

# 氯喹对 S<sub>180</sub> 荷瘤小鼠的抑瘤作用及其机制

岳丽玲<sup>1\*</sup> 梅庆步<sup>2</sup> 朱文斌<sup>1</sup> 张微<sup>1</sup> 刘得水<sup>1</sup> 刘莹<sup>3</sup>

(1. 齐齐哈尔医学院医药科学研究院; 2. 齐齐哈尔医学院生物遗传学教研室;  
3. 齐齐哈尔医学院 2013 级临床医学实验班, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

**[摘要]** 目的 探讨氯喹(CQ)对小鼠移植性肉瘤 S<sub>180</sub> 的抑瘤作用及其可能机制。方法 采用 40 只 S<sub>180</sub> 荷瘤小鼠分为模型组、氯喹低剂量组、氯喹中剂量组、氯喹高剂量组进行体内抑瘤实验,观察不同浓度氯喹对小鼠肉瘤 S<sub>180</sub> 的抑制作用;透射电子显微镜观察氯喹作用下荷瘤鼠肿瘤细胞超微结构的变化;流式细胞术检测氯喹诱导荷瘤鼠 S<sub>180</sub> 细胞凋亡的情况;免疫组织化学方法检测相关凋亡因子 Bcl-2、细胞色素 C 和 Cle-Caspase-3 的表达情况;Western blotting 检测荷瘤组织 Bcl-2 和 Cle-Caspase-3 蛋白表达水平的变化以及线粒体和细胞质中细胞色素 C 蛋白含量的变化。结果 与模型组相比较,氯喹处理组小鼠移植肉瘤 S<sub>180</sub> 生长速度显著减慢,肿瘤体积和瘤质量明显减小( $P < 0.05$ );透射电子显微镜观察发现,与模型组比较氯喹处理组肿瘤细胞形态出现明显凋亡损伤改变,凋亡小体形成;各剂量组氯喹均可诱导荷瘤鼠 S<sub>180</sub> 细胞凋亡,使抗凋亡因子 Bcl-2 表达下调,凋亡因子 Cle-Caspase-3 表达上调( $P < 0.05$ );并且氯喹能够降低线粒体内细胞色素 C 蛋白的表达,提高细胞质细胞色素 C 蛋白的表达( $P < 0.05$ ),促使线粒体内细胞色素 C 向细胞质内释放。结论 氯喹能够抑制小鼠 S<sub>180</sub> 肉瘤的生长,可能是通过线粒体凋亡途径诱导细胞凋亡,从而发挥抑瘤的作用。

**[关键词]** 氯喹;抑瘤作用;免疫印迹法;荷瘤小鼠

**[中图分类号]** R73-35 **[文献标志码]** A **[DOI]** 10.16098/j.issn.0529-4356.2016.06.010

## Anti-tumor effects of chloroquine on S<sub>180</sub> tumor-bearing mice and its mechanisms

YUE Li-ling<sup>1\*</sup>, MEI Qing-bu<sup>2</sup>, ZHU Wen-bin<sup>1</sup>, ZHANG Wei<sup>1</sup>, LIU De-shui<sup>1</sup>, LIU Ying<sup>3</sup>

(1. Research Institute of Medical Science and Pharmacy; 2. Department of Biological;  
3. Clinical Medicine Experimental Class of 2013; Qiqihar Medical University, Heilongjiang Qiqihar 161006, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the anti-tumor function of chloroquine on bearing cancer mice S<sub>180</sub> and its possible mechanism. **Methods** Forty S<sub>180</sub> tumor-bearing mice were divided into chloroquine, low dose group, middle dose and high dose group. The inhibiting effect of different concentration chloroquine on sarcoma 180 was observed with *in vivo*. The morphological changes in tumor cells of tumor-bearing mice induced by chloroquine was observed under the transmission electron microscope. The apoptosis of tumor cells induced by chloroquine were tested with flow cytometry. The expression of apoptosis-related factors Bcl-2, cytochrome-C and Cle-Caspase-3 was detected by immunohistochemistry. Western blotting was used to detect the protein levels of Bcl-2, Cle-Caspase-3 in tissue and the changes of Cytochrome-C in mitochondria and cytoplasm. **Results** Compared with the control group, the growth rate, the xenon graft volume and weight decreased obviously in chloroquine group ( $P < 0.05$ ). Apoptotic changes and apoptotic body were discovered obviously in chloroquine group under the electron microscope. Chloroquine induced the apoptosis of bearing cancer mice S<sub>180</sub> cell in every group, down-regulated the expression of anti-apoptotic factors Bcl-2 and up-regulated the expression of apoptotic genes Cle-Caspase-3 ( $P < 0.05$ ). Chloroquine reduced the mitochondria Cytochrome-C protein levels and increased the cytoplasm cytochrome-C protein levels ( $P < 0.05$ ). Chloroquine promoted the release of cytochrome-C to cytoplasm. **Conclusion** Chloroquine has the anti-tumor effect on the growth of bearing cancer mice S<sub>180</sub> cell. It may affect the mitochondria apoptosis pathway and thus play a role in anti-tumor.

