

# 甘氨酸鹅脱氧胆酸钠通过 MAPK/ERK1/2 介导 Bcl-2 在 Ser70 位点的磷酸化引起人肝细胞癌的抗药

陈磊<sup>1)</sup>, 周茂军<sup>2)</sup>, 肖湘成<sup>1)</sup>, 李霞<sup>1)</sup>, 杨满意<sup>3)\*</sup>

(<sup>1)</sup>中南大学湘雅医院肾内科血液净化中心, 长沙 410008; <sup>2)</sup>中南大学湘雅医院卫健委肿瘤蛋白质组学重点实验室, 长沙 410008; <sup>3)</sup>中南大学湘雅医院卫健委纳米生物技术重点实验室, 长沙 410008)

**摘要** B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)是一种重要的抗凋亡蛋白质,在多种人类肿瘤中普遍过表达。甘氨酸鹅脱氧胆酸钠(GCDA)与消化道肿瘤的发生发展密切相关,并能介导肝癌细胞对化疗药物的抵抗。本文旨在探讨在 GCDA 介导的人肝细胞癌(HCC)耐药性中 Bcl-2 的作用及其机制。本研究以肝癌细胞系为研究对象,Western 印迹结果显示,Bcl-2 在多种肝癌细胞系中均有表达。设计靶向 Bcl-2 的 siRNA 沉默 HCC 细胞系内源性 Bcl-2 的表达,发现 Bcl-2 沉默之后促进了化疗药物 5-FU 介导的 HCC 细胞凋亡。机制上,GCDA 可介导 Bcl-2 在 Ser70 位点的磷酸化,而 Ser70 位点的磷酸化能够被 PD98059(MAPK/ERK1/2 抑制剂)所抑制。构建 huBcl2-WT 和 huBcl2-S70A 真核表达载体,脂质体转染 HCC 细胞系。用 Annexin V-FITC/PI 流式细胞术检测凋亡细胞。结果显示,huBcl2-WT 过表达能抑制 5-FU 介导的凋亡,S70 位点失活突变成 A 后,Bcl-2 的过表达不能抑制 5-FU 介导的凋亡。本研究提示,GCDA 通过 MAPK/ERK1/2 通路介导的 Bcl-2 Ser70 位点的磷酸化,在肝癌细胞的存活和抗药中发挥重要作用。抑制 Bcl-2 能够促进化疗药物 5-FU 介导的 HCC 细胞凋亡,该结果为治疗 GCDA 介导的耐药性肝癌提供新的思路。

**关键词** 肝细胞癌;甘氨酸鹅脱氧胆酸钠;B 细胞淋巴瘤-2;磷酸化

**中图分类号** R735.7

## Glycochenodeoxycholate Induces Drug Resistance of Human Hepatocellular Carcinoma by Phosphorylation of Bcl-2 at Ser70 via MAPK/ERK1/2

CHEN Lei<sup>1)</sup>, ZHOU Mao-Jun<sup>2)</sup>, XIAO Xiang-Cheng<sup>1)</sup>, LI Xia<sup>1)</sup>, YANG Man-Yi<sup>3)\*</sup>

(<sup>1)</sup>Department of Nephrology, Blood Purification Center, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China;

<sup>2)</sup>Key Laboratory of Cancer Proteomics of Chinese Ministry of Health, Xiangya Hospital,

Central South University, Changsha 410008, China; <sup>3)</sup>Key Laboratory of Nanobiotechnology

of Chinese Ministry of Health, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

**Abstract** B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) is an important anti-apoptotic protein and is overexpressed in many human tumors. Glycochenodeoxycholate (GCDA) is closely related to the occurrence and development of digestive tract tumors and can mediate the resistance of hepatoma cells to chemotherapeutic drugs. The aim of this study is to investigate the effect and mechanism of Bcl-2 in GCDA-mediated drug resistance of human hepatocellular carcinoma (HCC). In this study, Western blot results showed that Bcl-2 was expressed in several HCC cell lines. siRNA targeting Bcl-2 was designed to

