

文章编号 1006-8147(2018)05-0376-05

论著

ATR 抑制剂 VX-970 对 CPT 诱导的结肠癌细胞生长的影响

吴锦欢¹, 陈玉平², 李磊², 薛颖², 李振鑫¹, 乔海恒¹, 袁建²

(1. 天津医科大学生物医学工程与技术学院, 天津 300070; 2. 同济大学附属东方医院, 心率失常教育部重点实验室, 上海 200120)

摘要 目的: 探讨 ATR 特异抑制剂 VX-970 对喜树碱抑制的结肠癌细胞 HCT-116 生长, 促进结肠癌细胞 HCT-116 凋亡的影响。方法: 采用克隆形成、MTS、流式细胞术等实验分别检测单独使用 VX-970、CPT 以及联合 VX-970 和 CPT 用药处理对细胞生长、细胞周期及凋亡等影响, 蛋白免疫印迹检测 DNA 损伤关键蛋白 p-ATR, p-Chk1, γ H2AX 等的表达。结果: VX-970 增强 CPT 对 HCT-116 细胞生长和增殖的抑制作用, 促进细胞凋亡和减弱细胞周期 G2/M 期的阻滞。结论: VX-970 能显著增强 CPT 抑制 HCT-116 细胞生长, 诱导细胞凋亡和提高细胞对 CPT 药物的敏感性。

关键词 VX-970; 喜树碱; 凋亡; 结肠癌细胞; 生长

中图分类号 R735.3*5

文献标志码 A

Effect of ATR inhibitor VX-970 on the growth of colorectal cancer cell induced by CPT

WU Jin-huan¹, CHEN Yu-ping², LI Lei², XUE Ying², LI Zhen-xin¹, QIAO Hai-xuan¹, YUAN Jian²

(1. School of Biomedical Engineering and Technology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Key Laboratory of Arrhythmias of the Ministry of Education of China, East Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200120, China)

Abstract **Objective:** To investigate the effect of VX-970, an ATR specific inhibitor, on growth and apoptosis induced by CPT in colorectal cancer cells. **Methods:** Upon absence or presence of VX970 in CPT treatment for colorectal cancer cells, cell survival, proliferation, cell cycle and apoptosis were detected by colony forming, MTS and cell flow cytometry; the expression of DNA damage response key proteins (p-ATR, p-Chk1, γ H2AX) was detected by Western blot. **Results:** VX-970 enhanced the effect of CPT on inhibiting proliferation, promoted cell apoptosis and induced cell cycle G2/M phase arrest. **Conclusion:** Combining CPT with VX-970 could significantly inhibit the growth and apoptosis and sensitize human colorectal cancer cells to CPT.

Key words VX-970; CPT; apoptosis; colorectal cancer cells; growth

化疗是肿瘤治疗中使用频率最高, 范围最广的一种方法, 主要通过诱导 DNA 损伤而杀死肿瘤细胞, 但也出现很多副作用^[1-2]。化疗引起 DNA 单链断裂时激活 ATR/Chk1/p53 等信号通路, 而 DNA 双链断裂时激活 ATM/Chk2/p53 等信号通路后促进 DNA 损伤修复, 降低药物对细胞的毒性作用^[3]。化疗药物 CPT (Camptothecin) 主要引起 DNA 单链断裂 (会有少数双链断裂) 从而诱导细胞凋亡, 但同时也会激活并促进细胞 DNA 损伤修复通路, 降低化疗效果^[4]。VX-970 是一种 Vertex 共济失调毛细血管扩张和 Rad3 相关的蛋白激酶 (ATR) 的特异性抑制剂, 通过抑制 ATR 的磷酸化而抑制 ATR/Chk1 信号通路, 阻

碍 DNA 损伤修复^[5-6]。因此 VX-970 与化疗药物联合使用是一种潜在提高 CPT 化疗效果的方法。目前关于 CPT 和 VX-970 联合使用处理不同肿瘤细胞的报道不少, 但这两种药联合使用对结肠癌细胞 HCT-116 生长、周期以及凋亡的影响还不是很清楚。本研究以结肠癌 HCT-116 为细胞模型, 分别单独使用 VX-970、CPT 以及二者联合使用处理 HCT-116 细胞, 检测不同条件处理后对 HCT-116 细胞生长、周期、凋亡的影响, 同时利用蛋白免疫印迹 Western Blot 检测 DNA 损伤信号通路中关键蛋白 ATR、Chk1、Chk2 磷酸化水平以及 DNA 损伤标记蛋白 γ H2AX 的水平变化。

