

11-脱氧轮枝菌素 A 引起前列腺癌 PC3M 细胞 Caspase 依赖的凋亡

时迎娣^{1,2}, 张迎秋³, 倪扬笑^{1,2}, 史国利^{1,2}, 杨怀义¹

1 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

2 中国科学院研究生院, 北京 100049

3 辽宁师范大学, 辽宁 大连 116029

时迎娣, 张迎秋, 倪扬笑, 等. 11-脱氧轮枝菌素 A 引起前列腺癌 PC3M 细胞 Caspase 依赖的凋亡. 生物工程学报, 2012, 28(1): 96-103.

Shi YD, Zhang YQ, Ni YX, et al. 11'-Deoxyverticillin A induces caspase-dependent cell apoptosis in PC3M cells. Chin J Biotech, 2012, 28(1): 96-103.

摘要: 近几年, 我国前列腺癌的发病率和致死率均明显升高。虽然早期肿瘤对去雄激素疗法敏感, 但最终几乎所有病人均可转变为雄激素非依赖型。目前, 对于此类病人还没有好的治疗手段和药物。11-脱氧轮枝菌素 A (11'-deoxyverticillin A, C42) 是一种从冬虫夏草共生菌中分离得到的多硫代二氧基哌嗪 (Epipolythiodioxopiperazines, ETPs) 族结构化合物, 通过利用研究前列腺癌雄激素非依赖性癌细胞生长的常用细胞系 PC3M 细胞, 就其对雄激素非依赖性前列腺癌细胞的凋亡及凋亡机制进行了研究。结果发现, C42 能够显著抑制细胞生长, 并增加 caspase-3/7 的活性及 PARP 的剪切。C42 引起的这种 caspase 依赖的细胞凋亡与处理时间和该化合物的浓度相关。上述结果表明, C42 能够诱导 caspase 依赖的细胞凋亡。进一步深入研究此类化合物将有助于理解其诱导程序性细胞死亡的机理, 为开发此类化合物进行可能的临床治疗雄激素非依赖性前列腺癌打下了一定的理论基础。

关键词: 11-脱氧轮枝菌素 A, 前列腺癌, 细胞凋亡, 多硫代二氧基哌嗪族

Received: August 29, 2011; **Accepted:** November 21, 2011

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 30770086, 31070149), Mega Project of Research on the Prevention and Control of HIV/AIDS, Viral Hepatitis Infectious Diseases (No. 2009ZX10004-101).

Corresponding author: Huaiyi Yang. Tel: +86-10-64807372; Fax: +86-10-64807381; E-mail: yanghy@sun.im.ac.cn

国家自然科学基金 (Nos. 30770086, 31070149), “艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”科技重大专项 (No. 2009ZX10004-101) 资助。

11'-Deoxyverticillin A induces caspase-dependent cell apoptosis in PC3M cells

Yingdi Shi^{1,2}, Yingqiu Zhang³, Yangxiao Ni^{1,2}, Guoli Shi^{1,2}, and Huaiyi Yang¹

1 Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3 Liaoning Normal University, Dalian 116029, Liaoning, China

Abstract: Recent years, the incidence and mortality of prostate cancer have increased dramatically in China. At earlier stages, most diagnosed prostate cancers are responsive to androgen depletion treatment, yet, nearly all patients will eventually progress to metastatic androgen-independent prostate cancer (AIPC), which still has no effective therapeutic method or drug to deal with. 11'-Deoxyverticillin A (C42) belongs to the family of epipolythiodioxopiperazines (ETPs), an interesting class of fungal toxins that inhibit farnesyl transferase. Compounds holding such a property have been explored as putative anticancer agents. In this study, using PC3M cells, an AIPC cell line, we investigated the effect of the compound on apoptosis and explored the underlying mechanism. It revealed that C42 markedly enhanced the activity of caspase-3/7 and increased the accumulation of the cleaved PARP, all of which are the markers of apoptosis. It also revealed that C42 either decreased cell viability or inhibited the growth of PC3M cells. Moreover, we observed that the loss of cell viability and cell growth inhibition induced by C42 were both time- and dosage dependent. Taken together, we indicated that C42 can induce caspase-dependent apoptosis in AIPC cells, and the results presented here will broaden our knowledge about the molecular mechanisms by which C42 exerts its anticancer activity, and future work in this direction may provide valuable information in the development of these compounds into effective cancer therapeutic strategies against androgen-independent prostate cancer.

