

· 最新医学论著 ·

硫利达嗪对结直肠癌细胞 CT26.WT 免疫原性细胞死亡的作用及机制研究

林静, 许文超, 刘柳, 汪毅, 孙祥*

(安徽医科大学第三附属医院肿瘤科, 安徽 合肥 230001)

摘要: **目的** 以 CT26.WT 细胞株为研究对象, 探讨硫利达嗪诱导其发生免疫原性细胞死亡及可能的作用机制。**方法** 不同浓度硫利达嗪处理 CT26.WT 细胞, 采用 MTT 法检测细胞增殖抑制, 流式细胞术检测细胞凋亡率、细胞表面钙网蛋白 CRT 表达情况, Western blot 法检测内质网应激相关蛋白 PERK、Phospho-eIF2 α 、ATF-4、CHOP、BIP、HMGB1 及线粒体凋亡相关蛋白 Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-9、Cleaved PARP 的表达水平。**结果** 随着药物浓度的升高, CT26.WT 细胞的增殖抑制明显增加, 凋亡率及细胞表面 CRT 表达上升。Western blot 结果显示在一定浓度范围内, 硫利达嗪可上调内质网应激相关蛋白 PERK、Phospho-eIF2 α 、ATF-4、CHOP、BIP、HMGB1 及线粒体凋亡相关蛋白 Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-9、Cleaved PARP 表达。**结论** 硫利达嗪对结直肠癌细胞 CT26 有增殖抑制效应并可诱导细胞发生免疫原性细胞死亡, 其可能的机制与 Caspase 内外源性凋亡及内质网应激相关。

关键词: 硫利达嗪; 免疫原性细胞死亡; 内质网应激; 结直肠癌

中图分类号: R735.3+7

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1671-3141.2022.009.007

本文引用格式: 林静, 许文超, 刘柳, 等. 硫利达嗪对结直肠癌细胞 CT26.WT 免疫原性细胞死亡的作用及机制研究 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2022, 22(009): 29-34.

Effect and Mechanism of Immunogenic Cell Death of Thiolidazine on Colorectal Cancer CT26.WT Cells

LIN Jing, XU Wen-chao, LIU Liu, WANG Yi, SUN Xiang*

(Department of Oncology, the Third Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei Anhui 230001)

ABSTRACT: Objective Some drugs can induce immunogenic cell death while inducing apoptosis of tumor cells, which can stimulate the anti-tumor immune killing effect in the body and usually have better therapeutic effect. This experiment was conducted to investigate the immunogenic cell death induced by thiolidazine in CT26. WT cell line and its possible mechanism. **Methods** After being treated with different concentrations of thioridazine, the proliferation-inhibition rate of CT26. WT cells was detected by MTT assay. Flow cytometry was used to measure the expression of apoptosis rate and calreticulin on cell surface. Endoplasmic reticulum stress-related proteins (PERK、Phospho-eIF2 α 、ATF-4、CHOP、BIP、HMGB1) and mitochondrial apoptosis-related proteins (Cleaved Caspase-3, Cleaved Caspase-9, Cleaved-PARP) were detected by Western blot. **Results** The proliferation of CT26. WT cells was significantly inhibited by thioridazine in a concentration-dependent manner. Flow cytometry results showed that cell apoptosis rate and the expression of calreticulin were significantly increased with the increasing of drug concentration. Western blot analysis showed that PERK, Phospho-eIF2 α , ATF-4, CHOP, BIP, HMGB1, Cleaved Caspase-3, Cleaved Caspase-9, and Cleaved PARP were up-regulated within a certain concentration range after thiolidazine treatment. **Conclusion** Thiolidazine can inhibit the proliferation of colorectal cancer CT26 cells and induce immunogenic cell death, which may be related to endoplasmic reticulum stress and endogenous and exogenous apoptosis pathways of Caspase.

