

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.02.004

· 基础研究 ·

冬凌草甲素诱导人多发性骨髓瘤 ARH-77 细胞凋亡及其可能机制

曲佳¹, 郭坤元¹, 吴秉毅¹, 宋朝阳¹, 余妙容², 贺艳杰¹ (1. 南方医科大学暨珠江医院 血液科, 广东 广州 510282; 2. 广东省人民医院暨广东省医学科学院 血液科, 广东 广州 510080)

[摘要] 目的:探讨冬凌草甲素(oridonin, Ori)对人多发性骨髓瘤 ARH-77 细胞的致凋亡作用及其可能的机制。方法:不同浓度 Ori(2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$)作用于 ARH-77 细胞,MTT 法检测 ARH-77 细胞的增殖,相差显微镜和 Hoechst 33258 染色观察细胞凋亡的形态学改变,流式细胞术检测 ARH-77 细胞的早期凋亡及线粒体膜电位($\Delta\psi\text{m}$)的变化,caspase 8 凋亡试剂盒检测 ARH-77 细胞 caspase 8 的活化。结果:Ori 对 ARH-77 细胞的生长有明显的抑制作用,且呈时间和剂量依赖性。10 $\mu\text{mol/L}$ Ori 作用于 ARH-77 细胞 24 h 后可见细胞变小、胞质中出现空泡,并可见凋亡小体。流式细胞术结果显示,经不同浓度 Ori(2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$)处理后,细胞早期凋亡率分别为(15.07 \pm 0.78)%、(21.00 \pm 1.49)%和(27.45 \pm 2.47)%,均高于对照组的(5.27 \pm 1.46)%($P < 0.01$)。不同浓度 Ori(2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$)处理后,反映 $\Delta\psi\text{m}$ 的绿色荧光细胞百分率分别为(26.80 \pm 0.75)%、(36.81 \pm 2.27)%和(49.48 \pm 1.10)%,均高于对照组的(16.96 \pm 0.50)%($P < 0.01$),提示 ARH-77 细胞凋亡有显著增加。同时,Ori 处理可上调 ARH-77 细胞 caspase 8 的活性($P < 0.01$)。结论:冬凌草甲素能明显诱导多发性骨髓瘤 ARH-77 细胞的凋亡,其机制可能与激活内、外源凋亡通路有关。

[关键词] 冬凌草甲素;多发性骨髓瘤;凋亡;caspase 8;线粒体膜电位

[文献标志码] A **[文章编号]** 1007-385X(2010)02-0134-05

Oridonin induces apoptosis of human multiple myeloma ARH-77 cells and its possible mechanism

QU Jia¹, GUO Kun-yuan¹, WU Bing-yi¹, SONG Chao-yang¹, SHE Miao-rong², HE Yan-jie¹ (1. Department of Hematology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong, China; 2. Department of Hematology, Guangdong People's Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, Guangdong, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the apoptosis induction effect of oridonin (Ori) on human multiple myeloma cell line ARH-77 and the possible mechanism. **Methods:** ARH-77 cells were treated with different concentrations of oridonin (2.5, 5 and 10 $\mu\text{mol/L}$), and then the proliferation of ARH-77 cells was detected by MTT assay. The morphological change of apoptotic ARH-77 cells was observed under phase contrast microscope and Hoechst 33258 staining. The apoptosis and the change of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi\text{m}$) of ARH-77 cells were examined by flow cytometry. The caspase 8 activity was measured by caspase-8 apoptosis kit. **Results:** Ori significantly inhibited the growth of ARH-77 cells in a time- and dose-dependent manner. After treatment with 10 $\mu\text{mol/L}$ Ori for 24 h, ARH-77 cells became shrunk, with cytoplasm vacuoles and apoptotic bodies. Flow cytometry results revealed that the apoptotic rates of ARH-77 cells after Ori treatments (2.5, 5 and 10 $\mu\text{mol/L}$) were significantly higher than that of control group, with apoptotic rates being (15.07 \pm 0.78)%, (21.00 \pm 1.49)%, (27.45 \pm 2.47)% vs (5.27 \pm 1.46)% ($P < 0.01$). Green fluorescence percentages of $\Delta\psi\text{m}$ of ARH-77 cells were significantly increased in Ori-treated groups (2.5, 5 and 10 $\mu\text{mol/L}$) compared with that in control group, with percentages being (26.80 \pm 0.75)%, (36.81 \pm 2.27)%, (49.48 \pm 1.10)% vs (16.96 \pm 0.50)% ($P < 0.01$). Meanwhile, caspase 8 activity of ARH-77 cells was significantly up-regulated by Ori treatment ($P < 0.01$). **Conclusion:** Oridonin can markedly induce apoptosis of human multiple myeloma ARH-77 cells, which might be related to extrinsic and intrinsic pathways.

