

• 论 著 •

重组分泌型 Fas 配体对肝癌细胞株 HepG2 凋亡的影响*

尚小玲^{1,3}, 汪宏良^{1,3}, 冯琴琴⁴, 胡芳^{1,3}, 杨浩^{1,3}, 谌章舟^{1,2,3△}

1. 黄石市中心医院/湖北理工学院附属医院医学检验科, 湖北黄石 435000; 2. 湖北理工学院医学院, 湖北黄石 435003; 3. 肾脏疾病发生与干预湖北省重点实验室, 湖北黄石, 435003; 4. 黄石市妇幼保健院产科, 湖北黄石 435003

摘要:目的 构建重组表达 Fas 配体(FasL)基因(N 端含有 IL2 信号肽)的慢病毒, 探讨其介导肝癌细胞凋亡的可行性及其可能的分子机制。方法 将含有 IL2 信号肽的 FasL 基因克隆至慢病毒载体 pCDH-CMV-MCS-EF1-GFP+Puro (简称 pCDH) 中, 然后将重组 pCDH-IL2sig-FasL 与慢病毒辅助质粒共同转染至 HEK293 细胞中, 获得重组慢病毒 LV-IL2sig-FasL, 阴性对照为 LV, 分别感染 HepG2 细胞。最后将成功构建的稳转细胞 HepG2-LV-IL2sig-FasL 及 HepG2-LV 同时培养至 96 h, 采用实时荧光定量聚合酶链反应(qPCR)检测细胞中相关凋亡信号因子的转录水平, Western blot 检测蛋白表达水平, MTT 检测细胞增殖抑制水平。结果 HepG2-LV-IL2sig-FasL 细胞相对于阴性对照株 HepG2-LV, 其凋亡因子转录及表达水平均上调; MTT 检测结果显示 HepG2-LV-IL2sig-FasL 细胞生长明显受到抑制。结论 外源表达 IL2sig-Fas 基因可诱导肿瘤细胞 HepG2 凋亡, 有可能作为肿瘤基因治疗的新途径。

关键词: Fas 配体; 肝癌细胞; 慢病毒; 凋亡

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2023.04.014

中图法分类号: Q291

文章编号: 1673-4130(2023)04-0450-06

文献标志码: A

Study on the apoptosis mediated by recombinant secretory

Fas ligand in hepatoma cell line HepG2*

SHANG Xiaoling^{1,3}, WANG Hongliang^{1,3}, FENG Qingqin⁴, HU Fang^{1,3},
YANG Hao^{1,3}, SHEN Zhangzhou^{1,2,3△}

1. Department of Clinical Laboratory, Huangshi Central Hospital/Affiliated Hospital of Hubei Polytechnic University, Huangshi, Hubei 435000, China; 2. Medical School, Hubei Polytechnic University, Huangshi, Hubei 435003, China; 3. Hubei Key Laboratory of Kidney Diseases Pathogenesis and Intervention, Huangshi, Hubei 435003, China; 4. Department of Obstetrics, Huangshi Maternal and Children's Health Hospital, Huangshi, Hubei 435003, China

Abstract: Objective To construct a recombinant lentivirus expressing Fas ligand(FasL) gene containing IL2 signal peptide at N-terminal, and to investigate the feasibility and possible molecular mechanism of FasL gene mediated apoptosis of liver cancer cells. **Methods** FasL gene containing IL2 signal peptide was cloned into lentiviral vector pCDH-CMV-MCS-EF1-GFP+Puro (pCDH), and then the recombinant pCDH-IL2sig-FasL and lentiviral helper plasmid were transfected into HEK293 cell line. Recombinant lentivirus LV-IL2sig-FasL was obtained, and the negative control was LV, which was infected with HepG2 cells respectively. Finally, the successfully constructed stable cell lines HepG2-LV-IL2sig-FasL and HepG2-LV were simultaneously cultured for 96 h, and the transcription levels of apoptosis signal factors in the cell lines were detected by using real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction(qPCR), the protein expression levels were detected by using western blot, and the cell proliferation inhibition levels were detected by using MTT. **Results** Compared with hepG2-LV, the transcription and expression levels of apoptosis factors in HepG2-LV-IL2sig-FasL cell line were up-regulated. MTT showed that the growth of HepG2-LV-IL2sig-FasL cell line was significantly inhibited. **Conclusion** The expression of IL2sig-FasL gene can induce the apoptosis of HepG2,

* 基金项目: 湖北省卫生健康委员会科研基金项目(WJ2019M044); 黄石市科技局项目(2019A02); 肾脏疾病发生与干预湖北省重点实验室开放基金项目(SB202105)。

作者简介: 尚小玲, 女, 主管技师, 主要从事免疫学检测研究。△ 通信作者, E-mail: shen7279@163.com。

网络首发 <https://kns.cnki.net/kcms/detail//50.1176.r.20230208.1657.005.html>(2023-02-09)

which may be used as a new approach for gene therapy.

