

二萜化合物 Rabdocoetsin B 抑制蛋白酶体功能并诱导 t(8;21)白血病细胞凋亡

冯婷婷^{1,2,5}, 普建新³, 胡政¹, 刘大鹏¹, 孙汉董³, 周光彪^{1,2,4}

1 中国科学院广州生物医药与健康研究院, 广州 510663

2 中国科学技术大学生命科学学院, 合肥 230027

3 中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650204

4 中国科学院动物研究所 生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100101

5 安徽医科大学基础医学院, 合肥 230032

摘要: 从香茶菜属植物细锥香茶菜中分离得到的二萜类化合物 Rabdocoetsin B(Rabd-B), 研究其对人类 t(8;21)白血病细胞凋亡的诱导作用及其对蛋白酶体 19S 泛素识别亚基 S6'(Rpt5)的抑制作用, 为 Rabd-B 应用于 t(8;21)白血病治疗提供实验依据。以不同浓度的 Rabd-B 处理 t(8;21)白血病 Kasumi-1 细胞, 应用 CCK-8 法检测细胞活力, 用 Bliss 法计算 IC₅₀ 值, 通过流式细胞术检测细胞凋亡情况, 并以稳定表达 pGC-E1-ZU1-GFP 的 A549 细胞作为蛋白酶体抑制剂筛选模型, 荧光显微镜成像拍照 GFP 荧光。Western blotting 检测不同浓度的 Rabd-B 处理 Kasumi-1, 检测 Casp-3、S6'(Rpt5)、PARP、ubiquitin 在该细胞内的表达变化。结果显示, Rabd-B 明显抑制 t(8;21)阳性的 Kasumi-1 细胞生长, 48 h 的 IC₅₀ 值为 1.27 μmol/L; 同时诱导 Kasumi-1 细胞凋亡效果显著; 荧光显微镜观察药物处理和未处理的 pGC-E1-ZU1-GFP 的 A549 细胞 Ub-GFP 表达, 结果显示 GFP 平均荧光值随药物浓度增高而增强; Rabd-B 处理 Kasumi-1 细胞 24、48 h 后蛋白质免疫印迹技术检测 Casp-3、PARP, 发现 Casp-3 激活, 其底物 PARP 发生切割产生 85 kD 的降解带; 2.5、5.0 μmol/L Rabd-B 处理 Kasumi-1 细胞 24、48 h 后 Western blotting 检测蛋白酶体组分, 发现 19S 调节亚基 S6'(Rpt5)降解, 细胞内泛素化水平增高。以上结果说明, Rabd-B 一方面通过激活 Caspase 级联反应, 另一方面抑制蛋白酶体 19S 泛素识别亚基, 导致细胞内泛素化积累, 进而抑制 t(8; 21)白血病细胞生长并诱导其凋亡。

关键词: t(8;21)白血病, Rabd-B, 泛素, 凋亡

Rabdocoetsin B, a diterpenoid isolated from *Isodon coetsa*, is a potential proteasome inhibitor and induced apoptosis of t(8;21) leukemia cells

Tingting Feng^{1,2,5}, Jianxin Pu³, Zheng Hu¹, Dapeng Liu¹, Handong Sun³, and Guangbiao Zhou^{1,2,4}

1 Guangzhou Institute of Biomedicine and Health, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510663, China

Received: April 12, 2009; **Accepted:** May 8, 2009

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 30871110, 30772637), Key Project of Knowledge Innovation Program of the Chinese Academy of Sciences (No. KSCX1-YW-R-26), Key Program of Natural Science Foundation of Guangdong Province (No. 06107503), Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (No. 2007B030701005), National Programs for High Technology Research and Development of China (863 Program)(No. 2006AA02A301), NSFC-Joint Foundation of Yunnan Province (No. U0832602).

