

可替宁对穿孔素/粒酶 B 诱导的 NCI - H460 肺癌细胞凋亡的抑制作用

李春生 黎运呈

摘要 **目的** 探讨可替宁对穿孔素/粒酶 B(perforin/granzyme B)诱导的 NCI - H460 非小细胞肺癌细胞凋亡的抑制作用及其机制。**方法** 以人肺癌细胞株 NCI - H460 为研究对象,采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色检测细胞生长增殖活性,吖啶橙/溴化乙锭(AO/EB)双染荧光显微镜下观察细胞凋亡形态学变化,异硫氰酸荧光素标记的膜联蛋白 V/碘化丙啶(Annexin V - FITC/PI)染色后流式细胞仪定量检测细胞凋亡率,RT - PCR 及 Western blot 法检测凋亡抑制蛋白 XIAP 及 Survivin 的表达量。**结果** (1)不同浓度可替宁单独作用 NCI - H460 细胞时未见明显诱导凋亡现象,可显著抑制细胞生长,其抑制率与作用时间和剂量呈正相关。(2)0.25 $\mu\text{g/ml}$ 浓度穿孔素作用 NCI - H460 细胞(1×10^6 个)时,PI 染核率可达到 90% 以上。而当加入 1.5 μl 粒酶 B(1 $\mu\text{g/ml}$)孵育 6h 时,穿孔素/粒酶 B 组细胞可呈现 90% 以上的凋亡现象。(3)166ng/ml 浓度可替宁作用穿孔素/粒酶 B 预处理的细胞 6h 时可见明显凋亡抑制现象,当检测其凋亡抑制蛋白 XIAP、survivin 表达量时,发现穿孔素/粒酶 B 组表达量明显降低,可替宁组表达量较高,而当可替宁联合穿孔素/粒酶 B 时表达量最高。**结论** 可替宁可明显抑制穿孔素/粒酶 B 诱导的 NCI - H460 肺癌细胞凋亡现象,这种作用可能与凋亡抑制蛋白 XIAP、survivin 的表达上调有关。

关键词 可替宁 NCI - H460 肺癌细胞 凋亡 穿孔素 粒酶 B

Cotinine Inhibits Perforin/Granzyme B - Induced Apoptosis in NCI - H460 Lung Cancer Cells. Li Chunsheng, Li Yuncheng. Zhoushan Hospital, Zhejiang 316004, China

Abstract **Objective** To study the mechanism that cotinine inhibits perforin/granzyme B - induced apoptosis in NCI - H460 lung cancer cells. **Methods** An MTT assay, AO/EB and Annexin V - FITC/PI staining, RT - PCR and Western blotting were applied to identify the viability of cells, characteristic morphology and stages of apoptosis, expression of XIAP and Survivin respectively. **Results** First, we observed that cotinine induced no significant apoptosis when used alone, and inhibited cell proliferation in a concentration - and time - dependent manner ($P < 0.01$). Second, when perforin (0.25 $\mu\text{g/ml}$) worked on NCI - H460 cells (1×10^6), PI staining rate was up to 90%. When adding 1.5 μl of granzyme B (1 $\mu\text{g/ml}$) of 6h incubation, the cells could present more than 90% apoptosis. Third, we observed that when cotinine (166ng/ml) combined with perforin/granzyme B for 6h, it could inhibit significant apoptosis. Furthermore, the higher of XIAP and survivin was observed when cotinine was used alone, the lowest of XIAP and Survivin was observed when perforin/granzyme B was used alone, but the highest of XIAP and Survivin was also observed when perforin/granzyme B was used combined with cotinine. **Conclusion** Cotinine could inhibit perforin/granzyme B - induced apoptosis in NCI - H460 lung cancer cells. This effect may be related to the up - regulation of inhibitor of apoptosis protein XIAP and Survivin.