1 材料与方法

1.1 实验材料和细胞培养 人的结肠癌 HCT-116 细胞株由上海市东方医院肿瘤科惠赠, VX-970, 喜树碱, DMEM 培养基, 胎牛血清, 磷酸缓冲液 (PBS), 细

基金项目 国家自然科学基金重大研究计划 (91749115)

作者简介 吴锦欢 (1990-), 女, 硕士在读, 研究方向: DNA 损伤与肿瘤研究; 通信作者: 乔海恒, E-mail: qiaohaixuan@aliyun.com, 袁建, E-mail: yuanjian229@hotmail.com。

胞周期检测试剂盒,Annexin V-FITC/PI 双染凋亡试剂盒,二甲基亚砷(DMSO),细胞培养皿,移液管等耗材和试剂购于上海元象医疗器械有限公司。其中抗 P-ATR(Thr1989)抗体、抗 ATR 抗体、抗 P-Chk1(Ser345)抗体、抗 Chk1 抗体、抗 P-Chk2(Thr68)抗体、抗 Chk2 抗体、抗 γ H2AX 抗体、抗 H3 抗体均购于 Cell Signaling Technology 公司,而抗 β -actin 抗体购于 Proteintech 公司。

结肠癌 HCT-116 细胞株接种于 DMEM 培养基(含 10%的胎牛血清和 1%青链霉素),在 37℃、5%CO₂ 的培养箱中培养。从液氮复苏后次日更换新鲜培养基,待细胞长至 80%~90%密度时用含有 EDTA 的胰酶消化处理,传代培养以便用于相关的研究。

1.2 细胞克隆形成实验 取对数生长期的贴壁细胞,胰酶消化后取适量的细胞悬液至含有 1 mL 正常培养液的灭菌 EP 管中,轻轻吹打使细胞均匀分布,吸取单细胞悬液至血球计数板上并用盖玻片盖上,显微镜下进行细胞计数(4 格计数原则:左上、左下、右上、右下),每毫升(mL)所含细胞数=(细胞数总和/4) $\times 10^4$;计数结束后,每个孔(6 孔板)接种 1 000 个细胞,摇匀后至 37℃、5%CO₂ 培养箱培养。待细胞完全贴壁后,VX-970 与 CPT 联合处理的细胞,先加 VX-970 提前 1 h 处理后再用 CPT 处理,每组设立 3 个复孔,放入培养箱继续培养 7~10 d。终止培养后吸掉培养基,每孔加入 1 mL 的甲醇固定 30 min,用 1 XPBS 洗 3 遍后每孔加入 1 mL 的考马斯亮蓝染色 2 h,吸掉考马斯亮蓝用 ddH₂O 洗净残余的染料,倒置晾干后计数。

1.3 细胞活力测定(MTS) 取对数生长期的贴壁细胞,胰酶消化后取适量的细胞悬液至含有 1 mL 正常培养液的灭菌 EP 管中,轻轻吹打使细胞均匀分布,吸取单细胞悬液至血球计数板上并用盖玻片盖上,显微镜下进行细胞计数(4 格计数原则:左上、左下、右上、右下),每毫升(mL)所含细胞数=(细胞数总和/4) $\times 10^4$;以每孔 3 000 个细胞接种到 96 孔板,每组设立 6 个复孔;待细胞贴壁完全贴壁后,分别单独使用 CPT(0、0.001、0.01、0.1、1 μ mol/L),以及联合使用 50 nmol/L 的 VX-970 和 CPT(0、0.001、0.01、0.1、1 μ mol/L)处理后,继续培养 3 d;然后每孔加入 20 μ L 的 MTS 溶液,培养箱中孵育 3 h,最终在酶标仪上选择 490 nm 波长测定各孔光吸收值,记录结果。

1.4 PI 染色测定 细胞周期取对数生长期的 HCT-116 细胞于六孔板中培养,待细胞密度达到 60%~70%时分别给予 DMSO、4 μ mol/L CPT、100 nmol/L

VX-970、4 μ mol/L CPT+100 nmol/L VX-970 处理。待处理 24 h 后 PBS 洗涤细胞 1 次收集并调整细胞浓度 1×10^6 cells/mL,取 1 mL 单细胞悬液,2 000 r/min 4℃,离心 3 min,弃上清,预冷的 PBS 洗两遍;加入 70%乙醇-20℃固定过夜,次日 2 000 r/min 4℃,离心 3 min,弃掉固定液;预冷 PBS 洗两遍(用 200 目的筛网过滤一次),加入 100 μ L 的 RNase-A 于 37℃水浴 30 min,加入 500 μ L 的 PI 染料重悬细胞,冰上避光孵育 30 min 后上机检测。