[Key words] oridonin; multiple myeloma; apoptosis; caspase 8; mitochondrial membrane potential

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(2): 134-138]

[基金项目] 广东省自然科学基金资助项目(No. 7001196)。Project supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (No. 7001196)

[作者简介] 曲佳(1980-),女,山东省青岛市人,博士研究生,主要从事血液肿瘤生物治疗方面的研究。E-mail:qujia2000@126.com

[通信作者] 郭坤元(GUO Kun-yuan, corresponding author), E-mail: gzyuan@pub.guangzhou.gd.cn

多发性骨髓瘤是来源于浆细胞的恶性肿瘤,近年来发病率有逐渐上升的趋势。化学治疗、分子靶向药物的出现和自身造血干细胞移植在一定程度上提高了患者的中位生存期,但患者高龄、多药耐药、化疗药物对机体的毒性作用等都极大地影响着患者的预后。因此,需要寻找一种不良反应小、能辅助治疗多发性骨髓瘤的药物,以提高多发性骨髓瘤患者生存率,改善患者生活质量。

冬凌草甲素(oridonin, Ori)是从冬凌草中提取的一种四环二萜类化合物,能明显抑制乳腺癌、宫颈癌、肝癌等肿瘤细胞的生长,降低肿瘤负荷^[1-3],但其在多发性骨髓瘤中的应用尚未见报道。本实验通过观察 Ori 作用后人多发性骨髓瘤 ARH-77 细胞形态、增殖、凋亡的变化,探讨 Ori 对多发性骨髓瘤细胞增殖的抑制作用及其可能的机制,为 Ori 应用于多发性骨髓瘤的治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株和试剂

人多发性骨髓瘤 ARH-77 细胞株由本实验室保存。常规方法复苏冻存的 ARH-77 细胞置于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中(含 100 U/ml 青霉素和 100 mg/ml 链霉素),在 37 ℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。实验所用细胞均处于对数生长期。

Ori 由中国生物制品检定所提供,纯度 > 98%,用二甲基亚砜(DMSO)溶解,0.22 μm 尼龙滤膜过滤除菌,母液浓度为 0.1 mol/L, -20 ℃ 避光保存。RPMI 1640 培养液为美国 Hyclone 公司产品,胎牛血清为杭州四季青公司产品,MTT、DMSO 为美国 Sigma 公司产品。Hoechst 33258 染色试剂盒、caspase 8 凋亡试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒均购于南京凯基生物公司。

1.2 MTT 法检测 Ori 对 ARH-77 细胞的抑制作用

ARH-77 细胞接种于 96 孔板中(每孔约 1×10^4 个)培养 12 h,加入不同浓度的 Ori(终浓度分别为 1.25、2.5、5、10、20、40、80、160 μmol/L)。对应浓度的多柔比星(doxorubicin, DOX)作为阳性对照,溶剂 DMSO 为溶剂对照组,并设空白对照组。每组设 3 个复孔,每孔 100 μl,于 37 ℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中分别培养 12、24 和 48 h。每孔加入 10 μl MTT,孵育 4 h,950 × g 离心 10 min,小心去上清,每孔加入 150 μl DMSO 溶解,于酶标仪 492 nm 处检测光密度(D)值。细胞生长抑制率(%) = $(1 - \text{实验组 } D \text{ 值} / \text{阴性对照组 } D \text{ 值}) \times 100\%$

