

。 基础研究 。

Fas 和 DcR3 在垂体腺瘤的表达及 FasL 与 RGD-FasL 诱导的细胞凋亡机制

陈陆旭^{1,2}, 康俊龙², 刘运生¹, 侯永宏¹, 张俊卿², 田新华², 李文珠³, 庄国洪³

(1. 中南大学湘雅医院 神经外科, 湖南 长沙 410008; 2. 厦门大学附属中山医院 神经外科, 福建 厦门 361004;
3. 厦门大学抗癌研究中心, 福建 厦门 361000)

摘要: 目的 研究 RGD-FasL 诱导垂体腺瘤细胞株 GH3、MMQ、AtT20 所产生的细胞毒性效应, 并探讨其机制。方法 应用 RT-PCR 法和流式细胞仪检测肿瘤细胞上 Fas、DcR3 的表达。应用 MTT 测定法检测 FasL、RGD-FasL 对肿瘤细胞所产生的细胞毒性效应, 并经琼脂糖凝胶电泳证实是否为该配体所诱导的凋亡。通过流式细胞仪 PI 染色法评价细胞周期的变化和凋亡分析。通过 Western 蛋白印迹法检测 Caspase 8、Caspase 9、Caspase 3、Bcl-2、RANKL 和 JNK 2 的表达。结果 垂体腺瘤细胞株 GH3、MMQ、AtT20 均表达 Fas 和 DcR3。FasL 和 RGD-FasL 诱导肿瘤细胞所产生的细胞毒性效应均呈现剂量依赖关系。细胞周期分析表明 RGD-FasL 能诱导细胞周期的停滞。经 RGD-FasL 或 FasL 干预的肿瘤细胞的凋亡指数差异不明显。经 RGD-FasL 干预后, Caspase 8、Caspase 9、Caspase 3、RANKL 和 JNK 2 的表达均增加, 而 Bcl-2 的表达减少。结论 RGD-FasL 能通过 Caspase 途径诱导垂体腺瘤细胞的凋亡。RGD-FasL 的研制很可能为垂体腺瘤的生物靶向治疗提供一种新的途径。

关键词: Fas; 死亡诱骗受体 3; Fas 配体; RGD; 垂体腺瘤; 凋亡

中图分类号: R736.4

文献标识码: A

文章编号: 1007-1520(2008)02-0081-07

Expressions of Fas/ DcR3 and FasL/ RGD-FasL mediated apoptosis in pituitary adenoma cells

CHEN Lu-kui, KANG Jun-long, LIU Yun-sheng, et al.

(Department of Neurosurgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract: **Objective** To investigate the cytotoxic effects of pituitary adenoma cell lines GH3, MMQ, AtT20 induced by RGD-FasL and the underlying mechanism. **Methods** Fas and DcR3 mRNAs were detected by RT-PCR and their surface expression was measured by flow cytometry. Cytotoxicity exerted by RGD-FasL on tumor cells was measured with MTT assay and the induced apoptosis was determined by agarose gel electrophoresis. The cell cycle and apoptosis was assessed by flow cytometry with PI staining. The expressions of Caspase8, Caspase9, Caspase3, Bcl-2, RANKL and JNK2 were detected by Western Blot. **Results** GH3, MMQ and AtT20 cells expressed Fas and DcR3. The cytotoxic effects of FasL and RGD-FasL on tumor cells were dose-dependent. The cell cycle analysis indicated that RGD-FasL could induce cell cycle stagnation. In pituitary tumor cells treated with RGD-FasL, the apoptotic index was insignificantly different from that treated with FasL. The expression of Caspase8, Caspase9, Caspase3, RANKL and JNK2 increased while that of Bcl-2 decreased after treated with RGD-FasL. **Conclusion** RGD-FasL induces apoptosis of pituitary adenoma cells through Caspase activation, and may be

作者简介: 陈陆旭, 男, 副主任医师, 博士, 现在厦门大学附属中山医院神经外科。
通讯作者: 刘运生, Email: xyluys@163.com.

a novel therapeutical candidate for the treatment of pituitary adenomas.

