

氯化两面针碱对人食管癌 Eca109 细胞抑制作用及机制研究

袁翠林¹, 娄 诤², 谢璐迪², 王大维^{3*}

1. 杭州市萧山区中医院, 浙江 杭州 311201

2. 浙江中医药大学第二临床医学院, 浙江 杭州 310053

3. 浙江中医药大学基础医学院, 浙江 杭州 310053

摘要: **目的** 探讨氯化两面针碱对人食管癌 Eca109 细胞的抑制作用及其诱导凋亡的分子机制。**方法** 采用 CCK-8 法检测不同浓度的氯化两面针碱不同的干预时间对 Eca109 细胞的增殖抑制率。依据 CCK-8 法的结果将实验设 4 组, 各组氯化两面针碱的终浓度分别为 0、5、10、15 $\mu\text{mol/L}$, 药物作用时间为 48 h。以 AnnexinV-FITC/PI 双染法流式细胞术检测凋亡率; 以实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测 Caspase-3、Caspase-9 和 Noxa 的 mRNA 表达; 采用 Western blotting 法检测 cleaved Caspase-3、Bcl-2、p53 和 Noxa 的蛋白表达水平。**结果** 氯化两面针碱对 Eca109 细胞具有增殖抑制作用, 一定范围内呈时间和浓度依赖性。流式细胞术结果显示, 5 $\mu\text{mol/L}$ 的氯化两面针碱主要诱发早期凋亡 ($P < 0.01$); 10、15 $\mu\text{mol/L}$ 的氯化两面针碱主要诱发的是晚期凋亡 ($P < 0.01$)。qRT-PCR 结果显示, Caspase-3、Caspase-9 和 Noxa 的 mRNA 表达均随氯化两面针碱的浓度增加而升高, 其中 10、15 $\mu\text{mol/L}$ 组升高比较显著。Western blotting 法结果显示, cleaved Caspase-3、p53 和 Noxa 的蛋白水平均随氯化两面针碱浓度的增加而升高 ($P < 0.01$), 但 Noxa 的升高在 5 $\mu\text{mol/L}$ 组不显著, 在 10、15 $\mu\text{mol/L}$ 组升高明显 ($P < 0.01$); Bcl-2 蛋白的表达随着氯化两面针碱浓度的升高而降低, 10、15 $\mu\text{mol/L}$ 组较为显著 ($P < 0.05$ 、0.01)。**结论** 氯化两面针碱对 Eca109 细胞的增殖抑制作用主要是通过诱导凋亡实现的, 氯化两面针碱诱导 Eca109 细胞的凋亡与 p53 和 Noxa 的表达升高和 Bcl-2 的下调以及 Caspase-3 的活化有关。

关键词: 氯化两面针碱; Eca109 细胞; cleaved Caspase-3; Bcl-2; p53; Noxa

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)20-4969-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.20.019

Inhibitory effect and mechanism of nitidine chloride on human esophageal cancer Eca109 cells

YUAN Cui-lin¹, LOU Zheng², XIE Lu-di², WANG Da-wei³

1. Hangzhou Xiaoshan District Chinese Medicine Hospital, Hangzhou 311201, China

2. The Second clinical medical college, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

3. Basic Medical College, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effect of nitidine chloride (NC) on human esophageal carcinoma cell line Eca109 and the molecular mechanism of its induction. **Methods** CCK-8 method was used to detect the inhibition rate of human esophageal cancer Eca109 cells with different concentrations of NC and different intervention time. According to the result of CCK-8 method, the experiment was divided into four groups, and the concentrations of NC in each group were 0, 5, 10, and 15 $\mu\text{mol/L}$, respectively, and the drug action time was 48 h. The apoptotic rate was detected by flow cytometry with Annexin V-FITC/PI double staining. The mRNA expressions of Caspase-3, Caspase-9, and Noxa were detected by qRT-PCR. The expressions of cleaved Caspase-3 and Bcl-2, p53, and Noxa protein levels were detected by Western blotting. **Results** NC had inhibitory effect on Eca109 cells in a certain range of time and dose-dependent manner. Flow cytometry showed that NC at 5 $\mu\text{mol/L}$ mainly induced early apoptosis ($P < 0.01$); NCs at 10 and 15 $\mu\text{mol/L}$ mainly induced late apoptosis ($P < 0.01$). qRT-PCR results showed that the mRNA expression of Caspase-3, Caspase-9 and Noxa was increased with the increase of NC concentration, of which 10 and 15 $\mu\text{mol/L}$ group increased significantly. The results of Western blotting showed that the protein levels of cleaved Caspase-3, p53, and Noxa were both increased with the increase of NC concentration ($P < 0.01$), but the increase of Noxa was not significant in 5 $\mu\text{mol/L}$ group ($P < 0.01$). The expression of Bcl-2 protein

