

# 人重组 Fas 配体体外诱导细胞周期特异性 凋亡模型的建立及其意义

何小军 胡 静 李小兰 肖 徽 陶德定 龙浩成 胡俊波 龚建平\*

(华中科技大学同济医学院附属同济医院肿瘤研究所 / 分子医学中心, 武汉 430030)

**摘要** 以 Molt-4、Jurkat 细胞株和外周血淋巴细胞(peripheral blood lymphocyte, PBL)为靶细胞, 检测细胞膜上 Fas 的表达。人重组 Fas 配体(recombinant human Fas ligand, rhFasL)诱导细胞 6~36 h 后用改良后的 API 等方法检测细胞凋亡及诱导凋亡过程中细胞周期蛋白的变化, 探讨 Fas 介导的细胞凋亡与细胞周期的关系。结果显示: rhFasL 诱导 Molt-4、Jurkat 细胞株和植物血凝素刺激进入细胞周期的 PBL 的凋亡具有细胞周期特异性并始动于 G<sub>1</sub> 期; 而 G<sub>0</sub> 期 PBL 的细胞膜上虽然也有 Fas 的表达, 但不能诱导细胞凋亡。研究还发现 rhFasL 诱导细胞凋亡时 G<sub>1</sub> 期的细胞周期蛋白 D3 明显升高, 细胞周期蛋白 E 明显下降。以上结果表明 rhFasL 体外诱导的细胞凋亡发生在晚 G<sub>1</sub> 期, 细胞凋亡的发生与细胞是否通过限制点进入细胞周期有关, 细胞凋亡发生于晚 G<sub>1</sub> 期是 G<sub>1</sub> 期细胞周期蛋白 E 的下降和检测点的监督导致 DNA 受损的细胞不能通过 G<sub>1</sub>/S 交界的结果。

**关键词** 人重组 Fas 配体; 细胞周期; 细胞凋亡模型; 体外; 流式细胞术

细胞凋亡的发生和细胞周期的运行是细胞事件中的两个截然相反的结果, 同时细胞凋亡的发生过程也是细胞周期运行过程周期检测点对细胞损伤或阻滞不能修复而导致的结果, 换句话说, 细胞凋亡与细胞周期事件有着密切的关联<sup>[1,2]</sup>。为了明确细胞周期的运行和细胞凋亡的关系, 建立稳定的凋亡模型至关重要。而 Fas 介导的细胞凋亡在肿瘤形成、移植物的排斥反应、自身免疫性疾病、神经系统退化性疾病的发生发展中起着重要作用, 如何通过调控细胞周期运行来影响细胞凋亡以达到防治疾病有着重要意义。故而本实验针对 Fas 介导的细胞凋亡模型进行研究, 为阐明细胞凋亡与细胞周期运行的关联性提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞株及主要试剂

白血病细胞株 Molt-4(急性淋巴母细胞白血病)和 Jurkat(急性 T 细胞白血病)购自武汉大学典型物保藏中心, 外周血淋巴细胞(peripheral blood lymphocyte, PBL)取自健康志愿者。异硫氰酸荧光素(FITC)标记的膜联蛋白 V(annexin V)、植物血凝素(phytohemagglutinin, PHA)购自晶美公司, 人重组 Fas 配体(recombinant human Fas ligand, rhFasL)购自 Sigma 公司,

淋巴细胞分离液购自中国医学科学院血液学研究所。鼠抗人细胞周期蛋白 D3、E、A、B1 单克隆抗体和同型特异性抗体 IgG、FITC 标记的兔抗鼠 Ig 抗体、1% 不含甲醇的甲醛购自 PharMingen 公司。FITC 标记的 IgG 型抗 Fas 抗体购自 BD 公司。

### 1.2 细胞培养

Molt-4 和 Jurkat 细胞在含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、0.1 g/ml 链霉素以及 2 mmol/L 谷氨酰胺的 RPMI-1640 培养基中, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下的恒温箱中培养至对数生长期 [(3~5) × 10<sup>5</sup> 个/ml]。外周血加入淋巴细胞分离液后通过密度梯度离心(2 000 r/min, 20 min)分离, 取 PBL 重悬于 RPMI-1640 培养基中, 调整细胞浓度为(1~2) × 10<sup>5</sup> 个/ml 共两组 [一组加入 PHA(终浓度 10 μg/ml), 一组不加 PHA], 置于细胞培养箱中培养 24~48 h。