收稿日期: 2019-07-23; 修回日期: 2019-09-29; 接受日期: 2019-10-12

国家自然科学基金(No.81703412, No.81402001)和湖南省自然科学基金(No.2018JJ3830, No.2016JJ3177)资助

\* 通讯作者 Tel: 13677326089; E-mail: yangmanyi@csu.edu.cn

Received: July 23, 2019; Revised: September 29, 2019; Accepted: October 12, 2019

Supported by National Natural Science Foundation of China (No.81703412 and No.81402001) and Natural Science Foundation of Hunan Province (No. 2018JJ3830 and No.2016JJ3177)

\* Corresponding author Tel: 13677326089; E-mail: yangmanyi@csu.edu.cn

silence endogenous Bcl-2 expression. Silence of Bcl-2 promoted apoptosis of HCC cells mediated by 5-FU. GCDA can induce the phosphorylation of Bcl-2 at Ser70, which may be inhibited by PD98059 (MAPK/ERK1/2 inhibitor). HuBcl2-WT and huBcl2-S70A eukaryotic expression vectors were constructed and transfected into HCC cell lines. Apoptotic cells were detected by Annexin V-FITC/PI flow cytometry. Overexpression of huBcl2-WT could inhibit 5-FU-mediated apoptosis. When S70 of Bcl-2 was mutated to A, Bcl-2 inhibition of 5-FU-mediated apoptosis was abolished. This study suggests that phosphorylation of Bcl-2 at S70 by GCDA was through MAPK/ERK1/2 pathway, which may play an important role in the survival and drug resistance of HCC cells. Inhibition of Bcl-2 promotes 5-FU-mediated apoptosis in HCC cells, which can be used in the treatment of GCDA-mediated drug-resistance in hepatocellular carcinoma.

**Key words** hepatocellular carcinoma (HCC); glycochenodeoxycholate (GCDA); B-cell lymphoma-2 (Bcl-2); phosphorylation

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是原发性肝癌中最常见的, 约占 70%~90%<sup>[1]</sup>。肝细胞分泌的胆汁中, 胆汁酸是其主要成分。由于胆汁所存在的 pH 环境, 几乎均与甘氨酸或牛磺酸结合而形成钠盐或钾盐, 称为胆盐。甘氨酸脱氧胆酸钠 (glycochenodeoxycholate, GCDA) 是胆盐中一种剧毒的疏水性结合胆盐<sup>[2]</sup>。有研究揭示, GCDA 参与胆管癌及食管腺癌发生的机制<sup>[3-7]</sup>。胆盐也是肝细胞癌 (HCC) 发生的潜在因素, 但具体的细胞内信号机制还有待进一步研究。

B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 蛋白质家族由关键的抗凋亡和促凋亡蛋白质组成, Bcl-2 是其中主要的抗凋亡蛋白质。Bcl-2 蛋白的过度表达及磷酸化参与细胞增殖的调控, 并且在肿瘤的形成和多药耐药中发挥至关重要的作用。近年来, Bcl-2 在临床上的应用较为普遍, 被认为是一个有效的肿瘤治疗靶点<sup>[8-10]</sup>。然而, 关于 Bcl-2 在肝细胞癌中的作用机制研究较少。最早的研究认为, 肝细胞中 Bcl-2 的过表达是肝细胞抵御有毒性胆盐损伤的适应性现象<sup>[11]</sup>。胆汁淤积小鼠模型中, 胆盐可能诱导了 Bcl-2 的抗凋亡功能<sup>[12]</sup>。Mcl-1 是 Bcl-2 家族中另一重要的抗凋亡蛋白质。Liao 等<sup>[13]</sup>研究已证明, GCDA 可能通过增强 Mcl-1 在 T163 位点的磷酸化, 使 Mcl-1 的半衰期延长, 从而促进 HCC 细胞的存活及化学耐药性。本文在此基础上, 着重探究 Bcl-2 在 GCDA 介导的 HCC 生存及抗药中的作用, 并揭示 Bcl-2 发挥作用的机制, 旨在为肝细胞癌的防治提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

GCDA 和 5-FU 购自美国 Sigma-Aldrich 公司。十字孢碱和 PD98059 (513001) 购自美国 Calbioche

公司。一抗 Bcl-2、p-Bcl-2 (Ser70)、p-Bcl-2 (Ser87)、p-Bcl-2 (Thr56)、anti-Flag、 $\beta$ -肌动蛋白和二抗购自美国 Cell Signaling Technology 公司。Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒来自 BD 公司。

