

尿多酸肽抑制多发性骨髓瘤细胞株 RPMI 8226 增殖及其机制研究

叶宝东, 邵科钉, 陈丹, 张翔, 张宇, 周郁鸿(浙江中医药大学附属第一医院, 杭州 310006)

摘要: 目的 探讨尿多酸肽(CDA-2)抑制多发性骨髓瘤细胞株 RPMI8226 增殖作用及其机制。方法 采用四甲基偶氮唑(MTT)比色法检测 CDA-2 对 RPMI8226 抑制作用并筛选研究浓度; 通过 Hoechst33258、Annexin-V/PI、细胞周期分析、DNA 琼脂糖凝胶电泳等方法检测 CDA-2 诱导 RPMI8226 凋亡作用; 使用 Western Blot 法检测 caspase-8、caspase-3 及其激活物的表达改变; 半定量 RT-PCR 法检测 TNF、FADD、TRAF3 mRNA 表达。结果 CDA-2 能够抑制 RPMI8226 细胞株增殖, 并呈浓度依赖性, IC_{50} 为 $1.64 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; 经 CDA-2 作用后, Hoechst33258 荧光染色提示细胞核浓集及出现凋亡小体, Annexin-V/PI 分析示早期凋亡细胞比例呈时间依赖增加, 细胞周期分析提示呈浓度依赖上调凋亡峰及下调 G1 期比例, DNA 凝胶电泳可见断裂成 180~200 bp 及其倍数的片断梯形条带, 故 CDA-2 可诱导 RPMI8226 细胞株凋亡; Western Blot 检测发现随药物作用时间延长 caspase-8、caspase-3 表达明显下降, 而 active-caspase8、active-caspase3 表达上升; 半定量 RT-PCR 证实凋亡相关基因 TNF、FADD、TRAF3 mRNA 表达上调。结论 CDA-2 可抑制 RPMI8226 增殖, 且可通过死亡受体途径诱导细胞凋亡。

关键词: 尿多酸肽; RPMI8226; 增殖抑制

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)11-1161-05

Uroacitides(CDA-2) Inhibited the Proliferation of Multiple Myeloma Cell Line RPMI 8226

YE Baodong, SHAO Keding, CHEN Dan, ZHANG Xiang, ZHANG Yu, ZHOU Yuhong(*The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medicine University, Hangzhou 310006, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the effects of uroacitides(CDA-2) on the proliferation of RPMI 8226 cells and its mechanisms. **METHODS** The proliferative inhibition of CDA-2 on RPMI 8226 cells was detected by MTT and the drug concentrations for further researches were screened out. The apoptosis of RPMI8226 cells after treating with CDA-2 was analyzed by Hoechst33258 staining, Annexin-V/PI staining, PI staining, and DNA gel electrophoresis. Changes in the expression of caspase-8, caspase-3 and their active forms were tested by Western Blot. The expression of TNF, ADD and TRAF3 mRNA were detected by semi-quantitative RT-PCR. **RESULTS** CDA-2 inhibited the proliferation of RPMI8226 cells in a dose-dependent manner with the IC_{50} $1.64 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Condensed nuclei and apoptotic body were found via Hoechst33258 fluorescence staining when cells were treated with CDA-2. Annexin-V/PI analysis showed that the proportion of early apoptotic cells raised in a time-dependent manner. Cell cycle analysis showed that the apoptotic peak was up-regulated and G1 phase was decreased in a dose-dependent manner. DNA gel electrophoresis revealed integer multiples of 180~200 bp "ladder" bands. Western blot revealed that the expression of caspase-8, caspase-3 was down-regulated, while the expression of active caspase-8, activecaspase-3 was increased as the exposed time extended. The semi-quantitative RT-PCR showed up-regulation of TNF, FADD, TRAF3 mRNA, which were associated with apoptosis. **CONCLUSION** CDA-2 inhibited the proliferation of RPMI8226 cells and induced apoptosis via death receptor pathway.

