

# 自杀基因 ePNP 诱导小鼠巨噬细胞凋亡的研究

于敏敏 尹洪超

**摘要** **目的** 通过制作 ePNP 转基因小鼠,研究自杀基因 ePNP 对小鼠巨噬细胞凋亡的影响。**方法** 实验分 ePNP 转基因小鼠组和野生型小鼠组,在体外培养的各组小鼠腹腔巨噬细胞中分别加入浓度为 0、0.125、0.25、0.5、1.0 和 2.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的前体药物氟达拉滨(fludarabine),采用活细胞计数试剂盒(CCK-8)检测腹腔巨噬细胞加药后的细胞存活率;其次,给 ePNP 转基因小鼠和野生型小鼠腹腔注射剂量分别为 0、10、20、60  $\text{mg}/\text{kg}$  的 fludarabine,分别采用流式细胞术和原位凋亡检测试剂盒(TUNEL 法)检测加入 fludarabine 后腹腔巨噬细胞和组织(肺、脾)巨噬细胞的凋亡情况。**结果** CCK-8 检测显示给药后 ePNP 小鼠腹腔巨噬细胞存活率明显下降,尤其在浓度为 2.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  时,细胞存活率仅为 10.8%  $\pm$  0.8%;其次,流式细胞术和 TUNEL 结果也显示给药后其腹腔巨噬细胞和肺、脾巨噬细胞凋亡明显增加,并且存在剂量效应关系。CCK-8、流式细胞术和 TUNEL 法均显示野生型小鼠给药后没有明显巨噬细胞凋亡。**结论** 自杀基因 ePNP 能在前体药物 fludarabine 协同作用下,诱导小鼠巨噬细胞凋亡。

**关键词** 自杀基因 巨噬细胞凋亡 ePNP 氟达拉滨

**中图分类号** R3

**文献标识码** A

**DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.07.006

**Effect of *E. coli* Purine Nucleoside Phosphorylase on Inducing the Apoptosis of Murine Macrophages.** Yu Minmin, Yin Hongchao. Department of Pathology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, School of Basic Medicine, Peking Union Medical College, Beijing 100005, China

**Abstract** **Objective** To investigate the effect of the suicide gene *E. coli* purine nucleoside phosphorylase (ePNP) on mouse macrophages apoptosis by using transgenic mice models. **Methods** The cell survival rate of peritoneal macrophages in ePNP transgenic mice and wild-type mice were detected by Cell Counting Kit-8 (CCK-8) after adding prodrug (fludarabine) with the dosage of 0, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 and 2.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  respectively in vitro. The apoptosis of peritoneal macrophages and tissue (lung, spleen) macrophages were detected by flow cytometry and TUNEL assay after injecting fludarabine intraperitoneally with the dosage of 0, 10, 20 and 60  $\text{mg}/\text{kg}$  respectively. **Results** CCK-8 assay demonstrated that the survival rate of peritoneal macrophages of ePNP transgenic mice was obviously decreased after the treatment. Cell survival rate was only 10.8%  $\pm$  0.8% with the dosage of 2.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . The flow cytometry showed that the peritoneal macrophages apoptosis of transgenic mice was significantly increased with a dose-effect relationship after administration, while the counterpart of wild-type mice did not change. Likewise, TUNEL assay showed that the lung and spleen macrophages apoptosis of transgenic mice were significantly increased with a dose-effect relationship after administration, while the counterpart of wild-type mice did not change. **Conclusion** The suicide gene ePNP can induce the apoptosis of mouse macrophages with synergistic action of fludarabine.

**Key words** Suicide gene; Macrophage apoptosis; ePNP; Fludarabine

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是心血管系统常见疾病。近年来随着我国经济的迅速发展,As 的发生率和病死率也有逐年增高的趋势。As 晚期巨噬细胞的凋亡造成 As 斑块形态学改变(尤其是帽/核比值的变小),影响斑块易损性,从而造成斑块不稳

定,是导致各种心血管疾病的重要原因<sup>[1]</sup>。As 斑块中的巨噬细胞几乎都变成了泡沫细胞,巨噬细胞/泡沫细胞凋亡导致细胞外脂质核的发生和扩大,在脂质核的非细胞部分可发现凋亡残留体。因此诱导巨噬细胞凋亡,对通过巨噬细胞凋亡建立 As 易损斑块模型进而了解 As 易损斑块发生、发展的分子机制奠定良好基础<sup>[2,3]</sup>。