Key words Cotinine; NCI - H460 lung cancer cells; Apoptosis; Perforin; Granzyme B

肺癌的发病率和病死率在全球范围内均居首位,已经造成全世界 130 万的死亡人数^[1]。现在大家普遍认为肺癌的高发生率与空气中的致癌物有密切关系,特别是吸烟。尼古丁是烟草的主要成分,而可替宁是尼古丁的主要代谢产物,可替宁在体内的浓度依赖于机体暴露在吸烟环境中的时间^[2]。早先的报道

称可替宁能诱发肺癌、慢性支气管炎、肺气肿、心脑血管疾病等。现在也有证据表明可替宁可以导致 A549 肺癌细胞骨架的改变,特别是 F - 肌动蛋白的结构。另外,可替宁还可引起 A549 肺癌有丝分裂突变而导致细胞死亡^[3]。

效应细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)对靶细胞实行杀伤的途径主要是通过颗粒胞吐分泌穿孔素、颗粒酶介导的溶细胞作用。粒酶 B 是细胞毒性丝氨酸蛋白酶,当联合穿孔素作用时,粒酶 B 可释放到靶细胞的细胞质,通过直接或者间

作者单位:316004 浙江省舟山医院病理科(李春生);感染科(黎运呈)

通讯作者:黎运呈,电子信箱:zengfang20052008@yahoo.com.cn

接激活 caspases 的方式诱导凋亡。Xu 等对 CTL 杀伤肿瘤细胞的机制研究表明,CTL 杀伤肿瘤细胞时主要通过释放穿孔素/颗粒酶的细胞毒作用杀伤肿瘤细胞,而不是 Fas/FasL 介导的凋亡程序,这说明机体的 TIL 和自然杀伤细胞等免疫活性细胞已经对肿瘤作出了相应的反应。Kontani 等^[4]通过免疫组织化学的方法研究表明,肺癌患者有 100% 和 54% 的人颗粒酶 B 和穿孔素阳性,有趣的是它们不是表达在肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocyte, TIL)中而是在肿瘤细胞中。然而可替宁是否会抑制由机体免疫活性细胞产生的穿孔素/粒酶 B 介导的肺癌细胞凋亡作用,目前尚未阐明。

材料与方法

1. 主要试剂:RPMI 1640 培养基和小牛血清购自 Gibco 公司。异硫氰酸荧光素标记的膜联蛋白 V (annexin V - fluorescein 5 - isothiocyanate, Annexin V - FITC) 和碘化丙啶(propidium iodide, PI) 双染凋亡试剂购自 BD 公司。吖啶橙/溴乙啶(acridine orange/ethidium bromide, AO/EB) 和 3 - (4,5 - 二甲基噻唑 - 2) - 2,5 - 二苯基四氮唑盐[3 - (4,5 - dimethylthiazol - 2 - yl) - 2,5 - diphenyltetrazolium bromide, MTT] 染色剂购自碧云天生物技术有限公司。RT - PCR 试剂盒购自 Promega 公司。PCR 引物均由上海生工合成。XIAP、Survivin 及 actin 抗体均购自 Santa cruz 公司。可替宁购自 Sigma 公司。穿孔素和粒酶 B 均购自 Alexis 公司,其他化学试剂购自国药,均为 AR 级。

2. 细胞培养:NCI - H460 肺癌细胞购自中国科学院上海细胞库。采用 RPMI - 1640 培养基和 10% 小牛血清作为基础培养基,添加 100U/ml 的青霉素和 100U/ml 的链霉素,在 37℃, 5% CO₂ 的恒温恒湿培养箱中培养。

