

单宁酸联合顺铂增强肝癌 HepG2 细胞 IRE1-XBP1 通路的激活水平

耿娜娜^{1,2}, 吴明松^{1,2,3}, 郑翔³, 杨蕾³, 王宏阳³, 李学英^{3*}

¹遵义医学院口腔学院; ²遵义医学院医学与生物学研究中心贵州省普通高等学校口腔疾病研究特色重点实验室;

³遵义医学院医学遗传学教研室, 遵义 563000

摘要: 本文主要研究单宁酸(TA)联合顺铂(CDDP)对肝癌 HepG2 细胞内质网应激 IRE1-XBP1 通路的影响。用 180 μ M 单宁酸、0.9 μ g/mL 顺铂单独用药或者联合用药处理肝癌 HepG2 细胞 24 h 或 48 h 后,应用流式细胞术测定 HepG2 细胞的凋亡率,实时荧光定量 PCR 技术(q-RT-PCR)、蛋白免疫印迹(western blot)技术检测 IRE1 α 和 XBP-1 分子的表达水平。MTT 结果显示,单宁酸和顺铂均能显著抑制 HepG2 细胞的生长,且均呈剂量性依赖;二者联合用药能够显著增加 HepG2 细胞的生长抑制率;流式细胞术结果显示,单宁酸与顺铂联合用药能够显著抑制 HepG2 细胞的增殖,并诱导细胞凋亡的发生;q-RT-PCR 及 Western blot 结果显示,单宁酸与顺铂联合用药能显著上调细胞 IRE1 α 和 XBP-1 的表达水平。结果表明单宁酸能够联合顺铂增强肝癌 HepG2 细胞内质网应激 IRE1-XBP1 通路的激活水平,提示 IRE1-XBP1 通路可能是单宁酸和顺铂协同抗肝癌 HepG2 细胞的分子机制之一。

关键词: 单宁酸;顺铂;肝癌;内质网应激;肌醇激酶 1;X-盒结合蛋白 1

中图分类号: R979.1 + 9

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.11.020

Enhanced Activation of IRE1-XBP1 Pathway by Tannic Acid and Cis-dichlorodiamine Platinum in Human Hepatocellular Carcinoma HepG2 cells

GENG Na-na^{1,2}, WU Ming-song^{1,2,3}, ZHENG Xiang³, YANG Lei³, WANG Hong-yang³, LI Xue-ying^{3*}

¹School of Stomatology, Zunyi Medical University; ²Special Key Laboratory of Oral Diseases Research, Higher Education institutions of Guizhou province; Research Center of Medicine and Biology of Zunyi Medical University;

³Medical Genetics Department of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China

Abstract: This study investigated the effect of tannic acid and cisplatin on IRE1-XBP1 pathway of endoplasmic reticulum stress in hepatocellular carcinoma HepG2 cells. HepG2 cells were cultured with 180 μ M TA and/or 0.9 μ g/mL CDDP for 24 h or 48 h. Then apoptosis rate was detected by flow cytometry and levels of IRE1 α and XBP1 were analyzed by real-time fluorescence quantitative technology (q-RT-PCR) or western blot. MTT assay showed that TA or CDDP can inhibit HepG2 cells growth with dose dependence manner and TA combined with CDDP can significantly increase the growth inhibition rate of HepG2 cells. Flow cytometry results showed that tannic acid and cisplatin can significantly inhibit the proliferation of HepG2 cells and induce cell apoptosis. Q-RT-PCR and western blot results showed that tannic acid and cisplatin can significantly increase expression level of IRE1 α and XBP-1. The results indicated that tannic acid can combine with cisplatin to increase the levels of IRE1-XBP1 pathway of endoplasmic reticulum stress in hepatocellular HepG2 cells, suggesting that the IRE1-XBP1 pathway may be one of the molecular mechanisms of synergistic anti-hepatocellular carcinoma effect of tannic acid and cisplatin on HepG2 cells.

