

呼肠孤病毒导致白血病细胞凋亡的分子机制研究*

李晨^{1,2}, 莫晶^{1,2}, 舒莉萍^{1,2}, 吴西军^{1,2}, 许键炜^{1,2}, 杨燕^{1,2}, 何志旭^{2,3,△}

1. 贵州医科大学基础医学院 免疫教研室组织工程与干细胞实验中心(贵阳 550004);
2. 中国医学科学院成体干细胞转化研究重点实验室(贵阳 550004);
3. 遵义医科大学附属医院 儿科学教研室(遵义 563003)

【摘要】 目的 初步探讨溶瘤病毒呼肠孤病毒 3 型(Reovirus 3, Reo3)致白血病 HL60 细胞凋亡的分子机制。
方法 用不同感染复数(MOI)的 Reo3 感染 HL60 细胞, 设未感染的 HL60 细胞为对照组, 病毒感染 48 h 后, 通过 CCK8 法检测不同 MOI 的病毒对 HL60 细胞活性的影响; 利用流式细胞术检测 HL60 细胞凋亡率; Western blot 检测 HL60 细胞中双链 RNA 依赖性蛋白激酶(PKR)活化水平和凋亡相关蛋白表达情况。用 PKR 特异性抑制剂 2-氨基嘌呤(2-AP)作用 HL60 细胞 24 h 后, Reo3 感染 HL60 细胞 48 h, 检测细胞凋亡水平和凋亡相关蛋白表达水平。
结果 MOI 为 1 的 Reo3 作用于 HL60 细胞 48 h 后对细胞的抑制作用明显, 细胞存活率为 $(24.333 \pm 3.396)\%$, 细胞凋亡率为 $(29.96 \pm 2.06)\%$, 与对照组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。Western blot 结果显示: 与对照组比较, 感染 Reo3 的 HL60 细胞 PKR、p-PKR、Bax、Caspase3、cleaved Caspase3 蛋白表达均升高 ($P < 0.05$), 而 Bcl-2 蛋白表达水平下降 ($P < 0.05$)。与未加抑制剂组比较, 采用 2-AP 预处理的 HL60 细胞感染 Reo3 后细胞凋亡率下降 ($P < 0.05$), PKR 磷酸化水平和凋亡相关蛋白表达水平亦下降 ($P < 0.05$)。
结论 溶瘤病毒 Reo3 作用 HL60 细胞可以引起 PKR 的活化, 导致 HL60 细胞的凋亡。

【关键词】 呼肠孤病毒 HL60 细胞 细胞凋亡 凋亡相关蛋白 PKR 2-氨基嘌呤

Molecular Mechanisms of Apoptosis of Leukemia Cell Induced by Reovirus LI Chen^{1,2}, MO Jing^{1,2}, SHU Liping^{1,2}, WU Xi-jun^{1,2}, XU Jian-wei^{1,2}, YANG Yan^{1,2}, HE Zhi-xu^{2,3,△}. 1. Tissue Engineering and Stem Cell Research Center, School of Basic Medical Sciences, Guizhou Medicine University, Guiyang 550004, China; 2. Key Laboratory of Adult Stem Cell Translational Research, Chinese Academy of Medical Sciences, Guiyang 550004, China; 3. Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563003, China
△ Corresponding author, E-mail: 1179909832@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the molecular mechanism of apoptosis of HL60 cells induced by oncolytic virus Reovirus type 3 (Reo3). **Methods** HL60 cells were infected with Reo3 at different multiplicity of infection (MOI) with the uninfected HL60 cells as control group. After 48 h of infection, the activity of HL60 cells infected with virus at different MOI was detected by CCK8 method to investigate the influence of MOI to cell activity. Simultaneously, the apoptotic rate of HL60 cells was detected by flow cytometry, and the activation level of double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) and the expression of apoptotic-related protein in HL60 cells were detected by Western blot. Before infection with Reo3 for 48 h, HL60 cells were treated with 2-aminopurine (2-AP), a specific inhibitor of PKR, for 24 h. Afterward, the apoptotic level and expression of apoptotic related proteins were detected. **Results** Activity of HL60 cells was obviously inhibited after infected with Reo3 with a MOI of 1 for 48 h. The cell survival rate was $(24.333 \pm 3.396)\%$ and the apoptotic rate was $(29.96 \pm 2.06)\%$. Both rates were all higher than those in the control group ($P < 0.05$). Western blot results showed that the expression levels of PKR, p-PKR, Bax, Caspase3 and cleaved Caspase3 in HL60 cells infected with Reo3 were higher than those in the control group ($P < 0.05$), while the expression level of Bcl-2 was lower ($P < 0.05$). Compared with the group without inhibitor, the apoptotic rate of HL60 cells pretreated with 2-AP decreased ($P < 0.05$), the phosphorylation level of PKR and the expression level of apoptotic-related protein also decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Oncolytic virus Reo3 could activate PKR in HL60 cells and thus induce apoptosis of HL60 cells.