Keywords: 11'-deoxyverticillin A, prostate cancer, apoptosis, epipolythiodioxopiperazines (ETPs)

随着人们饮食结构和生活方式的改变,我国的前列腺癌发病率和死亡率呈现逐年上升趋势^[1-2]。针对早期前列腺癌细胞具有雄激素依赖性的特征,前期治疗前列腺癌最有效的手段,是通过雄激素阻断疗法进行治疗,然而在治疗期间,前列腺癌细胞往往会由雄激素依赖性转变为雄激素非依赖性^[3-5]。目前,还没有有效的手段或药物治疗雄激素非依赖性前列腺癌。因此,雄激素非依赖性前列腺癌的治疗成为前列腺癌治疗的难点和重点。

PC3M 细胞是前列腺癌高转移细胞系,是一种研究抑制前列腺癌雄激素非依赖性癌细胞生长的常用细胞^[6-10]。近年来,人们研究了 DIM^[6]、金丝桃素^[7]、羟基喜树碱^[8]、苦参碱^[9]、茶多酚^[10]

等对该细胞的抑制作用,为雄激素非依赖性前列腺癌的治疗提供了新的线索。

11-脱氧轮枝菌素 A (又称 11'-脱氧沃替西林 A, 11'-deoxyverticillin A, C42), 是一种从冬虫夏草共生菌中分离得到的多硫代二氧基哌嗪 (Epipolythiodioxopiperazines, ETPs) 族结构化合物^[11], 其对结肠癌细胞有诱导细胞凋亡的作用^[12]。为探讨其对前列腺癌雄激素非依赖性癌细胞生长的抑制作用,我们研究了其对 PC3M 细胞凋亡的影响。结果表明, C42 具有诱导 caspase 依赖性细胞凋亡,抑制 PC3M 细胞生长的作用。这为进一步研究利用 C42 类化合物作为雄激素非依赖性前列腺癌的可能临床药物提供了一定

的实验和理论参考。

1 材料与amp;方法

1.1 细胞

雄激素非依赖性前列腺癌高转移细胞系 PC3M 细胞为本实验室保存。

1.2 主要试剂和仪器

MEM、无酚红 DMEM 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司; 预染蛋白 Marker 购自 Fermentas 公司; β -Actin 抗体购自北京中杉金桥公司, PARP 抗体购自 Sigma-Aldrich 公司; ECL 发光液购自 GE 公司; Caspase-Glo 3/7 试剂盒、MTS 试剂盒 (CellTiter 96[®] Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay) 购自 Promega 公司; Annexin V-FITC 试剂盒购自 BD 公司。11'-Deoxyverticillin A (C42) 由中国科学院微生物研究所车永胜研究员提供。Sunrise 酶标仪为 TECAN 公司生产; 生物发光检测仪为 Promega 公司生产; 流式细胞仪为 BD 公司生产。

1.3 细胞培养

PC3M 细胞于完全 MEM 培养基 (10%胎牛血清、100 g/L 链霉素和 100 U/mL 的青霉素) 中培养, 条件为 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂。

1.4 细胞增殖检测

将 5 000~10 000 个细胞分至 96 孔板中, 每孔加入 100 μ L 完全 MEM 培养基 (含 10%胎牛血清、100 g/L 链霉素及 100 U/mL 的青霉素)。过夜后换为新鲜的无酚红 DMEM 培养基 (含 10%胎牛血清), 并加入不同浓度的 C42。加入 20 μ L MTS/PMS (MTS : PMS=20 : 1), 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下持续培养, 4 h 内检测, 酶标仪测定 490 nm