3. 穿孔素浓度的确立:穿孔素在诱导细胞凋亡前应确立穿透靶细胞的最低浓度。按照试剂说明书将 1μg 穿孔素溶解到 1ml 的穿孔素稀释液中,配成母液浓度是 1μg/ml。用 1% 浓度的 BSA - HEPES buffer (BSA 溶解于不含 Ca²⁺ 的 HEPES 缓冲液配成 1% 的浓度) 50μl 梯度稀释穿孔素成终浓度分别为 1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125μg/ml 的不同浓度穿孔素组。收集细胞并计数,调整细胞密度为 1 × 10⁶ 个细胞/组。用 Ca²⁺ - HEPES buffer 洗细胞 2 次,将不同浓度的穿孔素加到各组细胞中,37℃ 时共孵育 15min,采用碘化丙啶(PI) 染色法确定穿透性达到最大时的最小穿孔素浓度,染核率 = PI 染色阳性的细胞/总的细胞 × 100%。

4. 粒酶 B 浓度的确立及联合穿孔素触发凋亡的检测:收集细胞,调整细胞密度为 1 × 10⁶ 个细胞/组。采用 Ca²⁺ - HEPES buffer 清洗细胞 2 次,加入上述确定的穿孔素浓度,使细胞数与确定的穿孔素浓度剂量的比例是 1 × 10⁶ 个细胞/50 微升,再加入 0.5、1、1.5、2μl 等不同剂量粒酶 B (1μg/ml),混匀后滴到 24 孔板爬片上继续培养,孵育 4 ~ 6h 后采用 AO/EB

染色后荧光显微镜下观察细胞形态,并采用 Annexin V/PI 双染流式细胞仪检测凋亡细胞数。

5. 细胞生长抑制率曲线:采用 MTT 比色法检测不同浓度可替宁(0、3、6、12、24、48、96、192ng/ml)作用 NCI - H460 细胞时的生长抑制率。以 5 × 10³ 个细胞/孔的密度将对数生长期细胞种到 96 孔板中。24h 孵育后,采用可替宁不同浓度组作用细胞 6、12h 后,每孔加入 20μl MTT (5mg/mL 溶解于 PBS)。孵育 4h,吸弃 MTT,加 150μl DMSO,37℃ 孵育 10 min 直到结晶全部溶解。用 680 型酶标仪在 490 nm 波长时检测吸光度。

6. 细胞凋亡形态学改变及其定量检测:单独或者联合应用可替宁和穿孔素/粒酶 B 作用 NCI - H460 细胞 6h 被检测。采用 Annexin V 和 PI 双染的方法检测其凋亡细胞数。细胞样品采用冰冷的 PBS 洗 1 次,在 500 × g,4℃ 时离心 5min。弃上清,采用冰冷的 PBS 重悬细胞,使其密度为 5 × 10⁵ ~ 5 × 10⁶ 个细胞/毫升。取出 100μl 的重悬液加入 Annexin V - FITC 溶液 5μl 和 PI 溶液为 2.5μl,吹打匀后避光孵育 10min。加冰冷 400μl 的结合液到细胞样品中,混匀上机检测,结果采用 CellQuest 软件分析。

7. RT - PCR 分析基因 XIAP 和 survivin 的表达量:收集细胞计数,提取总 RNA,采用 AMV - RT kit (Promega) 试剂盒抽提说明书进行 cDNA 提取。采用一步法扩增 XIAP (368bp), Survivin (290bp), β - actin (234bp) 基因片段,引物分别是:XIAP 前向引物:5' - GTGACTAGATGTCCACAAGG - 3',反向引物:5' - CTTGAGGAGTGTCTG GTAAG - 3'; survivin 前向引物:5' - CTTGAAAGTGGCACCAGAGG - 3',反向引物:5' - TG - CAGCTCAGATTCAACAGG - 3'; β - actin 前向引物:5' - GGACTTCGAGCAAGAGATGG - 3',反向引物:5' - AGCACT - GTG TTGGCGTACAG - 3'。RT - PCR 的条件如下:45℃ 反转录 45min;95℃ 预变性 10min;95℃ 变性 30s,50℃ (XIAP)、60℃ (survivin)、56℃ (β - actin) 退火 30s,72℃ 延伸 45s,共 35 个循环;72℃ 10min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离,凝胶成像仪下拍照并采用 Quantity one 软件分析数据。

