文章编号:1000-5404(2013)08-0727-06

论著

对映-贝壳杉烷型二萜化合物 Wangzaozin A 对人早幼粒白血病 HL-60 细胞生长抑制和凋亡诱导的作用

丁 兰[1],第五佳丽[1],田继东[2],柳志军[1],杨 玲[1],刘国安[1],令利军[1] (730070 兰州,西北师范大学生命科学学院生物技术系[1];730050 兰州,甘肃中医院骨科[2])

[摘要] **目的** 研究对映-贝壳杉烷型二萜 Wangzaozin A 对人早幼粒白血病细胞 HL-60 生长抑制、周期阻滞、凋亡诱导作用以及相关的机制。**方法** 利用倒置显微镜观察和台盼蓝排染法检测了 Wangzaozin A 对 HL-60 细胞生长的影响;采用流式细胞术和吖啶橙/溴化乙锭(AO/EB)双染法检测化合物对细胞周期分布的影响以及诱导 HL-60 细胞凋亡的能力;进一步利用单细胞凝胶电泳法测试化合物对细胞 DNA 的损伤。**结果** 1~4 μmol/L 的 Wangzaozin A 对 HL-60 细胞具有较强的生长抑制作用,较高浓度(3 μmol/L 和 4 μmol/L)和较长处理时间(48~72 h)有较强的致死效应;1~2.5 μmol/L 药物处理细胞 24 h 或 48 h 条件下细胞周期分布主要表现为 G_1 期阻滞;4 μmol/L 药物处理 12~60 h 条件下细胞周期分布主要表现为很强的 S 期阻滞;2~4 μmol/L 药物作用 24 h 或 48 h 可诱导凋亡产生,其凋亡率呈显著水平($P<0.01$),相同条件下,药物对细胞 DNA 的损伤与对照相比差异有统计学意义($P<0.05$,$P<0.01$)。**结论** 该化合物对 HL-60 细胞 DNA 的损伤作用极可能是引起细胞生长抑制、周期阻滞及凋亡的直接原因。

[关键词] Wangzaozin A;人早幼粒白血病细胞 HL-60;周期阻滞;凋亡;DNA 损伤
[中图法分类号] R965;R733.7;R979.19 [文献标志码] A

Effect of an ent-kaurane diterpene Wangzaozin A on proliferation and apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells

Ding Lan[1], Diwu Jiali[1], Tian Jidong[2], Liu Zhijun[1], Yang Ling[1], Liu Guoan[1], Ling Lijun[1] ([1]Department of Biotechnology, College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou, Gansu Province, 730070; [2]Department of Orthopaedics, Traditional Chinese Medicine Hospital of Gansu Province, Lanzhou, Gansu Province, 730050, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of Wangzaozin A on the proliferation and apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. **Methods** HL-60 cells were treated with Wangzaozin A at different concentrations for different times. Trypan blue exclusion was performed to detect viability of HL-60 cells under an inverted microscope. Cell cycle arrest and apoptosis of HL-60 cells were detected by flow cytometry and AO/EB staining. DNA damage in HL-60 cells was detected by comet assay. **Results** Wangzaozin A strongly inhibited the growth of HL-60 cells at the concentration of 1 – 4 mol/L, and induced strong lethal effect to the cells at high concentrations (3 mol/L and 4 mol/L) for 48 – 72 h. Strong G_1 phase and S phase arrest could be induced by Wangzaozain A at 1 – 2.5 mol/L for 24 h or 48 h and at 4 mol/L for 12 – 60 h, respectively, and significant apoptosis of HL-60 cells was induced by Wangzaozain A at 2 – 4 mol/L ($P<0.01$). At the same time, the DNA damage in the treatment group was significantly different from that of the control group ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** Wangzaozin A induces proliferation suppression, cell cycle arrest and apoptosis in HL-60 cells directly through DNA damage.

[**Key words**] Wangzaozin A; human promyelocytic leukemia cell HL-60; cell cycle arrest; apoptosis; DNA damage

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30960464) and the Project of Knowledge and Sci&Tech Innovation of Northwest Normal University (NWNU-KJCXGC-03-65). Corresponding author: Ding Lan, E-mail: dinglan@nwnu.edu.cn

[基金项目] 国家自然科学基金(30960464);西北师范大学知识与科技创新工程项目(NWNU-KJCXGC-03-65)
[通信作者] 丁 兰,E-mail:dinglan@nwnu.edu.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130121.0927.005.html(2013-01-21)