1.3 Hoechst 33258 染色检测 ARH-77 细胞的凋亡

取对数生长期的 ARH-77 细胞接种于 6 孔板(每孔约 1×10^6 个),加入终浓度为 10 μmol/L 的 Ori,作用 24 h 后在倒置显微镜下观察细胞形态。收集 1×10^6 个细胞,PBS 洗涤 2 次,加入 1 ml 4% 的甲醛溶液,4 ℃ 固定细胞 10 min。离心去除固定液,用 PBS 洗涤 2 次,离心后留 50 μl PBS 重悬细胞并制备细胞涂片,自然晾干。滴加 100 μl Hoechst 33258 工作液,室温染色 10 min,水冲洗晾干。以紫外光(340 nm 波长)激发,荧光显微镜下观察。

1.4 流式细胞术检测 ARH-77 细胞的凋亡

取 Ori(2.5、5、10 μmol/L)作用 24 h 组和阴性对照组 ARH-77 细胞各 1×10^6 个,PBS 洗涤 2 次,然后重悬细胞于 200 μl 结合缓冲液,再加入 5 μl Annexin V-FITC 和 5 μl PI,混匀,避光室温反应 15 min。PBS 洗涤 2 次,去除多余荧光染料,流式细胞仪检测 ARH-77 细胞的凋亡(激发波长 488 nm)。实验重复 3 次。

1.5 Caspase 8 凋亡试剂盒检测 caspase 8 的活化

收集实验组(Ori 2.5、5、10 μmol/L 作用 24 h)和阴性对照组细胞约 4×10^6 个,PBS 洗涤 2 次,每次 500 × g 离心 5 min,尽量去除上清。在收集的沉淀细胞中加入 50 μl 冰冷的裂解缓冲液,吹打均匀,置冰上裂解 60 min;其间涡旋振荡 4 次,每次 10 s。4 ℃、10 000 × g 离心 1 min,小心吸取上清至新管中,置于冰上待用。测定上清中蛋白浓度,吸取约含 200 μg 蛋白的细胞裂解上清(如体积不足 50 μl,用裂解缓冲液补至 50 μl)至 96 孔板,加入 50 μl 的 2 × 反应缓冲液和 5 μl caspase 8 底物,以裂解缓冲液和反应缓冲液作为空白对照,并于 37 ℃ 避光孵育 4 h。酶标仪 405 nm 处测定各组细胞的光密度值。

1.6 流式细胞术检测线粒体膜电位(Δψ_m)的变化

将对数生长期 ARH-77 细胞经不同终浓度(2.5、5、10 μmol/L)的 Ori 作用 24 h,收集 1×10^6 个细胞,并设培养液对照组。PBS 洗涤 2 次,取 500 μl JC-1 工作液重悬细胞,37 ℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中孵育 20 min。室温离心收集 ARH-77 细胞,缓冲液洗涤 2 次,用 500 μl 孵育缓冲液重悬 ARH-77 细胞,流式细胞仪检测线粒体膜电位的变化(激发波长 488 nm)。实验重复 3 次。

1.7 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 16.0 软件进行数据处理,各时间点和各浓度之间的比较采用 *F* 检验,各组指标与对照组间的比较采用 S-N-K Test 分析,*P* < 0.05 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ori 抑制 ARH-77 细胞的生长

MTT 检测结果显示, 在同一时间点, 不同浓度的 Ori 对 ARH-77 细胞的抑制率有显著差异; 同一浓度 Ori 时, 随着作用时间的延长, Ori 对 ARH-77 细胞的生长抑制作用明显增强, 且差异均有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 1)。低浓度 Ori (1.25、2.5 $\mu\text{mol/L}$) 时, 48 h 抑制率虽比 24 h 略有增高, 但无统计学意义。由此表明, Ori 对人多发性骨髓瘤 ARH-77 细胞生长的抑制作用呈时间和剂量依赖性。其中作用 24 h 时 Ori 的 IC_{50} 值为 11.53 $\mu\text{mol/L}$, 阳性对照 DOX 的 IC_{50} 值为 2.30 $\mu\text{mol/L}$ 。