### 1.3 细胞处理

处于对数生长期的白血病细胞株和细胞培养箱中培养了 24~48 h 的外周血淋巴细胞[(1~5) × 10<sup>5</sup> 个/

收稿日期: 2006-05-16 接受日期: 2006-10-18

国家重点基础研究发展规划(973 计划)肿瘤项目(No.2004CB518705, No.2002CB513100-2)、国家自然科学基金(No.30440024, No.30570908)和卫生部临床重点项目“临床肿瘤的细胞周期诊断与分析第三期”资助

\* 通讯作者。Tel: 027-83662696, Fax: 027-83662696, E-mail: jpgong@tjh.tjmu.edu.cn

ml]中分别加入 rhFasL (终浓度为 5 ng/ml)培养后于 6 h、12 h、18 h、24 h、36 h 收获细胞进行处理和检测; 对照组不加 rhFasL。

#### 1.4 细胞凋亡的检测

**1.4.1 传统的膜联蛋白 V/PI 检测法** 细胞离心去上清液, 以预冷(4 °C)的结合缓冲液(binding buffer)洗涤细胞, 调整细胞浓度为  $1 \times 10^6$  个/ml, 取 100  $\mu$ l 细胞加入 5  $\mu$ l FITC 标记的膜联蛋白 V 和 10  $\mu$ l 碘化丙啶(propidium iodide, PI, 试剂盒配备不含任何破膜剂), 室温避光温育 15 min 后流式细胞仪检测。

**1.4.2 改良后的 API 检测法** 细胞离心去上清液, 以预冷(4 °C)的结合缓冲液洗涤细胞, 调整细胞浓度为  $1 \times 10^6$  个/ml, 取 100  $\mu$ l 细胞加入 5  $\mu$ l FITC 标记的膜联蛋白 V 后, 室温避光 30 min, 结合缓冲液洗涤 2 次, 加入 1 ml 1% 不含甲醇的甲醛, 冰上固定 30 min 后结合缓冲液洗涤 2 次, 加入 0.5 ml PI 染液 (50  $\mu$ g/ml PI, 500  $\mu$ g/ml 洋地黄皂苷, 10 mmol/L PIPES, 2 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 0.1 mol/L NaCl, 本实验室原创配制, 洋地黄皂苷为温和的破膜剂)和 10  $\mu$ l 5  $\mu$ g/ml 50 $\times$ 核糖核酸酶(RNase), 室温避光温育 1 h 后流式细胞仪检测<sup>[31]</sup>。

**1.4.3 亚 G<sub>1</sub> 峰值法** 细胞用 80% 乙醇固定, 并于 -20 °C 冰箱放置 24~48 h; PBS 洗涤, 将样本细胞数调至约(2~8) $\times 10^5$  个/ml; 洗涤后加入由 0.05 mol/L 磷酸钠(9 份)和 25 mmol/L 枸橼酸(1 份)组成的 50  $\mu$ l PC 缓冲液(pH 7.8), 室温下放置 15 min; 加 500  $\mu$ l PBS, 10  $\mu$ l 10 $\times$  PI(含破膜剂 Triton X-100)和 10  $\mu$ l 5  $\mu$ g/ml 50 $\times$  RNase 于室温下避光温育 30 min 后流式细胞仪检测。

#### 1.5 检测 Fas 在 Molt-4、Jurkat 细胞和 PBL 中的表达

取培养的细胞离心去除细胞培养基, PBS 洗涤后重新悬浮于 PBS 中(细胞浓度  $1 \times 10^6$  个/ml), 取 50  $\mu$ l 细胞悬液加入 0.5  $\mu$ l FITC 标记的 IgG 型抗 Fas 抗体(对照组用 PBS 温育), 4 °C 避光反应 1 h, PBS 洗涤、离心、弃上清液两次, 用 500  $\mu$ l PBS 悬浮细胞, 避光反应 1 h 后流式细胞仪检测。