Key words: Fas; DcR3; FasL; RGD; Pituitary adenoma; Apoptosis

垂体腺瘤的发生是由于基因突变导致的细胞转化, 以及中枢、周围及局部信号的改变诱发的细胞异常增殖^[1], 基因突变的细胞往往通过凋亡机制被清除^[2]。因此, 细胞凋亡途径的缺陷在垂体腺瘤的发生和发展中可能扮演着极其重要的角色。临床上绝大多数垂体腺瘤是良性的, 但其对周围组织(如骨、硬脑膜和海绵窦)的侵袭大大影响了肿瘤的疗效和预后^[3]。因此, 在手术和放射治疗之外, 急需从生物治疗领域探求新的有效的治疗方法。

1 材料和方法

1.1 垂体腺瘤细胞株

三种瘤细胞株 GH3、MMQ、AtT20 均购于中国医学科学院基础医学研究所细胞中心。细胞解冻后用含 15% 胎牛血清、20 mM NaHCO₃、20 mM HEPES、100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素的低糖 DMEM 培养基培养, 在 5% CO₂、37 °C、湿度 100% 的培养箱中孵育。

1.2 RGD-FasL 基因和重组质粒的构建及表达

1.2.1 RGD-FasL 基因的构建 以 F1: 5'-CAGCAGCCCTTCAATTACCC-3' 和 F18: 5'-GCTGCTCGAGCTTATATAAGC-3' 为上、下游引物, 质粒 pET-22b(+)/FasL 为模板, 常规 PCR 扩增 FasL 基因。通过重叠 PCR 将扩增所得片段与 RGD 相连, 再以 F2: 5'-TAGGATCCTCATGGGCTGCGATTGTCG-3' 和 F18 为上、下游引物常规 PCR 扩增得到 RGD-FasL 完整基因。

1.2.2 pET-22b(+)/RGD-FasL 重组质粒的构建及表达 PCR 产物及质粒分别用限制性内切酶 BamH I 和 Xho I 消化, 胶回收。用 T4 DNA 连接酶将 RGD-FasL 基因克隆至质粒 pET-22b(+), 构建重组质粒 pET-22b(+)/RGD-FasL, 转化 E. Coli Rosetta-gami。重组子提取质粒进行酶切鉴定, 阳性克隆送上海英俊生物技术有限公司

测序。挑选测序正确的重组质粒 pET-22b(+)/RGD-FasL 的 E. Coli Rosetta-gami 单菌落, 37 °C 振荡培养过夜, 按 1:100 稀释到 LB 培养液中, 37 °C 振荡培养至 A₆₀₀ 值 0.6~0.8 时, 加入终浓度为 0.7 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 7 h。目的蛋白的纯化参照 Gen Script Corporation 公司提供的 GST Resin 蛋白纯化操作手册进行。

1.3 RT-PCR 分析 Fas 和 DcR3 mRNA 的表达

依照 Superscript TM II 试剂盒 (Gibco-BRL, USA) 中的说明, 分别收集 GH3 细胞、MMQ 细胞、AtT20 细胞的匀浆液于 1.5 ml EP 管中, 8000 rpm 离心 10 min, 应用 Trizol 试剂提取 RNA, 在逆转录体系 (20 μl) 下进行逆转录。取逆转录好的 cDNA 2 μl 进行 PCR, GAPDH 作内参照。Fas 引物序列: 上游 5'-GTACCATGGCGCTGGGCATCTGG-3', 下游 5'-GCTGCTCGAGGACCAAGCTTTGG-3'; DcR3 引物序列: 上游 5'-TAGGCCATG-GATGTGGCAG-3', 下游 5'-CAAGATGCAT-GCTCCAAG-3'。

1.4 流式细胞分析 Fas 和 DcR3 蛋白的表达

所有细胞 (1 × 10⁵ /ml) 分别和兔抗人 Fas 单克隆抗体及 DcR3 单克隆抗体 (Sigma, USA) 各 100 μl/ml 在冰面上与 0.5% BSA 孵育 30 min。再用 PBS 液冲洗 3 次, 在结合 FITC 的羊抗兔 IgG 中孵育 30 min。冲洗后, 这些细胞通过 FACS (Becton Dickinson, USA) 分析。

