

# CARM1 Regulates the Growth of Hepatocellular Carcinoma Cells via Regulation of Bax/Bcl-2 Level and Caspase-3 Activity

Meiling Liu, Honghai Hong\*, Zheng Wang

Department of Clinical Laboratory, Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou Guangdong

Email: [gaolaosao@126.com](mailto:gaolaosao@126.com)

Received: Jun. 30<sup>th</sup>, 2019; accepted: Jul. 19<sup>th</sup>, 2019; published: Jul. 26<sup>th</sup>, 2019

## Abstract

**Objective:** To investigate the effect and mechanism of CARM1 on the growth of HCC. **Methods:** qRT-PCR and western blot were used to detect the expression of CARM1. MTT assay and Trypan blue assay were used to detect the growth of hepatocellular carcinoma cells; Caspase-3 kit was used to detect the activity of Caspase-3; small interfering RNA interference CARM1 was used to study its role and molecular mechanism on HCC growth. **Results:** Small interfering RNA significantly knocked down the level of CARM1; interfering with CARM1 significantly, which inhibited the growth of hepatocellular carcinoma cells, down-regulated Bcl-2, up-regulated Bax expression, and activated Caspase-3 activity. **Conclusion:** CARM1 regulates the growth of hepatocellular carcinoma by regulating the expression of Bax/Bcl-2 and the activity of Caspase-3.

## Keywords

HCC, CARM1, Bcl-2, Bax, Caspase-3

# CARM1通过调控Bax/Bcl-2表达和Caspase-3活性进而调控肝癌生长作用

刘美玲, 洪宏海\*, 王 征

广州医科大学附属第三医院检验科, 广东 广州

Email: [gaolaosao@126.com](mailto:gaolaosao@126.com)

收稿日期: 2019年6月30日; 录用日期: 2019年7月19日; 发布日期: 2019年7月26日

\*通讯作者。

## 摘要

目的：共激活因子相关精氨酸甲基转移酶1 (Coactivator-associated arginine methyltransferase 1, CARM1)在肝癌细胞中生长作用及机制研究。方法：qRT-PCR、western blot法检测肝癌细胞中CARM1表达；MTT法和台盼蓝实验检测肝癌细胞的生长情况；Caspase-3试剂盒检测Caspase-3活性；小分子干扰RNA干扰CARM1研究其作用和分子机制。结果：小分子干扰RNA明显敲低CARM1水平；干扰CARM1后明显抑制肝癌细胞生长，且下调抑凋亡蛋白Bcl-2和上调促凋亡蛋白Bax表达水平，同时激活Caspase-3活性。结论：CARM1通过调控Bax/Bcl-2表达和Caspase-3活性进而调控肝癌生长作用。

## 关键词

肝癌, CARM1, Bcl-2, Bax, Caspase-3

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

肿瘤的发生是由于促癌基因和抑癌基因的突变引起的。近些年发现，除促癌基因和抑癌基因的突变外，肿瘤表观遗传学也在肿瘤的发生发展中起着关键的作用[1]。DNA甲基化和共价组蛋白修饰是表观遗传学的重要组成部分。研究发现肿瘤基因调控区高甲基化可促进肿瘤发生和发展[2]。因此，调控肿瘤表观遗传学的调控因子是潜在的肿瘤治疗靶点，目前几种DNA甲基转移酶和组蛋白脱乙酰基酶抑制剂已被批准用于癌症治疗[3]。共激活因子相关精氨酸甲基转移酶1 (Coactivator-associated arginine methyltransferase 1, CARM1) CARM1是一种重要的甲基转移酶，也称为精氨酸甲基酶4 (protein arginine methyltransferase 4, PRMT4)。最初发现CARM1和核受体辅助因子p160结合调控生物学功能[4]。后来研究发现CARM1与转录因子cAMP反应元件结合蛋白CBP、 $\beta$ -catenin和NF- $\kappa$ B的p65结合调控下游靶基因的转录[5][6][7]。很多研究表明CARM1在肿瘤的发生、发展和转移过程发挥着重要作用。文献报道CARM1促进乳腺癌、胰腺癌、骨肉瘤增殖和转移[8][9][10][11]。在早期肝癌中，CARM1水平增高[12]。研究发现SKP2通过调控细胞核内的AMPK-SKP2-CARM1信号通路诱导自噬并影响肝癌进展[13]。但是，CARM1在肝癌中直接作用尚不清楚。