**[Key words]** Chloroquine; Anti-tumor function; Western blotting; Tumor-bearing mouse

**[收稿日期]** 2016-06-02 **[修回日期]** 2016-07-26

**[基金项目]** 黑龙江省普通高等学校青年学术骨干支持计划(1253G066)

**[作者简介]** 岳丽玲(1973—),女(汉族),黑龙江省齐齐哈尔市人,博士,教授。

\* 通讯作者(To whom correspondence should be addressed)

E-mail: yuell1025@126.com Tel: (0452) 2663380

氯喹(chloroquine, CQ) 是人工合成的 4-氨基喹啉的衍生物。氯喹对各种疟原虫的红细胞内期裂殖体均有较强的杀灭作用,能迅速有效的控制疟疾的临床发作。此外,氯喹还具有抗肠道外阿米巴病作用和免疫抑制作用,可用于治疗阿米巴肝脓肿和类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮等免疫功能紊乱性疾病<sup>[1~3]</sup>。近年来研究发现,氯喹在体外具有抗肿瘤作用,可引起恶性胶质瘤 A172 细胞<sup>[4]</sup>、人乳腺癌 Bcap-37 细胞<sup>[5]</sup>等多种肿瘤细胞生长抑制和死亡。本研究以肉瘤 S<sub>180</sub> 荷瘤鼠为对象,研究氯喹的体内抗肿瘤作用及其机制,为临床抗肿瘤治疗提供实验依据。

## 材料和方法

### 1. 药物与试剂

氯喹购自 Sigma 公司,常温保存。Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒、线粒体蛋白制备试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司; RPMI-1640 培养基购自 Gibco 公司; 胎牛血清购自 Hyclone 公司; 兔抗半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cleaved-Caspase-3, Cle-Caspase-3)、细胞色素 C (cytochrome C, Cyt-C)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (B-cell lymphoma/Leukemia-2, Bcl-2) 多克隆抗体购自 Cell Signaling 公司; HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体购自 Cell Signaling 公司; 即用型 SABC 免疫组织化学试剂盒、DAB 显色试剂盒购自福州迈新生物技术公司。

### 2. 动物与细胞

无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级 ICR 小鼠,雄性,体重 18~22g,鼠龄 6~8 周,购自吉林大学白求恩医学院动物实验中心,动物许可证号: SCXK-(吉) 2007-0003,购买后饲养 1 周进行实验。小鼠实体移植肉瘤 S<sub>180</sub> 瘤株购自中国科学院上海细胞库。

### 3. 实验方法

3.1 S<sub>180</sub> 荷瘤小鼠模型的建立: 选取腹腔接种瘤细胞 7d 腹水饱满的 S<sub>180</sub> 荷瘤小鼠,颈椎脱臼处死,无菌条件下抽取腹水,生理盐水稀释后 0.2% 锥虫蓝染色检测细胞存活率,活细胞数为 95% 以上可接种。细胞计数,用 PBS 调整瘤细胞数至  $2 \times 10^{10}$  /L,每只小鼠于右腋窝皮下接种 0.2ml。

3.2 分组及给药: 小鼠接种 S<sub>180</sub> 肉瘤后随机分成模型对照组、氯喹低剂量组 (10 mg/kg)、氯喹中剂量组 (20 mg/kg) 和氯喹高剂量组 (40 mg/kg),共 4 组,每组 10 只。接种瘤株 24 h 后,氯喹低、中、高剂量组分别腹腔注射给药,模型对照组腹腔注射等体积的生理盐水,每天给药 1 次,连续 10d。实验期间

每日观察小鼠的活动、体重等一般情况及皮下肿瘤生长情况。

3.3 抑瘤率测定: 停药次日处死小鼠,称体重,剥离肿瘤组织,称重,按以下公式计算抑瘤率: 抑瘤率 (%) =  $(1 - \text{实验组平均瘤重} / \text{对照组平均瘤重}) \times 100\%$ 。

