

# 大戟苷诱导人宫颈癌Hela细胞凋亡及其作用机制研究<sup>Δ</sup>

张德莉<sup>1\*</sup>, 李晓强<sup>1</sup>, 白银亮<sup>1</sup>, 何荣霞<sup>2#</sup>, 吕银凤<sup>2</sup>, 文惠方<sup>2</sup>, 魏丽<sup>2</sup>(1. 兰州大学第二医院药学部, 兰州 730030; 2. 兰州大学第二医院妇产科, 兰州 730030)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)20-2773-04  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.20.08

**摘要** 目的: 研究大戟苷对人宫颈癌Hela细胞凋亡的诱导作用及其机制。方法: 取Hela细胞分为空白对照组、顺铂组(阳性对照, 10 mg/L)和大戟苷低、中、高剂量组(50、100、200 mg/L), 分别加入相应药物进行培养。药物作用24、48、72 h后, 采用MTT法检测细胞增殖抑制率。药物作用48 h后, 采用流式细胞术检测细胞凋亡率, 采用Hoechst 33258染色法检测细胞核的形态变化; 采用Western blot法检测细胞色素C(Cyt-C)、Bcl-2、Bax、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9和Caspase-10蛋白表达水平。结果: 与空白对照组比较, 顺铂组和大戟苷各剂量组细胞增殖抑制率和细胞凋亡率均显著升高( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ), 细胞核浓染, 或有变形、缩小、碎裂, 或出现凋亡小体。与空白对照组比较, 大戟苷低、中、高剂量组细胞中Cyt-C、Caspase-8和Caspase-9蛋白表达水平均显著升高, Bcl-2蛋白表达水平和Bcl-2/Bax比值均显著降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ); 大戟苷中、高剂量组细胞中Bax、Caspase-3和Caspase-10蛋白表达水平均显著升高( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。结论: 大戟苷能显著抑制Hela细胞增殖、促进细胞凋亡, 其作用可能是通过激活Caspase依赖的线粒体凋亡途径来实现的。

**关键词** 大戟苷; 宫颈癌; Hela细胞; 凋亡; 机制

## Study on the Effect and Mechanism of Euphornin Inducing the Apoptosis of Cervical Cancer Hela Cells

ZHANG Deli<sup>1</sup>, LI Xiaoqiang<sup>1</sup>, BAI Yinliang<sup>1</sup>, HE Rongxia<sup>2</sup>, LYU Yinfeng<sup>2</sup>, WEN Hui Fang<sup>2</sup>, WEI Li<sup>2</sup>(1. Dept. of Pharmacy, Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, China; 2. Dept. of Obstetrics and Gynecology, Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study induction effect of euphornin on the apoptosis of cervical cancer Hela cells and its mechanism. METHODS: The cervical cancer Hela cells were divided into blank control group, cisplatin group (positive control, 10 mg/L) and euphornin low-dose, medium-dose and high-dose groups (50, 100, 200 mg/L). They were treated with relevant medicine. The inhibitory effect of Hela cells proliferation was tested by MTT assay after 24, 48, 72 h of medicine treatment. The apoptotic rate of Hela cells was measured by flow cytometry after 48 h of medicine treatment. Morphology of nucleus was detected by Hoechst 33258 staining. The protein expression of Cyt-C, Bcl-2, Bax, Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9 and Caspase-10 were detected by Western blot assay. RESULTS: Compared with blank control group, inhibitory rate of cell proliferation and cell apoptosis rate were increased significantly in cisplatin group and euphornin groups ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), and obvious staining, deformation, shrinking, fragmentation or apoptotic bodies was found in nucleus. Compared with blank control group, the protein expression levels of Cyt-C, Caspase-8 and Caspase-9 in euphornin low-dose, medium-dose and high-dose groups were increased significantly, while the protein expression level of Bcl-2 and Bcl-2/Bax ratio were decreased significantly ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ); the protein expression levels of Bax, Caspase-3 and Caspase-10 in euphornin medium-dose and high-dose groups were increased significantly ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). CONCLUSIONS: Euphornin can significantly inhibit the proliferation of Hela cell and promote cell apoptosis, the effect of which will be achieved by activating the Caspase-dependent mitochondrion apoptosis pathway.