### 1.2 细胞系和培养条件

5 个 HCC 细胞系 HepG2、Bel7402、QGY7703、SMMC7721 和 Huh7 均购自上海中科院细胞库。其中, HepG2、Bel7402、QGY7703 和 SMMC7721 用含 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素混悬液的 RPMI-1640 培养, Huh7 用加了上述 2 种物质的 DMEM 高糖培养。所有细胞均在含 5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱 37 °C 培养。

### 1.3 RNA 干扰、真核表达载体构建和转染

靶向人 Bcl-2 基因的 siRNA (5'-AACATCGCCCTGTGGATGACT-3') 和阴性对照 siRNA (5'-AATTCTCCGAACGTGTCACGT-3') 购自上海吉玛制药技术有限公司。

人的 Bcl-2 (Gene ID: 596) 编码区全长 720 bp, 编码 240 个氨基酸。根据 NCBI 数据库提供的序列, 由华大基因公司合成人的 Bcl-2 编码区序列, 并分别在 5' 和 3' 端加入 Xho I 和 Hind III 酶切位点及保护碱基。合成人的 Bcl-2-WT 的 cDNA 序列由 Xho I 和 Hind III 进行双酶切, 并亚克隆到真核表达载体 (-B)-Flag-pcDNA3.1 (3' 端带 Flag 标签), 构建成 huBcl-2-WT 载体。huBcl-2-S70 A 即是将第 70 位点的 Ser(S) 突变为 Ala(A) 的非磷酸化突变体。突变的序列由华大基因公司合成, 并分别在 5' 和 3' 端加入 Xho I 和 Hind III 酶切位点及保护碱基。合成的突变序列由 Xho I 和 Hind III 进行双酶切, 并亚克隆到真核表达载体 (-B)-Flag-pcDNA3.1 (3' 端带 Flag 标签), 构建成 huBcl-2-S70A 载体。

根据说明书, 使用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 将 siRNAs 或者真核表达质粒转染到细胞中。

## 1.4 Western 印迹检测

将处理好的细胞用预冷的 PBS 洗 2 遍,加入 RIPA 蛋白(加入了蛋白酶抑制剂 PMSF 和磷酸酶抑制剂)提取液,用细胞刮将细胞轻轻刮下,移至 1.5 mL EP 管,冰上裂解 30 min。在 12 000 r/min,离心 15 min,所得上清为细胞总蛋白质。将样品加入 10% SDS-PAGE 分离胶,然后转移至 PVDF 膜,将膜放入 5% BSA 封闭 1 h,加入相应一抗孵育过夜。孵育结束后,膜用 TBST 洗 3 遍,每次 10 min,再加入相应的二抗室温封闭 1 h,洗膜后 ECL 化学发光显影。

## 1.5 流式细胞术分析

将所需质粒转染到相应的细胞系至少 24 h,在存在或不存在 GCDA 情况下,用各细胞对应的 5-FU 的  $IC_{50}$  浓度处理 72 h。然后收集细胞,并用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次。将细胞混悬于结合缓冲液中。并根据说明书,用膜联蛋白 V-FITC 和碘化丙啶(PI)染色,通过流式细胞术分析细胞凋亡。

## 1.6 统计学方法

使用 SPSS 18.0 对数据进行统计分析。所有数据均表示为 3 次或更多次独立实验的平均值 $\pm$ SD。多组之间的配对比较采用单因素方差进行分析,在  $P<0.05$  时认为差异有统计学意义。

# 2 结果

## 2.1 Bcl-2 的沉默促进了肝癌细胞对 5-FU 的敏感性

Bcl-2 是 Bcl-2 家族的主要抗凋亡成员。Bcl-2 在人肝癌细胞中广泛表达。其中,HepG2、Bel7402、QGY7703 和 SMMC7721 肝癌细胞中内源 Bcl-2 的表达相对较高,而 Huh7 肝癌细胞中内源 Bcl-2 的表达相对较低(Fig.1A)。