#### 1.6 细胞周期蛋白的检测

获取的细胞经 PBS 洗涤后用 80% 的冰乙醇(-20 °C)固定(用作细胞周期蛋白 E, A, B1 和同型对照分析)或者用 1% 不含甲醇的甲醛固定 15 min, 再用 PBS 洗涤、离心后 80% 的冰乙醇(-20 °C)固定(用作细胞周期蛋白 D3 分析)24~48 h。将固定后的细胞悬液分装于各试管中并予以标记, 用 PBS 洗涤 2 次, 用含 0.25% Triton X-100 的 PBS 溶液处理 5 min, 加 5 ml 的 PBS 溶液洗涤、离心、去上清液吸干后, 分别加入用 1% BSA 稀释的鼠抗人细胞周期蛋白 D3、E、A 和 B1 单克隆抗体和同型特异性抗体 IgG(抗体用 1% BSA 以 1:100 稀释), 4 °C 温育过夜。次日, 将温育过的细胞用 1% BSA 洗涤、离心、去上清液吸干后加入标有 FITC 的兔抗鼠 Ig 抗体(抗体用 1% BSA 按 1:20 稀释), 室温下避光温育 30 min 后用 1% BSA 洗涤、离心、去上清液, 加入含 10 mg/ml PI 和 0.1% RNase PBS 溶液, 室温下避光放置 20 min, 留待流式细胞仪检测。

#### 1.7 流式细胞仪分析

经荧光标记后的细胞用 FACSort 流式细胞仪(Becton Dickinson 公司)进行检测, 经 488 nm 激光激发, 被标记细胞发射红色(PI)和 / 或绿色(FITC)荧光, 分别被流式细胞仪的不同透镜接收, 接收的信号经 Cellquest 软件处理并对其所检测的荧光强度进行分析, 获得单 / 双参数图像。