香茶菜属植物全世界共有150余种,中国分布90余种,其中有30余种作为民间中草药使用。溪黄草和冬凌草的提取物已作为抗癌和抗炎产品在临床使用[1-2],王枣子也以其具有显著的医治肺脓疡疗效及抑菌作用在临床使用[3-4]。对映-贝壳杉烷类二萜类化合物是香茶菜属植物最重要的次生代谢产物,在其嫩枝叶中含量极为丰富,迄今已分离得到约400余种[1],并且,该类化合物具有广泛生物学活性,尤其抗肿瘤、抗炎和抑菌活性最为显著[5]。其中从冬凌草中分离得到的对映-贝壳杉烷类二萜冬凌草甲素(Oridonin)其抗肿瘤研究最为广泛、系统和深入,在国内外已有大量相关报道[6-9]。尤其令人关注的是,新近发现冬凌草甲素可与致癌蛋白AML1-ETO结合,使其产生截短的AML1-ETO,选择性地诱导t(8;21)白血病细胞凋亡[10],并对M2型白血病的治疗已进入临床试验阶段。但具有相似分子构型的对映-贝壳杉烷类二萜类化合物的抗白血病细胞株的相关研究报道却不多。

对映-贝壳杉烯类二萜化合物Wangzaozin A于1982年从香茶菜属植物王枣子(Isodon amethystoides)中首次分离得到[3]。我们课题组从甘肃产总序香茶菜[Isodon racemosa (Hemsl) Hara]中再次分离得到该化合物,并利用现代波谱学手段对该化合物结构进行了确定[11],确定了其绝对结构[12]。同时,经过体外抗癌活性的筛选证明该化合物具有很强的抑制癌细胞增殖和致癌细胞死亡的作用,其细胞毒活性比冬凌草甲素高约10倍[13-16],这表明该化合物可作为新型抗白血病药物的候选化合物,具有进一步研究的价值。

本研究旨在我们过去工作的基础上,通过评估单体化合物Wangzaozin A对体外培养HL-60细胞生长和细胞周期分布的影响,以及诱导HL-60细胞凋亡的作用,探讨该化合物抑制癌细胞生长和诱导癌细胞凋亡的作用机制,为Wangzaozin A的进一步开发应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验药物

对映-贝壳杉烷型二萜化合物Wangzaozin A,由本实验室从甘肃产总序香茶菜[Isodon racemosa (Hemsl) Hara]从分离得到,并采用了波谱学方法(紫外、红外、质谱、核磁共振和X-单晶衍射)对其结构进行了确定[9-10],使用前将药物溶于DMSO,在4 ℃冰箱中保存备用。

1.2 细胞

人早幼粒白血病细胞HL-60引自兰州大学生命科学学院。

1.3 试剂及仪器

培养基RPMI1640(美国Gibcobrl),小牛血清(兰州荣烨),二甲基亚砜(DMSO,美国Merck);溴化乙啶(EB)、吖啶橙(AO)均为美国Sigma公司产品;其他化学药品为国产分析纯。

CO_2培养箱(美国Forma Scientific),超净工作台(苏净集团安泰公司生产),倒置显微镜(德国Leitz-diavert),荧光显微镜(日本Olympus),流式细胞仪(Coulter Epics XL),水平电泳槽,稳压稳流电泳仪(北京六一仪器厂DYY-6B),高速低温离心机(湘仪制造厂),培养板(美国Costar细胞培养板)。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养 人早幼粒白血病细胞HL-60培养于含10%小牛血清的RPMI1640培养液中,加入青霉素100 U/mL,链霉素100 μg/mL,置于5% CO_2,37 ℃饱和湿度恒温箱中培养。

1.4.2 台盼蓝排染法检测Wangzaozin A对HL-60细胞生长的影响 浓度为8×10^4/mL的HL-60细胞悬液,于24孔培养板接种并预培养24 h后加药,受试药物终浓度为0、1、2、3、4 μmol/L。从加药开始计时,每隔12 h,用0.4%台盼蓝染色,对活细胞计数并绘制细胞生长曲线。

1.4.3 流式细胞术检测Wangzaozin A引起的HL-60细胞周期阻滞 以8×10^4/mL浓度细胞接种于3 mL培养瓶中,培养24 h后,分别用浓度为1.5、2、2.5 μmol/L的Wangzaozin A处理细胞24 h和48 h,离心收集细胞,用冷PBS洗2次,之后用70%乙醇在4 ℃下固定过夜。离心洗去乙醇,用PBS洗2遍,然后加入10 μg/mL的碘化丙啶(PBS溶液,0.2% Triton X-100,0.1 mmol/L EDTA和100 μg/mL RNase)于室温,暗处染色30 min。用PBS洗去染料,流式细胞仪进行检测并分析细胞周期。

1.4.4 吖啶橙/溴化乙锭(AO/EB)双染检测Wangzaozin A引起的HL-60细胞凋亡和坏死 浓度为8×10^4/mL的细胞悬液接种并预培养24 h,然后加入不同浓度的药物(1、2、3和4 μmol/L)分别作用24 h和48 h后,收集细胞并制成细胞悬液,取100 μL并加入AO/EB染料4 μL,混匀后置1滴于载玻片上于荧光显微镜下观察并计数至少300个细胞。

