

白花蛇舌草乙醇提取物体外诱导人 AML-M2 白血病细胞凋亡机制研究

陈智¹, 林圣云², 李建新¹, 李晖¹, 熊昊¹, 聂应明¹, 裘玫^{3*} (1.华中科技大学同济医学院附属武汉儿童医院血液肿瘤科, 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, 武汉 430061)

摘要: 目的 观察白花蛇舌草乙醇提取物(ethanol extract of *Hedyotis diffusa* Willd., EEHDW)对 AML-M2 白血病 Kasumi-1 细胞增殖和凋亡的影响机制。方法 采用 MTT 比色法、Hoechst 荧光染色检测测定 EEHDW 作用后 Kasumi-1 细胞增殖和凋亡的情况, Western blotting 法检测 Kasumi-1 细胞中 Bcl-2、Bax、caspase-3、caspase-9、Cyto-C、P65、p-P65、IkB α 、p-IkB α 、IKK α/β 、C-myc 以及 AML1-ETO 的蛋白水平。结果 EEHDW 抑制急性髓系白血病 Kasumi-1 细胞增殖, 并具有时间和浓度依赖性。0.04, 0.06, 0.08 mg·mL⁻¹ 的 EEHDW 能诱导细胞凋亡($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。EEHDW 可以显著上调 Cyto-C、cleaved PARP、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 以及 Bax 的表达水平, 而降低 Bcl-2、C-myc 和 AML1-ETO 蛋白的表达, 同时 EEHDW 能够浓度依赖性地增加 p-P65、p-IkB α 的蛋白表达。结论 EEHDW 诱导 Kasumi-1 细胞凋亡一方面是通过调节 Bax/Bcl-2 的表达影响线粒体途径, 另外一方面还与激活 NF- κ B 信号通路有关, 在这个过程中同时抑制原癌基因 C-myc 和 AML1-ETO 融合基因的表达。

关键词: 白花蛇舌草乙醇提取物; Kasumi-1 细胞; 凋亡; NF- κ B 信号通路

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2020)17-2067-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.17.004

引用本文: 陈智, 林圣云, 李建新, 等. 白花蛇舌草乙醇提取物体外诱导人 AML-M2 白血病细胞凋亡机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(17): 2067-2072.

Study on the Mechanism of Inducing Apoptosis of AML-M2 Cells *in Vitro* by Ethanol Extraction of *Hedyotis Diffusa* Willd.

CHEN Zhi¹, LIN Shengyun², LI Jianxin¹, LI Hui¹, XIONG Hao¹, NIE Yingming¹, QIU Mei^{3*} (1. Department of Hematology, Wuhan Children's Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430016, China; 2. Department of Hematology, The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, China; 3. Clinical College of Chinese Medicine, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the effect of ethanol extract of *Hedyotis diffusa* Willd. (EEHDW) on the proliferation and apoptosis of AML-M2 cells Kasumi-1 and its mechanism. **METHODS** MTT colorimetry and Hoechst staining were used to detect the effect of EEHDW on the proliferation and apoptosis of Kasumi-1 cells. Western blotting was used to detect the protein levels of Bcl-2, Bax, caspase-3, caspase-9, Cyto-C, p65, p-P65, IkB α , p-IkB α , IKK α/β , C-myc and AML1-ETO in Kasumi-1 cells. **RESULTS** EEHDW inhibited the proliferation of Kasumi-1 cells. The 0.04, 0.06 and 0.08 mg·mL⁻¹ of EEHDW could induce apoptosis ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). It could significantly up regulate the expression of Cyto-C, cleaved PARP, cleaved caspase-3, cleaved caspase-9 and Bax, but decreased the expression of Bcl-2, C-myc and AML1-ETO. Meanwhile, EEHDW could increase the expression of p-P65 and p-IkB α in a concentration dependent manner. **CONCLUSION** EEHDW induce apoptosis of Kasumi-1 cells not only related to the regulation of Bax/Bcl-2 expression, but also relate to the activation of NF- κ B signal pathway, which inhibits the expression of C-myc and AML1-ETO fusion gene.