【Key words】 Reovirus HL60 cells Apoptosis Apoptosis-related proteins PKR 2-aminopurine

* 国家自然科学基金(No. 81871313)、贵州省科学技术厅(No. 黔科合 J 重大字[2015]2003、No. 黔教合 KY 字[2018]192)和贵阳市人民政府-贵州医科大学联合基金项目(No. 筑科合同[2017]5-10)资助

△ 通信作者, E-mail: 1179909832@qq.com

急性髓细胞白血病(AML)是一种起源于骨髓多能造血干细胞的恶性克隆性肿瘤,以髓系细胞过度增殖为特征,预后差。全球发病率为(1.0~2.0)/10 万^[1],我国发病率占成人新诊断白血病的 60%以上。目前全反式维甲酸等联合化疗是早幼粒白血病的主要治疗方法。随着临床应用的增加,不仅耐药问题越来越严重,而且抑制骨髓等副作用阻碍了疗效,所以需要找到一种新的疗法以解决现存问题,从而达到急性早幼粒患者长期生存的目的。

溶瘤病毒(Oncolytic virus,OVs)是一种具有肿瘤杀伤作用且使正常细胞相对不受伤害的病毒。许多实验证实 OV 在刺激宿主抗肿瘤免疫的溶瘤病毒联合免疫疗法的总体效率中有重要贡献^[2-3]。呼肠孤病毒作为一种天然存在的溶瘤病毒,在治疗黑色素瘤、胶质瘤、卵巢癌、乳腺癌、结肠癌等多种人类癌症疾病中已有临床疗效^[4-9]。GUERRA 等^[10]利用人类 cDNA 芯片技术鉴定呼肠孤病毒感染细胞中相关基因的表达情况,受双链 RNA 依赖性蛋白激酶(PKR)影响的 111 个基因中,97 个基因被上调,14 个基因被下调,激活的 PKR 参与细胞凋亡。当细胞被病毒感染或其他外界刺激时,PKR 形成二聚体,导致 PKR 自磷酸化被激活。激活的 PKR 抑制细胞增殖、通过凋亡损毁细胞。另外,PKR 还能促进肿瘤坏死因子受体家族的表达,包括 Fas(CD95/Apo-1)和凋亡蛋白 Bax。因此,PKR 是宿主防御机制中启动细胞死亡、抗病毒感染和肿瘤发生的关键环节。本研究通过呼肠孤病毒 3 型(Reovirus 3,Reo3)与 HL60 细胞体外共培养实验,初步探讨 Reo3 通过激活 PKR 对 HL60 细胞凋亡的影响及其机制,为早幼粒白血病甚至其他肿瘤治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

HL60 细胞购于美国 ATCC 公司;L929 细胞购于南京凯基公司。Reo3 型病毒株购自 ATCC 公司。RPMI1640 培养基、100 U/mL 青-链霉素、FBS 购自 Gibco 公司;Anti-PKR、Ati-PKR(phospho T446)、Anti-Bax、Anti-Caspase3、Anti-active Caspase3、Anti-Bcl-2 购自 Abcam 公司;CCK8 试剂盒购自 Promega 公司。

1.2 方法

1.2.1 HL60 细胞培养和传代扩增 取生长对数期的 HL60 细胞,并进行活细胞计数。取培养瓶,向

其中加入适量的含有 10%FBS 的 RPMI1640 细胞培养基,再将上述细胞悬液加入其中,置于 37℃、50 mL/L CO₂ 恒温培养箱中培养。

1.2.2 Reo3 病毒的大量扩增 复苏 L929 细胞于 T75 培养瓶中,待细胞贴壁融合至 90%以上,用无菌 PBS 洗涤培养基两次,加入 0.5~1 mL Reo3 病毒原液,吸附 120 min,再补足含 2%FBS 的维持培养基,置于细胞培养箱中培养。待细胞全部病变后(约 2~3 d),反复冻融(先置于一 80℃冰箱再置于 4℃冰箱)直到细胞完全破坏,收集培养瓶中液体,离心 20 min 然后收集上清。上清液用 0.2 μm 滤器过滤,收集滤液即为病毒。