Corresponding author: Guangbiao Zhou. Tel: +86-20-32290596; E-mail: Zhou_guangbiao@gibh.ac.cn;

Handong Sun. Tel: +86-871-5223251; E-mail: hdsun@mail.kib.ac.cn.

国家自然科学基金(Nos. 30871110, 30772637), 中国科学院知识创新工程重要方向项目(No. KSCX1-YW-R-26)、广东省自然科学基金重点项目(No. 06107503), 广东省科技计划项目(No. 2007B030701005), 国家高技术研究发展计划(863计划)(No. 2006AA02A301), 国家基金委-云南省联合基金项目(No. U0832602)资助。

2 School of Life Science, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China

3 Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China

4 State Key Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

5 College of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032, China

Abstract: Effects of Rabdoetsin B (Rabd-B), a diterpenoid extracted from *Isodon coetsa*, on t(8;21) leukemic cells was tested by CCK-8 assay and Flow cytometry. The A549 cells stably expressing pGC-E1-ZU1-GFP were treated with Rabd-B for 4 h, and the accumulation of GFP was detected by fluorescence microscope. Using Western blotting, we investigated the expression of Casp-3, PARP, S6', which is a subunit of the 19S regulatory complex of the 26S proteasome, and cellular ubiquitinated proteins. We found that Rabd-B induced growth inhibition and apoptosis of Kasumi-1 cells in a dose-dependent manner. In Kasumi-1 cells treated with 2.5 $\mu\text{mol/L}$ Rabd-B for 24 h, pro-caspase-3 was processed into its active form. The substrate of Casp-3, poly ADP-ribose polymerase (PARP), was cleaved with generation of an 85 kD fragment. The increased GFP fluorescence intensity, cleavage of S6' and the accumulation of ubiquitinated proteins were found in Kasumi-1 cells treated with Rabd-B. These results suggested that Rabd-B is a potential proteasome inhibitor which induces programmed cell death of t(8;21) cells. Further study might provide evidence for employing Rabd-B in treating human t(8;21) leukemia.

Keywords: t(8;21) leukemia, Rabd-B, proteasome inhibitor, apoptosis

泛素蛋白酶体系统是调节细胞内蛋白降解的重要途径, 蛋白底物被多聚泛素分子标记后, 能被蛋白酶体 19S 上泛素识别亚基所识别^[1], 接着在 20S 催化核心腔内被催化降解成肽段, 该通路参与细胞内绝大多数的蛋白降解^[2-3]。很多重要的调节蛋白都是通过这一途径降解, 因此, 可以通过干预调节这一通路, 触发肿瘤细胞的周期阻滞, 诱导肿瘤细胞凋亡^[4]。

t(8; 21)(q22; q22)是 AML 中最常见的染色体易位, 在所有的 AML 中其发生率为 12%~15%, 在 AML M2 中发生率为 40%~80%。t(8; 21)累及 21 号染色体上的急性髓性白血病基因 1(Acute myeloid leukemia gene 1, AML1)基因和 8 号染色体上的 ETO(Eight-Twenty One)基因, 从而产生 AML1-ETO 融合转录因子^[5]。

AML1-ETO 融合蛋白的 N 末端保留了包括 RHD(Runx homology domain)结构域在内的 AML1 蛋白中前 177 个氨基酸, C 末端部分包含了几乎全长的 ETO 蛋白, 因此保留了 AML1 上与 DNA 结合、与野生型伙伴形成异二聚体的结构域及 ETO 的多个功能结构域并通过它们募集 N-CoR/SMRT-mSin3A-HDAC 转录共抑制物^[6], 通过直接抑制基本转录机制及募集 HDAC 而发挥转录抑制作用, 使 AML1-ETO 与 CBF β 的亲合力比野生型 AML1 强, 从而在核内能更有效地募集 CBF β ^[7], 抑制野生型 AML1/CBF β 转录复合体的形成, 进而抑制野生型