1.5 MTT 测定法

FasL 和 RGD-FasL 对瘤细胞增殖的影响通过 MTT 测定法检测。首先, 瘤细胞 (1 × 10⁴ /ml) 分成 3 份在 96 孔的平板 (Costar, Cambridge, MA, USA) 中孵育, 每个孔中分别加入剂量为 0.2 ml 的不同浓度 (1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 μg/ml) 的 FasL 和 RGD-FasL 作用 12 h。然后将 0.02 ml 的 MTT 溶剂 (5 g/L) 加入到每个孔中孵育 4 h。离心, 移除上清液。由 MTT 中产生的结晶随即溶解在 0.15 ml 的 DMSO 中, 通过 Multiscanner

自读仪 (Dynatech MR 5000, Chantilly, VA) 在 490 nm 处测量光密度值。细胞增殖抑制率 (%) = [1 - (实验组的 OD / 对照组的 OD)] × 100 %。

1.6 DNA 片段分析

处于指数生长期的细胞 ($1 \times 10^6 / \text{ml}$) 分别经过或不经过 FasL 和 RGD-FasL ($50 \mu\text{g} / \text{mL}$) 处理 4 h。经冷 PBS 冲洗 2 次, 经离心并溶解于 20 ml 的缓冲液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 10 mM EDTA) 中。溶解物在 50°C 的振荡水槽中首先与核糖核酸酶 A ($500 \text{ mg} / \text{ml}$) 孵育 30 min, 随即与蛋白酶 K ($500 \text{ mg} / \text{ml}$) 孵育 60 min。在 50V 电压下, TBE 缓冲液 (2 mM EDTA, pH 8; 89 mM Tris-HCl 和硼酸) 中, 等量的 DNA (2~3 mg) 可通过琼脂糖凝胶电泳分析。DNA 片段图经溴乙锭染色后在紫外线灯下显影并照相。

1.7 细胞周期及凋亡分析

细胞周期分布及凋亡通过流式细胞仪碘化丙脒 (PI) DNA 染色分析。未处理的或分别经过 FasL 和 RGD-FasL ($25 \mu\text{g} / \text{ml}$, 12 h) 处理的细胞离心, 经 PBS 冲洗, 在 70% 预冷的乙醇中固定。内装细胞团试管在 4°C 下冷藏至少 24 h。随后以 1500 rpm 的转速离心 5 min, 将上清液 (内含乙醇) 去除。沉淀物再经 PBS 冲洗并由 PI 染色 ($100 \mu\text{g} / \text{ml}$ PI, $0.1 \text{ mg} / \text{ml}$ RNA 酶 A, 0.05% 麦芽凝集素 X-100), 然后在 37°C 的暗环境中孵育 40 min。加入 3 ml 的 PBS, 离心后去除上清

液。将细胞团悬浮于 500 μl 的 PI 染液中, 再将样品加入 FACS 的样品室。处于 G_1 期前、 G_1/G_0 期、S 期和 G_2/M 期的细胞所占的百分比通过 Multicycle 软件分析。

1.8 Western 蛋白印迹分析

细胞裂解物的等份试样 ($30 \mu\text{g}$ 蛋白) 经 12% 的 SDS-PAGE 分离, 在抗原封闭后的 PVDF 膜上分别加入以封闭液稀释的一抗 (兔抗大鼠 Caspase-8、Caspase-9、Caspase-3、RANKL、JNK 2 和 Bcl-2 多克隆抗体)。用含有 0.05% Tween 20 的 PBS (pH 7.6) 液冲洗 PVDF 膜, 并在室温下与 1:2000 辣根过氧化物酶二抗 (Promega, USA) 孵育 60 min。蛋白条带通过 DAB 反应显色。

1.9 统计分析

每组数据采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$)。统计分析采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 认为有统计学意义。实验组和对照组的实验均重复 3 次。