吖啶橙(AO)能透过完整未损的细胞膜,嵌入DNA,使细胞呈现绿色荧光,而溴化乙锭(EB)仅能透过受损的细胞膜,嵌入DNA,发橘红色荧光。在荧光显微镜下可见4种细胞形态:活细胞核染色质着绿色并呈正常结构;早期凋亡细胞核染色质着绿色呈固缩状或圆珠状;非凋亡的死亡细胞核染色质着橘红色并呈正常结构;晚期凋亡细胞核染色质为橘红色并呈固缩状或圆珠状[17]。细胞凋亡率、坏死率及总致死率由以下公式计算:

凋亡率 $=\frac{EA+LA}{V+N+EA+LA}\times100\%$;坏死率 $=\frac{N}{V+N+EA+LA}\times100\%$;总致死率=凋亡率+总致死率;EA:早期凋亡细胞;LA:晚期凋亡细胞;V:活细胞;N:坏死细胞。

1.4.5 单细胞凝胶电泳法(SCGE)检测Wangzaozin A对HL-60细胞的DNA损伤 根据刘国安等[18]的方法,于磨砂载玻片上滴加0.3%正常熔点琼脂糖100 μL,用玻璃棒涂均匀并晾干后,再取40 μL的0.7%低熔点琼脂糖(按10:1比例与细胞悬

液混合)在 37 ℃下平铺到第一层胶上,加盖玻片。将胶板(去盖玻片)水平浸在新配制的细胞裂解液(0.25 mol/L NaOH, 2.5 mol/L NaCl,100 mmol/L EDTA-Na_2 临用时加入 1% Triton X-100,1% DMSO)中,4 ℃下裂解至少 1 h。置于水平电泳槽中,加新配制的电泳缓冲液(1 mmol/L EDTA-Na_2,300 mmol/L NaOH)使液面高于玻片,放置 20 min,使 DNA 解旋后进行电泳(电压 20 V,时间 25 min)。电泳完毕后,用洗碱液(pH 7.2)浸 10 min。以 20 μg/mL 溴化乙锭染色并观察照相,上述操作均在暗处进行,每个样制片 3 张。荧光显微镜下(515 nm)随机观察 50 个细胞,统计 DNA 损伤情况。

1.5　统计学分析

采用 SPSS 11.0 统计软件进行数据分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用单因素方差分析。

2　结果

2.1　Wangzaozin A 对 HL-60 细胞生长的影响

不同浓度 Wangzaozin A 与 HL-60 细胞共培养,取不同培养时间的细胞,用台盼蓝排染法统计活细胞数,绘制细胞生长曲线。由图 1 可以看出,低浓度药物(1、2 μmol/L)对细胞生长具有一定的抑制作用;3 μmol/L 的药物在作用细胞 36 h 内,对细胞生长具有完全的生长抑制效应,即细胞基本没有增殖,之后的 48 ~ 72 h 细胞开始死亡;4 μmol/L 的药物处理细胞后,细胞数目持续减少,对细胞具有致死作用。

2.2　Wangzaozin A 对 HL-60 细胞周期的影响

分别用浓度为 1.5、2 μmol/L 和 2.5 μmol/L 的 Wangzaozin A 处理 HL-60 细胞 24 h 和 48 h 后,对其周期进行分析。结果如图 2 所示,药物处理 24 h 后,与对照组相比,1.5 μmol/L 和 2 μmol/L药物处理 24 h 和 48 h 后 G_1 期均有上升,引起了细胞 G_1 期阻滞; 2.5 μmol/L 药物处理 24 h 后,G_1 期细胞百分比为 54.9%,同时 G_2 期上升到 19.5%,而 48 h 后 G_1 期细胞百分比为 46.4%,G_2 期为 10.5%,该浓度下表现了显著的 G_1 期阻滞和 G_2 期阻滞。由此可以看出,当药物浓度为 1.5、2 μmol/L 时,以引起 G_1 期阻滞为主,药物浓度为 2.5 μmol/L 时在引起细胞 G_1 期阻滞的同时也引起了细胞的 G_2 期阻滞。

以 2 μmol/L 和 4 μmol/L 处理细胞 12、24、36、48、60 h 后,分别收集细胞进行周期分析,结果见图 3 所示。在 2 μmol/L 的处理组中,与对照组相比,不同时间处理组细胞的 G_1 期和 G_2 期所占比例均上升,而在 4 μmol/L 的处理组中,与对照组相比,不同时间处理组细胞的 S 期所占比例均有显著上升,引起了明显的 S 期阻滞;该浓度下 G_2 期所占比例由 12.7% 下降至 0.4%,在 36 h 时有明显的 G_2 期阻滞。此外有极少的凋亡细胞出现。