AML1、GM-CSF^[8]、C/EBP α ^[9]、PU.1^[10]和肿瘤抑制基因 p14(ARF)^[11]。并且还能激活 Bcl-2^[12]凋亡抑制因子的转录, 上调蛋白酪氨酸激酶 C-KIT^[13], 诱导癌基因 c-Jun 的表达^[14], 并通过 C/EBP ϵ 上调 G-CSFR 的表达使白血病细胞获得自分泌的生长信号及增殖/生存优势^[15]。

AML1-ETO 癌蛋白能增强造血干细胞的自我更新能力、阻断造血分化、干扰正常细胞的增殖^[14]。在体外, AML1-ETO 的表达可促进人 CD34⁺造血干/祖细胞的生长并使其获得明显的生存优势; 使人原始红细胞的自我更新能力明显增强^[16]。

近来本研究室从一些中药提取物中筛选新型蛋白酶体抑制剂, 发现从香茶菜属植物细锥香茶菜中分离得到的二萜类化合物 Rabd-B^[17-18]可以引起蛋白酶体 19S 调节亚基 S6' 发生降解, 导致细胞内泛素化水平的升高, 并可以明显地诱导 t(8; 21)白血病细胞凋亡, 活化 Caspase-3, 切割底物分子 PARP, 为 Rabd-B 应用于 t(8; 21)白血病治疗提供了依据。

1 材料与方法

1.1 材料

化合物: Rabd-B 由中国科学院昆明植物所孙汉董研究员提供, PS-341 购自美国强生公司, PBS 溶解至储存浓度 2.6 mmol/L, 培养基稀释至需要浓度; MG-132 购自 Calbiochem。

细胞: 蛋白酶体抑制剂筛选模型 pGC-E1-ZU1-

GFP 的 A549 细胞由本实验室构建并保存。

抗体: polymerase(PARP), caspase-3,ubiquitin 一抗 购自 Cell signaling, S6^γ(Rpt5)一抗购自 upstate。

1.2 方法

1.2.1 细胞的培养

饱和湿度、37 °C、5% CO₂ 的条件下, Kasumi-1 细胞在含有青霉素(100 U/mL)和链霉素(100 g/mL)的 20%小牛血清(FBS; Gibco/BRL, Grand Island, NY)的 1640 中培养^[19]。

A549-ZU1-GFP 细胞培养在含有 2% GlutaMAX, 1%青霉素链霉素的 10%小牛血清(FBS; Gibco/BRL, Grand Island, NY)的 DMEM 中培养。

1.2.2 CCK-8 法检测细胞增殖

按实际给药浓度用新鲜培养基配药(10×), 收集细胞计数后调整至 1.11×10^5 cells/mL, 96 孔板每孔加入 90 μL 细胞悬液以及 10 μL 相应药物, 设置空白(只有培养基)及对照(90 μL 细胞加 10 μL 培养基)组, 37 °C、5% CO₂ 下孵育 20 h 或 44 h, 加入 10 μL CCK-8 solution(CCK-8; Dojindo, Kumamoto, Japan), 继续孵育 4 h, 酶标仪测量 450 nm 及 600 nm (600 nm 作为背景值参考)下的吸光度, 450 nm 的吸光度减去 600 nm 吸光度得数值 ΔOD 。抑制率按以下公式计算:

$$\text{Inhibition rate (\%)} = \left[1 - \frac{\Delta OD(\text{Rabd B}) - \Delta OD(\text{Blank})}{\Delta OD(\text{Control}) - \Delta OD(\text{Blank})} \right] \times 100\%$$