2 结果

2.1 肿瘤细胞株中 Fas 和 DcR3 的 mRNA 表达

3 种瘤细胞株中均可见 Fas mRNA 的表达。GH3 细胞和 MMQ 细胞可见 DcR3 mRNA 的表达, 但在 AtT 20 细胞中 DcR3 mRNA 的表达低 (图 1)。Fas 位于 467 bp, DcR3 位于 320 bp, GAPDH (内参) 位于 189 bp。

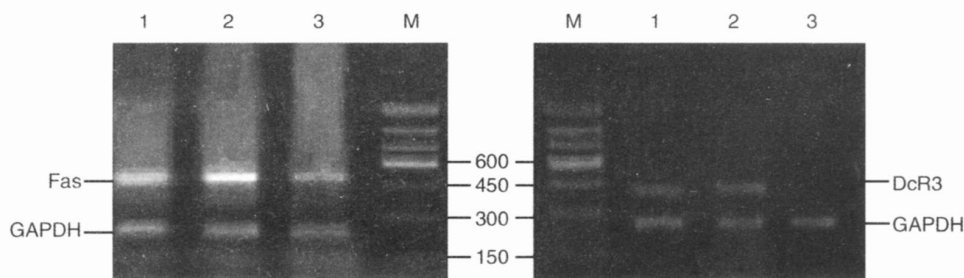


图 1 RT-PCR 法分析 Fas 和 DcR3 mRNA 的表达

条带 1: GH3 细胞; 条带 2: MMQ 细胞; 条带 3: AtT 20 细胞; 条带 M: DNA 标记。

2.2 流式细胞仪检测瘤细胞株中 Fas 和 DcR3 的表达

13.7% 的 GH3 细胞, 25.5% 的 MMQ

细胞和 22.2% 的 AtT 20 细胞表达 Fas, 而 23.9% 的 GH3 细胞, 24.1% 的 MMQ 细胞和 4.6% 的 AtT 20 细胞表达 DcR3 (图 2)。

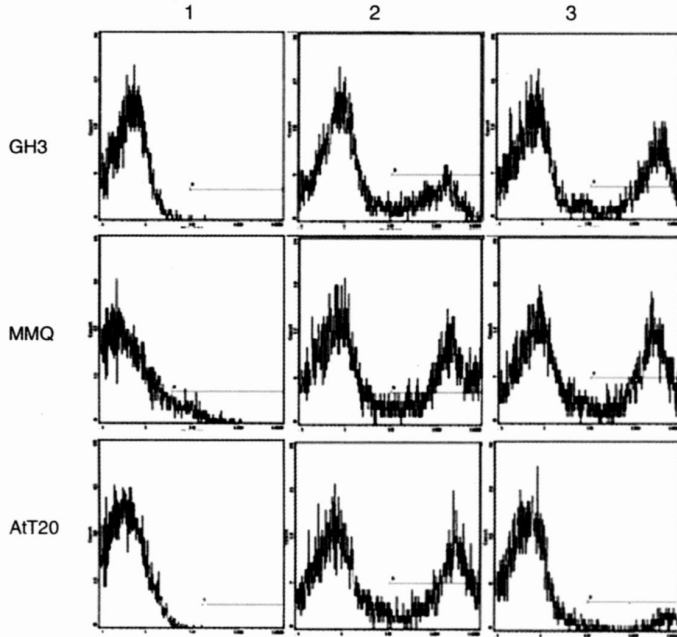


图 2 流式细胞分析 Fas 和 DcR3 蛋白在瘤细胞上的表达

1. 表示对照组; 2. 表示 Fas 在瘤细胞中的表达; 3. 表示 DcR3 在瘤细胞中的表达。

2.3 FasL 和 RGD-FasL 对瘤细胞株的细胞毒性效应

FasL 和 RGD-FasL 对 3 种瘤细胞株的细胞毒性效应均呈现剂量依赖关系。统计分析表明 GH3、MMQ 和 AtT20 细胞株对 RGD-FasL 的敏感性等同于对 FasL 的敏感性