Key words: tannic acid; cis-dichlorodiamine platinum; hepatocellular carcinoma; endoplasmic reticulum stress; inositol requiring enzymel 1; X box binding protein-1

收稿日期: 2017-07-03

接受日期: 2017-08-02

基金项目: 贵州省教育厅特色药用资源研发创新团队(2013-15); 贵州省科技厅资助(2014-7548); 遵义医学院硕士启动基金(F-841); 遵义医学院硕士启动基金(F-827)

* 通信作者 Tel: 86-851-28609692; E-mail: leexueying4722@163.com

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC), 是世界男性中第五大常见疾病, 女性中第七大常见疾病^[1]。据统计结果显示, 每年全世界新发生的肝癌病例约为 26 万, 超过 80% 的肝癌患者发生在亚洲,

而我国约占 55%,同时肝癌的死亡比例约为 20.4/10 万^[2,3]。较发达国家而言,HCC 的发病率和死亡率在发展中地区更高^[4]。早期诊断困难和药物治疗的低效性使 HCC 成为癌症死亡的第三大原因^[1]。顺铂(cis-dichlorodiamine platinum,CDDP)是治疗肝癌常用的化疗药物之一,但是其毒副作用也较大。此外,HCC 对化疗药物的耐药性,使得 HCC 的治疗方案更加复杂化^[1]。因此,找到一种既能够促进肝癌细胞凋亡,又能够降低 CDDP 使用剂量的低毒性辅助性药物,具有重要的研究意义。单宁酸(tannic acid,TA),是植物界中广泛分布的一种重要的多酚类天然活性产物,它能够抑制乳腺癌^[5]、胆管癌^[6]等癌细胞的生长增殖,与 CDDP 联合能够促进卵巢癌细胞凋亡^[7]等。此外,TA 本身毒性很低,有研究表明 TA 口服是比较安全的^[7],可作为一种食品添加剂广泛应用于食品加工工业。

我们前期的研究结果表明,TA 可通过内质网应激(endoplasmic reticulum stress,ERS)通路增强 CDDP 对肝癌 HepG2 细胞的促凋亡作用,但二者协同的具体分子机制尚未完全清楚。持续的 ERS 能够导致癌细胞的死亡^[8]。研究表明,ERS 参与了肝癌细胞的促凋亡过程^[9]。其中,IRE1-XBP1 通路是 ERS 的主要通路之一。肌醇激酶 1(inositol requiring enzyme 1,IRE1)是内质网膜上的一种跨膜蛋白,具有核糖核酸内切酶活性,参与了 X-盒结合蛋白(X box binding protein-1,XBP1) mRNA 的剪切加工过程,诱导其形成剪切型的 XBP1^[10,11]。XBP1 为碱性亮氨酸拉链(basic leucine zipper,bZIP)的一种结构

蛋白,是环腺苷酸应答元件连接蛋白/激活因子(cyclic AMP response element binding protein/activating factor,CREB/ATF)家族中的转录因子^[12]。XBP-1 的剪切活化形式可诱导一些 ERS 相关基因的表达^[13,14]。本研究探讨了内质网应激 IRE1-XBP1 通路在 TA 与 CDDP 协同抗肝癌中的作用,为肝癌的临床治疗方案提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌细胞系 HepG2,由中国科学院细胞库提供。单宁酸(C₇₆H₅₂O₄₆)由 Sigma 公司生产,顺铂注射液[Cl₂(NH₃)₂Pt]由山东齐鲁制药公司生产,RP-MI-1640 培养基来源于 Gibco 公司,胎牛血清购自浙江天杭生物科技有限公司,噻唑蓝(MTT)购自 BBI 公司,Annexin V-FITC/PI 双染凋亡试剂盒购自 BBI 公司,RNAiso TM Plus 购自 TaKaRa Biotechnology 公司,dNTP Mix(10 mM)购自上海生工生物公司,M-MLV 逆转录酶购自 Promega 公司,实时荧光定量 PCR 试剂盒购自 Bio-Rad 公司,PCR 引物由上海生工生物公司合成,兔抗人多抗 IRE1 和 XBP-1、兔抗人 β-actin 单抗和抗兔的二抗均购自 Protein-Tech Group 公司。

微量分光光度计(Nanodrop 2000)购自 Thermo Scientific 公司,PCR 仪(CFX Connect TM Optics Module)购自 Bio-Rad 公司,倒置荧光显微镜(IX73)购自 Olympus 公司,二氧化碳培养箱(GOLD-SIM)购自西盟国际公司,Gallios 流式细胞仪购自 Beckman Coulter 公司。

表 1 PCR 引物序列及扩增片段长度

Table 1 Primer sequences and amplified fragment lengths

基因 Gene	引物序列 Primer sequence (5'-3')	产物长度 Length (bp)
<i>β-actin</i>	F:CGGGAATCGTGCCTGAC R:CAGGAAGGAAGCTGGAAG	186
<i>IRE1α</i>	F:CACAGTGACGCTTCCTGAAAC R:GCCATCATTAGGATCTGGGAGA	169