KEY WORDS: uroacitides(CDA-2); RPMI8226; proliferative inhibition

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是以浆细胞恶性增殖及单克隆免疫球蛋白或其片段大量分泌为特点的血液系统恶性肿瘤, 虽然沙利度胺、硼替佐米等新药及自体造血干细胞移植的应用改善了疾病的预后, 然而化疗耐药及如何治愈仍是该病治疗过程中较为棘手的问题, 故新药的开发仍是该病研究的热点之一。尿多酸肽(CDA-2)是从健康人尿中提取的含有多重有机酸和多肽成分的非细胞毒性新型诱导分化治疗抗癌药, 目前体外

研究证实其可抑制部分血液系统肿瘤的增殖^[1], 然少见其对 MM 作用的研究。本课题组前期研究表明 CDA-2 可诱导 RPMI8226 细胞凋亡^[2], 本实验结合前期研究结果, 进一步深入探讨其抑制 RPMI8226 增殖机制, 为临床使用该药治疗 MM 提供依据。

1 仪器与材料

1.1 细胞株

RPMI8226 细胞株由浙江大学第一附属医院

基金项目: 浙江省“十二五”第一批省重中之重一级学科项目

作者简介: 叶宝东, 男, 博士, 副主任医师

Tel: (0571)86620325

E-mail: 13588453501@163.com

血液病研究所惠赠。

1.2 药物

CDA-2 由台湾信东化学工业公司廖明徵博士馈赠(原药药物浓度为 $278 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 实验前用 RPMI1640 培养液稀释成所需浓度。

1.3 试剂及仪器

RPMI1640、胎牛血清(FBS)均购自GIBCO公司; 四甲基偶氮哇蓝(MTT, Sigma公司); Hoechst33258染料(美国BD公司); PI试剂盒(Sigma公司, 批号: P4170); Annexin-V/FITC细胞凋亡检测试剂盒(美国CALTAG公司, 批号: CAS136107-94-3); DNA分子量标记(上海sangan公司); DNA-Ladder试剂盒(北京博大泰克公司, 批号: DP2402); Trizol(GIBCO公司); M-MLV逆转录酶及其 $5\times$ 缓冲液(GIBCO公司); Taq DNA合成酶及其 $5\times$ 缓冲液、MgCl₂: Promega公司; 随机引物、PCR引物(上海Sangan公司); PVDF膜: MILLPORE公司; 预染蛋白质分子量标志, SM-0441 Fermentas公司; 抗体Caspase8(美国Cell Signaling公司); Caspase3(Santa Cruz公司); EMSA试剂盒(购自美国Promega公司, 批号: DBI-1027); 辣根标记山羊抗兔IgG(H+L)(亲和纯化, 北京中山生物技术公司); 辣根标记山羊抗鼠IgG(H+L)(亲和纯化, 北京中山生物技术公司); Western-blotting luminol试剂盒(ECL, Santa Cruz公司, 批号: SC-2048)。

2 方法

2.1 细胞株及细胞培养

将RPMI8226细胞以 $1\times 10^6\cdot\text{mL}^{-1}$ 的浓度接种于含10%胎牛血清、青霉素 $100 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和链霉素 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的RPMI1640培养液中, 置于 37°C 、饱和湿度条件下, 体积分数为5%的CO₂培养箱中培养, 每2~3 d换液1次。取对数生长期的细胞进行实验。

2.2 CDA-2对RPMI8226增殖抑制作用

取对数生长期细胞, 以 $5\times 10^5\cdot\text{mL}^{-1}$ 接种于96孔培养板, 加入不同浓度药物(0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, $4.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 不足部分用RPMI1640培养液补足, 每孔总体积 $200 \mu\text{L}$, 处理24 h, 加 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ MTT $20 \mu\text{L}\cdot\text{孔}^{-1}$, 37°C 、5%CO₂培养箱中孵育4 h, $1000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心, 小心吸去上清, 加入二甲亚砜 $150 \mu\text{L}\cdot\text{孔}^{-1}$, 振荡仪上震荡使紫蓝色沉淀充分溶解, 在酶标仪 570 nm 波长处读取吸

