

· 基础研究 ·

白花蛇舌草对香豆酸组合物对急性髓系白血病
细胞 Kasumi-1 生长抑制作用陈 智¹ 林圣云² 蒋剑平² 王 博² 沈英英² 裘 玫³ 李建新¹

摘要 **目的** 研究白花蛇舌草对香豆酸组合物(total coumarins of *Hedyotis diffusa* Willd, TCHDW)对急性髓系白血病 Kasumi-1 细胞株生长抑制作用。**方法** 采用不同浓度的 TCHDW(0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 mg/mL),作用于对数生长期的 Kasumi-1 细胞,MTT 法检测 TCHDW 对 Kasumi-1 细胞株作用 24、48 h 后的生长抑制作用。再以经一定浓度(0、0.02、0.04、0.06 mg/mL)的 TCHDW 处理 24 h 后的 Kasumi-1 细胞为对象,采用 Hoechst33258 染色法观察 Kasumi-1 细胞凋亡的形态学改变,Western Blot 检测 Kasumi-1 细胞中有关凋亡信号传导通路蛋白 Caspase 家族、Bcl-2 家族、凋亡抑制蛋白 IAPs 家族、MAPKs 信号通路蛋白的变化情况。**结果** 0.02~0.10 mg/mL 的 TCHDW 可明显抑制白血病 Kasumi-1 细胞株的增殖,与空白组比较,细胞存活率明显降低($P < 0.01$),呈时间-浓度依赖性;Kasumi-1 细胞核内凋亡小体随着药物浓度的增加逐渐增多。与空白组比较,TCHDW 0.06 mg/mL 组 Caspase 家族蛋白、Bak、Bax、Smac、p-ERK、Ras、p-P38、p-JNK 升高($P < 0.01$, $P < 0.05$);Bcl-2、Bcl-XL、Bim、Mcl-1、XIAP、CIAP1、CIAP2、Survivin、JNK 降低($P < 0.01$, $P < 0.05$)。**结论** TCHDW 可抑制 Kasumi-1 细胞增殖并诱导其凋亡,其凋亡机制与 Caspase 家族蛋白、Bcl-2 家族蛋白和 IAPs 家族蛋白表达变化以及 MAPKs 信号通路的激活相关。

关键词 白花蛇舌草对香豆酸组合物;急性髓系白血病;细胞凋亡

Inhibitory Effect of Total Coumarins of *Hedyotis diffusa* Willd on the Growth of AML Cell Line Kasumi-1 CHEN Zhi¹, LIN Sheng-yun², JIANG Jian-ping², WANG bo², SHEN YING-ying², QIU Mei³, and LI Jian-xin¹ 1 Department of Hematology, Wuhan Children's Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan (430016); 2 Department of Hematology, The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou (310006); 3 Shanghai Teaching and Research Section, Clinical College of Chinese Medicine, Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan (430061)

ABSTRACT **Objective** To explore the growth-inhibition of total coumarins of *Hedyotis diffusa* Willd (TCHDW) on AML Cell Line Kasumi-1. **Methods** Kasumi-1 cells at logarithmic growth phase were treated with TCHDW in various concentrations (0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10 mg/mL) for different duration (24 or 48 h). The inhibitive effect of TCHDW on cell growth was determined by MTT method. After Kasumi-1 cells were incubated with TCHDW (0, 0.02, 0.04, 0.06 mg/mL) for 24 h, the apoptosis of cells were observed by Hoechst33258 staining. The expression levels of Caspase family, Bcl-2 family, IAPs family and MAPKs survival signaling pathways were examined by Western Blot. **Results** The proliferation of Kasumi-1 cells was significantly inhibited after treatment with TCHDW (0.02–0.10 mg/mL), which was lower than that of the control group ($P < 0.01$), and showed a dose- and time-dependent manner. After treated with TCHDW, apoptotic body appeared in Kasumi-1 cells nucleus and the number of apoptotic body increased in a dose-de-

基金项目:浙江省中医药优秀青年人才基金项目(No. 2017ZQ012)

作者单位:1. 华中科技大学同济医学院附属武汉儿童医院小儿血液肿瘤科(武汉 430016); 2. 浙江中医药大学附属第一医院血液科(杭州 310006); 3. 湖北中医药大学中医临床学院伤寒教研室(武汉 430061)

通讯作者:林圣云, Tel: 0571-87232213, E-mail: lsyw2012@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20170702.172

pendent manner. Compared with control group, Caspase family proteins, Bak, Bax, Smac, p-ERK, Ras, p-P38, p-JNK increased ($P < 0.01$, $P < 0.05$); Bcl-2, Bcl-XL, Bim, Mcl-1, XIAP, CIAP1, CIAP2, Survivin, JNK decreased ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Conclusion TCHDW could significantly inhibit the proliferation of Kasumi-1 cells and induce its apoptosis. Its mechanism may involve the Caspase, Bcl-2 and IAPs family proteins, and the MAPK signaling pathways.