收稿日期: 2019-03-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81373633); 浙江省自然科学基金资助项目 (LY18H270014)

作者简介: 袁翠林, 硕士, 主治医师, 研究方向为消化系统肿瘤防治研究。E-mail: yclfiona@126.com

*通信作者 王大维, 硕士, 实验师。Tel: 15158871450 E-mail: 602599510@qq.com

was decreased with the increase of NC concentration, and which was significantly higher in 10 and 15 $\mu\text{mol/L}$ groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** The inhibitory effect of NC on human esophageal carcinoma Eca109 cells is mainly through apoptosis. The apoptosis of NC induced of Eca109 cells is associated with increased expression of p53 and Noxa, downregulation of Bcl-2, and activation of Caspase-3.

Key words: nitidine chloride; Eca109 cells; cleaved caspase-3; Bcl-2; p53; Noxa

食管癌是一种较为常见的消化系统上皮组织恶性肿瘤, 发病率在恶性肿瘤中居第 5 位, 病死率居第 3 位。我国食管癌发病率和死亡率均较高, 每年约 20 万人死于食管癌。由于食管癌初发时症状较为隐匿, 一旦发现常常是中晚期。目前最主要的治疗方法是手术, 但食管癌术后 5 年生存率较低, 约为 38%^[1]。临床常用化疗药物逐步产生耐药, 因此急需开发毒副作用相对较小且疗效较好的药物。近年来发现两面针在抗肿瘤方面有较大的潜力, 氯化两面针碱是两面针的主要成分之一, 且目前尚未有氯化两面针碱抗食管癌的研究报道。因此本实验以人食管癌 Eca109 细胞为实验对象, 观察氯化两面针碱对其活力的影响, 探讨可能的作用靶点和分子机制, 为氯化两面针碱应用于临床抗食管癌提供理论依据。

1 材料

1.1 细胞

Eca109 细胞购自中国科学院上海细胞库。

1.2 药品与试剂

氯化两面针碱(质量分数 97%, 批号 18062121) 购自上海同田生物技术公司; RPMI 1640 培养基、青霉素/链霉素双抗购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清购自美国 Gemini 公司; CCK-8 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; 反转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂购自日本 Takara 公司; β -actin 抗体、GAPDH 抗体、Bcl-2 抗体、p53 抗体、Noxa 抗体购自英国 Abcam 公司; Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自美国 BD 公司。

1.3 仪器

Scientific Varioskan flash 多功能酶标仪 (Thermo 公司); 实时荧光定量 PCR 仪 (Roche 公司); Odyssey 双色红外激光成像系统 (LI-COR 公司); FC500 流式细胞仪 (Beckman Coulter 公司)。

2 方法

2.1 CCK-8 法检测细胞活性

Eca109 细胞, 使用含 10% 胎牛血清、青霉素 (1×10^5 U/L) 和链霉素 (100 mg/L) 的 RPMI 1640 完全培养基, 在 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 、饱和湿度条件下

