

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.01177

芬维 A 胺和硼替佐米联用调节内质网应激蛋白促进肺癌 A549 细胞凋亡

汪莹^{1△}, 叶韵杰^{1△}, 徐健¹, 宁允叶¹, 商艳^{1*}, 金海^{2*}, 李强¹

1. 第二军医大学长海医院呼吸内科, 上海 200433

2. 第二军医大学长海医院胸心外科, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨芬维 A 胺[fenretinide, N-(4-hydroxyphenyl) retinamide (4-HPR), 一种人工合成的维甲酸]与硼替佐米联合应用对非小细胞肺癌 A549 细胞的促凋亡作用。**方法** 将非小细胞肺癌细胞株 A549 用不同浓度的 4-HPR(2.5、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)和硼替佐米(0.1、0.2、0.4、0.8 $\mu\text{mol/L}$)单独或联合处理 24 h。应用 MTT 法检测 4-HPR 和硼替佐米单独或联合处理对细胞的生长抑制作用;碘化丙啶(PI)染色和流式细胞术检测细胞周期;Annexin V-FITC 和 PI 双染检测细胞凋亡;实时荧光定量 PCR 和蛋白质印迹检测内质网应激相关凋亡蛋白 CHOP 的表达。**结果** 4-HPR 和硼替佐米单独处理肺癌细胞株 A549 能够以剂量依赖性方式抑制细胞增殖,两药联用后抗增殖作用明显增强。细胞周期检测显示两药联用能导致细胞停滞于 G₀/G₁ 期, S 期细胞显著减少。与两药单独使用相比, 4-HPR 和硼替佐米联用能显著增强 A549 细胞凋亡, 伴随内质网应激蛋白 CHOP 的 mRNA 和蛋白表达增强。**结论** 4-HPR 和硼替佐米联用能促进肺癌 A549 细胞的凋亡, 为药物联合治疗肺癌提供了实验基础。

[关键词] 非小细胞肺癌; A549 细胞; 硼替佐米; 芬维 A 胺; 细胞凋亡; 内质网应激

[中图分类号] R 734.2

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2013)11-1177-06

4-HPR combined with bortezomib promoting apoptosis of A549 lung cancer cells by regulating endoplasmic reticulum protein

WANG Ying^{1△}, YE Yun-jie^{1△}, XU Jian¹, NING Yun-ye¹, SHANG Yan^{1*}, JIN Hai^{2*}, LI Qiang¹

1. Department of Respiratory Medicine, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Thoracic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To explore the synergistic apoptosis-promoting effect of fenretinide (N-[4-hydroxyphenyl] retinamide, 4-HPR, a synthetic retinoic acid) with bortezomib in non-small cell lung cancer (NSCLC) A549 cells. **Methods** NSCLC A549 cells were treated with 4-HPR and bortezomib alone or in combination at different concentrations (2.5, 5, 10 and 20 $\mu\text{mol/L}$ for 4-HPR; 0.1, 0.2, 0.4 and 0.8 $\mu\text{mol/L}$ for bortezomib) for 24 h. MTT assay was performed to detect cell growth inhibition. Propidium iodide (PI) staining and flow cytometry were performed to analyze cell cycle. Annexin V-FITC and PI double staining was performed to detect apoptosis. Real-time quantitative PCR and Western blotting analysis were performed to examine the expression of endoplasmic reticulum stress protein CHOP. **Results** 4-HPR or bortezomib alone inhibited the cell proliferation in a dose-dependent manner, and combined treatment with both 4-HPR and bortezomib showed significantly a stronger anti-proliferative effect. Cell cycle analysis showed that the combination of the two drugs caused cell cycle arrest in the G₀/G₁ phase, with S phase cells significantly reduced. Compared with 4-HPR or bortezomib used alone, combination of both significantly enhanced the apoptosis of A549 cells, accompanied by enhanced expression of CHOP mRNA and protein, an endoplasmic reticulum stress marker. **Conclusion** Combination of 4-HPR and bortezomib can promote apoptosis in lung cancer A549 cells, which provides an experimental basis for their combination treatment of lung cancer.