F:forward primer;R:reverse primer

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

人肝癌细胞系 HepG2 培养于 1640 培养基,内含 10% 胎牛血清、2.0 g/L NaHCO₃、100 μg/mL 链霉素、100 U/mL 青霉素,于 37 °C、95% 空气、5% CO₂ 的二氧化碳培养箱中培养。每 2~3 d 传代一次。

1.2.2 MTT 法检测细胞生长的变化

取对数期 HepG2 细胞接种于 96 孔培养板,每孔 1 × 10⁴ 个。经 24 h 静置培养后,分别加 TA 0、90、180、270、360、450、540 μM 和 CDDP 0、0.6、1.2、1.8、2.4、3.0、3.6 μg/mL,每组设置 5 个复孔。继续培养 24 h 后,每孔加入 10 μL MTT 溶液(5 mg/mL);再培养 4 h,去除上清,每孔加入 100 μL

DMSO,轻轻振荡 10 min。采用酶标仪测定 570 nm 波长下各样品的吸光值(A),各复孔的吸光值取平均值,按公式:细胞抑制率(%) = 1-细胞存活率(%) = 1-(实验组 A 值-阴性对照组 A 值)/(空白对照组 A 值-阴性对照组 A 值),计算细胞的抑制率,其中对照组细胞生长存活率记为 100%,生长抑制率记为 0%。

1.2.3 Annexin V/PI 流式细胞术测定细胞凋亡率

将 HepG2 细胞接种于 6 孔培养板中,每孔 3×10^5 个细胞,经 24 h 静置培养后,分别设置 180 μM TA 组、0.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CDDP 组和 180 μM TA + 0.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CDDP 组为实验组,空白对照组中加入等体积的培养基。培养 24 h 后收集细胞,用 PBS 漂洗 2 次,离心,用 Annexin V/PI 进行染色,具体步骤详见说明书(BBI,BS7127),室温下避光反应 15 min 后,再用适量缓冲液重悬细胞,用流式细胞仪检测活细胞百分率、早期凋亡细胞百分率、晚期凋亡细胞百分率和坏死细胞百分率。其中,细胞的总凋亡率 = 早期凋亡细胞百分率 + 晚期凋亡细胞百分率 + 坏死细胞百分率。

1.2.4 实时荧光定量 PCR

药物处理 24 h 和 48 h 后,分别裂解并收集细胞,提取细胞总 RNA,根据试剂盒方法,逆转录合成 cDNA。实时荧光定量 PCR 反应体系体积为 10 μL ,包括 cDNA 1 μL ,Sso Fast-Eva Green supermix 5 μL ,3'引物 0.5 μL ,5'引物 0.5 μL ,无菌水 3 μL 。PCR 反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,再 95 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,56 $^{\circ}\text{C}$ (和 β -actin)或 56.7 $^{\circ}\text{C}$ (IRE1 α)30 s,40 个循环周期。每个样品设置 3 管重复。以 β -actin 作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 的方法,用三次重复的平均值计算基因相对表达量。

1.2.5 蛋白免疫印迹

药物处理 24 h 和 48 h 后,裂解细胞,提取细胞总蛋白质,以 BCA 法测定蛋白质的浓度,取一定体积量蛋白质样品,进行变性、SDS-PAGE 电泳、将蛋白质转至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶封闭 2 h、孵育一抗 (IRE1 α 1:200;XBP-1 1:100; β -actin 1:10000)、洗涤后加二抗 (1:2000)、加 ECL 发光试剂曝光与显影。

1.2.6 统计学方法

实验数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用

SPSS 22.0 统计软件进行分析,用 IPP 软件分析蛋白免疫印迹条带灰度值,两组间比较采用独立样本 t 检验进行分析,多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA),以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 TA 与 CDDP 联合抑制 HepG2 细胞的生长增殖