Key words: Fas ligand; liver cancer cells, lentivirus; apoptosis

Fas/Fas 配体(FasL)是一个重要的凋亡途径,对维持机体稳态起着非常重要的作用,可以激活胞内 Caspase 级联反应,促进细胞骨架降解和 DNA 片段化,导致细胞凋亡的发生。凋亡受体 Fas 即 CD95,是一个重要的 TNF 受体家族成员,正常情况下在细胞表面跨膜表达,其蛋白相对分子质量为 36×10^3 [1-3]。FasL 是一种可以与死亡受体 TNFRSF6/Fas 结合的细胞因子,它可以通过细胞毒作用诱导 T 细胞凋亡 [4]。在人体内,Fas 与其配体 FasL 结合后促使 Fas 阳性的细胞迅速凋亡。Fas 与其配体 FasL 的结合可使正常细胞及肿瘤细胞发生细胞凋亡,细胞凋亡是机体抵御癌症的重要防御手段,这种现象最常见于细胞毒性 T 细胞之中,这种现象是机体排除异常的细胞、清除异物的主要方式。Fas 与其配体 FasL 都参与维持机体免疫环境的稳定 [5-7]。免疫抑制治疗是通过阻滞某些特定的通路来抵抗肿瘤。T 细胞是杀灭肿瘤的主力军,其表面可表达多种免疫抑制受体,而肿瘤细胞表面可以产生相应配体。配体通过与 T 细胞表面受体因子的结合,如 Fas/FasL 的结合,抑制 T 细胞的活化来抑制免疫应答反应 [8-10]。Fas/FasL 凋亡系统是诱导肿瘤细胞凋亡的重要途径。将分泌型 FasL 转染至人肝癌细胞后,分泌到细胞外的 FasL 可反作用于肝癌细胞表面凋亡受体 Fas,触发肝癌细胞内的凋亡信号通路。本研究构建了含有 IL2 信号肽序列的 FasL 基因重组慢病毒表达载体 pCDH-IL2sig-FasL,利用磷酸钙转染技术将重组慢病毒载体及另外 2 个辅助质粒共转染至 HEK293 细胞中,制备出具有感染性的缺陷型活病毒粒子,直接感染 HepG2 细胞,然后检测外源性 FasL 基因的分泌性表达对人肝癌细胞 HepG2 凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 人肝癌细胞 HepG2 细胞株、人胚肾细胞 HEK293 细胞、大肠杆菌 Top10 为肾脏疾病发生与干预湖北省重点实验室所有;真核表达载体 pCDH-CMV-MCS-EF1-GFP + Puro (简称 pCDH)、pcDNA3、psPAX2、pMD2. G 购自湖南丰晖生物科技有限公司;Fas 及 FasL 单克隆抗体购自 Cell Signaling 公司,Caspase-8 及 Actin 单克隆抗体购自武汉三鹰生物公司;PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase、TRIzol RNA、RNA to cDNA EcoDry premix (oligo dT)、内切酶-BamH I、Xba I、Not I、DNA 连接酶等分子克隆相关试剂购自 TaKaRa 公司;2×Sybr Green 实时荧光定量 PCR(qPCR)混合液购自上海翊圣生物公司;胎牛血清购自 Biological Industries 公司;嘌呤霉

素购自武汉益易普公司;胰酶、双抗、DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司;人 FasL 酶连免疫吸附测法(ELISA)试剂盒购自江苏酶标生物科技有限公司;MTT 试剂盒购自碧云天公司;二抗-HRP 山羊抗兔 IgG(H+L)抗体和 HRP 山羊抗鼠 IgG(H+L)抗体购自安迪福诺生物科技武汉有限公司;RIPA 裂解液、ECL 超敏发光液购自北京普利莱公司;引物均由武汉奥科公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人肝癌细胞 HepG2 及人胚肾细胞 HEK293 分别用含 10% 胎牛血清、1% 双抗(P/S)的 DMEM 培养液置于 37℃、5% CO₂ 条件下培养,0.25% 胰蛋白酶(含 0.02% EDTA)消化传代。