在本篇论文中，我们采取小分子干扰片段抑制肝癌细胞中CARM1的表达，用MTT实验和台盼蓝实验检测肝癌的生长情况。同时检测相关凋亡蛋白Bax/Bcl-2和Caspase-3活性，初步阐明CARM1在肝癌中作用及分子机制。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 细胞培养

肝母细胞瘤细胞HepG2和肝癌细胞Huh7购自ATCC。用DMEM+10%的胎牛血清完全培养基无菌于37°、5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中培养。

### 2.2. 试剂和耗材

Caspase-3活性试剂盒购自Biovision公司。Real time PCR的SYBER Green和逆转录酶试剂盒购自

Takara 公司。RNA 提取试剂盒购自康为世纪公司。siCARM1 小分子干扰片段购自锐博公司。转染试剂 Lipo2000 购自 Invitrogen 公司。细胞培养液购 Hyclone 公司。细胞培养皿购自康宁公司。CARM1、Bax、Bcl-2、 $\beta$ -actin 抗体购自 CST 公司。MTT 和台盼蓝购自北京鼎国公司。

### 2.3. 方法

**MTT 法检测 HepG2 和 Huh7 细胞增殖能力:** 采用噻唑兰颜色反应法, 即 MTT 法进行细胞增殖活力的测定[14]。其原理为活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性 MTT 还原为水不溶性的蓝紫色晶体—甲瓊(formazan), 并沉淀在细胞中, 而死细胞无此功能。HepG2 和 Huh7 细胞种植于 96 孔板, 处理 24h 后, 每孔加入 10  $\mu$ l 的 MTT 工作液(浓度为 5 mg/ml), 继续培养 4 小时; 加入三联溶液, 培养箱中过夜以使蓝色结晶颗粒(甲瓊)完全溶解, 用酶标仪测定 OD<sub>570</sub> 的光密度值。实验中每份样品设 3 个复孔, 实验至少重复 3 次。

**台盼蓝法检测 HepG2 和 Huh7 细胞活力:** 台盼蓝能使死细胞染色, 而不能使活细胞染色。HepG2 和 Huh7 细胞种植于 96 孔板, 处理 24 h 后, 胰酶消化细胞, 离心, 重悬细胞, 吸 10  $\mu$ l 细胞悬液和 10  $\mu$ l 0.4%的台盼蓝溶液混合, 充入细胞计数板, 显微镜下计数四个大方格中染色和非染色细胞总数。非染色细胞除以非染色细胞和染色细胞的总数的百分数即细胞活力。

#### qRT-PCR 实验

qRT-PCR 检测 CARM1 的 mRNA 水平。具体实验如下: 收集处理后的 HepG2 和 Huh7 细胞 RNA, 逆转录为 cDNA, 用 Takara 公司的 SYBER green 试剂盒进行实时荧光 PCR 实验。PCR 条件为: 95 $^{\circ}$ C 30 s, 1 个循环; PCR 反应, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 15 s, 45 个循环; 溶解, 95 $^{\circ}$ C 0 s, 65 $^{\circ}$ C 20 s, 95 $^{\circ}$ C 0 s, 1 个循环。PCR 结束后, 根据反应得到的 Cp 值, 使用相对定量的分析方法, 以标准曲线进行校正, 最后计算出样品中各 mRNA 的相对浓度。进行 qRT-PCR 引物序列如表 1。

**Table 1.** Real-time fluorescence quantitative PCR primers

**表 1.** 实时荧光定量 PCR 引物

NCBI ID	基因	引物	引物序列	产物大小
NM_199141.2	CARM1	上游	5'-GAAGGAGATTTGCACAGGATAGA-3'	125 bp
		下游	5'-GACAGCCACACGGTCATTAT-3'	
NM_002046.5	GAPDH	上游	5'-ACCATCTTCCAGGAGCGAGA-3'	71 bp
		下游	5'-GACTCCACGACGTACTCAGC-3'	

#### CARM1 干扰实验

CARM1 干扰小分子片段购自锐博公司。

CARM1 干扰实验具体方法如下: HepG2 和 Huh7 细胞种植于六孔板中, 待其融合度为 50%~60%时候, 用 Lipo2000 转染试剂转染 CARM1 干扰小分子片段, 24 小时后收集细胞 RNA 和蛋白, 检测 CARM1 转录和蛋白水平。干扰 CARM1 小分子序列如表 2。