KEY WORDS: thiolidazine; immunogenic cell death; endoplasmic reticulum stress; colorectal cancer

基金项目: 本研究受国家外国专家项目 (G2021019011L) 和合肥市引进境外智力项目 (基于高通量测序技术的结直肠癌发生免疫原性死亡的基因挖掘与生物信息学分析) 资助。

作者简介: 第一作者: 林静 (1996-), 女, 安徽省滁州市, 安徽医科大学肿瘤学硕士研究生; 研究方向为肿瘤免疫相关治疗。

通信作者*: 孙祥, 主任医师, 安徽医科大学硕士生导师。

0 引言

结直肠癌 (Colorectal Cancer, CRC) 的发生率在全球范围内居恶性肿瘤第 3 位^[1], 近年来中国的发病率和死亡率亦不断上升^[2]。虽然手术和化疗在结直肠癌治疗中起着重要作用, 但其疗效仍很局限^[3], 且存在严重的不良反应。因此, 需要不断寻找更有效的临床疗法^[4,5]。目前硫利达嗪 (thialidazine, THZ) 作为一种抗精神疾病药物在肿瘤治疗中处于探索阶段, 其抗肿瘤作用及机制仍是较少被关注的领域^[6,7]。硫利达嗪诱导结直肠癌细胞发生免疫原性细胞死亡及其机制研究尚未见报道。本研究通过观察硫利达嗪对 CT26.WT 增殖、凋亡的影响, 进一步探讨其在诱导结直肠癌细胞免疫原性死亡中的机制, 为结直肠癌治疗提供了新思路, 也为临床研究奠定了理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株与实验药物

结直肠癌细胞株 CT26.WT 购自中国科学院上海细胞库, 由安徽医科大学第三附属医院中心实验室传代保存; 硫利达嗪购自美国 Sigma 公司。

1.1.2 主要试剂及仪器

RPMI-1640 培养基购自美国 Hyclone 公司; 青霉素-链霉素双抗购自上海碧云天生物技术有限公司; 胎牛血清、二甲基亚砷 (DMSO)、含乙二胺四乙酸 (EDTA) 胰酶购自美国 Gibco 公司; MTT 试剂盒购自 Sigma 公司; Annexin V-FICT/PI 双染凋亡检测试剂盒购于美国 BD 公司; CRT 抗体购自 Abcam 公司; Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-9、Cleaved PARP、PERK、Phospho-eIF2 α 、ATF-4、CHOP、BIP、HMGB1 单克隆抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司; β -Actin 及所有二抗均购自北京中杉金桥生物技术有限公司; ECL 超敏发光试剂盒购自 Thermo 公司。倒置显微镜购自日本 OLYMPUS 公司; 全自动酶标仪购自美国 Bio-Rad 公司; 流式细胞仪 FACS Calibur 购自美国 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 CT26.WT 细胞株培养

细胞置于 37 $^{\circ}$ C, 含有 5% CO₂ 的细胞恒温培养箱中, 在含双抗和 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中培养。根据细胞的形态及密度等情况定时传代。以下所有实验用细胞均取对数生长期。

1.2.2 MTT 法检测细胞增殖抑制

细胞以 4×10^4 个 /mL, 每孔 100 μ l 接种于 96 孔板, 边缘孔均以无菌 PBS 填充。培养至细胞贴壁并呈对数生长时, 实验组每孔更换含不同浓度 THZ (10、20、25、30、35、40、45、50 μ mol/L) 的培养基。各组设 5 个副孔, 同时设置空白对照组及阴性对照组。培养 24 h 后, 每孔加入 10 μ l MTT (5 mg/mL), 继续培养 4 h 后弃去上清, 再加入 DMSO 150 μ l 后室温下振荡 10 min。用酶标仪在 490nm 波长处测得每孔吸光度值 (optical density, OD 值), 计算出抑制率 = (对照组吸光度均值 - 实验组吸光度均值) / 对照组吸光度均值 \times 100%。

1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡率

细胞以 1×10^5 个 /mL, 2mL/孔接种于 6 孔板, 孵育至贴壁后换液。对照组更换 1640 培养基, 实验组分别加入浓度 10、20、30、40、50 μ mol/L 的 THZ, 每组均设 3 个复孔, 继续培养 24h 后用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化收集细胞 (包括上清细胞), PBS 预冷洗涤 2 遍弃上清, 加入 5 μ l Annexin V-FITC 和 5 μ l PI 震荡混匀后室温避光孵育 15min, 再次 PBS 清洗、离心、重悬, 上流式细胞仪检测细胞早调和晚调情况。