KEYWORDS total coumarins of *Hedyotis diffusa* Willd ; acute myelogenous leukemia; apoptosis

急性髓系细胞白血病(acute myeloid leukemia, AML)是一类具有高度异质性的血液系统恶性肿瘤。尽管治疗方法和新技术的不断优化和发展,绝大多数患者仍面临复发并最终死亡的结局^[1,2]。因此,迫切需要新的药物来提高疗效。从传统中草药中开发出高效低毒甚至高度特异性的靶向药物是目前临床热点之一。

对香豆酸属于酚酸类化合物,研究发现其有很好的抗氧化^[3]和抗菌、抗突变活性^[4],但最重要的是能抑制肿瘤细胞生长,尤其对消化道肿瘤^[5,6],而对白血病的作用研究较少,因此本研究将从白花蛇舌草中提取到的对香豆酸组合物(total coumarins of *Hedyotis diffusa* Willd, TCHDW),作用于 AML 细胞株 Kasumi-1,以研究 TCHDW 在体外对 Kasumi-1 的作用和机制,为临床治疗白血病提供新的候选药物。

材料与方法

1 细胞株及培养 人髓系细胞白血病细胞株 Kasumi-1 细胞株由浙江大学血液学研究所惠赠(购自美国标准生物制品收藏中心,货号:CRL-2724)。细胞株在 37℃、5% CO₂、饱和湿度环境下,置于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中培养,细胞密度为 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ /mL,1~2 天换液传代 1 次。取对数生长期细胞进行实验。

2 药物 TCHDW 由浙江省中医院中药制剂室从白花蛇舌草(购自杭州萧山医药公司中药分公司,批号:110326)提取和制备,将全草粉碎后加乙醇萃取,将提取物用蒸馏水溶解,利用乙酸乙酯液-液萃取,再将提取物溶解于蒸馏水中,用 60% 乙醇连续多次洗脱,将乙醇馏分洗脱物收集和干燥后,用蒸馏水配成 12 mg/mL 样品。其中主要成分为对香豆酸(纯度 98% 以上)、反式 6-O-对香豆酰鸡屎藤苷甲酯(纯度 98% 以上),并已申请专利(专利号:201410324070.2)。

3 主要试剂及仪器 二甲基亚砜(DMSO)购自中国杭州化学试剂有限公司;四甲基偶氮唑蓝(MTT)

及碘化丙啶(PI)试剂盒购自美国 Sigma-Aldrich 公司;流式凋亡检测试剂盒购自美国 Biouniquer 公司;Caspase-3、-8、-9、Cyto-C、PRAP、Bad、Bcl-2、Bcl-XL、Bak、Bax、Bid、Bim、Mcl-1、XIAP、CIAP-1、CIAP-2、Survivin、Smac 抗体购自美国 Cell Signaling 公司;β-actin 抗体购自美国 Santa Cruz 公司;Western Blot luminol 试剂盒(ECL)购自以色列 Biological Industries 公司。细胞培养箱购自美国 Forma Scientific 公司;荧光倒置显微镜购自日本 Olympus 公司;垂直电泳及转膜装置购自美国 BIO-RAD 公司。

4 检测指标及方法

4.1 MTT 比色法检测细胞增殖抑制情况 取对数生长期 Kasumi-1 细胞以 1×10^5 /mL 接种于 96 孔培养板,使每孔终体积为 200 μL,按终浓度 0、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 mg/mL 分别加入 TCHDW,置于培养箱中孵育 24 和 48 h 后,每孔加入 20 μL MTT 工作液,37℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中继续培养 4 h,3 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入二甲基亚砜(DMSO)200 μL/孔,待蓝紫色甲臞充分溶解后,于紫外分光光度仪测 570 nm 处吸光度值(OD 值)。按照公式计算细胞存活率:细胞存活率(%) = (处理组 OD 值/对照组 OD 值) × 100%。实验重复 3 次,设复孔 4 个,取平均值为最终结果。用 Logit 法计算半数抑制浓度(IC₅₀)。