大肠杆菌嘌呤核苷酸磷酸化酶(*E. coli* purine nucleoside phosphorylase, ePNP)基因有较强的细胞杀伤作用,因此一直是基因治疗的热点。ePNP 作为一种前药转换酶基因,能将某些腺嘌呤类似物,如 fludara-

基金项目:国家高技术研究发展计划(“863”计划)项目(81670430)

作者单位:100005 北京,中国医学科学院基础医学研究所病理学系

通讯作者:尹洪超,教授,硕士生导师,电子信箱:yinhc0105@163.com

bine 等转化成高毒性能自由穿透细胞膜的代谢产物,对细胞产生毒性作用,引起细胞死亡<sup>[4]</sup>。众多研究已经在肝癌,胰腺癌等肿瘤细胞中证实 ePNP 自杀基因系统良好的杀伤细胞作用<sup>[5-12]</sup>。由 ePNP 杀伤肿瘤细胞的原理,笔者推测 ePNP 基因同样可以诱导巨噬细胞凋亡。因此,本实验拟采用巨噬细胞特异表达的 ePNP 转基因小鼠,探究自杀基因 ePNP 联合前体药物 fludarabine 对巨噬细胞凋亡的诱导作用。

### 材料与方法

1. 试剂:PCR 试剂(2xEs TaqMasterMix 及 DL1000maker)、荧光定量 PCR 试剂(SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II)购自日本 TaKaRa 公司;引物合成和基因测序由北京擎科新业生物技术有限公司完成;1640 培养基、胎牛血清购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心;fludarabine 购自美国 Selleck. cn 公司;Annexin V - FITC 凋亡试剂盒购自美国 BD 公司;Cell Counting Kit - 8 购自上海东仁化学科技公司;氧化低密度脂蛋白购自北京协生生物科技有限责任公司(浓度为 1.05mg/ml, MDA 为 43nmol/ml);原位凋亡检测试剂盒(In Situ Death Detection Kit)购自瑞士 Roche 公司;RNA 抽提试剂(Trizol)、反转录试剂盒(TransScript First - Strand Cdna Synthesis SuperMix)购自北京全式金生物技术有限公司;6 × his tag 抗体购自美国 CST 公司(Cell Signaling Technology);内参 β - Actin 抗体购自英国 Abcam 公司;巯基乙酸盐肉汤粉购自美国 Sigma 公司;3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 工作液、封闭用正常山羊血清工作液 3ml、浓缩型 DAB 试剂盒[内容物包括 DAB chromogen (× 20) 1ml、DAB substrate 60ml 等]购自北京中杉金桥生物技术有限公司等。

2. 转基因小鼠制作以及基因型鉴定:提供携带有 ePNP 基因和 6 个组氨酸标签(6 × his tag)以及人清道夫受体 A1 (SR - A1)启动子/增强子的重组载体 pJC - 13 - SR - ePNP,由百奥赛图公司构建了 SR - A1 启动子/增强子调控的 ePNP 转基因小鼠(C57/B6)[实验动物生产许可证:SCXK(京)2015 - 0008]<sup>[5]</sup>。实验动物在 SPF(specific pathogen free)级环境下饲养,严格控制温度、湿度、光照、换气条件等,高压灭菌的普通膳食喂养,定时称体重,了解小鼠生长发育情况,并通过伦理委员会审查。将获得的阳性亲代鼠 z1、z2、z3、z7 与野生型小鼠进行合笼繁殖,通过普通 PCR 从后代中筛选出阳性的小鼠并按系别传代繁殖。以 β - Actin 为内参基因,内参上游引物:5' -

AGTTCTGCCACGTGGTTGGT - 3',下游引物:5' - GTCTCCTGGCTCAGAGGGAG - 3';ePNP 引物 1 上游引物:5' - TCGAATTCAAGCTTAGATCTGGGC - 3',下游引物:5' - AGTAGAACAGGTCAGCGGAGAAC - 3';ePNP 引物 2 上游引物:5' - CGTCCTGCTCCATCTACACCA - 3',下游引物:5' - GGGCTCAGATTACAGTCTCC - 3'。

