

## 7-乙酰基-鲁山冬凌草甲素诱导 HL-60 细胞周期阻滞及其机制研究

刘高媛<sup>1</sup>, 余祖胤<sup>2</sup>, 善亚君<sup>2</sup>, 柳晓兰<sup>2</sup>, 赵振虎<sup>2</sup>, 赵勤实<sup>3</sup>, 陈丁丁<sup>1\*</sup>, 从玉文<sup>2\*</sup>

**[摘要]** 目的 研究 7-乙酰基-鲁山冬凌草甲素 (7-acetyl-lushanrubescensin A, ARA) 对人急性髓系白血病细胞株 HL-60 的细胞增殖和细胞周期的影响, 并对其作用机制进行探讨。方法 MTT 法检测 ARA 对 HL-60 细胞增殖的影响; 在 ARA 作用 HL-60 细胞不同时间后, 流式细胞仪检测细胞周期变化; Western 印迹检测周期相关蛋白 Rb, p (phospho)-Rb (ser795)、p-Rb (ser807/811)、细胞周期蛋白 (cyclin) D1、cyclin D3、cyclin E2、CDK4 及 CDK6 的蛋白表达; 流式细胞仪检测细胞内活性氧 (ROS) 水平。结果 ARA 剂量依赖性地抑制 HL-60 细胞增殖, 48 h 的  $IC_{50}$  为  $(1.96 \pm 0.08) \mu\text{mol/L}$ 。ARA 诱导 HL-60 细胞发生明显的细胞周期  $G_0/G_1$  阻滞, 具有时间和浓度依赖性。机制研究显示 ARA 引起 Rb 总蛋白出现移行条带, 并抑制 p-Rb (ser795) 位点磷酸化, 显著抑制 CDK4 的蛋白表达, 并部分降低 cyclin D3 和 cyclin E2 的表达水平, 但对 cyclin D1 和 CDK6 的作用则不明显。此外, ARA 显著增加 HL-60 细胞内 ROS 水平, 而抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸 (NAC) 能够阻断 ARA 诱导的 ROS 升高及细胞周期阻滞。结论 ARA 能够明显抑制白血病细胞增殖, 诱导细胞周期阻滞, 其机制可能与抑制 Rb 活化和降低 cyclin D3、cyclin E2 和 CDK4 的表达水平相关, 并且 ROS 在 ARA 介导的生物学效应中可能有重要作用。

**[关键词]** 7-乙酰基-鲁山冬凌草甲素; HL-60 细胞; 细胞增殖; 细胞周期阻滞; 活性氧; 白血病

**[中图分类号]** R733.7

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1000-5501(2010)02-0156-04

### HL-60 cell cycle arrest induced by 7-acetyl-lushanrubescensin A and its mechanism

LIU Gao-yuan<sup>1</sup>, YU Zu-yin<sup>2</sup>, SHAN Ya-jun<sup>2</sup>, LIU Xiao-lan<sup>2</sup>, ZHAO Zhen-hu<sup>2</sup>, ZHAO Qin-shi<sup>3</sup>, CHEN Ding-ding<sup>1\*</sup>, CONG Yu-wen<sup>2\*</sup>

(1. Department of Clinical Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 2. Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China; 3. Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

\* Corresponding author, CHEN Ding-ding, Tel: 025-83271264; CONG Yu-wen, Tel: 010-66930295

**[Abstract]** **Objective** To explore the effect of 7-acetyl-lushanrubescensin A (ARA) on cell proliferation and cell cycle of HL-60 myeloid leukemia cell line, and to further investigate the mechanism of action. **Methods** MTT assay was used to assess the proliferation of HL-60 cells treated with ARA. After treatment of HL-60 cells with ARA of different durations, cell cycle changes were determined by flow cytometry. The protein expression of Rb, p (phospho)-Rb (ser795), p-Rb (ser807/811), cyclin D1, cyclin D3, cyclin E2, CDK4 and CDK6 were detected by Western blot. The intracellular reactive oxygen species (ROS) level was measured by flow cytometry. **Results** ARA inhibited the proliferation of HL-60 cells in a concentration-dependent manner, with an  $IC_{50}$  of  $(1.96 \pm 0.08) \mu\text{mol/L}$  at 48 h. ARA induced significant  $G_0/G_1$  phase arrest of HL-60 cells in a time- and concentration-dependent manner. Studies on the mechanisms underlying these effects indicated that treatment with ARA induced the rapidly migrating band of total Rb protein, and reduced the pRb phosphorylation on ser795. Furthermore, ARA markedly inhibited the protein expression of CDK4, and partially decreased expression of cyclin D3 and cyclin E2, but had no effect on cyclin D1 and CDK6. In addition, ARA significantly increased the intracellular ROS level of HL-60 cells, whereas antioxidant NAC blocked the ROS production and cell cycle arrest induced by ARA. **Conclusion** ARA can significantly inhibit proliferation and induce cell cycle arrest of leukemia cells. The mechanisms underlying these effects may be related to inhibition of pRb phosphorylation and down-regulation of cyclin D3, cyclin E2, and CDK4 protein expression. Furthermore, ROS production may play an important role in the biological effects of ARA.