4.2 Hoechst 荧光染色检测细胞凋亡 取对数生长期 Kasumi-1 细胞以 1×10^5 个/mL 进行实验,将细胞悬液接种于 6 孔板,使每孔终体积为 5 mL,分别加入 TCHDW,使终浓度分别达到 0.02、0.04、0.06 mg/mL,设置空白组,作用于 Kasumi-1 细胞 24 h 后,收集空白组及药物处理组细胞,离心,PBS 洗涤 2 次,弃上清,各加入 4% 甲醛 200 μL 分别移至 EP 管,放入培养箱中 30 min。离心弃甲醛,用移液器在干净玻璃片上涂单层细胞,待涂层干燥后,PBS 摇床洗 3 次,每次 10 min,用含 0.5% Triton 的 PBS 在摇床上透化 30 min,再用 PBS 摇床洗 3 次,每次 10 min,每张玻片用 1 μg/mL Hoechst33258 染液均匀滴涂于细胞涂层,避光反应 20 min。弃 Ho-

echst33258 染液, PBS 摇床洗 3 次, 每次 10 min。分别用低倍(10×)、高倍(40×)、油镜(100×)观察并拍照。每张片随机选取 3 个视野, 实验重复 2 次。

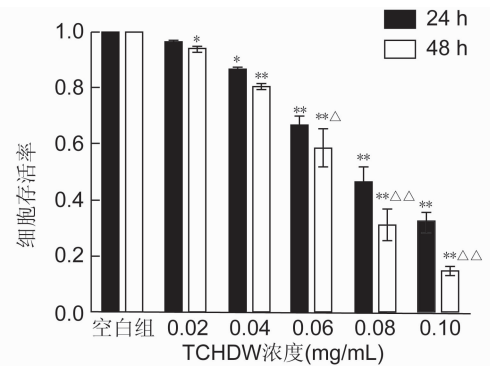
4.3 Western Blot 分析相关蛋白表达水平 检测 Caspase 家族蛋白 (RARP, Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9, Cyto-C)、Bcl-2 家族蛋白 (Bad, Bak, Bax, Bcl-2, Bcl-XL, Bid, Bim, Mcl-1)、细胞凋亡抑制蛋白 (XIAP, CIAP1, CIAP2, Survivin, Smac) 及 MAPKs 信号通路蛋白 (ERK, p-ERK, Ras, p-P38, JNK, p-JNK) 表达。总蛋白提取后, 按 Bradford 法测蛋白浓度, 取 10 μg 蛋白样品与 2× 加样缓冲液等体积混合, 煮沸变性 5 min 后进行 100、120 或 150 g/L 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 电转移至 PVDF 膜上, 室温封闭 1 h, 立即加入一抗溶液, 平缓摇动, 4℃ 过夜, 室温下加二抗溶液孵育 1 h。以 β-actin 作为内参照, 显影参照 ECL 试剂盒说明书操作, 用 IPP 光密度分析软件进行分析, 以目的条带与 β-actin 灰度值的比值表示目的蛋白的表达水平, 各实验均重复 3 次。Western Blot 显示的蛋白条带扫描后用 Imagequant5.1 软件进行量化分析, 其灰度用 OD 值计算。

5 统计学方法 实验数据采用 SPSS 17.0 软件分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。方差齐性检验后, 组内多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较时采用 SNK-q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组 Kasumi-1 细胞株存活率比较(图 1) Kasumi-1 细胞经 TCHDW (0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 mg/mL) 作用 24 h 和 48 h 后, 不同浓度的 TCHDW 均可抑制细胞增殖, 随着 TCHDW 浓度增加

或作用时间延长, 对 Kasumi-1 细胞增殖抑制作用加强, 抑制作用呈现出时间 - 浓度依赖关系 ($r = 0.962$)。TCHDW 作用后的 Kasumi-1 细胞, 存活率与空白组比较明显下降 ($P < 0.01, P < 0.05$)。且相同浓度 (0.06 ~ 0.10 mg/mL) 时, 作用 48 h 的细胞存活率比作用 24 h 的也明显降低 ($P < 0.01, P < 0.05$)。