3. Western blot 法检测 ePNP 转基因小鼠巨噬细胞内 6 × his tag 的表达情况:取野生型小鼠 2 只和 z1、z2、z3、z7 各系 ePNP 转基因小鼠各 2 只,均为 6 ~ 8 周雄鼠,同时于腹腔内注射 1ml 6% 的巯基乙酸盐肉汤,3 天后提取腹腔巨噬细胞,提取步骤参见参考文献[6]。计数板进行细胞计数。提取各组蛋白,BSA 法进行蛋白含量测定。采用 Western blot 法检测 6 × his tag 的表达,以检测自杀基因 ePNP 在阳性小鼠体内的表达。在 10% 的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶上配制 6% 的凝胶,加标本 15μl,电泳 80V 40min,120V 90min。转膜到聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜,90min;5% 脱脂牛奶封闭 1h。1:1000 稀释一抗内参抗体 β - actin,1:500 稀释 6 × his tag 抗体,一抗 4℃ 孵育过夜,TBST 漂洗 10min,共 4 次;二抗均 1:5000 稀释,室温孵育 1h,TBST 漂洗 10min,共 4 次。ECL 显影,使用凝胶成像系统拍照。

4. 荧光定量 PCR 检测 ePNP 转基因小鼠腹腔巨噬细胞吞噬 ox - LDL 后 ePNP 表达变化规律:取 z1、z2、z3、z7 各系 ePNP 转基因小鼠和野生型小鼠各 3 只,均为 6 ~ 8 周雄鼠,同时于腹腔内注 1ml 6% 巯基乙酸盐肉汤,3 天后在超净台内提取腹腔巨噬细胞,细胞计数后,将每只小鼠的巨噬细胞均分到 6 孔板的两个孔内,一个为对照组,另一个为加入实验组,贴壁纯化后,实验组加入 40mg/L 的氧化低密度脂蛋白(oxidized low - density lipoprotein, ox - LDL),培养 36h 后,采用全式金的试剂盒提取各组总 RNA<sup>[7]</sup>。总 RNA 提取:采用 Trizol 一步法提取总 RNA,用 NanoDrop 微量分光光度计(NanoDrop Technologies)检测 RNA 的浓度和纯度。取等量的 RNA 进行反转录,以总 RNA 为模板,反转录合成 cDNA。荧光定量 PCR:GAPDH 上游引物:5' - CTGCACCACCAACTGCTTAG - 3';下游引物:5' - GTGGATGCAGGGATGATGTTC - 3';ePNP 上游引物:5' - TGAAGATGCCCCGTGAAGT - 3',下游引物:5' - GGTGTAGATGGAGCAGGAC - 3';反应程序如下:预变性:95℃,3min;变性:95℃,30s,退火:59℃,20s,延伸 72℃,20s,共 40 个循环。每组

实验设置 3 个平行孔,选用 GAPDH 为内参基因。反应重复 3 次,计算 ct 值(荧光信号达到设定的阈值所经历的循环数)。实验结束后,用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法处理数据,即且每只小鼠目的基因都以 GAPDH 作为内参基因进行校正,并计算出其相对表达量。

5. CCK-8 法检测 ePNP 对体外培养的小鼠腹腔巨噬细胞的毒效应:取 ePNP 转基因小鼠和野生型小鼠各 3 只,均为 6~8 周雄鼠,提取腹腔巨噬细胞,细胞计数后,每系小鼠的巨噬细胞稀释调整至  $10^6$ ,每一系和野生型小鼠分别设 0、0.125、0.25、0.5、1.0 和 2.0  $\mu\text{g/ml}$  不同浓度组,每组分别设 6 个平行孔,并设不加细胞的空白对照组。在 96 孔板中每孔接种 100  $\mu\text{l}$  的细胞悬液,贴壁纯化后,向每孔加入 10 ml CCK-8 溶液,再在培养箱(在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的条件下)内孵育 2 h。用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。此结果代表没有加药之前的细胞活力。之后更换新的培养基,按分组剂量加入 fludarabine,将培养板在培养箱培养 48 h;48 h 后更换新的培养基,用酶标仪测定加药之后的细胞活力。前后结果相比较,制作出一条以药物浓度为横坐标(X 轴)、细胞活力为纵坐标(Y 轴)的标准曲线。

6. 流式细胞术检测腹腔给药后 ePNP 转基因小鼠腹腔巨噬细胞的凋亡情况:取 ePNP 转基因小鼠和野生型小鼠各 12 只,各分 4 组,每组 3 只,腹腔给药 fludarabine 0、10、20、60  $\text{mg/kg}$  4 组,每组 3 只,均为 6~8 周雄鼠,分别给药 5 天,每天 2 次;在给药第 3 天时,每只小鼠腹腔注射 1 ml 3% 巯基乙酸盐肉汤,3 天后,分别检测提取小鼠腹腔巨噬细胞,纯化细胞后细胞计数(细胞数量约  $10^6$ ),然后用 BD 公司的 Annexin V-FITC 凋亡试剂盒上机操作。