KEYWORDS: ethanol extract of *Hedyotis diffusa* Willd.; Kasumi-1 cell; apoptosis; NF- κ B signal pathway

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)是在骨髓和血液中异常累积原始造血细胞的一类异质性疾病, 基因异常与其发生密切相关。M2b 型 AML(AML-M2b)是 AML 中的一种独特类型, 占 8%~12%^[1], t(8; 21)(q22; q22)染色体异常

是其主要特征, 能产生 AML1-ETO 融合基因。目前常用的化学治疗法虽然可以使病情得到暂时缓解, 但其复发率高, 患者 5 年后的生存率仅为 20%^[2]。在治疗肿瘤疾病的化疗药物中, 约 50%直接来源于天然产物或其衍生物^[3], 比如紫杉醇、长

基金项目: 湖北省卫生计生委面上项目(WJ2017M195); 武汉市中青年医学骨干人才培养计划(武卫生计生[2014]77 号); 武汉市卫计委临床医学科研项目(WX13B19)

作者简介: 陈智, 男, 硕士, 主治医师 Tel: (027)82433402 E-mail: chen_zhi0804@126.com *通信作者: 裘玫, 女, 硕士, 助理研究员 Tel: (027)68889091 E-mail: qiumei1128@126.com

春新碱等已成为临床重要的植物类化疗药品。因此,为了在疗效上取得突破,对传统中药进行研究成为可能的途径之一。

白花蛇舌草是一种抗肿瘤中草药,属于茜草科尔草属,一直沿用至今,其抗肿瘤作用也不断被发现^[4-6],但对于抗 AML1-ETO 阳性白血病的研究很少报道。本实验以白花蛇舌草乙醇提取物(ethanol extract of *Hedyotis diffusa* Willd., EEHDW)作用于 AML-M2 白血病 Kasumi-1 细胞,探讨其诱导凋亡的作用,并从蛋白表达的水平,来研究 EEHDW 诱导 Kasumi-1 细胞凋亡的机制。

1 仪器与试剂

3110 型细胞培养箱(美国 Forma Scientific 公司);12-0625 型垂直电泳及转膜装置(美国 Bio-Rad 公司);FACS Canto II 型流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司);BCD-271W 型 4 °C 及 -20 °C 冰箱(德国 Siemens 公司);DS-970 扫描仪(美国 Epson 公司);CL30/CL31 低温离心机(德国 Heraeus)。

人髓系白血病细胞株 Kasumi-1 由浙江大学血液学研究所惠赠(美国标准生物制品收藏中心,货号:CRL-2724);白花蛇舌草购自杭州萧山医药公司中药分公司(批号:110326);二甲基亚砜(DMSO,中国杭州化学试剂有限公司,批号:20160423);四甲基偶氮唑蓝(MTT)及碘化丙啶(PI)试剂盒(美国 Sigma-Aldrich 公司,批号:A82381024);Caspase-3、Caspase-9、Cyto-C、PRAP、Bcl-2、Bax、P65、p-P65、IkB α 、p-IkB α 、IKK α / β 、C-myc、AML1-ETO 抗体(美国 Cell Signaling 公司,批号分别为 9662S, 9508S, 4280S, 9542S, 15071S, 5023S, 8284S, 3033S, 4814S, 2859S, 2682S, 9420S, 4334S); β -actin 抗体(美国 Santa Cruz 公司,批号:SC-47778);Hoechst33258 染液(美国 Sigma-Aldrich 公司,批号:94403);Western blotting luminol 试剂盒(ECL)(以色列 Biological Industries 公司,批号:20500A)。

2 方法

2.1 EEHDW 的制备

取 200 g 白花蛇舌草的干燥全草,经粉碎后用 5 400 mL 80%乙醇浸泡(室温,0.5 h)并浓缩提取(80 °C, 2 h),再将经过干燥和蒸发得到的提取物溶解于 200 mL 蒸馏水中,用乙酸乙酯进行液-液萃取,把过滤和干燥得到的 5 g 提取物再次溶解于 100 mL 蒸馏水中,并用蒸馏水和体积分数 60%乙醇进行连续多次洗脱,将乙醇馏分洗脱物收集和