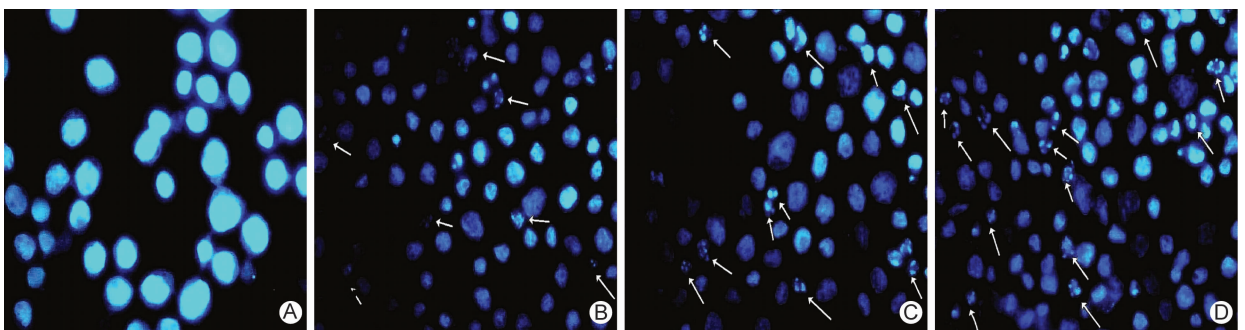


注: 与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与同浓度 24 h 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

图 1 各浓度 TCHDW 组 Kasumi-1 细胞株增殖抑制作用比较

2 各组 Kasumi-1 细胞株凋亡形态学结果(图 2) 荧光显微镜下发现空白组细胞内几乎未见蓝色荧光增强的凋亡小体, 而在实验组中, 随着药物浓度增加, 凋亡小体逐渐增多。

3 各组 Kasumi-1 细胞 Caspase 家族蛋白表达比较(图 3, 表 1) 与空白组比较, TCHDW-0.02 mg/mL 组 Caspase-8 升高 ($P < 0.05$); TCHDW-0.04 mg/mL 组 PARP、Caspase-8、Caspase-9 升高 ($P < 0.01, P < 0.05$); TCHDW 0.06 mg/mL 组 PARP、Caspase-3、Caspase-8、Caopase-9、Cyto-C 表达升高 ($P < 0.01, P < 0.05$)。



注: A 为空白组; B 为 TCHDW 0.02 mg/mL 组; C 为 TCHDW 0.04 mg/mL 组; D 为 TCHDW 0.06 mg/mL 组; 箭头所示为凋亡小体

图 2 各组 Kasumi-1 细胞株凋亡形态学结果 (Hochest33258 荧光, $\times 100$)