本研究通过 MTT 法测定不同药物处理对 HepG2 细胞的抑制率,结果表明 TA 和 CDDP 均能显著抑制 HepG2 细胞的生长,且均呈剂量性依赖 ($P < 0.01$),其半数抑制率 (IC_{50}) 浓度分别约为 360 μM 和 1.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。为了评价 TA 与 CDDP 的协同效应,本实验采用两种药物 IC_{50} 一半浓度 (即 180 μM TA 和 0.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CDDP) 进行联合用药处理细胞^[15]。单独使用 TA 和 CDDP 对 HepG2 的抑制率分别为 (19.1 \pm 6.0)% 和 (17.5 \pm 4.0)%,而联合用药后抑制率为 (60.3 \pm 2.0)%,均显著高于 180 μM TA 单药组和 0.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CDDP 单药组 ($P < 0.01$ 、 $P < 0.01$) (表 2),表明 TA 与 CDDP 能够联合抑制 HepG2 细胞的生长增殖。

表 2 MTT 法检测 TA 与 CDDP 对 HepG2 细胞的抑制率
Table 2 The inhibitory rates of TA and CDDP on HepG2 cells detected by MTT

组别 Group	生长抑制率 Growth inhibitory rate (%)
对照组 Control	0.0 \pm 0.0
TA 组 TA group	19.1 \pm 6.0 * * * #
CDDP 组 CDDP group	17.5 \pm 4.0 * * * #
TA + CDDP 组 TA + CDDP group	60.3 \pm 2.2 * *

注:与对照组相比,* * $P < 0.01$;与 TA + CDDP 组相比,## $P < 0.01$ 。
Note:compared with control group,* * $P < 0.01$;compared with TA + CDDP group,## $P < 0.01$.

2.2 TA 与 CDDP 联合促进 HepG2 细胞的凋亡

本研究采用 Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒,用于检测早期凋亡细胞、晚期凋亡细胞及坏死细胞。结果显示,药物作用于细胞 24 h 后,与对照组相比,TA 组、CDDP 组和 TA + CDDP 组细胞的总凋亡率分别为 (4.8 \pm 0.5)%、(4.6 \pm 0.8)%、(20.9 \pm 2.0)%,均显著高于对照组 (2.6 \pm 0.2)% ($P < 0.01$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.01$);此外,TA + CDDP 组细胞的总凋亡率亦显著高于 TA 组和 CDDP 组 ($P < 0.01$ 、 $P < 0.01$) (图 1,表 3)。

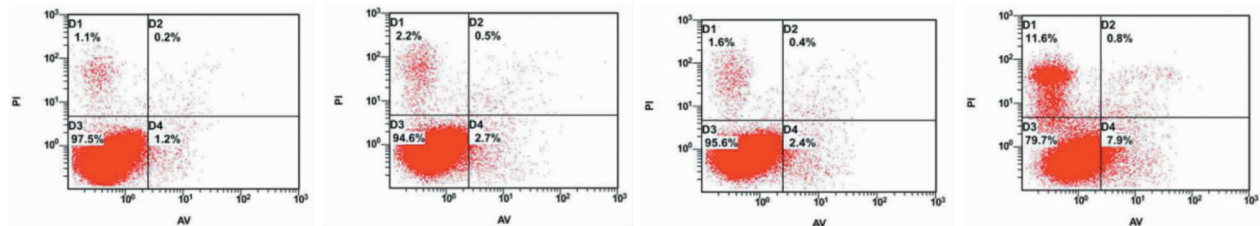


图1 细胞流式技术检测 TA 与 CDDP 对 HepG2 细胞凋亡的影响

Fig.1 Effects of TA and CDDP on apoptosis of HepG2 cells by cell flow cytometry

注: D1 象限表示坏死细胞百分率; D2 象限表示晚期凋亡细胞百分率; D3 象限表示活细胞百分率; D4 象限表示早期凋亡细胞百分率

Note: D1 indicated percentage of dead cells; D2 indicated percentage of non-viable apoptotic cell; D3 indicated percentage of living cells; D4 indicated percentage of viable apoptotic cell

表3 细胞流式技术检测 HepG2 细胞的总凋亡率

Table 3 The total apoptotic rate of HepG2 cells detected by flow cytometry

组别 Group	总凋亡率 Total apoptosis rate (%)
对照组 Control	2.6 ± 0.2
TA 组 TA group	4.8 ± 0.5 * * * #
CDDP 组 CDDP group	4.6 ± 0.8 * * * #
TA + CDDP 组 TA + CDDP group	20.9 ± 2.0 * *

注: 与对照组相比, * * P < 0.01; 与 TA + CDDP 组相比, # # P < 0.01。
Note: compared with control group, * * P < 0.01; compared with TA + CDDP group, # # P < 0.01.

