

· 研究简报 ·

牛蒡子苷元诱导人白血病细胞凋亡的作用及机制

王 潞^{1,2}, 赵 烽^{1*}, 刘 珂^{1,2}

(1. 烟台大学 药学院, 山东 烟台 264005; 2. 辽宁中医药大学 药学院, 辽宁 大连 116600)

关键词: 牛蒡子苷元; HL-60 细胞; K562 细胞; 细胞凋亡

中图分类号: R963 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2008)05-0542-06

Induction of apoptosis of the human leukemia cells by arctigenin and its mechanism of action

WANG Lu^{1,2}, ZHAO Feng^{1*}, LIU Ke^{1,2}

(1. School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005, China;

2. School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

Abstract: This study investigated the effect of arctigenin (ARG) on the induction of apoptosis and the putative pathways of its action in HL-60 and K562 cells. MTT assay was used to detect the cytotoxic effect of ARG in HL-60 and K562 cells. The apoptosis was observed by Hoechst 33258 fluorescence staining and DNA agarose gel electrophoresis. Caspase-3 enzyme activity was measured by caspase-3 enzyme activity detection kit. The expression of related protein was analyzed by Western blotting and the vascular endothelial growth factor (VEGF) level was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). ARG-treated HL-60 cells and K562 cells exhibited growth inhibition and displayed several features of apoptosis, including DNA fragmentation and DNA laddering by agarose gel electrophoresis. It was observed that poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP) were cleaved to smaller molecules and ARG induced upregulation of bax and downregulation of bcl-2 protein expression. However, it had no effect on VEGF levels. Taken together, this study demonstrated that ARG is a potent inducer of apoptosis and this was accompanied by caspase-3 activation and upregulation of bax/bcl-2, which offers a potential mechanism for the apoptosis-inducing activity of ARG.

Key words: arctigenin; HL-60 cell; K562 cell; apoptosis

牛蒡子来源于菊科两年生草本植物牛蒡子属牛蒡(*Atractium lappa* L.)的干燥成熟果实,为常用中药,有疏风散热、解毒透疹、利咽消肿等功效,现代药理学研究表明牛蒡子有抗病毒^[1,5]、抗炎^[2]、抗癌^[3,4]、抑制热休克反应^[6]等广泛的药理活性。其主要活性成分是牛蒡子苷元(arctigenin, ARG)^[1]。

Hirano T等^[7]曾对 ARG 的抗白血病活性进行了较为系统地研究,证明 ARG 对白血病细胞株 HL-60 有强的抑制活性, $IC_{50} < 100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 几乎和目前使用的抗白血病药物活性相当,通过染色排除试验证明 ARG 对 HL-60 细胞几乎无毒性,而传统的抗白血病药物的毒性很强。并且证明了 ARG 可强烈地抑制 [³H] 胸腺嘧啶核苷、 [³H] 尿嘧啶核苷、 [³H] 亮氨酸结合进 HL-60 细胞。这些结果说明 ARG 抑制 HL-60 细胞的生长是以一种无毒的机制进行的,可能是通过停止白血病细胞合成 DNA、

收稿日期: 2007-10-15.

*通讯作者 Tel: 86-535-6706921, Fax: 86-535-6706066, E-mail: zhaofeng@ytu.edu.cn

RNA 或蛋白质发挥作用。可见,对 ARG 抗白血病的机制进行深入探讨具有很大的意义。但是,关于 ARG 诱导白血病细胞凋亡的作用及机制尚未见报道,因此,本文以急性早幼粒细胞白血病细胞株 HL-60 和慢性粒细胞白血病细胞株 K562 为模型,探讨了 ARG 诱导两种白血病细胞凋亡的作用及相关机制。