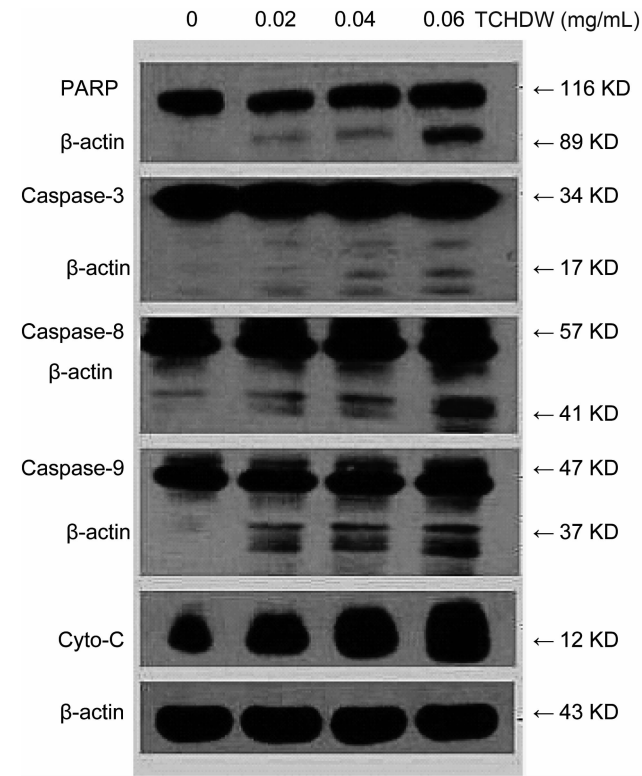


图3 各组 Kasumi-1 细胞 Caspase 家族蛋白表达

4 各组 Kasumi-1 细胞 Bcl-2 家族蛋白表达比较 (表 2,图 4) 与空白组比较,TCHDW0.02 mg/mL 组 Bim、Mcl-1 降低($P < 0.05$); TCHDW0.04 mg/mL 组 Bax 升高($P < 0.05$), Bcl-XL、Bim、Mcl-1 降低($P < 0.01, P < 0.05$); TCHDW0.06 mg/mL 组 Bak、Bax 升高($P < 0.01$), Bcl-2、Bcl-XL、Bim、Mcl-1 降低($P < 0.01, P < 0.05$)。

5 各组 Kasumi-1 细胞凋亡抑制蛋白表达比较 (图 5,表 3) 与空白组比较,TCHDW0.04 mg/mL 组 XIAP、CIAP1、Survivin 降低 ($P < 0.05$); TCHDW0.06 mg/mL 组 XIAP、CIAP1、CIAP2、Survivin 降低($P < 0.01$),Smac 升高($P < 0.01$)。

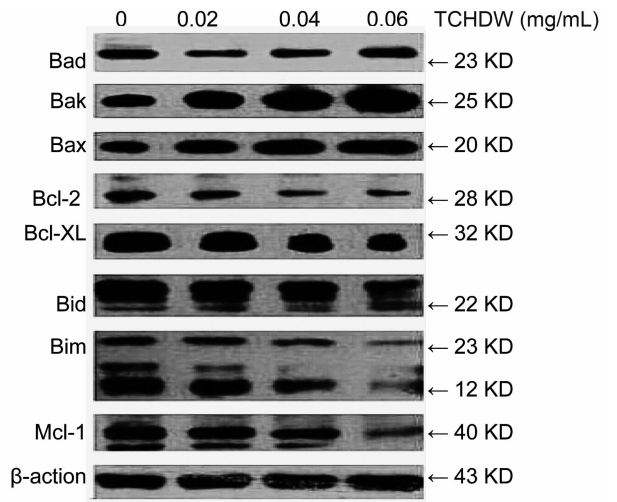


图4 各组 Kasumi-1 细胞 Bcl-2 家族蛋白表达

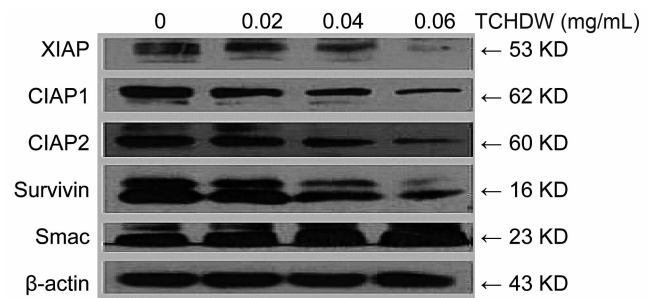


图5 各组 Kasumi-1 细胞凋亡抑制蛋白表达

6 各组 Kasumi-1 细胞 MAPKs 信号转导通路蛋白表达比较 (表 4, 图 6) 与空白组比较, TCHDW0.04 mg/mL 组 p-JNK 升高($P < 0.05$); TCHDW0.06 mg/mL 组 p-ERK、Ras、p-P38、p-JNK 升高,JNK 降低($P < 0.01, P < 0.05$)。

讨 论

急性白血病的发生与细胞的增殖失控、凋亡受阻等原因密切相关,故抑制细胞增殖是抗白血病药物发

表1 各组 Kasumi-1 细胞 Caspase 家族蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PARP	Caspase-3	Caspase-8	Caspase-9	Cyto-C	β-actin
空白	3	0.476 ± 0.018	0.442 ± 0.005	0.45 ± 0.04	0.34 ± 0.04	142 ± 29	203 ± 5
TCHDW0.02 mg/mL	3	0.560 ± 0.024	0.486 ± 0.018	0.61 ± 0.08 *	0.50 ± 0.15	163 ± 25	205 ± 8
TCHDW0.04 mg/mL	3	0.641 ± 0.058 *	0.546 ± 0.058	0.67 ± 0.07 **	0.55 ± 0.12 *	180 ± 20	204 ± 6
TCHDW0.06 mg/mL	3	0.871 ± 0.075 **	0.582 ± 0.053 **	0.82 ± 0.14 **	0.67 ± 0.06 **	213 ± 16 *	208 ± 3