3.4 透射电子显微镜观察荷瘤鼠组织形态学变化: 分别取 1mm<sup>3</sup> 模型组及低、中、高剂量组氯喹处理的 S<sub>180</sub> 荷瘤组织标本,2.5% 戊二醛及 1% 锇酸双重固定,乙醇、丙酮梯度脱水,环氧树脂常规包埋,超薄切片机切片后经醋酸铀和枸橼酸铅双染色,透射电子显微镜观察,摄片。

3.5 流式细胞术检测荷瘤鼠肿瘤细胞凋亡: 在冰块上切取瘤组织,将瘤组织剪碎,利用流式细胞制备仪研磨成细胞悬液,调整细胞浓度为  $1 \times 10^9$  /L,参照试剂盒说明,加入 5μl AnnexinV-FITC 和 5μl 碘化丙啶 (PI),混匀避光孵育 15min,加入 400μl 结合缓冲液后上机检测。

3.6 免疫组织化学染色: 切取各组肿瘤组织,置于 4% 多聚甲醛溶液固定,常规脱水,石蜡包埋,切片,厚 5μm。石蜡切片脱蜡至水,免疫组织化学采用 SABC 法, Bcl-2、Cle-Caspase-3 一抗工作浓度为 1:50, Cyt-C 一抗工作浓度为 1:100,以 PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照,具体操作步骤参照试剂盒说明书。镜检,细胞质或核呈棕褐色或棕黄色反应产物代表抗原的定位。应用 Image-Pro Plus 7.0 图像分析软件分析免疫组织化学结果,阳性结果用积分吸光度 (integrated absorbance, IA) 表示。

3.7 Western blotting 分析: 取适量荷瘤组织于液氮下研磨, RIPA 蛋白裂解液裂解组织,提取细胞总蛋白质; 用线粒体蛋白制备试剂盒提取线粒体蛋白和细胞质蛋白,二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 法测定蛋白浓度。取 30 μg 总蛋白质进行 SDS-PAGE 电泳,转 PVDF 膜,封闭液室温封闭 2 h 后加入一抗 Bcl-2 (1:1000)、Cyt-C (1:1000)、Cle-Caspase-3 (1:1000),4℃ 过夜后加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG (1:3000) 室温孵育 2 h, TBST 洗膜后 ECL 显色,暗室曝光。以 GAPDH 作为内参,应用图像分析软件定量分析各蛋白相对表达量。

### 4. 统计学处理

计算数据以均值 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,应用 SPSS 19.0 统计学软件进行分析处理,组间比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA),以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

结 果

1. 氯喹对 S<sub>180</sub> 荷瘤小鼠的抑制作用

模型组平均瘤重 > 1 g,说明造模成功,肿瘤生长良好。各给药组小鼠瘤重较模型组均有所降低(图1),氯喹高、中、低剂量组的抑瘤率分别是49.26%、37.50%和24.26% 其中氯喹高剂量组与模型对照组相比较差异具有显著性(\*\**P* < 0.01),氯喹中、低剂量组与模型组比较具有统计学意义(\**P* < 0.05),如表1所示。

2. 电子显微镜观察结果

电子显微镜下可见模型组肿瘤细胞体积较大,细

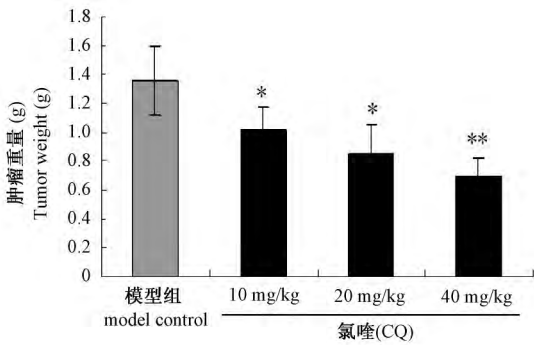


图1 氯喹对荷瘤小鼠肿瘤重量的影响  
与模型对照组比较: \* *P* < 0.05, \*\* *P* < 0.01  
Fig.1 Effect of CQ on the S<sub>180</sub> xenograft growth in mice  
Compared with model control group, \* *P* < 0.05, \*\* *P* < 0.01

表1 氯喹对 S<sub>180</sub> 荷瘤小鼠抑瘤率的影响(*n* = 10  $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effect of CQ on tumor-inhibition rate in S<sub>180</sub> mice (*n* = 10,  $\bar{x} \pm s$ )