材料与方法

主要材料 ARG 由牛蒡苷按照文献^[8]方法自行酶解而得,为无色棱柱状结晶,经 ¹H NMR 及 ¹³C NMR 鉴定其结构,并检验其纯度大于 99%。以 DMSO 溶解,稀释至不同浓度(DMSO 的终浓度控制在小于 0.1%),于 -20 °C 冷藏备用。人白血病株 HL-60 与 K562 细胞株均购自中国科学院上海细胞库(ATCC);人胎儿成纤维细胞为烟台市毓璜顶医院赠送;人 VEGF ELISA 试剂盒购自晶美生物工程有限公司;Bradford 蛋白浓度测定试剂盒,caspase-3 活性检测试剂盒,细胞凋亡—DNA Ladder 抽提试剂盒,Western blotting 用 caspase-3 抗体、多聚腺苷二磷酸核糖多聚酶(PARP)抗体、bax 抗体、bcl-2 抗体及试剂均购自碧云天生物技术研究所。

主要仪器 JY96-IIIN 超声波细胞破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司);全自动酶标仪(美国 Biotek 集团);TE2000-U 倒置荧光显微镜(日本 Nikon 公司);MINIVE 垂直蛋白电泳仪(美国 Amersham Biosciences 公司);OMEGA10 凝胶成像分析仪(美国 ULTRA-LUM 公司)。

细胞培养 HL-60、K562 细胞与人胎儿成纤维细胞均用含 10% 胎牛血清、100 μg·mL⁻¹链霉素,100 单位·mL⁻¹青霉素的 RPMI 1640 培养液于 37 °C CO₂ 培养箱中常规培养,隔天传代,HL-60 与 K562 细胞呈悬浮状态生长,人胎儿成纤维细胞呈贴壁状态生长。待细胞处于对数生长期时进行实验。

细胞增殖/毒性分析 取对数生长期的细胞,制成细胞数 1 × 10⁵/mL 的单细胞悬液,接种于 96 孔板内,每孔 200 μL,4 h 后加入不同浓度的 ARG,每个浓度 3 个平行,同时设空白对照组,于 CO₂ 培养箱中培养。48 h 后,每组加入 MTT(终浓度 200 μg·mL⁻¹) 8 μL,继续培养 4 h 后弃去上清液,吸干残留液,每孔加入 DMSO 100 μL,振荡至生成的蓝紫色甲瓞结晶完全溶解后,以 630 nm 为参比波长,用酶标仪测定 570 nm 处的吸收度值(A₅₇₀),计

算细胞的存活率。

细胞凋亡形态学观察 取对数生长期的白血病细胞制成细胞数为 2 × 10⁵/mL 的单细胞悬液,接种于 6 孔板中,每孔 2 mL,每组设 3 个平行。4 h 后加入不同浓度的 ARG,同时设空白对照组,置 37 °C 培养箱中培养 48 h 后收集细胞,1 000 r·min⁻¹离心 3 min,弃上清液,用 PBS 洗涤细胞 1 次,同上离心收集细胞。加入含 Hoechst 33258(终浓度为 20 μg·mL⁻¹)的 PBS 20 μL 重悬细胞,置于冰上染色 15 min,吸取少量点在载玻片上,于倒置荧光显微镜下观察细胞形态并照相。

DNA Ladder 测定 取对数生长期的白血病细胞制成细胞数为 4 × 10⁵/mL 的单细胞悬液,接种于 60 mm × 15 mm 培养皿(每皿 6 mL),置 37 °C 培养箱中培养 4 h 后分别加入不同浓度的 ARG,同时设空白对照组,继续培养 48 h 后收集细胞,按照 DNA Ladder 试剂盒说明书方法进行 DNA 提取。DNA 上样 15 μL,1.5% 琼脂糖凝胶电泳在恒压 100 V 下电泳 1 h,将凝胶浸入 EB 中染色 30 min,采用凝胶成像分析仪观察并照像。

Caspase-3 酶活力水平的检测 同上述方法接种细胞,每组设 3 个平行。置 37 °C 培养箱中培养 4 h 后分别加入不同浓度的 ARG,同时设空白对照组,继续培养 24 h 后收集细胞,按照 caspase-3 试剂盒说明书方法进行测定,并根据说明计算细胞内 caspase-3 的酶活力水平。