1.2.4 流式细胞术检测细胞表面 CRT 表达率

细胞的培养、收集同上, 将收集的细胞悬液加入 CRT 一抗 (1:1000), 避光条件下室温孵育 30min, PBS 离心洗涤两遍, 用荧光色素 PE 标记的 IgG 二抗孵育 1h, PBS 洗涤重悬, 采用间接流式细胞术上机检测钙网蛋白 CRT 的表达率。

1.2.5 Western blot 法检测相关蛋白的表达

选取对数生长期的细胞, 对照组 (0 μ mol/L) 和实验组 (10、20、30、40、50 μ mol/L) THZ 预处理 24 小时后, 收取细胞样本 (约 1×10^5 个), 加入 RIPA 细胞裂解液裂解后离心收集上清液得到总蛋白, 按照 1:4 加入蛋白上样缓冲液, 沸水浴加热 15 分钟使蛋白充分变性, 把蛋白样品冷却至室温后以 5-10 μ l/孔上样到 SDS-PAGE 胶加样孔内, 恒压 80v 电泳 1h 后恒流转至 PVDF 膜, 洗去转膜液后加入封闭液 (5% 脱脂奶粉) 室温封闭 2h。参考一抗说明书用一抗稀释液进行稀释, 4 $^{\circ}$ C 缓慢摇动孵育过夜。参考一抗的属性和二抗说明书, 按照 1:20000 用二抗稀释液稀释辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗, 室温孵育 1.2h。PBST 洗涤 3 次后使用 ECL 发光并显影定影。

1.3 统计分析

所有实验均重复 3 次及 3 次以上, 采用 SPSS

20.0 及 GraphPad Prism 7.0 统计软件进行数据分析及图表绘制。实验数据用 Mean \pm SD 表示,采用单因素方差分析对数据进行比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 硫利达嗪对细胞增殖的影响

MTT 法检测结果显示,在一定的范围内,THZ 对 CT26.WT 的增殖抑制效应与浓度呈正相关。不同浓度 (10、20、25、30、35、40、45、50 $\mu\text{mol/L}$) 的药物作用 24h,各组的增殖抑制率分别为 (8.327 \pm 3.748)%、(21.385 \pm 2.372)%、(43.872 \pm 4.355)%、(68.023 \pm 3.808)%、(79.569 \pm 5.504)%、(85.807 \pm 3.793)%、(87.783 \pm 2.519)% 和 (91.067 \pm 1.960)%。各实验组与对照组相比差异有统计学意义 ($F=439.368$, $P < 0.01$) (图 1B)。光学显微镜下观察细胞形态,可见随着药物浓度增加,正常细胞数量减少、轮廓不清、间隙增加,贴壁细胞减少,细胞呈漂浮状 (图 1A)。通过 SPSS 20.0 软件计算

得出,THZ 对 CT26.WT 半数抑制浓度 (IC₅₀) 值为 25.373 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.2 硫利达嗪对细胞的凋亡作用

流式细胞术采用 Annexin-V-FITC/PI 双染分析细胞凋亡。结果显示,0、10、20、30、40、50 $\mu\text{mol/L}$ 的 THZ 作用于 CT26.WT 细胞 24h 后,促进细胞发生凋亡。各组的凋亡率分别为 (0.175 \pm 0.170)%、(14.073 \pm 3.817)%、(24.250 \pm 3.424)%、(40.437 \pm 1.186)%、(44.783 \pm 2.076)% 和 (47.073 \pm 3.821)%。与对照组相比,差异有统计学意义 ($F=137.480$, $P < 0.001$) (图 2)。在 THZ 浓度超过 30 $\mu\text{mol/L}$ 后,随着浓度的增加,凋亡率无明显上升 ($P=0.08$)。

2.3 硫利达嗪对细胞表面钙网蛋白 CRT 表达的影响

采用流式细胞术对细胞表面钙网蛋白的表达进行检测,结果显示对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 的 CRT 阳性表达率为 (0.399 \pm 0.597)%,经 10、20、30、40、50 $\mu\text{mol/L}$ 的 THZ 作用 24h 后,细胞表面 CRT 的表达率分别为 (16.900 \pm 1.054)%、(24.433 \pm 4.102)%、(45.967 \pm 2.616)%、