2.3 TA 与 CDDP 联合促进 HepG2 细胞 IRE1α 的表达

q-RT-PCR 及 western blot 结果显示, 各组药物分别处理细胞 24 h 和 48 h 后, 与对照组相比, TA 组、CDDP 组和 TA + CDDP 组细胞 IRE1α mRNA 表达水平(图 3A)和蛋白表达水平(图 2, 图 3B)均显著升高(P < 0.01 或 P < 0.05)。总体上, 与 24 h 组相比, 药物处理 48 h 后, TA 组细胞中 IRE1α mRNA 和蛋白表达水平均呈升高趋势, 而 CDDP 组和 TA + CDDP 组 IRE1α mRNA 和蛋白表达水平均呈降低趋势。

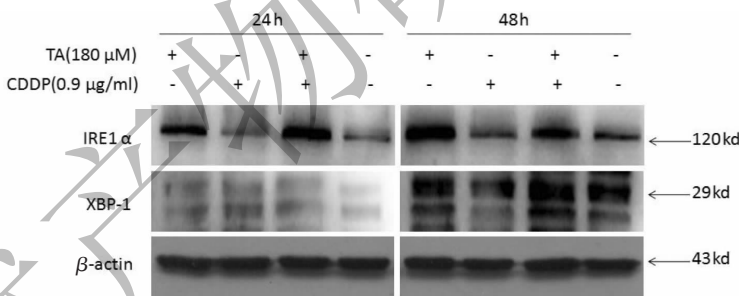


图2 Western Blot 检测 IRE1α 和 XBP-1 蛋白的表达

Fig.2 Detection of IRE1 and XBP-1 levels by western blot

2.4 TA 与 CDDP 联合促进 HepG2 细胞 XBP-1 的表达

Western blot 结果显示, 各组药物分别处理细胞 24 h 后, 与对照组相比, TA 组、CDDP 组和 TA + CDDP 组细胞 XBP-1 蛋白表达水平均显著升高(P < 0.01 或 P < 0.05); 药物处理 48 h 后, 与对照组相比, TA 组和 TA + CDDP 组细胞 XBP-1 蛋白表达水平均显著升高(P < 0.01 或 P < 0.05), 而 CDDP 组蛋白水平变化不显著。总体上, 与 24 h 组相比, 药物处理 48 h 后, TA 组、CDDP 组和 TA + CDDP 组细

胞中 XBP-1 蛋白表达水平均呈升高趋势(图 2, 图 4)。

3 讨论与结论

内质网应激(ERS)是由一系列病理或生理因素(如氧化应激、未折叠或错误折叠蛋白质、突变或毒性物质等)导致内质网稳态失衡所发生的一种应激反应。ERS 发生时, 细胞内发生未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR), 促使未折叠或错误折叠蛋白进行正确折叠, 使内质网维持稳态以保

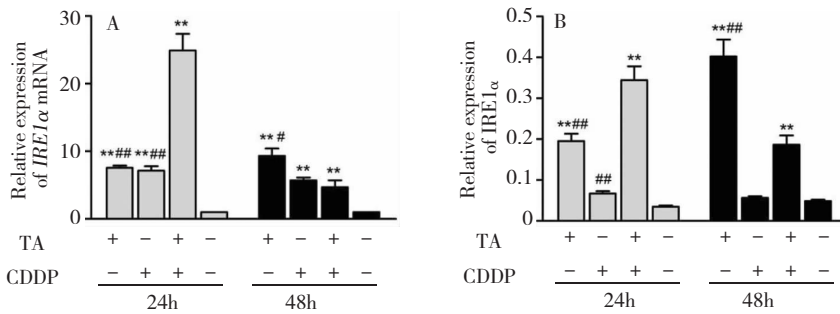
图3 TA与CDDP对IRE1 α 表达的影响

Fig. 3 Effects of TA and CDDP on IRE1 expression level

注:(A):IRE1 α mRNA水平的相对定量;(B):IRE1 α 蛋白水平的相对定量。与对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与联合用药组相比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$

Note:(A):Relative quantification of IRE1 α mRNA level;(B):Relative quantification of IRE1 α protein level;compared with control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;compared with TA + CDDP group,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$

