

$\Delta\psi_m$ 和 Caspase 3 在 As_2O_3 诱导腺样囊性癌 ACC-2 细胞凋亡过程中的作用

欧阳艳艳¹, 姜涛¹, 高萌¹, 肖利华², 周杨¹, 顿月丽¹, 赵桂秋¹, 刘世海³, 梁晔³

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目(No. ZR2012HM062)
作者单位: (266003) 中国山东省青岛市, 青岛大学医学院附属医院¹眼科; ³中心实验室; ²(100039) 中国北京市, 北京武警总医院眼眶病研究所

作者简介: 欧阳艳艳, 在读硕士研究生, 研究方向: 眼外伤、眼底病、眼眶病。

通讯作者: 姜涛, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 副主任医师, 副主任, 研究方向: 眼外伤、眼底病、角膜病、白内障、眼眶病。
lanlandetian20000@163.com

收稿日期: 2013-09-15 修回日期: 2013-12-26

Role of $\Delta\psi_m$ and Caspase 3 in the process of arsenic trioxide-induced apoptosis in adenoid cystic carcinoma ACC-2 cells

Yan-Yan Ouyang¹, Tao Jiang¹, Meng Gao¹, Li-Hua Xiao², Yang Zhou¹, Yue-Li Dun¹, Gui-Qiu Zhao¹, Shi-Hai Liu³, Ye Liang³

Foundation item: Natural Science Foundation of Shandong Province(No. ZR2012HM062)

¹Department of Ophthalmology; ³Central Laboratory, the Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China; ²Institute of Orbital Disease, Armed Police General Hospital, Beijing 100039, China

Correspondence to: Tao Jiang. Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China. lanlandetian20000@163.com

Received: 2013-09-15 Accepted: 2013-12-26

Abstract

• **AIM:** To investigate the role of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) and Caspase 3 in the ACC-2 cell apoptosis induced by As_2O_3 .

• **METHODS:** ACC-2 cells were cultured. The As_2O_3 of different drug concentration gradients (0, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 $\mu\text{mol/L}$) were applied to ACC-2 cells respectively. The changes in $\Delta\psi_m$ of ACC-2 cells before and after As_2O_3 's inducing (8.0 $\mu\text{mol/L}$ for 24h) were detected by flow cytometry with Rh123 staining. Caspase 3 activity was detected by the multifunctional microplate reader.

• **RESULTS:** Rh123 fluorescence intensity in ACC-2 cells was strongest in the control group, while it weakened in ACC-2 cells in 8.0 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 treatment group. The difference between two groups was significant ($P < 0.05$). With the increase of As_2O_3 concentration (0, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 $\mu\text{mol/L}$), Caspase 3 enzyme activity unit in ACC-2 cells gradually increased.

• **CONCLUSION:** As_2O_3 can induce apoptosis of ACC-2 cells by reducing $\Delta\psi_m$. Caspase 3 enzyme activity unit of ACC-2 cells gradually increases with As_2O_3 concentration increases, which results in activation of the expression of Caspase 3, and the cells' irreversible apoptosis process coming immediately.

• **KEYWORDS:** arsenic trioxide; adenoid cystic carcinoma ACC-2 cells; apoptosis; mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$); Caspase 3

Citation: Ouyang YY, Jiang T, Gao M, et al. Role of $\Delta\psi_m$ and Caspase 3 in the process of arsenic trioxide-induced apoptosis in adenoid cystic carcinoma ACC-2 cells. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2014;14(2):232-235

摘要

目的: 探讨线粒体膜电位($\Delta\psi_m$)、Caspase 3 在 As_2O_3 诱导 ACC-2 细胞凋亡中的作用。

方法: 进行 ACC-2 细胞培养, 将 As_2O_3 建立不同药物浓度梯度(0, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 $\mu\text{mol/L}$) 分别作用于 ACC-2 细胞, 用 Rh123 染色, 流式细胞仪检测 8.0 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 作用前、后(24h), ACC-2 细胞的线粒体膜电位($\Delta\psi_m$)变化; 用多功能酶标仪进行 Caspase 3 活性检测。