组别 groups	剂量( mg/kg) dose ( mg/kg)	瘤重( g) tumor weight ( g)	抑瘤率( %) tumor-inhibition rate ( %)
模型对照组 model control group	—	1.36 ± 0.59	—
氯喹低剂量组 low doses chloroquine	10	1.02 ± 0.63	24.26*
氯喹中剂量组 middle doses chloroquine	20	0.85 ± 0.47	37.50*
氯喹高剂量组 high doses chloroquine	40	0.69 ± 0.34	49.26**

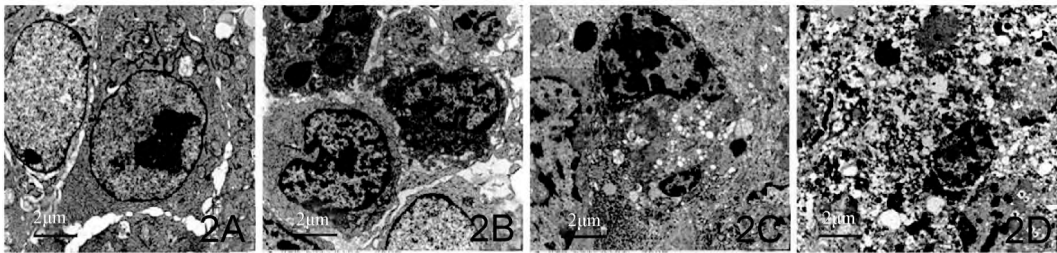


图2 电子显微镜下瘤细胞的病理形态学变化 标尺示 2 μm  
A. 模型对照组; B. 氯喹低剂量组; C. 氯喹中剂量组; D. 氯喹高剂量组  
Fig.2 Pathomorphological changes of tumor cells under transmission electron microscope Bar = 2 μm  
A, Model control group; B, Low doses chloroquine; C, Middle doses chloroquine; D, High doses chloroquine

胞核形态规整,染色均匀,且核质比较大,而药物处理组肿瘤细胞与之相比体积变小,细胞质浓缩,细胞核固缩、边缘化,其中氯喹低剂量组细胞胞质皱缩,细胞核染色不均,细胞核固缩,呈现凋亡早期特点;氯喹中剂量组细胞核碎裂,可见少量空泡;氯喹高剂量组镜下可见大量空泡,细胞核裂解,产生凋亡小体(图2)。

3. 氯喹对荷瘤鼠肿瘤细胞凋亡的影响

氯喹不同剂量组(10、20、40 mg/kg)细胞凋亡率分别为9.39%、17.04%、20.38%,与模型对照组(5.44%)相比,氯喹处理组细胞凋亡率明显增加,差异具有显著性(*P* < 0.05),并且呈现剂量依赖效应(图3)。

4. 免疫组织化学染色检测细胞凋亡因子的表达情况

实验结果显示,Bcl-2、Cyt-C、Cle-Caspase-3均在肿瘤细胞胞质内表达,表达呈棕黄色或棕褐色颗粒。Bcl-2在模型组着色最深,氯喹处理组阳性颗粒数目减少,随着药物剂量增加染色逐渐变浅,模型对照组肿瘤组织中Bcl-2阳性表达量明显高于各药物处理组(*P* < 0.05);Cyt-C、Cle-Caspase-3在模型组着色最浅,氯喹处理组染色明显增强,阳性表达量明显高于模型对照组(*P* < 0.05),且呈现一定的剂量相关性(图4~6)。各组Bcl-2、Cyt-C、Cle-Caspase-3阳性细胞IA值见表2。