干燥后用蒸馏水配成 12 mg·mL⁻¹ 的样品,将样品原液分装于 -20 °C 冷冻保存^[7]。采用超高效液相色谱串联质谱系统(UPLC-MS/MS)检测其纯度,主要成分为对香豆酸(纯度>98%)、反式 6-O-对香豆酰鸡屎藤苷甲酯(纯度>98%),EEHDW 已申请专利(专利号:201410324070.2)。

2.2 细胞培养

将 Kasumi-1 细胞株在 37 °C、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(5~10)×10⁵·mL⁻¹,1~2 d 换液传代 1 次。取对数生长期细胞进行实验。

2.3 MTT 比色法检测细胞存活率情况

配置 EEHDW 干预组,按照药物浓度从低到高分 5 个剂量组,终浓度分别为 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10 mg·mL⁻¹,另外设置 1 组不加 EEHDW 为空白组。取对数生长期 Kasumi-1 细胞以 1×10⁵·mL⁻¹ 接种于 96 孔培养板,使每孔终体积为 200 μ L,按终浓度 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10 mg·mL⁻¹ 分别加入 EEHDW,置于培养箱中孵育 24, 48 h 后,每孔加入 20 μ L 的 MTT 工作液,37 °C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中继续培养 4 h,3 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,弃上清,加入 DMSO,每孔 200 μ L,待蓝紫色甲臞充分溶解后,于紫外分光光度计测 570 nm 处吸光度值(A 值)。按照公式计算细胞存活率:细胞存活率(%)=(处理组 A 值/对照组 A 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)。

2.4 Hoechst 荧光染色检测细胞凋亡

取对数生长期 Kasumi-1 细胞以 1×10⁵·mL⁻¹ 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 EEHDW,使终浓度分别达到 0.02, 0.04, 0.06 mg·mL⁻¹ 分别为 0.02, 0.04, 0.06 mg·mL⁻¹ EEHDW 组,同时设置空白组,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 μ L 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 μ g·mL⁻¹ Hoechst 33258 染液均匀滴涂于细胞涂层,避光反应 20 min,弃 Hoechst 33258

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。

2.5 Western blotting 分析相关蛋白表达水平

检测凋亡相关蛋白(RARP, caspase-3、caspase-9、Cyto-C、Bcl-2、Bax), NF- κ B 信号通路蛋白(P65、p-P65、IkBa、p-IkBa、IKK α / β)以及 C-myc、AML1-ETO 蛋白的表达。总蛋白提取后, 按 Bradford 法测蛋白浓度, 取 10 μ g 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 $g \cdot L^{-1}$ 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 $^{\circ}C$ 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 blotting 显示的蛋白条带扫描后用 Imagequant 5.1 软件进行量化分析, 其灰度用 A 值计算。

2.6 统计学处理

实验数据采用 SPSS 17.0 软件分析, 计量资料实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。单变量 2 组资料比较采取 t 检验, 多组资料比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 EEHDW 对 Kasumi-1 细胞增殖的影响

EEHDW 能有效抑制急性髓系白血病细胞株 Kasumi-1 增殖($P < 0.05$), 并具有时间和浓度依赖性。24 和 48 h 的 IC_{50} 分别为 0.077, 0.083 $mg \cdot mL^{-1}$ 。0.04, 0.06, 0.08, 0.10 $mg \cdot mL^{-1}$ EEHDW 作用后的 Kasumi-1 细胞存活率与空白组比较明显下降($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。且相同 EEHDW 浓度(0.06~0.10 $mg \cdot mL^{-1}$)时, 作用 48 h 的细胞存活率比作用 24 h 明显降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结果见图 1。