**Table 2.** HE4 interference sequence

**表 2.** HE4 干扰序列

基因	干扰片段	干扰序列
CARM1	SiCARM1	5'-GCAAGCAGUCCUUAUCAUCACUC-3'

### Caspase-3 活性实验

$5 \times 10^6$  HepG2 和 Huh7 细胞种植于 6 孔板中, 干扰 CARM1 基因 24 h 后, 将细胞重新悬浮在 50  $\mu$ l 冷冻细胞溶解缓冲液中, 冰上 10 分钟。在微型离心机(10,000  $\times$  g)中离心 1 分钟。将上清液(细胞溶质提取物)转移到新鲜的试管中, 然后放在冰上。测定蛋白质浓度, 将 50  $\mu$ g~200  $\mu$ g 蛋白质稀释到 50  $\mu$ l, 添加 50  $\mu$ l 2X 反应缓冲液和 5  $\mu$ l 的 Devd PNA (200  $\mu$ m 终浓度), 在 37 $^{\circ}$ 培养 1~2 小时。分光光度计 405 nm 读数。

### Western blot 实验

Western blot [15]实验检测 CARM1 蛋白水平, 具体实验方案如下: 收集处理好的 HepG2 和 Huh7 细胞蛋白, 进行蛋白定量, 跑胶。加入 CARM1 一抗, 4 度过夜, 收集一抗, 加入二抗, 然后加入 ECL 显色, 拍照。

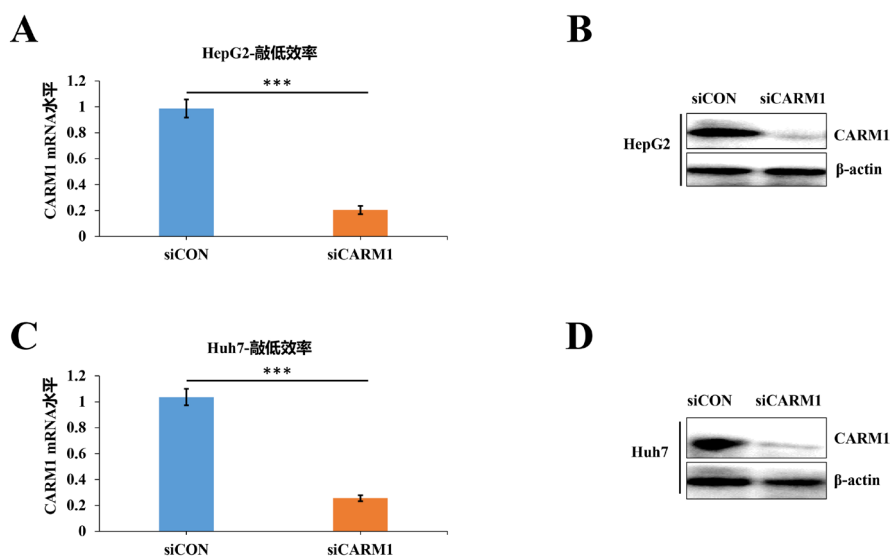
## 2.4. 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理。计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示。采用 *t* 检验。 $P < 0.05$  表示具有统计学意义。

## 3. 实验结果

### 3.1. 肝癌细胞中有效干扰 CARM1 基因

用小分子干扰片段 siCARM1 转染 HepG2 和 Huh7 细胞 24 小时后收集细胞 RNA 和蛋白。结果显示小分子干扰片段 siCARM1 明显敲低肝癌细胞的 CARM1 转录水平, 沉默效果近 80% (图 1(A)和图 1(C))。Western blot 结果也显示小分子干扰片段 siCARM1 明显敲低 CARM1 蛋白水平(图 1(B)和图 1(D)), 这些结果为进一步的功能实验提供基础。



qRT-PCR 和 Western blot 检测干扰 CARM1 的效果。干扰 CARM1 后, 于 24 h 收集 RNA 和细胞蛋白分别进行 qRT-PCR 和 Western blot 实验。\*\*\*  $< 0.001$ 。