已有多个研究报道了 Bcl-2 参与肿瘤化学耐药的机制<sup>[14-16]</sup>。为了检验 Bcl-2 是否也与人肝癌细胞的化学耐受有关,用靶向 Bcl-2 的 siRNA 转染具有高水平内源性 Bcl-2 表达的 HepG2、Bel7402、QGY7703 和 SMMC7721 四种 HCC 细胞系,用 Western 印迹检测干扰效率(Fig.1B)。结果显示,该条靶向 Bcl-2 的 siRNA 在 4 种肝癌细胞中均能有效干扰 Bcl-2 表达,沉默率为 40%~60%(Fig.1B)。然后,将 siRNA NC 与 siRNA Bcl-2 转染到 HepG2、Bel7402、QGY7703 和 SMMC7721 细胞系中。转染至少 24 h 后,再用各细胞系对应的 5-FU  $IC_{50}$  的浓度(HepG2 为 15  $\mu$ g/mL, Bel7402 为 30  $\mu$ g/mL,

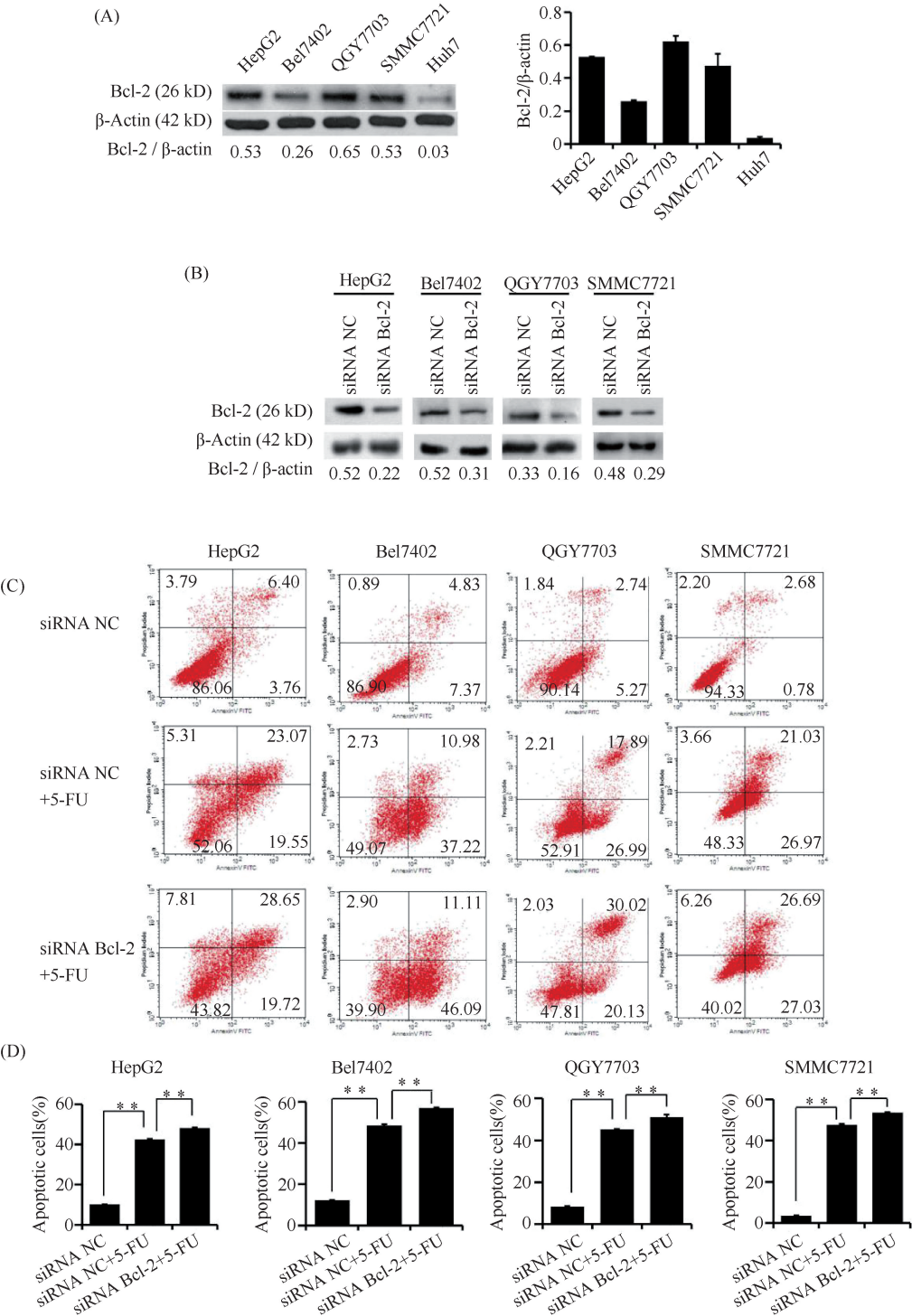
QGY7703 为 1.5  $\mu$ g/mL, SMMC7721 为 20  $\mu$ g/mL)处理细胞 72 h。流式细胞术检测细胞凋亡。结果显示,用各个细胞对应的 5-FU 的  $IC_{50}$  浓度处理细胞 72 h 后,约 50% 的细胞发生凋亡,而 Bcl-2 的沉默进一步促进了 5-FU 介导的细胞凋亡(Fig.1C-D)。