7. DNA 断裂的原位末端标记法(TUNEL)检测腹腔给药后 ePNP 转基因小鼠组织巨噬细胞凋亡情况:取 ePNP 转基因小鼠 12 只和野生型小鼠 12 只,ePNP 小鼠按给药剂量分 4 组,0、10、20、60  $\text{mg/kg}$ ,野生型小鼠按同样给药剂量分组,给药 5 天,每天 2 次;5 天后灌流固定取材(肺、脾),OCT 包埋,冰冻切片机连续切片,厚度 6  $\mu\text{m}$ 。之后取转基因和野生型小鼠各剂量组肺脾各 1 张,设阴性对照和阳性对照各 1 张,用罗氏原位末端凋亡检测试剂盒进行检测。

8. 统计学方法:采用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计分析。所有计量资料用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较应用独立样本  $t$  检验,3 组之间的比较用方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1. Western blot 法检测 ePNP 转基因小鼠巨噬细胞内 6  $\times$  his tag 的表达:提取 z1、z2、z3、z7 各系 ePNP 小鼠和野生型小鼠的腹腔巨噬细胞,提取蛋白,Western blot 法鉴定 6  $\times$  his tag 的表达,转基因小鼠在分子质量为 25 kDa 处有一条杂交带,而野生型小鼠没有,可见 ePNP 转基因小鼠特异表达 ePNP(图 1)。

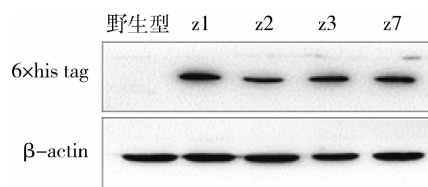


图 1 Western blot 法检测 ePNP 转基因小鼠 ePNP 表达

2. ePNP 转基因小鼠腹腔巨噬细胞吞噬 ox-LDL 后 ePNP 表达变化规律:经荧光定量 PCR 发现,吞噬 ox-LDL 的 ePNP 转基因小鼠腹腔巨噬细胞内 ePNP 表达明显比对照组高,野生型小鼠作为阴性对照组。巨噬细胞向泡沫细胞转化的过程中,SR-A1 表达上调,SR-A1 启动子/增强子调控的 ePNP 表达上调,结果提示 ePNP 在巨噬细胞泡沫化时表达增加(图 2)。

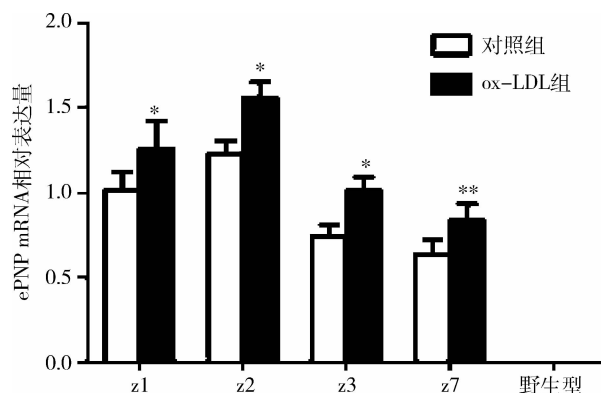


图 2 荧光定量 PCR 检测 ePNP 转基因小鼠腹腔巨噬细胞吞噬 ox-LDL 后 ePNP 表达变化  
 $\bar{x} \pm s, n=3$ 。与对照组比较 \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

3. 自杀基因 ePNP 对体外小鼠腹腔巨噬细胞的细胞毒性效应:给药浓度在 0、0.25、0.5、1.0、2.0  $\mu\text{g/ml}$  依次增加时,ePNP 转基因小鼠腹腔巨噬细胞存活率分别为  $100.0\% \pm 6.5\%$ 、 $30.5\% \pm 5.4\%$ 、 $25.8\% \pm 4.1\%$ 、 $13.4\% \pm 0.9\%$ 、 $10.8\% \pm 0.8\%$  ( $P < 0.05$ );野生型小鼠腹腔巨噬细胞存活率分别为  $100.0\% \pm 6.5\%$ 、 $99.6\% \pm 7.0\%$ 、 $96.7\% \pm 6.7\%$ 、 $101.3\% \pm$

2.5%、106.0% ± 6.1% (图3)。加入前体药物后, ePNP转基因小鼠腹腔巨噬细胞的存活率明显下降;