($P > 0.05$)。抑制 GH3 细胞生长所需的 FasL 或 RGD-FasL 的浓度高于抑制 MMQ 和 AtT20 细胞生长所需的浓度。3 种细胞株受 FasL 或 RGD-FasL 抑制的 IC_{50} 值 (12 h) 分别为 $30.6, 25.9, 15.0 \mu\text{g/ml}$ 和 $31.0, 21.9, 15.6 \mu\text{g/ml}$ (图 3)。

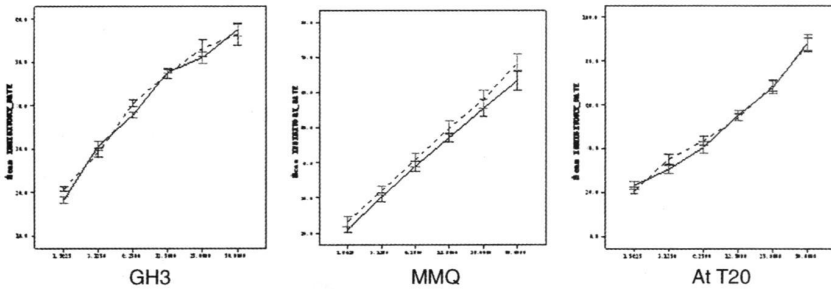


图 3 MTT 法检测 FasL 和 RGD-FasL 在瘤细胞株中的细胞毒性效应

实线示 FasL 对瘤细胞的生长抑制效应, 虚线示 RGD-FasL 对瘤细胞的生长抑制效应。

2.4 FasL 和 RGD-FasL 诱导瘤细胞的凋亡

DNA 裂解片段作为细胞凋亡性死亡的标志, 可通过琼脂糖凝胶电泳证实。与对照组相比, 瘤细胞在 FasL 和 RGD-FasL

($50 \mu\text{g/ml}$) 处理 4 h 后, DNA 裂解片段出现一个典型的梯形条带 (图 4)。

2.5 FasL 和 RGD-FasL 诱导细胞周期的变化和瘤细胞的凋亡

与对照组比较, 经 FasL 或 RGD - FasL (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 处理 12 h 后, 处于 G_0/G_1 期和 G_2/M 期的 GH3、MMQ 和 AtT20 细胞的数量分别增加和减少。分别经 RGD-FasL 和 FasL 处理过的瘤细胞的凋亡指数 (AI) 无明显差异 ($P > 0.05$)。DNA 含量分析显示, RGD-FasL (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 处理 12 h 后, GH3 细胞 G_1 期前亚二倍体 DNA (凋亡前) 的含量为 38.8%, 而 MMQ 细胞 G_1 期前亚二倍体 DNA 的含量为 55.8%, AtT20 细胞 G_1 期前亚二倍体 DNA 的含量为 49.5% (表 1 和图 5)。

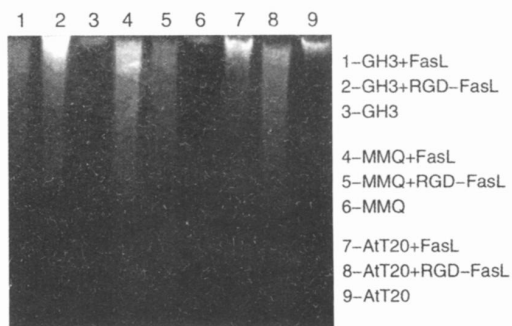


图 4 DNA 裂解片段分析

表 1 FasL 和 RGD-FasL 对细胞周期及凋亡指数的影响 ($\bar{x} \pm s$)