3.2 EEHDW 对急性髓系白血病 Kasumi-1 细胞凋亡形态的影响

对于空白组, 荧光显微镜下细胞内几乎未见蓝色荧光增强的凋亡小体, 细胞形态完整。而不同浓度(0.02, 0.04, 0.06 $mg \cdot mL^{-1}$) EEHDW 处理 Kasumi-1 细胞 24 h 后, 部分细胞核出现碎片、分叶和固缩, 凋亡形态学结果见图 2, 在用药组中, 凋亡小体随着药物浓度增加逐渐增多。

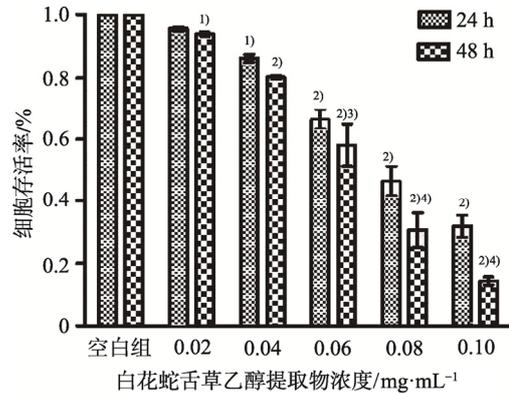


图 1 白花蛇舌草乙醇提取物对 Kasumi-1 细胞增殖的抑制作用

与空白组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与同浓度 24 h 组比较, ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 1 Inhibition effect of ethanol extract of *Hedyotis diffusa* Willd. on proliferation of Kasumi-1 cell

Compared with the blank group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; compared with 24 h, ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$.

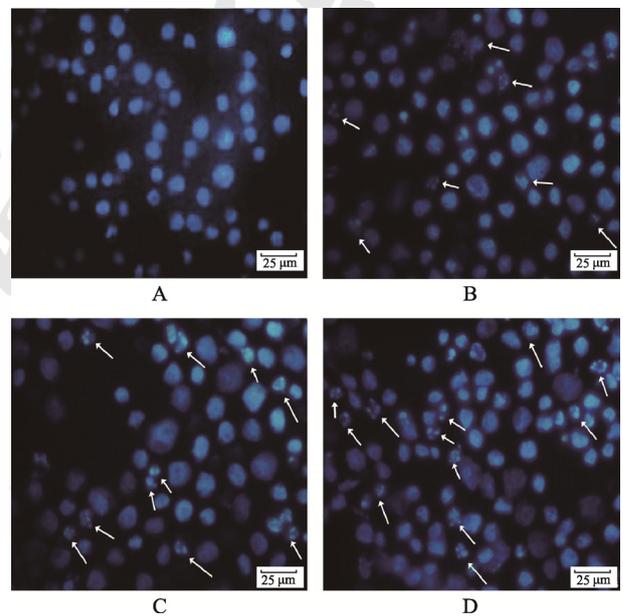


图 2 Hoechst 333258 染色结果(100×)

A-空白组; B-EEHDW 0.02 $mg \cdot mL^{-1}$; C-EEHDW 0.04 $mg \cdot mL^{-1}$; D-EEHDW 0.06 $mg \cdot mL^{-1}$ 。

Fig. 2 Results of Hoechst 333258 stainin(100×)

A-blank group; B-EEHDW 0.02 $mg \cdot mL^{-1}$; C-EEHDW 0.04 $mg \cdot mL^{-1}$; D-EEHDW 0.06 $mg \cdot mL^{-1}$ 。

3.3 EEHDW 对 Kasumi-1 细胞株凋亡相关蛋白水平的影响

与空白组比较, 0.02, 0.04, 0.06 $mg \cdot mL^{-1}$ 的 EEHDW 作用于急性髓系白血病细胞 Kasumi-1 细胞株 24 h 后, Bax、cleaved PARP、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 以及 Cyto-C 蛋白的表达水平逐渐升高, 其中 0.06 $mg \cdot mL^{-1}$ EEHDW 组与空白组的差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而 Bcl-2 水