光度值(A)。以时间为横轴, A值为纵轴, 绘制细胞生长曲线。半数抑制浓度(IC₅₀)采用Logit法计算。

2.3 Hoechst33258细胞染色

CDA-2以 $2.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 终浓度作用于RPMI8226 24 h后, 收集空白对照及药物处理细胞, PBS洗涤2次。用 $1 \mu\text{L}$ Hoechst33258($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)孵育 $100 \mu\text{L}$ 样品细胞($8\times 10^5\cdot\text{mL}^{-1}$)10 min, 样品作细胞甩片, 空气干燥后加盖玻片, Zeiss荧光显微镜($200\times$)观察。

2.4 Annexin-V/PI染色分析

RPMI8226细胞株以 $5\times 10^5\cdot\text{mL}^{-1}$ 接种6孔培养板, 加入浓度为 $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的CDA-2, 同时设空白对照组, 6, 12, 24 h后收获细胞, 收集 1×10^6 个细胞, 参照Annexin-V/PI细胞凋亡检测试剂盒说明书操作。各组细胞用PBS洗2遍, $1\times$ Binding Buffer调整细胞至 $1\times 10^6\cdot\text{mL}^{-1}$, 吸取 $300 \mu\text{L}$, 加 AnnexinV-FITC $5 \mu\text{L}$, PI $5 \mu\text{L}$, 室温下避光孵育15 min, 1 h之内, 用流式细胞仪FACScan检测凋亡率。

2.5 细胞周期分析

RPMI8226细胞株以 $5\times 10^5\cdot\text{mL}^{-1}$ 接种6孔培养板, 分别加入实验浓度CDA-2(0, 1, 2, $4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)作用24 h, 收集细胞, 参照细胞周期试剂盒说明书操作。各组细胞用PBS洗2遍, DNA Staining Solution调整细胞至 $1\times 10^6\cdot\text{mL}^{-1}$, 吸取 $300 \mu\text{L}$, 加PI $10 \mu\text{L}$, 室温下避光孵育30 min, 1 h之内, 用流式细胞仪FACScan检测, 并用ModFitLT软件分析结果。

2.6 DNA琼脂糖凝胶电泳

每瓶接种 $5\times 10^5\cdot\text{mL}^{-1}$ 细胞, 用不同浓度的CDA-2(0, 1, 2, $4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)分别处理24 h, 收集经药物处理后的细胞 1×10^6 个, PBS洗涤后转至Eppendorf管中, 严格按照DNA-Ladder试剂盒说明步骤操作, 取 $10 \mu\text{L}$ DNA样品与上样缓冲液按混匀, 1.8%琼脂糖凝胶电泳($1 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$)紫外灯下观察并拍照。

2.7 Caspase-8、caspase-3及其激活物检测

RPMI8226细胞株经CDA-2($2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)作用6, 12, 24 h后提取细胞总蛋白, 经Bradford法(BCA法)定量蛋白, 按 $30 \mu\text{g}$ 总蛋白量上样, 经SDS-PAGE电泳后, 转移到硝酸纤维素膜上, $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 脱脂奶粉 4°C 封闭过夜, 室温下与caspase-8、caspase-3单克隆抗体反应2 h。辣根过

氧化物酶标记的二抗反应 1 h, 充分洗膜后化学增强发光。

2.8 TNF、FADD、TRAF3 mRNA 表达检测

2.8.1 总 RNA 提取 收集经 $2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ CDA-2 处理 RPMI8226 细胞 24 h(1×10^6 个), 提取方法按照 Trizol RNA 提取试剂说明, 所提取的总 RNA 经紫外分光光度计测定 260 nm 和 280 nm 吸光度(A) 值及总 RNA 浓度, A_{260}/A_{280} 在 1.80~2.20 之间者用于 RT-PCR。分装 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 备用。