1.5 Annexin V-FITC/PI 双染法 流式细胞术取对数生长期的细胞分别用 CPT、VX-970、CPT+VX-970 药物处理,分别给予 10 μ mol/L CPT、100 nmol/L VX-970、10 μ mol/L CPT+100 μ mol/L VX-970 药物处理。以上药物处理 24 h 后收集细胞,1 000 r/min 离心 3 min,弃上清,预冷的 PBS 洗两遍。加入 500 μ L 的结合缓冲液轻轻吹打成单细胞悬液并调整细胞浓度 1×10^6 cells/mL,加入 5 μ L 的 FITC 避光冰上孵育 15 min,再加上 10 μ L 的 PI 染料冰上避光孵育 5 min 后上机检测。

1.6 免疫印迹分析 取对数生长期的细胞,消化离心,铺 6 cm 皿,次日待细胞长至 60%后分别给予 10 μ mol/L CPT、100 nmol/L VX-970、10 μ mol/L CPT+100 nmol/L VX-970 药物处理;细胞处理 12 h 后收集细胞,加入 NETN 裂解液,冰上裂解 30 min,12 000 r/min 4℃,离心 10 min,取上清用 BCA 蛋白浓度测定,调整蛋白浓度,加入 5X Loading Buffer 于 100℃煮 5 min。取制备好的蛋白样品至 SDS-PAGE 胶进行蛋白电泳,使用 Biorad 全能型蛋白快速转膜仪把 SDS-PAGE 胶上的蛋白转移至 PVDF 膜上;5%的脱脂奶粉封闭 1 h,取目的条带加入对应 P-ATR 抗体,ATR 抗体,P-Chk1 抗体,Chk1 抗体,P-Chk2 抗体,Chk2 抗体, γ H2AX 抗体,H3 抗体, β -actin 抗体,4℃孵育过夜;次日用 1XTBST 洗 3 遍,每次 5 min,根据抗体的属性加入对应的鼠或兔的荧光二抗,避光室温孵育 1 h;1XTBST 洗 3 遍,每次 5 min,ECL 曝光显影,观察结果。

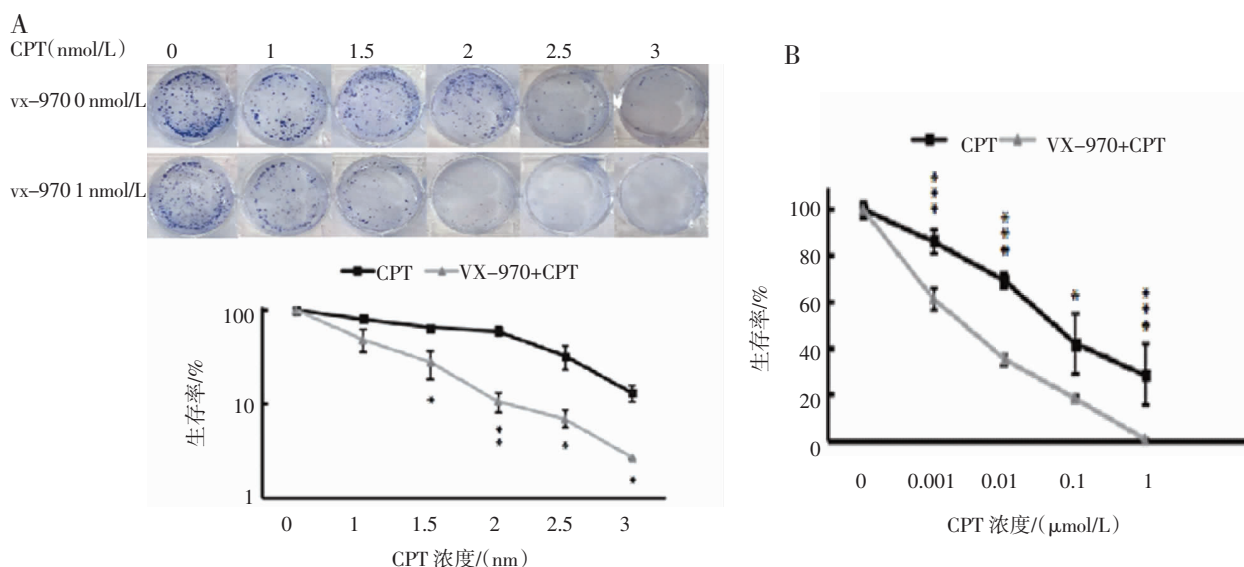
1.7 统计学方法 细胞活性实验 MTS(6 个平行复孔),细胞克隆实验(3 个平行复孔),蛋白免疫印迹实验(3 次独立重复实验)等均采用 SPSS22.0 统计软件进行统计分析,两组间样本比较采用 *t* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 时,差异具有统计学意义,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