## 2.2 GCDA 可能通过 MAPK/ERK1/2 介导 Bcl-2 在 Ser70 位点的磷酸化

先前的研究认为,PKC 和 ERK1/2 均可作为 Bcl-2 的上游激酶。ERK1 和 ERK2 可与线粒体的 Bcl-2 共定位,并在体内体外直接使 Bcl-2 的 Ser70 位点磷酸化<sup>[17]</sup>。在各种细胞中表达的内源性 Bcl-2,均可在柔性环结构域(flexible loop domain, FLD)中的多个位点磷酸化,包括 Thr56(T56)、Ser70(S70)和 Ser87(S87)位点,Bcl-2 在这些位点的磷酸化参与调节细胞凋亡<sup>[18]</sup>。为检测 GCDA 能否诱导肝癌细胞中 Bcl-2 的磷酸化及其上游的调控激酶,在存在和不存在十字孢碱(Staurosporine, PKC 抑制剂)或 PD98059(MAPK/ERK1/2 抑制剂)情况下,用 100  $\mu$ mol/L GCDA 处理 QGY7703 细胞 30 min,Western 印迹检测 Bcl-2 的表达及其在 Ser70、Ser87 和 Thr56 位点的磷酸化情况。结果显示,GCDA 能介导 Bcl-2 在 Ser70 位点的磷酸化,而对 Ser87 和 Thr56 位点的磷酸化未见作用;PD98059 能抑制 GCDA 介导的 Bcl-2 在 Ser70 位点的磷酸化,而十字孢碱无作用(Fig.2)。上述结果表明,GCDA 可能通过 MAPK/ERK1/2 介导 Bcl-2 在 Ser70 位点发生磷酸化。

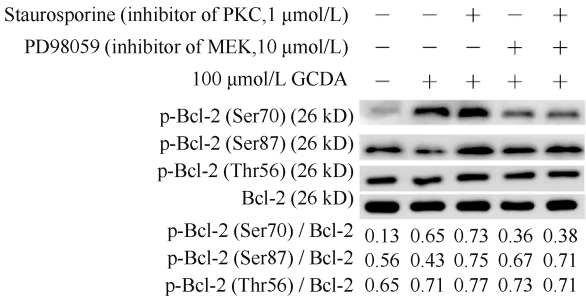
## 2.3 Bcl-2 在 Ser70 磷酸化位点失活突变后不能介导肝癌细胞对 5-FU 的抵抗

为进一步验证 Bcl-2 的 Ser70 位点在 GCDA 介导的 HCC 细胞化学耐受中的重要性,构建 huBcl2-WT 真核表达载体(将野生型人 Bcl-2 基因构建到真核表达载体中)和 huBcl2-S70A 真核表达载体(将第 70 位点的 Ser(S)突变为 Ala(A),为非磷酸化的突变体)。首先转染 2 个真核表达载体到内源 Bcl-2 低表达的 Huh7 细胞中,Western 印迹检测到 2 个真核载体均表达良好(Fig.3A)。之后,将空载、huBcl2-WT 与 huBcl2-S70A 转染到内源 Bcl-2 低表达的 Huh7 细胞。24 h 后,用 5-FU(3  $\mu$ g/mL)处理 72 h,流式细胞术检测细胞凋亡。流式结果显示,huBcl2-WT 过表达能抑制 5-FU 介导的凋亡,S70 位点失活突变为 A 后,Bcl-2 的过表达不能抑制 5-FU 介导的凋亡,凋亡细胞增多,活细胞减少(Fig.3B-C)。上述结果表明,Ser70 位点的磷酸化对于细胞