8. Western blotting 分析蛋白 XIAP 和 survivin 的表达量:收集细胞,分别加入适量含 PMSF 的 RAPI 裂解液,冰上裂解 30min,4℃ 下 12000r/min 离心 15min,取总蛋白上清液 24μl,加 6μl 5 × 上样缓冲液混匀。10min 变性后取 20μg 上样,进行 SDS - PAGE 电泳分离蛋白(12% 分离胶,5% 浓缩胶),转移至 PVDF 膜上(300mA,30min),5% 脱脂牛奶封闭非特异抗原 2h,按照蛋白质 Marker 切割 PVDF 膜,并分别加入 1:500 稀释的兔抗人 XIAP 多克隆抗体,兔抗人 survivin 多克隆抗体,β - actin 多克隆抗体,4℃ 过夜。PBS - T 洗涤 3 次,每次 10min。再分别加入 1:5000 稀释的羊抗兔 IgG - HRP,室温震荡 1h, PBST 洗涤 3 次,每次 15min。ECL 系统显色,凝胶成像仪检测,采用 Quaintity one 分析软件进行条带分子量及灰度值的分析。

9. 统计学方法:用 SPSS 软件包(15.0)分析数据,所得数

据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 实验重复至少 3 次。采用单因素方差分析、直线相关与回归分析进行统计学处理, $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

结 果

1. 穿孔素及粒酶 B 浓度的确立及其凋亡的诱导: 用 1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125、0.015625 $\mu\text{g/ml}$ 等不同终浓度的穿孔素作用 1×10^6 个 NCI-H460 肺癌细胞时, 1、0.5 $\mu\text{g/ml}$ 高浓度的穿孔素导致细胞全部死亡, PI 染核率基本为 100%, 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 中浓度的穿孔素细胞染核率为 90% 以上, 而 0.125、0.0625、0.03125、0.015625 $\mu\text{g/ml}$ 低浓度组随着浓度的降低, 穿孔素细胞染核率越低。故我们选择 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 浓度穿孔素作为最适合的浓度组去穿透细胞膜。当用 0.5、1、1.5、2 μl 等不同剂量的粒酶 B 作用 1×10^6 个细胞时, 我们分别采用 AO/EB, Annexin V/PI 双染法检测其凋亡率, 结果 1 μl 低剂量的粒酶 B 导致的凋亡率为 70% 左右, 而 1.5、2 μl 剂量的粒酶 B 均可导致 90% 以上的细胞凋亡率, 见图 1。故我们选择最低的 1.5 μl 的粒酶 B 剂量作为作用终剂量。因此, 穿孔素/粒酶 B 作用 NCI-H460 细胞 (1×10^6) 时的作用浓度及剂量分别为 50 μl 穿孔素 (0.25 $\mu\text{g/ml}$) 和 1.5 μl 粒酶 B (1 $\mu\text{g/ml}$)。