培养, 细胞融合度约为 90% 时以 0.25% 胰酶消化传代。取处于对数生长期 Eca109 细胞, 以单细胞悬液每孔 1×10^4 个接种于 96 孔板上。分组设置: 空白组为不含细胞的 RPMI 1640 培养基 (10% 胎牛血清), 对照组为不含氯化两面针碱的正常培养细胞, 实验组的氯化两面针碱终浓度分别为 2.5、5.0、7.5、10.0、12.5、15.0、17.5 $\mu\text{mol/L}$, 每组设置 6 个复孔。分 3 个时间梯度: 12、24、48 h。按 CCK-8 说明书进行检测, 测定吸光度 (A) 值。并按照公式计算增殖抑制率。

$$\text{增殖抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.2 Annexin V-FITC/PI 双染法测细胞凋亡

将对数生长期 Eca109 细胞, 以单细胞悬液按每孔 5×10^5 个接种于 6 孔板。根据增殖抑制率的结果, 将实验组最终设置为 3 组, 药物终浓度分别为 5、10、15 $\mu\text{mol/L}$, 药物作用时间为 48 h。正常培养的细胞作为对照组。药物作用结束后用不含 EDTA 的胰酶消化并离心收集细胞。以磷酸盐缓冲液 (PBS) 漂洗, 去除胰酶, 再次离心后每组以 100 μL 的 $1 \times \text{binding buffer}$ 重悬细胞。加入 Annexin V-FITC 5 $\mu\text{L}/\text{管}$, 吹打混匀, 室温避光孵育 15 min, 而后加入 PI 5 $\mu\text{L}/\text{管}$, 立即上机检测。

2.3 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测凋亡相关基因的表达

细胞培养、分组以及干预方案同“2.2”项。用胰酶消化并收集细胞; 离心柱法提取总 RNA。将 mRNA 逆转录合成 cDNA 按说明书进行。qRT-PCR 反应体系为 20 μL , 反应条件: 95 $^\circ\text{C}$ 预变性 5 min; 40 个循环: 95 $^\circ\text{C}$ 、10 s, 55 $^\circ\text{C}$ 、30 s; 72 $^\circ\text{C}$ 10 min。熔解曲线起始温度为 60 $^\circ\text{C}$, 每 30 秒升高 0.5 $^\circ\text{C}$, 至 95 $^\circ\text{C}$ 结束。实验组的目的基因相对于对照组的表达量以 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算得出。所用引物见表 1。

2.4 Western blotting 法检测凋亡相关蛋白的表达

细胞培养、分组以及干预方案同“2.2”项。用胰酶消化, 离心收集细胞, 预冷的 PBS 清洗细胞, 再次离心后加入裂解液在冰上裂解提取总蛋白。采用 BCA 法测定蛋白浓度后, 100 $^\circ\text{C}$ 水浴加热 10

表 1 qRT-PCR 引物序列
Table 1 qRT-PCR primer sequences

基因	引物序列 (5'→3')
β-actin	正向: GACTTAGTTGCGTTACACCCTTTC 反向: TGCTGTCACCTTCACCGTTC
Caspase-3	正向: CATGGAAGCGAATCAATGGACT 反向: GCCATATCTAGTTTGCCACACACC
Caspase-9	正向: CACTGCTCAAAGATGTCGTCCA 反向: TCAAAGGTCGTGGTCAAAGCC
Noxa	正向: TTCGTGTTCAAGTCGCGTCC 反向: CTCGGTGTAGCCTTCTTGCC

min, 使所提取蛋白充分变性, -20°C 存放。根据 BCA 法所测蛋白结果于 SDS-PAGE 凝胶中加入充分变性的蛋白样本。经过电泳以及湿法电转后室温封闭 1 h, 而后在相应的一抗中 4°C 孵育过夜。后经 TBST 洗涤, 加入相应二抗室温孵育 2 h 后在红外激光成像系统中扫描显影。后期经过 Image J 软件分析相应条带的灰度值。并计算目的蛋白与内参蛋白的灰度比值, 以消除上样量差异。以该比值计算出目的蛋白的相对表达量。