**KEYWORDS** Euphornin; Cervical cancer; Hela cell; Apoptosis; Mechanism

宫颈癌是女性最常见的妇科恶性肿瘤之一, 发病率在全球女性肿瘤中居第3位, 严重威胁女性健康<sup>[1]</sup>。泽漆是大戟属植物泽漆(*Euphorbia helioscopia* L.)的干燥全草, 其作为民间验方的重要组成部分用于治疗宫颈癌、食道癌等表现出一定疗效, 因此其抗肿瘤活性引起了研究者的广泛关注<sup>[2-3]</sup>。近年来, 有研究者对泽漆的不

同溶剂提取物进行了抗肿瘤活性筛选, 发现其对多种肿瘤细胞均有一定的抑制作用<sup>[2-4]</sup>。以往研究显示, 泽漆的乙酸乙酯、石油醚、氯仿等萃取液对肝癌SMMC7721细胞、HepG2细胞, 胃癌SGC7901细胞和肺癌A549细胞均有显著的增殖抑制作用, 其机制可能是通过线粒体途径诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[5-8]</sup>。目前的研究大多是针对泽漆的提取混合物, 对其单体活性成分的研究较少。只有Chen H等<sup>[9]</sup>于2012年首次研究了泽漆的二萜酯类单体活性成分之一大戟苷(Euphornin)的细胞毒作用, 结果发现其对肺癌细胞LA795细胞增殖具有显著的抑制作用, 因此提出大戟苷是泽漆提取物发挥抗肿瘤作用的最关键

<sup>Δ</sup> 基金项目: 甘肃省自然科学基金项目(No.1506RJZA251)

\* 副主任中药师。研究方向: 中药药理学。电话: 0931-8942491。  
E-mail: lzuzdl@163.com

# 通信作者: 主任医师, 教授, 硕士生导师。研究方向: 妇科肿瘤。  
电话: 0931-8943051。E-mail: luzhrx@163.com

组分之一,但并未对其抗肿瘤作用机制作进一步研究。基于此,本课题组拟研究大戟苷诱导人宫颈癌Hela细胞凋亡的作用及其机制,为大戟苷临床上用于宫颈癌的治疗提供实验基础。

## 1 材料

### 1.1 仪器

BB15型CO<sub>2</sub>细胞培养箱(美国Thermo Scientific公司);Synergy H1型多功能酶标仪(美国BioTek公司);IX51型荧光显微镜(日本Olympus公司);FACS Calibur型流式细胞仪(美国BD公司);DYY-III型电泳仪、DYY-III型电泳槽(北京六一实验仪器厂);Z216K型高速冷冻离心机(德国Hermle公司)。

### 1.2 药品与试剂

大戟苷(兰州大学天然药物化学教研室,批号:20151121,纯度:≥98%);顺铂注射液(江苏豪森药业股份有限公司,批号:160508,规格:30 mg/6 mL);四甲基偶氮唑蓝(MTT)、Hoechst 33258染色试剂盒、Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒、ECL化学发光试剂盒(碧云天生物技术研究所);鼠抗人细胞色素C(Cyt-C)、Bcl-2、Bax、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、Caspase-10、 $\beta$ -actin单克隆抗体和辣根过氧化物酶标记兔抗鼠二抗(美国Santa Cruz公司);BCA蛋白定量分析试剂盒、胎牛血清、DMEM培养基、双抗(青霉素-链霉素)、磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)[赛默飞世尔科技(中国)有限公司];水为双蒸水。

### 1.3 细胞

人宫颈癌Hela细胞株由中国科学院上海细胞库提供。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

取Hela细胞,在含有10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100  $\mu$ g/mL链霉素的DMEM培养基(以下简称“DMEM培养基”)中,于37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>条件下培养。待细胞生长至对数生长期时取出用于试验。

### 2.2 细胞增殖抑制率检测

采用MTT法检测。将Hela细胞以 $5 \times 10^4$ 个/孔接种于96孔培养板,在37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>条件下培养24 h;将细胞分为空白对照组、顺铂组(阳性对照)和大戟苷低、中、高剂量组,分别加入含相应药物的DMEM培养基。根据文献[9],大戟苷低、中、高剂量组的药物终质量浓度分别为50、100、200 mg/L;顺铂组的药物终质量浓度为10 mg/L;空白对照组加入等体积的不含药DMEM培养基。加药后继续培养24、48、72 h。每组细胞均设6个复孔平行操作。培养完毕后收集细胞,以MTT染色液染色,采用酶标仪在492 nm波长处检测吸光度(OD值),计算大戟苷对Hela细胞的增殖抑制率。细胞增殖抑制率(%)=(1-试验组OD值/对照组OD值) $\times$ 100%。试验重复3次。