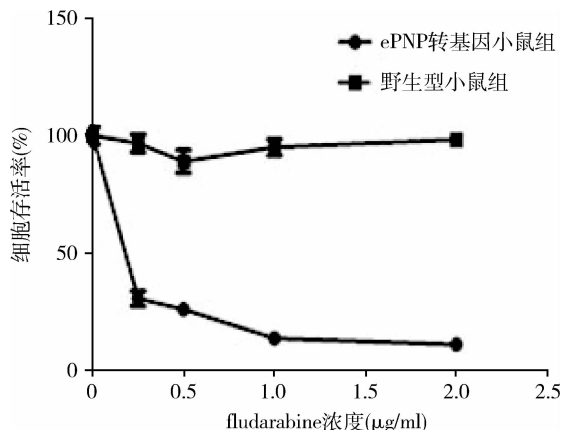


图3 CCK-8 检测 ePNP 对转基因小鼠腹腔巨噬细胞的毒效应 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

野生性小鼠细胞存活率与未加药时变化不大。自杀基因 ePNP 在低浓度前体药物 fludarabine 协同作用下可诱导巨噬细胞凋亡, 并且低浓度 fludarabine 对野生型小鼠没有影响。

4. 流式细胞术检测腹腔给药后 ePNP 转基因小鼠腹腔巨噬细胞的凋亡情况: 当 fludarabine 浓度分别为 0、10、20、60mg/kg 时, 经流式细胞术检测显示转基因小鼠组腹腔巨噬细胞凋亡率分别是 4.9%、8.5%、12.4%、34.3% (图4中 A~D); 野生型小鼠腹腔巨噬细胞凋亡率分别为 4.7%、5.7%、5.6%、6.5% (图4中 E~H), 凋亡率为早期凋亡 (annexin V) 和晚期凋亡 (PI) 之和, 即为图中 UR + UL + LR。结果提示, 自杀基因 ePNP 在低浓度前体药物 fludarabine 协同作用下可诱导 ePNP 转基因小鼠腹腔巨噬细胞。

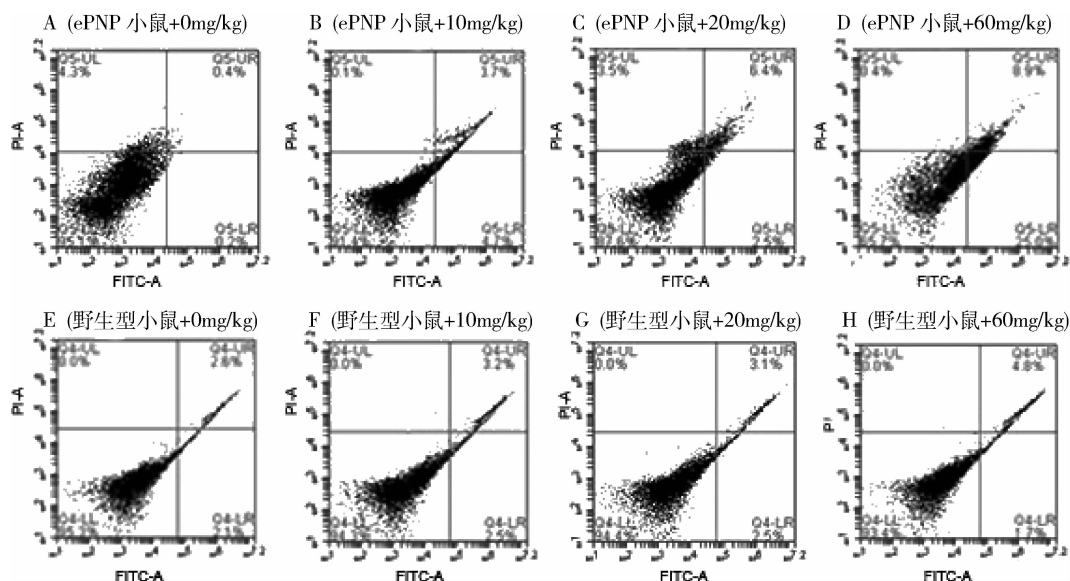


图4 流式细胞术检测 ePNP 转基因小鼠腹腔给药后腹腔巨噬细胞凋亡情况

A~D. 给药浓度分别为 0、10、20 和 60mg/kg 的 ePNP 转基因小鼠组腹腔巨噬细胞的凋亡情况; E~H. 给药浓度分别为 0、10、20 和 60mg/kg 的野生型小鼠组腹腔巨噬细胞的凋亡情况