平明显降低, 0.04 和 0.06 mg·mL⁻¹ EEHDW 组与空白组的差异均有统计学意义($P<0.05$)。结果见图 3。

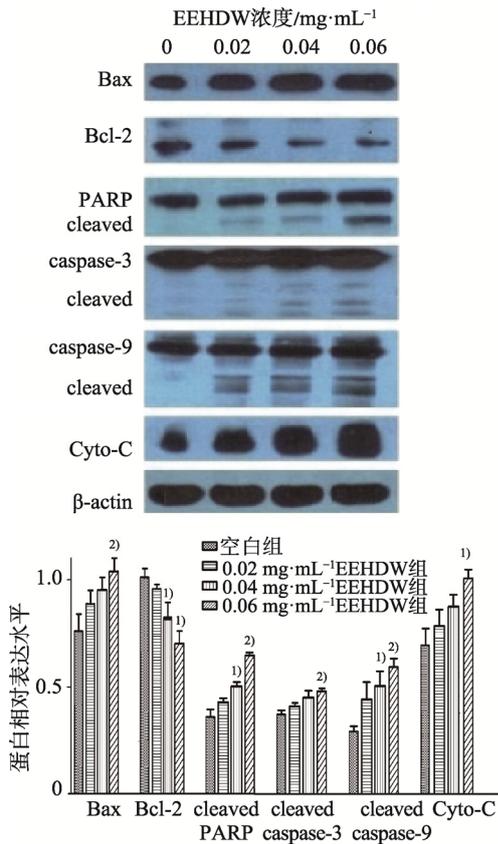


图 3 Western blotting 检测相关凋亡蛋白表达的变化($\bar{x} \pm s, n=3$)
与空白组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 3 Changes of levels of apoptosis related protein detected by Western blotting($\bar{x} \pm s, n=3$)
Compared with the blank group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

3.4 EEHDW 对 Kasumi-1 细胞内 NF- κ B 信号通路蛋白水平的影响

实验结果显示, 不同浓度 EEHDW 处理 Kasumi-1 细胞 24 h, 随着细胞凋亡的增加, p-P65、p-I κ B α 的表达呈浓度依赖性上升, 而 I κ B α 、IKK α / β 则下降明显, 0.06 mg·mL⁻¹ EEHDW 组与空白组相比, 差异均具有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$); P65 与空白组相比, 蛋白表达基本不变, 结果见图 4。

3.5 EEHDW 对 Kasumi-1 细胞内其他相关蛋白水平的影响

经 Western blotting 检测, EEHDW 作用于 Kasumi-1 细胞 24 h 以后, 随着药物浓度的增加, 细胞内 C-myc 和 AML1-ETO 融合蛋白的表达逐渐降低, 与空白组相比, 0.04, 0.06 mg·mL⁻¹ 的 EEHDW 组差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 呈现药物剂量的依赖性, 结果见图 5。

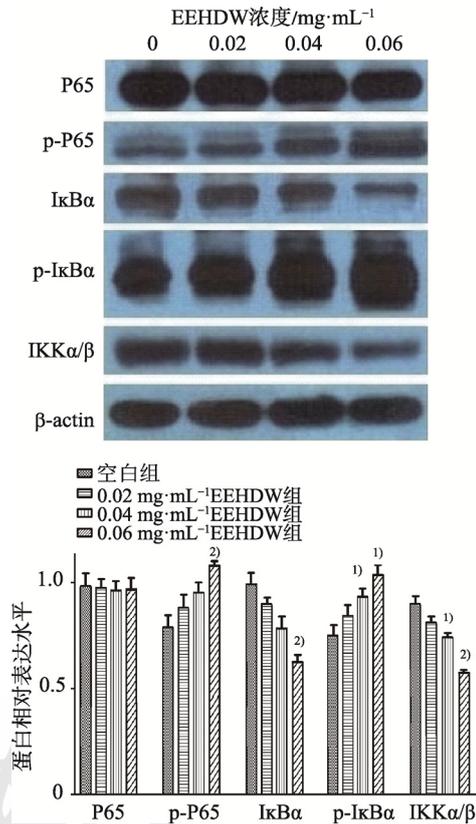


图 4 Western blotting 法检测 NF- κ B 信号通路蛋白水平表达的情况($\bar{x} \pm s, n=3$)
与空白组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 4 Levels of protein expression in NF- κ B signaling pathway detected by Western blotting($\bar{x} \pm s, n=3$)
Compared with the blank group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