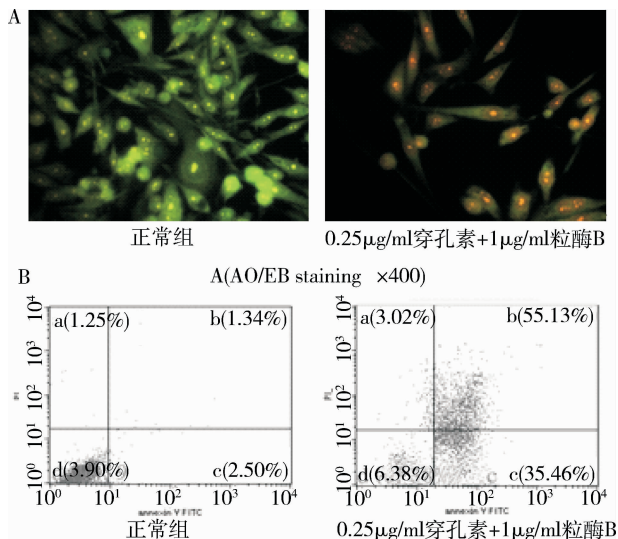


图 1 穿孔素及粒酶 B 浓度的确立

A. 采用 AO/EB 染色荧光显微镜下观察 50 μl 穿孔素 (0.25 $\mu\text{g/ml}$) 联合 1.5 μl 粒酶 B (1 $\mu\text{g/ml}$) 作用时细胞形态。B. Annexin V/PI 双染法流式细胞仪检测 50 μl 穿孔素 (0.25 $\mu\text{g/ml}$) 联合 1.5 μl 粒酶 B (1 $\mu\text{g/ml}$) 作用细胞凋亡率。左上象限是机械性损伤细胞 (a 区, Annexin V⁻/PI⁺) ; 右上象限是中晚期凋亡和坏死细胞 (b 区, Annexin V⁺/PI⁺) ; 右下象限是早期凋亡细胞 (c 区, Annexin V⁺/PI⁻) ; 左下象限是正常活细胞 (d 区, Annexin V⁻/PI⁻)

2. 可替宁抑制 NCI-H460 细胞增殖, 但无凋亡诱导作用: MTT 实验表明, 0、3、6、12、24、48、96、192 ng/ml 不同浓度可替宁对 NCI-H460 细胞生长具有明显抑制作用。随着可替宁浓度的增大, 对细胞的生长抑制作用越明显, 并表现出时间剂量依赖性, 见图 2。我们采用 Annexin V/PI 法检测凋亡率, 发现采用不同浓度和时间时, 可替宁作用 NCI-H460 细胞均不会诱导明显的凋亡现象 (数据没有显示)。于是我们推论由于可替宁的细胞毒性作用导致了细胞生长受到抑制, 且可替宁作用 NCI-H460 细胞 6h 半数抑制率 IC_{50} 是 166 ng/ml。

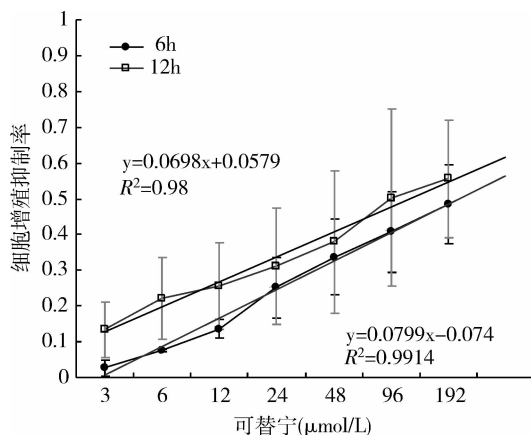


图 2 不同浓度的可替宁 (0、3、6、12、24、48、96、192 ng/ml) 作用 NCI-H460 细胞 6、12h 细胞生长抑制率

3. 可替宁对穿孔素/粒酶 B 诱导的细胞凋亡的抑制作用: 实验分成正常组, 可替宁 166 ng/ml 组, 穿孔素/粒酶 B 组, 联合组 (可替宁 166 ng/ml + 穿孔素/粒酶 B) 共 4 组。分别作用 NCI-H460 细胞共 6h, 观察细胞的形态学改变。正常组细胞呈叶形, 单层贴壁生长; 可替宁 166 ng/ml 组细胞数目明显减少; 穿孔素/粒酶 B 组细胞凋亡改变明显, 可见细胞核质比减少, 包膜皱缩, 出泡, 凋亡小体较多; 联合组细胞凋亡现象不明显。我们采用流式细胞仪检测 4 组的凋亡率, 结果穿孔素/粒酶 B 组凋亡率很高, 可达到 90% 以上, 这与我们在图 1 中检测的结果一致。而正常组、可替宁 166 ng/ml 组、联合组未见明显凋亡现象。因此, 可替宁对穿孔素/粒酶 B 诱导的细胞凋亡现象是具有抑制作用的。