2.8.2 逆转录反应 反应总体系为 $20\text{ }\mu\text{L}$, 含 RNA $3\text{ }\mu\text{g}$, 随机引物 $5\text{ }\mu\text{g}$, dNTP 终浓度为 $0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, DTT 终浓度为 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, M-MLV $2\text{ }000\text{ U}$ $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min, $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 50 min, $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min 灭活逆转录酶。产物用于 PCR 扩增反应或 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.8.3 PCR 反应 总体系 $50\text{ }\mu\text{L}$: $10\times\text{PCR buffer}$ $5\text{ }\mu\text{L}$, $\text{MgCl}_2(25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1})$ $4\text{ }\mu\text{L}$, dNTP $1\text{ }\mu\text{L}$, cDNA 模板 $1\text{ }\mu\text{L}$, 上、下游引物各 $2\text{ }\mu\text{L}$, Taq DNA 合成酶 $0.5\text{ }\mu\text{L}$ 及 DEPC 水 $33.5\text{ }\mu\text{L}$ 。TNF、FADD、TRAF3 及 GAPDH 反应体系: TNF: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $54\text{ }^{\circ}\text{C}$ 40 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 60 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 35 个循环; FADD: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 40 s, $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 35 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 35 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min, 32 个循环; TRAF3: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 35 个循环; GAPDH: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $58.9\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 29 个循环。

2.8.4 琼脂糖凝胶电泳 2% 琼脂糖凝胶电泳, 电压 $5\text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$, 约电泳 30 min, 凝胶成像仪中观察, 记录并分析结果。

表 1 RT-PCR 引物

Tab 1 Primers of semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction

基因	引物序列	扩增产物/bp
GADPH	5'-ACCTGAACCTGCGCTCTAGAA-3'	247
	5'-TCCACCACCCTGCTGCTGTA-3'	
FADD	5'-CTGCCTTGGCAATTCTGTTATCAG-3'	345
	5'-TGGCTGGGGTGGGGTGGGGAGAC-3'	
TNF	5'-ATGAGCACTGAAAGCATGATC-3'	702
	5'-TCACAGGGCAATGATCCCAAAGTA-3'	
TRAF3	5'-AAGCAGACAGCATGATGAGCA-3	503
	5'-GCTTGAATGCATCTCCCAAATG-3'	

2.9 统计学方法

使用 SPSS 19.0 进行统计分析。常规进行方差齐性检验、正态性检验, 数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组资料之间的比较采用单因素方差分析, 相关与回归分析; 方差不齐者采用非参数检验, 以 $P<0.05$

为差别有统计学意义。

3 结果

3.1 CDA-2 诱导 RPMI8226 细胞凋亡

前期研究发现^[2], CDA-2 对 RPMI8226 细胞的抑制作用呈剂量依赖, 其 IC_{50} 为 $1.64\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; Hoechst33258 荧光染色显示 CDA-2 $2.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 作用 RPMI8226 24 h 后可见凋亡细胞的形态学特征: 细胞核浓集及出现凋亡小体; Annexin-V/PI 染色显示 CDA-2 $2.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 诱导 RPMI8226 细胞株早期凋亡呈时间依赖。结果见图 1 和图 2。

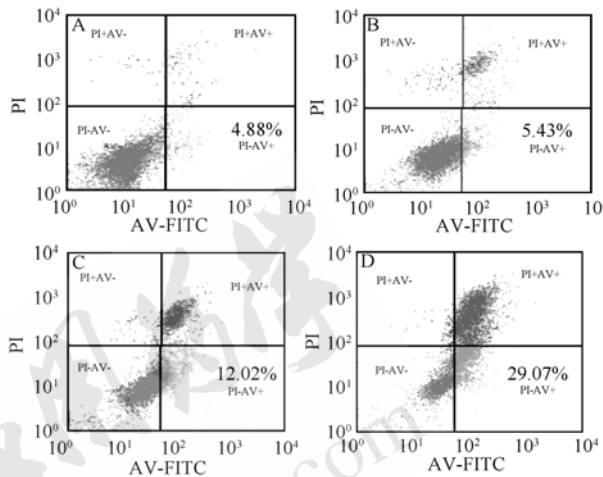


图 1 Annexin-V/PI 染色检测早期凋亡

A-0 h 组; B-6 h 组; C-12 h 组; D-24 h 组

Fig 1 The early stage of apoptosis was studied by Annexin-V/PI staining

A-0 h group; B-6 h group; C-12 h group; D-24 h group

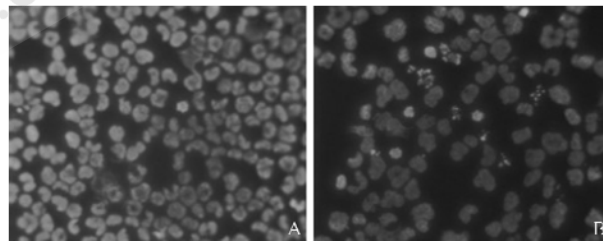


图 2 Hoechst33258 荧光染色观察细胞形态学变化

A-对照; B-CDA $2.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 作用 24 h

Fig 2 Morphological change of RPMI8226 cells after treating with CDA-2 was studied by Hoechst33258 staining
A-control; B-CDA $2.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ role for 24 h