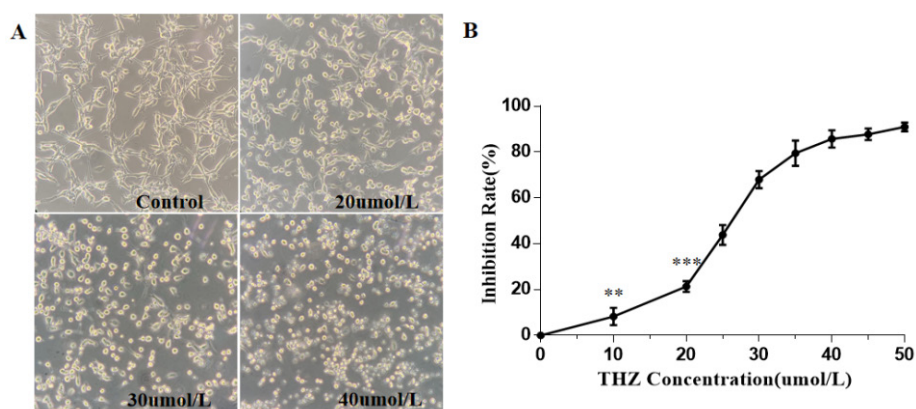


图 1 硫利达嗪对 CT26.WT 细胞增殖的影响

注: A: 光镜下观察不同浓度的硫利达嗪作用 24 h 后,CT26.WT 细胞形态学的变化。B: MTT 法检测增殖抑制率。与对照组相比,各实验组有统计学意义。* $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ 。

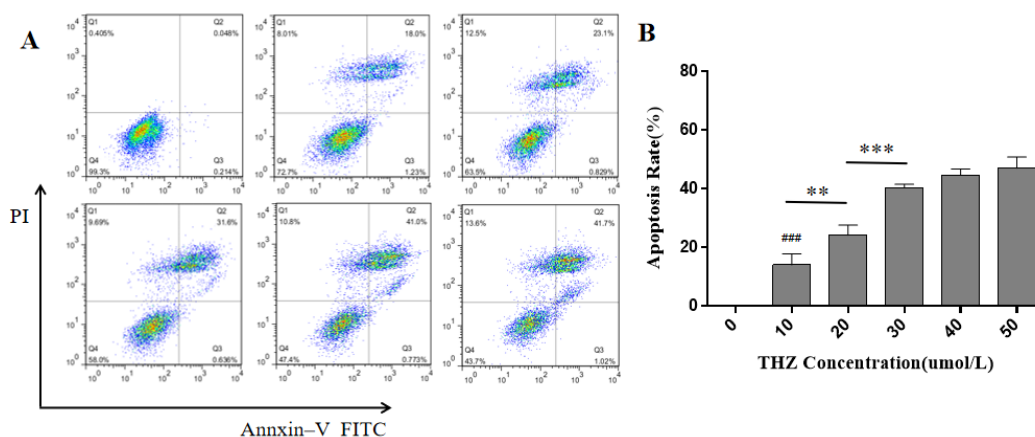


图 2 流式细胞术检测不同浓度硫利达嗪作用 24 小时后对细胞凋亡的影响

注: 随着浓度升高, 凋亡率明显上升。实验组与对照组相比, ### $P < 0.001$ 。对照组间比较, * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ 。

(79.500 ± 7.732)% 和 (90.733 ± 5.843)%。与对照组相比, 差异有统计学意义 ($F=195.330, P<0.01$), 且随着 THZ 浓度的增加, 细胞表面 CRT 表达上升。见图 3。

2.4 硫利达嗪对内质网应激及线粒体凋亡相关蛋白表达的影响

浓度为 0、10、20、30、40、50 μmol/L 的 THZ 分别作用于 CT26.WT 细胞 24 h 后, 与对照组相比, 内质网应激相关蛋白 PERK、Phospho-eIF2α、ATF-4、CHOP、BIP、HMGB1 及线粒体凋亡相关蛋白 Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-9、Cleaved PARP 表达上调, 且相对表达量在 20 μmol/L 时最多。当 THZ 浓度超过 20 μmol/L 时, 随着浓度的升高, 我们发现 CT26 的相关蛋白表达量整体呈现降低趋势, 结合流式细胞术检测结果, THZ 处理浓度为 30 μmol/L 时, 其诱导凋亡细胞比率较 10 μmol/L 上调 2 倍以上 ($40.437 ± 1.186$)%