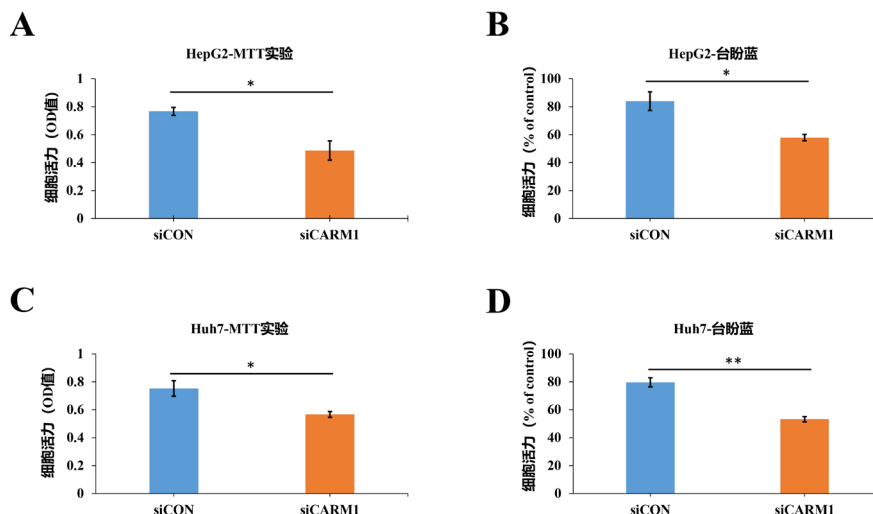
**Figure 1.** The effect of silencing of HE4by siRNA

**图 1.** 小分子干扰片段 siCARM1 敲低 CARM1 水平效果

### 3.2. 干扰 CARM1 后抑制 HepG2 和 Huh7 细胞生长

用小分子干扰片段 siCARM1 转染 HepG2 和 Huh7 细胞 24 小时后, MTT 实验和台盼蓝实验检测 HepG2

和 Huh7 细胞的生长能力。MTT 实验结果显示沉默 CARM1 后明显抑制 HepG2 和 Huh7 细胞的生长(图 2(A)和图 2(C))。台盼蓝实验也表明敲低 CARM1 后明显抑制 HepG2 和 Huh7 细胞的生长(图 2(B)和图 2(D))。这些结果提示 CARM1 调控肝癌细胞生长过程。

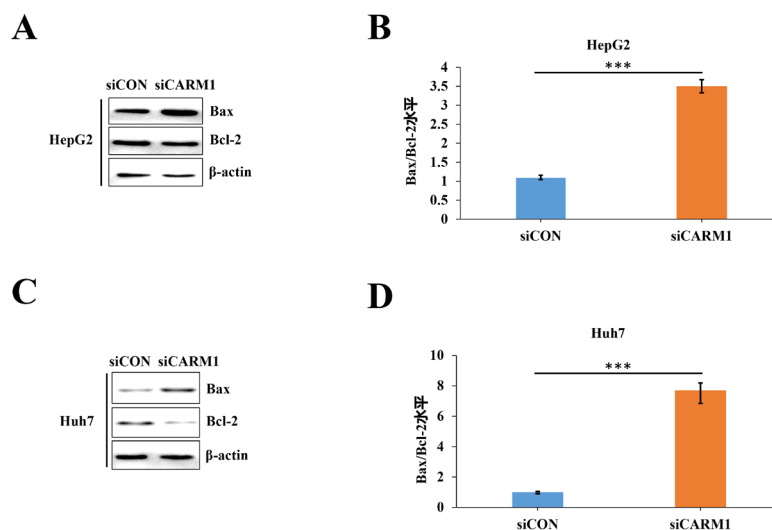


MTT 法和台盼蓝实验检测肝癌细胞生长情况。干扰 CARM1 后，于 24 h 进行 MTT 实验和台盼蓝实验。\* < 0.05, \*\* < 0.01。

**Figure 2.** Silencing of CARM1 inhibits the growth of HepG2 and Huh7 cells  
**图 2.** 干扰 CARM1 后抑制 HepG2 和 Huh7 细胞生长

### 3.3. CARM1 调控肝癌细胞 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达

为了阐明 CARM1 调控肝癌细胞生长作用分子机制,我们首先检测凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 表达。结果显示,沉默 CARM1 后明显上调促凋亡蛋白 Bax 表达,抑制抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达(图 3(A)和图 3(C))。同时,也明显上调 Bax/Bcl-2 比例(图 3(B)和图 3(D))。这些结果表明阻断 CARM1 后可能促进肝癌细胞凋亡过程进而抑制肝癌细胞的生长。