结果: 空白对照组 ACC-2 细胞内 Rh123 荧光强度最强, 8.0 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 处理组 ACC-2 细胞内 Rh123 荧光强度减弱, 其差异有显著性($P < 0.05$); 随着 As_2O_3 药物浓度的增高(0, 1, 2, 4, 8 $\mu\text{mol/L}$), ACC-2 细胞的 Caspase 3 酶活力单位逐渐增加。

结论: As_2O_3 作用于 ACC-2 细胞, 可通过降低线粒体膜电位从而引起细胞凋亡。随着 As_2O_3 药物浓度的增高, ACC-2 细胞的 Caspase 3 酶活力单位逐渐增加, Caspase 3 被激活, 细胞可发生不可逆转的凋亡过程。

关键词: 三氧化二砷; 腺样囊性癌 ACC-2 细胞; 凋亡; 线粒体膜电位; 半胱氨酸蛋白酶 3

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2014.02.09

引用: 欧阳艳艳, 姜涛, 高萌, 等. $\Delta\psi_m$ 和 Caspase 3 在 As_2O_3 诱导腺样囊性癌 ACC-2 细胞凋亡过程中的作用. 国际眼科杂志 2014;14(2):232-235

0 引言

腺样囊性癌(adenoid cystic carcinoma, ACC)为恶性肿瘤, 其特征为缓慢地局部浸润性生长, 且很容易局部复发与远处转移^[1]。ACC 恶性程度比较高, 属上皮性肿瘤, 可发生于全身各处, 常见的有涎腺^[2-4]、肺^[5]、气管^[6]等, 于眼眶部则好发于泪腺^[7,8]。泪腺 ACC 的平均发病年龄为 40 岁左右, 女性稍多见, 其发病率在泪腺上皮性肿瘤中仅次于多形性腺瘤而居于第 2 位, 是泪腺恶性上皮性

肿瘤中最为常见并且恶性程度最高的肿瘤,占所有眼眶肿瘤的1.6%^[9],是一种浸润性极强预后很差的肿瘤,很难根治,多数会局部复发,死亡率较高,其15a存活率不到20%^[10]。

ACC的临床治疗一直以来就是一个难点,报道的资料显示,化学治疗的反应率不高,有针对性的靶向治疗可能是一种选择^[11]。近年来,ACC的化疗研究逐渐为人们所重视,寻找新的更加有效的化疗药物成为临床基础研究的当务之急。

三氧化二砷(arsenic trioxide, As₂O₃)是最古老的毒物之一,无色无味,外观为白色霜状粉末,故称砒霜。作为抗肿瘤药物,在治疗急性早幼粒细胞白血病方面已较为成熟,尤其对于复发病例^[12-14]。另外,还可用于肝癌^[15]、肺癌^[16]、胰腺癌^[17]等的治疗。对于ACC的治疗目前仅限于实验室的研究中^[18]。

本研究旨在探询As₂O₃诱导腺样囊性癌ACC-2细胞凋亡的分子机制,寻找有效的化疗药物来治疗ACC,为临床应用提供可靠的理论依据。目前,关于这方面的研究国内外尚未见相关报道。近年来大量研究发现,线粒体与细胞凋亡进程关系密切,在抗肿瘤药物诱导肿瘤细胞凋亡的信号转导过程中,线粒体在促进凋亡信号和Caspase激活之间有着不可替代的作用^[19-22]。其中线粒体跨膜电位($\Delta\psi_m$)的影响,是线粒体参与的促凋亡过程中的重要环节^[20-22]。我们对As₂O₃作用于ACC-2细胞后,细胞 $\Delta\psi_m$ 和半胱氨酸蛋白酶3(Caspase 3)的变化进行了研究,探讨其在As₂O₃诱导腺样囊性癌ACC-2细胞凋亡过程中的作用,为As₂O₃治疗腺样囊性癌的临床应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验标本 腺样囊性癌ACC-2细胞株由上海交通大学医学院附属第九人民医院惠赠,经细胞复苏,RPMI-1640+10%胎牛血清培养液常规细胞培养,2~3d换液或传代一次,取指数生长期细胞用于实验。