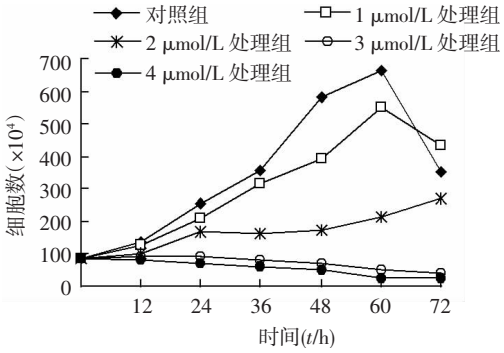
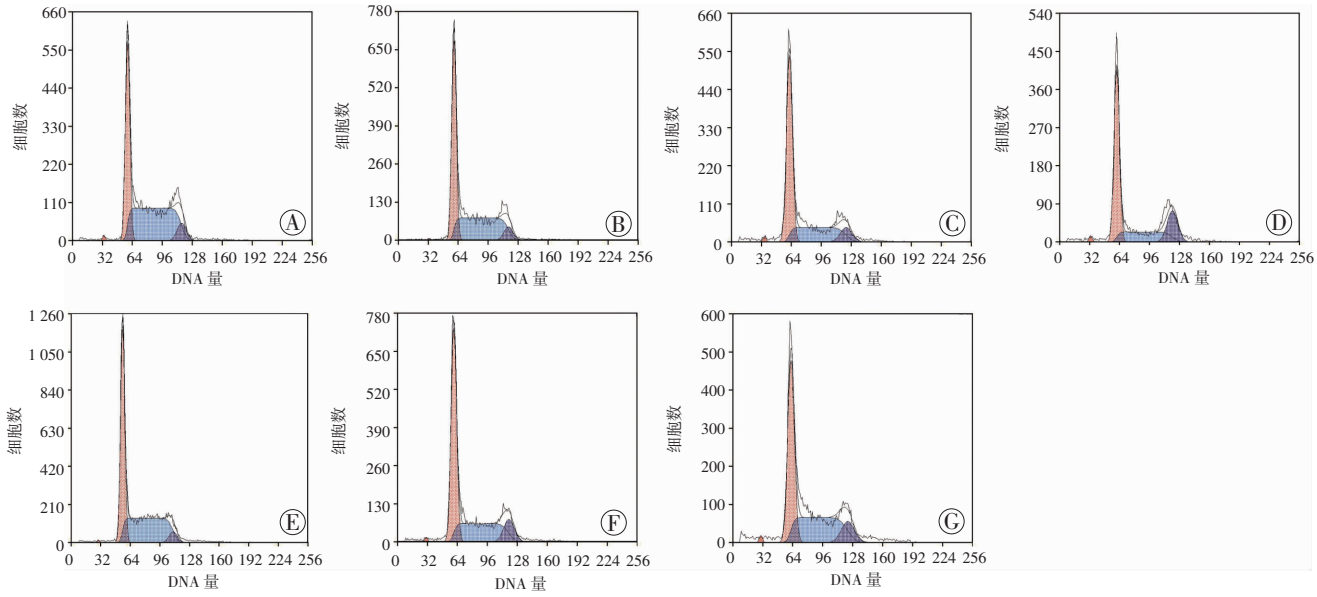
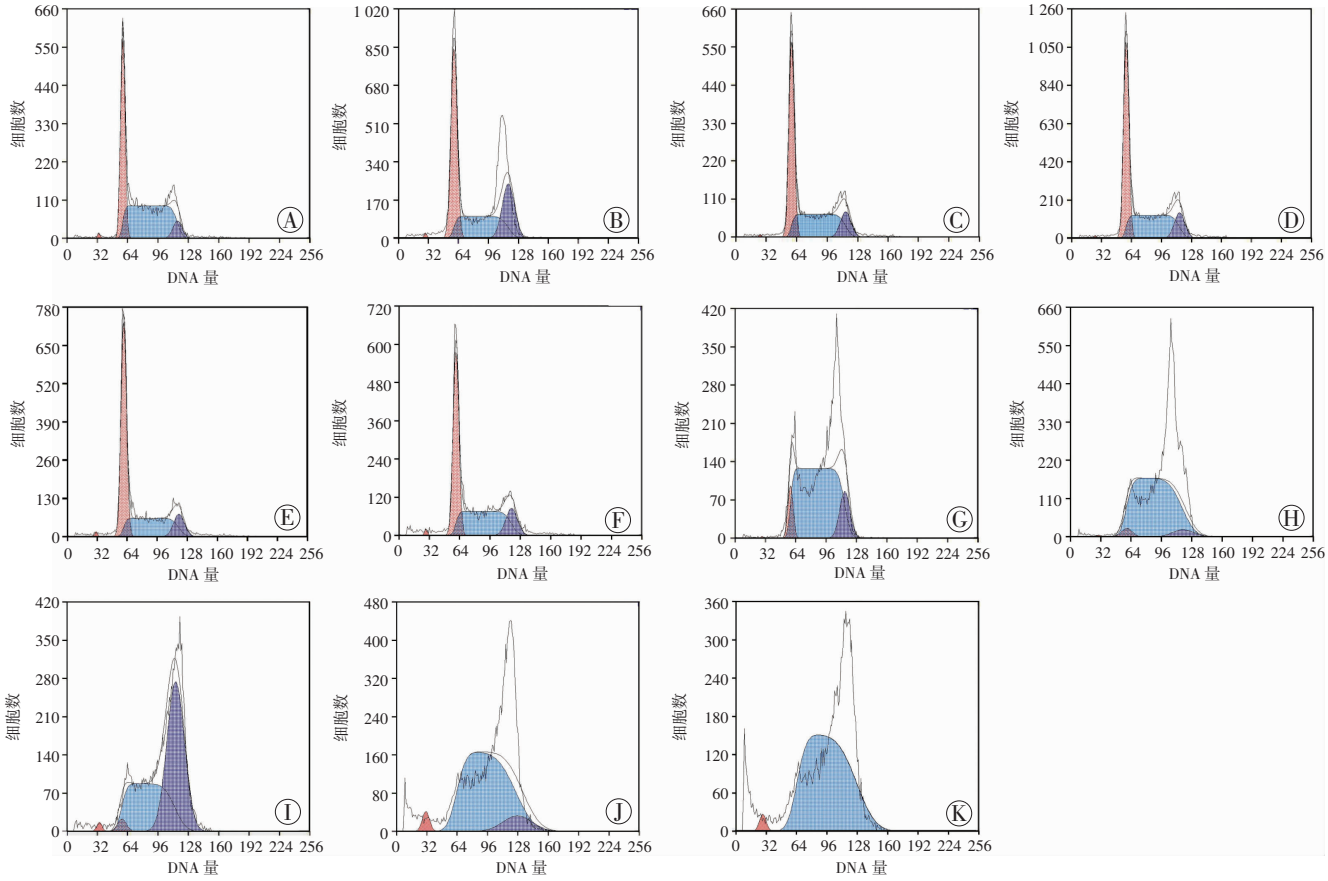