注:与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;下表同

表2 各组 Kasumi-1 细胞 Bcl-2 家族蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Bad	Bak	Bax	Bcl-2	Bcl-XL	Bid	Bim	Mcl-1	β-actin
空白	3	156 ± 20	184 ± 19	148 ± 31	196 ± 8	212 ± 14	174 ± 18	131 ± 3	201 ± 9	182 ± 6
TCHDW0.02 mg/mL	3	152 ± 9	203 ± 7	167 ± 19	180 ± 5	197 ± 5	172 ± 20	111 ± 5 *	191 ± 7 *	177 ± 2
TCHDW0.04 mg/mL	3	146 ± 6	214 ± 2	181 ± 19 *	157 ± 21	185 ± 9 **	171 ± 16	91 ± 5 **	175 ± 9 *	179 ± 3
TCHDW0.06 mg/mL	3	154 ± 12	233 ± 11 **	202 ± 20 **	136 ± 23 *	164 ± 20 *	168 ± 13	78 ± 5 **	147 ± 8 **	183 ± 2

表 3 各组 Kasumi-1 细胞凋亡抑制蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	XIAP	CIAP1	CIAP2	Survivin	Smac	β -actin
空白	3	167 $\pm$ 16	195 $\pm$ 8	199 $\pm$ 12	205 $\pm$ 9	187 $\pm$ 14	180 $\pm$ 4
TCHDW0.02 mg/mL	3	149 $\pm$ 4	182 $\pm$ 2	179 $\pm$ 20	185 $\pm$ 10	207 $\pm$ 11	182 $\pm$ 1
TCHDW0.04 mg/mL	3	130 $\pm$ 10 *	165 $\pm$ 5 *	163 $\pm$ 27	170 $\pm$ 8 *	217 $\pm$ 12	182 $\pm$ 4
TCHDW0.06 mg/mL	3	90 $\pm$ 6 **	144 $\pm$ 20 **	141 $\pm$ 23 **	132 $\pm$ 2 **	231 $\pm$ 16 **	184 $\pm$ 6

表 4 各组 Kasumi-1 细胞 MAPKs 信号通路蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ERK	p-ERK	Ras	p-P38	JNK	p-JNK	β -actin
空白	3	190 $\pm$ 24	152 $\pm$ 23	124 $\pm$ 5	160 $\pm$ 15	191 $\pm$ 13	145 $\pm$ 17	193 $\pm$ 7
TCHDW0.02 mg/mL	3	191 $\pm$ 23	172 $\pm$ 23	152 $\pm$ 14	176 $\pm$ 18	175 $\pm$ 1	166 $\pm$ 25	195 $\pm$ 10
TCHDW0.04 mg/mL	3	191 $\pm$ 25	189 $\pm$ 22	162 $\pm$ 18	189 $\pm$ 9	154 $\pm$ 21	185 $\pm$ 17 *	198 $\pm$ 9
TCHDW0.06 mg/mL	3	189 $\pm$ 23	211 $\pm$ 12 **	198 $\pm$ 12 **	204 $\pm$ 9 *	122 $\pm$ 12 **	202 $\pm$ 9 *	195 $\pm$ 7

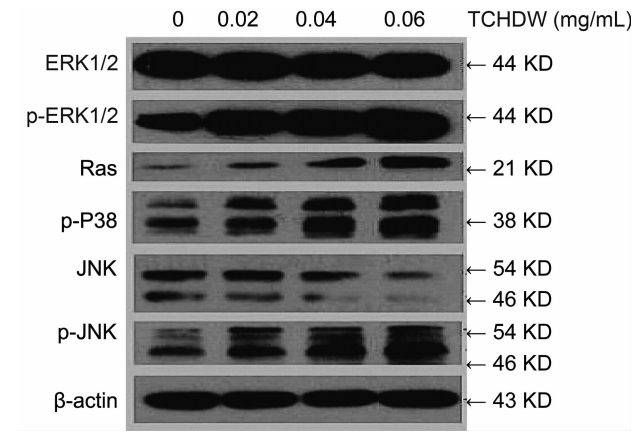


图 6 各组 Kasumi-1 细胞 MAPKs 信号转导通路蛋白表达

挥效应的关键。本研究显示，TCHDW 作用于 Kasumi-1 细胞后，细胞株的生存率较空白组降低 ($P < 0.01$)，0.1 mg/mL TCHDW 作用 Kasumi-1 细胞 24 和 48 h 的抑制率达 60% 以上。提示 TCHDW 可抑制白血病 Kasumi-1 细胞株增殖，并表现为剂量 - 时间效应。