| | GH3 | | | MMQ | | | AtT20 | | |
|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | Control | FasL | RGD-FasL | Control | FasL | RGD-FasL | Control | FasL | RGD-FasL |
| AI(%) | 4.5 \pm 2.3 | 34.6 \pm 3.9 | 38.8 \pm 3.5 | 10.2 \pm 3.3 | 52.6 \pm 4.2 | 55.8 \pm 4.5 | 5.8 \pm 2.5 | 47.8 \pm 3.7 | 49.5 \pm 5.2 |
| G_0/G_1 (%) | 26.3 \pm 4.3 | 41.6 \pm 4.9 | 39.8 \pm 2.5 | 19.5 \pm 1.8 | 26.9 \pm 0.9 | 25.6 \pm 1.4 | 25.0 \pm 2.1 | 32.5 \pm 2.4 | 29.6 \pm 0 |
| S(%) | 9.5 \pm 4.8 | 7.6 \pm 3.6 | 7.5 \pm 2.3 | 11.5 \pm 4.0 | 11.9 \pm 3.3 | 10.0 \pm 2.6 | 9.5 \pm 5.8 | 6.5 \pm 2.3 | 7.6 \pm 3.6 |
| G_2/M (%) | 57.9 \pm 3.4 | 16.3 \pm 4.2 | 14.4 \pm 2.6 | 49.0 \pm 3.5 | 10.1 \pm 0.6 | 12.6 \pm 3.2 | 59.8 \pm 2.5 | 12.4 \pm 2.2 | 13.5 \pm 4.2 |

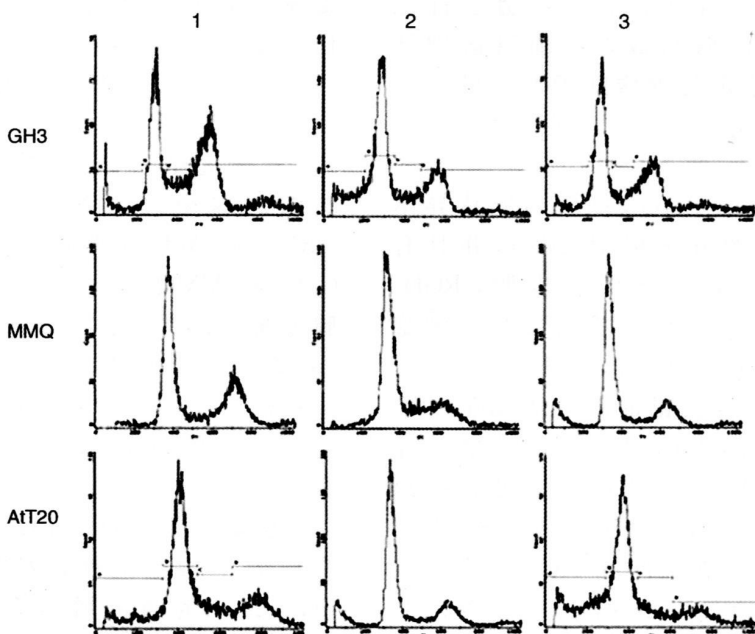


图 5 FasL 和 RGD-FasL 对细胞周期及凋亡指数 (AI) 的影响
1. 对照组; 2. FasL 处理的细胞; 3. 表示 RGD-FasL 处理的细胞

2.6 Caspase 8、Caspase 9、Caspase 3、Bcl-2、RANKL 和 JNK 2 的 Western 印迹分析
有关凋亡途径相关蛋白表达的分析显

示, FasL 或 RGD - FasL (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 处理 12 h 后, GH3、MMQ 和 AtT20 细胞中 Caspase 8、Caspase 9、Caspase 3、RANKL 和