图 1　不同浓度 Wangzaozin A 对 HL-60 细胞生长的影响



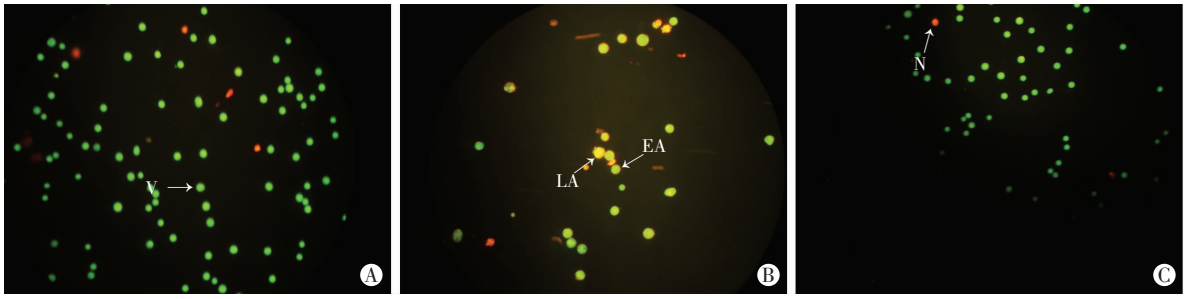
A:对照组;B:1.5 μmol/L 处理 24 h 组;C:2 μmol/L 处理 24 h 组;D:2.5 μmol/L 处理 24 h 组;E:1.5 μmol/L 处理 48 h 组;F:2 μmol/L 处理 48 h 组;G:2.5 μmol/L 处理 48 h 组

图 2　流式细胞术检测不同浓度 Wangzaozin A 处理 HL-60 细胞 24 h 和 48 h 后细胞周期分布的变化



A:对照组;B:2 μmol/L处理12 h组;C:2 μmol/L处理24 h组;D:2 μmol/L处理36 h组;E:2 μmol/L处理48 h组;F:2 μmol/L处理60 h组;G:4 μmol/L处理12 h组;H:4 μmol/L处理24 h组;I:4 μmol/L处理36 h组;J:4 μmol/L处理48 h组;K:4 μmol/L处理60 h组

图3 流式细胞术检测2 μmol/L和4 μmol/L Wangzaozin A分别处理HL-60细胞不同时间细胞周期分布的变化



A:对照组;B:2 μmol/L处理组;C:4 μmol/L处理组

图4 不同浓度Wangzaozin A处理HL-60细胞后细胞凋亡和坏死的形态变化 (×200)

2.3 吖啶橙/溴化乙锭(AO/EB)双染检测Wangzaozin A引起的HL-60细胞凋亡和坏死

由图4可见,正常细胞表现出均匀的绿色,形态规则的圆形细胞核。早期凋亡的细胞核出现凝集,细胞呈现出黄绿色,晚期凋亡的细胞并呈现出橙红色。坏死细胞表现出均匀的红色。由表1可知,在24 h处理组中,除1 μmol/L外,其余浓度(2~4 μmol/L)药物均能不同程度诱导HL-60细胞凋亡,并与对照组相比有显著性差异($P<0.05$);48 h处理组所有浓度的药物均能诱导凋亡发生,与对照组相比,当药物浓度≥2 μmol/L时差异更明显($P<0.01$)。各时间和浓度处理的细胞凋亡率呈现了良好的时间和浓度依赖性。Wangzaozin A在1~4 μmol/L浓度范围极少引起HL-60细胞坏死,其处理组的坏死率和总致死率与对照组相对没有统计学差异。