**[Key words]** 7-acetyl-lushanrubescensin A; HL-60 cells; cell proliferation; cell cycle arrest; reactive oxygen species; leukemia

**[作者简介]** 刘高媛, 女, 硕士研究生, 主要从事分子药理学研究, E-mail: jennielgy@yahoo.com.cn

**[作者单位]** 1. 中国药科大学临床药学教研室, 南京 210009; 2. 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850; 3. 中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650204

**[通讯作者]** 陈丁丁, Tel: 025-83271264; 从玉文, Tel: 010-66930295

急性髓系白血病 (AML) 是失去正常定向分化功能的非成熟的白血病细胞在体内堆积而产生异常造血的一种克隆性疾病, 可直接导致中性粒细胞减少症、贫血及血小板减少症等的发生<sup>[1]</sup>。在过去 40 年里, 得益于全反式维 A 酸 (ATRA) 与三氧化二砷 ( $As_2O_3$ ) 的联合用药, 急性早幼粒细胞白血病 (APL, AML 的一种特殊亚型) 的治疗取得了很大进展。此外, 对较年轻人群而言, 阿糖胞苷和蒽环类抗生素的使用可使 AML 患者痊愈率达到 50% ~ 75%。然而年长患病人由于无法承受强烈的化疗反应, 其治疗方面尚存瓶颈。尤其不容乐观的是, 即便初治成功, 仍有很多患者死于此种疾病的复发。因此, 寻找一种新型高效的抗白血病治疗药物仍迫在眉睫。

香茶菜属 (*Isodon*) 植物是我国民间广泛使用的草药, 多数具有抗菌、消炎和抗肿瘤等功效<sup>[2]</sup>。对映贝壳杉烷类二萜化合物在香茶菜属植物中含量丰富, 是这些植物抗肿瘤作用的主要活性成分。为人所熟知的冬凌草甲素 (oridonin) 是这类植物抗癌作用的重要活性成分<sup>[3]</sup>。研究表明冬凌草甲素对一系列不同来源的肿瘤细胞如前列腺癌、乳腺癌、非小细胞肺癌、急性白血病、多形性恶性胶质瘤以及人黑色素瘤肿瘤细胞具有诱导细胞凋亡和抑制增殖作用<sup>[4~7]</sup>。我们实验室先前的研究发现其中一种活性化合物苞叶香茶菜庚素 (melissoidesin G, MOG) 能够通过诱导白血病细胞凋亡发挥抗肿瘤作用。在此研究基础上, 本文探讨了另一种对映贝壳杉烷类二萜化合物, 7-乙酰基 鲁山冬凌草甲素 (7-acetyl lushanrubescensin A, ARA) 对白血病细胞的细胞增殖和细胞周期的影响, 并对其作用机制进行初步研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 试剂与药品** 7-乙酰基 鲁山冬凌草甲素 (ARA) 由中科院昆明植物所赵勤实教授提供, 化学结构见图 1; 化合物储存液用 DMSO 配制, 使用时用培养液稀释; RPMI 1640、新生牛血清均购自 Gibco 公司; RNAase 购自绿生源生物有限公司; 碘化丙啶 (propidium iodide, PI)、噻唑蓝 (MTT) 均购自 Sigma 公司; Annexin-FITC 试剂盒购自南京凯基生物有限公司; 细胞培养板购自 Costar; 抗 CDK4、CDK6、cyclin D1、cyclin E2、Rb p (phospho)-Rb 等单克隆抗体均购自 Cell Signaling 公司;  $\beta$ -actin 抗体及辣根过氧化物酶标记的二抗购自 Santa Cruz 公司; 辣根过氧化物酶显色底物 ECL 购自 Cell Signaling 公司; DCFH-DA 荧光探针购自 Sigma 公司。