Western blotting 检测 同上述方法接种细胞并加药,培养 48 h 后收集细胞,1 000 r·min⁻¹离心 3 min,弃上清液,用 PBS 洗涤细胞 1 次,同上离心收集细胞,加入含 1% PMSF 的 PBS 重悬细胞,于超声波细胞破碎仪内进行细胞破碎,将破碎完全的细胞悬液于 10 000 r·min⁻¹离心 5 min,取上清液,采用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒进行总蛋白浓度测定,用 PBS 调节蛋白浓度使每管总蛋白浓度均相同,加入 Loading buffer 上样缓冲液,于沸水中煮沸 3~5 min。取 50 μg 总蛋白上样,12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳于 70 V 下电泳 2 h,将凝胶上蛋白用电泳法转移至尿素纤维素膜上,5% 的脱脂奶粉 4 °C 封闭过夜,T-TBS 缓冲液(10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 7.14, 150 mmol·L⁻¹ NaCl, 0.05% Tween 20)洗膜 3 次,每次 5 min,加入第一抗体 4 °C 封闭 6 h,用相同方法洗膜,加入第二抗体 4 °C 封闭 1 h,相同方法洗膜后加入化学发光剂,再放入暗盒并压片,压片 1 min 后显影,定影。

VEGF 表达水平的检测 取对数生长期的白血病细胞制成细胞数为 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的单细胞悬液, 接种于 96 孔细胞培养板(每孔 $200 \mu\text{L}$), 每组设 3 个平行孔。培养 4 h 后分别加入不同浓度的 ARG, 同时设空白对照组, 置 37°C 培养箱中培养 48 h 后收集细胞上清液, 按照 VEGF 试剂盒说明书方法进行测定, 根据标准曲线计算各组培养上清液中 VEGF 的浓度。

统计学分析 采用统计软件 SPSS 10.0 和 Excel 2003 软件进行数据统计分析, 各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异的比较采用 *t* 检验。

结果

1 ARG 对人白血病细胞 HL-60、K562 以及人正常细胞增殖的影响

如图 1 所示, $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ARG 作用于人胎儿成纤维细胞即正常细胞(normal cells) 48 h 后, 细胞的存活率为 90.2%, 在 $1 \sim 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, ARG 对正常细胞几乎无毒, 细胞存活率在 100% 左右。而 ARG 作用于 K562 及 HL-60 细胞 48 h 后, 细胞的存活率较空白组明显降低, 并随着药物浓度

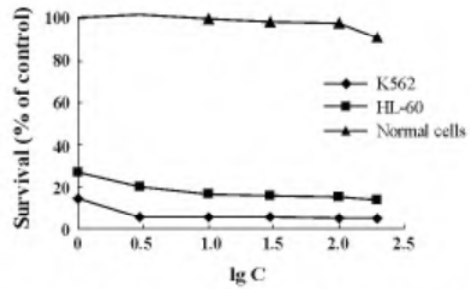


Figure 1 Cytotoxicity of ARG on normal cells, HL-60 cells and K562 cells ($n=3, \bar{x} \pm s$). Cells were treated with 1, 3, 10, 30, 100, 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ of arctigenin for 48 h. Survival rate was tested with MTT assay

的增高细胞存活率下降。ARG 对 HL-60 细胞作用 48 h 后的半数抑制浓度 IC_{50} 为 $0.42 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 对 K562 细胞作用 48 h 后的半数抑制浓度 IC_{50} 为 $0.58 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2 ARG 对 HL-60 及 K562 细胞形态的影响