2 结果

2.1 VX-970 增强 CPT 抑制 HCT-116 细胞的生长

细胞集落经考马斯亮蓝染色结果(图 1A),表明 VX-970 和 CPT 共同作用明显抑制 HCT-116 细胞的生长($P<0.01$)。进一步探究 VX-970 增强 CPT 对细胞增殖的抑制作用,与 CPT 单独处理相比较,CPT

与 VX-970 共同处理后 MTS(细胞活力测定)统计结果(图 1B)表明,VX-970 和 CPT 共同作用能显著抑制 HCT-116 细胞的生长($P<0.001$),抑制率随着给药浓度的增加而升高。



A. 克隆形成实验检测 VX-970 对 CPT 抑制 HCT-116 细胞生长的影响;B. MTS 实验检测 VX-970 对 CPT 抑制 HCT-116 细胞生长的抑制的影响 (* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$)

图 1 VX-970 增强了 CPT 对 HCT-116 细胞生长的抑制作用

Fig 1 VX-970 enhanced the effect of inhibiting growth induced by CPT

2.2 VX-970 联合 CPT 抑制 HCT-116 细胞的增殖 为了进一步证实 VX-970 能够增强 CPT 对 HCT-116 细胞生长的抑制作用,分别使用 VX-970, CPT 以及联合使用 VX-970 和 CPT 处理 HCT-116 细胞。倒置镜下观察发现,与对照(DMSO 处理)比较,单独使用 CPT 处理后细胞的增殖能力明显减弱,CPT 联合 VX-970 处理后细胞增殖能力显著受到抑制。以上实验结果表明 VX-970 能够显著增强 CPT 抑制 HCT-116 细胞生长的效果(图 2)。

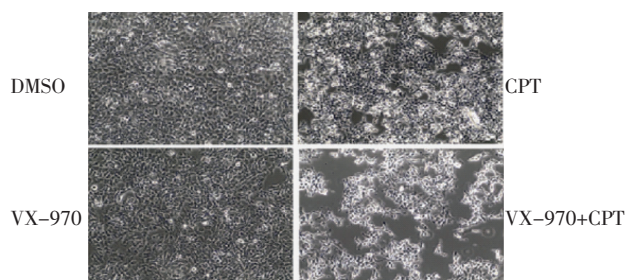


图 2 VX-970 与 CPT 作用对 HCT-116 细胞增殖影响的形态学观察 (×20)

Fig 2 Morphological observation of HCT-116 cells after treatment with DMSO, VX-970, CPT and VX-970+CPT for 48 hours (×20)

2.3 VX-970 联合 CPT 对 HCT-116 细胞周期的作用 为了研究 VX-970 和 CPT 对 HCT-116 细胞周

期的作用,单独 CPT 处理诱导细胞周期阻滞在 G2/M 期,而与单独 CPT 处理的细胞比较,联合 VX-970 和 CPT 处理的细胞 G2/M 期阻滞明显减弱(图 3),结果表明 VX-970 能够减弱由 CPT 诱导的细胞周期阻滞。

2.4 VX-970 增强 CPT 诱导的 HCT-116 细胞凋亡 为进一步阐明 VX-970 增强 CPT 杀伤 HCT-116 细胞作用效果,流式细胞术检测细胞凋亡率,使用 SPSS 统计分析(图 4),与对照相比,单独使用 CPT 处理 HCT-116 细胞凋亡率明显增加($P<0.001$),而 VX-970 与 CPT 联合使用处理 HCT-116 后细胞凋亡率显著增加($P<0.001$),表明 VX-970 能增强 CPT 诱导的 HCT-116 细胞凋亡。

2.5 VX-970 增强 CPT 诱导的 DNA 损伤 为了进一步阐明 VX-970 增强 CPT 作用的分子机制,不同药物处理 HCT-116 细胞后,蛋白免疫印迹检测 DNA 单链损伤关键蛋白 γ H2AX、p-ATR、p-Chk1 等表达水平,结果(图 5)发现与对照组相比,单独 CPT 处理后,p-ATR、p-Chk1 和 γ H2AX 表达显著上调;与单独 CPT 处理相比联合 VX-970 和 CPT 处理后,显著下调 p-ATR、p-Chk1($P<0.001$),而 p-Chk2 并未下调(p-Chk2 由 ATM 激活,表明 VX-970 特异性