[Key words] non-small-cell lung carcinoma; A549 cells; bortezomib; fenretinide; apoptosis; endoplasmic reticulum stress

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(11):1177-1182]

[收稿日期] 2013-05-29

[接受日期] 2013-09-04

[基金项目] 国家自然科学基金(81000006). Supported by National Natural Science Foundation of China (81000006).

[作者简介] 汪莹, 博士, 住院医师. E-mail: Wing_chhx@163.com; 叶韵杰, 博士, 住院医师. E-mail: hadrianye@163.com

△共同第一作者(Co-first authors).

*通信作者(Corresponding authors). Tel: 021-31161319, E-mail: shangyan751200@163.com; Tel: 021-31161764, E-mail: jinh-z@sohu.com

遍在蛋白-蛋白酶体通路是真核细胞内的一种非溶酶体蛋白降解系统^[1],通过在正常细胞和病变细胞中控制蛋白降解。遍在蛋白-蛋白酶体通路调节许多细胞内过程,如细胞周期、细胞凋亡、信号转导、DNA 转录以及抗原递呈^[2]。遍在蛋白-蛋白酶体通路的异常能导致包括肿瘤在内的许多疾病发生,因而成为肿瘤治疗的一个重要靶点^[3]。

硼替佐米(bortezomib, PS-341)是二肽基硼酸化合物,对蛋白酶体具有高度特异性抑制能力,通过抑制蛋白酶体 20S 催化中心的活性,从而选择性抑制体内某些参与调控细胞增殖和存活的蛋白质的降解^[4]。硼替佐米也是第 1 个应用于临床治疗的蛋白酶体抑制剂,能够有效抑制多种肿瘤(包括多发性骨髓瘤、甲状腺癌、乳腺癌、肺癌、胰腺癌、前列腺癌)生长和血管生成,迅速诱导肿瘤细胞凋亡^[5]。但是临床试验显示,单用硼替佐米对非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)的效果有限^[6]。目前的治疗策略是联合硼替佐米与其他药物治疗肿瘤,并显示了协同治疗效果^[7-8]。芬维 A 胺[fenretinide, N-(4-hydroxyphenyl) retinamide (4-HPR)]是一种人工合成的维甲酸类似物,对多种肿瘤具有化学预防作用,包括乳腺癌、前列腺癌、膀胱癌和皮肤癌等^[9]。在体外,4-HPR 对 NSCLC 细胞具有诱导凋亡作用^[10]。已有研究显示,4-HPR 和硼替佐米对黑色素瘤、成神经细胞瘤具有较好的联合抗肿瘤作用^[11-12]。本实验考察了 4-HPR 和硼替佐米联合应用对 NSCLC 细胞 A549 的抗肿瘤作用,为临床治疗肺癌提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 A549 细胞株购自中国科学院上海生命科学院细胞库。胎牛血清(FBS)为杭州四季青生物工程公司产品;高糖型 DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司。4-HPR、硼替佐米和二甲亚砜(DMSO)均购自 Sigma 公司,无水乙醇配制的储存液浓度为 10 mmol/L,避光保存于 -80°C 。使用时无水乙醇的终浓度小于 0.1%。小鼠抗人内质网应激相关凋亡蛋白 CHOP 单克隆抗体购于 Santa Cruz 公司。

1.2 细胞培养 将 A549 细胞以适当密度接种于含 10% FBS 的 DMEM 培养液,同时补充 100 U/mL 青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素和 2 mmol/L 谷氨酰胺,于 37°C 、饱和湿度、含 5% CO_2 的培养箱内培养。