如图 2 荧光染色照片所示, 空白对照组中 HL-60 及 K562 细胞(用 0.1% DMSO 处理)均呈现

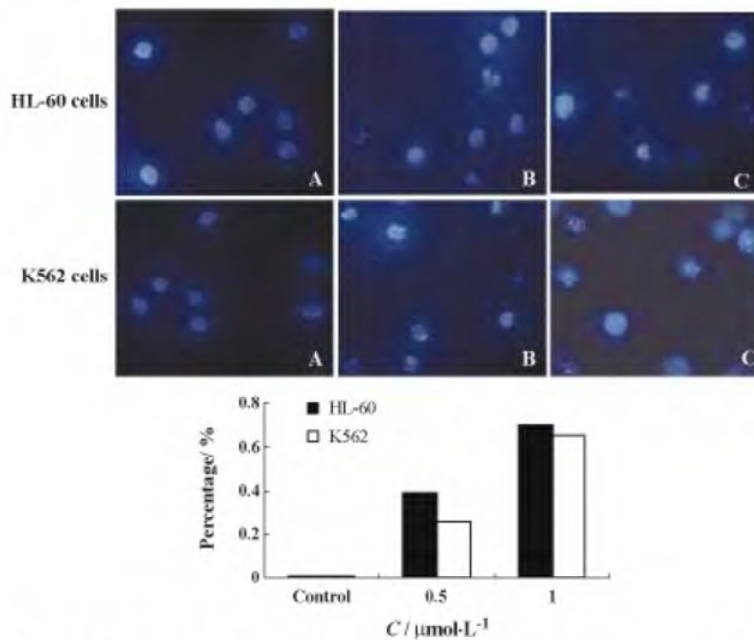


Figure 2 HL-60 and K562 cells apoptosis and necrosis in fluorescent microscope stained by Hoechst 33258 ($\times 400$). A; Control group; B; ARG $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; C; ARG $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. In control group, the chromatin was evenly distributed and stained regularly. When cells were exposed to ARG, the more higher the ARG concentration was, the much more condensation and margination of the chromatin there were. The number of apoptotic cells and normal cells were counted at the concentration of $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, and the percentage of apoptosis was also described in Figure 2

圆形,颜色均匀。ARG 作用于 K562 及 HL-60 细胞 48 h 后,与空白对照组相比,细胞呈现出一致的形态上的变化,包括细胞体积缩小、核断裂、染色质凝缩、凋亡小体形成、核小体间 DNA 断裂等。ARG 的浓度为 $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,已凋亡的细胞分别占 HL-60 及 K562 细胞总数的 39% 及 26%, ARG 的浓度为 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,凋亡比率上升,分别为 71% 及 65%。

3 ARG 对 HL-60 及 K562 细胞 DNA 断裂的作用

细胞凋亡时基因组 DNA 通常被特异性核酸酶水解成 180 bp 的片段。如图 3 所示,ARG 作用于 K562 及 HL-60 细胞 48 h 后,收集细胞,抽提 DNA,并在 1.5% 的琼脂糖凝胶上电泳,结果可见空白组凋亡几乎未见有 DNA 梯型条带的出现,而加药组随 ARG 浓度的增高,条带逐渐变长,引起 HL-60 及 K562 细胞凋亡的程度明显增强。

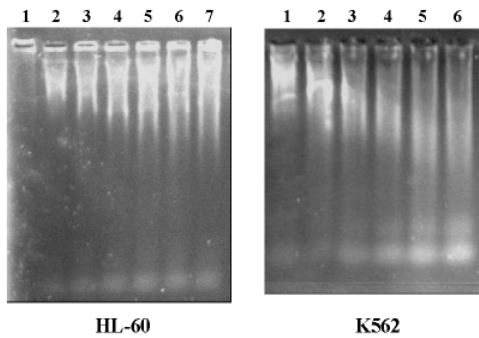


Figure 3 DNA fragmentation induced by ARG in HL-60 cells and K562 cells. Cells were subsequently harvested. DNA was isolated and DNA fragmentation was visualized as oligonucleosome-sized fragmentation in ethidium bromide after DNA agarose gel electrophoresis. 1: Control group; 2: ARG $0.06 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 3: ARG $0.12 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 4: ARG $0.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 5: ARG $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 6: ARG $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 7: ARG $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