处的 OD 值, 每样品设 3 次以上重复。

1.5 Western blotting 检测

细胞经不同浓度、不同时间 C42 处理后, PBS 漂洗并加入细胞裂解液 (150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl, 2 mmol/L EDTA, 0.5% TritonX-100, 0.5% 脱氧胆酸钠和 1 \times 蛋白酶抑制剂), 收集裂解产物, 冰上放置 30 min, 13 000 r/min 离心 15 min 后收集上清。SDS-PAGE (8%) 电泳, 湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜。5% 的脱脂牛奶封闭 2 h。孵育特异性抗体, anti-PARP 为 1 : 1 000, anti- β -actin 为 1 : 4 000, 二抗分别为辣根过氧化物酶标记的抗兔 IgG 1 : 4 000 或抗小鼠 IgG 1 : 2 000, 加 ECL 发光液, X-ray 自显影后采用图像系统软件 Quantity One 分析, 分析目的蛋白的表达差异。

1.6 Caspase-Glo 3/7 检测

将 5 000~10 000 个细胞分至 96 孔板中, 每孔加入 100 μ L 完全 MEM 培养基 (含 10%胎牛血清、100 g/L 链霉素及 100 U/mL 的青霉素)。过夜后换为新鲜的 DMEM 培养基 (含 10%胎牛血清), 并加入不同浓度的 C42, 每孔 100 μ L。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下持续培养 6 h 后, 于室温下, 加入 100 μ L Caspase-Glo 3/7 试剂, 300~500 r/min 摇动 30 min, 生物发光仪检测荧光。每样品设 3 次以上重复。

1.7 流式细胞检测

胰酶消化经不同浓度 C42 处理的细胞, 离心收集细胞, PBS 洗涤 2 次, 加入 1 \times 结合缓冲液 (0.1 mol/L Hepes (pH 7.4), 1.4 mol/L NaCl, 25 mmol/L CaCl₂) 重悬细胞, 使其密度为 1 \times 10⁶ 个细胞/mL。取出 1 \times 10⁵ 个细胞加入流式专用管

中, 并加入 5 μL Annexin V-FITC, 室温下避光孵育 15 min, 上机前 1 min, 再加入 1.5 μL PI, 并补加 400 μL 1 \times 结合缓冲液, 混匀细胞后, 流式细胞仪分析。

2 结果

2.1 C42 处理可抑制 PC3M 细胞的增殖

通过 MTS/PMS 检测 C42 处理对 PC3M 细胞增殖的影响。结果表明, 使用浓度分别为 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 、0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 C42 处理 PC3M 细胞 12 h 后, 其相对细胞增殖抑制率分别为 11% ($P < 0.05$) 及 44% ($P < 0.01$) (图 1A)。用浓度为 0.25 $\mu\text{mol/L}$ C42 处理 PC3M 细胞, 发现随着时间的延长, PC3M 细胞相对细胞增殖抑制率显著增加 (图 1B)。如图 1B 所示, PC3M 细胞相对细胞增殖抑制率从无显著变化 (6 h) 增加至 36% (24 h), 其中 12 h 组与 6 h 组相比, 24 h 组与 12 h 组相比均具有显著性差异 ($P < 0.01$)。以上说明, C42 具有抑制 PC3M 细胞生长的作用, 并且对细胞生长的抑制作用同时间和浓度具有相关性。

2.2 C42 处理可诱导 PC3M 细胞凋亡的发生

细胞凋亡是细胞死亡的一条重要途径。为验证 C42 处理是否通过诱导 PC3M 细胞凋亡的发生, 从而降低了其细胞增殖能力。我们利用细胞凋亡发生时膜内外翻的磷脂酰丝氨酸可与 Annexin V 特异性结合, 及 PI 能穿透不完整细胞膜使凋亡晚期细胞和坏死细胞的细胞核着色的特征, 通过 Annexin V/PI 双染, 利用流式细胞术对其进行了分析。结果表明, 经 C42 处理 6 h 后, 细胞凋亡显著增强。0.25 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.5 $\mu\text{mol/L}$ C42 处理后, 其早期凋亡细胞增加数量与对照相比分别增加了 1.1 倍和 2.6 倍, 均达到了统计学上的显著差异 (图 2A, 2B)。而晚期凋亡细胞和/或坏死细胞的增加数量, 仅 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的处理达到了显著性差异 (图 2A, 2C)。