1.2.3 CCK-8 检测 Reo3 病毒对 HL60 细胞的抑制能力 取对数期的 HL60 细胞,进行细胞计数;取一块 96 孔板,在其中 20 孔加入经过上一步细胞计数的 HL60 单细胞悬液,使 HL60 细胞数目达 1×10⁴/孔,每孔加入含 2%FBS 的 RPMI1640 培养基至总体积为 150 μL,再向每孔中分别加入感染复数(MOI)为 0.1、0.5、1、2 的 Reo3 病毒,每个 MOI 设置 3 个复孔,未用 Reo3 病毒感染的 HL60 细胞作为对照组;将 96 孔板置于细胞培养箱中培养 48 h 后取出 HL60 细胞,分别在显微镜下观察细胞形态,再每孔加入 CCK-8 试剂 10 μL/mL,细胞培养箱中培养 3 h 后用酶标仪在 450 nm 波长下检测吸光度(A)值后计算细胞相对存活率。相对细胞存活率(%)=加病毒组 A₄₅₀/对照组 A₄₅₀×100%。实验重复 3 次。

1.2.4 流式细胞术检测 HL60 细胞凋亡 实验分组:①空白对照组:HL60 细胞;②Reo3 组:用 Reo3(MOI=1)感染 HL60 细胞 48 h。利用 PBS 清洗两遍后,加入 400 μL 1×Binding 缓冲液轻轻重悬细胞,加入 5 μL Annexin V-FITC,轻轻混匀,室温避光孵育 15 min;加入 PI 染色液,轻轻混匀,冰浴 5 min,30 min 内利用流式细胞仪检测各组 HL60 细胞凋亡情况。实验重复 3 次。

1.2.5 Western blot 检测凋亡相关蛋白 实验分组同 1.2.4。收集各组 HL60 细胞,1 000 r/min 离心 5 min,1 mL 冷 PBS 重悬计数;再次离心后用冷 PBS 洗涤沉淀 2 次;按 1×10⁷细胞/1 mL 的比例加细胞裂解液,混匀后冰浴 30 min。4℃、12 000×g 离心 30 min;取上清,应用 BCA 法进行蛋白浓度测定。样本煮沸后,在 SDS-PAGE 中进行电泳,电泳后转膜,用封闭液封闭 60 min,分别加入一抗 4℃孵育过夜,第 2 天 1×TBST 洗膜 3 次,室温下用二

抗孵育 60 min,1×TBST 洗膜 3 次,加 ECL 显影、定影后拍照,使用 Bio-Rad 凝胶化学发光成像系统成像,实验重复 3 次。结果利用 Image Lab 分析,将总蛋白作为内参蛋白,目的条带与总蛋白条带灰度值的比值为目的蛋白的相对表达量,以空白对照组的蛋白相对表达量为 1。

1.2.6 Reo3 对 2-AP 预处理 HL60 细胞凋亡和凋亡相关蛋白表达的影响 实验分组:①空白对照组:HL60 细胞;②Reo3 对照组:用 Reo3(MOI=1)感染 HL60 细胞 48 h;③实验组:5 mmol/L 2-AP 预处理 HL60 细胞 24 h 后,再用 Reo3(MOI=1)感染 HL60 细胞 48 h。再重复 1.2.4 和 1.2.5 实验 3 次。

1.2.7 统计学方法 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用独立样本 *t* 检验, $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 Reo3 病毒液的大量扩增

没有感染 Reo3 的 L929 细胞生长状态良好,细胞呈鹅卵石状,细胞的折光性、通透性均较好,显微镜下漂浮的细胞较少(图 1A)。感染 Reo3 后的 L929 细胞 72 h 内大量死亡,镜下见大量漂浮死细胞及细胞碎片(图 1B)。与未感染 L929 细胞相比,L929 细胞在感染 Reo3 后,Reo3 可在细胞内大量复制包装后释放,以致 L929 细胞短期内大量死亡,说明目前 Reo3 病毒液毒力较强。