5. TUNEL 法检测腹腔给药后 ePNP 转基因小鼠组织巨噬细胞凋亡情况: 肺脏和脾脏有丰富的巨噬细胞, 棕黄色染色表明细胞发生凋亡, 当 fludarabine 浓度分别为 0、10、20、60mg/kg 时, 肺脏有明显的细胞凋亡 (图 5A 中 a~d)。对照组给药浓度为 0、10、20、60mg/kg 时, 肺脏经染色几乎没有细胞凋亡 (图 5A 中 e~h)。给药实验组肺脏凋亡细胞的面积比率为 0.05‰、2.21‰、2.73‰、3.01‰, 对照组接近于 0

( $P < 0.05$ , 图 5C)。给药浓度分别为 0、10、20、60mg/kg 时, 脾脏有明显的细胞凋亡 (图 5B 中 i~l)。对照组给药浓度为 0、10、20、60mg/kg 时, 脾脏经染色几乎没有细胞凋亡 (图 5B 中 m~p)。给药实验组脾脏凋亡细胞的面积比率为 0.082‰、3.25‰、3.87‰、7.03‰, 对照组接近于 0 ( $P < 0.05$ , 图 5D)。与流式结果一致, ePNP 在前体药物作用诱导小鼠组织巨噬细胞凋亡, 并且对野生型小鼠不造成影响。