4. 可替宁抑制穿孔素/粒酶 B 诱导的细胞凋亡的机制: 实验分成正常组, 可替宁 166 ng/ml 组, 穿孔素/粒酶 B 组, 联合组 (可替宁 166 ng/ml + 穿孔素/粒酶 B) 共 4 组。分别作用 NCI-H460 细胞 6h, 收集细

胞后,抽提 RNA 及蛋白。RT-PCR 结果分析:我们通过图 3A 可知, RNA 提取很好, 28s、18s、5s 均清晰可见, 未见降解片段。进一步采用一步法扩增凋亡抑制基因 XIAP、survivin 基因的表达, 发现与正常对照组比较, 可替宁 166ng/ml 组的表达分别为 1.092 ± 0.035 和 0.568 ± 0.163 , 无统计学意义, 而联合组表达远远高于正常组, 分别为 1.225 ± 0.109 和 0.750 ± 0.275 , 具有显著性差异。穿孔素/粒酶 B 组的表达

量最少, 分别为 0.912 ± 0.126 和 0.419 ± 0.191 。见图 3B、3C。Western blotting 结果分析: 提取蛋白定量后进行 XIAP、survivin 蛋白表达量检测。与正常对照组比较, 可替宁 166ng/ml 组的表达分别为 0.389 ± 0.042 和 0.168 ± 0.011 , 无统计学意义, 而联合组表达远远高于正常组, 分别为 1.021 ± 0.054 和 0.501 ± 0.023 , 具有显著性差异。穿孔素/粒酶 B 组的表达量最少, 分别为 0.362 ± 0.078 和 0.117 ± 0.009 。见图 4。

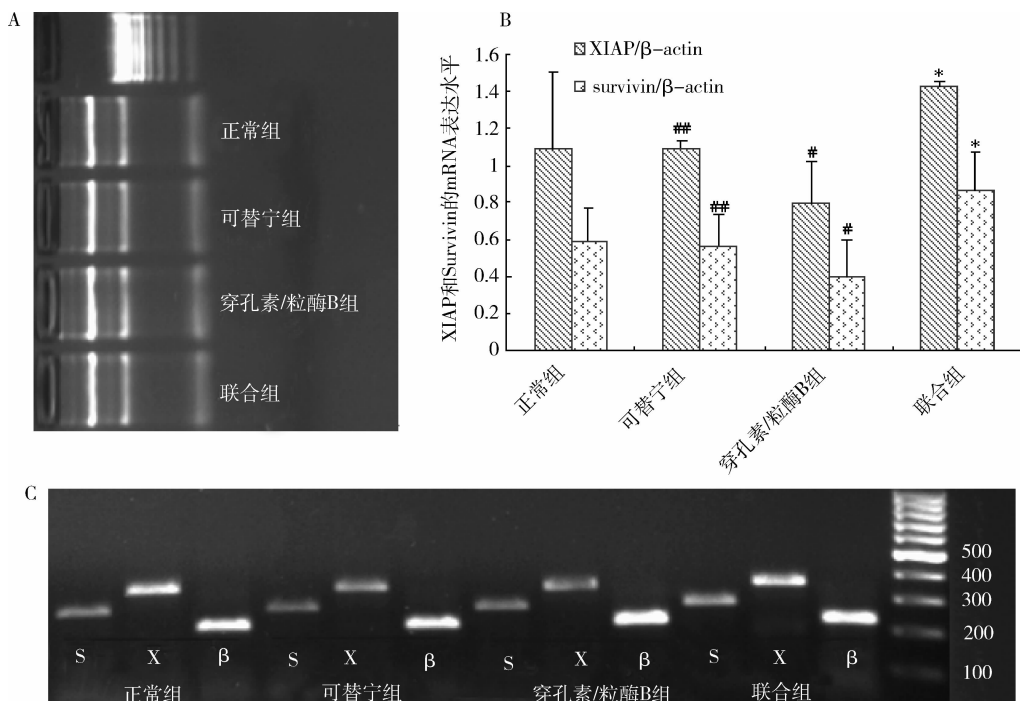


图 3 采用 RT-PCR 法检测正常组, 可替宁 166ng/ml 组, 穿孔素/粒酶 B 组, 联合组 (可替宁 166ng/ml + 穿孔素/粒酶 B) 分别作用 NCI-H460 细胞共 6h