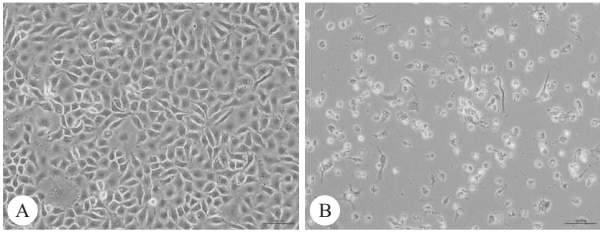


图 1 感染 Reo3 前(A)、后(B)L929 细胞的形态。倒置显微镜 × 100

Fig 1 Morphology of L929 cells before (A) and after (B) Reo3 infection. Inverted microscope ×100

2.2 CCK-8 法检测 Reo3 病毒对 HL60 细胞的抑制能力

由图 2 可见,对照组的 HL60 细胞在镜下细胞状态良好,HL60 细胞与 Reo3 病毒共培养 48 h,镜下细胞碎片增多,细胞皱缩、细胞膜有小泡的细胞数增多(图 2);随着 MOI 的增加,HL60 细胞的存活率呈下降趋势(图 3),MOI=1 与 MOI=0.1 和 0.5 相

比,对 HL60 细胞的抑制作用更加明显,而 MOI=1 与 MOI=2 对 HL60 细胞的抑制作用相近,最后选择 MOI=1 作为实验浓度。

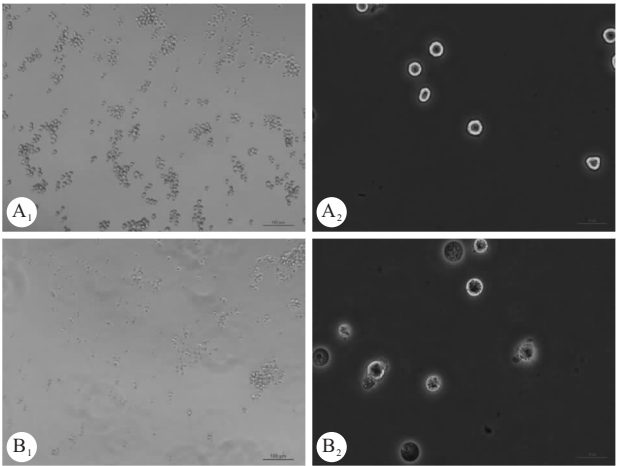


图 2 感染 Reo3 前(A)、后(B)HL60 细胞的形态(1 ×100,2 ×400)

Fig 2 Morphology of HL60 cells before (A) and after (B) Reo3 infection (1 ×100,2 ×400)

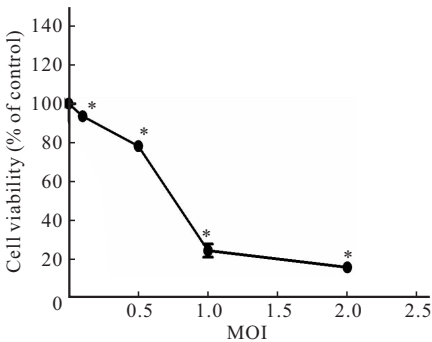


图 3 感染 Reo3 48 h 后 HL60 细胞的存活率曲线

Fig 3 Survival curve of HL60 cells after Reo3 infection

* $P<0.001$, vs. control group (MOI=0)

2.3 Reo3 对 HL60 细胞凋亡的影响和凋亡相关蛋白的表达情况

流式细胞术结果显示(图 4A),Reo3 感染 HL60 细胞 48 h 后细胞凋亡率增加,高于空白对照组($29.96\% \pm 2.06\%$ vs. $2.28\% \pm 0.23\%$, $P<0.01$)。Western blot 结果显示(图 4B),与空白对照组相比,Reo3 组的 PKR 和 Caspase3 表达升高($P<0.05$),p-PKR、Bax、cleaved Caspase3 蛋白表达均升高($P<0.01$),而 Bcl-2 蛋白表达水平降低($P<0.01$)。