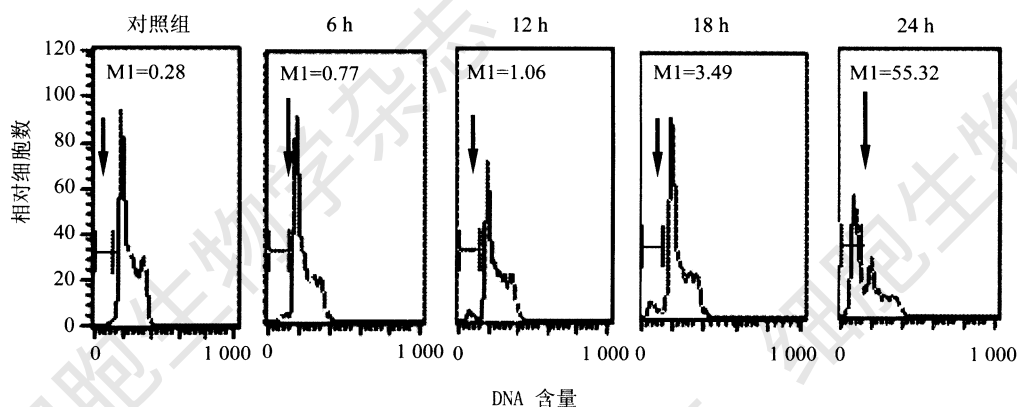


图 1 亚 G<sub>1</sub> 峰法检测的细胞凋亡

M1 表示的是细胞凋亡率(%)。

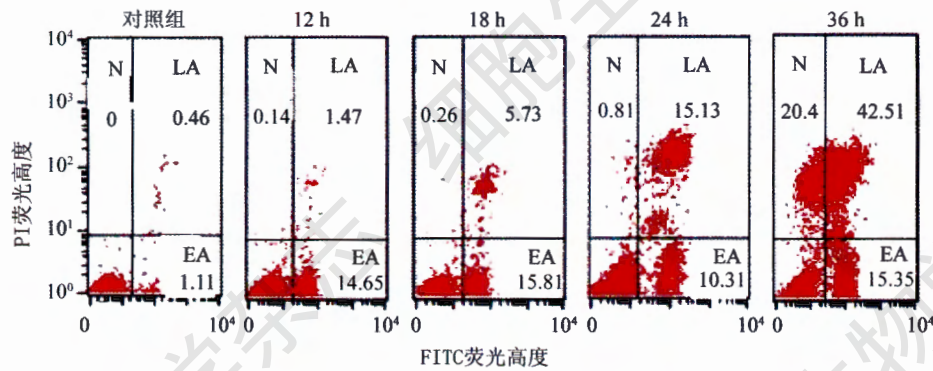


图2 传统的膜联蛋白 V/PI 检测细胞凋亡

N 为坏死细胞率(%)、LA 为晚期细胞凋亡率(%)、EA 为早期细胞凋亡率(%)。

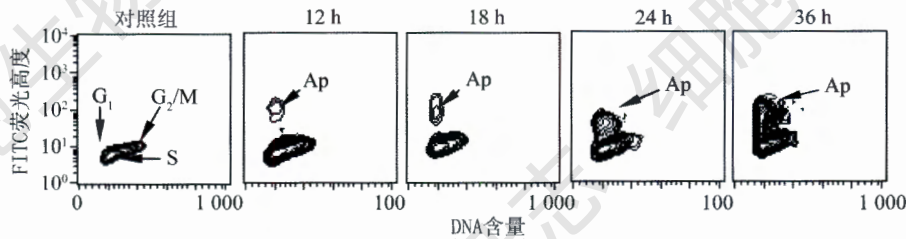


图3 改良后的 API 法检测细胞凋亡

G<sub>1</sub>、S、G<sub>2</sub>/M 表示细胞各周期, Ap 表示细胞凋亡。

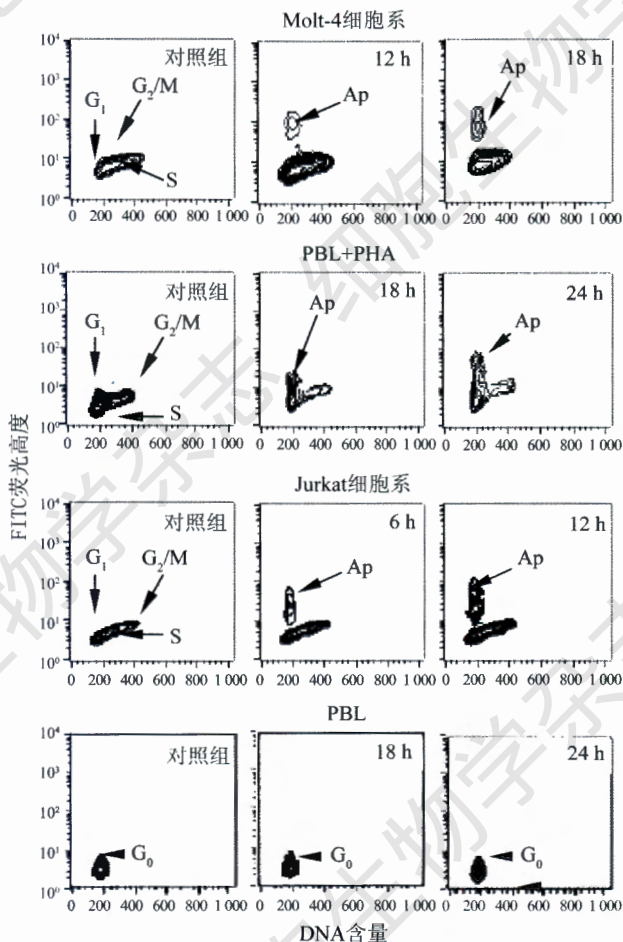


图4 API 法检测确立的典型细胞周期特异性凋亡

G<sub>0</sub>、G<sub>1</sub>、S、G<sub>2</sub>/M 表示各细胞周期; Ap 表示细胞凋亡; PBL、PBL+PHA 分别表示 G<sub>0</sub> 期 PBL 和经 PHA 刺激进入细胞周期的 PBL。