1.2.3 细胞的生长曲线实验

根据相关资料数据选取合适的药物浓度, 用新鲜培养基稀释 Rabd-B 贮存液至所需浓度(100×)。收集细胞: 吸取细胞悬液, 充分吹匀后转移至 50 mL 离心管中, 取少量用于细胞计数, 其余离心弃上清以获得细胞沉淀。密度调整: 由上步计数结果知细胞总数, 按比例用新鲜培养基稀释至约 1.01×10^5 cells/mL, 吸管吹打均匀后再取少量用于计数, 根据该结果对细胞密度进行微调, 使得最终细胞密度为 1.01×10^5 cells/mL。点板加样: 12 孔板做好相应标记后, 每孔加入 990 μL 已充分吹匀的细胞悬液, 然后各孔分别加入相应药物(对照组为新鲜培养基), 37 °C、5% CO₂ 的孵箱中培养 12 h、24 h、36 h 或 48 h, 药物作用相应时间后, 吹匀孔板内对照组细胞和不同浓度药物处理组细胞, 分别取 100 μL 细胞悬液与 100 μL PBS、200 mL 0.4%的台盼兰混合,

计数活细胞数, 每组细胞平行计数 12 次, 取平均数绘制生长曲线。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡

以每孔 5×10^5 的密度, 6 孔板培养 2 mL Kasumi-1 细胞; 按实际给药浓度用新鲜培养基配药(100×), 用药组加入 20 μL 稀释好的 Rabd-B(对照组以培养基代替); 24 h 和 48 h 后, 细胞计数。每组取 2×10^5 个细胞, 800 r/min 离心 6 min; 预冷 PBS 洗 2 遍, 100 μL PBS 重悬细胞转移至 FACS 管中, 加 Annexin V、碘化丙啶(PI)各 2.5 μL, 室温避光孵育 15 min, 加 $1 \times$ Binding buffer(按 Annexin V/FITC Kit 说明书稀释 Binding buffer), 15 min 内用 FACS Calibur 流式细胞仪(BD 公司)分析检测。

1.2.5 药物处理及绿色荧光观察

A549-ZU1-GFP 细胞以 80 000 cells/mL 铺 96 孔板, 每孔 100 μL, 37 °C、5% CO₂、95%培养箱中培养 18~24 h, 用 100 μL Assay buffer (含有 2% GlutaMAX, 1% Penicillin-Streptomycin, 和 10 mmol/L Hepes buffer 的 10% FBS 的 DMEM 培养基) 稀释药物加入 96 孔板中, 培养箱中培养 4 h, 之后弃去培养基, 每孔加 150 μL Fixing Solution (10% formalin, neutral- buffered solution (approximately 4% formaldehyde)), 室温培养 20 min, 再用 PBS 洗 4 次, 最后加入 100 μL 1 μmol/L Hoechst staining solution(10 mmol/L stock solution 溶于 DMSO)。LEICA DMI6000B 型倒置荧光生物显微镜 40 倍观察细胞绿色荧光。

1.2.6 流式细胞术检测平均荧光值

A549-ZU1-GFP 细胞以 80 000 cells/mL 铺 96 孔板, 每孔 100 μL, 37 °C、5% CO₂、95%培养箱中培养 18~24 h, 用 100 μL Assay buffer 稀释药物加入 96 孔板中, 培养箱中培养 4 h, 之后弃去培养基, 用 PBS 洗 2 次, 用胰酶消化 1 min, 加入培养基中离心, 去上清, 加 PBS 重悬, FACS Calibur 流式细胞仪(BD 公司)分析检测。

1.2.7 Western blotting 检测

5×10^6 的细胞用 200 μL 裂解液(0.5 mol/L Tris-HCl, pH 6.8, 2 mmol/L EDTA, 10% glycerol, 2% SDS and 5% β-mercaptoethanol) 裂解。用 12% SDS-PAGE 电泳裂解的蛋白产物 (50 μg), 之后 100 V