**Fig.1 Bcl-2 plays an important role in chemoresistance of human HCC cells** (A) The expression levels of endogenous Bcl-2 in HepG2, Bel7402, QGY7703, SMMC7721 and Huh7 were detected by Western blot; (B) HepG2, Bel7402, QGY7703 and SMMC7721 cell lines, with high levels of endogenous Bcl-2 expression, were transfected with siRNAs targeting Bcl-2. Western blot was used to detect the interference efficiency; (C, D) siRNA NC and siRNA Bcl-2 were transfected into HepG2, Bel7402, QGY7703 and SMMC7721 cell lines. After at least 24 hours, the cells were treated with 5-FU (15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for HepG2, 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for Bel7402, 1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for QGY7703 and 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for SMMC7721) for 72 hours. Apoptosis was detected by flow cytometry. siRNA NC, Negative control siRNA. Columns, means of three separate determinations; bars, SD; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$





**Fig.2 GCDA may mediate phosphorylation of Bcl-2 at Ser70 through MAPK/ERK1/2** QGY7703 cells were treated with 100 μmol/L GCDA for 30 minutes in the presence or absence of Staurosporine ( 1 μmol/L ) or PD98059 ( 10 μmol/L ). The expression of Bcl-2 and phosphorylated-Bcl-2 were detected by Western blot. The phosphorylated Bcl-2 was tested using corresponding first antibodies, including p-Bcl-2 ( Ser70 ), p-Bcl2 ( Ser87 ) and p-Bcl-2 ( Thr56 )

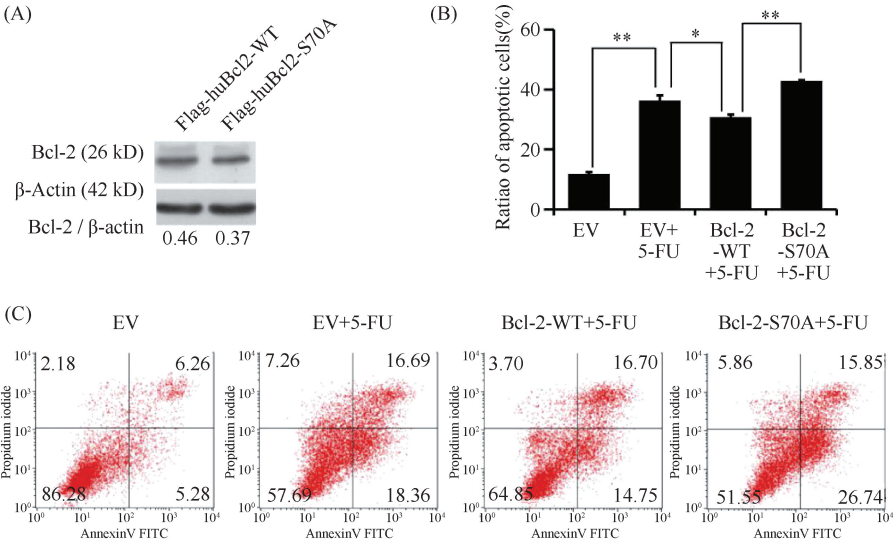
内生存信号的传递非常重要。

3 讨论

胆汁酸是肝细胞分泌的胆汁的主要成分,胆汁酸主要包括甘氨酸胆酸盐和牛磺胆酸盐,它们对脂肪的消化和吸收至关重要。生理学上,熊去氧胆酸及其与牛磺酸结合的形式通过直接抑制线粒体膜结构的破坏,对肝细胞具有保护作用,而 GCDA 具有细胞毒性,可导致肝细胞损伤。GCDA 能通过急性坏

死和慢性细胞凋亡引起肝细胞损伤<sup>[19]</sup>。有研究表明,GCDA 介导的肝细胞凋亡是通过胱天蛋白酶 (caspase) 激活调节的。胱天蛋白酶级联反应可以激活抗凋亡基因以防止肝细胞凋亡。GCDA 通过激活 ERK 和 p38 MAPK 通路诱导非肿瘤性 Barrett’s 细胞系中细胞增殖,还能通过激活 PI3 激酶/ Akt 信号通路刺激 Barrett 腺癌细胞系 ( SEG-1 ) 细胞生长<sup>[4, 6]</sup>。另有研究表明,GCDA 可激活 NADPH 氧化酶亚型,从而引起氧化应激反应,激活 CD95 系统和细胞凋亡<sup>[20]</sup>。我们和其他一些研究表明,GCDA 可介导 HCC 细胞对 5-FU 的化学耐受性,但其机制并不明确<sup>[3, 13]</sup>。