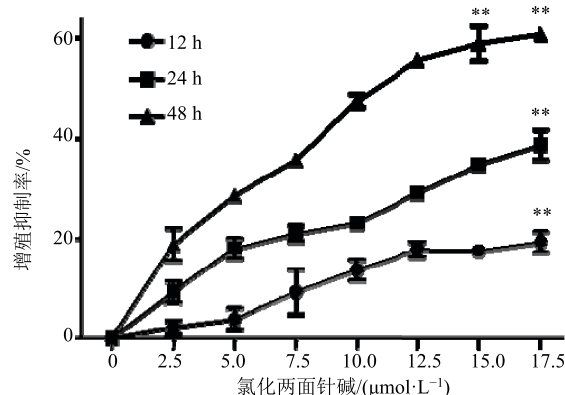
2.5 统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件对实验结果进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 先进行正态检验以及方差齐性检验, 组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 对 Eca109 细胞活性的影响

CCK-8 法检测氯化两面针碱作用后细胞的增殖抑制率。结果显示, 氯化两面针碱对 Eca109 细胞具有明显的增殖抑制作用, 随着作用时间的延长, 各实验组细胞的增殖率明显降低; 同时随着药物浓度的增加, 细胞的增殖率也显著下降。因此氯化两面针碱对 Eca109 细胞的增殖抑制作用呈时间和浓度依赖性, 结果见图 1。



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group, same as below

图 1 氯化两面针碱对 Eca109 细胞的增殖抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Inhibitory effect of NC on proliferation of Eca109 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.2 对 Eca109 细胞凋亡率的影响

流式细胞术检测结果见表 2 和图 2, 各实验组的总凋亡率与对照组相比差异均非常显著 ($P < 0.01$); $5 \mu\text{mol/L}$ 的氯化两面针碱主要引起 Eca109 细胞的早期凋亡 ($P < 0.01$); 10 、 $15 \mu\text{mol/L}$ 的氯化两面针碱主要引起 Eca109 细胞的晚期凋亡 ($P < 0.01$), 且 $10 \mu\text{mol/L}$ 氯化两面针碱组细胞早期凋亡率与对照组相比差异也非常显著 ($P < 0.01$)。

3.3 对 Eca109 细胞凋亡相关基因 mRNA 表达的影响

结果见图 3。与对照组相比, 经氯化两面针碱干预后的 Eca109 细胞中凋亡相关基因 Caspase-3、Caspase-9 和 Noxa 的 mRNA 均有一定程度的上调, 除了 $5 \mu\text{mol/L}$ 氯化两面针碱组外, 与对照组比较, 差异均显著 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.4 对 Eca109 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

由图 4 可见, 与对照组相比, 各实验组的 p53、cleaved Caspase-3 以及 Noxa 蛋白表达均有一定程

表 2 氯化两面针碱对 Eca109 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 2 Apoptotic rates of Eca109 cells induced by NC ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	$\rho/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	早期凋亡率/%	晚期凋亡率/%	总凋亡率/%
对照	—	1.00 ± 0.46	0.30 ± 0.20	1.30 ± 0.61
氯化两面针碱	5.0	$20.47 \pm 2.06^{**}$	1.33 ± 1.10	$21.80 \pm 2.17^{**}$
	10.0	$6.27 \pm 0.40^{**}$	$21.43 \pm 1.70^{**}$	$27.70 \pm 1.51^{**}$
	15.0	3.70 ± 2.26	$58.23 \pm 3.01^{**}$	$61.93 \pm 3.75^{**}$