4 ARG 对 HL-60 及 K562 细胞内 caspase-3 活性的影响

Caspase-3 是凋亡的执行人,在肿瘤细胞凋亡中起着十分重要的作用。ARG 能诱导凋亡,应了解其是否通过该途径,结果可见,在 ARG 处理 HL-60 与 K562 细胞 24 h 后, caspase-3 活性均显著增加,随 ARG 浓度的升高呈现较好的剂量依赖性,且浓度在 $0.5 \sim 1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,与空白对照组相比, $P < 0.05$,

具有显著差异(图 4),因此,ARG 可上调 HL-60 及 K562 细胞内 caspase-3 的酶活力水平。

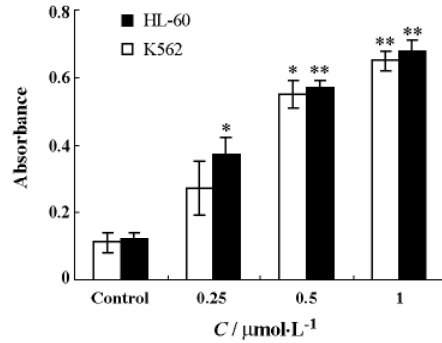


Figure 4 ARG treated HL-60 and K562 cells showed high levels of caspase-3 activity. Cells were treated with 0.1% DMSO or ARG for 24 h. Cell lysates were prepared from each sample and used in the caspase-3 activity assay. Absorbance was read at 405 nm. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

5 ARG 对 HL-60 及 K562 细胞中 bax、bcl-2 等凋亡相关蛋白表达的影响

凋亡的另一特征是 caspase-3 蛋白酶水解分子量为 116 kD 的多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶 [poly-(ADP-ribose) polymerase, PARP], 产生 85 kD 和 29 kD 两个片段,这将导致 PARP 正常功能的丧失,从而诱发细胞凋亡。ARG 处理 K562 与 HL-60 细胞不同时间后,用识别 PARP 的 116 kD 片段和 85 kD 片段的抗体 Western blotting 检测 PARP,结果可见 PARP 的剪切片段,并随时间增加量逐渐增加,而完整 PARP 的条带相应减少。此外,ARG 作用于 K562 及 HL-60 细胞 48 h 后,空白对照组几乎不表达 bax 蛋白,而 ARG 处理组 bax 蛋白的表达量随加药浓度的增高而增高,表明 ARG 可促进 bax 的上调;而空白组及低浓度加药组 bcl-2 的表达量较高,但随加药浓度的增高而降低,表明 ARG 可以促使 bcl-2 表达量下调(图 5)。

6 ARG 对 HL-60 及 K562 细胞内 VEGF 表达水平的影响

$0.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ARG 作用于 K562 细胞 48 h 后, VEGF 浓度为 $(1366.2 \pm 44.8) \text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$,与空白组 VEGF 浓度 $(1567.4 \pm 88.5) \text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 相比较, $P > 0.05$,无显著性差异,表明 ARG 对 K562 细胞内 VEGF 无明显抑制作用。 $0.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ARG 作用于 HL-60 细胞 24 h 后, VEGF 浓度为 $(433.9 \pm$

22.4) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 空白组 VEGF 浓度为 (600.7 ± 5.7) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 与空白组相比, $P > 0.05$, 无显著性差异, 表明 ARG 对 HL-60 细胞 VEGF 的表达亦无影响。