2.3 C42 处理可增强 PC3M 细胞中 caspase-3/7 的活性

Caspase-3/7 在细胞发生凋亡过程中起到至关重要的作用, 其酶活性随着细胞凋亡发生程度的增加而增加。为验证 C42 处理 PC3M 细胞后诱

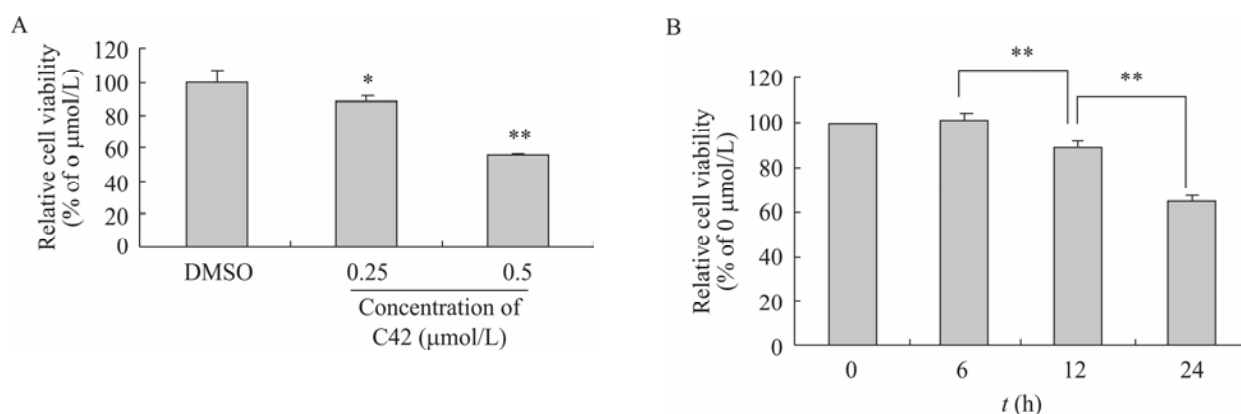


图 1 C42 诱导对 PC3M 细胞生长的影响

Fig. 1 C42 inhibits the cell proliferation of prostate cancer cells. (A) Cell viability of PC3M cells treated with different concentrations of C42 for 12 h. (B) Cell viability of PC3M cells treated with C42 (0.25 $\mu\text{mol/L}$) for different time. The data is represented as $\bar{x} \pm s$ from three independent experiments. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