2.4 Wangzaozin A对HL-60细胞DNA的损伤作用

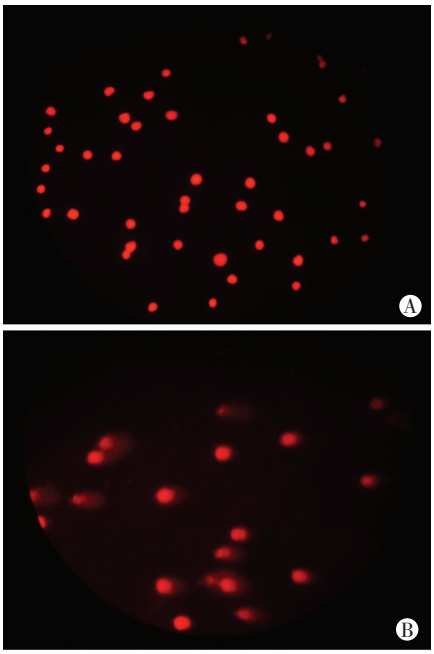
利用单细胞凝胶电泳法检测了Wangzaozin A对HL-60细胞DNA损伤的情况。细胞在经过单细胞凝胶电泳后,对照组中,细胞DNA没有损伤,其细胞核成圆形(图5A),而药物处理后细胞核出现彗星状拖尾(图5B),则表明DNA有损伤。不同浓度的Wangzaozin A对HL-60细胞DNA损伤率如图6所示:在24 h处理组中,1 μmol/L药物对DNA损伤率与对照相比并

表 1　不同浓度 Wangzaozin A 处理 HL-60 细胞 24、48 h 的凋亡率、坏死率和总致死率（%，$\bar{x} \pm s$）

浓度(μmol/L)	凋亡率		坏死率		总致死率	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
0	0	0	0.70 ± 0.17	1.58 ± 0.38	0.70 ± 0.15	1.58 ± 0.38
1	0	0	1.33 ± 0.54	4.59 ± 1.40[a]	1.33 ± 0.19	4.59 ± 1.40[a]
2	8.30 ± 0.07[b]	18.28 ± 1.05[b]	1.30 ± 0.54	2.07 ± 0.70	9.60 ± 0.17[b]	20.35 ± 0.50[b]
3	16.01 ± 0.14[b]	70.33 ± 1.17[b]	0.98 ± 0.02	0	16.99 ± 1.45[b]	70.33 ± 0.43[b]
4	21.70 ± 0.18[b]	93.85 ± 1.00[b]	0.28 ± 0.11	1.62 ± 0.42	21.98 ± 1.17[b]	95.47 ± 0.44[b]

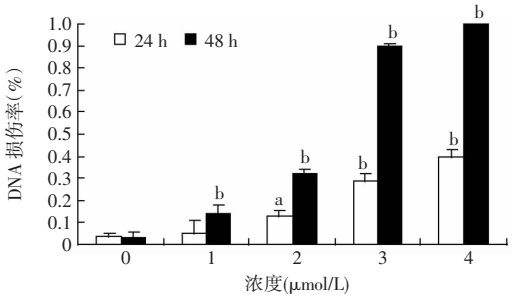
a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 0 μmol/L（对照组）比较

无显著性差异，而 2、3 μmol/L 和 4 μmol/L 药物处理后对 DNA 有不同程度的损伤作用，和对照组相比有显著性差异（$P<0.05$）；在 48 h 处理组中，1、2、3、4 μmol/L 药物处理的 HL-60 细胞均出现了 DNA 的损伤，其损伤比率与对照组相比差异显著（$P<0.01$）。同时，各处理组细胞的 DNA 损伤显示了时间和浓度的依赖性，损伤率随药物处理时间及药物浓度的提高而增加。另外，进一步的 CASP 图像定量分析（彗尾 DNA 含量）结果见图 7，除1 μmol/L 处理组外，其他浓度处理组的 DNA 损伤度与对照组相比具有显著性差异（$P<0.05$），且在≥3 μmol/L 差异更明显（$P<0.01$），各处理组细胞呈现良好的浓度依赖性和时间依赖性。