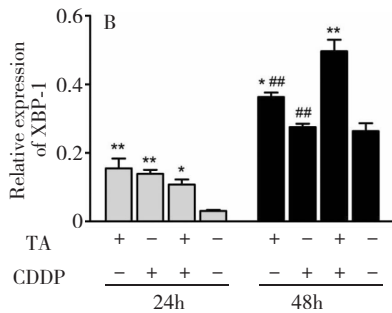


图4 TA与CDDP对XBP-1蛋白表达的影响

Fig. 4 Effects of TA and CDDP on XBP-1 expression level

注:与对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与联合用药组相比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$

Note:compared with control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;compared with TA + CDDP group,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$

证细胞正常的生理功能;但是当ERS持续发生时,并且通过UPR无法得到缓解时,细胞的正常生理功能被破坏,细胞将发生凋亡^[16]。ERS参与了多种疾病的发生发展,近年来被认为是癌症治疗的一个重要靶点,IRE1-XBP1通路是其三大通路之一^[17]。IRE1主要包括IRE1 α 和IRE1 β 两种亚型,其中IRE1 α 最为常见,且在ERS中发挥着重要作用。IRE1 α 的一个重要靶点是mRNA编码的XBP1。未折叠蛋白在内质网腔积累会刺激IRE1 α 发生二聚化和自身磷酸化,从而激活其对XBP1前体mRNA的核酸内切酶剪切活性,活化后的XBP1 mRNA能够编码形成XBP1蛋白^[18,19]。IRE1一方面参与了肿瘤坏死相关因子2/凋亡信号调节激酶1(TNF receptor-associated factor 2, TRAF2/Apoptosis signal-

regulating kinase 1,ASK1)介导的募集,促使其形成多聚体,激活p38 MAPK使其磷酸化,从而促进C/EBP同源蛋白(C/EBP-homologous protein,CHOP)的表达^[20,21];另一方面,IRE1也可通过募集TRAF2和ASK1激活氨基末端激酶(Jun N-terminal kinase, JNK),而激活JNK促凋亡途径^[22-24]。研究表明,抑制IRE1 α 或XBP1的活性,能够抑制多发性骨髓瘤细胞的生长增殖,增强其ERS的水平和促凋亡作用^[25,26]。

本研究结果显示,用药24 h时,在无ERS的对照组细胞中IRE1 α 的表达水平较低,与对照组相比,TA组、CDDP组和联合用药组细胞中IRE1 α 表达水平均显著上调;用药48 h时,CDDP组和联合用药组IRE1 α 水平呈现一定的下降趋势,而TA组呈现上升趋势,但与对照组相比,各组水平基本是显著上调的,可能HepG2细胞中IRE1 α 的激活主要与TA密切相关。此外,用药48 h时,IRE1 α mRNA和蛋白质的表达水平并不完全一致,一方面可能是由于真核基因表达的转录和翻译发生的时间和位点存在一定的时空间隔;另一方面可能与基因转录后的调节有关,从mRNA翻译为蛋白质的过程受到多种因素的调节,转录后加工、转录产物的降解、翻译、翻译后加工及修饰等过程可能导致了转录和翻译水平并不完全一致,还需进一步研究其具体机制。用药24 h时,TA组、CDDP组和联合用药组细胞中XBP1蛋白水平均显著高于对照组,但联合用药组水平略低于各单药组;用药48 h时,各组XBP1水平继续上调,但此时联合用药组XBP-1水平显著高于各单药组,可能是由于随着用药时间的增加,TA与CDDP

联合用药促进了 XBP1 的表达进一步大大增强。总体上,TA 与 CDDP 联合用药增强了 HepG2 细胞中 IRE1 α 和 XBP-1 的表达,诱导了细胞凋亡的发生,其主要机制可能是 HepG2 细胞接受 ERS 后,其 IRE1-XBP1 信号通路被激活,IRE1 表达增加,一方面 IRE1 可能与 TRAF2、ASK1 形成多聚体,促进 CHOP 的表达,高表达的 CHOP 能促进 Bax(促凋亡蛋白)的表达并抑制 Bcl-2(抑凋亡蛋白)的表达,激活 Caspase 家族级联反应,诱导细胞凋亡发生^[27];另一方面,IRE1 的高表达可能激活了 HepG2 细胞的 JNK 促凋亡途径,其具体的分子机制还有待进一步深入研究。

综上所述,TA 与 CDDP 具有协同抗肝癌 HepG2 细胞的作用,并且二者的协同作用与细胞内质网应激 IRE1-XBP1 通路的激活密切相关,为肝癌的化疗方案提供了新的探索。