1.2.2 重组慢病毒载体 pCDH-IL2sig-FasL 的构建与鉴定 以 pcDNA3-IL2sig-FasL 质粒为模板,设计引物扩增 IL2sig-FasL cDNA 片段,引物序列 F: CTAGTCTAGAATGTACAGGATGCAACTCCT, R: CGCGGATCCTTAGAGCTTATATAAGCCGA。利用 Xba I 和 BamH I 两种限制性内切酶同时酶切 pCDH 和扩增片段,分别纯化和回收双酶切后的载体 pCDH 和 IL2sig-FasL 片段,在 DNA 连接酶作用下将带有缺口的 pCDH 载体和 IL2sig-FasL 片段连接(16℃ 连接 4 h),转化到感受态细胞 Top10 中,37℃ 过夜培养。经双酶切、菌液 PCR 及琼脂糖凝胶电泳鉴定重组质粒 pCDH-IL2sig-FasL,最后将重组质粒送武汉奥科公司测序。

1.2.3 重组慢病毒 LV-IL2sig-FasL 和阴性对照病毒的制备及对 HepG2 细胞的感染 培养 HEK293 细胞,长满后接种到 8 个直径为 10 cm 的培养皿中,待其生长至密度约为 60% 左右开始转染,其中 4 个培养皿用于重组慢病毒载体转染,4 个培养皿转染阴性对照慢病毒载体(不含 IL2sig-Fas)。按照分子克隆实验磷酸钙转染法进行操作,同时将 pCDH-IL2sig-Fa/pCDH、psPAX2、pMD2. G 质粒以 15、12、9 μg 的量用磷酸钙混合液转染至 HEK293 细胞中,于 37℃、5% CO₂ 条件下培养至 48 h。然后在倒置荧光显微镜下观察转染后的结果,若 HEK293 细胞表达绿色荧光蛋白,证明慢病毒质粒转染成功。构建的重组慢病毒记为 LV-IL2sig-FasL,阴性对照慢病毒(不含 IL2sig-Fas)记为 LV。回收细胞培养基直接感染 HepG2 细胞,待 72 h 后加入终浓度为 10 μg/mL 的嘌呤霉素处理细胞,每天加 1 次,持续 4 d,最终获得全部被慢病毒感染的 HepG2 细胞,阳性命名为 HepG2-LV-IL2sig-FasL 细胞,阴性命名为 HepG2-LV 细胞。

1.2.4 ELISA 检测 FasL 蛋白的分泌 培养 HepG2-LV-IL2sig-FasL 和 HepG2-LV 细胞至第 72 h, 收集两种细胞的培养基, 按照人 FasL ELISA 试剂盒说明书操作, 用酶标仪在单波长 450 nm 处测定吸光度值(A_{450}), 每个样品设置 3 个平行重复检测。

1.2.5 MTT 检测细胞生长情况 将 HepG2-LV-IL2sig-FasL、HepG2-LV、HepG2 [作为空白对照 (NC)] 细胞分别以 1×10^5 /孔的密度种在 96 孔板中, 每种细胞设置 3 个平行重复检测, 于 37 °C、5% CO_2 条件下培养至 48 h 后按照 MTT 试剂盒说明书进行操作, 用酶标仪在单波长 570 nm 处测定 3 种不同细胞的吸光度值(A_{570})。

1.2.6 qPCR 检测凋亡因子的转录水平 培养稳转细胞 HepG2-LV-IL2sig-FasL 和 HepG2-LV, 在第 96 h 对 FasL、Fas、Caspase-8、Fas 相关死亡域蛋白 (FADD) 等凋亡相关基因的表达进行 qPCR 检测。按 TRIzol 法提取 2 组细胞总 RNA, 取总 RNA 约 2 μ g, 反转录合成 cDNA, 反应体积为 20 μ L。以 GAPDH 作为内参, 取合成的 cDNA 2 μ L 进行上述凋亡基因的 qPCR 检测, 每个样本设置 3 个平行检测, 引物序列见表 1。所有反应体系配制好后, 置于 ABI Quant-Studio 5 qPCR 仪进行检测, PCR 反应条件为 95 °C 60 s, 60 °C 30 s, 共 40 个循环。当 qPCR 反应运行结束, 导出数据并在 GraphPad Prism 5 软件中进行统计学分析和作图。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

基因	引物序列(5'-3')
GAPDH	正向: GTTTACATGTTCCAATATGA
	反向: TCCTGGAAGATGGTGATGGG
Fas	正向: CAAGGGATTGGAATTGAGGA
	反向: TGGAAGAAAAATGGGCTTT
FasL	正向: TGGCCTTGATCAATGAAA
	反向: TCATCATCTTCCCTCCATC
Caspase-8	正向: AAGCAAACCTCGGGGATACT
	反向: GGGGCTTGATCTCAAAATGA
FADD	正向: CCGAGCTCAAGTTCTATGC
	反向: CGTTAAATGCTGCACACAGG