1.3 细胞活力检测 以 MTT 法测定细胞活力。对数生长期的 A549 细胞以 $2 \times 10^4/\text{mL}$ 密度接种于 96 孔板,每孔 100 μL ,培养于含 10% FBS 的高糖 DMEM 培养液。分为 4-HPR 组、硼替佐米组、两药联用组和正常对照组;4-HPR 组加入 2.5、5、10、20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 浓度的 4-HPR;硼替佐米组加入 0.1、0.2、0.4、0.8 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 硼替佐米;两药联用组分别加入 2.5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 4-HPR + 0.1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 硼替佐米、5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 4-HPR + 0.2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 硼替佐米、10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 4-HPR + 0.4 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 硼替佐米、20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 4-HPR + 0.8 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 硼替佐米;以加入等量的不含药 DMEM 培养液的 A549 细胞作为正常对照组。分别于处理 24 h 后取细胞测细胞活力。每孔加入 MTT 溶液(5 mg/mL) 10 μL ,置于 37°C 下,暗处孵育 4 h,1 200 $\times g$ 离心 10 min,使蓝紫色产物 formazan 沉淀下来。吸出孔内培养上清液后,每孔加入 100 μL DMSO,充分溶解后,在酶标仪上 570 nm 处测定光密度(D)值。用每组细胞的 D 值除以对照组的 D 值,得到各组的相对细胞活力。

1.4 细胞周期检测 应用碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色分析 DNA 含量来测定细胞周期。对数生长期的 A549 细胞用无血清的 DMEM 培养 24 h,使其生长同步化。然后以 $2 \times 10^4/\text{mL}$ 密度接种于 24 孔培养板。分为 4 组:对照组、4-HPR (5 $\mu\text{mol}/\text{L}$)组、硼替佐米(0.2 $\mu\text{mol}/\text{L}$)组和两药联用组。培养 24 h 后,每组收集 $(1 \sim 2) \times 10^6$ 细胞,800 $\times g$ 离心 5 min。PBS 再洗涤 1 次,800 $\times g$ 离心后,加 PI 溶液(PI 终浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$; RNaseA 终浓度为 0.5 mg/mL),室温下暗处放置 15 min,上流式细胞仪检测。

1.5 细胞凋亡检测 用 Annexin V-FITC PI 双染检测细胞凋亡。将对数生长期的 A549 细胞分为 4 组:对照组、4-HPR (5 $\mu\text{mol}/\text{L}$)组、硼替佐米(0.2 $\mu\text{mol}/\text{L}$)组和两药联用组。培养 24 h 后,每组收集 2×10^5 细胞,800 $\times g$ 离心 5 min。PBS 洗涤 1 次,用 100 μL 1 \times 结合缓冲液重悬细胞,加入 2.5 μL Annexin V 和 5 μL PI(终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)后,暗处放置 15 min,再上流式细胞仪检测。

1.6 实时荧光定量 PCR 检测 CHOP mRNA 表达 根据 GenBank CHOP(NM_001109986.1)和管家基因 β actin (AY582799)的序列进行引物设计。CHOP 上游引物:5'-GGG AAA CAG CGC ATG AAG GA-3',下游引物:5'-GCG TGA TGG TGC

TGG GTA CA-3'; β actin 上游引物: 5'-GCC AAC CGC GAG AAG ATG A-3', 下游引物: 5'-CAT CAC GAT GCC AGT GGT A-3'。所有引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。收获各组 A549 细胞, PBS 洗涤后离心, 弃去液体, 在沉淀的细胞中加入 1 mL TRIzol, 然后加入 0.2 mL 氯仿, 震荡混匀后静置, 离心后提取上层加入异丙醇。离心后, 用 75% 乙醇洗涤沉淀, 再次离心后真空干燥, 加 DEPC 水溶解。应用 RT-Cycler™ 实时定量检测系统 (CapitalBio, Ltd) 和 SYBR Green (Molecular Probes) 测定各组 A549 细胞 *CHOP* mRNA 相对水平。反应体系: 12.5 μ L SYBR Premix *Ex Taq* (2 \times), 0.5 μ L 上、下游引物 (10 μ mol/L), 0.5 μ L Rox reference dye, 1 μ L 模板 DNA, 10 μ L 无菌水。反应条件: 先 95 $^{\circ}$ C 5 min 活化聚合酶, 再 PCR 扩增 40 个循环 (95 $^{\circ}$ C 45 s, 57 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 20 s)。