恒压转膜(Nitrocellulose membrane, NC) 1 h, 封闭液(5% No fat milk, 1×TBS-T)浸没 NC 膜, 摇床室温缓慢振荡 1 h。一抗孵育: 10 mL 封闭液中按照抗体说明书要求的比例加入抗体, 浸没 NC 膜, 摇床室温缓慢振荡 1.5 h(个别抗体要求 4 °C 杂交过夜)。孵育结束后, 1×TBS-T 洗涤 5 min×5 次。二抗孵育: HRP 标记二抗按照 1:10 000 的比例加入 10 mL 封闭液, 浸没 NC 膜, 摇床室温缓慢振荡 1.5 h, 1×TBS-T 洗涤 5 min, 重复 5 次, 加显色底物 Chemiluminescence phototope-horseradish peroxidase kit (Cell Signaling), 曝光显影。

1.2.8 统计分析

统计学处理所有数据应用 SPSS 12.0 软件进行统计学分析, 均数比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 Rabd-B 诱导 t(8; 21)白血病细胞凋亡

不同浓度的 Rabd-B 作用于 Kasumi-1 细胞 24 h、48 h, 细胞生长受到抑制, 以 48 h 的抑制作用更为明显, 并呈浓度依赖性, 0.5~4 μmol/L Rabd-B 抑制率分别为 6.9%、25.6%、56.5%、79.7%、90.3%、98.3%, 用 Bliss 法计算 IC₅₀ 为 1.27 μmol/L。细胞计数结果显示随药物浓度升高, Kasumi-1 细胞生长抑制作用显著。Kasumi-1 细胞凋亡结果, 2.5、3.5、5 μmol/L 浓度 Rabd-B 处理 Kasumi-1 细胞 24 h、48 h 后, Annexin-V-FITC 阳性细胞率分别为 34.9%、35.3%、41.8% 和 55.9%、56.6%、66.1%(图 1)。

2.2 Rabd-B 刺激 A549-ZU1-GFP 细胞内泛素化积累

A549 细胞是人非小细胞肺癌细胞株, 本实验所用的 A549-ZU1-GFP 细胞稳定转染了人的 Ubi (G76V), ZU1-GFP 为泛素-绿色荧光蛋白融合基因, 其编码的泛素-绿色荧光蛋白发生了突变, 即在 N 端泛素的第 76 位甘氨酸突变为缬氨酸, 阻断了融合蛋白的去泛素化过程, 使得融合蛋白可以直接进入蛋白酶体进行降解, 泛素融合 GFP 蛋白在泛素蛋白酶体降解系统功能正常的细胞内很快被降解, 泛素蛋白酶体途径被抑制则引起 GFP 在细胞内的积累^[20]。实验结果证明该细胞模型能有效反映蛋白酶体抑制剂 Rabd-B 对细胞泛素蛋白酶体途径的抑制作用。在荧光显微镜下观察, 发现随着药物浓度的

增高, GFP 在细胞内累积明显, 流式细胞术分析显示同样的结果(图 2)。

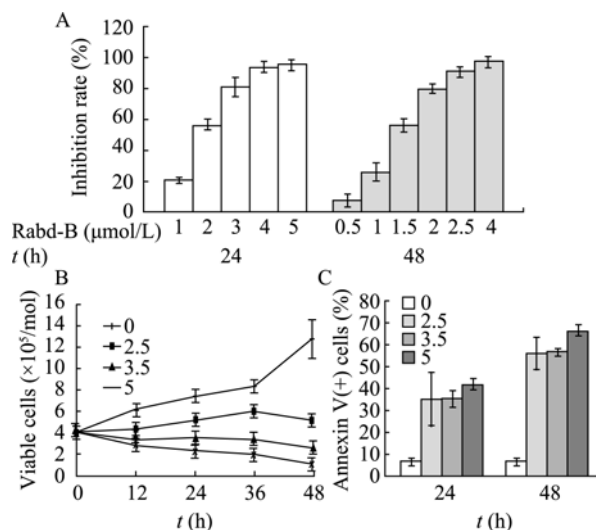


图 1 化合物 Rabd-B 抑制 Kasumi-1 细胞增殖并诱导其凋亡 Fig.1 Rabd-B inhibits cell growth and proliferation of t(8;21)-bearing leukemic cells, and induced apoptosis. (A) Effects of Rabd-B on Kasumi-1 cell proliferation detected by using a CCK-8 Kit. (B) Effects of Rabd-B on Kasumi-1 cell growth. (C) Apoptotic effects of Rabd-B on t(8;21) leukemic cells.