1.2.7 Western blot 检测凋亡因子的蛋白表达水平 分别收集 HepG2-LV-IL2sig-FasL、HepG2-LV、HepG2 3 种细胞, 用刮铲刮取细胞, 每个样品加 125 μ L RIPA 裂解缓冲液冰上裂解 10 min, 根据 BCA 蛋白定量试剂盒说明书操作, 用 Molecular Devices 多功能酶标仪测定总蛋白, 根据总蛋白水平确定上样量。进行 SDS-PAGE 电泳, 条件为 120 V、90 min。然后转膜(尼龙膜), 100 V 转膜 1 h, 用浓度为 5% 的牛奶缓冲液室温下封闭 1 h, 分别与 FasL、Fas、Caspase-8

及 β -Actin 一抗孵育, 4 °C 过夜。PBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 后与相对应的二抗室温孵育 1 h, 用 PBST 重复洗 3 次, 每次 10 min。最后用 ECL 超敏发光液孵育后置于 SGM2018147 迷你化学发光成像仪显色。以 β -Actin 作为内参, 用 ImageJ 软件测灰度值, 计算上述蛋白的相对表达水平(以目的蛋白的灰度值与 Actin 灰度值的比值表示)。每个样本设置 3 个平行重复检测。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 One-Way ANOVA 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组慢病毒载体 pCDH-IL2sig-FasL 的构建与鉴定 挑取单克隆培养菌株(非蓝白斑筛选), 进行菌液 PCR 扩增, 筛选 pCDH-IL2sig-FasL 阳性质粒, 产物经过琼脂糖凝胶电泳鉴定, 可以发现约 1 kb 的 DNA 片段, 同时抽提阳性重组质粒进行双酶切鉴定, 酶切产物经琼脂糖凝胶电泳显示, 出现约大于 8 kb 和约 1 kb 两条带, 与预期结果相符。最后, 将阳性质粒送武汉奥科公司测序, 将 NCBI 数据库的序列与测序结果进行对比, 证明序列完全一致。

2.2 重组慢病毒的制备 48 h 后在倒置荧光显微镜下观察, 发现 HEK293 细胞表达绿色荧光蛋白, 说明慢病毒质粒制备成功。

2.3 ELISA 检测 FasL 蛋白的细胞外分泌情况 HepG2-LV 细胞培养基 A_{450} 为 1.0 ± 0.10 , HepG2-LV-IL2sig-FasL 细胞培养基 A_{450} 为 1.4 ± 0.05 , 差异有统计学意义($P = 0.003$), 说明加入 IL2 信号肽的 FasL 蛋白能够分泌到细胞外。

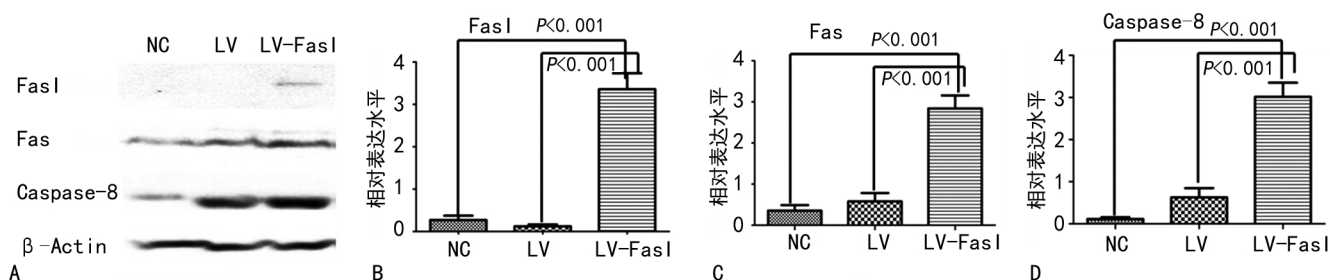
2.4 MTT 检测细胞生长情况 HepG2 细胞 A_{570} 最高, 为 4.21 ± 0.15 ; HepG2-LV 细胞 A_{570} 为 3.5 ± 0.27 ; HepG2-LV-IL2sig-FasL 细胞 A_{570} 最低, 为 2.5 ± 0.07 ; 3 种细胞间两两比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与其他两种细胞比较, HepG2-LV-IL2sig-FasL 细胞生长受到了明显抑制, 细胞外分泌的 FasL 蛋白对 HepG2 细胞具有抑制作用。