1.1.2 主要试剂 注射用三氧化二砷:北京双鹭药业股份有限公司;Rhodamine 123 (Rh123):美国Sigma公司;Caspase 3活性检测试剂盒:碧云天(Beyotime)生物技术研究所。

1.1.3 主要实验仪器 BD FACSCalibur流式细胞仪:美国BD(Becton-Dickinson)公司;TECAN Safire II多功能酶标仪:瑞士。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 收集 1×10^6 个细胞,用50mL(25cm²)培养瓶培养ACC-2细胞,分为对照组和8.0 μ mol/L As₂O₃处理组,每组4瓶,分别培养24h后终止。

1.2.2 流式细胞仪检测ACC-2细胞线粒体跨膜电位($\Delta\psi_m$)变化的具体实验步骤 (1)ACC-2细胞已贴壁,吸除培养液置15mL离心管,做好标记。(2)2.5g/L胰蛋白酶1mL消化5min,吸除胰酶。(3)原吸除到15mL离心管的培养液回吸入培养瓶,吹打细胞,成细胞悬液;细胞悬液吸入到刚才的15mL离心管,离心(1000转,5min),弃去上清液,PBS洗2次(每离心管加PBS 4mL,吹打成细胞悬液,1000转,5min离心),弃去上清液。(4)细胞重悬于1mL Rh123染液,使终浓度为10 μ g/mL,室温避光孵育30min。(5)离心(1000转,5min),弃去上清,1mL PBS洗2次。(6)重悬细胞,过滤网,入流式细胞仪测试管,用流式细胞仪(BD FACSCalibur)检测Rh123的荧光

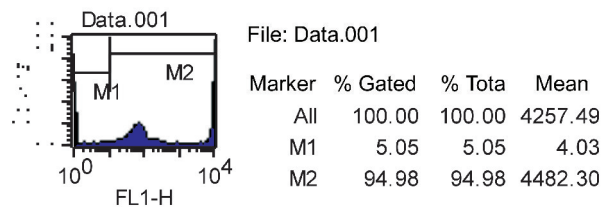


图1 对照组的线粒体膜电位。

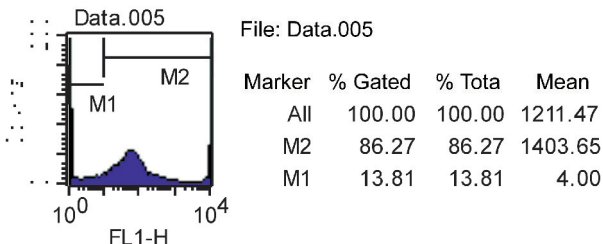


图2 8.0 μ mol/L As₂O₃处理组(24h)的线粒体膜电位。

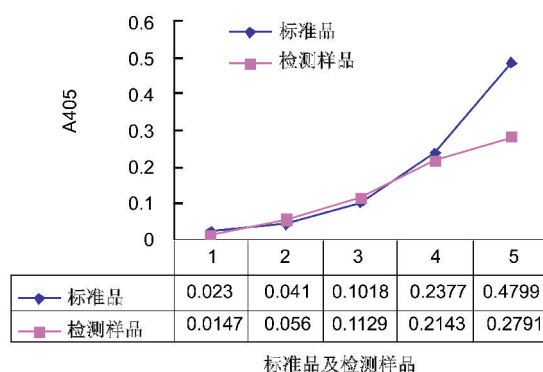


图3 检测样品(0, 1, 2, 4, 8 μ mol/L As₂O₃作用24h的ACC-2细胞)与标准曲线(10, 20, 50, 100, 200 μ mol/L pNA标准品)的对照。