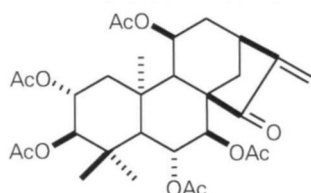


图 1 7-乙酰基 鲁山冬凌草甲素的化学结构

**1.1.2 仪器** FACSCalibur 流式细胞仪为美国 Becton Dickinson 公司产品; DN-9602G 型酶标仪为北京普朗新技术有限公司产品。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞株与细胞培养** 人急性髓系白血病 HL-60 细胞

株 (本室保存) 用含体积分数 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养基在 37℃、5%  $CO_2$  饱和湿度的条件下培养。

**1.2.2 MTT 法检测细胞增殖** 按照文献所示方法进行 MTT 试验, 取对数生长期的 HL-60 细胞, 以  $1.1 \times 10^5$  /ml 的密度接种于 96 孔培养板中。取化合物储存液, 设置不同作用浓度, 用 RPMI 1640 培养液稀释后加入 96 孔板至终浓度, 放入细胞培养箱。MTT 法检测 ARA 对 HL-60 细胞增殖影响, 酶标仪上于波长 570 nm 处读取光密度值, 绘制剂量效应曲线, 求出 ARA 对 HL-60 细胞的半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ )。

**1.2.3 PI 单染法检测细胞周期变化** 取对数生长期的 HL-60 细胞, 以  $2 \times 10^5$  /L 的密度接种于 6 孔板中, 给药组分别加入不同浓度的受试化合物, 空白对照组给予等体积的 DMSO。加药作用至相应时间点, 离心收集单细胞悬液 (500  $\times g$ , 5 min), 体积分数为 70% 的冰乙醇固定 4 过夜, 固定后的细胞离心, 弃上清, 100  $\mu$ l (1 mg/ml) RNase A 酶, 37℃ 处理 30 min, PI (100  $\mu$ g/ml) 染色后, 流式细胞仪上机检测。

**1.2.4 流式细胞仪检测活性氧 (ROS) 生成** 将 HL-60 细胞以  $2 \times 10^5$  /ml 接种至 6 孔板, 加药作用至相应时间点, 离心收集单细胞悬液 (500  $\times g$ , 5 min), 加入标记探针 DCFH-DA 至终浓度 10  $\mu$ mol/L, 置 37℃ 15 min, 流式细胞仪测定在激发光波长 485 nm, 发射波长 525 nm 处的荧光值。

**1.2.5 Western 印迹** 取对数生长期的 HL-60 细胞, 以  $2 \times 10^5$  /ml 接种于 60 mm 细胞培养皿中, 药物终浓度为 0.312  $\mu$ mol/L、0.625  $\mu$ mol/L 和 1.25  $\mu$ mol/L, 空白对照组加入 RPMI 1640。12 h 后离心收集细胞, 加入裂解缓冲液冰浴 15 min, 4℃ 12 000  $\times g$  离心 10 min 后取上清测蛋白浓度, 加入上样缓冲液, 100℃ 变性 7 min。每份样品取 20  $\mu$ g 蛋白样品进行 SDS-PAGE, 将电泳分离的蛋白转移到硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h 后加入一抗 4℃ 过夜。TBST 洗脱 3 次, 每次 10 min。加入相应的二抗, 室温孵育 1 h, TBST 洗脱 3 次, 每次 10 min。化学发光剂 ECL 孵育, 暗室曝光。扫描仪分析实验结果。

### 1.3 统计学分析

实验数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 所有实验均重复 3 次。统计分析采用 SAS 9.1 软件进行具有一个重复测量的单因素多水平方差分析, 作图采用 Origin 7.5 软件。

## 2 结果

### 2.1 ARA 对 HL-60 细胞增殖的影响

如图 2 所示, 不同浓度的 ARA 处理 HL-60 细胞 48 h 后, 对细胞增殖均有抑制作用, ARA 浓度越高, 其增殖抑制效应越强, 呈现明显的剂量依赖性。48 h 的  $IC_{50}$  为  $(1.96 \pm 0.08) \mu$ mol/L。