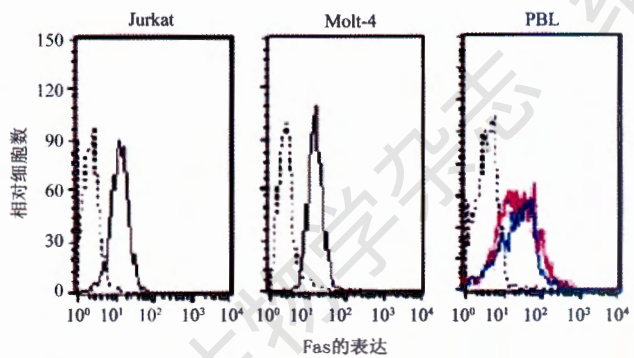


图5 Fas 在 Molt-4、Jurkat 细胞和 PBL 中的表达

图中虚线为对照, 实线为 Fas 的表达直方图; PBL 组中粉红线代表 G<sub>0</sub> 期 PBL, 蓝线代表经 PHA 刺激进入细胞周期的 PBL 的 Fas 表达。

## 2 结果

### 2.1 亚 G<sub>1</sub> 峰法检测细胞凋亡

rhFasL 在分别作用于 Molt-4、Jurkat 细胞株和经 PHA 刺激进入细胞周期的 PBL 24 h、18 h 和 36 h 后才出现典型的反映晚期细胞凋亡的亚 G<sub>1</sub> 峰(又称凋亡峰)(图 1 以 Molt-4 为例说明)。

### 2.2 传统的膜联蛋白 V/PI 检测细胞凋亡结果

rhFasL 诱导 Molt-4、Jurkat 细胞株和经 PHA 刺激进入细胞周期的 PBL 开始出现较为明显的细胞凋亡的时间分别是 12 h、6 h 和 18 h, 而且以早期细胞凋亡为主, 细胞凋亡率约为 10%~20% (图 2 以 Molt-4 为例说明)。

### 2.3 改良后的 API 法检测细胞凋亡

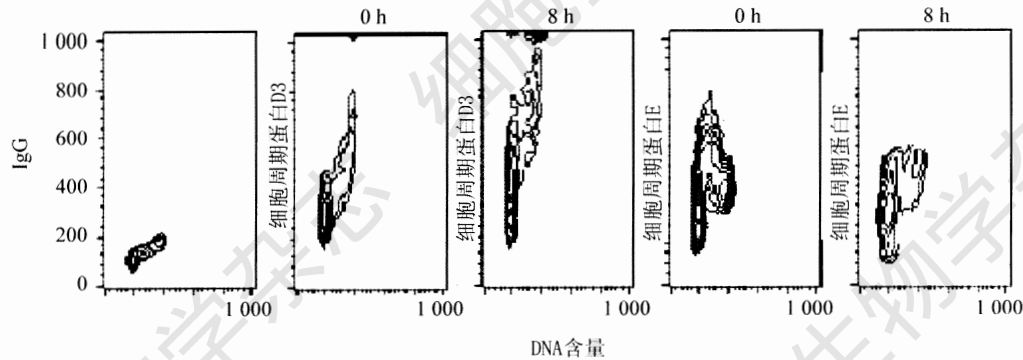


图6 rhFasL 诱导细胞凋亡时细胞周期蛋白表达的变化

rhFasL 诱导 Molt-4、Jurkat 细胞株和经 PHA 刺激进入细胞周期的 PBL 的细胞凋亡始动于  $G_1$  期, 维持这个细胞周期特异性凋亡的最佳时间段分别为 12~18 h、6~12 h 和 18~24 h。如果诱导时间太长, 则可以出现 S 和  $G_2/M$  期的凋亡现象(图 3 以 Molt-4 为例说明)。

#### 2.4 API 法检测确立的典型细胞周期特异性凋亡

结合改良后的 API 法和传统的膜联蛋白 V/PI 法建立的 rhFasL 诱导 Molt-4、Jurkat 细胞株和经 PHA 刺激进入细胞周期的 PBL 的细胞周期特异性凋亡模型。而  $G_0$  期的 PBL 则无明显凋亡发生(图 4)。