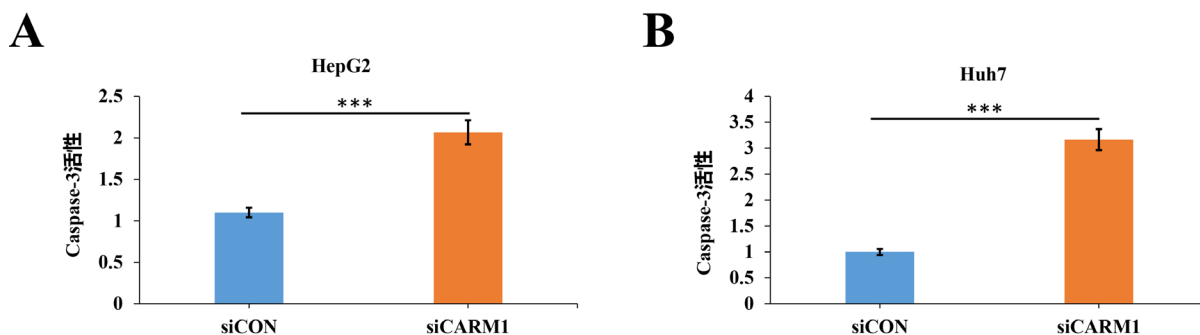


CARM1 调控肝癌细胞 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达。干扰 HE4 后，于 24 h 收集细胞蛋白检测 Bax 和 Bcl-2 表达。\*\*\* < 0.001。

**Figure 3.** CARM1 regulates Bax and Bcl-2 expression  
**图 3.** CARM1 调控肝癌细胞 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达

### 3.4. CARM1 调控肝癌细胞 Caspase-3 活性

为了进一步阐明 CARM1 通过调控肝癌细胞凋亡进而影响肝癌细胞生长作用的分子机制, 我们检测细胞凋亡过程关键酶 Caspase-3 活性。结果显示, 干扰 CARM1 后, Caspase-3 活性明显升高(图 4(A)和图 4(B))。以上结果表明, CARM1 通过调控凋亡相关蛋白 Bax/Bcl-2 和 Caspase-3 活性进而调控肝癌的凋亡过程, 从而抑制肝癌的生长。



CARM1 调控肝癌细胞 Caspase-3 活性。干扰 HE4 后, 于 24 h 检测 Caspase-3 活性。\*\*\* < 0.001。

**Figure 4.** CARM1 regulates the activity of Caspase-3

**图 4.** CARM1 调控肝癌细胞 Caspase-3 活性

## 4. 讨论

肝癌是一个全球性的健康问题, 其发病率越来越高, 死亡率也越来越高[16]。表观遗传的改变, 如组蛋白修饰、DNA 甲基化和小 RNA 介导过程, 与多种癌症的增殖和转移密切相关[17]。越来越多证据表明肝癌和表观遗传改变有关[18]。共激活因子相关精氨酸甲基转移酶 1 (Coactivator-associated arginine methyltransferase 1, CARM1)是蛋白质精氨酸甲基转移酶家族的一员, 催化蛋白质底物中精氨酸(arg)残基甲基化, 调控肿瘤表观遗传, 进而改变基因转录过程[19]。在这篇文章中, 我们采用小分子干扰 RNA 敲低 CARM1 水平, 研究其在肝癌中作用及分子机制。我们发现敲低 CARM1 后抑制肝癌细胞的生长, 促进凋亡蛋白 Bax 表达, 抑制抑凋亡蛋白 Bcl-2 水平, 同时促进 Caspase-3 活性, 表明 CARM1 通过调控肝癌细胞的凋亡过程进而调控肝癌细胞生长。