JNK 2 的表达高于对照组。在相同的条件下给予 FasL 或 RGD-FasL, 3 种细胞中 Bcl-2 的表达明显减少。MMQ 和 AtT 20 细胞株

有明显的 RANKL 和 JNK 2 表达, 而 GH 3 细胞株中 RANKL 和 JNK 2 的表达低于前二者(图 6)。

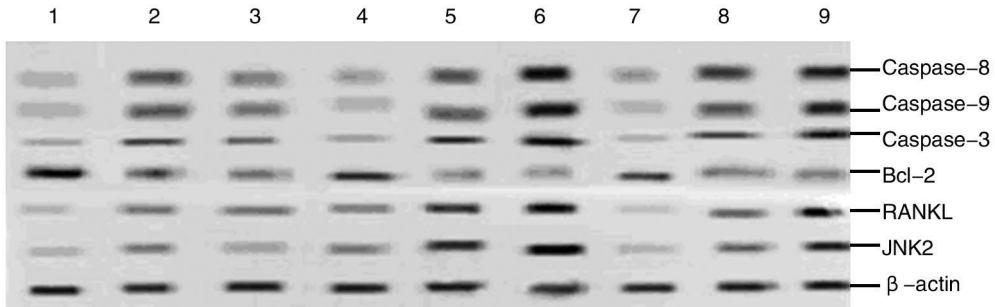


图 6 Western 印迹分析 Caspase 8、Caspase 9、Caspase 3、Bcl-2、RANKL 和 JNK 2 在瘤细胞中的表达
条带 1: GH3; 条带 2: GH3 + FasL; 条带 3: GH3 + RGD-FasL; 条带 4: MMQ; 条带 5: MMQ + FasL; 条带 6: MMQ + RGD-FasL; 条带 7: AtT 20; 条带 8: AtT 20 + FasL; 条带 9: AtT 20 + RGD-FasL。

3 讨论

生物靶向治疗在提高疗效的同时, 避免了对正常组织的毒副作用。某些分子标记可将新生的毛细血管与成熟的血管区别开来, 这些标记的鉴定为肿瘤病理血管的细胞毒性靶向治疗奠定了基础^[4]。本研究中, 新研制的 RGD-FasL 拥有一个特殊构象的 RGD 序列 (Arg-Gly-Asp), 该序列能特异结合肿瘤病理血管的分子标记 $\alpha\text{V}\beta 3$, 并具有高亲和力。前期实验结果已表明, RGD-FasL 对 U 138 和 Hela 细胞株所发挥的细胞毒效应不亚于单纯 FasL (待发表)。

Jaita 等^[5] 在雌性大鼠的腺垂体细胞中检测到 Fas 和 FasL 的表达, Fas 的活性能诱导 PRL 细胞和 ACTH 细胞的凋亡。另有报道证实, 分泌 GH 及 PRL 的肿瘤细胞株 GH 3 和分泌 ACTH 的肿瘤细胞株 AtT 20 均可检测到 Fas 的表达^[6,7]。Fas 的表达可通过凋亡途径加速肿瘤细胞的死亡, 因而认为 Fas 诱导的凋亡途径可能存在于 GH 3 和 AtT 20 细胞中。由于凋亡在调节垂体组织内环境的稳定中扮演着重要角色^[5], 如果细胞死亡和增殖的失衡有利于细胞增殖一方, 则不可避免地导致肿瘤的形成。因此, 将 Fas 和 $\alpha\text{V}\beta 3$ 作为联合靶点, 有可能诱发垂体腺瘤

的凋亡。

DcR3 是一个可溶性的分泌性蛋白。DcR3 和 Fas 竞争结合 FasL, 能抑制 FasL 诱导的凋亡, 充分表明它是 FasL 的一个诱骗受体。由于 FasL 是 NK 细胞和 CTL 细胞杀伤肿瘤细胞的重要介质, 所以某些肿瘤可能通过 DcR3 的过高表达而逃逸免疫细胞的攻击。

本研究中, Fas mRNA 在 3 种不同的腺瘤细胞株中的表达无明显差别, 而 DcR3 mRNA 在 AtT 20 细胞中的表达水平低于在 GH 3 和 MMQ 细胞中的表达, 这与流式细胞分析的结果一致。前期实验结果已证实, Fas 在人垂体腺瘤的表达高于 DcR3 的表达 (待发表)。Fas 和 DcR3 之间 mRNA 表达的差异, 可能是 FasL 诱导的选择性凋亡的原因。

本文实验检测了 RGD-FasL 对 3 种瘤细胞株的抗增殖活性, 这种抗增殖效应随着 RGD-FasL 浓度的增加而逐渐增强, 呈现剂量依赖关系。而且 3 种细胞株对 RGD-FasL 和 FasL 的敏感性无明显差别。因而认为 RGD 的空间构象并没有改变 FasL 的生物学活性, RGD-FasL 基本保持了与单纯 FasL 一致的杀伤功能。RGD 已被证实能特异地粘附于肿瘤病理血管, 抑制肿瘤组织所诱导的新生血管的发生^[8], 从而减少了全身静脉