2.5 qPCR 检测凋亡因子的转录水平 HepG2-LV-IL2sig-FasL 细胞中 FasL、Fas、Caspase-8、FADD 的相对表达水平分别为 HepG2-LV 细胞的 5.63 ± 2.88 、 3.42 ± 0.42 、 1.77 ± 0.63 、 3.62 ± 0.45 倍, 其中 FasL、Fas、FADD 的表达差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.6 凋亡因子蛋白表达水平的 Western blot 检测 HepG2-LV-IL2sig-FasL 细胞的检测中, FasL 有条带检出, 其余 2 种细胞未检测出明显条带; 而 Fas 和 Caspase-8 在所有细胞中均有条带检出。FasL 蛋白

在 HepG2-LV-IL2sig-FasL 细胞中的相对表达水平为 3.4 ± 0.37 , 明显高于该蛋白在其他两种细胞中的相对表达水平 ($P < 0.001$); Fas 和 Caspase-8 蛋白在

HepG2-LV-IL2sig-FasL 细胞中的相对表达水平分别为 2.8 ± 0.32 和 3.0 ± 0.34 , 也明显高于这两种蛋白在其他细胞中的表表达水平 ($P < 0.001$)。见图 1。



注: NC 表示作为空白对照的 HepG2 细胞; LV 表示 HepG2-LV 细胞; LV-FasL 表示 HepG2-LV-IL2sig-FasL 细胞; A 为 Western blot 条带图; B、C、D 分别为 FasL、Fas、Casp-8 蛋白在 3 种细胞中的相对表达水平比较。

图 1 细胞凋亡因子的 Western blot 条带检测图及各泳道蛋白相对表达水平分析

3 讨 论

本研究采用慢病毒作为 FasL 基因的运载工具, 将其有效地整合到宿主染色体上, 达到 FasL 在 HepG2 细胞中持久性表达的目的。同时克服了一般运载分子的缺点, 如使生物大分子构象改变、活性部位易受到影响、药效降低和毒副作用等^[11-14]。

Fas/FasL 通路在胞内具有双重调控作用。一方面, FasL 与靶细胞表面受体 Fas 结合, 使 Fas 细胞质区的死亡结构域(DD)与转接器蛋白的 FADD 结合, 形成死亡诱导信号复合体(DISC), 进而激活下游的凋亡蛋白, 从而介导细胞凋亡以保证功能异常细胞能够被及时清除, 在免疫监测中扮演着十分重要的作用^[15-18]。另一方面, 当 Fas/FasL 介导的细胞凋亡发生了异常改变, 引起一系列的不良反应, 继而对人体造成不良的影响。研究证明 Fas 或 FasL 的不正常表达可能与细胞损伤、生殖系统疾病、免疫疾病、神经系统病变、炎症反应、肿瘤发生有关^[19]。

高彦军等^[20]发现, PM2.5 动物实验组中大鼠肺组织出现显著病变并伴有凋亡迹象, 随着刺激物 PM2.5 水平增加, 凋亡水平也增加, 而且 Western blot 证明 Fas、FasL、Caspase-8 等蛋白的表达随 PM2.5 的增加而增加。因此 PM2.5 的有效暴露可以诱导实验动物肺上皮细胞发生 Fas/FasL 途径介导的凋亡。

戴芳等^[21]通过对 20 例临床精液标本进行分析, 发现弱精组、少精组和少弱精组中 Fas 表达水平与正常组相比均偏高, 但与精子浓度、前向运动精子数呈负相关, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。同时, 少精组和少弱精组中 FasL 转录水平上调, Fas 转录水平与前向运动精子和精子活力呈正相关, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。该研究初步证实 Fas/FasL 在转录及表达水平的异常促进了精细胞凋亡。有研究发现纳米二氧化硅通过诱导小鼠睾丸 TM4 细胞氧化应激反

应, 激活 Fas/FasL 通路, 促使 TM4 细胞发生凋亡, 且纳米二氧化硅表现出剂量依赖性地抑制 TM4 细胞的存活率和数量^[22]。

毒性弥漫性甲状腺肿(Graves)患者 I131 治疗前后的对比分析得出, 观察组中外周血 Fas 表达水平高于对照组, 缓解组、复发组的 Fas 表达水平均高于对照组, 缓解组 Fas 表达水平低于观察组和复发组, 所有对比均有统计学意义 ($P < 0.05$)。由此可见, Fas 在外周血中的表达水平随着 Graves 病程的发展而升高^[23]。还有类似研究显示慢性淋巴细胞性甲状腺炎患者经硒酵母联合地塞米松治疗后, 血清中 Fas 和 FasL 的蛋白表达水平明显降低, 患者的甲状腺功能明显改善^[24]。