诱导白血病细胞凋亡是治疗白血病的一条可行途径。0.02 ~ 0.06 mg/mL TCHDW 作用于 Kasumi-1 细胞 24 h 后，Hochest33258 染色检测提示在细胞形态学所呈现出的典型凋亡特征性改变，即核染色质凝集成团块状或凋亡小体，提示 TCHDW 可诱导 Kasumi-1 细胞发生凋亡，且细胞的凋亡率随着 TCHDW 浓度的增加而升高，因此 TCHDW 抑制 Kasumi-1 细胞增殖的机制之一是诱导细胞凋亡。

细胞凋亡过程中 Caspase 蛋白酶的级联激活是关键，而 Caspase-3 是执行者，它的激活标志着凋亡进入不可逆阶段^[7]，Bcl-2 家族蛋白和 IAPs 家族蛋白是主要控制因素。本研究发现经 TCHDW 处理后，细胞中 Caspase-3 明显激活，并呈浓度依赖性。而上一

级联中的 Caspase-8、Caspase-9 的激活，提示了 TCHDW 诱导 Kasumi-1 细胞凋亡过程中，细胞凋亡的外源途径和内源途径均参与其中。

内源性细胞凋亡途径主要由线粒体介导，可以通过 Bcl-2 凋亡蛋白家族调控。本研究发现 TCHDW 对 Kasumi-1 细胞作用后 Bcl-2 家族中抗凋亡蛋白 Bcl-2、Bcl-XL、Mcl-1 下调明显，而促凋亡蛋白 Bak 和 Bax 显著上调。尤其是 Mcl-1 在造血干细胞生存中起着关键作用^[8]，有研究已经发现当 Mcl-1 过度表达时，肿瘤细胞对临床上广泛应用的抗肿瘤药物易产生耐药作用^[9]，因此 TCHDW 在促进 Mcl-1 下调诱导细胞凋亡的同时，可能还能克服肿瘤细胞耐药作用的发生。另外笔者还发现促凋亡蛋白 Bim 水平下调，相关文献报道其能与所有的抗凋亡 Bcl-2 家族蛋白结合，也可直接与 Bax 或 Bak 结合后诱导其聚合促进凋亡^[10]。而 Bim 在 TCHDW 诱导白血病细胞株 Kasumi-1 凋亡过程中所发挥的具体作用还有待深入研究。

凋亡抑制蛋白 IAPs 家族成员在血液系统恶性肿瘤的发生发展中起到了关键作用^[11,12]。IAPs 主要是通过抑制 Caspase 家族中的 Caspase-3、-9 的活性来达到抑制细胞凋亡的作用。其中 XIAP 被认为与白血病细胞产生耐药有关，并在白血病细胞中常常过度表达^[13]。本研究观测到，TCHDW 作用于 Kasumi-1 细胞 24 h 后，细胞内 XIAP、CIAP1、CIAP2 和 Survivin 蛋白的表达减少，而促凋亡蛋白 Smac 表达增加，且呈浓度依赖性，表明 TCHDW 可能通过增加 Smac 的表达，降低凋亡抑制蛋白 XIAP、CIAP1、CIAP2 和 Survivin 的水平，从而诱导白血病细胞凋亡。对 XIAP 蛋白的影响，还提示 TCHDW 可能存在降低肿瘤细胞的凋亡阈，增加药物敏感性并克服耐药的作用。