参考文献

- Ferrin G, Aguilar-Melero P, Rodriguez-Peralvarez M, *et al.* Biomarkers for hepatocellular carcinoma: diagnostic and therapeutic utility. *Hepat Med*, 2015, 7: 1-10.
- Moraes T, Massignan B, Figueiredo AE, *et al.* Systemic lupus erythematosus and clinical outcomes in peritoneal dialysis. *Lupus*, 2015, 24: 290-298.
- Gao S(高姗), Yang WS(杨万水), Gao J(高静), *et al.* Advances in molecular epidemiology of primary liver cancer. *China Cancer(中国肿瘤)*, 2012, 21: 136-144.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, *et al.* Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: Globocan 2008. *Int J Cancer*, 2010, 127: 2893-2917.
- Tikoo K, Sané MS, Gupta C. Tannic acid ameliorates doxorubicin induced cardiotoxicity and potentiates its anti-cancer activity: Potential role of tannins in cancer chemotherapy. *Toxicol Pharmacol Appl*, 2011, 251: 191-200.
- Peter J. Naus. Tannic acid synergizes the cytotoxicity of chemotherapeutic drugs in human cholangio carcinoma by modulating drug efflux pathways. *J Hepatol*, 2007, 46: 222-229.
- Sun YY, Zhang TH, Wang BD, *et al.* Tannic acid, an inhibitor of poly(ADP-ribose) glycohydrolase, sensitizes ovarian carcinoma cells to cisplatin. *Anti-Cancer Drugs*, 2012, 23: 979-990.
- Muchowicz A, Firczuk M, Wachowska M, *et al.* SK053 triggers tumor cells apoptosis by oxidative stress-mediated endoplasmic reticulum stress. *Biochem Pharmacol*, 2015, 93: 418-427.
- Wang Z, Jiang C, Chen W, *et al.* Baicalein induces apoptosis

and autophagy via endoplasmic reticulum stress in hepatocellular carcinoma cells. *Biomed Res Int*, 2014, 2014 (7): 732516.

- Korennykh AV, Korostelev AA, Egea PF, *et al.* Structural and functional basis for RNA cleavage by Ire1. *BMC Biol*, 2011, 9(1): 1-15.
- Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(2): 89-102.
- Glimcher L H. XBP1: the last two decades. *Annals Rheumatic Diseases*, 2010, 69(1): 67-71.
- Montalbano R, Waldegger P, Quint K, *et al.* Endoplasmic reticulum stress plays a pivotal role in cell death mediated by the pan-deacetylase inhibitor panobinostat in human hepatocellular cancer cells. *Transl Oncol*, 2013, 6: 143-157.
- Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol*, 2011, 13: 184-190.
- Li CJ, Chu CY, Huang LH, *et al.* Synergistic anticancer activity of triptolide combined with cisplatin enhances apoptosis in gastric cancer *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Lett*, 2012, 319(2): 203-213.
- Jiu D, Zhang M, Yin H. Signaling pathways involved in endoplasmic reticulum stress-induced Neuronal apoptosis. *Int J Neurosci*, 2013, 123(3): 155-162.
- Kennedy D, Samali A, Jöger R. Methods for studying ER stress and UPR markers in human cells. *Methods Mol Biol*, 2015, 1292: 3-18.
- Lin JW(林建炜), Liu P(刘平), Xiang YX(向延秀), *et al.* Effect of transcription factor XBP1 on proliferation and apoptosis of human hepatocellular carcinoma HepG2 cell. *Tumor(肿瘤)*, 2011, 3(1): 11-16.
- Gupta S, Deepti A, Deegan S. HSP72 protects cells from ER stress-induced apoptosis via enhancement of IRE1 α -XBP1 signaling through a physical interaction. *PLoS Biol*, 2010, 8(7): e1000410.
- He K, Zheng X, Li M, *et al.* mTOR inhibitors induce apoptosis in colon cancer cells via CHOP-dependent DR5 induction on 4EBP1 dephosphorylation. *Oncogene*, 2016, 35: 148-157.
- Joo JH, Ueda E, Bortner CD, *et al.* Farnesol activates the intrinsic pathway of apoptosis and the ATF4-ATF3-CHOP cascade of ER stress in human T lymphoblastic leukemia Molt4 cells. *Biochem Pharmacol*, 2015, 97: 256-268.
- Urano F, Wang X, Bertolotti A, *et al.* Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science*, 2000, 287: 664-666.