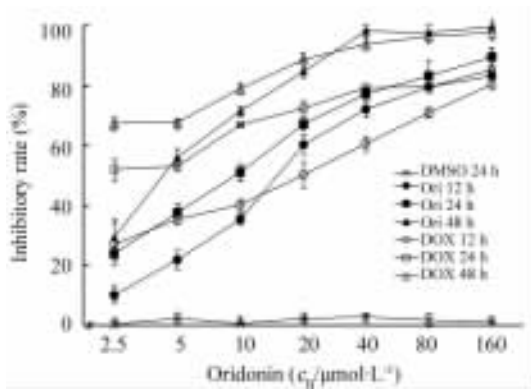


图 1 冬凌草甲素抑制 ARH-77 细胞的生长

Fig. 1 Oridonin inhibited growth of ARH-77 cells

2.2 Ori 对 ARH-77 细胞形态的影响

倒置显微镜观察: 对照组 ARH-77 细胞呈圆形, 大小较均一, 折光性好, 透亮, 边缘清楚。用 10 $\mu\text{mol/L}$ Ori 处理 24 h 后, ARH-77 细胞生长状态变

差, 部分细胞出现皱缩, 胞体变小, 细胞碎片增多, 折光性减弱, 胞质中出现空泡。荧光显微镜观察: 与对照组相比, 10 $\mu\text{mol/L}$ Ori 处理组 ARH-77 细胞有部分出现细胞核浓缩, 可见凋亡小体 (图 2)。

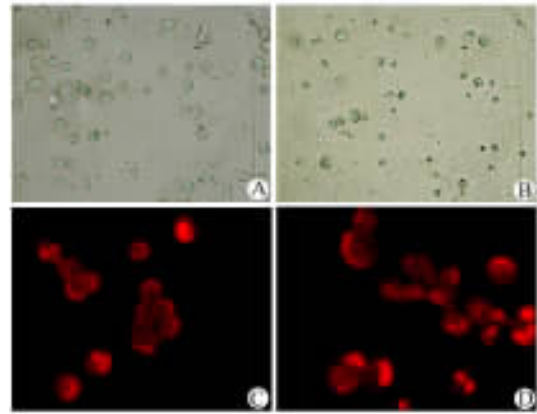


图 2 冬凌草甲素作用后 ARH-77 细胞的形态学改变

Fig. 2 Morphological change of ARH-77 cells after oridonin treatment

- A: ARH-77 cells (phase contrast microscope, $\times 400$);
- B: Ori-treated ARH-77 cells (phase contrast microscope, $\times 400$);
- C: ARH-77 cells (Hoechst 33258 staining, $\times 1\ 000$);
- D: Ori-treated ARH-77 cells (Hoechst 33258 staining, $\times 1\ 000$)

2.3 Ori 诱导 ARH-77 细胞凋亡

流式细胞仪检测结果显示, Ori 处理 24 h 后, 随着药物浓度的加大, 细胞早期凋亡率随之增加。2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 Ori 作用后, 细胞早期凋亡率分别为 (15.07 \pm 0.78)%、(21.00 \pm 1.49)%、(27.45 \pm 2.47)%; 对照组细胞早期凋亡率为 (5.27 \pm 1.46)% ($P < 0.01$, 图 3)。