表1 对照组与As₂O₃处理组(8.0 μ mol/L 24h)的ACC-2细胞线粒体膜电位 %

分组	1	2	3	4	$\bar{x} \pm s$
对照组	94.98	94.64	91.32	90.52	92.87 \pm 2.27
As ₂ O ₃ 组	86.27	90.09	80.11	81.05	84.38 \pm 4.67

强度(激发波长488nm,发射波长530nm)。所有资料用CellQuest Pro软件收集、分析。

1.2.3 Caspase 3活性检测的操作步骤 (1)实验分组:用50mL(25cm²)培养瓶培养ACC-2细胞,分为对照组和1.0, 2.0, 4.0, 8.0 μ mol/L As₂O₃处理组,每组1瓶,分别培养24h后终止。(2)测定pNA标准曲线,样品收集,Caspase 3酶活性的检测按试剂盒说明书进行操作。

统计学分析:采用SPSS 17.0统计学软件处理数据。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用t检验,标准曲线用线性回归分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ACC-2细胞 $\Delta\psi_m$ 结果 实验结果表明,空白对照组ACC-2细胞内罗丹明123荧光强度最强(图1),8.0 μ mol/L As₂O₃处理组(24h)ACC-2细胞内罗丹明123荧光强度减弱(图2),其差异有统计学意义($t = 3.27, P < 0.05$,表1)。

2.2 ACC-2细胞Caspase 3活性检测结果 经过检测,绘制pNA标准曲线(图3)。相关系数平方 $R^2 = 0.999, P = 0.000$,表明回归极显著。标准曲线中所对应的pNA浓

度分别为 10, 20, 50, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$, 其所对应的 Caspase 3 酶活力单位分别为 1, 2, 5, 10, 20 个。检测样品 (0, 1, 2, 4, 8 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 作用 24h 的 ACC-2 细胞) 的 A405 值及其与标准曲线的对照见图 3。对照标准曲线, 检测样品所对应的 Caspase 3 酶活力单位分别为 0.63913, 2.43478, 4.908696, 9.31739, 12.13478 个。

3 讨论

线粒体是细胞内的重要细胞器, 与细胞呼吸、氧的代谢、酶活性和能量供应有关, 线粒体的主要功能是产生能量, 可为细胞提供 ATP, 这些功能与线粒体膜的通透性和跨膜电位差 ($\Delta\psi\text{m}$) 有关^[19]。用于检测 $\Delta\psi\text{m}$ 的荧光染料有 Rh123、JC-1 和 DiOC₆(3) 等^[23]。Rh123 是检测 $\Delta\psi\text{m}$ 的常用染料之一, 通常与 PI 双染检测线粒体功能。在生理条件下 $\Delta\psi\text{m}$ 正常时, 线粒体膜产生较高的跨膜负电压, Rh123 带正电荷, 能跨过线粒体膜, 使荧光信号主要集中于线粒体。应用流式细胞术可以进行快速、高通量、多参数的定量分析, 更加有利于 $\Delta\psi\text{m}$ 的检测。当 $\Delta\psi\text{m}$ 下降, 线粒体就产生了形态和功能的改变。线粒体荧光探针罗丹明 123 能确定细胞生活状态和细胞代谢状态, 能特异地和活细胞线粒体结合。在各种刺激下, 线粒体罗丹明 123 荧光强度检测, 可代表线粒体的量和线粒体功能状态。罗丹明 123 荧光强度的下降, 说明线粒体内膜两侧电位差下降, 不能提供足够的电位梯度使标记物被吸收和保留在线粒体中; 电位差越小, 线粒体吸收的染料越少, 荧光强度就越弱。实验证实: 线粒体在死亡信号的诱导下, 跨膜电位下降, 线粒体膜通透性转运孔 (mitochondrial membrane permeability transition pore, MPTP) 开放是细胞凋亡的早期特征^[24]。 $\Delta\psi\text{m}$ 降低或丧失, 线粒体基质中释放出凋亡蛋白, 使细胞凋亡^[25]。近年来陆续有报道 $\Delta\psi\text{m}$ 的耗散是细胞凋亡级联反应过程中最早发生的事件, 而一旦 $\Delta\psi\text{m}$ 耗散, 细胞就会进入不可逆的凋亡过程^[26]。MPTP 是跨膜多蛋白孔, 定位于线粒体外膜接触点, 可能由电压依赖的阴离子通道 (VDAC)-腺苷酸移位酶-亲环蛋白 D 三联复合物构成, 有开放与关闭两种构象。MPTP 孔道作为许多生理效应的感受器 (二价阳离子、ATP、ADP、NAD、 $\Delta\psi\text{m}$ 、pH、巯基与多肽) 整合了电生理、氧化还原与细胞代谢状态的信息。在正常情况下, MPTP 只允许相对分子质量小于 1 500 的分子通过, 质子可自由通过线粒体膜形成稳定的线粒体膜电位, 如果 MPTP 开放, 导致线粒体膜电位下降或缺失, 且 MPTP 作用有自放大的效应。如果能稳定线粒体膜电位就能防止细胞凋亡或可阻止凋亡的进展。