### 2.3 细胞凋亡率检测

采用流式细胞术检测。将Hela细胞以 $1 \times 10^5$ 个/孔接种于6孔培养板中,在37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>条件下培养24 h;按“2.2”项下方法进行分组及加入相应药物;继续培养48 h后收集细胞,用预冷的PBS洗涤2次;按照Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒说明书操作,采用流式细胞仪检测细胞凋亡率。试验重复3次。

### 2.4 细胞核形态观察

采用Hoechst 33258染色法检测。按“2.3”项下方法取Hela细胞接种、培养、分组及加入相应药物;继续培养48 h后收集细胞并制成细胞悬液( $1 \times 10^4$ 个/mL);按照Hoechst 33258染色试剂盒说明书操作后,于荧光显微镜下观察Hela细胞核形态并对图像进行分析。镜下可见细胞呈蓝色荧光;凋亡细胞的细胞核浓染,或有变形、缩小或碎裂,或出现凋亡小体。

### 2.5 细胞中凋亡相关蛋白表达水平检测

采用Western blot法检测。按“2.3”项下方法取Hela细胞接种、培养,分为空白对照组(不含药DMEM培养基)和大戟苷低、中、高剂量组(终质量浓度分别为50、100、200 mg/L),加入相应药物;继续培养48 h后加入含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液冰浴裂解25 min,收集细胞,在4  $^{\circ}$ C条件下15 000 r/min离心25 min,取上清,采用BCA法进行总蛋白定量,-80  $^{\circ}$ C保存备用。蛋白采用10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,转膜,5%脱脂奶粉封闭2 h后,加入一抗(Cyt-C、Bcl-2、Bax、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、Caspase-10、 $\beta$ -actin,稀释度均为1:1 000),4  $^{\circ}$ C孵育过夜,然后加入二抗室温孵育2 h,电化学发光法显色。以 $\beta$ -actin为参比,采用Image Pro Plus 6.0软件分析目标条带的相对灰度值,以表示蛋白表达水平。试验重复3次。

### 2.6 统计学方法

数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。应用SPSS 15.0软件对多组间比较进行单因素方差分析,对组间两两比较进行LSD-*t*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 大戟苷对Hela细胞增殖的影响

与空白对照组比较,顺铂组和大戟苷低、中、高剂量组细胞加入相应药物作用24、48、72 h后,细胞增殖抑制率均显著升高,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ),表明不同剂量的大戟苷对Hela细胞增殖均有显著的抑制作用。各组细胞增殖抑制率比较见表1。

### 3.2 大戟苷对Hela细胞凋亡的影响

与空白对照组比较,顺铂组和大戟苷低、中、高剂量组细胞加入相应药物作用48 h后,细胞凋亡率均显著升高,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ),表明不同剂量的大戟苷均能够诱导Hela细胞发生凋亡。各组细胞的流式细胞图见图1,细胞凋亡率比较见表2。

表1 各组细胞增殖抑制率比较( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 1 Comparison of the inhibitory rate of cell proliferation in each group( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	给药剂量, mg/L	抑制率, %		
		培养24 h	培养48 h	培养72 h
空白对照组	0	0	0	0
顺铂组	10	43.75 ± 6.74**	65.12 ± 4.69**	86.14 ± 7.33**
大戟苷低剂量组	50	11.02 ± 2.91**	26.35 ± 4.15**	36.22 ± 4.04**
大戟苷中剂量组	100	20.79 ± 5.14**	34.32 ± 3.26**	55.48 ± 4.62**
大戟苷高剂量组	200	36.16 ± 4.63**	56.71 ± 3.65**	71.62 ± 5.16**

注:与空白对照组比较, \*\* $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, \*\* $P < 0.01$