内给药的剂量。因此, RGD-FasL 在对肿瘤进行靶向治疗的同时, 大大减少了体内的药物毒副作用, 很可能成为一种安全有效的靶向治疗药物。

通过 DNA 裂解片段^[9] 分析, 笔者证实了凋亡是 RGD-FasL 诱导的腺瘤细胞死亡的主要方式。通过流式细胞 PI 染色法, 笔者发现 RGD-FasL 能诱导细胞周期的停滞。经 RGD-FasL 或 FasL 处理过的 3 种瘤细胞株的凋亡指数 (AI) 明显增加, 而且两种药物对 AI 的影响无明显差别。

Caspase 家族成员在引发凋亡过程中扮演着极其重要的角色。活化的 Caspase 8 和作为底物的凋亡相关效应物 Caspases 及 Bcl-2 家族成员一道, 发动细胞事件的级联效应, 最终导致细胞凋亡^[10]。笔者观察到, RGD-FasL 能激活 Caspase 8、Caspase 9、Caspase 3、RANKL 和 JNK 2, 并呈剂量依赖关系。因此认为 RGD-FasL 在 3 种瘤细胞中通过激活 Caspase 途径传递凋亡信号, 增加 RANKL 和 JNK 2 的表达, 影响 DNA 造成其裂解, 导致细胞凋亡。在相同条件下给予 RGD-FasL, 3 种瘤细胞中 Bcl-2 的表达明显减少, 表明 Bcl-2 的表达在瘤细胞的抗凋亡效应中起着重要作用。可以认为, 肿瘤细胞对 RGD-FasL 的敏感性可能与其受体 Fas 和 DcR3 mRNA 的表达与 Caspase 8、Caspase 9、Caspase 3、RANKL、JNK 2 以及 Bcl-2 的释放有关。

总之, 本体外实验的结果首次证实了 RGD-FasL 对垂体腺瘤细胞的生长抑制效应等同于 FasL。RGD-FasL 的研制很可能在垂体腺瘤生物靶向治疗中发挥重要作用。

参考文献:

- [1] Asa SL, Ezzat S. The pathogenesis of pituitary tumours [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2 (11): 836-849.
- [2] Nobury CJ, Zhivotovsky B. DNA damage-induced apoptosis [J]. *Oncogene*, 2004, 23 (16): 2797-2808.
- [3] Randall RV, Laws ER Jr, Abboud CF, et al. Transsphenoidal microsurgical treatment of prolactin-producing pituitary adenomas. Results in 100 patients [J]. *Mayo Clin Proc*, 1983, 58 (2): 108-121.
- [4] Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model [J]. *Science*, 1998, 279 (5349): 377-380.
- [5] Jaita G, Candolfi M, Zaldivar V, et al. Estrogens up-regulate the Fas/ FasL apoptotic pathway in lactotropes [J]. *Endocrinology*, 2005, 146 (11): 4737-4744.
- [6] Kobayashi H, Fukata J, Murakami N, et al. Tumor necrosis factor receptors in the pituitary cells [J]. *Brain Res*, 1997, 758 (1-2): 45-50.
- [7] Huang P, Tofighi R, Engard M, et al. Cell death induced by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (2, 3, 7, 8-TCDD) in AtT-20 pituitary cells [J]. *Toxicology*, 2005, 207 (3): 391-399.
- [8] Lu X, Lu D, Scully MF, et al. Integrins in drug targeting- RGD templates in toxins [J]. *Curr Pharm Des*, 2006, 12 (22): 2749-2769.
- [9] Lawen A. Apoptosis - an introduction [J]. *Bioessays*, 2003, 25 (9): 888-896.
- [10] Kang TB, Ben-Moshe T, Varfolomeev EE, et al. Caspase-8 serves both apoptotic and nonapoptotic roles [J]. *J Immunol*, 2004, 173 (5): 2976-2984.

(修回日期: 2008-03-20)