A. 抽提总 RNA 并电泳检测; B. RT-PCR 分析显示可替宁单独或者联合穿孔素/粒酶 B 时 XIAP 和 survivin mRNA 的表达水平; C. 柱状图显示 XIAP 和 survivin mRNA 的表达水平。 $\bar{x} \pm s$, $n=5$ 。与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与联合组比较, # $P < 0.01$, ## $P < 0.05$

讨 论

粒酶 B 是颗粒酶家族中最有效的致凋亡成员, 尽管粒酶 B 也能自主进入靶细胞, 不需要穿孔素的辅助, 但穿孔素对凋亡过程的起始和颗粒酶进入核内有关键作用, 因为纯化的颗粒酶单独存在不能引起靶细胞凋亡, 必须两者同时存在时, 才可明显导致靶细胞凋亡^[5]。因此, 许多研究证明穿孔素和颗粒酶可作为活化细胞杀伤效应的特异性分子, 是活化细胞功能诊断的可靠指标。凋亡抑制蛋白 (inhibitor of apoptosis proteins, IAPs) 家族是继 Bcl-2 家族发现的第 2 个在凋亡过程中主要起抗凋亡作用的家族, 与 Bcl-2 家族不同的是 IAPs 家族成员均具有抗凋亡作

用。近年研究发现, 细胞凋亡受抑与增殖失控和分化障碍一样在肿瘤发生与发展中起重要作用, 凋亡抑制蛋白 XIAP、survivin 的抗凋亡作用尤其受到重视。

本文结果显示穿孔素单独作用 NCI-H460 细胞时, PI 能进入细胞核染色, 而 Annexin V 却未染色, 可见穿孔素只是具有细胞打孔功能, 未见引发细胞凋亡的作用。而当加入粒酶 B 时, 6h 孵育后即可见凋亡率达到 90% 以上, 结果与 Shi 等^[6]学者研究具有相似性。可替宁单独作用 NCI-H460 细胞时细胞生长受到抑制却未引发凋亡现象, 而 RT-PCR 及 Western blotting 实验结果也显示可替宁 166ng/ml 组的凋亡抑制蛋白表达量与正常对照组比较无统计学意义, 可

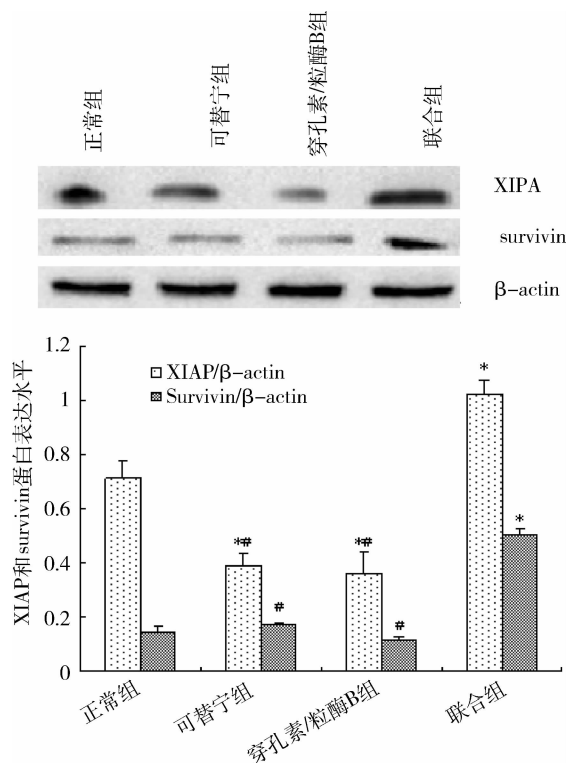


图4 采用 Western blotting 法检测正常组,可替宁 166ng/ml 组,穿孔素/粒酶 B 组,联合组(可替宁 166ng/ml + 穿孔素/粒酶 B)分别作用 NCI-H460 细胞共 6h