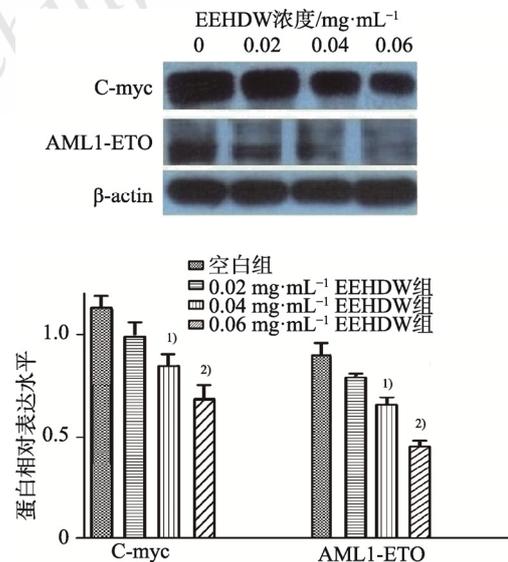


图 5 Western blotting 检测 Kasumi-1 细胞内蛋白水平的表达($\bar{x} \pm s, n=3$)
与空白组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 5 Levels of protein expression in Kasumi-1 cells detected by Western blotting($\bar{x} \pm s, n=3$)
Compared with the blank group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

4 讨论

近年来,由于传统抗肿瘤中药具有低毒、多靶点以及抗耐药等特点,在国际上获得越来越多关注,成为研究的热点^[8]。t(8; 21)(q22; q22)在白血病中是最常见的染色体易位类型,产生的特异融合蛋白 AML1-ETO 可以阻断髓系细胞的分化,并和细胞的凋亡相关。虽然 AML1-ETO 阳性的 AML 通常被认为具有较好预后^[9],但是长期临床观察发现,接近 40%的患者会复发,部分患者化疗缓解率低。

EEHDW 有明确的抗肿瘤作用^[10-11],对肿瘤细胞具有广泛的抑制作用,但其作用机制及靶点尚未完全明确,本研究将 EEHDW 作用于 t(8; 21)(q22; q22)急性髓系白血病的细胞株 Kasumi-1。实验研究首先发现,EEHDW 可以抑制 Kasumi-1 细胞的生长增殖,并且呈时间-剂量依赖性。采用 Hoechst 染色后,在显微镜下观察到凋亡细胞的典型特征:细胞核固缩,细胞出现空泡,周围出现凋亡小体状等;也呈现出剂量相关,从细胞形态学上证明了凋亡的发生。

维持细胞增殖和凋亡的平衡是一个多基因参与调控的过程,其中抗凋亡的 Bcl-2、促凋亡蛋白 Bax 和 caspase 家族尤为重要^[12]。有研究^[13]表明,内源性细胞凋亡途径是由线粒体释放 Cyto-C 介导的,通过被激活 caspase-9,启动了 caspase-3 在内的 caspase 级联反应过程,将线粒体内膜上的 Cyto-C 从释放到胞浆中。本研究证实,EEHDW 通过诱导 Kasumi-1 细胞凋亡达到抑制其生长的效果。在该过程中 Caspase-9 和 Caspase-3 被激活,且 Cyto-C 的蛋白水平随着药物浓度的增长明显升高。因为 Bcl-2 家族可调控线粒体介导的内源性凋亡途径,其中 Bax 与 Bcl-2 比例是影响细胞凋亡的关键因素^[14],降低 Bcl-2 的表达水平有利于抗肿瘤^[15]。本研究结果同时显示:白花蛇舌草乙醇提取物能够明显上调 Bax 的表达,而下调 Bcl-2 的表达,Bax 与 Bcl-2 比例明显上高。说明 EEHDW 是通过调节 Bax/Bcl-2 的表达来影响线粒体途径,发挥诱导 Kasumi-1 细胞凋亡的作用。