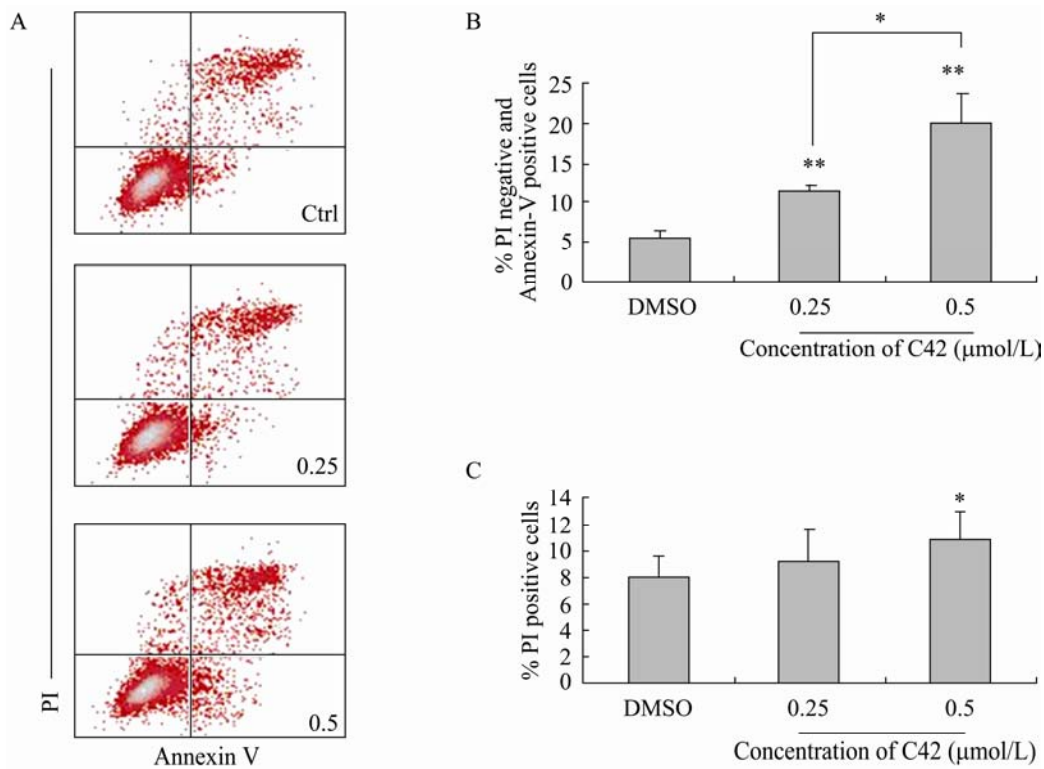


图2 C42对PC3M细胞凋亡的流式细胞分析

Fig. 2 The relationship between C42 and cell apoptosis of PC3M cells. (A) After treated with different concentrations of C42 for 6 h, PC3M cells were collected, incubated with FITC-Annexin V/PI and subjected to flow cytometry. (B) Quantities of early apoptotic cells: PI negative and Annexin V positive cells in all analyzed PC3M cells. (C) Quantities of end stage apoptotic and/ or necrotic cells: PI positive cells in all analyzed PC3M cells. The data is represented as $\bar{x} \pm s$ from three independent experiments. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

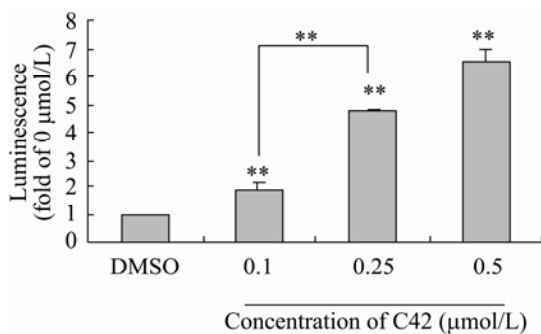


图3 C42对caspase-3/7的激活

Fig. 3 Relationship between C42 and the activity of caspase-3/7 in PC3M cells. PC3M cells were pretreated with C42 for 6 h, then, cells were subjected to caspase-Glo 3/7 assay. The data represented is based on three independent experiments. ** $P < 0.01$.

导的细胞凋亡, 是否具有 caspase 依赖性。我们用 caspase-Glo 3/7 试剂盒对 caspase-3/7 的活性进行检测。如图 3 所示, 随着 C42 处理浓度的增加, caspase-3/7 切割的底物所发的荧光强度不断增加, 当 C42 浓度分别为 0.1、0.25、0.5 μmol/L 时, 其荧光强度与对照组相比均具有极显著的差异, 分别是对照组的 2 倍、5 倍和 6.5 倍。说明 C42 能够增强 PC3M 细胞的 caspase-3/7 的活性, 诱导 caspase 依赖性细胞凋亡, 且具有一定的浓度依赖性。

2.4 C42 处理可诱导 PC3M 细胞中 PARP 的剪切

PARP 的切割是 caspase 依赖性细胞凋亡的

一种特异性标志, 当 caspase 依赖性细胞凋亡发生时, 116 kDa 的 PARP 会被 caspase 特异性切割为 89 kDa 和 24 kDa^[13-14]。因此为进一步阐明 C42 诱导的细胞凋亡为 caspase 依赖的凋亡, 我们在分析了 caspase-3/7 活性的基础上, 对 PARP 的切割情况进行了分析。结果发现, 当分别用浓度为 0.1、0.25、0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 C42 处理 PC3M 细胞

12 h 后, 随着 C42 浓度的增加, PARP 蛋白的被剪切程度增强 (图 4A, 4B)。当用 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 的 C42 处理细胞 0、3、6、12 h 时, PARP 的剪切量随着时间的延长而不断增加 (图 4C, 4D)。PARP 的剪切对 C42 具有一定的浓度依赖性和时间依赖性。这进一步说明, C42 对 PC3M 细胞诱导的细胞凋亡为 caspase 依赖的细胞凋亡。