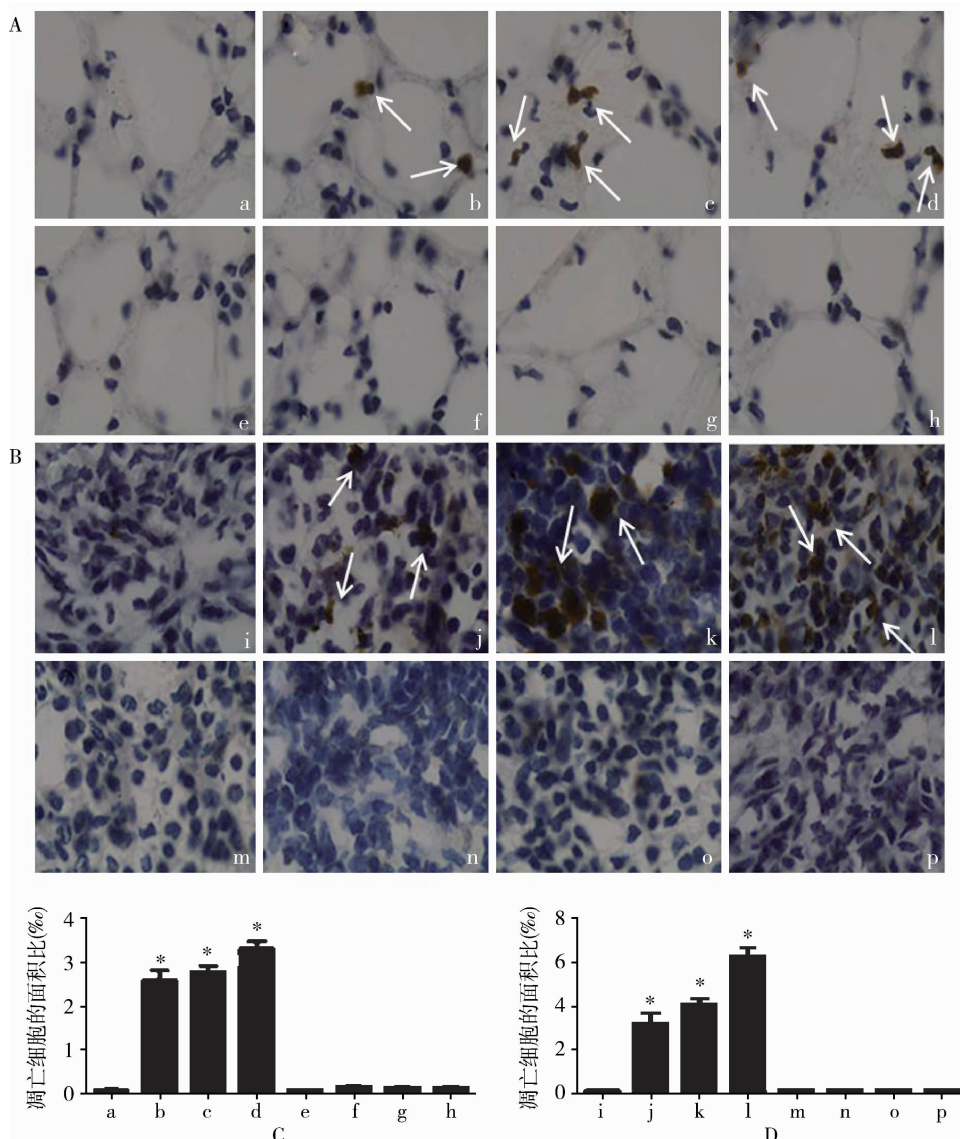


图 5 TUNEL 检测 ePNP 转基因小鼠腹腔给药后组织 (肺、脾) 巨噬细胞凋亡情况

A. a ~ h 分别表示给药浓度分别为 0、10、20 和 60mg/kg 的 ePNP 转基因小鼠组肺脏巨噬细胞 (a ~ d) 和野生型小鼠组肺脏巨噬细胞 (e ~ h) 的凋亡情况; B. i ~ p 分别表示给药浓度分别为 0、10、20 和 60mg/kg 的 ePNP 转基因小鼠组脾脏巨噬细胞 (i ~ l) 和野生型小鼠组脾脏巨噬细胞 (m ~ p) 的凋亡情况 (×1000); C. 各组肺脏凋亡巨噬细胞的面积比率; D. 各组脾脏凋亡巨噬细胞的面积比率 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ ) 与野生型小鼠组比较, \*  $P < 0.05$ ; 箭头所示为凋亡细胞

## 讨 论

ePNP 基因用做自杀基因, 因为一些独特的优点正逐渐受到人们的重视<sup>[8]</sup>。ePNP 能将无毒的前体药物 fludarabine 分解产生有毒的 6-甲基嘌呤 (MeP) 和 2-氟腺嘌呤 (2-fadenine, 2-F-A), 这些有毒物质穿透细胞膜并抑制细胞内 DNA、RNA 和蛋白质的合成, 而引起细胞死亡<sup>[9]</sup>。

本研究构建了具有巨噬细胞特异性的 SR-A1 启动子/增强子调控的 ePNP 转基因小鼠 (C57/B6)。SR-A1 主要在巨噬细胞/泡沫细胞内表达, 并在巨

噬细胞向泡沫细胞转化的过程中, SR-A1 表达上调, 理论上 SR-A1 启动子/增强子调控的 ePNP 表达也会上调<sup>[5, 13-15]</sup>。荧光定量 PCR 结果显示 ePNP 表达上调, 证实 ePNP 在巨噬细胞泡沫化时表达增加。

CCK-8 结果显示离体培养的原代巨噬细胞在分别给 0、0.25、0.5、1.0、2.0 μg/ml 浓度的前体药物 fludarabine 并培养 48h 后, ePNP 转基因小鼠组巨噬细胞有明显凋亡, 并且存在剂量效应关系, 而野生型小鼠来源的巨噬细胞给药后凋亡不明显。TUNEL 法和流式细胞术分别检测在体给不同剂量 (0、10、20、

60mg/kg)的前体药物后肺脾和腹腔巨噬细胞的凋亡情况,结果也显示 ePNP 在低浓度前体药物 fludarabine 作用下诱导巨噬细胞凋亡,并存在剂量效应关系,尤其在 fludarabine 剂量增加到 60mg/kg 时,小鼠腹腔巨噬细胞和肺、脾巨噬细胞凋亡明显增加,然而野生型小鼠给药后巨噬细胞凋亡不明显。可见,虽然 fludarabine 是抗肿瘤药物,但低浓度 fludarabine 并没有对野生型小鼠造成损伤,作为前药转换酶基因的 ePNP 已经对较低浓度的 fludarabine 表现出较强的敏感度。由此可见,ePNP 自杀基因系统的安全性和高效性。

综上所述,自杀基因 ePNP 在低浓度前体药物 fludarabine 作用下对巨噬细胞有明显的促凋亡作用,并随着 fludarabine 浓度的增加,巨噬细胞凋亡明显,而且 ePNP 在巨噬细胞内特异性表达,并不对其他部位造成损伤。并且,ePNP 在泡沫化的巨噬细胞中表达增加,提示其在巨噬细胞泡沫化后更加加剧巨噬细胞凋亡。国内外众多研究发现 As 晚期斑块脂质核心处巨噬细胞凋亡增多,并且巨噬细胞凋亡参与了 As 斑块形成和发展过程,巨噬细胞凋亡可引起斑块内炎症反应,释放促血栓形成物质,增加斑块脆性及血栓性事件的风险<sup>[3, 16]</sup>。了解巨噬细胞的凋亡,将为通过调节细胞凋亡建立易损斑块模型提供证据<sup>[17]</sup>。因此,本实验提供了一种行之有效的诱导巨噬细胞凋亡的方法,对于深入研究巨噬细胞凋亡的调控,建立 As 易损斑块模型,进而探讨 As 发生机制和临床治疗具有重大意义。