本实验采用罗丹明 123 与 ACC-2 活细胞内线粒体基质结合, 对线粒体进行标记, 并采用流式细胞仪系统检测活细胞内的荧光强度, 进行定量分析, 以此反映细胞内线粒体膜电位的相对变化。实验结果表明, 空白对照组 ACC-2 细胞内罗丹明 123 荧光强度最强, 8.0 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 处理组 ACC-2 细胞内罗丹明 123 荧光强度减弱, 提示 As_2O_3 作用于 ACC-2 细胞, 可能通过降低线粒体膜电位从而引起细胞凋亡。

目前已逐渐认识到线粒体是细胞凋亡的“关键执行者”^[27, 28], 某些与凋亡相关的基因产物 (蛋白质和酶) 均可定位于线粒体。在细胞凋亡的诱导期, 线粒体的结构和功能就开始发生一些特征性的变化^[29]。细胞色素 C (Cytochrome C, Cyt C) 作为一种信号物质, 也在细胞凋亡

中发挥着重要的作用。正常情况下, 它存在于线粒体内膜和外膜之间的膜间腔中, 膜间腔内含有许多凋亡因子, 凋亡信号刺激使其从线粒体释放至细胞质。Cyt C 一旦释放可引起两种后果: (1) 与凋亡蛋白酶活化因子 1 (apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1) 结合, 在 ATP/dATP 的介导下, 使 Caspase-9 前体裂解为活化的 Caspase-9, 活化的 Caspase-9 再激活 Caspase-3, 引起细胞凋亡。(2) 由于 Cyt C 释放入胞质, 细胞内 Cyt C 减少或缺失, 可直接导致呼吸链电子传递中断, 最后导致细胞坏死^[30]。Cyt C 的释放是线粒体外膜通透性增高的结果。bcl-2 蛋白主要聚集在线粒体外膜, 阻止 Cyt C 的释放, 使胞质内 Caspase 不能激活, 细胞凋亡受阻。Caspase-3 是最重要的凋亡执行者之一, 激活的 Caspase-3 能降解 bcl-2 蛋白, 阻止其抗凋亡作用。Caspase-3 一旦被激活, 细胞凋亡的发生将不可逆转。我们的研究结果发现, 随着 As_2O_3 药物浓度的增高 (0, 1, 2, 4, 8 $\mu\text{mol/L}$), ACC-2 细胞的 Caspase 3 酶活力单位逐渐增加, Caspase 3 被激活, 细胞可发生不可逆转的凋亡过程。推测 As_2O_3 可抑制 ACC-2 细胞的 bcl-2 蛋白表达, 从而可造成线粒体外膜通透性增高, 促进 Cyt C 的释放。