已有研究^[16]证实, NF- κ B 可通过靶基因产物 Bax、Bcl-2 等抑制内源性凋亡途径。所以笔者采用 Western blotting 进一步检测 NF- κ B 信号通路中的蛋白表达,希望揭示出可能存在的药理作用机制。NF- κ B p65 作为该家族 5 种相关转录因子构成

之一,可以形成同聚物或异聚物,继而调控基因表达^[17]。而 NF- κ B 的激活分为经典途径和非经典途径。在经典途径中,当细胞受到刺激时, IKK 复合体被激活,磷酸化 NF- κ B 的抑制因子 I κ B α ,并介导其降解,从而激活 NF- κ B,使其得以入核并发挥转录活性功能;而非经典途径激活中,当细胞受特异性的信号刺激时,蛋白激酶 NIK 激活下游的 IKK α ,使 p100 发生磷酸化,从而激活该通路^[18]。有研究也表明 NF- κ B 的激活可以促进细胞凋亡,例如化疗药物依托泊苷、替尼泊苷等激活 NF- κ B 后使细胞表达 FasL 增加从而促进肿瘤细胞凋亡^[19]。在本研究中观察到 EEHDW 能够浓度依赖性地上调 Kasumi-1 细胞中 p-P65、p-I κ B α 的表达水平,说明药物诱导细胞凋亡时存在 NF- κ B 通路的激活,激活的程度与 EEHDW 的剂量成正比,同时激活 NF- κ B 需要依赖于 I κ B α 活化和降解。IKK α / β 下降说明了通路的激活并不依赖 IKK α / β ,可能还存在其他途径。

AML1-ETO 是 t(8;21)染色体易位产生的融合基因,其表达的蛋白可以募集共抑制复合物,影响正常信号的传导和抑癌基因的表达,从而导致白血病的发生^[20]。同时有研究^[21]显示,在白血病细胞中,包括 t(8; 21)在内的染色体易位能激活 C-myc 基因表达,促进肿瘤细胞增殖。因此,在 EEHDW 诱导 Kasumi-1 细胞凋亡的同时,检测了其融合基因和 C-myc 基因表达的影响,目的是证实 EEHDW 是否能特异性地抑制 AML1-ETO 融合蛋白的表达,达到诱导白血病细胞凋亡的效应。结果显示 EEHDW 能够明显抑制 AML1-ETO 融合蛋白和 C-myc 蛋白的表达水平,并呈现浓度依赖性。

综上所述,本研究证实了 EEHDW 通过诱导 Kasumi-1 细胞凋亡,发挥增殖抑制作用,具有浓度依赖性;体外诱导白血病细胞凋亡的机制,可能与药物能够明显增加 Cyto-C 的释放和 PARP 的裂解,以及激活 caspase-3、caspase-9,影响 Bax 与 Bcl-2 相对比例,通过线粒体途径诱导 Kasumi-1 细胞凋亡。而药物诱导细胞凋亡时存在 NF- κ B 通路的激活。进一步的研究发现,EEHDW 能明显抑制原癌基因 C-myc 的表达和 Kasumi-1 细胞特征性 AML1-ETO 融合基因的表达,从而发挥抗白血病的作用。然而,EEHDW 具体降低 AML1-ETO 融合蛋白表达的机制尚待阐明,今后将做进一步的研究。