Fas/FasL 通路在神经系统疾病中也扮演重要角色, 研究人员发现在对难治性癫痫患者予以左乙拉西坦联合鼠神经生长因子治疗半年后, 可有效控制癫痫发作, 提高临床疗效, 且 FasL、Fas、Bcl-2 等蛋白水平也显著低于对照组 ($P < 0.05$), 说明 Fas/FasL 通路参与了癫痫的发病过程^[25]。

Fas/FasL 通路是维持机体组织正常生理功能的重要信号通路。研究证明, Fas 和 FasL 广泛表达于人体组织细胞中, 一旦机体组织细胞功能遭到破坏, 就会直接导致 Fas/FasL 凋亡通路无法执行凋亡程序, 启动异常细胞的死亡, 造成机体相关组织细胞走向不可逆转的癌变^[26]。结肠癌细胞中 CD47 高表达, 但过表达 CD47 蛋白却又阻断 Fas/FasL 通路, 抑制人结肠癌细胞 SW480 凋亡^[27]。辣椒素可以抑制人胃癌细胞 MKN-45 的活力, 促进 Fas/FasL 通路介导的细胞凋亡^[28]。研究人员还发现肝癌和上皮性卵巢癌组织中存在 Fas 跨膜表达的下调和 FasL 跨膜表达增加的情况, 这样肿瘤细胞表面 Fas 受体无法被免疫细胞识别, 同时肿瘤细胞表面异常表达的 FasL 配体又会结合免疫细胞膜表面受体 Fas 从而诱导免疫细胞

自身凋亡,以此来逃避宿主的免疫应答^[29-30]。

目前,治疗肝癌的主要方法以手术、放射介入、化疗为主,但整体疗效有限,多数患者就诊时已属肝癌晚期,不符合手术治疗范围,化学药物可以阻止癌细胞的增殖,但药物不仅作用于癌细胞,也会对正常的组织细胞造成损伤,引起临床不良反应。放射治疗的不良反应也一样明显。因此需要寻求有效治疗肝癌的新手段,而生物疗法是肿瘤治疗领域的一场革新,其中就包括免疫检查点抑制治疗法,而 Fas/FasL 通路在多种疾病特别是肿瘤发生、发展过程中起重要作用,有可能成为治疗的靶点。

综上所述,本研究结果显示,添加的 IL2 信号肽的分子能够引导 FasL 蛋白分泌到 HepG2 细胞外,还能抑制肿瘤 HepG2 细胞增殖,提高细胞内凋亡信号因子的转录水平和蛋白表达水平,具有明显的抗肿瘤作用。但本实验仅在细胞外证明外源性 FasL 对 HepG2 细胞的抑制效果,本课题组还将进一步开展动物模型体内实验,验证本研究采用的方法在临床治疗中的可行性。本研究成功采用慢病毒系统表达可分泌至细胞外的 FasL 蛋白,初步证明了靶向 Fas/FasL 通路治疗肝癌的可能性,为肝癌治疗的研究提供了新的思路。