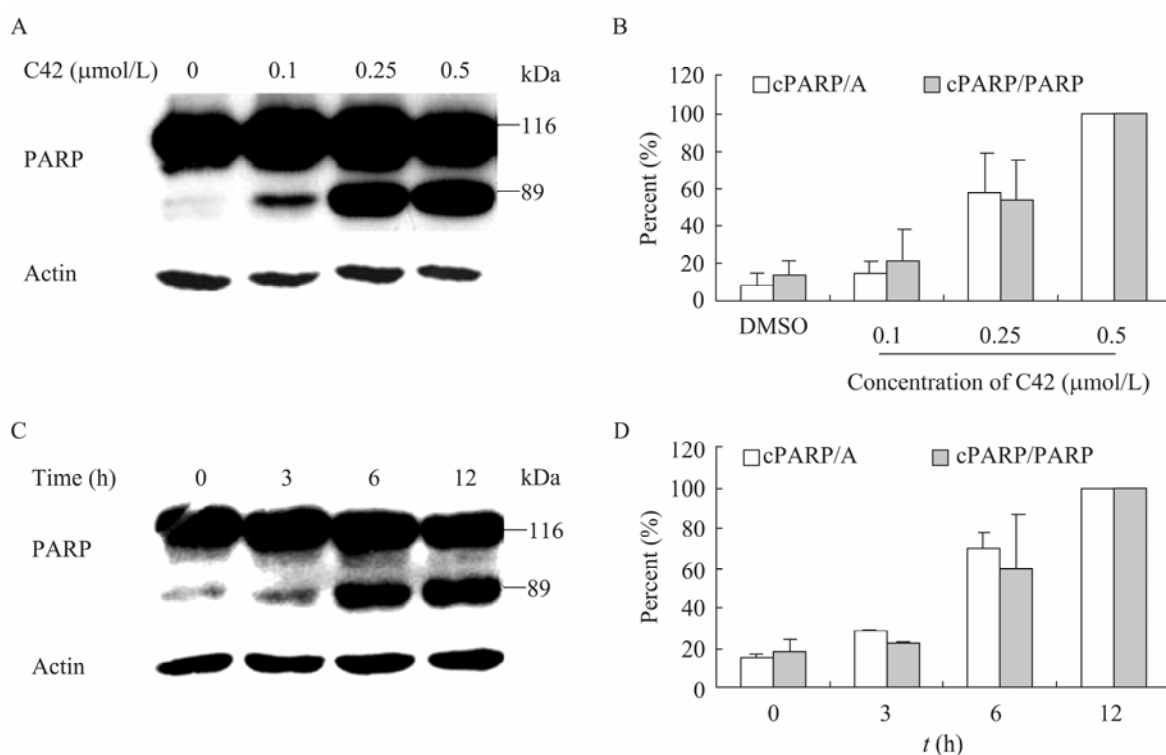


图 4 C42 对 PC3M 细胞 PARP 剪切的影响

Fig. 4 Relationship between C42 and the expression levels of cleaved PARP in PC3M cells. (A) Western blotting analysis of the PARP expression levels in PC3M cells. PC3M cells were treated with different concentrations of C42 for 12 h, then cells were lysed and subjected to western blotting with antibody to PARP or β -actin. (B) Quantification of the cleaved PARP (cPARP) expression levels for A. The cPARP/A (%) and cPARP/PARP (%) in PC3M cells treated with 0.5 $\mu\text{mol/L}$ C42 were defined as 100 respectively. The results were based on three independent experiments. (C) Western blotting analysis of the cPARP expression levels in PC3M cells. Treated with 0.25 $\mu\text{mol/L}$ C42 for 0 h, 3 h, 6 h, and 12 h, PC3M cells were then lysed and subjected to Western blotting with the antibody to PARP or β -actin. (D) Quantification of the cPARP expression levels for C. The cPARP/A (%) and cPARP/PARP (%) in PC3M cells treated with C42 for 12 h were defined as 100 respectively. The results were based on three independent experiments. cPARP/A (%): Quantitation of the cPARP (89 kDa) expression levels normalized against β -actin. cPARP/PARP (%): Quantitation of the cPARP (89 kDa) expression levels normalized against the full-length PARP (116 kDa).