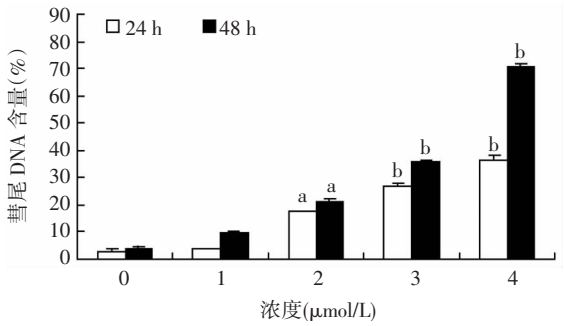
A：对照组；B：4 μmol/L 处理组

图 5　单细胞凝胶电泳法检测 Wangzaozin A 诱导 HL-60 细胞的 DNA 损伤（×200）



a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 0 μmol/L（对照组）比较

图 6　不同浓度 Wangzaozin A 对 HL-60 细胞 DNA 的损伤



a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 0 μmol/L（对照组）比较

图 7　不同浓度 Wangzaozin A 诱导 HL-60 细胞的彗尾 DNA 百分比

3　讨论

药物对恶性肿瘤细胞的毒性效果通常都与细胞增殖抑制能力相关[19]。本研究的实验结果显示，Wangzaozin A 在 1.5 ~ 2.5 μmol/L 浓度和 48 h 时间范围内，对 HL-60 细胞生长的影响表现为抑制作用。进一步的细胞周期分析显示，该化合物显著地影响了 HL-60 细胞周期的分布，导致较强的 G_1 期阻滞，并伴有轻微的 G_2 期阻滞发生；而在 4 μmol/L 处理浓度下，随着 Wangzaozin A 处理时间延长（12 ~ 60 h），HL-60 细胞表现为极强的 S 期阻滞，除 36 h 处理组外，其余各组的阻滞率达到 80% ~ 99.6%；这表明，Wangzaozin A 导致细胞周期阻滞是其抑制 HL-60 细胞生长的主要原因。另外，Wangzaozin A 对人早幼粒细胞株 HL-60 的生长抑制作用远大于贴壁细胞株 SGC-7901（≥8 μmol/L 才具有致死效应）[13]。

通过诱导肿瘤细胞凋亡成为评估肿瘤治疗效果的一个重要指标[20]。吖啶橙/溴化乙锭（AO/EB）双染法检测显示，Wangzaozin A 在较高浓度（≥3 μmol/L）的培养体系下能引起较大量的 HL-60 细胞凋亡，其凋亡率随药物作用的时间延长和浓度增大而增加。由于流式细胞术对凋亡细胞的记录是基于 DNA 含量低于 2n 的细胞，即晚期凋亡的细胞，而 AO/EB 双染法可检测到早期凋亡细胞。因此，在细胞周期分析中，在与 AO/EB 双染法相似的药物浓度（1 ~ 4 μmol/L）和作用时间（24 h 和 48 h）下，仅有极低的凋亡率（≤5%）显示，而大量的细胞被阻滞在 G_1 期或 S 期，这表明处于周期阻滞的部分细胞已具有早期凋亡的特征。另外，

实验表明,Wangzaozin A 在 1 ~ 4 μmol/L 浓度范围极少引起 HL-60 细胞坏死,处理组与对照组相比没有显著性差异。

研究表明,肿瘤细胞暴露于一些肿瘤治疗剂后会引起 DNA 损伤,如烷化剂或拓扑异构酶抑制剂[21]等。当细胞 DNA 受到损伤时,就会激活细胞周期检验点[22-23],在检验点的作用下,细胞周期发生阻滞,为 DNA 损伤修复提供时间,当 DNA 严重损伤而不能被修复时,细胞会发生凋亡[24-25]。在本实验中,较高浓度的 Wangzaozin A 处理细胞后,用彗星电泳检测可见其对细胞 DNA 有显著的损伤率和损伤度,且损伤率随药物浓度的增大和处理时间的加长而增加。我们课题组在非细胞体系检测 Wangzaozin A 对质粒 DNA 损伤的研究也证实[26]:Wangzaozin A 的确对 DNA 有直接的损伤作用,质粒的琼脂糖凝胶电泳表明,Wangzaozin A 能够嵌插在 DNA 的碱基对之间,对碱基有损伤作用;激光拉曼光谱证明该化合物对 DNA 的碱基对和磷酸骨架、脱氧核糖均有不同程度的损伤,使得 DNA 的双螺旋结构变得松散,引起 DNA 的构象变化。这些实验结果说明,本实验中不同浓度的 Wangzaozin A 极可能是通过损伤 HL-60 细胞 DNA 而激活了不同的细胞周期检验点,形成了不同时期细胞周期阻滞,高浓度药物长时间作用细胞后,细胞内难以修复的 DNA 损伤最终引发细胞启动了凋亡程序,细胞凋亡产生。

本研究证实,Wangzaozin A 可通过损伤 HL-60 细胞 DNA 而显示出较强的抗增殖和诱导凋亡的作用,具有良好的抗癌潜力,具有进一步研究价值。

参考文献:

[1] 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.

[2] 金忠民, 沙伟. 香茶菜属植物的研究现状及药用前景[J]. 齐齐哈尔大学学报: 自然科学版, 2003, 19(4): 10 - 13.

[3] 王先荣, 王兆全, 石鹏程, 等. 王枣子的新二萜——王枣子甲素[J]. 安徽医学, 1982, 3(2): 50 - 53.