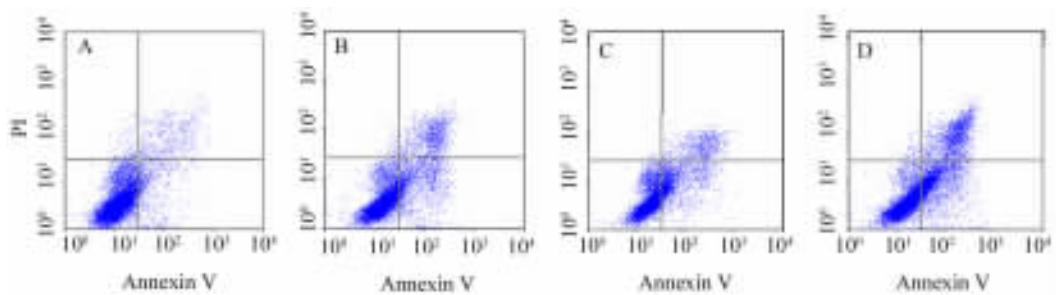


图 3 冬凌草甲素诱导 ARH-77 细胞凋亡

Fig. 3 Oridonin induced apoptosis of ARH-77 cells

- A: Ctrl; B: 2.5 $\mu\text{mol/L}$ Ori; C: 5 $\mu\text{mol/L}$ Ori; D: 10 $\mu\text{mol/L}$ Ori

2.4 Ori 诱导 ARH-77 细胞 caspase 8 活化

分光光度法检测不同浓度 Ori 作用于 ARH-77

细胞 24 h 后 caspase 8 的活化, 各组的光密度值分别为 0.188 \pm 0.002、0.186 \pm 0.001 和 0.198 \pm 0.001。

3 个 Ori 实验组与对照组 (0.154 ± 0.007) 相比有显著的增加 ($P < 0.05$); 各实验组间结果虽略有差别, 但差异无统计学意义 ($P = 0.08$)。

2.5 Ori 对 ARH-77 细胞线粒体 $\Delta\psi_m$ 的影响

JC-1 是一种阳离子脂质荧光探针, 正常线粒体依赖 $\Delta\psi_m$ 摄入 JC-1, 使其形成多聚体而产生红色荧光。细胞凋亡时, 线粒体 $\Delta\psi_m$ 去极化, JC-1 被释放, 并以单体形式存在于胞质内, 产生绿色荧光。故可通过观察荧光颜色的改变来检测 $\Delta\psi_m$ 的变化, 实验

结果中以绿色荧光细胞百分率表示线粒体 $\Delta\psi_m$ 的降低, 反映细胞凋亡程度^[4]。结果显示, ARH-77 细胞经 0、2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 的 Ori 分别作用 24 h 后, 绿色荧光细胞百分率分别为 (16.96 ± 0.50)%、(26.80 ± 0.75)%、(36.81 ± 2.27)%、(49.48 ± 1.10)%。这表明随药物浓度增加, 细胞的 $\Delta\psi_m$ 随之下降, 线粒体膜发生去极化 ($P < 0.01$, 图 4), 提示 ARH-77 细胞发生了凋亡。

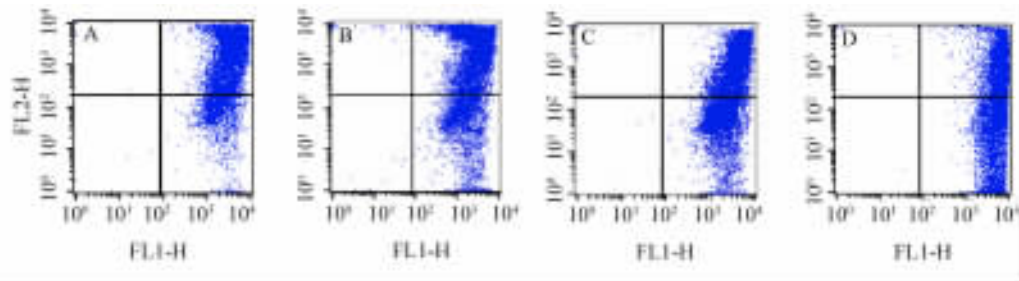


图 4 不同浓度冬凌草甲素作用于 ARH-77 细胞 24 h 后线粒体膜电位的变化

Fig. 4 Mitochondrial membrane potential changes of ARH-77 cells after treatment with different concentrations of Ori for 24 h

A: Ctrl; B: 2.5 $\mu\text{mol/L}$ Ori; C: 5 $\mu\text{mol/L}$ Ori; D: 10 $\mu\text{mol/L}$ Ori