5. Western blotting 检测 Bcl-2、Cyt-C 和 Cle-Caspase-3 蛋白的表达情况

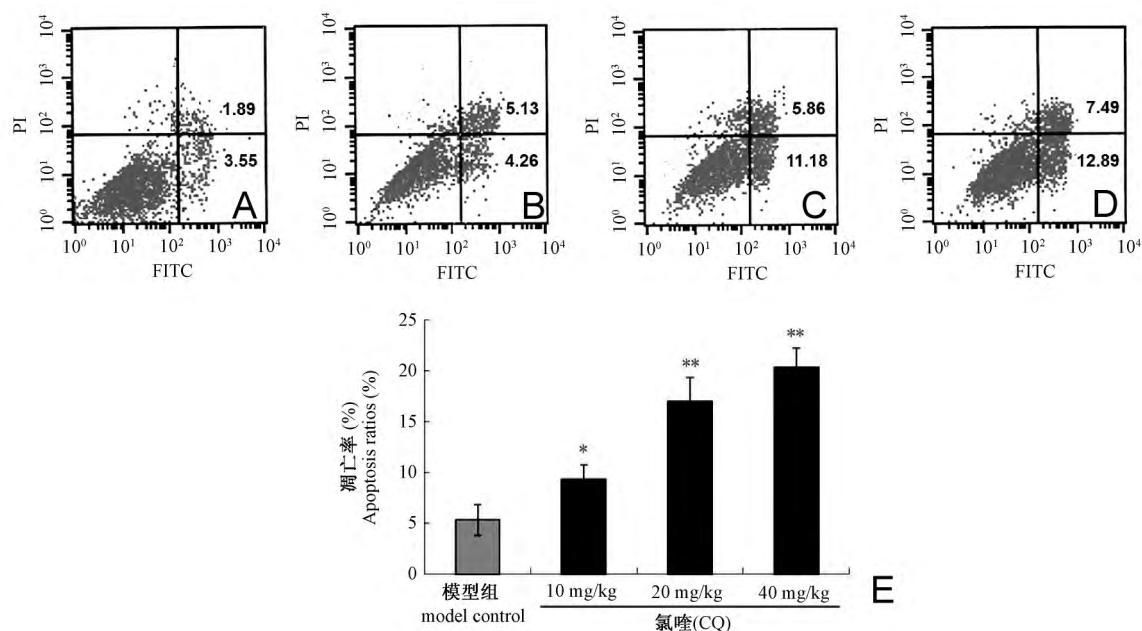


图3 氯喹对S<sub>180</sub>荷瘤小鼠细胞凋亡的影响

A. 模型对照组; B. 氯喹低剂量组; C. 氯喹中剂量组; D. 氯喹高剂量组; E. 与模型对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

Fig.3 Effect of CQ on the apoptosis of S<sub>180</sub> xenograft in mice

A, Model control group; B, Low doses chloroquine; C, Middle doses chloroquine; D, High doses chloroquine; E. Compared with model control group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

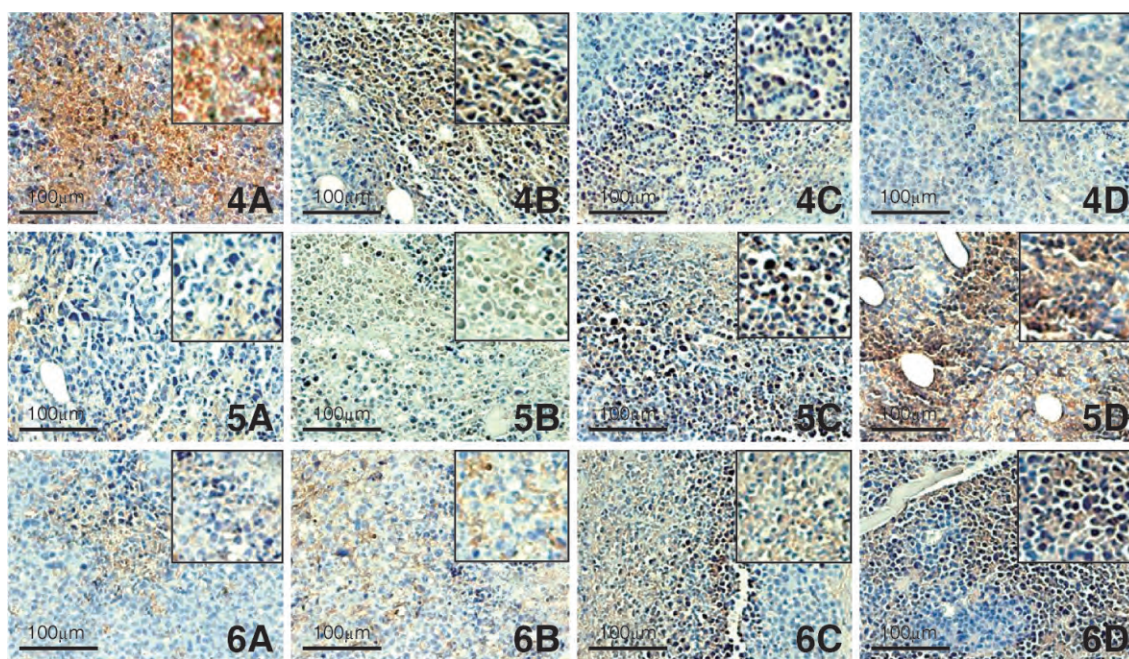


图4 Bcl-2 蛋白在荷瘤组织的表达情况 免疫组织化学染色 标尺示 100μm( 下同)