### 2.2 ARA 对 HL-60 细胞周期的影响

流式细胞仪检测细胞周期的结果显示 (图 3), 不同浓度 (0.625 ~ 2.5  $\mu$ mol/L) 的 ARA 作用于 HL-60 细胞 6 h 后, 细胞周期均无明显改变, 12 h 后 ARA 引起 HL-60 细胞  $G_0/G_1$  期细胞比例剂量依赖性增加。在 1.25 和 2.5  $\mu$ mol/L ARA 作用于 HL-60 细胞 12 h 后 (表 1),  $G_0/G_1$  期细胞比例明显高于对照组 ( $P < 0.05$ ), S 期细胞比例明显减少 ( $P < 0.05$ ),  $G_2/M$  期细胞比例则改变不明显, 没有统计学差异。这些结果显示 ARA 诱导 HL-60 细胞发生显著的  $G_0/G_1$  期周期阻滞。

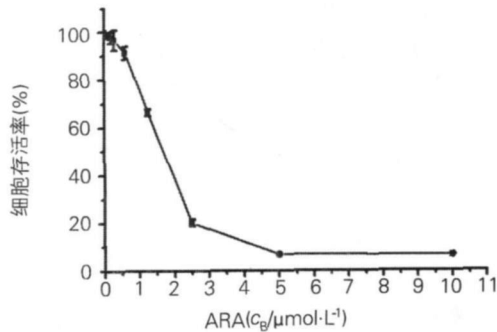
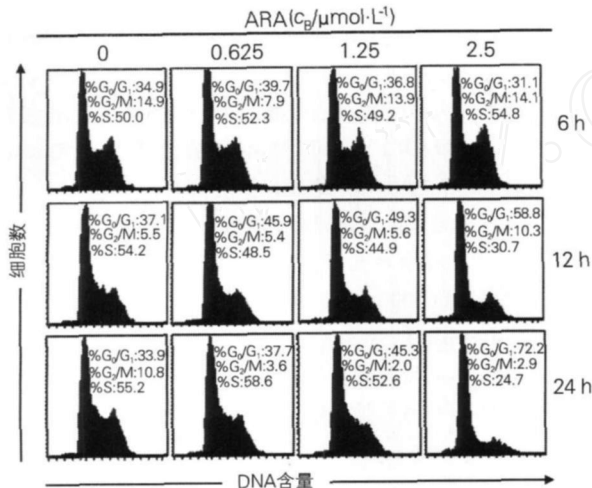


图2 48 h ARA 对 HL-60 细胞增殖抑制曲线

图3 ARA 处理 HL-60 细胞 6、12 和 24 h 后对细胞周期的影响 ( $n=3$ )表1 不同浓度 ARA 处理 12 h 后对 HL-60 细胞周期百分比的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别                                             | G <sub>0</sub> / G <sub>1</sub> | S             | G <sub>2</sub> / M |
|------------------------------------------------|---------------------------------|---------------|--------------------|
| 对照                                             | 35.08 ± 1.96                    | 51.35 ± 5.64  | 9.06 ± 2.25        |
| ARA (C <sub>B</sub> / μmol · L <sup>-1</sup> ) |                                 |               |                    |
| 0.625                                          | 38.43 ± 1.62                    | 52.51 ± 3.86  | 9.05 ± 2.25        |
| 1.25                                           | 41.93 ± 0.81*                   | 48.98 ± 1.22  | 9.09 ± 2.01        |
| 2.5                                            | 54.69 ± 2.14*                   | 36.67 ± 3.71* | 8.65 ± 1.58        |