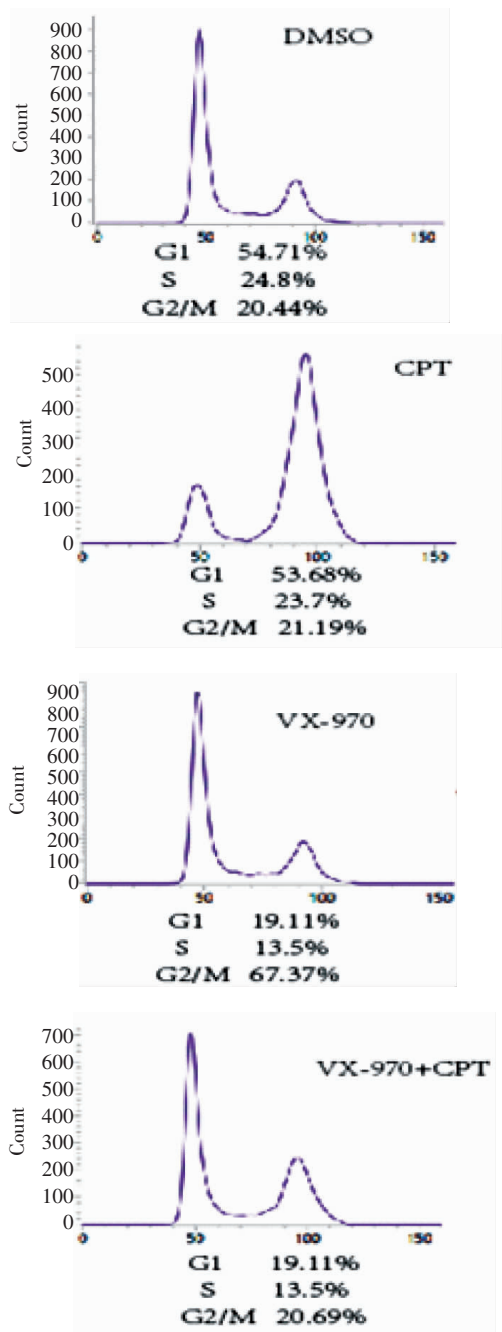
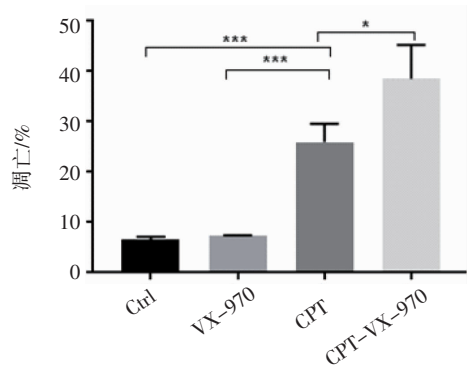
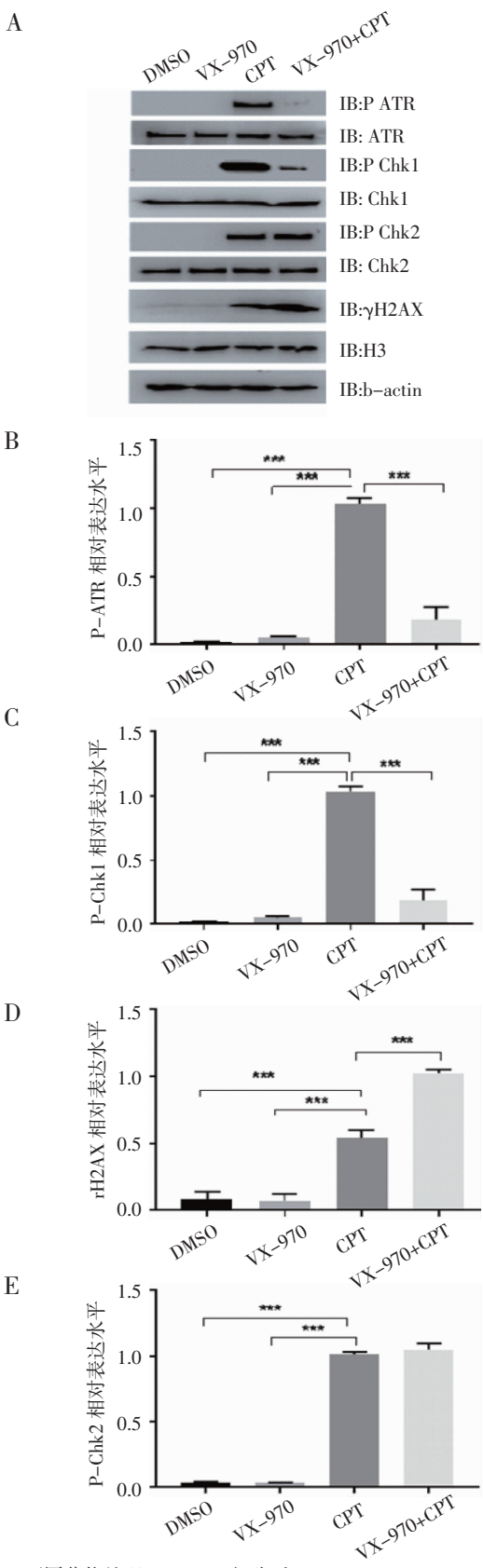