VS ($14.073 ± 3.817$)%, 蛋白表达下调可能与 CT26 细胞凋亡发生多, 蛋白合成能力不足有关。各实验组与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P<0.01$)。

3 讨论

肿瘤的低免疫原性和免疫逃逸可导致复发转移^[8,9]。最近研究表明某些化学药物等作用于肿瘤细胞可触发内质网 (ER) 应激反应, 从胞内释放免疫信号分子来提高肿瘤细胞的免疫原性, 这个过程导致的细胞凋亡即为肿瘤的免疫原性细胞死亡 (Immunogenic cell death, ICD)^[10-13]。作为一种广泛用于治疗精神疾病的吩噻嗪类药物^[14], 硫利达嗪还可以通过诱导凋亡和调节抗凋亡信号通路活性来抑制肿瘤细胞的生长^[15-17]。诱导 ICD 是一种恢复“冷”肿瘤免疫原性的具有前景的方法, 它可以

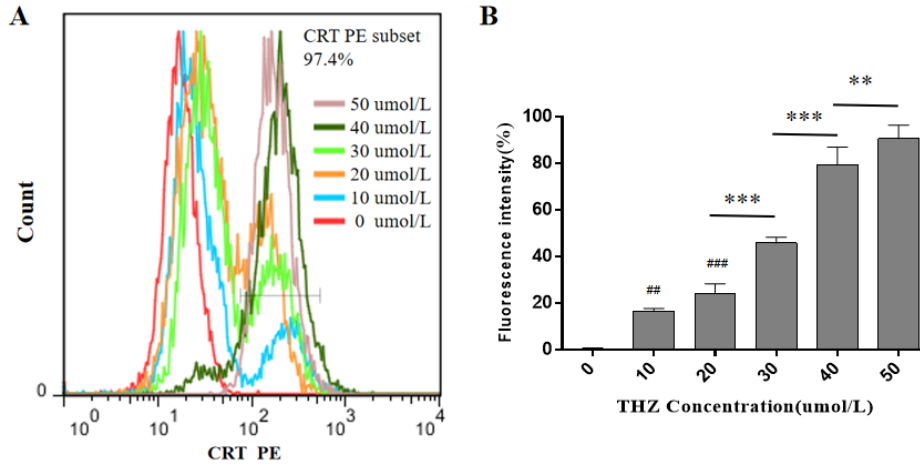


图 3 流式细胞术检测不同浓度硫利达嗪作用 24 小时对钙网蛋白 CRT 表达的影响

注: 结果显示各实验组细胞表面 CRT 阳性表达明显上调。实验组与对照组相比, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$ 。对照组间比较, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