#### 2.5 Fas 在 Molt-4、Jurkat 细胞株和 PBL 中的表达

Fas 在 Molt-4、Jurkat、 $G_0$  期 PBL 和经 PHA 刺激进入细胞周期的 PBL 细胞膜上的表达率分别为  $(64.67 \pm 4.18)\%$ 、 $(73.71 \pm 6.36)\%$ 、 $(46.65 \pm 5.17)\%$ 、 $(59.81 \pm 7.58)\%$  (图 5)。

#### 2.6 诱导细胞凋亡时细胞周期蛋白表达的变化

rhFasL 诱导细胞(Jurkat 细胞 4 h、Molt-4 细胞 8 h、PHA 刺激进入细胞周期的 PBL 12 h)后  $G_1$  期的细胞周期蛋白 D3 明显升高, 而细胞周期蛋白 E 则明显下降。S 和  $G_2/M$  期的细胞周期蛋白 A 和细胞周期蛋白 B1 无明显变化(资料未提供)(图 6 以 Molt-4 为例说明)。

### 3 讨论

自发现细胞凋亡以来, 细胞凋亡的研究已然成为生物学科学研究中的一个重要的研究热点。Fas 介导的细胞凋亡是诱导凋亡发生的主要途径之一, 它通过 Fas 与其相应的配体 FasL 结合后, 通过级联反应激活一系列的 caspase, 最终导致细胞凋亡。在此过程中, 细胞周期运行中的主要物质事件如细胞周期

蛋白、细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)、CDK 抑制剂(CDK inhibitor, CKI)等均被证明参与并影响细胞凋亡的发生, 很多调节细胞周期运行的基因如 c-myc、p53、bcl-2 也调节着凋亡的发生。这些研究都有力地证明了 Fas 介导的细胞凋亡与细胞周期事件密切相关<sup>[1,4-6]</sup>。

在过去的几十年研究和探索过程中, 由于技术上的限制——如亚  $G_1$  峰值法只能检测出晚期细胞凋亡而导致结果容易失真, 传统的膜联蛋白 V/PI 法只能显示细胞凋亡率, 均不能直观而又准确地显示细胞凋亡与细胞周期的关系。2004 年本实验组建立改良的 API 法将细胞凋亡与细胞周期的检测紧密地结合起来, 从而解决了这一难题。本实验方法的创新之处在于: (1)1% 不含甲醇的甲醛固定后凋亡细胞的 DNA 与甲醛结合使 DNA 片段不会从细胞内渗出, 不影响 DNA 含量的分析; (2)用作用温和的洋地黄皂苷增加细胞膜的通透性但不破坏其完整性, PI 通过细胞膜染色 DNA; (3)结合缓冲溶液和 PI 溶液中钙离子的存在保证了细胞固定和 DNA 染色时膜联蛋白 V 不会和磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)脱离; (3)同时检测细胞的凋亡和 DNA 含量, 膜联蛋白 V/DNA 双参数流式细胞术反映了早期细胞凋亡的细胞周期特异性<sup>[3]</sup>。经过多次摸索, 我们总结出在诱导出稳定的细胞周期特异性凋亡模型时应注意的关键事项: (1) 被诱导细胞的细胞膜上须有 Fas 的表达, Molt-4、Jurkat 细胞系和 PBL 的细胞膜上都有此表达; (2) 针对不同的细胞, Fas 诱导出典型的细胞周期特异性模型的时间段是不同的, 如作用于 Molt-4、Jurkat 细胞系和 PBL 的最佳时间段分别为 12~18 h、6~12 h 和 18~24 h。这种现象可能与细胞的膜受体表达量、细胞的生长活性及细胞特性有关; (3) 严格控制 rhFasL 作用于细胞的时间, 时间太长可能由于过多的死亡细