图 3 VX-970 与 CPT 作用对 HCT-116 细胞周期的影响
Fig 3 Effect of VX-970 and CPT on cell cycle of HCT-116 cells



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图 4 VX-970 增强 CPT 对 CP 诱导的细胞凋亡
Fig 4 VX-970 enhanced cell apoptosis induced by CPT



A:不同药物处理 HCT-116 细胞后 p-ATR, p-Chk1, p-Chk2, γH2AX 等蛋白 Western Blot 结果;B-E 图为 A 图(3 次独立实验)实验结果分析 p-ATR (Thr1989), p-Chk1 (Ser345), p-Chk2 (Thre68), γH2AX (Ser-139)相对表达水平统计结果(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

图 5 VX970 增强 CPT 诱导的 DNA 损伤
Fig 5 VX-970 elevated DNA damage induced by CPT

好);显著上调 γ H2AX 的表达($P<0.001$),由此表明 VX-970 进一步加剧 CPT 诱导的 DNA 损伤。以上结果表明 VX-970 通过抑制 ATR 的磷酸化抑制 DNA 损伤修复,增强 CPT 诱导的细胞凋亡。

3 讨论

DNA 损伤会导致基因组的不稳定性进而引发细胞死亡或肿瘤的发生,因此细胞进化出一套完整的检验系统和 DNA 损伤修复反应(DDR)机制去保护细胞免受 DNA 损伤对细胞的毒害作用,但与此同时 DDR 的高效性也是导致肿瘤细胞在 DNA 损伤抗肿瘤药物作用下产生耐药的主要因素^[12]。有研究发现 DDR 的抑制剂能增加化疗药物对肿瘤的杀伤效果,目前 DDR 信号通路中 Chk1 的抑制剂已经在临床上使用^[7-9]。ATR 的靶向抑制剂主要有 VX-970 (也称 VE822)和 AZD6738,其中 VX-970 对 ATR 具有更高的特异性。有研究表明, VX-970 通过抑制 ATR 的激活,阻碍了由顺铂类药物诱导的 Chk1 的磷酸化(Ser-345),提高 DNA 损伤标记蛋白 H2AX 磷酸化(Ser-139)和 KAP1 磷酸化(Ser-824)水平,加剧了由顺铂类化疗药物诱导的 DNA 损伤^[8-9]。此外,研究发现 VX-970 的类似物 VE-821 在卵巢癌细胞中也有类似的效果^[10]。

化疗药物喜树碱(CPT)是一种天然五环的喹啉生物碱,最早用于结肠癌的治疗,主要通过抑制 DNA 拓扑异构酶 I 而导致 DNA 双链在复制时断裂,进而激活细胞凋亡发挥其抗肿瘤作用^[11]。但是由于癌细胞存在较高 DNA 损伤修复活性,其通过 DNA 损伤修复降低 CPT 等化疗药物对细胞的毒害作用,最终导致化疗耐受降低化疗效果^[12]。因此,靶向抑制 DNA 损伤信号通路中的关键蛋白(ATR, ATM, Chk1, Chk2 等)是一种潜在提高化疗药物治疗效果的有效策略^[13]。

在本课题中,我们选择 ATR 的特异性抑制剂 VX-970 与 CPT 联合使用,比较联合使用 VX-970 和 CPT 与单独使用 CPT 对 HCT-116 细胞的生长、周期以及凋亡等的影响。同在其他肿瘤的研究结果相似^[14-16],我们发现 VX-970 能够显著减弱由 CPT 诱导的细胞周期阻滞作用,加剧由 CPT 诱导的 DNA 损伤;VX-970 能显著增强 CPT 诱导 HCT-116 细胞凋亡,抑制细胞增殖以及提高 CPT 对 HCT-116 的杀伤作用。同时通过检测 DNA 损伤信号通路(主要是 DNA 单链断裂信号通路)上关键蛋白磷酸化的表达水平,我们发现 VX-970 特异性地抑制了由 CPT 诱导的 ATR 的磷酸化水平,此外作为 ATR 磷