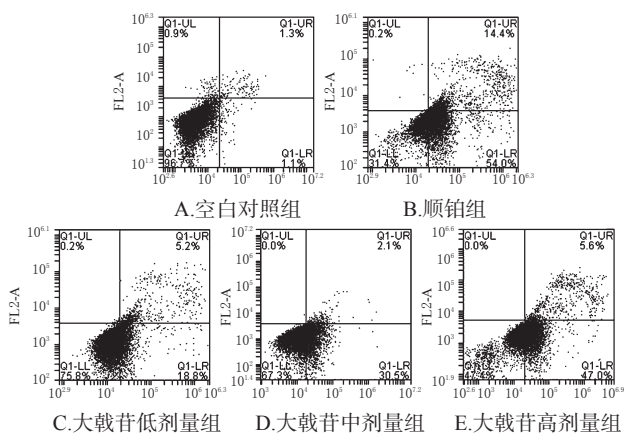


图1 各组细胞的流式细胞图

Fig 1 Flow cytometry of cells in each group

表2 各组细胞凋亡率比较( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 2 Comparison of the apoptotic rate of cells in each group( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	给药剂量, mg/L	凋亡率, %
空白对照组	0	2.31 ± 0.13
顺铂组	10	59.89 ± 7.23**
大戟苷低剂量组	50	20.34 ± 6.12*
大戟苷中剂量组	100	33.01 ± 6.92*
大戟苷高剂量组	200	50.80 ± 9.15**

注:与空白对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

### 3.3 大戟苷对Hela细胞核形态的影响

荧光显微镜下可见,与空白对照组比较,顺铂组细胞的细胞核出现明显的浓染、碎裂和凋亡小体;大戟苷低、中、高剂量组细胞的细胞核有不同程度的浓染或变

表3 各组细胞中凋亡相关蛋白表达水平比较( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 3 Comparison of the expression levels of apoptosis-related protein of cells in each group( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	Cyt-C	Bcl-2	Bax	Bcl-2/Bax	Caspase-3	Caspase-8	Caspase-9	Caspase-10
空白对照组	0.81 ± 0.11	1.12 ± 0.11	0.67 ± 0.09	4.06 ± 0.41	0.35 ± 0.04	0.14 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.30 ± 0.04
大戟苷低剂量组	0.92 ± 0.13*	0.91 ± 0.22*	0.84 ± 0.21	2.31 ± 0.33*	0.34 ± 0.09	0.39 ± 0.02*	0.14 ± 0.03*	0.32 ± 0.07
大戟苷中剂量组	1.34 ± 0.26**	0.77 ± 0.13**	1.83 ± 0.51**	0.74 ± 0.11**	0.69 ± 0.08**	0.61 ± 0.04**	0.26 ± 0.08**	0.41 ± 0.09*
大戟苷高剂量组	1.73 ± 0.19**	0.62 ± 0.14**	1.68 ± 0.12**	0.79 ± 0.22**	0.95 ± 0.11**	0.58 ± 0.03**	0.73 ± 0.09**	0.63 ± 0.06**

注:与空白对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

## 4 讨论

本课题组在预试验中考察了大戟苷对正常细胞系MRC-5细胞和人宫颈癌Hela细胞增殖的抑制作用,结

形、缩小、碎裂,其中大戟苷中、高剂量组细胞出现凋亡小体。这表明大戟苷可剂量依赖性促进Hela细胞发生凋亡。各组细胞的细胞核形态显微图见图2。

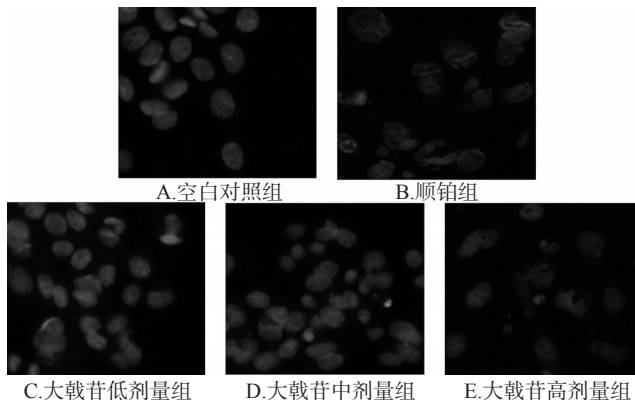


图2 各组细胞核形态显微图(Hoechst 33258, ×200)

Fig 2 Nuclear morphologic map of cells in each group (Hoechst 33258, ×200)