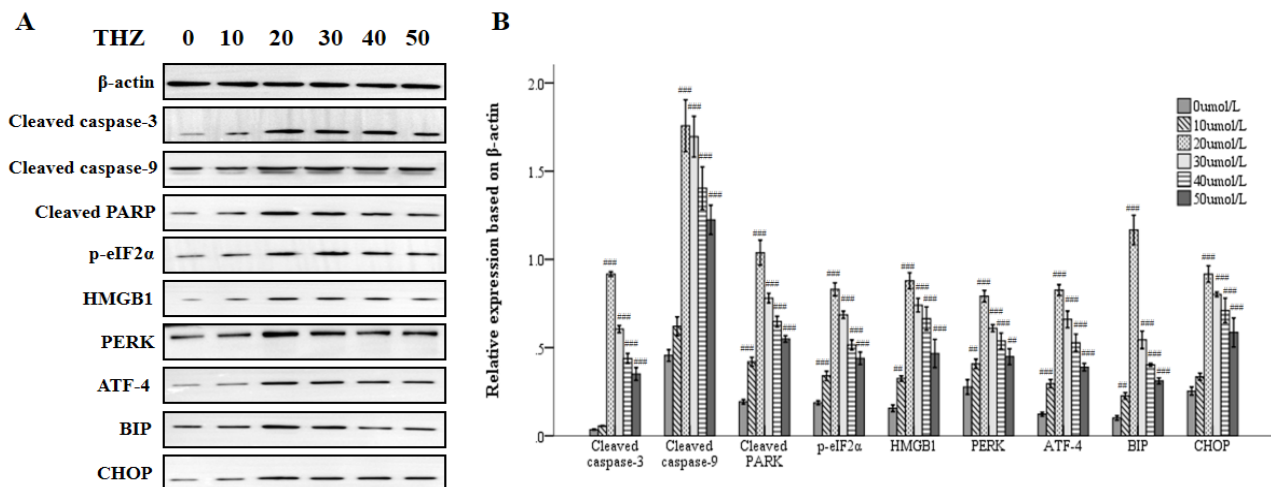


图 4 Western blot 法检测相关蛋白水平的改变

注: 与对照组相比, 线粒体凋亡蛋白及 ER-Stress 相关蛋白表达上调。各实验组与对照组比较, 差异有统计学意义。## $P<0.01$, ### $P<0.001$ 。

利用固有和适应性成分来启动肿瘤微环境 (TME) 以获得更大的抗肿瘤反应。ICD 为刺激机体抗肿瘤免疫反应提供了新途径。本课题研究组已证实硫利达嗪能诱导肺癌细胞 ICD 的发生,而在结直肠癌细胞中尚未见相关报道^[18,19]。

损伤相关分子 (Damage-associated molecular patterns, DAMPs)^[20-23] 的释放与内质网应激未蛋白折叠反应 (unfolded protein response, UPR) 相关^[24,25]。在内质网高应激条件下, BIP/GRP78 表达明显上调,产生 PERK-eIF2 α 、ATF6-ERSE、和 IRE1-XBP1s 三条主要信号通路来进行 UPR^[26-30]。激活 UPR 通路中 PERK 能够引起 ICD 的发生,并且 PERK 的激活能引起 eIF2 α 的磷酸化,进而引发 CRT 膜转位^[31,32]。我们的结果也显示,硫利达嗪能够使 PERK 及 eIF2 α 的磷酸化水平升高,这与文献报道相一致。硫利达嗪介导的内质网活性氧生成可导致严重的内质网应激,促凋亡蛋白 CHOP 的过表达证明了这一点,该蛋白是内质网凋亡的标志^[33-36]。且在一定范围内,CHOP 水平随着药物浓度的增加进一步升高。

内质网应激引起的 CRT 膜转位是 ICD 的核心事件。树突状 (DC) 细胞与 CRT 结合后生长为成熟 DC 细胞,并将肿瘤抗原呈现给 T 细胞以激活后续的免疫反应^[37]。本研究结果表明硫利达嗪促进了 CT26.WT 细胞表面 CRT 的表达。有研究将 CRT 与肿瘤抗原嵌合,大大提升了肿瘤抗原免疫原性^[38],这也为后续研究提供了新思路。

严重的内质网应激和内质网膜的破坏可能导致 Ca²⁺ 的泄漏,进而诱导线粒体相关细胞的凋亡^[39]。这可以通过 Caspase 裂解水平的增加来证明^[40]。本实验 Western blot 结果提示硫利达嗪显著诱导 Caspase-9 和 Caspase-3 的裂解。DNA 损伤时,细胞需产生大量的 PARP 用于 DNA 修复,以维持细胞存活^[41],故而出现了本实验中见到的 PARP 的表达增加。结合 Annexin V-FITC/PI 双标记流式细胞术分析结果,提示硫利达嗪诱导发生了线粒体相关的细胞凋亡,这与课题组之前的实验结果一致^[42]。

药物再利用 (或重新定位) 和药物组合是近年来众多研究团体关注的治疗策略。我们的数据表明硫利达嗪在体外能够显著诱发内质网应激,促使细胞发生 ICD,抑制结直肠癌 CT26.WT 细胞增殖,进而发挥抗肿瘤作用。目前动物实验正在进行中,