2.4 2-AP 预处理对 Reo3 感染的 HL60 细胞凋亡和凋亡相关蛋白表达的影响

流式细胞术结果显示(图 5A),Reo3 感染 2-AP 预处理后的 HL60 细胞 48 h 的凋亡率为($6.58\% \pm$

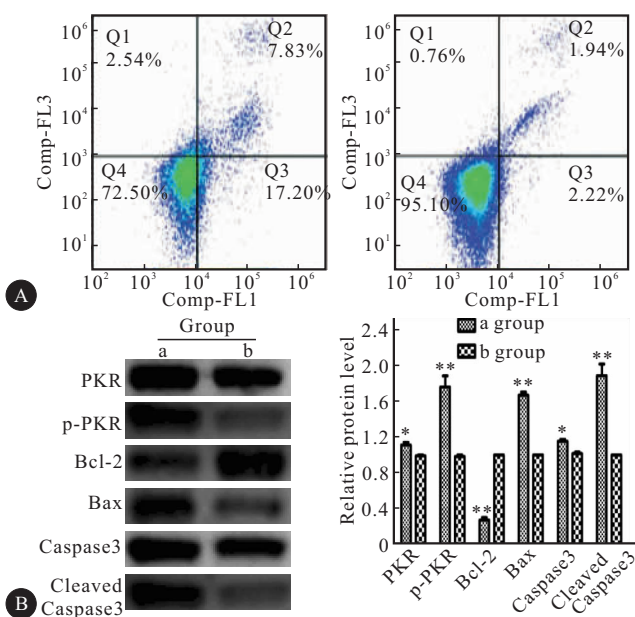


图 4 感染 Reo3 后 HL60 细胞的凋亡水平(A)和凋亡相关蛋白表达情况(B)

Fig 4 Apoptotic level (A) and expression of apoptotic related proteins (B) in HL60 cells infected with Reo3

a group: Reo3 group; b group: Control group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. b group

0.61%), 低于 Reo3 对照组 ($28.73\% \pm 2.77\%$), 但仍高于空白对照组 ($2.26\% \pm 0.33\%$), P 均 < 0.05 。Western blot 结果显示(图 5B), 实验组与 Reo3 对照组比较, PKR 的活化减少 ($P < 0.05$), 抗凋亡蛋

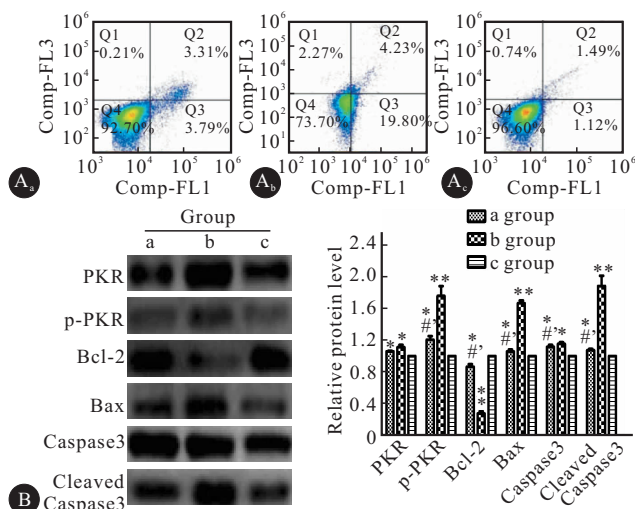


图 5 Reo3 感染用 2-AP 预处理后的 HL60 细胞的凋亡水平(A)和凋亡相关蛋白表达情况(B)

Fig 5 Apoptotic level (A) and expression of apoptotic-related proteins (B) in HL60 cells infected with Reo3 after 2-AP treatment

a group: Trial group; b group: Reo3 control group; c group: Control group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. c group; # $P < 0.05$, vs. b group

白 Bcl-2 表达水平升高, 促凋亡蛋白 Bax 表达水平下降, 下游的凋亡执行蛋白 Caspase3 及其活化也下降 (P 均 < 0.05); 与对照组比较, 实验组上述各指标的表达水平差异仍有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

