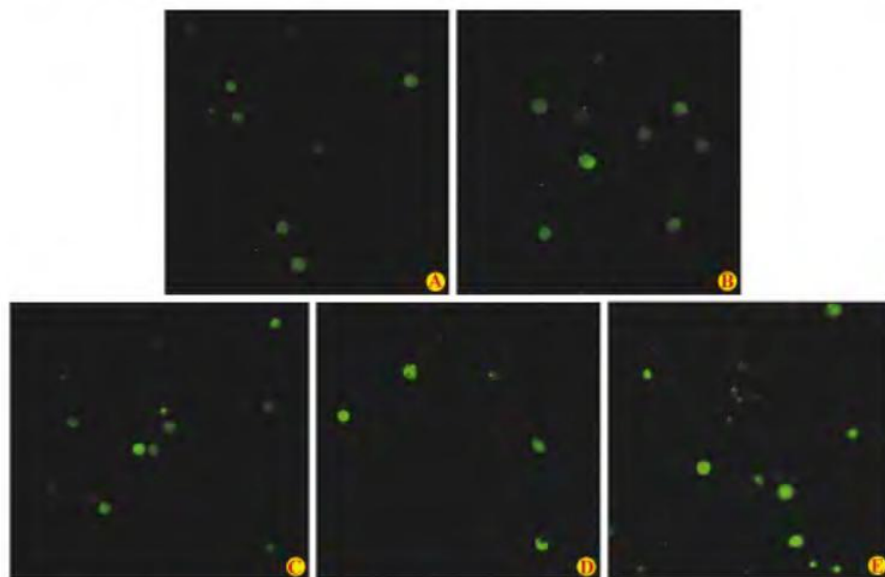


Figure 3 Confocal Laser Scanning images of Flou-3/AM fluorescence in K562 cells (200 \times). A: Control; B: 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Sim; C: 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Sim; D: 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Sim; E: 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TG

5 Caspase-3, -6, -7, -9, -12, GRP78, calpain 蛋白水平变化

Western blotting 检测结果显示, K562 细胞经 10、20、30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Sim 和 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TG 作用

72 h 后, GRP78 表达明显增加, 而 calpain, caspase-3, -6, -7, -9, -12 的蛋白水平均出现不同程度的下降, 表明它们均发生了剪切活化(图 6)。

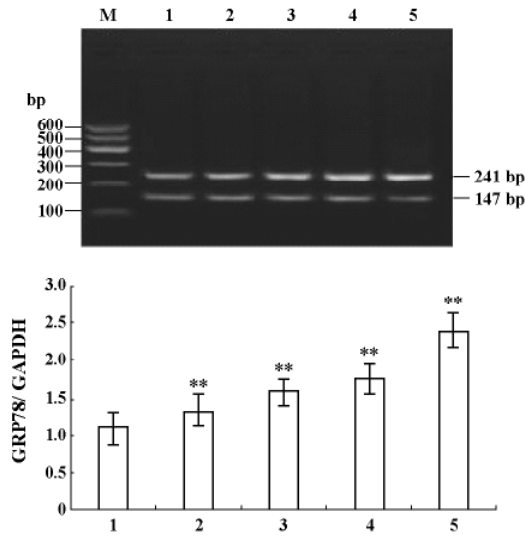


Figure 4 Effects of simvastatin and thapsigargin on GRP78 gene mRNA expression. M; Marker. Lane 1; Control group; Lane 2: 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Sim; Lane 3: 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Sim; Lane 4: 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Sim; Lane 5: 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TG. $n=3$, ** $P < 0.01$ vs control

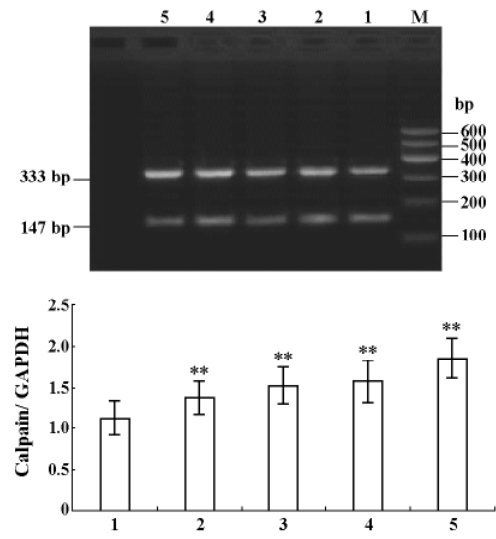


Figure 5 Effects of simvastatin and thapsigargin on calpain gene mRNA expression. M; Marker. Lane 1; Control group; Lane 2: 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Sim; Lane 3: 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Sim; Lane 4: 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Sim; Lane 5: 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TG. $n=3$, ** $P < 0.01$ vs control