参考文献

- [1] GLUKHOVA X A, TRIZNA J A, PROUSSAKOVA O V, et al. Impairment of Fas-ligand-caveolin-1 interaction inhibits Fas-ligand translocation to rafts and Fas-ligand-induced cell death[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 73.
- [2] GUEGAN J P, LEGEMBRE P. Nonapoptotic functions of Fas/CD95 in the immune response[J]. *FEBS J*, 2018, 285(5): 809-827.
- [3] KUCHAR M, STRIZOVA Z, VOTAVA M, et al. The relevance of Fas/Fas ligand axis in the tumor microenvironment of salivary gland adenoid cystic carcinoma[J]. *Oral Oncol*, 2019, 97: 135-136.
- [4] MODIANO J F, BELLGRAU D. Fas ligand based immunotherapy: a potent and effective neoadjuvant with checkpoint inhibitor properties, or a systemically toxic promoter of tumor growth[J]. *Discov Med*, 2016, 21(114): 109-116.
- [5] RIEUX-LAUCAT F, MAGERUS-CHATINET A, NEVEN B. The autoimmune lymphoproliferative syndrome with defective FAS or FAS-ligand functions[J]. *J Clin Immunol*, 2018, 38(5): 558-568.
- [6] NAGAO M, NAKAJIMA Y, HISANAGA M, et al. The alteration of Fas receptor and ligand system in hepatocellular carcinomas: how do hepatoma cells escape from the host immune surveillance in vivo[J]. *Hepatology*, 1999, 30(2): 413-421.
- [7] O'BRIEN D I, NALLY K, KELLY R G, et al. Targeting the Fas/Fas ligand pathway in cancer[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2005, 9(5): 1031-1044.
- [8] CARNEVALE G, CARPINO G, CARDINALE V, et al. Activation of Fas/FasL pathway and the role of c-FLIP in primary culture of human cholangiocarcinoma cells[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 14419.
- [9] KOSHKINA N, YANG Y, KLEINERMAN E S. The Fas/FasL signaling pathway: its role in the metastatic process and as a target for treating osteosarcoma lung metastases[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1258: 177-187.
- [10] UPADHYAY R, BOIARSKY J A, PANTSULAIA G, et al. A critical role for fas-mediated off-target tumor killing in T-cell immunotherapy[J]. *Cancer Discov*, 2021, 11(3): 599-613.
- [11] MITRAGOTRI S, BURKE P A, LANGER R. Overcoming the challenges in administering biopharmaceuticals: formulation and delivery strategies[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13(9): 655-672.
- [12] YE H M Y, HUANG C W, CHANG J W, et al. A novel nanostructured supramolecular hydrogel self-assembled from tetraphenylethylene-capped dipeptides[J]. *Soft matter*, 2016, 12(30): 6347-6351.
- [13] ANGELOVA A, GARAMUS V M, ANGELOV B, et al. Advances in structural design of lipid-based nanoparticle carriers for delivery of macromolecular drugs, phytochemicals and anti-tumor agents[J]. *Adv Colloid Interface Sci*, 2017, 249: 331-345.
- [14] TEN HAGEN T L, SEYNHAEVE A L, VAN TIEL S T, et al. Pegylated liposomal tumor necrosis factor- α results in reduced toxicity and synergistic antitumor activity after systemic administration in combination with liposomal doxorubicin (Doxil) in soft tissue sarcoma-bearing rats[J]. *Int J Cancer*, 2002, 97(1): 115-120.
- [15] KONG Q, WU X, DUAN W, et al. Penethylidine hydrochloride exerts protective effects in rats with acute lung injury via the Fas/FasL signaling pathway[J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(5): 3598-3606.
- [16] LU C, PASCHALL AV, SHI H, et al. The MLL1-H3K4me3 axis-mediated PD-L1 expression and pancreatic cancer immune evasion[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2017, 109(6): djw283.
- [17] MUSTAFA N, MITXELENA J, INFANTE A, et al. E2f2 attenuates apoptosis of activated t lymphocytes and protects from immune-mediated injury through repression of Fas and FasL[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 23(1): 311.
- [18] YAJIMA T, HOSHINO K, MURANUSHI R, et al. Fas/FasL signaling is critical for the survival of exhausted antigen-specific CD8(+) T cells during tumor immune response[J]. *Mol Immunol*, 2019, 107: 97-105. (下转第 460 页)