3 讨论

早期研究发现, Ori 具有的抗炎、杀菌等生物学效应, 近年人们又把焦点集中在它的抗肿瘤活性上^[5-7], 但目前尚未见其用于治疗多发性骨髓瘤的报道。本实验发现, Ori 在体外能明显抑制多发性骨髓瘤 ARH-77 细胞的生长, 并呈现时间和剂量依赖性。实验中化疗药物多柔比星 (DOX) 作为阳性对照, 可以看到 DOX 在体外对 ARH-77 细胞也具有时间和剂量依赖性的抑制作用, 其 24 h IC_{50} 明显低于 Ori。DOX 具有很强的细胞毒作用, 能引起骨髓抑制等不良反应; 而 Ori 的体内研究却未发现其对小鼠的骨髓抑制等不良反应^[8]。因此, 与 DOX 相比, Ori 毒性作用较小。

细胞凋亡也称为程序性细胞死亡, 是一种由基因严格控制的细胞主动性死亡方式。研究发现, 肿瘤的发生、发展与细胞凋亡异常密不可分。使用能够促进肿瘤细胞凋亡、抑制其生长的抗癌药物是目前肿瘤治疗的主要手段之一^[9]。本研究的形态学观察显示, Ori 作用后, 多发性骨髓瘤 ARH-77 细胞出现核固缩、胞体变小, 并形成凋亡小体。流式细胞术检测结果也表明, 不同浓度的 Ori 作用使 ARH-77 细胞的早期凋亡率明显增加。

两种途径可激活细胞凋亡信号: 由细胞表面死亡受体所介导的外源性途径和由线粒体介导的内源性途径, 两者最终可引起效应性 caspase 3、6、8 的活化, 导致细胞发生凋亡^[10-11]。在外源性凋亡途径中, 死亡受体与其相应配体结合并活化后, 将酶原形式的 pro-caspase 8 激活, 进而激活效应性 caspase 3^[12-14]。Liu 等^[15]发现, Fas/FasL 在 Ori 诱导人淋巴瘤 U937 细胞的凋亡过程中发挥了一定的作用。本研究发现, 不同浓度的 Ori 作用 ARH-77 细胞 24 h 可活化 caspase 8, 但各浓度间并无明显差异, 表明 Ori 能够部分地激活外源性凋亡途径, 从而引起骨髓瘤细胞 ARH-77 的凋亡。

内源性凋亡途径是由线粒体介导。早在十几年前, Zamzami 等^[16-17]就通过体内、体外实验证实线粒体跨膜电位 ($\Delta\psi_m$) 的降低是细胞凋亡过程中的首要事件, 一旦 $\Delta\psi_m$ 发生改变, 细胞凋亡将不可逆转, 且早于细胞核出现凋亡的特征性变化之前。受到凋亡刺激后, 线粒体膜通透性发生改变, 线粒体基质肿胀, 并伴随内膜电位的下降, 导致电子传递链的崩解、细胞色素 C 等促凋亡蛋白的释放以及细胞内活性氧的改变, 最终引起细胞凋亡^[18-19]。本实验应用荧光探针 JC-1 检测 $\Delta\psi_m$ 的改变, 观察到经 Ori 作用 24 h 后, 低浓度时药物即可改变 $\Delta\psi_m$, 而当 Ori 浓度

增加后, 细胞的 $\Delta\psi_m$ 也随之发生更为显著地下降。表明线粒体参与了 Ori 诱导 ARH-77 细胞凋亡发生, 并呈现剂量依赖性。研究^[8,20]发现, Ori 能够降低人白血病和小鼠纤维肉瘤细胞的 $\Delta\psi_m$, 同时下调 Bcl-2 的表达、活化 caspase 3, 并促进细胞色素 C 的释放。这些结果表明, Ori 损伤了线粒体, 通过激活内源性凋亡通路而最终引起肿瘤细胞凋亡。