MAPK 成员中有很多与血液系统肿瘤密切相关，如

JNK 入核后激活相应转录因子后能诱导死亡配体的表达,启动死亡受体途径的细胞凋亡,而 P38 则可启动 c-myc 等原癌基因转录,诱导凋亡执行蛋白的表达。Jantová S 等^[14]在鼠白血病 L1210 细胞中发现,氨基乙酰胺通过激活 p38MAPK 信号通路可诱导细胞凋亡。本次研究发现 TCHDW 处理过的 Kasumi-1 细胞中,不仅 p-ERK 的表达上调,使活化型的 JNK 和 p-P38 增多,而且 ERK 的上游 Ras 蛋白表达也随药物浓度增加而逐渐上调,据此初步认识到 TCHDW 诱导白血病细胞凋亡的机制中,MAPK 信号通路有明显改变,提示 TCHDW 可能通过协同活化 MAPK 信号通路进而抑制 Kasumi-1 细胞增殖以及促进其凋亡。

综上所述,本研究证实了 TCHDW 可以明显抑制 Kasumi-1 细胞增殖并诱导凋亡,其机制与下调抗凋亡蛋白(Bcl-2、Bcl-XL 及 Mcl-1)以及凋亡抑制蛋白(XIAP、CIAP1、CIAP2 和 Survivin)和激活 MAPKs 信通路有关。但本研究仅以对 TCHDW 在体外的作用进行了研究,其在生物体内对细胞凋亡影响尚需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Saito Y, Yuki H, Kuratani M, et al. A pyrrolo-pyrimidine derivative targets human primary AML stem cells *in vivo* [J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5 (181): 181ra52.
- [2] Pabst C, Krosch J, Fares I, et al. Identification of small molecules that support human leukemia stem cell activity *ex vivo* [J]. *Nat Meth ods*, 2014, 11(4): 436–442.
- [3] 赵春贵, 张立伟, 王晖. 肉桂酸及其衍生物抗氧化活性研究[J]. *食品科学*, 2005, 26(1): 218–222.
- [4] 赵健, 欧仕益. 比光谱-导数分光光度法同时测定对香豆酸和阿魏酸[J]. *食品科学*, 2010, 31(8): 189–193.
- [5] Femia AP, Canderni G, Vagnail F, et al. Effect of polyphenolic extracts from red wine and 4-OH-coumaric acid on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats [J]. *Eur J Nutr*, 2005, 44(2): 79–84.
- [6] Janicke B, Onning G, Oredsson MS. Differential effects of ferulic acid and p-coumaric acid on S phase distribution and length of S phase in the human colonic cell line Caco-2 [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(17): 6658–6665.
- [7] Sikdar S, Mukherjee A, Ghosh S, et al. Condu-rango glycoside-rich components stimulate DNA damage-induced cell cycle arrest and ROS-mediated caspase-3 dependent apoptosis through inhibition of cell-proliferation in lung cancer, *in vitro* and *in vivo* [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2014, 37(1): 300–314.
- [8] Rahmani M, Davis EM, Bauer C, et al. Apoptosis induced by the kinase inhibitor BAY 43–9006 in human leukemia cells involves down-regulation of Mcl-1 through inhibition of translation [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(42): 35217–35227.
- [9] Moldoveanu T, Follis AV, Kriwacki RW. Many players in Bcl-2 family affairs [J]. *Trends Biochem Sci*, 2014, 39(3): 101–111.
- [10] Tischner D, Woess C, Ottina E, et al. Bcl-2-regulated cell death signaling in the prevention of autoimmunity [J]. *Cell Death Dis*, 2010, 1(6): e48.
- [11] Grzybowska-Izydorczyk O, Cebula B, Robak T, et al. Expression and prognostic significance of the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family and its antagonists in chronic lymphocytic leukaemia [J]. *Eur J Cancer*, 2010, 46(4): 800–810.
- [12] Drolle Heidrun, Wagner Michaela, Vasold Jochen, et al. Hypoxia regulates proliferation of acute myeloid leukemia and sensitivity against chemotherapy [J]. *Leuk Res*, 2015, 39(7): 779–785.
- [13] Silva KL, de Souza PS, Nestal de Moraes G, et al. XIAP and P-glycoprotein co-expression is related to imatinib resistance in chronic myeloid leukemia cells [J]. *Leuk Res*, 2013, 37(10): 1350–1358.
- [14] Jantová S, Repický A, Letasiová S, et al. 4-Amino-3-acetylquinoline-induced apoptosis of murine L1210 leukemia cells involves ROS-mitochondrial-mediated death signaling and activation of p38 MAPK [J]. *Cell Biochem Funct*, 2008, 26(5): 609–619.

(收稿: 2016–01–20 修回: 2017–06–24)

责任编辑: 赵芳芳