其在体内能否协同免疫细胞杀伤肿瘤细胞仍需研究探索。由于硫利达嗪安全性和毒性相对明确,增加了药物进入临床试验的可能性。药物组合的方式可以一定程度上克服肿瘤内和肿瘤间的异质性,此外可能会影响肿瘤微环境,促进肿瘤特异性免疫反应以加速肿瘤细胞的清除。还需要更多的体内外实验进一步验证硫利达嗪与传统结直肠癌化疗药物或免疫疗法联合的疗效。

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries[J]. CA Cancer J Clin,2021,71(3):209-249.
- [2] Feng RM, Zong YN, Cao SM, et al. Current cancer situation in China: good or bad news from the 2018 Global Cancer Statistics? [J]. Cancer Commun (Lond),2019,39(1):22.
- [3] Lin JS, Perdue LA, Henrikson NB, et al. Screening for Colorectal Cancer: Updated Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force[J]. JAMA,2016,315(23):2576-94.
- [4] Moridikia A, Mirzaei H, Sahebkar A, et al. MicroRNAs: Potential candidates for diagnosis and treatment of colorectal cancer[J]. J Cell Physiol,2018,233(2):901-913.
- [5] Yang Q, Yu W, Han X. Overexpression of microRNA101 causes antitumor effects by targeting CREB1 in colon cancer[J]. Mol Med Rep,2019,19(4):3159-3167.
- [6] Antoszczak M, Markowska A, Markowska J, et al. Antidepressants and Antipsychotic Agents as Repurposable Oncological Drug Candidates[J]. Curr Med Chem,2021,28(11):2137-2174.
- [7] Busonero C, Leone S, Bianchi F, et al. In silico screening for ERalpha down modulators identifies thioridazine as an anti-proliferative agent in primary, 4OH-tamoxifen-resistant and Y537S ERalpha-expressing breast cancer cells[J]. Cell Oncol (Dordr),2018,41(6):677-686.
- [8] Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G. Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens[J]. Nat Rev Clin Oncol,2011,8(3):151-60.
- [9] Senovilla L, Aranda F, Galluzzi L, et al. Impact of myeloid cells on the efficacy of anticancer chemotherapy[J]. Curr Opin Immunol,2014,30: 24-31.
- [10] Casares N, Pequignot MO, Tesniere A, et al. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death[J]. J Exp Med,2005,202(12):1691-701.
- [11] Kepp O, Menger L, Vacchelli E, et al. Crosstalk between ER stress and immunogenic cell death[J]. Cytokine Growth Factor Rev,2013,24(4):311-8.
- [12] Zhou J, Wang G, Chen Y, et al. Immunogenic cell death in cancer therapy: Present and emerging inducers[J]. J Cell Mol Med,2019,23(8):4854-4865.