Bcl-2 是最重要的抗凋亡蛋白质,在多种人类肿瘤中均有过表达。Deng 等<sup>[21]</sup>发现,骨形态发生蛋白质 4 ( morphogenetic protein 4, BMP4 ) 可通过 JNK1/Bcl-2 信号转导自噬激活促进 HCC 增殖。还有报道发现,Bcl-2 参与肺癌、神经母细胞瘤和结直肠癌等多种癌症的凋亡与耐药机制中<sup>[14, 22, 23]</sup>。我们猜测,Bcl-2 是否也与 HCC 的耐药性有关。本文用靶向 Bcl-2 的 siRNA 转染 HCC 细胞系,发现 Bcl-2 沉默之后可以促进 5-FU 介导的细胞凋亡 ( Fig.1C ), 这表明 Bcl-2 对 GCDA 介导的 HCC 的化学耐受性是至关重要的。接下来,本文探讨了 Bcl-2 的作用机制,发现 GCDA 能够介导 Bcl-2 在 Ser70 位点的磷酸



**Fig.3 Phosphorylation of Bcl-2 at Ser70 is very important for intracellular survival signal transmission** (A) Two eukaryotic expression vectors were transfected into Huh7 cells with low expression levels of endogenous Bcl-2. Their expression effect was detected by Western blot. (B,C) EV, Bcl-2-WT and Bcl-2-S70A vectors were transfected into Huh7 cells. After 24 hours, cells were treated with 3 μg/mL 5-FU for 72 hours. The apoptotic cells were detected by flow cytometry. EV, empty vector of pcDNA3.1, used as control; Bcl-2-WT, full length of human Bcl-2 was inserted into pcDNA3.1 empty vector; Bcl-2-S70A, the Ser70 phosphorylation-deficient Bcl-2 mutant in which Ser70 was replaced with alanine (A). Columns, means of three separate determinations; bars, SD; \* P<0.05, \*\* P<0.01

化,用 PD98059 处理细胞后,GCDA 介导的 Bcl-2 在 S70 位点的磷酸化被显著抑制(Fig.2)。本文的研究表明,Bcl-2 在 GCDA 诱导的 HCC 细胞的生存与耐药中发挥了重要作用,其作用机制可能是通过 MAPK/ERK1/2 信号通路诱导 Bcl-2 在 Ser70 位点发生磷酸化来实现的。我们的研究为下一步探索 GCDA 介导的肝癌细胞化学耐受性的作用机制提供一定基础,同时为肝癌防治提供新的思路。

参考文献 (References)

[ 1 ] Baig B, Halim SA, Farrukh A, *et al.* Current status of nanomaterial-based treatment for hepatocellular carcinoma[ J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, **116**: 108852

[ 2 ] Wang A, Yu D, Gong Y, *et al.* Glycochenodeoxycholic Acid Does Not Increase Transforming Growth Factor-Beta Expression in Bile Duct Epithelial Cells or Collagen Synthesis in Myofibroblasts [J]. *J Clin Exp Hepatol*, 2017, **7**(4): 316-320

[ 3 ] Wang C, Yang M, Zhao J, *et al.* Bile salt (glycochenodeoxycholate acid) induces cell survival and chemoresistance in hepatocellular carcinoma[J]. *J Cell Physiol*, 2019, **234**(7): 10899-10906

[ 4 ] Jaiswal K, Lopez-Guzman C, Souza RF, *et al.* Bile salt exposure increases proliferation through p38 and ERK MAPK pathways in a non-neoplastic Barrett’s cell line[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006, **290**(2): G335-G342

[ 5 ] Komichi D, Tazuma S, Nishioka T, *et al.* Glycochenodeoxycholate plays a carcinogenic role in immortalized mouse cholangiocytes via oxidative DNA damage[J]. *Free Radic Biol Med*, 2005, **39**(11): 1418-1427

[ 6 ] Jaiswal K, Tello V, Lopez-Guzman C, *et al.* Bile salt exposure causes phosphatidyl-inositol-3-kinase- mediated proliferation in a Barrett’s adenocarcinoma cell line[J]. *Surgery*, 2004, **136**(2): 160-168