虽然在 AML 治疗上反式维甲酸等药物取得了一定的成功, 但随着使用频率的增加, 耐药、对骨髓和自身免疫力抑制作用等问题, 影响总体存活率, 因而亟需寻找解决以上问题的方法。本世纪初, 大量病毒已经被列入抗肿瘤研究中, 尤其是溶瘤病毒。溶瘤病毒是可以感染肿瘤细胞并致其死亡而对正常组织没有影响或者影响极小的非致病性病毒颗粒^[11], 且具有自我复制的能力和肿瘤靶向性, 其复制依赖宿主细胞, 有效的溶瘤特性得益于溶瘤病毒在肿瘤细胞内自我复制并增加其病毒数量, 同时对肿瘤的靶向性可以提高病毒的毒力作用^[12], 除此之外, 还可以使肿瘤细胞暴露肿瘤相关抗原, 从而引起机体内有效的抗肿瘤免疫反应^[13-15]。加拿大 Oncolytics 生物技术公司开发了 Reo3 型病毒株作为专利产品, 本研究用其进行相关实验。

本实验中, Reo3 与 HL60 细胞进行共培养, 48 h 后发现 HL60 细胞的存活率下降明显, 说明 Reo3 确实有抑制 HL60 细胞生长的作用。有研究发现细胞感染病毒以后, 激活细胞 PKR, 使得细胞自身以及病毒的转录翻译过程停滞, 进而引起细胞自身的凋亡^[16]。本实验利用流式细胞术检测共培养体系中 HL60 细胞凋亡水平, 结果表明 Reo3 组 HL60 细胞凋亡水平与空白对照组相比明显增高, 说明 Reo3 的确可以引起细胞的凋亡。当病毒进入细胞内, 引起 PKR 自身磷酸化, 从而激活 PKR^[17]。PKR 能诱导凋亡前蛋白 Bax 的表达, 抑制凋亡抑制蛋白 Bcl-2 的表达, Bax 和 Bcl-2 表达失衡, 导致线粒体的通透性发生改变, 促进细胞色素 C 释放, 两个辅助因子(细胞色素 C 和 Apaf-1)共同形成凋亡复合体激活 Caspase9, 之后活化的 Caspase9 可以通过激活 Caspase3 促使随后的一系列凋亡相关效应发生^[18]。据研究报道, Reo 能引起细胞凋亡的发生^[19], 本实验利用 Western blot 检测感染 Reo3 后 HL60 细胞 PKR 的活化水平以及凋亡相关蛋白的表达情况, 发现 PKR 磷酸化水平明显增高, Bcl-2 蛋白表达降低, Bax 蛋白表达增高, 从而促进下游 Caspase3 蛋白的活化, 说明 Reo3 可通过活化 PKR 进而诱导促凋亡蛋白表达引起细胞凋亡。为了进一步证实 Reo3 引起 HL60 细胞凋亡的机制,

本实验使用 PKR 特异性抑制剂 2-AP, 利用浓度为 5 mmol/L 的 2-AP 预处理 HL60 细胞 24 h, 流式细胞术检测 HL60 凋亡水平以及 Western blot 法检测凋亡相关蛋白, 发现用 2-AP 预处理后细胞凋亡水平明显下降, p-PKR、Bax 以及 cleaved Caspase3 的表达明显下降, Bcl-2 蛋白表达增高, 结果证实 Reo3 确实具有通过激活 PKR 促进 HL60 细胞凋亡的作用。

综上, 本研究首次利用 Reo3 直接作用于早幼粒白血病 HL60 细胞系, 初步验证了 Reo3 可以抑制 HL60 细胞的增殖, 通过激活 PKR 引起细胞的凋亡来发挥抗癌作用, 为急性早幼粒白血病的治疗上提供了理论依据。但就本实验而言, 仅是体外实验的初步发现, 还有待体内(动物)实验进一步验证。