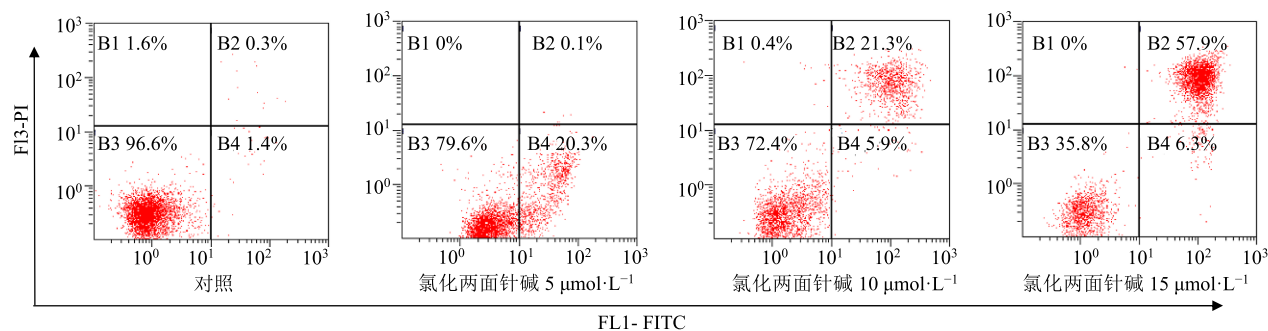
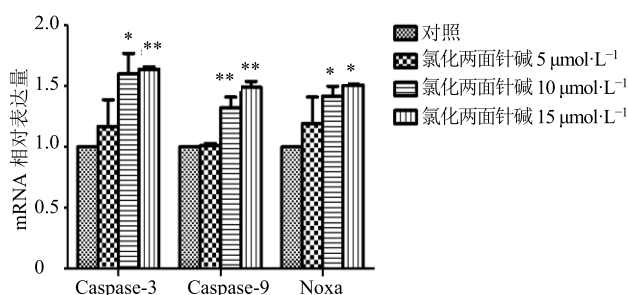
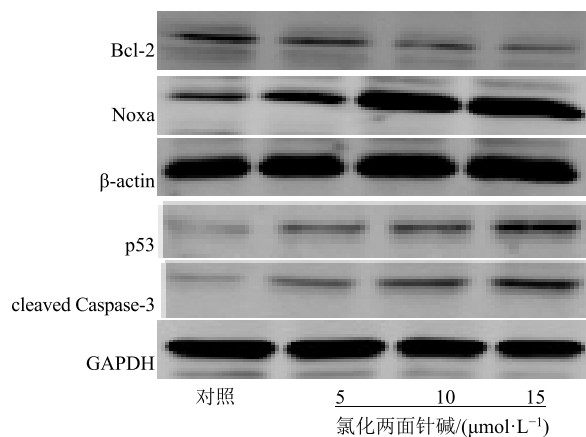


图 2 氯化两面针碱对 Eca109 细胞凋亡的影响

Fig. 2 Flow cytometry results of NC induced apoptosis in Eca109 cells

图 3 氯化两面针碱对 Eca109 细胞 Caspase-3、Caspase-9 和 Noxa mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 3 Effects of NC on mRNA expression of Caspase-3, Caspase-9, and Noxa in Eca109 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)图 4 氯化两面针碱对 Eca109 细胞 Bcl-2、cleaved Caspase-3、p53 和 Noxa 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 4 Effects of NC on expression of Bcl-2, cleaved Caspase 3, p53, and Noxa protein in Eca109 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

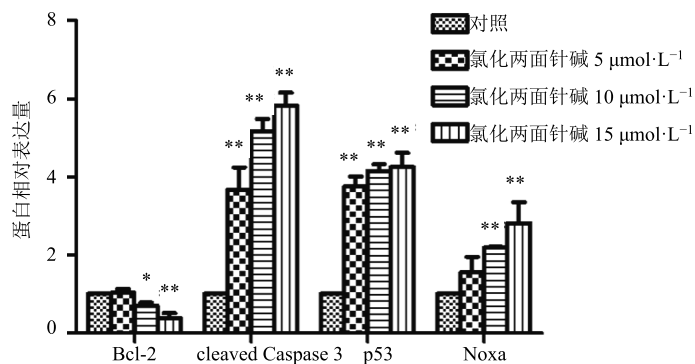
结果显示 5 $\mu\text{mol/L}$ 氯化两面针碱组主要发生早期凋亡, 10、15 $\mu\text{mol/L}$ 氯化两面针碱组主要发生晚期凋亡。