胞碎片和代谢产物影响细胞的培养环境、DNA 片段从细胞渗出导致 DNA 含量的变化以及细胞凋亡的旁观者效应(bystander response)而使得细胞凋亡的细胞周期特异性不明显<sup>[7]</sup>。我们通过应用传统的膜联蛋白 V/PI 法检测细胞凋亡, 在细胞凋亡率控制在约 10%~20%, 并以早期凋亡为主时来确定 rhFasL 诱导细胞凋亡的作用时间, 均获得了稳定而又典型的细胞周期特异性模型。(4)亚 G<sub>1</sub> 峰值法检测细胞凋亡的敏感度较差且只反映晚期细胞凋亡, 容易导致结果失真, 只可以作为检测晚期凋亡时分析亚 G<sub>1</sub>、G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>、S、G<sub>2</sub>/M 期各期的细胞比例, 即 DNA 直方图的分析作为补充, 间接地反映细胞凋亡的细胞周期特性; 膜联蛋白 V/PI 法可以作为建立模型时确定 rhFasL 诱导细胞凋亡的作用时间和细胞凋亡率。

运用改良的 API 技术检测 rhFasL 诱导体外培养的 Molt-4、Jurkat 细胞株和经 PHA 刺激进入细胞周期的 PBL 发现, rhFasL 诱导的细胞凋亡具有明显的细胞周期特异性, 并且始动于 G<sub>1</sub> 期。同时还发现未经 PHA 刺激的 G<sub>0</sub> 期 PBL 虽然也有 Fas 的表达但不能被 rhFasL 诱导细胞凋亡的现象。这一证据可能说明了细胞周期与细胞凋亡发生的关系——即细胞只有通过限制点(restriction point, 又称 R 点)进入细胞周期后才能诱导凋亡的发生, 也预示着细胞周期蛋白, CDK, 检测点和限制点等细胞周期事件在 Fas 诱导的细胞凋亡中起着重要的作用。这一现象与我们进行临床肿瘤化疗和生物学治疗时发现肿瘤的耐药和复发与 G<sub>0</sub> 期肿瘤细胞的逃避存活有关是相吻合的<sup>[8]</sup>。进一步研究还发现诱导细胞凋亡时细胞周期蛋白的变化规律: G<sub>1</sub> 期的细胞周期蛋白 D3 明显升高, 而细胞周期蛋白 E 则明显下降; S 和 G<sub>2</sub>/M 期的细胞周期蛋白 A 和细胞周期蛋白 B1 无明显变化。结合细胞周期蛋白在细胞周期运行中的作用和变化规律, 我们认为细胞凋亡发生在晚 G<sub>1</sub> 期。我们认为 rhFasL 与 Fas 结合启动细胞凋亡的同时可能作为诱导因子与生长因子共同刺激细胞周期蛋白 D3 的合成增加, 结合并激活 CDK4/6 后磷酸化 Rb 蛋白使之失活并释放出 E2F, 驱动细胞跨越 R 点由 G<sub>0</sub> 期进入 G<sub>1</sub> 期。当细胞运行至晚 G<sub>1</sub> 期时, 由于 G<sub>1</sub> 期检测点的存在, 已存在

DNA 损伤的细胞被停滞在晚 G<sub>1</sub> 期。而与此同时, 由于细胞周期蛋白 E 表达水平的下降(细胞周期蛋白 E 的合成必须达到一定阈值才能结合并激活 CDK2, 使之磷酸化), 细胞周期蛋白 E/CDK2 复合体不能被磷酸化或磷酸化不全, 使得 H1 组蛋白及晚 G<sub>1</sub> 期和早 S 期的其他底物均不能被磷酸化, DNA 受损的细胞不能通过 G<sub>1</sub> 期检测点和 G<sub>1</sub>/S 交界进入 S 期而被阻滞在晚 G<sub>1</sub> 期。于是在 G<sub>1</sub> 期检测点的监督下完成 Fas 诱导的细胞周期特异性凋亡<sup>[9~12]</sup>。