酸化底物的 Chk1 的磷酸化水平也显著降低,而作为 ATM 底物的 Chk2 的磷酸化水平没有受到抑制。这表明 VX-970 抑制是一种 ATR 高选择性,高特性的抑制剂。此外我们还检测了 DNA 损伤标记蛋白 γ H2AX 的表达水平,发现联合使用 VX-970 和 CPT 处理细胞比单独使用 CPT 处理细胞, γ H2AX 有着更高的表达水平。这表明 VX-970 可能通过抑制 ATR 的激活,从而降低由 CPT 诱导 DNA 损伤修复活性,从而加剧了由 CPT 诱导的损伤,进而增强了 HCT-116 细胞的敏感性,增强了 CPT 对 HCT-116 细胞的杀伤能力。

由于机体的复杂性以及 DNA 损伤修复信号通路的错综复杂,详细的机制还需要进一步的研究验证。在本课题中我们初步验证了在细胞水平上 VX-970 能增强 CPT 对 HCT-116 细胞的杀死效果,为了进一步验证 VX-970 能够增强 CPT 在结肠癌中的治疗效果,下一步我们将选用更多不同的结肠癌细胞系作为研究对象,分别检测 VX-970 是否能够增强 CPT 对这些细胞系的杀伤效果。其次,我们计划在动物(小鼠)水平上验证 VX-970 是否能够增强 CPT 对结肠癌的杀伤能力。总之,我们的研究结果初步表明 VX-970 是一种潜在提高 CPT 在结肠癌中化疗效果的药物,但为了使其能够应用到临床,还需要进一步的研究和验证。

参考文献:

- [1] 聂磊,薛迎利,李雅,等. 托泊替康与伊立替康单药治疗老年小细胞肺癌的疗效观察[J]. 现代肿瘤医学, 2017, 25(6):905
- [2] 孙佳,李胜范,郑丽丽. ATM /ATR 在 DNA 损伤反应中的作用[J]. 中华临床医师杂志, 2011, 5(6):1683
- [3] Zhang P, Wei Y, Wang L, et al. ATM-mediated stabilization of ZEB1 promotes DNA damage response and radioresistance through CHK1[J]. Nat Cell Biol, 2014, 16(9):864
- [4] 王晓娜,任来峰,赵安江,等. 3-甲基腺嘌呤对喜树碱诱导的宫颈癌 Hela 细胞凋亡的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(8):1128
- [5] Jossé R, Martin S E, Guha R, et al. ATR inhibitors VE-821 and VX-970 sensitize cancer cells to topoisomerase I inhibitors by disabling DNA replication initiation and fork elongation responses[J]. Cancer Res, 2014, 74(23):6968
- [6] Hall A B, Newsome D, Wang Y, et al. Potentiation of tumor responses to DNA damaging therapy by the selective ATR inhibitor VX-970[J]. Oncotarget, 2014, 5(14):5674
- [7] Fokas E, Prevost R, Pollard J R, et al. Targeting ATR in vivo using the novel inhibitor VE-822 results in selective sensitization of pancreatic tumors to radiation[J]. Cell Death Dis, 2012, 3:e441
- [8] Lord C J, Ashworth A. The DNA damage response and cancer therapy[J]. Nature, 2012, 481(7381):287

功能异常,最终导致肝硬化甚至肝癌^[6]。肝纤维化发生最为关键的一步是 HSC 的活化和增殖^[7]。TGF- β 1 是目前已知最强的促肝纤维化细胞因子^[8]。HSCs 在 TGF- β 1 的作用下活化增殖,并且促进细胞外基质 I 型胶原和 IV 型胶原的产生进而使得肝纤维化进一步发生发展^[9]。本实验应用蒿鳖养阴软坚方能显著抑制 LX-2 细胞的增殖,表明蒿鳖养阴软坚方可通过抑制 LX-2 细胞增殖发挥抗纤维化的作用。羟脯氨酸是胶原蛋白中特有的有效成分,肝纤维化时,活化的 HSCs 合成大量以胶原纤维为主的细胞外基质,测定培养液上清中羟脯氨酸含量可换算成 HSCs 产生胶原蛋白的含量,以反映肝纤维化的程度^[10]。蒿鳖养阴软坚方能显著降低羟脯氨酸含量。 α -SMA 是 HSCs 活化的标志,在肝纤维化研究中被广泛应用, α -SMA 的表达随着肝纤维化的加重而增加^[11]。本实验通过测定 LX-2 细胞中 α -SMA 的表达来反映肝纤维化的程度。实验结果显示,蒿鳖养阴软坚方降低 α -SMA 蛋白水平,表明蒿鳖养阴软坚方能抑制 LX-2 细胞活化,从而发挥抗肝纤维化的作用。