3.2 PI 染色亚二倍体分析

分别以 0, 1.0, 2.0, $4.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ CDA-2 作用于 RPMI8226 细胞 24 h 后, DNA 亚二倍体凋亡细胞百分数分别为 4.18%, 8.58%, 19.84%, 56.54%, G0/G1 期细胞百分比分别为 43.79%, 36.60%, 32.46%, 18.55%, 故 CDA-2 上调凋亡峰及下调 G1 期比例呈浓度依赖。结果见图 3。

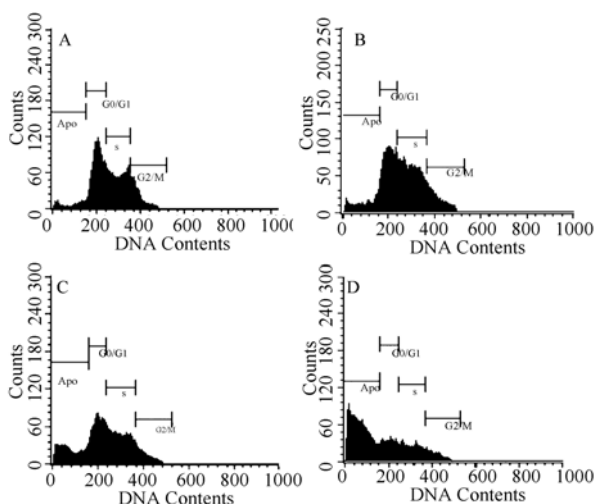


图3 PI染色亚二倍体分析

A-0 mg·mL⁻¹组; B-1.0 mg·mL⁻¹组; C-2.0 mg·mL⁻¹组; D-4.0 mg·mL⁻¹组

Fig 3 The diploid analysis was displayed by PI staining

A-0 mg·mL⁻¹ group; B-1.0 mg·mL⁻¹ group; C-2.0 mg·mL⁻¹ group; D-4.0 mg·mL⁻¹ group

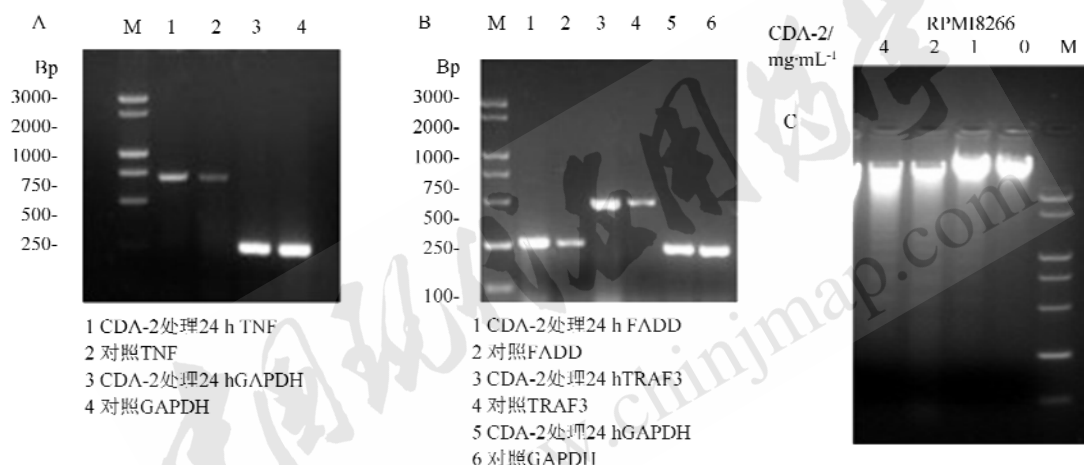


图4 DNA凝胶电泳

A-TNF基因表达检测; B-FADD、TRAF3基因表达检测; C-DNA断裂片段分析

Fig 4 Gel electrophoresis of DNA

A-detection for the expression of TNF gene; B-detection for the expression of FADD and TRAF3 genes; C-analysis of DNA ladder)