### 3.4 大戟苷对Hela细胞中凋亡相关蛋白表达的影响

与空白对照组比较,药物作用48 h后,大戟苷低、中、高剂量组细胞中Cyt-C、Caspase-8和Caspase-9蛋白表达水平均显著升高,Bcl-2蛋白表达水平和Bcl-2/Bax比值均显著降低;大戟苷中、高剂量组细胞中Bax、Caspase-3和Caspase-10蛋白表达水平均显著升高,以上差异均有统计学意义( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。各组细胞中凋亡相关蛋白电泳图见图3,蛋白表达水平比较见表3。

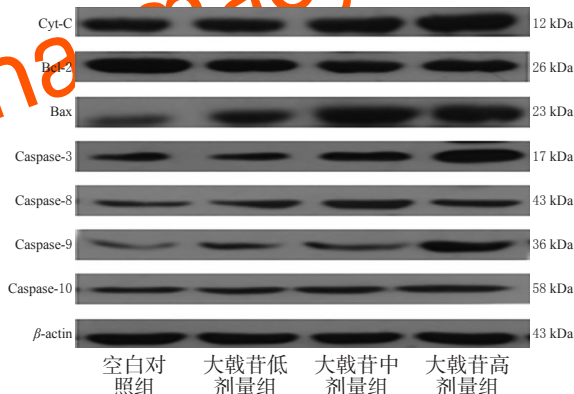


图3 各组细胞中凋亡相关蛋白电泳图

Fig 3 Electrophorogram of apoptosis-related protein of cells in each group

果发现不同剂量的大戟苷(50、100、200 mg/L)均能显著抑制Hela细胞增殖,但对MRC-5细胞未表现出明显的增殖抑制作用。因此,本研究采用上述剂量进行试验。

线粒体凋亡途径是细胞凋亡最主要的途径之一,通常凋亡信号能引起线粒体的通透性转换孔(PT)开放,导致线粒体跨膜电位下降和Cyt-C释放进入细胞质<sup>[10]</sup>。作为凋亡诱导因子,Cyt-C能与凋亡酶激活因子(Apaf-1)、Caspase-9前体、腺嘌呤核糖核苷酸/腺嘌呤脱氧核糖核苷酸(ATP/dATP)形成凋亡体,然后募集并激活Caspase-3,进而诱发Caspase家族级联反应,最终导致细胞凋亡<sup>[11-13]</sup>。同时,Bcl-2家族蛋白能够调节PT孔的开放和关闭:促凋亡蛋白Bax可通过与PT孔的腺苷转位因子(ANT)和电压依赖性阴离子通道(VDAC)结合介导PT孔的开放,继而发挥其促凋亡效应;而抗凋亡蛋白Bcl-2则可通过与Bax竞争性地结合ANT或VDAC,继而发挥其抗凋亡效应<sup>[14-16]</sup>。本研究结果显示,大戟苷能显著诱导Hela细胞发生凋亡,升高Cyt-C、Bax蛋白表达水平,降低Bcl-2蛋白表达水平。这提示大戟苷能诱导Cyt-C向细胞质释放,从而启动线粒体凋亡途径。

Caspase蛋白家族属于半胱氨酸蛋白酶,是诱发细胞凋亡的关键酶,一旦被激活即能降解细胞内的蛋白质,导致细胞发生不可逆的死亡<sup>[17]</sup>。Caspase蛋白通常分为两类:一类是启动者,如Caspase-8、Caspase-9和Caspase-10,它们能通过自催化或自剪接的方式被激活,继而引起Caspase家族级联反应;另一类是执行者,如Caspase-3、Caspase-6和Caspase-7,它们可直接降解细胞内结构蛋白和功能蛋白,引起细胞凋亡,但不能通过自催化或自剪接的方式被激活<sup>[18]</sup>。通常当Cyt-C过度释放进入细胞质后,Caspase-8、Caspase-9和Caspase-10接受凋亡信号后通过异源活化方式激活下游Caspase信号,将凋亡信号级联放大,被异源活化的Caspase-3等最终执行细胞死亡程序<sup>[19-20]</sup>。本研究结果显示,大戟苷能显著升高Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9和Caspase-10蛋白表达水平。这进一步提示大戟苷能通过启动线粒体凋亡途径而诱导Hela细胞凋亡。