3 讨论

ETPs 族化合物是来源于真菌的活性化合物, 具有免疫抑制、抗炎症反应和抗菌、寄生虫、病毒等广泛的生物活性作用^[15], 是潜在的肿瘤治疗药物, 其家族成员胶黏毒素、来普生苷均被证实对癌细胞产生毒性^[16-18]。我们研究发现, 从冬虫夏草共生菌中分离到的此类化合物 C42, 具有抑制前列腺雄激素非依赖性 PC3M 细胞生长和诱导细胞凋亡的作用。进一步分析发现, 其对 PC3M 诱导的细胞凋亡为 caspase 依赖性的凋亡, C42 处理细胞后, 细胞的 caspase-3/7 的活性增加, PARP 的被剪切程度增强。这对利用 C42 类化合物作为肿瘤药物的临床应用所涉及的基础研究具有重要意义。

我们研究发现, 在利用 0.25 $\mu\text{mol/L}$ C42 处理 PC3M 细胞 6 h 后, 即可显著增加 caspase-3/7 的活性, 增加 PARP 的被剪切量, 显著诱导 caspase 依赖的细胞凋亡发生; 处理 12 h 后, 即可显著降低细胞增殖能力, 抑制 PC3M 细胞的生长; 24 h 后, 与对照相比, 其细胞增殖抑制率可达至 36%。当 C42 使用浓度提高至 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 时, 处理 6 h 后, 其不仅能显著地增加早期凋亡细胞的数量, 且可显著提高晚期凋亡细胞和/或坏死细胞的比例; 处理 12 h 后, 其细胞增殖抑制率可达 44%。

而目前筛选出的对 PC3M 细胞具有杀伤作用的其他化合物, 如金丝桃素在 1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下, 处理 48 h 后, 其细胞增殖抑制率为 20%^[7]; 羟基喜树碱在 2.74 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下, 处理 24 h 后, 其抑制率为 26.57%^[8]; 苦参碱在 503 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下, 处理 24 h 后, 其抑制率为 1.68%^[9]; DIM

在 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下, 处理 48 h 后, 其抑制率为 35.6%^[6]。由此可见, C42 对 PC3M 细胞具有更好的杀伤作用, 且具有更高的潜在应用价值。

目前研究认为, 促使细胞导向死亡的途径主要有 3 种, 即细胞凋亡 (Apoptosis)、自噬性死亡 (Autophagic cell death) 和细胞坏死 (Necrosis)^[19]。C42 处理对 PC3M 细胞生长的抑制, 除通过细胞凋亡途径使细胞导向死亡外, 是否还通过引起自噬性细胞死亡、细胞坏死而使细胞导向死亡, C42 是否可抑制实体瘤的生长等, 这些对进一步开发利用 ETPs 类真菌来源的活性化合物和研究此类化合物的可能临床治疗前列腺癌均十分重要, 有待进一步深入研究。

致谢 衷心感谢中国科学院微生物研究所姜学军研究员给予本文的指导与帮助!

REFERENCES

- [1] Hua LX, Qiao D, Xu B, et al. Clinical and pathological characteristics of screen-detected versus clinically diagnosed prostate cancer in Nanjing, China. *Med Oncol*, 2011, 28(1): 357-364.
- [2] Fang RK. The study of environment and cancer in China-with special reference to Shanghai. [2004-01-25]. http://www.geographie.uni-muenchen.de/geomed/pdf_presentations/07_Sat_Rukang.pdf.
- [3] Soriano-Hernández AD, Galvan-Salazar HR, Montes-Galindo DA, et al. Antitumor effect of meclofenamic acid on human androgen-independent prostate cancer: a preclinical evaluation. *Int Urol Nephrol*, 2011: 1-7.
- [4] Miyamoto H, Messing E M, Chang C. Androgen deprivation therapy for prostate cancer: current status and future prospects. *Prostate*, 2004, 61(4): 332-353.
- [5] Isaacs JT. New strategies for the medical treatment of prostate cancer. *BJU Int*, 2005, 96(S2): 35-40.