除了异常分化和增殖外, 细胞凋亡也是肿瘤的一个重要特征[20]。细胞凋亡主要由细胞凋亡蛋白 Bcl-2 家族调控。Bcl-2 家族包括促凋亡蛋白 Bak 和 Bax 以及抑凋亡蛋白 Bcl-2 和 Mcl-1 [21]。文献报道许多肝癌中 Bcl-2 表达增高, 抑制肝癌凋亡促进其增殖[22], 同时 Bcl-2 高表达的病人比低表达病人的无病生存期明显缩短[23]。在我们实验中发现沉默 CARM1 后明显上调促凋亡蛋白 Bax 水平, 下调抑凋亡蛋白 Bcl-2 水平, 明显升高 Bax/Bcl-2 比例, 表明阻断 CARM1 后促进肝癌细胞凋亡过程进而抑制肝癌细胞生长, 后者被 MTT 实验和台盼蓝实验所证明。我们结果与其他文献报道阻断 CARM1 后抑制乳腺癌、骨肉瘤和胰腺癌生长作用类似[8] [9] [10] [11]。Caspase 是调控细胞凋亡的重要酶。Caspase-3 (也称为 cyp32、sca-1 和 cyp32b)是一种位于染色体 4q34 的 casp-3 基因编码的半胱氨酸蛋白酶[24], 在细胞凋亡中起着关键作用, 其可切割和激活 Caspase-6、Caspase-7 和 Caspase-9。我们实验结果发现阻断 CARM1 后促进 Caspase-3 活性, 进一步表明 CARM1 通过调控肝癌细胞凋亡过程进而调控肝癌的生长。但是, CARM1 调控肝癌的 Caspase-3 活性的分子机制尚未清楚, 还值得我们进一步研究, 这块也是这篇文章不足之处。

总之, 在这篇论文中我们研究调控甲基化关键酶 CARM1 在肝癌细胞生长中作用及机制。发现沉默 CARM1 后抑制肝癌细胞生长, 进一步研究发现阻断 CARM1 后上调促凋亡蛋白 Bax 水平, 下调抑凋亡

蛋白 Bcl-水平, 且促进 Caspase-3 活性, 这些结果表明 CARM1 通过调控细胞凋亡过程进而调控肝癌细胞生长, 提示着 CARM1 可能成为肝癌治疗新的靶点, 具有一定的临床意义。

## 基金项目

广州医科大学博士启动基金(项目编号: 2015C24); 广州市卫生局一般引导项目(项目编号: 20171A011312); 广州市卫生局中西医结合项目(项目编号: 20182A011020)广州医科大学大学生实验室开放项目(项目编号: B185004039); 广东省教育厅项目(项目编号: 2017KTSCX155); 广东省自然科学基金(项目编号: 2018A030310298)。