2.3 Rabd-B 降解 19S 蛋白酶体亚基 S6' 并引起细胞内泛素化水平增高

对 Kasumi-1 细胞蛋白酶体组分进行 Western blotting 检测, 发现 19S 蛋白酶体泛素识别亚基 S6' 发生降解, 尤其在 5 μmol/L Rabd-B 处理 48 h 时, 出现了 S6' 的切割条带。检测细胞内泛素化水平, 发现 2.5 μmol/L Rabd-B 处理 24 h 后, 胞内泛素化明显升高(图 3)。

2.4 凋亡蛋白 caspase-3 的激活

随着 Rabd-B 浓度增加和药物处理时间的延长, 凋亡相关蛋白 35 kD Caspase-3 酶原蛋白水平降低明显^[21], 表明其发生了剪切活化, 同时 Caspase-3 的底物 PARP 被切割, 产生 85 kD 的切割带^[19](图 3A)。

3 讨论

t(8;21)是急性髓性白血病最常见的染色体异常之一, 其特点为发病年龄轻、恶性度高、预后差, 严重危害人类生命与健康。尽管化疗对许多 AML 患者有效, 仍有很多患者复发或耐药, 这些病人需要新的治疗。从天然药物中提取有效成分用于治疗恶性

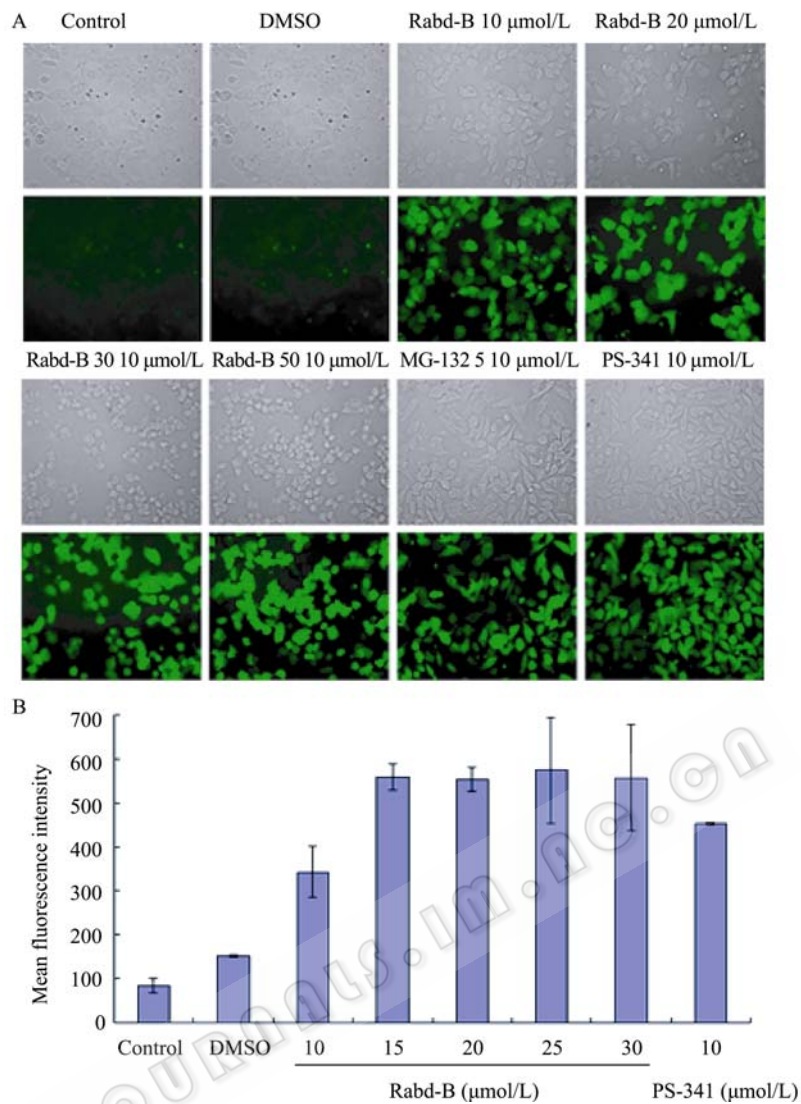


图 2 Rabd-B 处理 A549-ZU1-GFP 细胞后检测 GFP 荧光表达强度

Fig. 2 Ub-GFP expression monitored by fluorescence intensity. (A) Green fluorescent micrographs of A549-ZU1-GFP cells treated with different concentrations of Rabd-B, MG-132 and PS-341 (proteasome inhibitors). (B) Flow-cytometric analysis of A549-ZU1-GFP cells expressing the Ub-GFP chimeras. The mean fluorescence (FL) intensity is indicated.

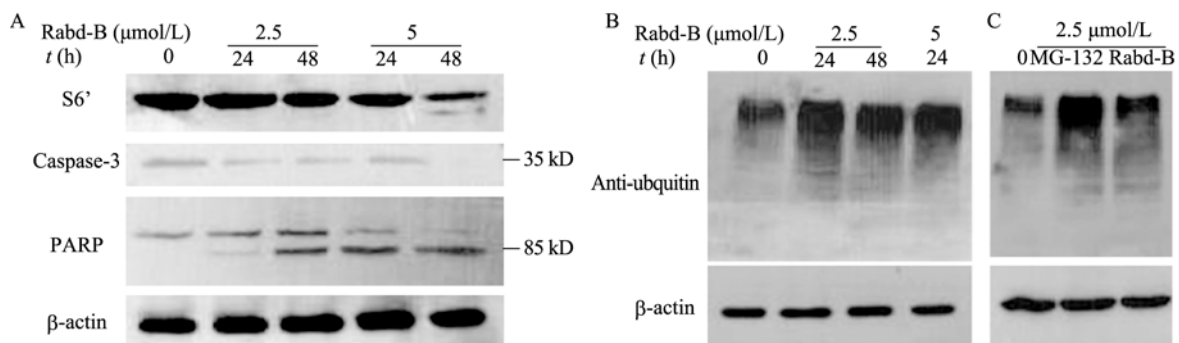