[ 7 ] Yoon JH, Werneburg NW, Higuchi H, *et al.* Bile acids inhibit Mcl-1 protein turnover via an epidermal growth factor receptor/ Raf-1-dependent mechanism[J]. *Cancer Res*, 2002, **62**(22): 6500-6505

[ 8 ] Kim JY, Kim J, Bazarsad S, *et al.* Bcl-2 is a prognostic marker and its silencing inhibits recurrence in ameloblastomas[J]. *Oral Dis*, 2019, **25**(4): 1158-1168

[ 9 ] Diaz-Flores E, Comeaux EQ, Kim KL, *et al.* Bcl-2 Is a Therapeutic Target for Hypodiploid B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia [J]. *Cancer Res*, 2019, **79**(9): 2339-2351

[10] Wang L, Zhang L, Chow BKC. Secretin Prevents Apoptosis in

the Developing Cerebellum Through Bcl-2 and Bcl-xL[J]. *J Mol Neurosci*, 2019, **68**(3): 494-503

[11] Kurowsawa H, Que FG, Roberts LR, *et al.* Hepatocytes in the bile duct-ligated rat express Bcl-2[J]. *Am J Physiol*, 1997, **272**(6 Pt 1): G1587-G1593

[12] Schoemaker MH, Gommans WM, Conde de la Rosa L, *et al.* Resistance of rat hepatocytes against bile acid-induced apoptosis in cholestatic liver injury is due to nuclear factor-kappa B activation[J]. *J Hepatol*, 2003, **39**(2): 153-161

[13] Liao M, Zhao J, Wang T, *et al.* Role of bile salt in regulating Mcl-1 phosphorylation and chemoresistance in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Mol Cancer*, 2011, **10**: 44

[14] Wang Y, Liu X, Liu J, *et al.* Knockdown of REG Ialpha Enhances the Sensitivity to 5-Fluorouracil of Colorectal Cancer Cells via Cyclin D1/CDK4 Pathway and BAX/BCL-2 Pathways [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2019, **34**(6): 362-370

[15] Jia Y, Li Z, Cheng X, *et al.* Depletion of death-associated protein-3 induces chemoresistance in gastric cancer cells through the beta-catenin/LGR5/Bcl-2 axis[J]. *J Investig Med*, 2019, **67**(5): 856-861

[16] Bergandi L, Mungo E, Morone R, *et al.* Hyperglycemia Promotes Chemoresistance Through the Reduction of the Mitochondrial DNA Damage, the Bax/Bcl-2 and Bax/Bcl-XL Ratio, and the Cells in Sub-G1 Phase Due to Antitumoral Drugs Induced-Cytotoxicity in Human Colon Adenocarcinoma Cells [J]. *Front Pharmacol*, 2018, **9**: 866

[17] Deng X, Ruvo P, Carr B, *et al.* Survival function of ERK1/2 as IL-3-activated, staurosporine-resistant Bcl2 kinases[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, **97**(4): 1578-1583

[18] Deng X, Gao F, Flagg T, *et al.* Mono- and multisite phosphorylation enhances Bcl2’s antiapoptotic function and inhibition of cell cycle entry functions[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, **101**(1): 153-158

[19] Wang K, Brems JJ, Gamelli RL, *et al.* Reversibility of caspase activation and its role during glycochenodeoxycholate-induced hepatocyte apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2005, **280**(25): 23490-23495

[20] Drudi Metalli V, Mancino MG, Mancino A, *et al.* Bile salts regulate proliferation and apoptosis of liver cells by modulating the IGF1 system[J]. *Dig Liver Dis*, 2007, **39**(7): 654-662

[21] Deng G, Zeng S, Qu Y, *et al.* BMP4 promotes hepatocellular carcinoma proliferation by autophagy activation through JNK1-mediated Bcl-2 phosphorylation[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, **37**(1): 156

[22] Klenke S, Akdeli N, Stelmach P, *et al.* The small molecule Bcl-2/Mcl-1 inhibitor TW-37 shows single-agent cytotoxicity in neuroblastoma cell lines[J]. *BMC Cancer*, 2019, **19**(1): 243

[23] Yu S, Gong LS, Li NF, *et al.* Galangin (GG) combined with cisplatin (DDP) to suppress human lung cancer by inhibition of STAT3-regulated NF-kappaB and Bcl-2/Bax signaling pathways [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, **97**: 213-224