综上所述,大戟苷能显著抑制Hela细胞增殖、促进细胞凋亡,其作用可能是通过激活Caspase依赖的线粒体凋亡途径来实现的。

## 参考文献

- [1] 魏丽惠,赵超. 宫颈癌及其癌前病变的筛查研究进展[J]. 中华妇幼临床医学杂志:电子版,2016,36(1):16-19.
- [2] 赵杰,吴繁荣,韩续,等. 泽漆化学成分研究[J]. 安徽医科大学学报,2016,51(3):383-388.
- [3] 杨万里,衷宇,丁井永. 泽漆抗肿瘤作用机制研究进展[J]. 现代肿瘤医学,2016,24(22):3680-3683.
- [4] SALEEM U, AHMAD B, AHMAD M, et al. Determination of cytotoxicity of latex and methanol extract of Euphorbia helioscopia leaves on vero cell line with MTT assay[J]. *Pak J Zool*, 2014, 46(3): 741-745.
- [5] 邵远,柳鹏程,程军胜,等. 泽漆乙酸乙酯提取物对SGC7901/DDP多药耐药性的逆转及机制[J]. 中成药, 2017, 39(8): 1713-1717.
- [6] WANG ZY, LIU HP, ZHANG YC, et al. Anticancer potential of Euphorbia helioscopia L extracts against human cancer cells[J]. *Anat Rec: Hoboken*, 2012, 295(2): 223-233.
- [7] LIU HP, SHI XF, ZHANG YC, et al. Quantitative analysis of quercetin in Euphorbia helioscopia L by RP-HPLC[J]. *Cell Biochem & Biophys*, 2011, 61(1): 59-64.
- [8] 刘海鹏. 泽漆的体外抗肿瘤作用及其生物活性组分研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2011.
- [9] CHEN H, WANG Z, YANG L. Analysis of euphornin in Euphorbia helioscopia L. and its cytotoxicity to mice lung adenocarcinoma cells(LA795)[J]. *Nat Prod Res*, 2012, 26(22): 2112-2116.
- [10] LOPEZ J, TAIT SWG. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within[J]. *Br J Cancer*, 2015, 112(6): 957-962.
- [11] NAGY A, EDER K, SELAK MA, et al. Mitochondrial energy metabolism and apoptosis regulation in glioblastoma[J]. *Brain Res*, 2015, 1595: 127-142.
- [12] YU X, ZHOU X, FU C, et al. Celastrol induces apoptosis of human osteosarcoma cells via the mitochondrial apoptotic pathway[J]. *Oncol Rep*, 2015, 34(3): 1129-1136.
- [13] MURPHY AN. Potential mechanisms of mitochondrial cytochrome-C release during apoptosis[J]. *Drug Develop Res*, 1999, 46(1): 18-25.
- [14] GIBSON CJ, DAVIDS MS. Bcl-2 antagonism to target the intrinsic mitochondrial pathway of apoptosis[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(22): 5021-5029.
- [15] KONG F, WANG H, GUO J, et al. Hsp70 suppresses apoptosis of BRL cells by regulating the expression of Bcl-2, cytochrome C, and caspase 8/3[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2016, 52(5): 568-575.
- [16] ALABSI AM, LIM KL, PATERSON IC, et al. Cell cycle arrest and apoptosis induction via modulation of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase dependence in Dracaena cinnabari-treated H400 human oral squamous cell carcinoma[J]. *Biomed Res Int*, 2016. DOI: 10.1155/2016/4904016.
- [17] SHALINI S, DORSTYN L, DAWAR S, et al. Old, new and emerging functions of caspases[J]. *Cell Death Differ*, 2015, 22(4): 526-539.
- [18] UNSAIN N, BARKER PA. New views on the misconstrued: executioner caspases and their diverse non-apoptotic roles[J]. *Neuron*, 2015, 88(3): 461-474.
- [19] OLA MS, NAWAZ M, AHSAN H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis[J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 351(1/2): 41-58.
- [20] PALAI TK, MISHRA SR. Caspases: an apoptosis mediator[J]. *J Adv Vet Anim Res*, 2015, 2(1): 18-22.

(收稿日期:2018-04-25 修回日期:2018-08-24)

(编辑:段思怡)