$n=4$ ; \*  $P < 0.05$  与对照组相比

### 2.3 ARA对周期相关蛋白表达的影响

Rb蛋白磷酸化是 G<sub>1</sub> 期向 S 期发展的关键进程。为阐明 ARA 诱导 HL-60 细胞 G<sub>0</sub> / G<sub>1</sub> 期阻滞的原因,首先通过 Western 印迹检测 Rb、p-Rb (ser795) 以及 p-Rb (ser807/811) 等蛋白的变化。如图 4 所示,不同浓度 ARA 处理 HL-60 细胞 12 h 后,Rb 蛋白出现快速移行条带,并具有明显的剂量效应。同时,ARA 剂量依赖性降低 p-Rb (ser795) 蛋白表达,但对 p-Rb (ser807/811) 的表达无显著影响。通过对 cyclin D1、cyclin D3、cyclin E2、CDK4 及 CDK6 等蛋白的检测,结果显示,ARA 剂量依赖性降低 CDK4 的表达,高浓度 (2.5 μmol/L) ARA 处理后 CDK4 的表达则被完全抑制,此时 cyclin D3 和 cyclin E2 的表达也明显降低。不同浓度 ARA 对 cyclin D1 和 CDK6 的蛋白表达水平均无明显影响 (图 5)。

### 2.4 ARA 对 HL-60 细胞内活性氧 (ROS) 生成的影响

前期研究中我们发现另一种对映贝壳杉烷类二萜化合

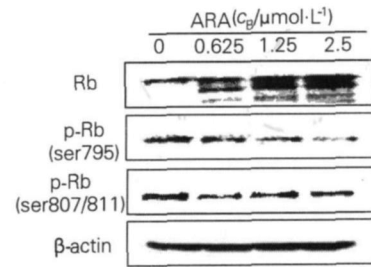


图4 不同浓度 ARA 处理 HL-60 细胞 12 h 后对 Rb、p-Rb (ser795)、p-Rb (ser807/811) 表达的影响

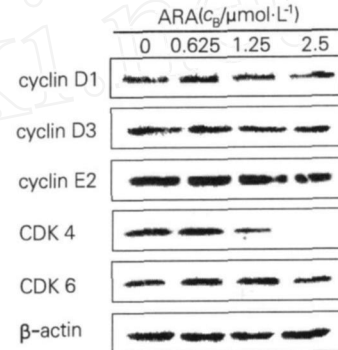
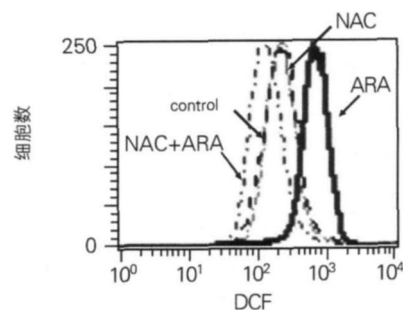


图5 不同浓度 ARA 处理 HL-60 细胞 12h 后对 cyclin D1、cyclin D3、cyclin E2、CDK4 及 CDK6 表达的影响

物 MOG 能够诱导细胞内 ROS 水平升高,导致氧化还原状态失衡<sup>[8]</sup>。为了观察同类化合物 ARA 是否具有诱导 ROS 生成的作用,采用特异性荧光探针 DCFH-DA 标记检测 ARA 处理后细胞内的 ROS 水平。如图 6 显示,ARA 处理 HL-60 细胞 3 h 后,DCFH-DA 荧光强度明显高于空白对照组,提示 ARA 诱导细胞内 ROS 水平升高。

图6 NAC 对 ARA 诱导 HL-60 细胞内 ROS 水平升高的影响  
control 空白对照; NAC 300 μmol/L; ARA 2.5 μmol/L

### 2.5 ROS 生成在 ARA 诱导细胞周期阻滞中的作用

N-乙酰半胱氨酸 (NAC) 是一种常用的抗氧化剂,能够有效清除细胞内 ROS。如图 6 所示,NAC 与 ARA 共处理 HL-60 细胞后,导致细胞内 ROS 水平显著降低。为了了解 ROS 生成在 ARA 诱导细胞周期阻滞中的作用,进一步观察了 NAC 对 ARA 诱导的细胞周期阻滞的影响。结果显示,HL-60 细胞在 2.5 μmol/L ARA 处理后 24 h, G<sub>0</sub> / G<sub>1</sub> 期细胞比例增加到 61.1%,而 NAC 共处理明显抑制 ARA 诱导的细胞周期阻滞,使 G<sub>0</sub> / G<sub>1</sub> 期细胞比例恢复正常 (图 7)。这些结果提示 ROS 可能在 ARA 诱导细胞周期阻滞中发挥重要作用。