REFERENCES

- [1] TELFER J C, ROTHENBERG E V. Expression and function of a stem cell promoter for the murine CBFa2 gene: Distinct roles and regulation in natural killer and T cell development [J]. *Dev Biol*, 2001, 229(2): 363-382.
- [2] ROWE J M. Why is clinical progress in acute myelogenous leukemia so slow? [J]. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2008, 21(1): 1-3.
- [3] NEWMAN D J, CRAGG G M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010 [J]. *J Nat Prod*, 2012, 75(3): 311-335.
- [4] SUN G D, WEI L H, FENG J Y, et al. Inhibitory effects of *Hedyotis diffusa* Willd. on colorectal cancer stem cells [J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(6): 3875-3881.
- [5] SUN C, WU M J, JIANG Z Q, et al. Effective components 2-hydroxyl group-3-tectoquinone of *Herba Hedyotis* inducing liver cancer cells apoptosis by IL-6/STAT3 signaling pathway [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志)*, 2018, 33(12): 5346-5350.
- [6] SUN X C, GUO J C, SUN C, et al. The inhibitory effect of extracts from *Platycodon grandiflorum* and *Hedyotis diffusa* Willd. on human lung cancer cells A549 [J]. *Chin Agric Sci Bull(中国农学通报)*, 2019, 35(1): 144-148.
- [7] YAO T H, JIANG J P, LIN S Y, et al. Optimization of total flavonoids extraction from *Hedyotis diffusa* Willd. by means of response surface methodology [J]. *J Zhejiang Chin Med Univ(浙江中医药大学学报)*, 2012, 36(4): 425-429.
- [8] DENG F C, YU Z J, YANG Y, et al. Effect and mechanism of cryptotanshinone on apoptosis of human gastric cancer cell line SGC-7901 [J]. *J Beijing Univ Tradit Chin Med(北京中医药大学学报)*, 2015(7): 457-461.
- [9] PALLISGAARD N, HOKLAND P, RIISHØJ D C, et al. Multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction for simultaneous screening of 29 translocations and chromosomal aberrations in acute leukemia [J]. *Blood*, 1998, 92(2): 574-588.
- [10] LYU X, ZHOU L S, YANG L, et al. Intervention effect of ethanol extract of *Oldenlandia diffusa* on TGF- β 1-induced epithelial mesenchymal transformation of human lung adenocarcinoma cell H358 [J]. *Chin Pharm J(中国药学杂志)*, 2015, 50(7): 590-594.
- [11] JIN Y Y, LAI Z J, YAN Z K, et al. Effects of ethanol extract of *Hedyotis diffusa* Willd. on the growth of colorectal cancer drug-resistant xenograft in nude mice [J]. *Anti-tumor Pharm(肿瘤药理学)*, 2016, 6(5): 343-348.
- [12] YOULE R J, STRASSER A. The Bcl-2 protein family: Opposing activities that mediate cell death [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(1): 47-59.
- [13] LI M, LIN J. The apoptotic pathways and their mechanisms [J]. *J Int Obstet Gynecol(国际妇产科学杂志)*, 2014, 41(2): 103-107.
- [14] KLUCK R M. The release of cytochrome C from mitochondria: A primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis [J]. *Science*, 1997, 275(5303): 1132-1136.
- [15] WANG Y Y, YANG Y X, ZHAO R, et al. Bardoxolone methyl induces apoptosis and autophagy and inhibits epithelial-to-mesenchymal transition and stemness in esophageal squamous cancer cells [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9: 993-1026.
- [16] LIN K I, LEE S H, NARAYANAN R, et al. Thiol agents and Bcl-2 identify an alphavirus-induced apoptotic pathway that requires activation of the transcription factor NF-kappa B [J]. *J Cell Biol*, 1995, 131(5): 1149-1161.
- [17] TANG H L. The progress of NF- κ B cell signaling and disease [J]. *Heilongjiang Med Pharm(黑龙江医药科学)*, 2012, 35(5): 34-36.
- [18] ROTHWART D M, ZANDI E, NATOLI G, et al. IKK- γ is an essential regulatory subunit of the I κ B kinase complex [J]. *Nature*, 1998, 395(6699): 297-300.
- [19] KASIBHATLA S, BRUNNER T, GENESTIER L, et al. DNA damaging agents induce expression of fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF- κ B and AP-1 [J]. *Mol Cell*, 1998, 1(4): 543-551.
- [20] ZHANG J S, HUG B A, HUANG E Y, et al. Oligomerization of ETO is obligatory for corepressor interaction [J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(1): 156-163.
- [21] KARASAWA M, OKAMOTO K, MACHARA T, et al. Detection of C-myc oncogene amplification in a CML blastic phase patient with double minute chromosomes [J]. *Leuk Res*, 1996; 20(1): 85-91.

收稿日期: 2019-10-25

(本文责编: 李艳芳)