对于药物诱导腺样囊性癌细胞凋亡的研究, 目前还不多, Chu 等^[31]的研究发现, 萝卜硫素可诱导涎腺腺样囊性癌高转移细胞株 ACC-M 细胞凋亡, 细胞阻滞于 G₂-M 期, bcl-2 表达下降, 随后触发细胞色素 C 从线粒体释放和 Caspase-3 的活化, 但在所有时间点, Fas 的水平和 Caspase-8 的活性仍然不变。另外, 细胞质和细胞核的核因子- κB (NF- κB) 和 p65 的水平也得到明显抑制。

关于 As_2O_3 作为抗肿瘤药物, 其抗肿瘤的机制研究, 目前只在白血病^[32]、宫颈癌^[33]、肝癌^[34]、多发性骨髓瘤^[35]、淋巴瘤^[36]、头颈部鳞状细胞癌^[37]等进行过。其中的作用机制也不尽相同, Yang 等^[32]在人急性髓系白血病细胞株 HL60 细胞上, 探讨自噬机制对 As_2O_3 诱导 HL60 细胞死亡的动态效果, 发现 HL60 细胞对 As_2O_3 的诱导反应, 仍是线粒体膜电位的崩溃, 细胞色素 C 从线粒体释放, 进而激活 Caspase-3。认为自噬在 As_2O_3 诱导 HL60 细胞死亡过程中作用比较复杂, 它在起始阶段抑制 As_2O_3 诱导凋亡, 但如果坚持激活的话, 它则放大 As_2O_3 介导的凋亡程序。Yu 等^[33]的研究则探讨了 As_2O_3 在体内和体外, 通过诱导宫颈癌细胞凋亡而发挥治疗作用。他们研究了 As_2O_3 对不同的宫颈癌细胞的诱导凋亡, 发现触发了细胞凋亡的线粒体途径, 并从 bax 和电压依赖阴离子通道 (voltage-dependent anion channels, VDAC) 分离 bcl-2, 然后从 bax 和 VDAC 通道释放细胞色素 C, 导致活化的 Caspase-9 和 Caspase-3。bcl-2 的过度表达, 抵消了的 As_2O_3 介导的细胞凋亡。 As_2O_3 也通过诱导微管聚合, 增加 M 期细胞周期分布。两个独立的死亡信号途径在宫颈癌细胞被激活, 一个以 JNK/p38/GADD45 为主, 另一个是 p53 信号途径。进一步研究证实, As_2O_3 也抑制体内肿瘤的生长。 As_2O_3 作为抑制剂, 在体外和体内都能抑制子宫颈癌扩散, 表现出治疗子宫颈癌的临床应用前景。

综上所述, As_2O_3 作用于 ACC-2 细胞, 可通过降低线粒体膜电位从而引起细胞凋亡。随着 As_2O_3 药物浓度的增高, ACC-2 细胞的 Caspase 3 酶活力单位逐渐增加, Caspase 3 被激活, 细胞可发生不可逆转的凋亡过程。