1.7 蛋白质免疫印迹法检测 *CHOP* 蛋白表达 将细胞用 PBS 洗涤 1 次, 以 0.25% 胰蛋白酶消化, 收集所有细胞后离心, 用 Bradford 法测定蛋白质含量。蛋白煮沸后, 每孔上样 50 μ g 总蛋白, 经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 再电转移至 PVDF 膜。用含 5% 脱脂奶粉的 TTBS 缓冲液封闭 2 h 后洗膜, 加入小鼠抗人 *CHOP* 单克隆抗体 (1:1 000) 在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。洗膜后, 加辣根过氧化物酶标记的兔抗小鼠二抗 (1:1 000), 室温震荡孵育 1 h。应用增强型化学发光试剂进行发光显色。对蛋白条带进行灰度扫描, 以 *CHOP* 蛋白对 β -actin 蛋白的灰度比值作为 *CHOP* 蛋白的相对表达值。

1.8 统计学处理 应用 SPSS 14.0 统计软件进行统计学分析, 计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA)。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 4-HPR 和硼替佐米联用抑制 A549 细胞活力 结果显示, 4-HPR 和硼替佐米单独作用都以浓度或时间依赖方式降低细胞活力 (图 1A、1B)。比较各时间点的数据, 24 h 时 4-HPR 或硼替佐米均对细胞活力有中等程度的抑制作用, 并且细胞活力在各浓度之间相差较大。因此, 在后续实验中, 我们选择 24 h 这一时间点。药物联用实验显示, 与单独药物组相比, 4-HPR 与硼替佐米联用能降低细胞活力 ($P < 0.05$, 图 1C)。在联合用药 4 种组合中, 组合 5 μ mol/L 4-HPR + 0.2 μ mol/L 硼替佐米和组合 10

μ mol/L 4-HPR + 0.4 μ mol/L 硼替佐米相对于 4-HPR 和硼替佐米单用组均显示出显著降低的细胞活力 ($P < 0.05$)。由于 5 μ mol/L 接近 4-HPR 的血浆药理浓度, 同时该组合的两种单药组细胞活力抑制和坏死的程度均不深, 有利于进一步的机制研究, 因此, 我们选择 5 μ mol/L 4-HPR + 0.2 μ mol/L 硼替佐米的组合进行后续研究。