图5 Cyt-C 蛋白在荷瘤组织的表达情况

图6 Cle-Caspase-3 蛋白在荷瘤组织的表达情况

A. 模型对照组; B. 10 mg/kg 氯喹组; C. 20 mg/kg 氯喹组; D. 40 mg/kg 氯喹组

Fig.4 Bcl-2 protein expression in S<sub>180</sub> mice Immunocytochemical staining Bar = 100μm ( The same below)

Fig.5 Cyt-C protein expression in S<sub>180</sub> mice

Fig.6 Cle-Caspase-3 protein expression in S<sub>180</sub> mice

A, Model control group; B, 10 mg/kg chloroquine group; C, 20 mg/kg chloroquine group; D, 40 mg/kg chloroquine group



表 2 各组荷瘤组织 Bcl-2、Cyt-C、Cle-Caspase-3 免疫组织化学阳性细胞 IA 值( % ,  $n = 10$  ,  $\bar{x} \pm s$ )  
Table 2 IA values of Bcl-2 , Cyt-C and Cle-Caspase-3-immunostaining positive cells in S<sub>180</sub> mice ( % ,  $n = 10$  ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别 groups	例数 <i>n</i>	IA 值( IA values)		
		Bcl-2	Cyt-C	Cle-Caspase-3
模型对照组 model control group	10	54.21 ± 4.34	9.67 ± 2.12	11.33 ± 1.57
氯喹低剂量组 low doses chloroquine	10	38.96 ± 5.82*	26.73 ± 4.35*	20.02 ± 2.69*
氯喹中剂量组 middle doses chloroquine	10	26.87 ± 4.14**	35.91 ± 3.38**	31.75 ± 2.41**
氯喹高剂量组 high doses chloroquine	10	11.96 ± 1.63**	49.27 ± 5.91**	40.72 ± 3.48**

与模型对照组比较 , \*  $P < 0.05$  , \*\*  $P < 0.01$   
Compared with model control group , \*  $P < 0.05$  , \*\*  $P < 0.01$

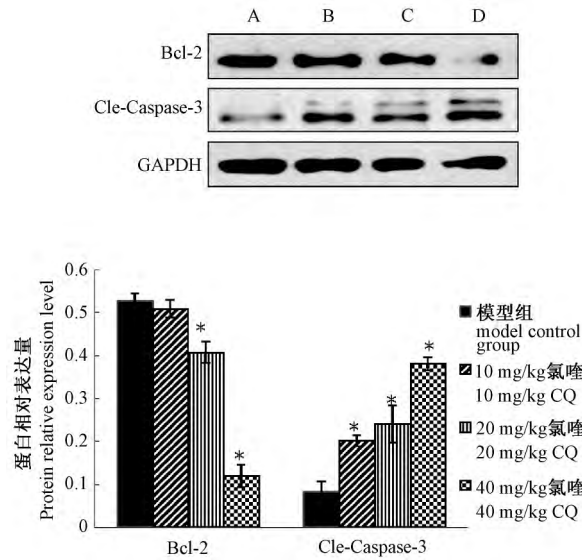


图 7 Bcl-2、Cle-Caspase-3 蛋白在荷瘤组织中的免疫印迹结果与模型对照组比较 , \*  $P < 0.05$   
Fig. 7 Western blotting analysis of Bcl-2 and Cle-Caspase-3 in S<sub>180</sub> mice  
Compared with model control group , \*  $P < 0.05$

Western blotting 结果显示 ,与模型对照组相比 ,氯喹组肿瘤细胞 Bcl-2 蛋白的表达水平明显降低 ,且随着药物浓度增高其表达逐渐下降 (  $P < 0.05$  ) ;同时氯喹组 Cle-Caspase-3 蛋白的表达水平与模型组相比显著上调 (  $P < 0.05$  ) ( 图 7 ) 。本实验还分别检测了线粒体及细胞质中 Cyt-C 的蛋白含量 ,结果显示 ,线粒体内 Cyt-C 随着氯喹浓度的增高含量不断降低 (  $P < 0.05$  ) ,而细胞质 Cyt-C 含量显著增加 (  $P < 0.05$  ) ,说明氯喹促进 Cyt-C 从线粒体腔释放到细胞基质( 图 8 ) 。

### 讨 论

氯喹具有广泛的生理学效应 ,已经安全地用于疟疾的预防<sup>[6]</sup> 以及与甲氨蝶呤合用治疗类风湿性关节炎长达十余年<sup>[7]</sup> 。研究发现 ,氯喹作为一种靶