- 达及功能预测[J]. 结直肠肛门外科, 2017, 23(3): 269-272.
- [10] JIN L, WESSELY O, MARCUSSEON EG, et al. Prooncogenic factors miR-23b and miR-27b are regulated by Her2/Neu, EGF, and TNF-alpha in breast cancer[J]. Cancer Res, 2013, 73(9): 2884-2896.
- [11] 胡秀秀, 孙慧玲, 潘玉琴. microRNA 在结直肠癌诊断、治疗及预后中的研究进展[J]. 临床检验杂志, 2017, 35(8): 624-627.
- [12] WANG L, CHO K B, LI Y, et al. Long noncoding RNA (lncRNA)-mediated competing endogenous RNA networks provide novel potential biomarkers and therapeutic targets for colorectal cancer[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(22): 5758.
- [13] BALACESCU O, SUR D, CAINAP C, et al. The impact of miRNA in colorectal cancer progression and its liver metastases[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(12): 3711.
- [14] LIN Z, NI X, DAI S, et al. Screening and verification of long noncoding RNA promoter methylation sites in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Cell Int, 2020, 20(1): 311.
- [15] LI G, QIAN L, TANG X, et al. Long noncoding RNA growth arrest- specific 5 (GAS5) acts as a tumor suppressor by promoting autophagy in breast cancer[J]. Mol Med Rep, 2020, 22(3): 2460-2468.
- [16] YU Y, GAO F, HE Q, et al. lncRNA UCA1 functions as a ceRNA to promote prostate cancer progression via sponging miR143[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2020, 19: 751-758.
- [17] LIU Y, LIN W, DONG Y, et al. Long noncoding RNA HCG18 up-regulates the expression of WIPF1 and YAP/TAZ by inhibiting miR-141-3p in gastric cancer[J]. Cancer Med, 2020, 9(18): 6752-6765.
- [18] NISSAN A, STOJADINOVIC A, MITRANIROSEN-BAUM S, et al. Colon cancer associated transcript-1: a novel RNA expressed in malignant and pre-malignant human tissues[J]. Int J Cancer, 2012, 130(7): 1598-1606.
- [19] TAKAHASHI Y, SAWADA G, KURASHIGE J, et al. Amplification of PVT-1 is involved in poor prognosis via apoptosis inhibition in colorectal cancers[J]. Br J Cancer, 2014, 110(1): 164-171.
- [20] 梁思远, 徐艳松, 陆绍龙, 等. SNHG11 在结直肠癌中的表达及功能预测[J]. 结直肠肛门外科, 2017, 23(3): 269-272.
- [21] XU W, ZHOU G, WANG H, et al. Circulating lncRNA SNHG11 as a novel biomarker for early diagnosis and prognosis of colorectal cancer[J]. Int J Cancer, 2019, 146(10): 2901-2912.
- [22] YANG C X, SEDHOM W, SONG J, et al. The Role of MicroRNAs in Recurrence and Metastasis of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma[J]. Cancers (Basel), 2019, 11(3): 395.
- [23] ZHANG Z, LIU S, SHI R, et al. miR-27 promotes human gastric cancer cell metastasis by inducing epithelial-to-mesenchymal transition[J]. Cancer Genetics, 2011, 204(9): 486-491.
- (收稿日期: 2022-09-20 修回日期: 2022-12-26)
-
- (上接第 454 页)
- [19] OWEN-SCHAUB L, CHAN H, CUSACK J C, et al. Fas and Fas ligand interactions in malignant disease[J]. Int J Oncol, 2000, 17(1): 5-12.
- [20] 高彦军, 林红卫, 王在强, 等. Fas/FasL 途径在 PM2.5 诱导肺泡上皮细胞凋亡中的作用及机制[J]. 山西医科大学学报, 2022, 53(4): 428-435.
- [21] 戴芳, 林泽森, 买鹏宇, 等. Fas/FasL 基因和蛋白表达对精子浓度和活力的影响[J]. 中华男科学杂志, 2021, 27(12): 1069-1074.
- [22] 王旭莹, 郭志义, 郝会宇, 等. SiO₂ NPs 通过诱导氧化应激激活 Fas/FasL 通路促进 TM4 细胞凋亡[J]. 生物化学与生物物理进展, 2022, 49(10): 2024-2033.
- [23] 蔡丽娟, 任妹, 刘剑荣, 等. 毒性弥漫性甲状腺肿病患者 131I 治疗前后外周血 Th1/Th2 细胞及 Fas/FasL 表达分析[J]. 中国当代医药, 2022, 29(5): 59-61.
- [24] 张娜, 易茂林, 田双黎. 硒酵母联合地塞米松治疗慢性淋巴细胞性甲状腺炎的疗效及其对氧化/抗氧化系统和 Fas/FasL 表达的影响[J]. 药物评价研究, 2021, 44(9): 1956-1960.
- [25] 张洪波, 陈冬霞, 冯青芝, 等. 左乙拉西坦联合鼠神经生长因子治疗难治性癫痫临床疗效及对患者血清 Bcl-2 Fas/FasL 水平的影响[J]. 临床心身疾病杂志, 2021, 27(4): 11-15.
- [26] 朱垠, 郑浩轩. Fas/FasL 信号通路对大肠癌恶性生物学特性的影响[J]. 现代消化及介入诊疗, 2020, 25(8): 989-992.
- [27] 王芳, 吴晓婷, 路志国, 等. 过表达 CD47 通过阻断 Fas/FasL 途径抑制 SW480 人结肠癌细胞凋亡[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2021, 37(10): 904-909.
- [28] 宋文龙, 汪建军. 辣椒素通过 Fas/FasL 死亡受体通路诱导胃癌细胞发生凋亡的研究[J]. 实用中医内科杂志, 2021, 35(5): 129-132.
- [29] 焦晓路, 何秀萍. PI3K/AKT 及 Fas/FasL 信号通路在卵巢癌中作用研究进展[J]. 中国生育健康杂志, 2020, 31(6): 596-599.
- [30] GREGORY M S, SAFF R R, MARSHAK-ROTHSTEIN A, et al. Control of ocular tumor growth and metastatic spread by soluble and membrane Fas ligand[J]. Cancer Res, 2007, 67(24): 11951-11958.
- (收稿日期: 2022-09-28 修回日期: 2022-12-31)