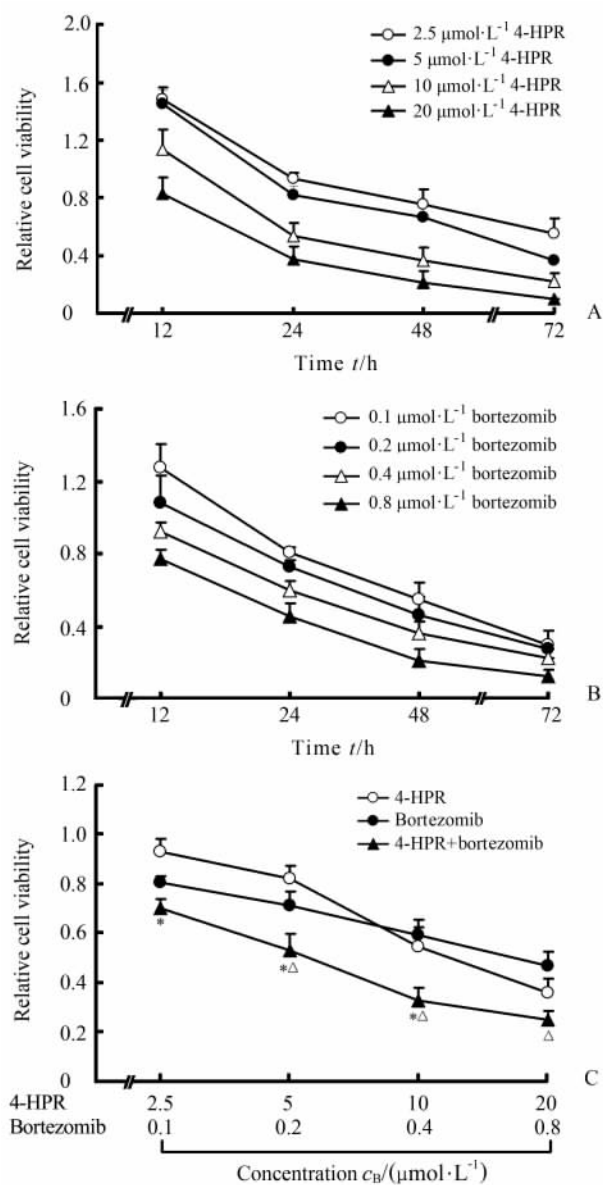


图 1 4-HPR 和硼替佐米联用对 A549 细胞活力的抑制作用
Fig 1 Combination of 4-HPR and bortezomib inhibited A549 cell viability

A, B; 4-HPR and bortezomib alone inhibited A549 cell viability in a concentration- and time-dependent manner; C: Combination of the two drugs showed a stronger anti-proliferative effect 24 h after incubation. 4-HPR: N-(4-hydroxyphenyl) retinamide. * $P < 0.05$ vs 4-HPR group; $\Delta P < 0.05$ vs bortezomib group. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

2.2 4-HPR 和硼替佐米联用诱导 A549 细胞周期停滞于 G₀/G₁ 期 我们研究了 4-HPR(5 μmol/L) 和硼替佐米(0.2 μmol/L)单独和联合使用对 A549 细胞周期分布的影响。研究结果(图 2)显示:4-HPR 和硼替佐米联用能显著提高 G₀/G₁ 期细胞比例,由对照组的 55.8% 提高到 80.7%;而两药单独处理均只能微弱地提高 G₀/G₁ 期细胞比例(4-HPR: 65.2%;硼替佐米:62.1%)。相应地,4-HPR 和硼替佐米联用也减少了 S 期和 G₂/M 期细胞的比例。

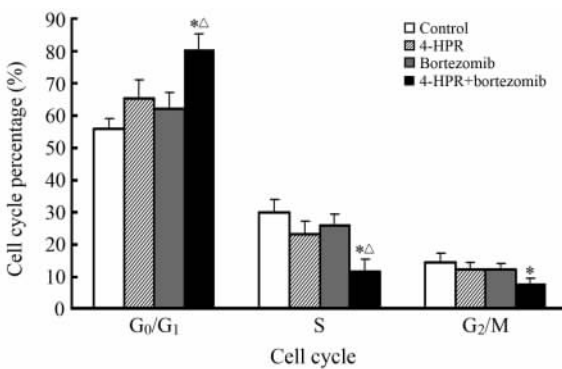


图 2 5 μmol/L 4-HPR 和 0.2 μmol/L 硼替佐米联用诱导 A549 细胞周期停滞于 G₀/G₁ 期

Fig 2 Combination of 5 μmol/L 4-HPR and 0.2 μmol/L bortezomib induced cell cycle arrest in G₀/G₁ phase in A549 cells

4-HPR: N-(4-hydroxyphenyl) retinamide. * $P < 0.05$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs 4-HPR group and bortezomib group. $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.3 4-HPR 和硼替佐米联用促进 A549 细胞凋亡 我们应用 Annexin V-FITC 和 PI 双染的方法,检测了 4-HPR(5 μmol/L)和硼替佐米(0.2 μmol/L)