为了进一步论证 Fas 诱导的细胞凋亡的细胞周期特异性的发生机制, 结合本模型提出以下展望: (1)我们在研究中发现, 经 rhFas 诱导后的 G<sub>0</sub> 期 PBL 和其他细胞一样虽然均有 DNA 损伤(资料尚未发表)但不能诱导出细胞凋亡。这种现象可能提示细胞凋亡过程中效应 caspase 的激活与检测点的监督有关, 检测点在 Fas 诱导的细胞凋亡中的作用机制需要进一步加以研究。(2)G<sub>1</sub> 期细胞周期蛋白在 Fas 诱导的细胞凋亡中存在变化规律, CDK 的活性与细胞周期蛋白密切相关, 由此可以针对性地研究 G<sub>1</sub> 期的 CDK 在此过程中的变化和可能的作用。(3)很多调节细胞周期运行的基因(如 c-myc, c-fos, c-jun, p53 等)同时也调节着细胞凋亡。这个模型的建立也提示了通过基因治疗控制细胞周期的运行进而达到调节细胞凋亡的可能性<sup>[6]</sup>。(5)此模型反映的是 Fas 诱导的早期细胞凋亡, 建立在此模型基础上的研究更能真实地反映细胞凋亡过程中的细胞周期事件。

### 参考文献 (References)

- [1] Borgne A *et al.* *Progr in Cell Cycle Res*, 2003, **5**: 453
- [2] Jarpe MB *et al.* *Oncogene*, 1998, **17**: 1475
- [3] Tao D *et al.* *Cytometry*, 2004, **57**: 70
- [4] Kerr JFR *et al.* *Br J Cancer*, 1972, **26**: 239
- [5] Nagata S. *Cell*, 1997, **88**: 355
- [6] Lawen A. *Bioessays*, 2003, **25**: 888
- [7] Mitchell SA *et al.* *Radiat Res*, 2004, **161**: 397
- [8] Fukuoka K *et al.* *Invest New Drugs*, 2001, **19**: 219
- [9] 龚建平等. *细胞生物学杂志*, 2000, **22**: 79
- [10] Gong J *et al.* *Cell Prolif*, 1995, **28**: 337
- [11] Norbury C *et al.* *Ann Rev Biochem*, 1992, **61**: 441
- [12] Sherr CJ. *Cell*, 1993, **73**: 1059

## The Significance and Establishment of Cell Cycle Specific Apoptosis Model Induced by Recombinant Human Fas Ligand *in Vitro*

Xiao-Jun He, Jing Hu, Xiao-Lan Li, Hui Xiao, De-Ding Tao, Hao-Cheng Long, Jun-Bo Hu, Jian-Ping Gong\*  
(Tongji Cancer Research Institute/Molecular Medical Center, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

**Abstract** The target cells—leukaemia cell lines (Molt-4 and Jurkat) and peripheral blood lymphocyte were incubated with recombinant human Fas ligand for 6 to 36 hours, apoptosis was detected by sub-G<sub>1</sub>, traditional annexin-V/PI and modified API methods. Meanwhile, Fas expression in such cells' membrane was labelled and the rule of cyclin expression in Fas-mediated apoptosis was studied as well, so as to clarifying the correlation of Fas-mediated apoptosis and cell cycle progression. The data showed that apoptosis induced by recombinant human Fas ligand was cell cycle specific and initiated at G<sub>1</sub>-phase in the leukaemia cell lines and activated peripheral blood lymphocyte stimulated by phytohemagglutinin, whereas apoptosis in peripheral blood lymphocyte at G<sub>0</sub>-phase could not be induced effectively. Moreover, cyclin D3 expression increased and cyclin E expression decreased evidently during the induction of apoptosis while the expression of cyclins A and B1 was unaltered. These findings indicated that Fas-mediated apoptosis was located at late G<sub>1</sub>-phase and determined by whether the target cells had passed through the restriction point to cell division cycle or not. And the cell cycle specificity of Fas-mediated apoptosis was the result of the cells with DNA damage being blocked at late G<sub>1</sub>-phase, due to the decrease of cyclin E expression and under the surveillance of G<sub>1</sub>-phase check point.

**Key words** recombinant human Fas ligand; cell cycle; apoptotic model; *in vitro*; flow cytometry

Received: May 16, 2006 Accepted: October 18, 2006

This work was supported by the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program) (No.2004CB518705, No.2002CB513100-2), the National Nature Science Foundation of China (No.30440024, No.30570908) and the Key Clinical Program of the Ministry of Public Health of China

\*Corresponding author. Tel: 86-27-83662696, Fax: 86-27-83662696, E-mail: jpgong@tjh.tjmu.edu.cn