- [6] Pan YZ, Li Y, Zhao YY, et al. Inhibitory effect of DIM on growth of human prostate cancer cell PC3M. *J Jilin Univ: Med Ed*, 2006, 32(6): 1034–1036.
潘玉琢, 李扬, 赵燕颖, 等. DIM 对人激素非依赖性前列腺癌细胞 PC3M 的生长抑制作用. *吉林大学学报: 医学版*, 2006, 32(6): 1034–1036.
- [7] Gao LF, Meng Y, Zhao XJ, et al. Inhibitory effect of photoactivated hypericin on growth of human prostate cancer cell PC3M. *J Jilin Univ: Med Ed*, 2004, 30(1): 97–99.
高丽芳, 孟艳, 赵雪俭, 等. 光活化的金丝桃素对人前列腺癌细胞 PC3M 的生长抑制作用. *吉林大学学报: 医学版*, 2004, 30(1): 97–99.
- [8] Jin GH, Chen S, Yang L, et al. Hydroxycamptothecin induced human prostate cancer Line PC-3M cell apoptosis. *Chin J Lab Diagn*, 2010, 14(1): 12–13.
金光虎, 陈爽, 杨丽, 等. 羟基喜树碱对人前列腺癌 PC-3M 细胞凋亡的影响. *中国实验诊断学*, 2010, 14(1): 12–13.
- [9] Jin GH, Gao J, Mao XQ, et al. Matrine induced human prostate cancer Line PC-3M cell apoptosis and affected the Osteopontin levels. *Chin J Gerontol*, 2009, 29(21): 2758–2759.
金光虎, 高吉, 毛小强, 等. 苦参碱诱导人前列腺癌 pc-3M 细胞凋亡及对骨桥蛋白表达的影响. *中国老年学杂志*, 2009, 29(21): 2758–2759.
- [10] Mao XQ, Na W L, Zhao D, et al. Effects of tea polyphenol on proliferation inhibition and apoptosis in human prostate cancer PC-3M cells. *Chin J Lab Diagn*, 2010, 14(2): 170–173.
毛小强, 那万里, 赵丹, 等. 茶多酚对前列腺癌 PC-3M 细胞增殖与凋亡的影响. *中国实验诊断学*, 2010, 14(2): 170–173.
- [11] Dong JY, He HP, Shen YM, et al. Nematicidal epipolysulfanyldioxopiperazines from *Gliocladium roseum*. *J Nat Prod*, 2005, 68(10): 1510–1513.
- [12] Zhang N, Chen YL, Jiang RX, et al. PARP and RIP 1 are required for autophagy induced by 11'-deoxyverticillin A, which precedes caspase-dependent apoptosis. *Autophagy*, 2011, 7(6): 598–612.
- [13] Schlegel J, Peters I, Orrenius S, et al. CPP32/Apopain is a key interleukin 1 β converting enzyme-like protease involved in Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem*, 1996, 271(4): 1841–1844.
- [14] Liu XS, Kim CN, Yang J, et al. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 1996, 86(1): 147–157.
- [15] Gardiner DM, Waring P, Howlett BJ. The epipolythiodioxopiperazine (ETP) class of fungal toxins: distribution, mode of action, functions and biosynthesis. *Microbiology*, 2005, 151(4): 1021–1032.
- [16] Bernardo PH, Brasch N, Chai CLL, et al. A novel redox mechanism for the glutathione-dependent reversible uptake of a fungal toxin in cells. *J Biol Chem*, 2003, 278(47): 46549–46555.
- [17] Beaver JP, Waring P. Lack of correlation between early intracellular calcium ion rises and the onset of apoptosis in thymocytes. *Immunol Cell Biol*, 1994, 72(6): 489–499.
- [18] Yanagihara M, Sasaki-Takahashi N, Sugahara T, et al. Leptosins isolated from marine fungus *Leptoshaeria* species inhibit DNA topoisomerases I and/or II and induce apoptosis by inactivation of Akt/protein kinase B. *Cancer Sci*, 2005, 96(11): 816–824.
- [19] Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*, 2009, 16(1): 3–11.