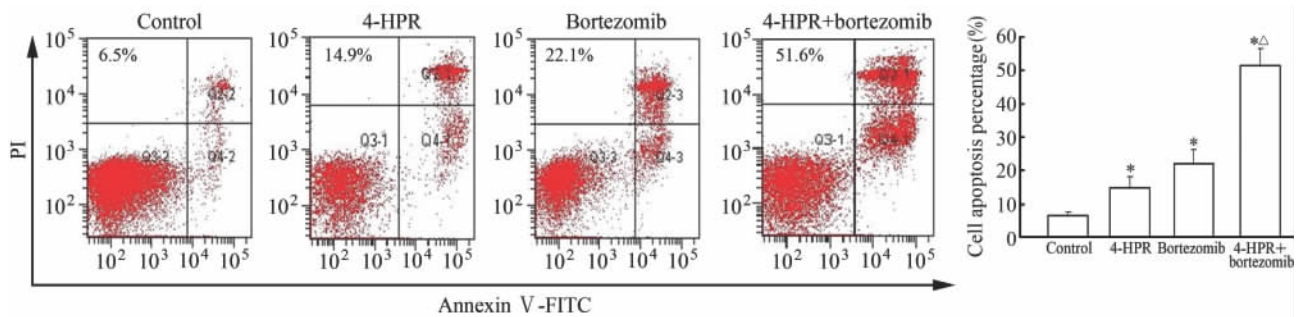


图 3 5 μmol/L 4-HPR 和 0.2 μmol/L 硼替佐米联用促进 A549 细胞凋亡

Fig 3 Combination of 5 μmol/L 4-HPR and 0.2 μmol/L bortezomib-induced apoptosis of A549 cells

PI: Propidium iodide; 4-HPR: N-(4-hydroxyphenyl) retinamide. * $P < 0.05$ vs control; $\Delta P < 0.05$ vs 4-HPR group and bortezomib group. $n = 3, \bar{x} \pm s$

单独和联合处理 24 h 后的细胞凋亡率。由图 3 可见,对照组 A549 细胞的自发凋亡率约为 6.5%;5 μmol/L 的 4-HPR 和 0.2 μmol/L 的硼替佐米单独处理后,细胞凋亡率较对照组明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$);两药联用后,凋亡率进一步升高,与对照组及两药单用组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 4-HPR 和硼替佐米联用增强内质网应激蛋白 CHOP 表达 我们应用实时荧光定量 PCR 和蛋白质印迹方法检测了 4-HPR(5 μmol/L)和硼替佐米(0.2 μmol/L)单独和联合处理 24 h 后内质网应激蛋白 CHOP 的表达。结果显示,4-HPR 或硼替佐米单独处理几乎不改变 CHOP mRNA 和蛋白表达水平,4-HPR 与硼替佐米联用能显著增强 CHOP mRNA 和蛋白表达(图 4)。

3 讨论

本实验探讨了 4-HPR 和硼替佐米联合应用对肺癌 A549 细胞的抗肿瘤作用。实验结果显示 4-HPR 和硼替佐米均能以浓度依赖方式降低细胞活力,二者联合能够增强抑制效果。这种抗肿瘤作用与诱导细胞周期停滞于 G₀/G₁ 期、增强细胞凋亡有关。我们还发现,4-HPR 和硼替佐米联用能通过激活细胞内内质网应激通路诱导细胞凋亡,表现为内质网应激相关凋亡蛋白 CHOP 表达增强。我们在 A549 肺癌细胞中证实了 4-HPR 和硼替佐米联用的抗肿瘤效果,提示这两种药物联合使用,有可能克服单独用药导致的疗效有限与耐药性,提高肺癌治疗效果。