- [13] 杨督, 田同德, 岳文莉. 免疫原性细胞死亡相关分子的表达机制及对免疫的调节 [J]. 现代肿瘤医学, 2020, 28(2): 316-320.
- [14] Fenton M, Rathbone J, Reilly J, et al. Thioridazine for schizophrenia [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2007(3): CD001944.
- [15] Min KJ, Seo BR, Bae YC, et al. Antipsychotic agent thioridazine sensitizes renal carcinoma Caki cells to TRAIL-induced apoptosis through reactive oxygen species-mediated inhibition of Akt signaling and downregulation of Mcl-1 and c-FLIP(L) [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1063.
- [16] Choi AR, Kim JH, Yoon S. Thioridazine specifically sensitizes drug-resistant cancer cells through highly increase in apoptosis and P-gp inhibition [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(10): 9831-8.
- [17] Mu J, Xu H, Yang Y, et al. Thioridazine, an antipsychotic drug, elicits potent antitumor effects in gastric cancer [J]. *Oncol Rep*, 2014, 31(5): 2107-14.
- [18] 柯章敏. 疏利达嗪诱导人肺鳞癌细胞 SK-MES-1 发生免疫原性死亡的机制研究 [J]. *国际呼吸杂志*, 2018, 38(22): 1689-1693.
- [19] 李娟, 等. 疏利达嗪通过内质网应激介导 DR5 表达上调增敏 TRAIL 对肺癌 PC9 细胞的促凋亡效应 [J]. *中国肺癌杂志*, 2017, 20(2): 80-87.
- [20] Solari JIG, Filippi-Chiela E, Pilar ES, et al. Damage-associated molecular patterns (DAMPs) related to immunogenic cell death are differentially triggered by clinically relevant chemotherapeutics in lung adenocarcinoma cells [J]. *BMC Cancer*, 2020, 20(1): 474.
- [21] Fucikova J, Kepp O, Kasikova L, et al. Detection of immunogenic cell death and its relevance for cancer therapy [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(11): 1013.
- [22] Zhou J, Wang G, Chen Y, et al. Immunogenic cell death in cancer therapy: Present and emerging inducers [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(8): 4854-4865.
- [23] Ahmed A, Tait SWG. Targeting immunogenic cell death in cancer [J]. *Mol Oncol*, 2020, 14(12): 2994-3006.
- [24] Chakrabarti A, Chen AW, Varner JD. A review of the mammalian unfolded protein response [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2011, 108(12): 2777-93.
- [25] Brewer JW. Regulatory crosstalk within the mammalian unfolded protein response [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71(6): 1067-79.
- [26] Zielke S, Kardo S, Zein L, et al. ATF4 links ER stress with reticulophagy in glioblastoma cells [J]. *Autophagy*, 2021, 17(9): 2432-2448.
- [27] Sano R, Reed JC. ER stress-induced cell death mechanisms [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1833(12): 3460-3470.
- [28] Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(7): 519-29.
- [29] Kopp MC, Larburu N, Durairaj V, et al. UPR proteins IRE1 and PERK switch BiP from chaperone to ER stress sensor [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2019, 26(11): 1053-1062.
- [30] Yang Y, Liu Y, Zhang Y, et al. Periplogenin Activates ROS-ER Stress Pathway to Trigger Apoptosis via BIP-eIF2alpha-CHOP and IRE1alpha-ASK1-JNK Signaling Routes [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2021, 21(1): 61-70.
- [31] Kepp O, Semeraro M, Bravo-San Pedro JM, et al. eIF2alpha phosphorylation as a biomarker of immunogenic cell death [J]. *Semin Cancer Biol*, 2015, 33: 86-92.
- [32] Bezu L, Wu Chuang A, Humeau J, et al. Quantification of eIF2alpha phosphorylation during immunogenic cell death [J]. *Methods Enzymol*, 2019, 629: 53-69.
- [33] Ma B, Zhang H, Wang Y, et al. Corosolic acid, a natural triterpenoid, induces ER stress-dependent apoptosis in human castration resistant prostate cancer cells via activation of IRE-1/JNK, PERK/CHOP and TRIB3 [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 210.
- [34] Li, Y., et al. New insights into the roles of CHOP-induced apoptosis in ER stress [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2014, 46(8): 629-40.
- [35] Tang J, Ge Y, Yang L, et al. ER Stress via CHOP Pathway is Involved in FK506-Induced Apoptosis in Rat Fibroblasts [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 39(5): 1965-1976.
- [36] Delbrel E, Soumare A, Naguez A, et al. HIF-1alpha triggers ER stress and CHOP-mediated apoptosis in alveolar epithelial cells, a key event in pulmonary fibrosis [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 17939.
- [37] Galluzzi L, Buqué A, Kepp O, et al. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17(2): 97-111.
- [38] Chuang CM, Monie A, Hung CF, et al. Treatment with imiquimod enhances antitumor immunity induced by therapeutic HPV DNA vaccination [J]. *J Biomed Sci*, 2010, 17: 32.
- [39] Van Opdenbosch N, Lamkanfi M. The social network of cell death [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1823(2): 327-34.
- [40] Van Opdenbosch, N., M. Lamkanfi, Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease [J]. *Immunity*, 2019, 50(6): 1352-1364.
- [41] Zhang D, Tang B, Xie X, et al. The interplay between DNA repair and autophagy in cancer therapy [J]. *Cancer Biol Ther*, 2015, 16(7): 1005-13.
- [42] 龚理. 疏利达嗪对肺癌 PC9 细胞的杀伤效应及其机制 [J]. *中国肺癌杂志*, 2015(12): 727-733.