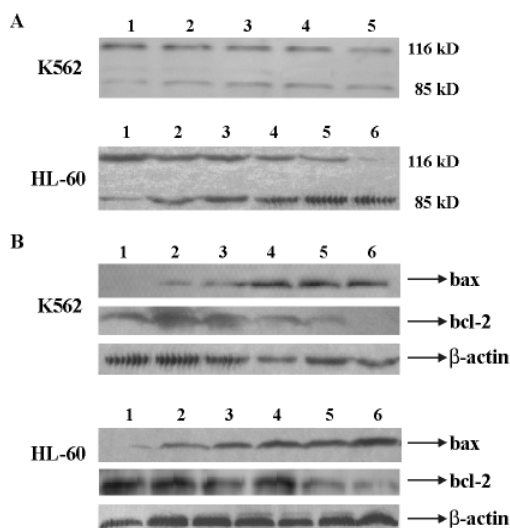


Figure 5 Treatment of HL-60 and K562 cells with ARG induced PARP cleavage (A), upregulation of bax and downregulation of bcl-2 (B). Cell lysates were prepared from 0.1% DMSO (lane 1), ARG 0.125 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (lane 2), 0.25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (lane 3), 0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (lane 4), 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (lane 5) and 3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (lane 6). Total protein (50 μg per lane) was resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane and probed with corresponding antibody

讨论

ARG 属木质素类化合物, 近年来其生物学活性受到了国内外学者的广泛关注。ARG 的抗肿瘤谱较广, 具有抗肺癌、皮肤癌^[9], 抗乳腺癌、结肠癌、胰腺癌^[10, 11] 等药理活性, 尤其对白血病细胞株 HL-60 与 K562 的抑制作用较强^[7]。本文的研究结果也表明, ARG 能有效抑制急性早幼粒细胞白血病 HL-60 的增殖, 结果与文献报道一致。研究证明, ARG 也能有效抑制慢性粒细胞性白血病 K562 的增殖, 并且, 形态学及 DNA 片段化电泳结果表明 ARG 是通过诱导细胞凋亡发挥细胞毒作用。

细胞凋亡有外源性和内源性两种激活途径, 外源性途径主要经 caspase 将凋亡信号传至细胞核, 从而引起细胞凋亡; 而内源性途径是由线粒体介导

的细胞凋亡途径^[12]。位于上游的 caspase-8 及 -10 被激活后, 顺次活化位于下游的 caspase-3, -6 和 -7, 随之一系列下游 caspase 的底物被降解, 最终完成细胞凋亡的过程^[13]。PARP 是凋亡的标志底物, 它参与 DNA 的修复及基因的整合, 另外也能抑制与细胞凋亡晚期核小体间染色体的断裂有关的 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 依赖性核酸内切酶的活化。它的降解打破了细胞的平衡状态, 细胞因此不能进行正常的生理活动, 核酸内切酶的活化又促成了核内 DNA 的断裂, 从而使细胞走向凋亡^[14]。本实验结果表明, ARG 可以提高 HL-60 及 K562 细胞内 caspase-3 的酶活力水平, 并且可以促使 caspase-3 的作用底物 PARP 发生降解。而 bax/bcl-2 同二聚体与 bax/bcl-2 或 bax/bcl-X_L 异二聚体的比例决定着细胞对凋亡刺激信号敏感性, 决定着细胞存活或死亡^[15], 本实验证明在 ARG 作用白血病细胞 48 h 后, bax 的表达随药物浓度的增加而上调, bcl-2 表达下调, bax/bcl-2 水平随药物浓度的增加而上升。可见, 在 ARG 诱导的白血病细胞凋亡过程中, bax/bcl-2 及 caspase-3 酶活力水平升高, 此后 caspase-3 底物 PARP 被降解, DNA 发生片段化, 随即 HL-60 及 K562 凋亡, 表明 ARG 有可能通过改变 bax/bcl-2 的表达, 激活线粒体途径而诱导细胞凋亡。