参考文献

- 1 Jaso J, Malhotra R. Adenoid cystic carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 2011;135(4): 511–515
- 2 Gondivkar SM, Gadbail AR, Chole R, et al. Adenoid cystic carcinoma: A rare clinical entity and literature review. *Oral Oncol* 2011; 47(4): 231–236
- 3 Sasahira T, Kurihara M, Yamamoto K, et al. Downregulation of runt-related transcription factor 3 associated with poor prognosis of adenoid cystic and mucoepidermoid carcinomas of the salivary gland. *Cancer Sci* 2011; 102(2): 492–497
- 4 Vacchi – Suzzi M, Bocciolini C, Bertarelli C, et al. Ki – 67 proliferation rate as a prognostic marker in major salivary gland carcinomas. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2010; 119(10): 677–683
- 5 Fujii Y, Masuda M, Hirokawa M, et al. Bilateral retial metastases of lung adenoid cystic carcinoma. *Hinyokika Kyo* 1991; 37(10): 1307–1311
- 6 Park I, Lim SN, Yoon DH, et al. Metastasectomy for hepatic metastases from adenoid cystic carcinoma of the trachea. *Gut Liver* 2009; 3(2): 127–129
- 7 Meel R, Pushker N, Bakhshi S. Adjuvant chemotherapy in lacrimal gland adenoid cystic carcinoma. *Pediatr Blood Cancer* 2009; 53(6): 1163–1164
- 8 Tse DT, Benedetto P, Dubovy S, et al. Clinical analysis of the effect of intraarterial cytoreductive chemotherapy in the treatment of lacrimal gland adenoid cystic carcinoma. *Am J Ophthalmol* 2006;141(1):44–53
- 9 Ducey N, Villemure JG, Jaques B. Cystic adenocarcinomas of the lacrimal gland. *Klin Monbl Augenheilkd* 2002; 219(4): 231–234
- 10 Marsh JL, Wise DM, Smith M, et al. Lacrimal gland adenoid cystic carcinoma; intracranial and extracranial en bloc resection. *Plast Reconstr Surg* 1981; 68(4): 577–585
- 11 Gupta AK, Wilke WW, Taylor EN, et al. Signaling pathways in adenoid cystic cancers; implications for treatment. *Cancer Biol Ther* 2009;8(20): 1947–1951
- 12 Alimoghaddam K, Ghavamzadeh A, Jahani M, et al. Treatment of relapsed acute promyelocytic leukemia by arsenic trioxide in Iran. *Arch Iran Med* 2011;14(3): 167–169
- 13 Baidil'dina DD, Maschan MA, Skorobogatova EV, et al. Recurrences of acute promyelocytic leukemia in children; experience with arsenic trioxide therapy and autologous hematopoietic cell transplantation. *Ter Arkh* 2010; 82(7): 20–25
- 14 Powell BL, Moser B, Stock W, et al. Arsenic trioxide improves event-free and overall survival for adults with acute promyelocytic leukemia; North American Leukemia Intergroup Study C9710. *Blood* 2010; 116(19): 3751–3757
- 15 Cui X, Wakai T, Shirai Y, et al. Arsenic trioxide inhibits DNA methyltransferase and restores methylation – silenced genes in human liver cancer cells. *Hum Pathol* 2006; 37(3): 298–311
- 16 Park JH, Kim EJ, Jang HY, et al. Combination treatment with arsenic trioxide and sulindac enhances apoptotic cell death in lung cancer cells via activation of oxidative stress and mitogen – activated protein kinases. *Oncol Rep* 2008; 20(2): 379–384
- 17 Wang W, Adachi M, Zhang R, et al. A novel combination therapy with arsenic trioxide and parthenolide against pancreatic cancer cells. *Pancreas* 2009; 38(4): e114–123
- 18 Hu T, Shi J, Jiao X, et al. Measurement of annexin V uptake and lactadherin labeling for the quantification of apoptosis in adherent Tca8113 and ACC–2 cells. *Braz J Med Biol Res* 2008; 41(9): 750–757
- 19 Mohamad N, Gutiérrez A, Núñez M, et al. Mitochondrial apoptotic pathways. *Biocell* 2005; 29(2): 149–161