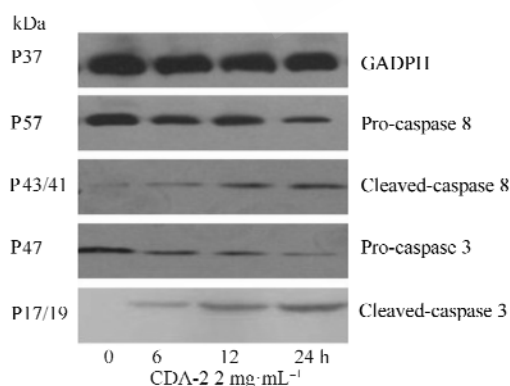


图5 Caspase-8、caspase-3及其激活物检测

Fig 5 Analysis of caspase-8, caspase-3 and their active forms by western blot

3.3 DNA断裂片段分析

不同浓度CDA-2(1.0, 2.0, 4.0 mg·mL⁻¹)作用于RPMI8226细胞24h后抽提DNA,在琼脂糖凝胶电泳可见DNA断裂成180~200 bp及其倍数的片断梯形条带,空白对照则未见此现象。结果见图4。

3.4 Caspase-8、caspase-3及其激活物检测

经CDA-2 2.0 mg·mL⁻¹作用0, 6, 12, 24 h后,随着药物作用时间的延长,caspase-8、caspase-3表达明显下降,而active-caspase8、active-caspase3表达上升。结果见图5。

3.5 TNF、FADD、TRAF3 mRNA表达检测

经CDA-2 2.0 mg·mL⁻¹作用RPMI8226细胞24 h后,琼脂糖凝胶电泳证实凋亡相关基因TNF、FADD、TRAF3 mRNA表达上调。结果见图4。

4 讨论

CDA-2是从健康人尿中提取的含有多种有机酸和多肽成分的非细胞毒性新型诱导分化治疗抗癌药。CDA-2治疗血液病的研究主要集中骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndrome, MDS)、慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML)慢性淋巴细胞白血病,淋巴瘤等疾病^[1,3]。研究发现CDA-2可诱导MDS细胞凋亡及细胞G1周期阻滞进而抑制其增殖,具体机制可能和抑制PI3K/AKT/NF-κB通路激活、去甲基化作用激活抑癌基因PTEN和p15INK4B及影响hTERT表达进而影响端粒酶活性相关^[4]。临床研究发现CDA-2

治疗 MDS 在改善贫血方面具有一定作用^[5], 笔者所在医院则对 CDA-2 治疗多种药物无效的 MDS 进行初步研究, 发现其对于 MDS-RA 患者血液学有效率可达 60%^[6], 因此 CDA-2 可以作为低危尤其是单纯以贫血为临床表现患者的选择。此外, CDA-2 可诱导 CML 及其伊马替尼耐药细胞凋亡及 G1 期周期阻滞, 并向成熟粒系分化, 主要机制可能和逆转细胞周期调节基因的甲基化状态有关^[7]。因此, CDA-2 除直接抑制肿瘤增殖外, 其对基因甲基化状态的调节作用值得关注。