图 3 Rabd-B 诱导 Caspase-3 激活和泛素化蛋白积累

Fig. 3 Activation of Caspase-3 and the accumulation of ubiquitinated proteins in Kasumi-1 cells in response to Rabd-B. (A) After treatment with Rabd-B at 2.5 or 5 μmol/L for 24 h or 48 h, Kasumi-1 cells are lysed, and Western blotting assays are performed to test the expression of Rpt5, caspase-3 and PARP. (B) Accumulation of ubiquitinated proteins is found in Kasumi-1 cells treated with Rabd-B at 2.5 μmol/L for 24 h, detected by Western blotting using an anti-ubiquitin antibody. (C) Treatment with both MG-132 and Rabd-B 2.5 μmol/L for 24 h leads to accumulation of ubiquitinated proteins.

肿瘤已经获得了广泛的应用, 比如紫杉醇用于治疗乳腺癌、卵巢癌^[22], 维甲酸用于治疗白血病等^[23]。

Rabd-B 是从细锥香茶菜(*Isodon coetsa*)中分离得到的二萜类化合物, 研究发现这一化合物 Rabd-B 对 t(8; 21)白血病细胞的生长有明显的抑制作用, 并且随着药物浓度的增高, 生长抑制率增加。恶性肿瘤的发生发展与细胞增殖和凋亡的调控失衡密切相关, 细胞凋亡在肿瘤发展中起着负向调控作用, 可以抑制白血病细胞生长。目前, 通过诱导凋亡来治疗肿瘤已成为肿瘤研究的热点。通过流式细胞术证实, Rabd-B 可以诱导 t(8; 21)白血病细胞发生凋亡, 并且呈明显的量效关系。这提示 Rabd-B 可能在治疗 t(8; 21)白血病中具有潜在的应用价值。