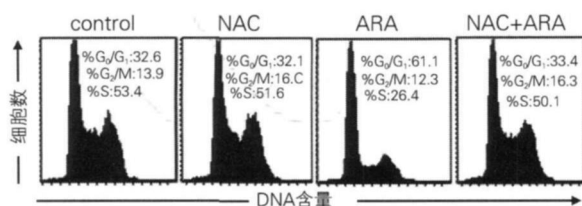


图 7 NAC 对 ARA 诱导 HL-60 细胞周期阻滞的阻断作用

control 空白对照; NAC 300  $\mu$ mol/L; ARA 2.5  $\mu$ mol/L

### 3 讨论

香茶菜属植物富含具有各种不同生物活性的对映贝壳杉烷类二萜化合物。大量的研究表明一些对映贝壳杉烷类二萜化合物在不同细胞模型上均能抑制 NF- $\kappa$ B 信号途径的活化,而这种效应也与其抗炎功能有密切关系<sup>[9-11]</sup>。不仅如此,这些二萜化合物还有很强的抗肿瘤活性,可诱导白血病及其他多种肿瘤细胞发生细胞凋亡<sup>[8]</sup>。在这里我们研究了一种新的从香茶菜属植物中提取的对映贝壳杉烷类二萜化合物 ARA,该化合物能够抑制人白血病细胞增殖和诱导细胞周期阻滞。我们发现 ARA 显著抑制人急性髓系白血病 HL-60 细胞增殖,并诱导明显的细胞周期 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期阻滞。机制研究表明 ARA 处理 HL-60 细胞后抑制 Rb 蛋白激活,显著降低 CDK4 的表达,并部分降低 cyclin D3 和 cyclin E2 的表达水平。此外,ARA 处理 HL-60 细胞后引起细胞内 ROS 水平升高,而抗氧化剂 NAC 能够阻断 ARA 介导的 ROS 升高和细胞周期阻滞,提示 ROS 可能在 ARA 诱导细胞周期阻滞中发挥重要作用。

Rb 蛋白是一个位于细胞核的磷蛋白,在聚丙烯酰胺凝胶中,高度磷酸化的 Rb 蛋白移行缓慢,而低磷酸化或非磷酸化的 Rb 蛋白则会出现快速移行条带。Rb 蛋白磷酸化及脱磷酸化过程是细胞周期依赖性的,脱磷酸化状态的 Rb 蛋白具有生长抑制作用。本研究发现,ARA 处理 HL-60 细胞后,Rb 蛋白出现快速移行条带,表明此时 Rb 蛋白的磷酸化程度减弱,出现低磷酸化或非磷酸化的 Rb 蛋白。与此相一致,ARA 明显抑制 p-Rb (ser795) 磷酸化。此外,文献研究显示,CDK4/6 与 cyclin D 复合体在 G<sub>1</sub> 早期可通过下调 Rb 蛋白磷酸化而诱导周期停滞,而与 cyclin E 结合的复合体则可通过影响 G<sub>1</sub>/S 监控点控制周期进程<sup>[12,13]</sup>。我们的实验结果显示,ARA 可能通过降低 cyclin D3、cyclin E2 和 CDK4 的表达,进而促进 Rb 蛋白低磷酸化,下调 p-Rb (ser795) 磷酸化水平,最终诱导细胞周期 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期阻滞。

ROS 通常被认为是有毒的,能够导致各种细胞成分如 DNA、脂质以及蛋白质的氧化,并最终导致细胞死亡。然而,越来越多的实验数据表明,ROS 也可能充当信号分子的角色在细胞周期发生发展过程中发挥作用<sup>[14]</sup>。ROS 通过对细胞信号转导级联、蛋白泛素化及降解以及细胞骨架等各个系统的不同调节作用影响着细胞周期的发生发展<sup>[15]</sup>。我们的实验结果显示,ARA 明显升高 HL-60 细胞内 ROS 水平,而抗氧化剂 NAC 共处理能够阻断 ROS 升高和 ARA 诱导的细胞周期阻滞,提示 ROS 可能参与 ARA 诱导细胞周期阻滞的过程。然而,对映贝壳杉烷类二萜化合物 ARA 如何诱导细胞内 ROS 生成尚不清楚。以往的研究表明,对映贝壳杉烷类