CDA-2 对 MM 的作用亦有初步的报道, 该药主要通过内源性途径诱导 MM 细胞凋亡, 其机制和抑制 NF- κ B 的核转位, 下调 Bcl-2、Mcl-1、Survivin 及上调 Bax 表达相关^[8]。另外有研究也发现通过抑制骨髓细胞 NF- κ B 激活来抑制肺癌增殖^[9]。笔者研究发现 CDA-2 可抑制 RPMI8226 细胞株的增殖, 24 h IC₅₀ 为 1.64 mg·mL⁻¹, 其值小于 MDS 细胞株 MUTZ-1(24 h IC₅₀ 为 4.82 mg·mL⁻¹) 及急性髓系白血病细胞株 KG-1、NB4、K562、Kasumi-1、U937 等(24 h IC₅₀ 为 5.51 mg·mL⁻¹)^[4], 可见多发性骨髓瘤较其他血液疾病对该药敏感。进一步经 Hoechst33258、Annexin-V/PI、细胞周期分析、DNA 琼脂糖凝胶电泳等方法研究证实该药通过诱导该细胞株凋亡实现增殖抑制, Western Blot 法证实经 CDA-2(2 mg·mL⁻¹)作用后活化的 caspase-8、caspase-3 表达增强, 且呈时间依赖, 进一步探讨其诱导凋亡的机制发现 TNF、FADD 及 TRAF3 基因 mRNA 表达增高, 其中 TNF 为 TNFR 途径的配体, FADD 为 Fas/FasL 途径激活 caspase-8 的重要分子, 而 TRAF3 则通过加强不同亚型 TNFR 的相互作用加强该途径产生凋亡的效应, 故 CDA-2 可通过死亡受体途径诱导 RPMI8226 细胞株凋亡。

大多数关于 CDA-2 治疗肿瘤的文献报道该药可通过线粒体途径和死亡受体途径诱导肿瘤细胞凋亡, 且以线粒体途径为主, 未对死亡受体途径进行深入的探讨。本实验通过对死亡受体途径重

要蛋白 caspase-8 及 TNF、FADD、TRAF3 等基因的分析, 证实 TNF/TNFR、Fas/FasL 在 CDA-2 诱导 RPMI8226 细胞株的外源性凋亡中均存在不同程度的活化, 最终引起 caspase-8、caspase-3 的激活, 引起凋亡效应。本实验通过细胞周期分析发现, 随着 CDA-2 浓度的提高, DNA 亚二倍体峰逐渐升高, 而 G0/G1 期比例逐渐减少, 与大多数文献报道的 CDA-2 具有 G1 期阻滞作用并不相符, 故值得进一步深入探讨, 亦提示该药对不同肿瘤的作用存在一定的异质性。

REFERENCES

- [1] ROBAK T, KORYCKA A, KASZNICKI M, et al. Purine nucleoside analogues for the treatment of hematological malignancies: pharmacology and clinical applications [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2005, 5(6): 421-444.
- [2] YE B D, SHEN Y P, ZHOU Y H, et al. The apoptosis-inducing effect of uroacitides(CDA-2) on human multiple myeloma RPMI8226 cells [J]. *J Zhejiang Univ Tradit Chin Med*(浙江中医药大学学报), 2010, 34(5): 650-651,657.
- [3] ROBAK T, ROBAK P. Purine nucleoside analogs in the treatment of rarer chronic lymphoid leukemias [J]. *Curr Pharm Des*, 2012, 18(23): 3373-3388.
- [4] HUANG J, YANG M, LIU H, et al. Human urine extract CDA-2 induces apoptosis of myelodysplastic syndrome-derived MUTZ-1 cells through the PI3K/Akt signaling pathway in a caspase-3-dependent manner [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2008, 29(8): 951-964.
- [5] CHEN J X, WANG X, ZHOU Y, et al. Efficacy of uroacitides for myelodysplastic syndromes (MDS): An analysis of 13 cases [J]. *Eva Anal Drug-use Hosp China*(中国医院用药评价与分析), 2010, 10(7): 633-634.
- [6] YU Q H, SHEN Y P, SHAO K D, et al. The effect of CDA-2 in the treatment of myelodysplastic syndrome [J]. *J Zhejiang Univ Tradit Chin Med*(浙江中医药大学学报), 2009, 33(6): 789-799.
- [7] WANG X D, QIU L, LU R Z, et al. Growth inhibition and differentiation of imatinib-resistant chronic myeloid leukemia cell induced by cell differentiation agent *in vitro* [J]. *Natl Med J China*(中华医学杂志), 2007, 87(48): 3999-3404.
- [8] YANG M. The study on the effects and mechanisms of triptolide and uroacitides to dex-resistant and sensitive human multiple myeloma cell lines [D]. Zhejiang, Zhejiang University: 2009.
- [9] WANG X, JIANG C M, WAN H Y, et al. CDA-2, a urinary preparation, inhibits lung cancer development through the suppression of NF-kappaB activation in myeloid Cell [J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e52117.

收稿日期: 2013-03-12