- 20 Rasul A, Yu B, Khan M, et al. Magnolol, a natural compound, induces apoptosis of SGC–7901 human gastric adenocarcinoma cells via the mitochondrial and PI3K/Akt signaling pathways. *Int J Oncol* 2012; 40(4): 1153–1161
- 21 Kim YJ, Lee SA, Myung SC, et al. Radicicol, an inhibitor of Hsp90, enhances TRAIL–induced apoptosis in human epithelial ovarian carcinoma cells by promoting activation of apoptosis – related proteins. *Mol Cell Biochem* 2012; 359(1–2): 33–43
- 22 Burgeiro A, Gajate C, Dakirel H, et al. Involvement of mitochondrial and B – RAF/ERK signaling pathways in berberine – induced apoptosis in human melanoma cells. *Anticancer Drugs* 2011; 22(6): 507–518
- 23 Marchetti C, Jouy N, Leroy – Martin B, et al. Comparison of four fluorochromes for the detection of the inner mitochondrial membrane potential in human spermatozoa and their correlation with sperm motility. *Hum Reprod* 2004; 19(10):2267–2276
- 24 Lucken – Ardjomande S, Martinou JC. Newcomers in the process of mitochondrial permeabilization. *J Cell Sci* 2005; 118(Pt 3): 473–483
- 25 Danial NN. BCL–2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clin Cancer Res* 2007; 13(24): 7254–7263
- 26 Liu J, He H, Zhang Z, et al. Mitochondria play a role in the development of non – apoptotic programmed cell death of neutrophils induced by ONO–AE–248. *Cell Mol Immunol* 2007;4(6): 447–453
- 27 Lin HH, Hsu HL, Yeh NH. Apoptotic cleavage of NuMA at the C – terminal end is related to nuclear disruption and death amplification. *J Biomed Sci* 2007; 14(5): 681–694
- 28 Brenner C, Kroemer G. Apoptosis. Mitochondria – the death signal integrators. *Science* 2000; 289(5482): 1150–1151
- 29 Reed JC, Green DR. Remodeling for demolition; changes in mitochondrial ultrastructure during apoptosis. *Mol Cell* 2002;9(1):1–3
- 30 Haraguchi M, Torii S, Matsuzawa S, et al. Apoptotic protease activating factor 1 (Apaf–1) – independent cell death suppression by Bcl–2. *J Exp Med* 2000;191(10):1709–1720
- 31 Chu WF, Wu DM, Liu W, et al. Sulforaphane induces G2–M arrest and apoptosis in high metastasis cell line of salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Oral Oncol* 2009; 45(11): 998–1004
- 32 Yang YP, Liang ZQ, Gao B, et al. Dynamic effects of autophagy on arsenic trioxide – induced death of human leukemia cell line HL60 cells. *Acta Pharmacol Sin* 2008;29(1):123–134
- 33 Yu J, Qian H, Li Y, et al. Therapeutic effect of arsenic trioxide (As₂O₃) on cervical cancer *in vitro* and *in vivo* through apoptosis induction. *Cancer Biol Ther* 2007;6(4): 580–586
- 34 Li JJ, Tang Q, Li Y, et al. Role of oxidative stress in the apoptosis of hepatocellular carcinoma induced by combination of arsenic trioxide and ascorbic acid. *Acta Pharmacol Sin* 2006; 27(8): 1078–1084
- 35 Nakazato T, Ito K, Ikeda Y, et al. Green tea component, catechin, induces apoptosis of human malignant B cells via production of reactive oxygen species. *Clin Cancer Res* 2005; 11(16): 6040–6049
- 36 Michel L, Dupuy A, Jean – Louis F, et al. Arsenic trioxide induces apoptosis of cutaneous T cell lymphoma cells: evidence for a partially caspase – independent pathway and potentiation by ascorbic acid (vitamin C). *J Invest Dermatol* 2003;121(4):881–893
- 37 Seol JG, Park WH, Kim ES, et al. Potential role of caspase–3 and –9 in arsenic trioxide – mediated apoptosis in PCI–1 head and neck cancer cells. *Int J Oncol* 2001; 18(2): 249–255