多细胞生物的细胞增殖和死亡平衡使机体处于稳态。而细胞死亡的形式有多种, 包括坏死、凋亡、自噬等等。凋亡是生理条件下机体维持稳态的重要

度上调, 其中 p53 和 cleaved Caspase-3 呈现比较明显的浓度依赖性且差异比较显著 ($P < 0.01$); Noxa 在 10、15 $\mu\text{mol/L}$ 氯化两面针碱组的表达升高比较明显 ($P < 0.01$); Bcl-2 表达在 10、15 $\mu\text{mol/L}$ 氯化两面针碱组随着氯化两面针碱浓度的增加而降低 ($P < 0.05, 0.01$)。

4 讨论

近年来有研究表明, 两面针对多种肿瘤有抑制作用^[2-7]。本研究的结果显示不同浓度的氯化两面针碱对 Eca109 细胞均有增殖抑制作用, 并且抑制作用随着浓度的增加和干预时间的延长而更加明显。Annexin V-FITC/PI 双染法检测 Eca109 细胞凋亡率



机制。肿瘤细胞的无限增殖与凋亡异常密切相关。目前认为凋亡的主要途径为死亡受体途径和线粒体途径, 其他还有 MAPK 通路、内质网通路、p53 通路、NF- κ B 通路等。其中线粒体途径诱导的凋亡与 p53 通路关系紧密, 错综复杂。

据文献报道, 氯化两面针碱抑制结直肠癌细胞、胃

癌 SGC7901 细胞和人骨肉瘤 MG-63 细胞的增殖过程中均有 Caspase-3 和 Caspase-9 mRNA 的表达升高^[5-9], 因此推测氯化两面针碱抑制 Eca109 细胞的增殖也有 Caspase-3 和 Caspase-9 的参与。本研究的 qRT-PCR 的结果显示 10、15 $\mu\text{mol/L}$ 的氯化两面针碱使 Eca109 细胞 Caspase-3、Caspase-9 和 Noxa 的 mRNA 表达明显高于对照组。Caspase-9 在线粒体途径诱导的凋亡中位于 Caspase 级联反应的顶端, 由细胞色素 C 激活^[10]。Noxa 属于 Bcl-2 家族中 BH3 亚家族成员, 在凋亡的发生和发展的过程中起着重要的促进作用。凋亡信号刺激后, p53 可直接结合 Noxa 上游的靶位点, 促进 Noxa 的表达^[11-12]。Noxa 常通过 2 种方式起作用: 一是通过 BH3 结构域与线粒体膜上的抑凋亡蛋白 Bcl-2 或 Bcl-xL 的 BH1、BH2 结合, 使后者对 Bax、Bak 的抑制作用丧失; 二是直接与 Bax、Bak 相互作用, 使其转换构象, 促进线粒体途径的凋亡发生^[13-16]。因此氯化两面针碱所诱导的 Eca109 细胞凋亡或许与线粒体有着密切的关系, 故进一步以 Western blotting 法检测了 Noxa、Bcl-2 和 p53 的表达, 以及 cleaved Caspase-3 的水平。结果显示, 除了 Bcl-2 的表达是随着氯化两面针碱浓度的增加而降低之外, 其余均显著升高。

多种诱导凋亡的药物都可以激活 p53。它在凋亡中起着非常重要的作用, 其结构包括 4 个功能区: DNA 结合区、转录激活区、低聚反应区和基础区。p53 通过转录激活区调节靶基因的表达, 通过低聚反应区和基础区调节与靶蛋白的结合, 产生各种生物学效应^[17]。在诱发凋亡的过程中, p53 与 Bcl-2/Bax 或者 Bcl-xL/Bax 等复合体相互作用, 使促进凋亡的 Bax 等解离出来进而形成寡聚体使线粒体膜通透性增大, 释放促凋亡蛋白, 导致胞浆中的凋亡效应分子活化, 引发凋亡^[16,18]。例如释放出来的细胞色素 C 可以使胞浆中的 Caspase-9 活化而诱发线粒体凋亡途径。