二萜化合物可能通过和细胞内 GSH 直接结合,并因此降低细胞内 GSH 的水平,引起 ROS 升高,导致细胞内氧化还原状态的失衡。因此,ARA 可能通过相似的途径引起细胞内 ROS 水平的变化,最终介导生物学效应的发生。

本研究表明,对映贝壳杉烷类二萜化合物 ARA 可以抑制 HL-60 细胞增殖,诱导细胞周期阻滞,并抑制 Rb 蛋白磷酸化和降低周期相关蛋白包括 cyclin D3、cyclin E2 和 CDK4 的表达,而 ROS 可能在 ARA 的抗肿瘤效应中发挥重要作用。该结果有助于阐明对映贝壳杉烷类二萜化合物抗肿瘤作用的可能机制,并为研发新型天然植物类抗肿瘤药物提供实验依据。

### 【参考文献】

- [1] 李园,胡亮钉,陈虎.急性髓系白血病干细胞的研究现状与临床应用[J].中国实用内科杂志,2007,27(6):466-468.
- [2] 孙汉董,许云龙,姜北.香茶菜属植物二萜化合物[M].北京:科学出版社,2001:5-6.
- [3] Henan Medical Institute, Henan Medical College, Yunnan Institute of Botany. Oridonin: a new antitumor subject [J]. Chin Sci Bull, 1978, 23: 53-56.
- [4] Li XT, Lin C, Li PY, et al. Comparative study on the sensitivities of seven human cancer cell lines to rubescensine A [J]. Acta Pharmaceut Sin, 1985, 20(4): 243-246.
- [5] Zhang CL, Wu LJ, Zuo HJ, et al. Cytochrome C release from oridonin-treated apoptotic A375-S2 cells is dependent on p53 and extracellular signal-regulated kinase activation [J]. J Pharmacol Sci, 2004, 96(2): 155-163.
- [6] Ikeze T, Chen SS, Tong XJ, et al. Oridonin induces growth inhibition and apoptosis of a variety of human cancer cells [J]. Int J Oncol, 2003, 23(4): 1187-1193.
- [7] Chen S, Gao J, Halicka HD, et al. The cytostatic and cytotoxic effects of oridonin (Rubescensine), a diterpenoid from *Rabdosia rubescens*, on tumor cells of different lineage [J]. Int J Oncol, 2005, 26(3): 579-588.
- [8] Yu ZY, Liang YG, Xiao He, et al. Melissoidesin G, a diterpenoid purified from *Isodon melissoides*, induces leukemia-cell apoptosis through induction of redox imbalance and exhibits synergy with other anticancer agents [J]. Int J Cancer, 2007, 121(9): 2084-2094.
- [9] Ikeze T, Yang Y, Bandobashi K, et al. Oridonin, a diterpenoid purified from *Rabdosia rubescens*, inhibits the proliferation of cells from lymphoid malignancies in association with blockade of the NF- $\kappa$ B signal pathways [J]. Mol Cancer Ther, 2005, 4(4): 578-586.
- [10] Lee JH, Koo TH, Hwang BY, et al. Kaurane diterpene, kamebakaurin, inhibits NF- $\kappa$ B by directly targeting the DNA-binding activity of p53 and blocks the expression of antiapoptotic NF- $\kappa$ B target genes [J]. J Biol Chem, 2002, 277(21): 18411-18420.
- [11] Leung CH, Grill SP, Lam W, et al. Eriocalyxin B inhibits nuclear factor- $\kappa$ B activation by interfering with the binding of both p65 and p50 to the response element in a noncompetitive manner [J]. Mol Pharmacol, 2006, 70(6): 1946-1955.
- [12] Ferguson KL, Callaghan SM, O'Hare MJ, et al. The Rb-CDK4/6 signaling pathway is critical in neural precursor cell cycle regulation [J]. J Biol Chem, 2000, 275(43): 33593-33600.
- [13] 陈大年. 视网膜母细胞瘤基因(Rb基因)的作用机制[J]. 国外医学眼科学分册, 1995, 19(5): 274-283.
- [14] Menon SG, Goswami PC. A redox cycle within the cell cycle: ring in the old with the new [J]. Oncogene, 2007, 26(8): 1101-1109.
- [15] 余祖胤,毛秉智,从玉文.活性氧与细胞周期调控[J]. 军事医学科学院院刊, 2007, 31(6): 576-579.

(姜晓舜 编辑 2010-01-29 收稿)