$\bar{x} \pm s$, $n=5$;与正常对照组比较, * $P < 0.01$;与联合组比较, # $P < 0.01$

见这两者是具有一致性的。说明当粒酶 B 和穿孔素联合作用 NCI-H460 细胞时,可诱发其凋亡。

RT-PCR 及 Western blotting 结果均发现联合组作用细胞 6、12 h 时凋亡抑制蛋白的表达量远远高于其他组,可能是由于 XIAP 及 survivin 的过量表达,导致细胞在联合作用时穿孔素/粒酶 B 产生的凋亡作用不能发挥,于是未见明显凋亡现象的产生。穿孔素/粒酶 B 组的表达量最少,因此,凋亡抑制蛋白的减少,导致凋亡的发生,这与我们前面穿孔素联合粒酶 B 时凋亡率很高的检测结果具有一致性。

本课题将在存在或缺乏穿孔素/粒酶 B 的情况下加入可替宁到 NCI-H460 肺癌细胞株,检测 NCI-H460 细胞中凋亡抑制蛋白基因家族中两个新成员

X 连锁凋亡抑制蛋白和生存素的表达,探讨可替宁对穿孔素/粒酶 B 介导的肺癌细胞株凋亡过程中的作用机制,发现可替宁在抑制穿孔素/粒酶 B 介导的肺癌细胞株凋亡中的关键分子靶点以及治疗和判断患者预后的分子标志物,阐明肺癌患者吸烟导致肺癌发生和发展过程中逃避机体免疫系统监视的机制,为预防和治疗肺癌提供理论基础均具有具有重要意义。

由上可知,可替宁可以抑制穿孔素/粒酶 B 诱导的 NCI-H460 肺癌细胞凋亡,与可替宁上调凋亡抑制蛋白 XIAP 和 survivin 的表达有关。因此,进入到这些肿瘤细胞内的免疫毒性分子穿孔素未能启动细胞的凋亡系统和(或)是已经启动但因受到某种物质的阻断而终止了细胞的凋亡程序,结果未能杀死肿瘤细胞,本项目对于阐明肺癌进展过程中出现的阻碍凋亡的分子作用、探讨肺癌发生和发展过程中逃避机体免疫系统监视的机制,为预防和治疗肺癌提供理论基础均具有重要意义。

参考文献

- 1 WHO Cancer Feb 2006. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> (10.04.2008)
- 2 Baltar VT, Xun WW, Chuang SC, *et al.* Smoking, secondhand smoke, and cotinine levels in a subset of EPIC cohort[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2011, 20(5):869-875
- 3 Nowak JM, Grzanka A, Gagat M. The influence of cotinine on the non-small-cell lung cancer line A549 [J]. Postepy Hig Med Dosw, 2009, 63 (1):1-7
- 4 Kontani K, Sawai S, Hanaoka J. Involvement of granzyme B and perforin in suppressing nodal metastasis of cancer cells in breast and lung cancers [J]. Eur J Surg Oncol, 2001, 27 (2):180-186
- 5 Yamada T, Tomita T, Weiss LM. Toxoplasma gondii inhibits granzyme B-mediated apoptosis by the inhibition of granzyme B function in host cells[J]. Int J Parasitol, 2011, 41(6):595-607
- 6 Shi L, Keefe D, Durand E. Granzyme B binds to target cells mostly by charge and must be added at the same time as perforin to trigger apoptosis [J]. J Immunol, 2005, 74 (9): 5456-5546

(收稿:2011-07-04)

(修回:2011-07-27)

欢迎订阅

欢迎赐稿