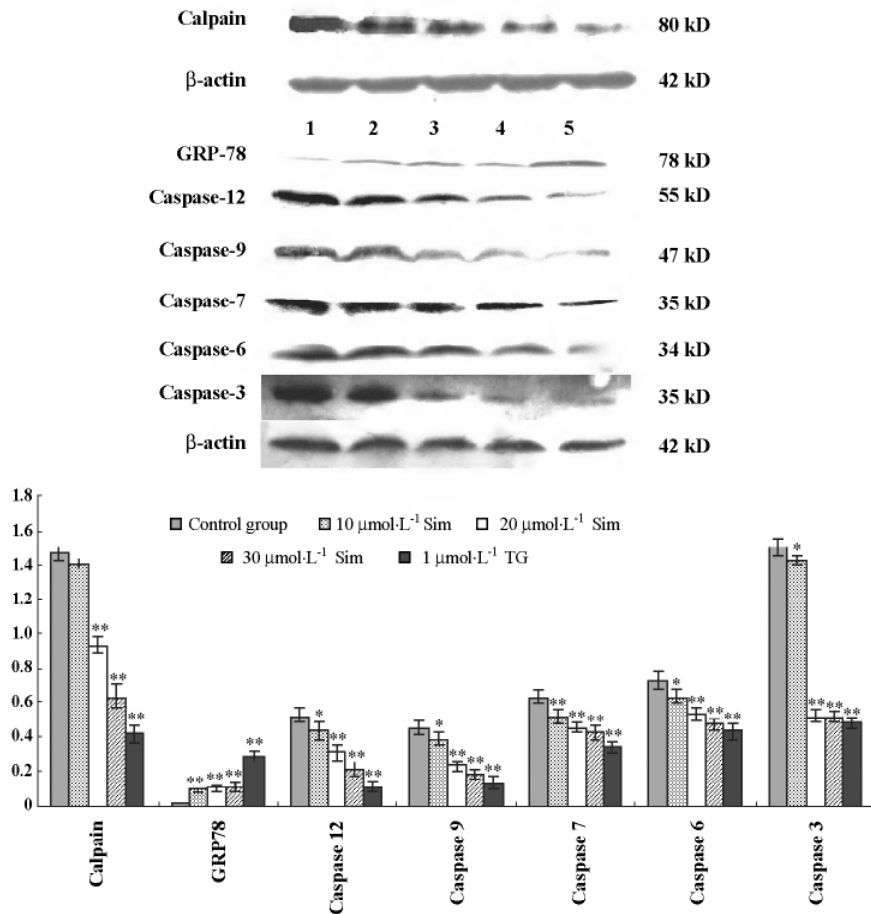


Figure 6 Cleavage and activation of calpain, caspase-3, -6, -7, -9, -12. Upregulation of GRP78 expression induced by simvastatin and thapsigargin in K562 cells. $n=3$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control

讨论

Sim 是 HMG-COA 还原酶抑制剂, 广泛用于高胆固醇血症的治疗。研究发现, Sim 能诱导多种肿瘤细胞凋亡, 能选择性地抑制 CML 细胞增殖并诱导其凋亡, 但机制尚不完全清楚。前期实验 Sim 作用 K562 细胞后, 基因芯片结果显示, GRP78 mRNA 水平明显上调(数据未显示), 而 GRP78 是定位于内质网中的一种分子伴侣蛋白, 是内质网应激反应标志分子之一, 因此 Sim 可能通过内质网应激反应途径诱导 K562 细胞凋亡。