#### 参考文献

- 1 许金鹏,刘福林,刘洋,等. 动脉粥样硬化斑块巨噬细胞凋亡与斑块易损性的关系[J]. 军医进修学院学报, 2008,4:289-291
- 2 Gautier EL, Huby T, Witztum JL, *et al.* Macrophage apoptosis exerts divergent effects on atherogenesis as a function of lesion stage[J]. *Circulation*, 2009,119(13):1795-1804
- 3 Gonzalez L, Trigatti BL. Macrophage apoptosis and necrotic core development in atherosclerosis: a rapidly advancing field with clinical relevance to imaging and therapy[J]. *Can J Cardiol*, 2017,33(3):303-312
- 4 李锋,王楚. PNP/fludarabine 自杀基因系统对人肝癌细胞 HepG2 体外杀伤效应[J]. 中国肿瘤, 2004,12:50-55
- 5 Zhang H, Zhang W, Sun X, *et al.* Class A1 scavenger receptor modulates glioma progression by regulating M2-like tumor-associated macrophage polarization[J]. *Oncotarget*, 2016,7(31):50099-50116
- 6 张淑莉,张琪,景晓红. 小鼠腹腔巨噬细胞的提取与鉴定[J]. 国际检验医学杂志, 2015,2:174-175,178
- 7 袁颖琳,何芸,张琴,等. 氧化低密度脂蛋白诱导巨噬细胞泡沫化氧化损伤后血管紧张素转化酶 2 的表达变化及意义[J]. 解剖学报, 2016,1:42-48
- 8 Ardiani A, Johnson AJ, Ruan H, *et al.* Enzymes to die for: exploiting nucleotide metabolizing enzymes for cancer gene therapy[J]. *Curr Gene Ther*, 2012,12(2):77-91
- 9 Deharvengt S, Rejiba S, Wack S, *et al.* Efficient electrogene therapy for pancreatic adenocarcinoma treatment using the bacterial purine nucleoside phosphorylase suicide gene with fludarabine[J]. *Int J Oncol*, 2007,30(6):1397-1406
- 10 Fu W, Lan H, Li S, *et al.* Synergistic antitumor efficacy of suicide/ePNP gene and 6-methylpurine 2'-deoxyriboside via *Salmonella* against murine tumors[J]. *Cancer Gene Ther*, 2008,15(7):474-484
- 11 Fu W, Lan H, Liang S, *et al.* Suicide gene/prodrug therapy using salmonella-mediated delivery of *Escherichia coli* purine nucleoside phosphorylase gene and 6-methoxypurine 2'-deoxyriboside in murine mammary carcinoma 4T1 model[J]. *Cancer Sci*, 2008,99(6):1172-1179
- 12 Borderud SP, Li Y, Burkhalter JE, *et al.* Electronic cigarette use among patients with cancer: characteristics of electronic cigarette users and their smoking cessation outcomes[J]. *Cancer*, 2015,121(5):800
- 13 Hu Z, Li J, Kuang Z, *et al.* Cell-specific polymorphism and hormonal regulation of DNA methylation in scavenger receptor class B, type I[J]. *DNA Cell Biol*, 2016,35(6):280-289
- 14 姚树桐,赵莉,苗成,等. 内质网应激介导氧化低密度脂蛋白所诱导的巨噬细胞清道夫受体 A1 上调[J]. 生理学报, 2014,5:612-618
- 15 Xie C, Kang J, Chen JR, *et al.* Lowbush blueberries inhibit scavenger receptors CD36 and SR-A expression and attenuate foam cell formation in ApoE-deficient mice[J]. *Food Funct*, 2011,2(10):588-594
- 16 Kavurma MM, Rayner KJ, Karunakaran D. The walking dead: macrophage inflammation and death in atherosclerosis[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2017,28(2):91-98
- 17 方丽娟,刘乃丰. 细胞凋亡与动脉粥样硬化关系的研究进展[J]. 东南大学学报:医学版, 2010,1:107-110

(收稿日期:2017-03-12)

(修回日期:2017-04-01)