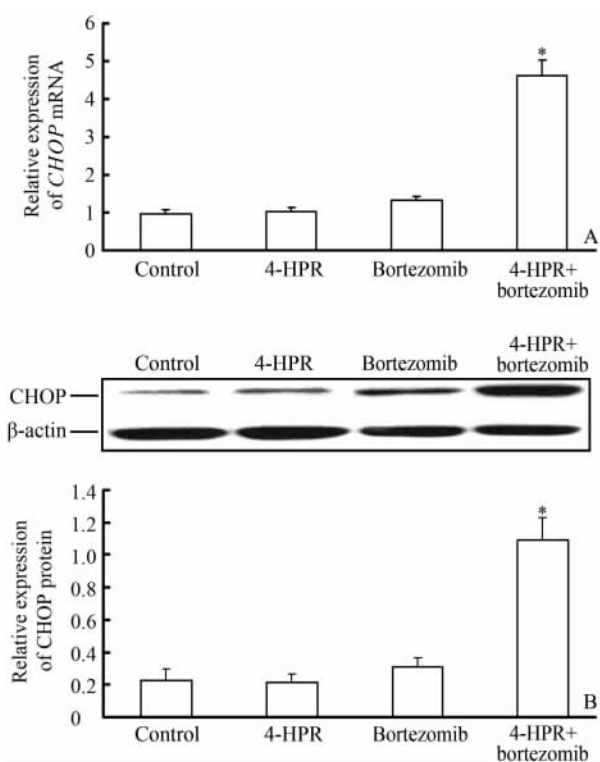


图 4 4-HPR 和硼替佐米联用增强 A549 细胞 CHOP 表达

Fig 4 CHOP expression in A549 cells 24 h after 4-HPR and bortezomib treatment

A: Real-time RT-PCR results; B: Western blotting results. 4-HPR; N-(4-hydroxyphenyl) retinamide. * $P < 0.05$ vs control group. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

4-HPR 和硼替佐米联合处理后活细胞减少,可能是细胞生长受到了抑制,也可能是细胞凋亡的原因。但是我们分析了细胞周期各时相的比例,发现联合用药后细胞周期阻滞于 G_0/G_1 期,表现为 G_0/G_1 期比例显著升高,S 期比例降低。我们的结果与文献报道类似,如在神经母细胞瘤中,4-HPR 和硼替佐米联用后导致了 G_2/M 期和 G_0/G_1 期细胞比例的增加,S 期细胞几乎完全消失^[12]。我们进一步发现,4-HPR 和硼替佐米联用能显著增强细胞凋亡。同样浓度的 4-HPR 和硼替佐米,当单独应用时,只引起中等程度的凋亡,但联用后引起强烈的凋亡。

内质网是细胞内膜蛋白和分泌蛋白修饰、折叠成熟的场所。蛋白质的正确折叠依赖于内质网内部存在的伴侣分子、钙离子及氧化还原环境,正确折叠的蛋白转移出内质网并分泌。错误折叠的蛋白大量沉积于内质网,作为降解通路的底物,由遍在蛋白酶系统降解^[13]。当各种原因破坏了伴侣分子有效折叠蛋白所需的氧化还原环境,并超出了蛋白

酶体降解能力,则导致内质网应激的发生^[14]。当内质网应激持续时间过长时,细胞会启动凋亡机制,而 CHOP 蛋白是执行内质网应激相关凋亡的一个非常重要的分子。我们的实验发现:4-HPR 和硼替佐米联合处理 24 h 后,A549 细胞表达 CHOP 的 mRNA 和蛋白均显著升高,但 4-HPR 或硼替佐米单独处理则几乎不改变 CHOP mRNA 或蛋白的表达水平。这提示 4-HPR 和硼替佐米联用后不仅诱导肺癌细胞产生内质网应激,而且所产生的持续应激最终诱导细胞凋亡。

实际上,4-HPR 和硼替佐米各自都能诱导肿瘤细胞产生内质网应激。硼替佐米主要通过抑制蛋白酶体降解内质网错误折叠蛋白,从而诱导肿瘤细胞产生内质网应激、细胞周期阻滞和凋亡^[15]。在吸烟导致的肺癌发展早期,肺上皮细胞内质网应激反应升高,并促进了肺癌的发展^[16]。内质网应激是一个复杂的过程,其中激活的信号通路既有促进细胞凋亡的,也有促进细胞存活的,如大量帮助折叠的分子伴侣的表达。细胞最终的命运,取决于凋亡还是存活占优势。这也可能是单独应用硼替佐米治疗肿瘤效果有限的原因。与硼替佐米相反,4-HPR 主要通过升高细胞内活性氧产生内质网应激^[17],因此可能产生互补作用,使细胞内的平衡向着凋亡的方向倾斜。

本研究证实了 4-HPR 与硼替佐米联用对肺癌细胞具有较强的抗肿瘤作用,表现为生长抑制、细胞周期阻滞和强烈凋亡,其机制可能与诱导细胞内质网应激通路的激活有关。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Roccaro A M, Hideshima T, Richardson P G, Russo D, Ribatti D, Vacca A, et al. Bortezomib as an antitumor agent[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2006, 7: 441-448.
- [2] Orłowski R Z. The ubiquitin proteasome pathway from bench to bedside[J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2005, 2005: 220-225.
- [3] Landis-Piwowar K R. Proteasome inhibitors in cancer therapy: a novel approach to a ubiquitous problem[J]. *Clin Lab Sci*, 2012, 25: 38-44.