内质网应激反应性细胞凋亡是一种不同于受体介导或线粒体介导的新细胞凋亡途径。Caspase-12 存在于内质网膜上^[6], 作为凋亡起始因子发挥了关键作用。细胞经 TG 处理引起内质网应激反应诱导细胞凋亡时, 内质网中活性 caspase-12 和 GRP78 表达增加, 并启动 caspase 级联反应及 caspase-9, -3 的剪切活化^[8,9], 而 caspase-12 缺陷小鼠能抵抗内质网应激诱导的凋亡^[6]。有研究显示^[10,11] 内质网 Ca^{2+} 失衡诱导应激反应时, 激活 calpain, 活化的 calpain 切割内质网膜上的 caspase-12, 产生 caspase-12 活性片段, 将其导入细胞, 细胞出现凋亡。Tan 等^[12] 研究发现, calpain 基因缺失的胚胎纤维母细胞能抵抗内质网应激诱导的凋亡, 提示 calpain 与 caspase-12 的直接活化有关。内质网应激反应时, 胞质中的 caspase-7 自身活化, 并迁移到内质网膜上切割 caspase-12, 使 caspase-12 活化^[13]。但 Xie 等^[14] 研究发现, caspase-12 的活化与 caspase-7 及 caspase-3 的进程一致, 认为 caspase-12 活化的主要机制不是 caspase-7 的活化, 而是与细胞 Ca^{2+} 失衡有关。TG 是一种内质网膜 Ca^{2+} -ATP 酶抑制剂, 作为内质网应激诱导剂, 作用细胞后, 导致内质网腔 Ca^{2+} 浓度降低, 胞浆 Ca^{2+} 浓度升高, 从而引起内质网应激反应诱导细胞凋亡。因此本实验以 TG 为阳性对照, 初步探讨 Sim 诱导 K562 细胞凋亡的机制。

研究表明, Sim 作用 K562 细胞后, 能诱导细胞凋亡。同时观察到 GRP78 mRNA 和 GRP78 蛋白水平上调, 与基因芯片结果一致。10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Sim 能诱导 GRP78 蛋白表达增高近 9 倍, 说明 Sim 能引起 K562 细胞内质网应激反应, 但随着 Sim 浓度增加, GRP78 蛋白并未增加。不同浓度 Sim 作用 K562 细胞 72 h 后, 细胞内 Ca^{2+} 浓度随 Sim 浓度增加而增加, 具有浓度依赖性。 Ca^{2+} 浓度增加可能与内质网内 Ca^{2+} 释放有关。细胞内 Ca^{2+} 浓度增加导致 calpain mRNA 水平上调及其蛋白的裂解、活化。

Caspase-3, -6, -7, -9, -12 蛋白水平随 Sim 浓度增加而下降, 具有浓度依赖性。在 Sim 诱导 K562 细胞内质网应激反应性凋亡过程中, caspase 蛋白发生剪切、活化, 并在此凋亡途径中发挥重要作用。研究发现, 虽然 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Sim 可引起细胞内 Ca^{2+} 浓度增加但并没有导致 calpain 蛋白裂解、活化, 这可能与 calpain 蛋白裂解、活化需要达到一定 Ca^{2+} 浓度有关。10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Sim 处理 K562 细胞后, 引起 caspase-12 蛋白剪切、活化, 而其上游的 calpain 蛋白并没有裂解、活化, 提示 caspase-12 蛋白剪切、活化可能存在其他途径。

综上所述, Sim 可能通过内质网应激途径诱导 K562 细胞凋亡, 即内质网 Ca^{2+} 失衡, 引起细胞内 Ca^{2+} 增高激活 calpain, 活化的 calpain 进一步剪切 caspase-12, caspase-12 活化后, 引起下游 caspase-9, -6, -3 激活, 最终导致细胞凋亡。但在内质网凋亡途径中, caspase-7 是否参与活化 caspase-12 及其 Sim 诱导 K562 细胞凋亡是否还存在其他途径, 尚需进一步研究。

References

- [1] Koyuturk M, Ersoz M, Altioek N. Simvastatin induces proliferation inhibition and apoptosis in C6 glioma cells via c-jun N-terminal kinase [J]. *Neurosci Lett*, 2004, 370:212-217.
- [2] Khanzada UK, Pardo OE, Meier C, et al. Potent inhibition of small-cell lung cancer cell growth by simvastatin reveals selective functions of Ras isoforms in growth factor signaling [J]. *Oncogene*, 2006, 25:877-887.
- [3] Takeda I, Maruya S, Shirasaki T, et al. Simvastatin inactivates beta1-integrin and extracellular signal-related kinase signaling and inhibits cell proliferation in head and neck squamous cell carcinoma cells [J]. *Cancer Sci*, 2007, 98:890-899.
- [4] Koyuturk M, Ersoz M, Altioek N. Simvastatin induces apoptosis in human breast cancer cells: p53 and estrogen receptor independent pathway requiring signalling through JNK [J]. *Cancer Lett*, 2007, 250:220-228.
- [5] Mehmet H. Caspases find a new place to hide [J]. *Nature*, 2000, 403:29-30.
- [6] Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta [J]. *Nature*, 2000, 403:98-110.
- [7] Nawrocki ST, Carew JS, Dunner K, et al. Bortezomib inhibits PKR-like endoplasmic reticulum (ER) kinase