[4] 张修华. 草药王枣子抗菌作用的临床应用[J]. 煤矿医学, 1982, 4(5): 13 - 14.

[5] 梁宇光, 郝光涛, 苏佳, 等. 唇形科香茶菜属二萜类化合物的生物活性研究进展[J]. 军事医学科学院院刊, 2009, 33(2): 190 - 192.

[6] 刘家云, 魏敏, 顾琴龙. 冬凌草甲素抗肿瘤的研究进展[J]. 中国新药与临床杂志, 2010, 29(2): 81 - 84.

[7] 朱楠. 冬凌草甲素抗肿瘤机制的研究进展[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2012, 33(13): 1785 - 1786.

[8] Zang L, Xu Q, Ye Y, *et al*. Autophagy enhanced phagocytosis of apoptotic cells by oridonin-treated human histocytic lymphoma U937 cells [J]. Arch Biochem Biophys, 2012, 518(1): 31 - 41.

[9] Li D, Wang L, Cai H, *et al*. Synthesis and biological evaluation of novel furozan-based nitric oxide-releasing derivatives of oridonin as potential anti-tumor agents[J]. Molecules, 2012, 17(6): 7556 - 7568.

[10] Zhen T, Wu C F, Liu P, *et al*. Targeting of AML1-ETO in t(8;21) leukemia by oridonin generates a tumor suppressor-like protein[J]. Sci Transl Med, 2012, 4(127): 127ra38.

[11] Ding L, Liu G A, Wang L, *et al*. Cytotoxic ent-Kaurane Diterpenoids from Isodon racemosa (Hemsl) Hara[J]. Indian J Chem-Sect B, 2006, 45(2): 548 - 551.

[12] 丁兰, 郁开北, 刘国安. 细胞毒活性二萜 Wangzaozin A 的晶体结构[J]. 高等学校化学学报, 2005, 26(8): 1455 - 1458.

[13] 丁兰, 张世栋, 刘国安, 等. 对映-贝壳杉烷二萜化合物 Wangzaozin A 对人胃腺癌细胞 SGC-7901 生长的影响[J]. 西北师范大学学报: 自然科学版, 2006, 42(3): 70 - 73.

[14] 王瀚. 拟缺香茶菜化学成分及其抗癌活性的研究[D]. 兰州: 西北师范大学, 2006.

[15] Ding L, Hou Q, Zhou Q, *et al*. Structure-activity relationships of eight ent-kaurene diterpenoids from three Isodon plants[J]. Research on Chemical Intermediates, 2010, 36(4): 443 - 452.

[16] Ding L, Zhou Q, Wang L, *et al*. Comparison of cytotoxicity and DNA damage potential induced by ent-kaurene diterpenoids from Isodon plant[J]. Nat Prod Res, 2011, 25(15): 1402 - 1411.

[17] Mironova E V, Evstratova A A, Antonov S M. A fluorescence vital assay for the recognition and quantification of excitotoxic cell death by necrosis and apoptosis using confocal microscopy on neurons in culture [J]. J Neurosci Methods, 2007, 163(1): 1 - 8.

[18] 刘国安, 郑荣梁. 彗星电泳检测细胞 DNA 损伤应用新进展[J]. 西北师范大学学报: 自然科学版, 2003, 39(2): 114 - 117.

[19] Montenegro R C, de-Vasconcellos M C, Silva-Bezerra F, *et al*. Pisosterol induces monocytic differentiation in HL-60 cells[J]. Toxicol *In Vitro*, 2007, 21(5): 795 - 800.

[20] Parker B W, Kaur G, Nieves-Neira W, *et al*. Early induction of apoptosis in hematopoietic cell lines after exposure to flavopiridol[J]. Blood, 1998, 91(2): 458 - 465.

[21] Kellner U, Sehested M, Jensen P B, *et al*. Culprit and victim—DNA topoisomerase Ⅱ[J]. Lancet Oncol, 2002, 3(4): 235 - 243.

[22] Coultas L, Strasser A. The molecular control of DNA damage-induced cell death[J]. Apoptosis, 2000, 5(6): 491 - 507.

[23] Skladanowski A. Modulation of G(2) arrest enhances cell death induced by the antitumor 1-nitroacridine derivative, nitracrine[J]. Apoptosis, 2002, 7(4): 347 - 359.

[24] 江瑞胜, 欧阳高亮, 鲍仕登. 细胞 DNA 损伤检控点[J]. 细胞生物学杂志, 2004, 26 (3): 209 - 215.

[25] Foster I. Cancer: A cell cycle defect[J]. Radiography, 2008, 14(2): 144 - 149.

[26] 王丽. 对映-贝壳杉烯二萜化合物的细胞毒性及其与 DNA 相互作用的研究[D]. 兰州: 西北师范大学, 2008.

(**收稿**:2012-10-19;**修回**:2012-12-05)

(编辑 张 维)