中药在治疗肝纤维化方面有其独特的优势,中药复方多成分、多靶点的特点正好应对肝纤维化复杂的发病机制。蒿鳖养阴软坚方主要是由鳖甲、青蒿、地黄等九味中药构成,具有多种药理作用。本实验探究蒿鳖养阴软坚方对 LX-2 细胞增殖,细胞产生羟脯氨酸含量以及相关蛋白表达的影响,发现蒿鳖养阴软坚方具有良好的抗肝纤维化作用。

本研究结果显示,蒿鳖养阴软坚方通过抑制 HSCs 的激活增殖和细胞外基质的沉积减轻 TGF- β 1 诱导的肝纤维化,为临床治疗肝纤维化提供了新的理论依据。

参考文献:

- [1] Popov Y, Schuppan D. Targeting liver fibrosis: strategies for development and validation of antifibrotic therapies[J]. *Hepatology*, 2009, 50(4):1294
- [2] Yin C, Evason K J, Asahina K, et al. Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(5):1902
- [3] Dooley S, Delvoux B, Streckert M, et al. Transforming growth factor beta signal transduction in hepatic stellate cells via Smad2/3 phosphorylation, a pathway that is abrogated during in vitro progression to myofibroblasts. TGFbeta signal transduction during transdifferentiation of hepatic stellate cells[J]. *FEBS Lett*, 2001, 502(1-2):4
- [4] Liu X, Hu H, Yin J Q. Therapeutic strategies against TGF-beta signaling pathway in hepatic fibrosis[J]. *Liver Int*, 2006, 26(1):8
- [5] 率红莉, 方步武, 邢伟, 等. 蒿鳖养阴软坚方对四氯化碳复合因素所致肝纤维化的预防作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013(16):197
- [6] Friedman S L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis[J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(6):1655
- [7] Anthony B, Allen J T, Li Y S, et al. Hepatic stellate cells and parasite-induced liver fibrosis[J]. *Parasit Vectors*, 2010, 3(1):60
- [8] Chen Y W, Li D G, Wu J X, et al. Tetrandrine inhibits activation of rat hepatic stellate cells stimulated by transforming growth factor-beta in vitro via up-regulation of Smad 7[J]. *J Ethnopharmacol*, 2005, 100(3):299
- [9] Oh C J, Kim J Y, Min A K, et al. Sulforaphane attenuates hepatic fibrosis via NF-E2-related factor 2-mediated inhibition of transforming growth factor-beta/Smad signaling[J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 52(3):671
- [10] Sancho-Bru P, Juez E, Moreno M, et al. Hepatocarcinoma cells stimulate the growth, migration and expression of pro-angiogenic genes in human hepatic stellate cells[J]. *Liver Int*, 2010, 30(1):31
- [11] Cheng Y, Zheng H, Wang B, et al. Sorafenib and fluvastatin synergistically alleviate hepatic fibrosis via inhibiting the TGFbeta1/Smad3 pathway[J]. *Dig Liver Dis*, 2018, 50(4):381

(2018-02-07 收稿)

(上接第 380 页)

- [9] Massey A J. Inhibition of ATR-dependent feedback activation of Chk1 sensitises cancer cells to Chk1 inhibitor monotherapy [J]. *Cancer Lett*, 2016, 383(1):41
- [10] Huttoon C J, Flatten K S, Wahner Hendrickson A E, et al. ATR inhibition broadly sensitizes ovarian cancer cells to chemotherapy Independent of BRCA status[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(12):3683
- [11] Li W, Saud S M, Young M R, et al. Cryptotanshinone, a Stat3 inhibitor, suppresses colorectal cancer proliferation and growth in vitro[J]. *Mol Cell Biochem*, 2015, 406(1/2):63
- [12] Jackson S P, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease[J]. *Nature*, 2009, 461(7267):1071
- [13] Reaper P M, Griffiths M R, Long J M, et al. Selective killing of

ATM- or p53-deficient cancer cells through inhibition of ATR[J]. *Nat Chem Biol*, 2011, 7(7):428

- [14] Massey A J. Inhibition of ATR-dependent feedback activation of Chk1 sensitises cancer cells to Chk1 inhibitor monotherapy [J]. *Cancer Lett*, 2016, 383(1):41
- [15] Shigechi T, Tomida J, Sato K, et al. ATR-ATRIP kinase complex triggers activation of the Fanconi anemia DNA repair pathway[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(5):1149
- [16] Singh T R, Ali A M, Paramasivam M, et al. ATR-dependent phosphorylation of FANCM at serine 1045 is essential for FANCM functions[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(14):4300

(2018-03-13 收稿)