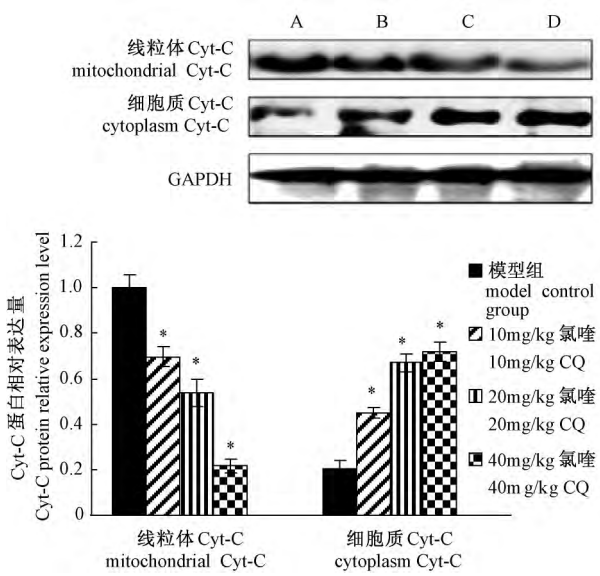


图 8 线粒体及细胞质内 Cyt-C 蛋白含量的免疫印迹结果与模型对照组比较 , \*  $P < 0.05$   
Fig. 8 Western blotting analysis of Cyt-C in mitochondrial and cytoplasm  
Compared with model control group , \*  $P < 0.05$

向溶酶体药物 ,能够抑制自噬体与溶酶体融合使自噬体退化 ,阻断自噬。已知在多种人类肿瘤中均存在自噬活性的改变<sup>[8]</sup> 。有实验表明 ,抑制自噬可提高细胞对凋亡信号的敏感性<sup>[9]</sup> ;促进肿瘤细胞的死亡 ,如应用氯喹抑制细胞自噬后可增强 p53 诱导凋亡的能力<sup>[10]</sup> 。目前文献报道 ,氯喹对胃癌、结肠癌和皮肤癌等多种肿瘤细胞均有抑制作用<sup>[11~13]</sup> ,显示了较强的抗肿瘤作用。Zheng 等<sup>[14]</sup> 研究发现 ,氯喹能够通过浓度和时间依赖的方式抑制小鼠结肠癌细胞系 CT26 的增殖 ,并可以减少 CT26 荷瘤小鼠的肿瘤体积以及延长荷瘤鼠的生存时间 ,在体内和体外均显示了抗肿瘤效应。本研究发现 ,氯喹对 S<sub>180</sub> 肉瘤荷瘤鼠具有显著的抑瘤作用 ,且剂量越大 ,抑瘤率越高 ,呈现明显的剂量依赖性 ;流式细胞术结果显示 ,随着氯喹浓度的增高 ,细胞凋亡率逐渐增加 ;透

射电子显微镜下氯喹处理组的细胞体积减小,胞质浓缩,且随剂量的升高,镜下细胞中出现空泡,核固缩,核碎裂增多,这些现象符合细胞凋亡形态学变化,以上结果说明氯喹在体内抑制肿瘤生长,诱导肿瘤细胞凋亡。

细胞凋亡是细胞程序性死亡的一种方式,能够使肿瘤细胞死亡,减缓肿瘤生长速度<sup>[15]</sup>,其过程受基因控制,并且与多种信号转导通路有关。为了进一步验证氯喹诱导肿瘤细胞凋亡的机制,我们检测了凋亡相关蛋白的表达,结果显示,在氯喹的作用下凋亡抑制蛋白 Bcl-2 表达下降,而具有活性的 Caspase-3 凋亡蛋白表达上调,并且线粒体内细胞色素 C 的含量降低,在细胞质内的含量增加。Bcl-2 是线粒体凋亡途径的重要调节分子,其能通过增强线粒体膜电位,保持线粒体内外膜的完整性及减少钙离子释放外流而抑制细胞凋亡<sup>[16,17]</sup>。Bcl-2 表达的下降可以使 Bax 等促凋亡因子活化<sup>[18]</sup>。通过直接降低线粒体外膜稳定性促进细胞色素 C 释放,从而启动 Caspase-3 级联反应,诱导细胞凋亡<sup>[19]</sup>。因此,上述研究结果提示,氯喹可能通过下调 Bcl-2 蛋白的表达来诱导肿瘤细胞启动程序性细胞死亡。

目前多数研究认为,氯喹可以作为肿瘤化疗的辅助药物<sup>[20]</sup>,我们的研究显示,氯喹在体内单独用药亦能够通过线粒体凋亡途径诱导肿瘤细胞的凋亡,抑制小鼠 S<sub>180</sub> 肉瘤的生长,从而发挥抑瘤的作用,本研究为氯喹的老药新用提供了实验依据。