- [4] Cvek B, Dvorak Z. The ubiquitin-proteasome system (UPS) and the mechanism of action of bortezomib[J]. *Curr Pharm Des*, 2011, 17:1483-1499.
- [5] Chen D, Frezza M, Schmitt S, Kanwar J, Dou Q P. Bortezomib as the first proteasome inhibitor anticancer drug: current status and future perspectives [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2011, 11:239-253.
- [6] Besse B, Planchard D, Veillard A S, Taillade L, Khayat D, Ducourtieux M, et al. Phase 2 study of frontline bortezomib in patients with advanced non-small cell lung cancer[J]. *Lung Cancer*, 2012, 76:78-83.
- [7] Wang C, Gao D, Guo K, Kang X, Jiang K, Sun C, et al. Novel synergistic antitumor effects of rapamycin with bortezomib on hepatocellular carcinoma cells and orthotopic tumor model[J]. *BMC Cancer*, 2012, 12:166.
- [8] Kawabata S, Gills J J, Mercado-Matos J R, Lopiccolo J, Wilson W 3rd, Hollander M C, et al. Synergistic effects of nelfinavir and bortezomib on proteotoxic death of NSCLC and multiple myeloma cells[J]. *Cell Death Dis*, 2012, 3:e353.
- [9] Hail N Jr, Kim H J, Lotan R. Mechanisms of fenretinide-induced apoptosis [J]. *Apoptosis*, 2006, 11: 1677-1694.
- [10] Choi E J, Whang Y M, Kim S J, Kim H J, Kim Y H. Combinational treatment with retinoic acid derivatives in non-small cell lung carcinoma *in vitro* [J]. *J Korean Med Sci*, 2007, 22 Suppl:S52-S60.
- [11] Hill D S, Martin S, Armstrong J L, Flockhart R, Toniason J J, Simpson D G, et al. Combining the endoplasmic reticulum stress-inducing agents bortezomib and fenretinide as a novel therapeutic strategy for metastatic melanoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15:1192-1198.
- [12] Pagnan G, Di Paolo D, Carosio R, Pastorino F, Marimpietri D, Brignole C, et al. The combined therapeutic effects of bortezomib and fenretinide on neuroblastoma cells involve endoplasmic reticulum stress response[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15:1199-1209.
- [13] Hoseki J, Ushioda R, Nagata K. Mechanism and components of endoplasmic reticulum-associated degradation [J]. *J Biochem*, 2010, 147:19-25.
- [14] Malhotra J D, Miao H, Zhang K, Wolfson A, Pennathur S, Pipe S W, et al. Antioxidants reduce endoplasmic reticulum stress and improve protein secretion [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105:18525-18530.
- [15] Brüning A, Burger P, Vogel M, Rahmeh M, Friese K, Lenhard M, et al. Bortezomib treatment of ovarian cancer cells mediates endoplasmic reticulum stress, cell cycle arrest, and apoptosis [J]. *Invest New Drugs*, 2009, 27: 543-551.
- [16] Jorgensen E, Stinson A, Shan L, Yang J, Gietl D, Albino A P. Cigarette smoke induces endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in normal and malignant human lung cells [J]. *BMC Cancer*, 2008, 8: 229.
- [17] Tiwari M, Kumar A, Sinha R A, Shrivastava A, Balapure A K, Sharma R, et al. Mechanism of 4-HPR-induced apoptosis in glioma cells: evidences suggesting role of mitochondrial-mediated pathway and endoplasmic reticulum stress [J]. *Carcinogenesis*, 2006, 27:2047-2058.

[本文编辑] 徐佳,尹茶