综上所述, 氯化两面针碱对 Eca109 细胞有明显的抑制作用, 并且主要是通过凋亡实现的。这为食管癌的治疗带来了新的希望。本研究表明氯化两面针碱诱导 Eca109 细胞的凋亡与 p53 和 Noxa 的表达升高和 Bcl-2 的下调以及 Caspase-3 的活化有关。本研究为将来氯化两面针碱在食管癌方面的治疗提供了初步依据, 但更详细的调控作用有待进一步阐明。

参考文献

[1] 李国栋. 1 510 例食管癌患者术后生存率及预后影响因

素分析 [D]. 太原: 山西医科大学, 2016.

- [2] 刘丽敏, 刘华钢. 氯化两面针碱的抗肝癌活性及对 DNA 拓扑异构酶的影响 [J]. 中国药理学通报, 2010, 26(4): 497-500.
- [3] 程翔宇. 氯化两面针碱对前列腺癌细胞抑制增殖、侵袭与诱发凋亡的研究 [D]. 济南: 山东大学, 2015.
- [4] 王宏虹, 刘华钢, 黄慧学, 等. 两面针抗宫颈癌谱-效关系研究 [J]. 中药药理与临床, 2011, 27(5): 84-89.
- [5] 申庆荣, 黄慧学, 王宏虹, 等. 两面针提取物抗胃癌谱-效关系研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(19): 2693-2696.
- [6] 徐 强, 李朝旭, 叶招明. 氯化两面针碱对人骨肉瘤细胞的诱导凋亡作用及其机制 [J]. 南方医科大学学报, 2011, 31(2): 361-364.
- [7] 王宏虹, 刘华钢, 黄慧学, 等. 两面针提取物抗肝癌谱-效关系研究 [J]. 中草药, 2014, 45(8): 1102-1109.
- [8] 张婉君, 陈 阳, 张 娜. 氯化两面针碱对胃癌细胞株 SGC7901 凋亡的影响及初步机制 [J]. 世界华人消化杂志, 2017, 25(14): 1248-1254.
- [9] 翟慧渊. 氯化两面针碱对结直肠癌细胞增殖和凋亡作用机制的研究 [D]. 济南: 山东大学, 2016.
- [10] Qi H, Jiang Y, Yin Z, *et al.* Optimal pathways for the assembly of the Apaf-1cytochrome: C complex into apoptosome [J]. *Phys Chem Chem Phys*, 2018, 20(3): 1964-1973.
- [11] Hernandezborrero L J, Zhang S, Lulla A, *et al.* CB002, a novel p53 tumor suppressor pathway-restoring small molecule induces tumor cell death through the pro-apoptotic protein NOXA [J]. *Cell Cycle*, 2018, 17(5): 557-567.
- [12] Furukawa H, Makino T, Yamasaki M, *et al.* PRIMA-1 induces p53-mediated apoptosis by upregulating Noxa in esophageal squamous cell carcinoma with TP53 missense mutation [J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(2): 412-421.
- [13] Zheng J H, Viacava F A, Kriwacki R W, *et al.* Discoveries and controversies in BCL-2 protein-mediated apoptosis [J]. *Febs J*, 2016, 283(14): 2690-2700.
- [14] Gómezfernández J C. Functions of the C-terminal domains of apoptosis-related proteins of the Bcl-2 family [J]. *Chem Phys Lipids*, 2014, 183: 77-90.
- [15] Gillies L A, Kuwana T. Apoptosis regulation at the mitochondrial outer membrane [J]. *J Cell Biochem*, 2014, 115(4): 632-640.
- [16] Peñablanca A, Garcíasáez A J. Bax, Bak and beyond: Mitochondrial performance in apoptosis [J]. *Febs J*, 2018, 285(3): 416-431.
- [17] Uversky V N. p53 Proteoforms and intrinsic disorder: An illustration of the protein structure-function continuum concept [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, doi: 10.3390/ijms17111874.
- [18] Aubrey B J, Kelly G L, Janic A, *et al.* How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? [J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(1): 104-113.