- and induces apoptosis *via* ER stress in human pancreatic cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2005, 65:11510-11519.
- [8] Siman R, Flood DG, Thinakaran G, et al. Endoplasmic reticulum stress-induced cysteine protease activation in cortical neurons; effect of an Alzheimer's disease-linked presenilin-1 knock-in mutation [J]. *Biol Chem*, 2001, 276:44736-44743.
- [9] Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, et al. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis [J]. *Biol Chem*, 2002, 277:34287-34294.
- [10] Nakagawa T, Yuan J. Cross-talk between two cysteine protease families: activation of caspase-12 by calpain in apoptosis [J]. *Cell Biol*, 2000, 150:887-894.
- [11] Mandic A, Hansson J, Linder S, et al. Cisplatin induces ER stress and nucleus-independent apoptotic signaling [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278:9100-9106.
- [12] Tan Y, Dourdin N, Wu C, et al. Ubiquitous calpains promote caspase-12 and JNK activation during endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281:16016-16024.
- [13] Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: mechanism of caspase activation [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276:33869-33874.
- [14] Xie Q, Khaoustov VI, Chung CC, et al. Effect of tauroursodeoxycholic acid on ER stress-induced caspase-12 activation [J]. *Hepatology*, 2002, 36:592-601.

中华中医药学会第九届中药鉴定学术研讨会征文通知

中华中医药学会中药鉴定分会定于 2008 年 7 月下旬在浙江省建德市(千岛湖)召开“中华中医药学会第九届中药鉴定学术研讨会”,会议由第二军医大学药学院与浙江省建德市人民政府共同承办,会期 3 天(会后安排中药资源考察)。会议将邀请著名专家及相关人士就中药鉴定与品质评价、中药质量标准化、信息化、网络化进展情况;中药资源开发及可持续利用、中药鉴定学和生药学教学及实验、教材与标本等问题做专题报告。相关征文事宜通知如下:

1 征文内容

① 中药鉴定学及生药学的新方法、新技术、新思路、新观点;② 中药质量标准研究、品质评价相关内容;③ 中药品种考证及相关内容;④ 地道药材、中药资源开发与可持续利用研究及中药材规范化种植(GAP)、采收期、加工、储藏、保管等相关内容;⑤ 中药珍稀、濒危物种的开发及可持续发展战略问题的讨论;⑥ 民族药的开发、保护与可持续利用;⑦ 分子生物学技术、信息技术、生物工程技术在中药现代化研究中的应用;⑧ 中药化学成分及有效成分的提取、分离及鉴定研究、药效学研究以及其它相关领域的研究论文;⑨ 有关《中药鉴定学》和《生药学》的教学内容、教学方法、教学手段、教学改革等方面的论文。

2 征文要求

① 征文为未公开发表的论文。请在论文及信封右上角注明中药鉴定研讨会稿件字样。② 稿件一律用 Microsoft Word 文档标准 A4 版面,标题 3 号宋体,作者及单位小 4 号楷体,摘要与关键词小 5 号宋体,正文 5 号宋体,页边距:上 3 cm,下、左、右 2.5 cm。③ 请附 400 字以内摘要(少附英文摘要)及关键词。④ 截止日期 2008 年 5 月 15 日,请自留底稿,概不退稿。请将论文发送如下 E-mail 地址,注明中药鉴定研讨会稿件字样。⑤ 论文一经采用,将收入会议论文集,并通知作者出席会议,会议期间颁发论文证书,参会代表计国家级 I 类继续教育学分 6 分。

3 联系方式

地 址:上海市国和路 325 号第二军医大学药学院生药学教研室(邮编:200433)

联系人:孙连娜 副教授 手机:13818946096 Tel/Fax: 86-21-25074574, E-mail: lianna_sunln@hotmail.com

秦路平 教授 手机:13901600345 Tel/Fax: 86-21-25070394, E-mail: qinluping@126.com