参 考 文 献

- [1] ALIKIAN M, GALE R P, APPERLEY J F, *et al.* Molecular techniques for the personalised management of patients with chronic myeloid leukaemia. *Biomol Detect Quantif*, 2017, 11: 4-20 [2018-12-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5348117/>. doi: 10.1016/j.bdq.2017.01.001.
- [2] CHAIKOF M, GANDHI S, SOBEL M. Anémie gravidique se manifestant par une glossite aiguë. *J Obstet Gynaecol Can*, 2019, 41(4): 406 [2018-12-20]. <https://doi.org/10.1016/j.jogc.2018.01.034>.
- [3] SAHA D, MARTUZA R L, RABKIN S D. Oncolytic herpes simplex virus immunovirotherapy in combination with immune checkpoint blockade to treat glioblastoma. *Immunotherapy*, 2018, 10(9): 779-786.
- [4] TWIGGER K, ROULSTONE V, KYULA J, *et al.* Reovirus exerts potent oncolytic effects in head and neck cancer cell lines that are independent of signalling in the EGFR pathway. *BMC Cancer*, 2012, 12: 368 [2018-12-20]. <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-12-368>. doi: 10.1186/1471-2407-12-368.
- [5] DONNELLY O G, ERRINGTON-MAIS F, PRESTWICH R, *et al.* Recent clinical experience with oncolytic viruses. *Curr Pharm Biotechnol*, 2012, 13(9): 1834-1841.
- [6] ALLOUSSI S H, ALKASSAR M, URBSCAT S, *et al.* All reovirus subtypes show oncolytic potential in primary cells of human high-grade glioma. *Oncol Rep*, 2011, 26(3): 645-649.
- [7] DAUTZENBERG I J C, VAN DEN HENGEL S K, DE VRIJ J, *et al.* Baculovirus-assisted reovirus infection in monolayer and spheroid cultures of glioma cells. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 17654.
- [8] INAGAKI Y, KUBOTA E, MORI Y, *et al.* Anti-tumor efficacy of oncolytic reovirus against gastrointestinal stromal tumor cells. *Oncotarget*, 2017, 8(70): 115632-115646.
- [9] MOSTAFA A A, MEYERS D E, THIRUKKUMARAN C M, *et al.* Oncolytic reovirus and immune checkpoint inhibition as a novel immunotherapeutic strategy for breast cancer. *Cancers (Basel)*, 2018, 10(6). pii: E205 [2018-12-20]. <https://doi.org/10.3390/cancers10060205>.
- [10] GUERRA S, LÓPEZ-FERNÁNDEZ L A, GARCÍA M A, *et al.* Human gene profiling in response to the active protein kinase, interferon-induced serine/threonine protein kinase (PKR), in infected cells. Involvement of the transcription factor ATF-3 IN PKR-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 2006, 281(27): 18734-18745.
- [11] NAOUM G E, TAWADROS F, FAROOQI A A, *et al.* Role of nanotechnology and gene delivery systems in TRAIL-based therapies. *Ecancermedicalscience*, 2016, 10: 660 [2018-12-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4990059/>. doi: 10.3332/ecancer.2016.660.
- [12] LI S, OU M, WANG G, *et al.* Application of conditionally replicating adenoviruses in tumor early diagnosis technology, gene-radiation therapy and chemotherapy. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(19): 8325-8335.
- [13] CAMPADELLI-FIUME G, PETROVIC B, LEONI V, *et al.* Retargeting strategies for oncolytic herpes simplex viruses. *Viruses*, 2016, 8(3): 63 [2018-12-20]. <https://doi.org/10.3390/v8030063>.
- [14] NAMBA H, KAWAJI H, YAMASAKI T. Use of genetically engineered stem cells for glioma therapy. *Oncol Lett*, 2016, 11(1): 9-15.
- [15] KACZOROWSKI A, HAMMER K, LIU L, *et al.* Delivery of improved oncolytic adenoviruses by mesenchymal stromal cells for elimination of tumorigenic pancreatic cancer cells. *Oncotarget*, 2016, 7(8): 9046-9059.
- [16] GAL-BEN-ARI S, BARRERA I, EHRLICH M, *et al.* PKR: a kinase to remember. *Front Mol Neurosci*, 2019, 11: 480 [2018-12-20]. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00480>.
- [17] DEY M, MANN B R, ANSHU A, *et al.* Activation of protein kinase PKR requires dimerization-induced cis-phosphorylation within the activation loop. *J Biol Chem*, 2014, 289(9): 5747-5757.
- [18] XU C, GAMIL A A A, MUNANG'ANDU H M, *et al.* Apoptosis induction by dsRNA-dependent protein kinase R (PKR) in EPC cells via Caspase 8 and 9 pathways. *Viruses*, 2018, 10(10). pii: E526 [2018-12-20]. <https://doi.org/10.3390/v10100526>.
- [19] BROWN J J, SHORT S P, STENCEL-BAERENWALD J, *et al.* Reovirus-induced apoptosis in the intestine limits establishment of enteric infection. *J Virol*, 2018, 92(10). pii: e02062-17 [2018-12-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5923068/>. doi: 10.1128/JVI.02062-17.

(2019-03-01 收稿, 2019-06-30 修回)

编辑 余琳