综上所述, 诱导细胞凋亡是 ARG 抑制人白血病细胞 HL-60 与 K562 增殖的机制之一, 且 ARG 对两种白血病细胞的作用几乎一致。ARG 诱导白血病细胞凋亡的机制可以初步总结为: ARG 通过上调 bax/bcl-2 的表达, 提升 caspase-3 的酶活力水平, 促进 caspase-3 的作用底物 PARP 被剪切, 进而产生细胞内染色质凝缩、片断化以及 DNA 梯型条带, 从而诱发细胞的程序性死亡即凋亡, 并且此过程与白血病细胞内 VEGF 的水平无关。有关 ARG 诱导白血病细胞 HL-60 与 K562 凋亡的详细途径还待今后进一步阐明。

References

- [1] Yang ZF, Liu N, Huang BS, et al. Effect of anti-influenza virus of arctigenin *in vivo* [J]. Chin Med Mater (中草药), 2005, 11:1012-1014.
- [2] Cho MK, Jang YP, Kim YC, et al. Arctigenin, a phenylpropanoid dibenzylbutyrolactone lignan, inhibits MAP kinases and AP-1 activation via potent MKK inhibition; the role in TNF- α inhibition [J]. Int Immunopharmacol, 2004, 4:1419-1429.
- [3] Awale S, Lu J, Kalauni SK, et al. Identification of

- arctigenin as an antitumor agent having the ability to eliminate the tolerance of cancer cells to nutrient starvation [J]. *Cancer Res*, 2006,66:1751-1757.
- [4] Matsumoto T, Hosono-Nishiyama K, Yamada H. Antiproliferative and apoptotic effects of butyrolactone lignans from *Arctium lappa* on leukemic cells [J]. *Planta Med*, 2006,72:276-278.
- [5] Gao Y, Dong X, Kang TG, et al. Activity of *in vitro* anti-influenza virus of arctigenin [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2002,33:724-726.
- [6] Ishihara K, Yamaqishi N, Saito Y, et al. Arctigenin from *Fructus Arctii* is a novel suppressor of heat shock response in mammalian cells [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2006, 11:154-161.
- [7] Hirano T, Gotoh M, Oka K. Natural flavonoids and lignans are potent cytostatic agents against human leukemic HL-60 cells [J]. *Life Sci*, 1994,55:1061-1069.
- [8] Hu YJ, Fan YH, Xiao MX, et al. Preparation of arctigenin by enzymolysis of arctiin with snail hydrolase [J]. *J Guang Zhou Univ Tradit Chin Med (广州中医药大学学报)*, 2004,21:473-475.
- [9] Takasaki M, Konoshima T, Komatsu K, et al. Antitumor-promoting activity of lignans from the aerial part of *Saussurea medusa* [J]. *Cancer Lett*, 2000,158: 53-59.
- [10] Hausott B, Greger H, Marian B. Naturally occurring lignans efficiently induce apoptosis in colorectal tumor cells [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2003,129:569-576.
- [11] Hirose M, Yamaguchi T, Lin C, et al. Effects of arctiin on PhIP-induced mammary, colon and pancreatic carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats and MeIQx-induced hepatocarcinogenesis in male F344 rats [J]. *Cancer Lett*, 2000,155:79-88.
- [12] Wang DY, Zhang HQ, Li X. Apoptosis induced by the C₂₁ sterols in Baishouwu and its mechanism of action in hepatoma [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2007,42: 366-370.
- [13] Xia MY, Wang MW, Wang HR, et al. Mechanism of dracorhodin perchlorate-induced Hela cell apoptosis [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2004,39:966-970.
- [14] Wang HY, Cai B, Cui CB, et al. Vitexicarpin, a flavonoid from *Vitex trifolia* L., induces apoptosis in K562 cells via mitochondria-controlled apoptotic pathway [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2005,40:27-31.
- [15] Spiekermann K, Faber F, Voswinkel R, et al. The protein tyrosine kinase inhibitor SU5614 inhibits VEGF-induced endothelial cells sprouting and induces growth arrest and apoptosis by inhibition of ckitin AML cells [J]. *Exp Hematol*, 2002,30:767-773.