## 参考文献

- [1] Rodriguez-Paredes, M. and Esteller, M. (2011) Cancer Epigenetics Reaches Mainstream Oncology. *Nature Medicine*, **17**, 330-339. <https://doi.org/10.1038/nm.2305>
- [2] Fraga, M.F., et al. (2005) Loss of Acetylation at Lys16 and Trimethylation at Lys20 of Histone H4 Is a Common Hallmark of Human Cancer. *Nature Genetics*, **37**, 391-400. <https://doi.org/10.1038/ng1531>
- [3] Kelly, T.K., De Carvalho, D.D. and Jones, P.A. (2010) Epigenetic Modifications as Therapeutic Targets. *Nature Biotechnology*, **28**, 1069-1078. <https://doi.org/10.1038/nbt.1678>
- [4] Suzuki, S., et al. (2004) Specific Differences in Gene Expression Profile Revealed by cDNA Microarray Analysis of Glutathione S-Transferase Placental form (GST-P) Immunohistochemically Positive Rat Liver Foci and Surrounding Tissue. *Carcinogenesis*, **25**, 439-443. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgh030>
- [5] Xu, W., et al. (2001) A Transcriptional Switch Mediated by Cofactor Methylation. *Science*, **294**, 2507-2511. <https://doi.org/10.1126/science.1065961>
- [6] Koh, S.S., et al. (2002) Synergistic Coactivator Function by Coactivator-Associated Arginine Methyltransferase (CARM) 1 and  $\beta$ -Catenin with Two Different Classes of DNA-Binding Transcriptional Activators. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**, 26031-26035. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110865200>
- [7] Covic, M., et al. (2005) Arginine Methyltransferase CARM1 Is a Promoter-Specific Regulator of NF- $\kappa$ B-Dependent Gene Expression. *The EMBO Journal*, **24**, 85-96. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600500>
- [8] Wang, Y.P., et al. (2016) Arginine Methylation of MDH1 by CARM1 Inhibits Glutamine Metabolism and Suppresses Pancreatic Cancer. *Molecular Cell*, **64**, 673-687. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.09.028>
- [9] Frietze, S., et al. (2008) CARM1 Regulates Estrogen-Stimulated Breast Cancer Growth through Up-Regulation of *E2F1*. *Cancer Research*, **68**, 301-306. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1983>
- [10] Wang, L., et al. (2016) CARM1 Methylates Chromatin Remodeling Factor BAF155 to Enhance Tumor Progression and Metastasis. *Cancer Cell*, **30**, 179-180. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.06.013>
- [11] Li, S., et al. (2017) The Overexpression of CARM1 Promotes Human Osteosarcoma Cell Proliferation through the pGSK3 $\beta$ / $\beta$ -Catenin/CyclinD1 Signaling Pathway. *International Journal of Biological Sciences*, **13**, 976-984. <https://doi.org/10.7150/ijbs.19191>
- [12] Osada, S., et al. (2006) Altered Gene Expression of Transcriptional Regulatory Factors in Tumor Marker-Positive Cells during Chemically Induced Hepatocarcinogenesis. *Toxicology Letters*, **167**, 106-113. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2006.08.014>
- [13] Wei, X., et al. (2018) SKP2 Promotes Hepatocellular Carcinoma Progression through Nuclear AMPK-SKP2-CARM1 Signaling Transcriptionally Regulating Nutrient-Deprived Autophagy Induction. *Cellular Physiology and Biochemistry*, **47**, 2484-2497. <https://doi.org/10.1159/000491622>
- [14] Stockert, J.C., et al. (2012) MTT Assay for Cell Viability: Intracellular Localization of the Formazan Product Is in Lipid Droplets. *Acta Histochemica*, **114**, 785-796. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2012.01.006>
- [15] Jian, W., et al. (2019) A Novel Role of HuR in Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) Induces Tumour Cells Apoptosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **23**, 3767-3771. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14249>
- [16] Llovet, J.M., Burroughs, A. and Bruix, J. (2003) Hepatocellular Carcinoma. *The Lancet*, **362**, 1907-1917. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14964-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14964-1)
- [17] Han, T.S., et al. (2018) The Epigenetic Regulation of HCC Metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*, **19**, 3978. <https://doi.org/10.3390/ijms19123978>
- [18] Khan, F.S., et al. (2017) Epigenetic Mechanisms Regulating the Development of Hepatocellular Carcinoma and Their

- Promise for Therapeutics. *Hepatology International*, **11**, 45-53. <https://doi.org/10.1007/s12072-016-9743-4>
- [19] Bedford, M.T. and Clarke, S.G. (2009) Protein Arginine Methylation in Mammals: Who, What, and Why. *Molecular Cell*, **33**, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.12.013>
- [20] Su, Z., *et al.* (2015) Apoptosis, Autophagy, Necroptosis, and Cancer Metastasis. *Molecular Cancer*, **14**, 48. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0321-5>
- [21] Adams, J.M. and Cory, S. (2007) The Bcl-2 Apoptotic Switch in Cancer Development and Therapy. *Oncogene*, **26**, 1324-1337. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210220>
- [22] Shigematsu, S., *et al.* (2011) ZNF689 Suppresses Apoptosis of Hepatocellular Carcinoma Cells through the Down-Regulation of Bcl-2 Family Members. *Experimental Cell Research*, **317**, 1851-1859. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.05.012>
- [23] Brito, A.F., *et al.* (2016) Targeting Hepatocellular Carcinoma: What Did We Discover So Far? *Oncology Reviews*, **10**, 302. <https://doi.org/10.4081/oncol.2016.302>
- [24] Khalilzadeh, B., *et al.* (2018) Advances in Nanomaterial Based Optical Biosensing and Bioimaging of Apoptosis via Caspase-3 Activity: A Review. *Microchimica Acta*, **185**, 434. <https://doi.org/10.1007/s00604-018-2980-6>

#### 知网检索的两种方式:

1. 打开知网首页: <http://cnki.net/>, 点击页面中“外文资源总库 CNKI SCHOLAR”, 跳转至: <http://scholar.cnki.net/new>, 搜索框内直接输入文章标题, 即可查询;  
或点击“高级检索”, 下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2164-9049, 即可查询。
2. 通过知网首页 <http://cnki.net/>顶部“旧版入口”进入知网旧版: <http://www.cnki.net/old/>, 左侧选择“国际文献总库”进入, 搜索框直接输入文章标题, 即可查询。

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: [wjcr@hanspub.org](mailto:wjcr@hanspub.org)