综上所述, Ori 在体外可通过内、外源凋亡途径诱导人多发性骨髓瘤 ARH-77 细胞发生凋亡。Ori 对于多发性骨髓瘤的治疗具有一定的应用前景, 但其具体的分子机制仍需进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Cui Q, Tashiro S, Onodera S, Minami M, Ikejima T. Autophagy preceded apoptosis in oridonin-treated human breast cancer MCF-7 cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(5): 859-864.
- [2] Hu HZ, Yang YB, Xu XD, Shen HW, Shu YM, Ren Z, *et al*. Oridonin induces apoptosis via PI3K/Akt pathway in cervical carcinoma HeLa cell line [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28(11): 1819-1826.
- [3] Huang J, Wu L, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. Reactive oxygen species mediate oridonin-induced HepG2 apoptosis through p53, MAPK, and mitochondrial signaling pathways [J]. *J Pharmacol Sci*, 2008, 107(4): 370-379.
- [4] Baxa DM, Luo X, Yoshimura FK. Genistein induces apoptosis in T lymphoma cells via mitochondrial damage [J]. *Nutr Cancer*, 2005, 51(1): 93-101.
- [5] Zhang CL, Wu LJ, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. Oridonin induced A375-S2 cell apoptosis via Bax-upregulated caspase pathway activation, dependent on the cytochrome c/caspase-9 apoptosis [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2004, 6(2): 127-138.
- [6] Lou H, Zhang X, Gao L, Feng F, Wang J, Wei X, *et al*. *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of oridonin nanosuspension [J]. *Int J Pharm*, 2009, 379(1): 181-186.
- [7] Zhang Y, Wu Y, Wu D, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. NF-kappa B facilitates oridonin-induced apoptosis and autophagy in HT1080 cells through a p53-mediated pathway [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2009, 489(1-2): 25-33.
- [8] Zhou GB, Kang H, Wang L, Gao L, Liu P, Xie J, *et al*. Oridonin, a diterpenoid extracted from medicinal herbs, targets AML1-ETO fusion protein and shows potent antitumor activity with low adverse effects on t(8; 21) leukemia *in vitro* and *in vivo* [J]. *Blood*, 2007, 109(8): 3441-3450.
- [9] Pathania D, Millard M, Neamati N. Opportunities in discovery and delivery of anticancer drugs targeting mitochondria and cancer cell metabolism [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61(14): 1250-1275.
- [10] Takeda K, Stagg J, Yagita H, Okumura K, Smyth MJ. Targeting death-inducing receptors in cancer therapy [J]. *Oncogene*, 2007, 26(25): 3745-3757.
- [11] Debatin KM. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2004, 53(3): 153-159.
- [12] Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(4): 277-288.
- [13] Holloch PA, Griffith TS. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): a new path to anti-cancer therapies [J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 625(1-3): 63-72.
- [14] Strasser A, Jost PJ, Nagata S. The many roles of Fas receptor signaling in the immune system [J]. *Immunity*, 2009, 30(2): 180-192.
- [15] Liu YQ, Mu ZQ, You S, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. Fas/FasL signaling allows extracellular-signal regulated kinase to regulate cytochrome c release in oridonin-induced apoptotic U937 cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2006, 29(9): 1873-1879.
- [16] Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Zanin C, Vayssière JL, Petit PX, *et al*. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death *in vivo* [J]. *J Exp Med*, 1995, 181(5): 1661-1672.
- [17] Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Decaudin D, Macho A, Hirsch T, *et al*. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death [J]. *J Exp Med*, 1995, 182(2): 367-377.
- [18] Zamzami N, Larochette N, Kroemer G. Mitochondrial permeability transition in apoptosis and necrosis [J]. *Cell Death Differ*, 2005, 12(Suppl 2): 1478-1480.
- [19] Gulbins E, Dreschers S, Bock J. Role of mitochondria in apoptosis [J]. *Exp Physiol*, 2003, 88(1): 85-90.
- [20] Wu JN, Huang J, Yang J, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. Caspase inhibition augmented oridonin-induced cell death in murine fibrosarcoma I929 by enhancing reactive oxygen species generation [J]. *J Pharmacol Sci*, 2008, 108(1): 32-39.

[收稿日期] 2009 - 12 - 29

[修回日期] 2010 - 02 - 28

[本文编辑] 徐红梅

《中国肿瘤生物治疗杂志》欢迎投稿、欢迎订阅