### 参 考 文 献

- [1] Solomon VR, Lee H. Chloroquine and its analogs: A new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies [J]. Eur J Pharmacol, 2009, 625(1-3): 220-233.
- [2] Kruize AA, Hene RJ, Kallenberg CG, et al. Hydroxychloroquine treatment for primary Sjogren's syndrome: a two years double-blind crossover trial [J]. Ann Rheum Dis, 1993, 52(5): 360-364.
- [3] Shuai SQ, Sun HB. Treatment of primary Sjogren's syndrome with hydroxychloroquine [J]. Med J West China, 2011, 23(7): 1281-1283.
- [4] Park BC, Park SH, Paek SH, et al. Chloroquine-induced nitric oxide release and cell death is dependent on cellular [J]. Toxicol Lett, 2008, 178(1): 52-60.
- [5] Jiang PP, Zhao YL, Shi W, et al. Cell growth inhibition, G<sub>2</sub>/M cell cycle arrest and apoptosis induced by chloroquine in human breast cancer cell line bcap-37 [J]. Cell Physical Biochem, 2008, 22(5-6): 431-440.
- [6] O'Neill PM, Bray PG, Hawley SR, et al. 4-Aminoquinolines—past, present, and future: a chemical perspective [J]. Pharmacol Ther, 1998, 77(1): 29-58.
- [7] Kremer JM. Rational use of new and existing disease-modifying agents in rheumatoid arthritis [J]. Ann Intern Med, 2001, 134(8): 695-706.
- [8] Hippert MM, O'Toole PS, Thorburn A. Autophagy in cancer: good, bad, or both [J]? Cancer Res, 2006, 66(19): 9349-9351.
- [9] Kanzawa T, Kondo Y, Ito H, et al. Induction of autophagic cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide [J]. Cancer Res, 2003, 63(9): 2103-2108.
- [10] Maclean KH, Dorsey FC, Cleveland JL, et al. Targeting lysosomal degradation induces p53-dependent cell death and prevents cancer in mouse models of lymphomagenesis [J]. J Clin Invest, 2008, 118(1): 79-88.
- [11] Kim MS, Jeong EG, Ahn CH, et al. Frameshift mutation of UVRAG, an autophagy related gene, in gastric carcinomas with micro satellite instability [J]. Human Pathol, 2008, 39(7): 1059-1063.
- [12] Claerhout S, Verschooten L, Van Kelst S, et al. Concomitant inhibition of AKT and autophagy is required for efficient cisplatin-induced apoptosis of metastatic skin carcinoma [J]. Int J Cancer, 2010, 127(12): 2790-2803.
- [13] Sasaki K, Tsuno NH, Sunami E, et al. Chloroquine potentiates the anti-cancer effect of 5-fluorouracil on colon cancer cells [J]. BMC Cancer, 2010, 10(1): 370.
- [14] Zheng Y, Zhao YL, Deng X, et al. Chloroquine inhibits colon cancer cell growth in vitro and tumor growth in vivo via induction of apoptosis [J]. Cancer Invest, 2009, 27(3): 286-292.
- [15] Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy [J]. Cancer, 1994, 73(8): 2013-2026.
- [16] Gogada R, Prabhu V, Amadori M, et al. Reseratinol induces p53-independent, X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)-mediated Bax protein oligomerization on mitochondria to initiate cytochrome c release and caspase activation [J]. J Biol Chem, 2011, 286(33): 28749-28760.
- [17] Pucci B, Bertani F, Karpnich NO, et al. Detailing the role of Bax translocation, cytochrome c release and perinuclear clustering of the mitochondria in the killing of HeLa cells by TNF [J]. J Cell Physiol, 2008, 217(2): 442-449.
- [18] Sun DY, Zuo YZ, Liang HH, et al. Effects of dihydromyricetin on apoptosis of lung adenocarcinoma A549 cells [J]. Acta Anatomica Sinica, 2015, 46(3): 359-362. (in Chinese)  
孙大永, 左彦珍, 梁鸿鹄, 等. 二氢杨梅素对肺癌 A549 细胞凋亡的作用 [J]. 解剖学报, 2015, 46(3): 359-362.
- [19] Mazumder S, Plesca D, Almasan A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis [J]. Methods Mol Biol, 2008, 414: 13-21.
- [20] Zhao XG, Sun RJ, Yang XY, et al. Chloroquine-enhanced efficacy of cisplatin in the treatment of hypopharyngeal carcinoma in xenograft mice [J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0126147.

(编辑 安晓意)