真核细胞内大多数调控细胞生长和凋亡的调节蛋白通过泛素-蛋白酶体通路降解, 蛋白酶体活性的异常改变, 使肿瘤细胞持续性生长, 是肿瘤发生的标志。蛋白酶体抑制剂阻止蛋白酶体降解调节蛋白, 导致细胞内泛素化水平增高破坏细胞稳态, 诱导细胞凋亡^[2]。发现化合物 Rabd-B 抑制泛素蛋白酶体途径, 导致泛素融合 GFP 蛋白在细胞内的积累。这一结果表明, Rabd-B 可能作为一种潜在的蛋白酶抑制剂通过对蛋白酶体功能的抑制从而导致细胞凋亡。

为了进一步探寻细胞内泛素水平增高的机理, 对蛋白酶体的组分进行表达分析, 发现其中一个重要的 19S 调节亚基组分 S6' 发生降解, 有文献报道这一亚基有依赖于 ATP 识别多聚泛素链的功能^[1], 药物诱导的这一亚基的降解可能使泛素化蛋白底物无法被识别不能进入 20S 催化核心颗粒中降解而被积累。

Caspase(半胱氨酸天门冬氨酸蛋白酶)家族包含多个成员, 在细胞凋亡过程中起着非常关键的作用。正常情况下 Caspase 以无活性的酶原形式存在, 在促凋亡因素的作用下级联激活而触发凋亡。Caspase-8 和 Caspase-9 位于凋亡途径的上游, 分别介导外源性死亡受体通路和内源性线粒体通路, 活化后作为始动 Caspase 进一步活化下游的效应性 Caspase-3, 从而剪切其死亡底物如 PARP、DNA2PK 等, 导致蛋白酶体级联切割放大, 使细胞走向凋

亡^[21,24]。为进一步阐明 Rabd-B 诱导 Kasumi-1 细胞凋亡的信号通路, 本实验检测了其对 Caspase-3 的影响。可以看到 Kasumi-1 细胞中的 Caspase-3 在加入 Rabd-B 处理后被活化, 其死亡底物 PARP 被剪切, 提示 Rabd-B 诱导的 Kasumi-1 细胞凋亡与 Caspase 级联活化有关。有文献报道, S6' 的降解依赖于 Caspase-3 的激活^[1], 药物对蛋白酶体功能的抑制可能是由于先激活 Caspase 通路, 从而降解 S6', 导致细胞内泛素化水平升高, 最终诱导细胞凋亡。

因此推测, Rabd-B 除了通过抑制蛋白酶体、活化 Caspases 外, 还可能通过多种分子通路诱导细胞凋亡。比如: 1) 激活其下游 Bax、Fas 基因的表达, 下调 Bcl-2、Bcl-xl 的表达, 促进细胞色素 C 从线粒体解离; 2) 调控癌蛋白 AML1-ETO 的表达, 从而促进细胞凋亡。拟进一步研究其分子作用机制, 为阐明其作用机制、开发 Rabd-B 治疗 t(8;21)白血病提供重要的实验依据。

REFERENCES

- [1] Sun XM, Butterworth M, MacFarlane M, *et al.* Caspase activation inhibits proteasome function during apoptosis. *Mol Cell*, 2004, **14**(1): 81-93.
- [2] Ciechanover A. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, **6**(1): 79-86.
- [3] Orłowski RZ. The role of the ubiquitin-proteasome pathway in apoptosis. *Cell Death Differ*, 1999, **6**(4): 303-313.
- [4] Ciechanover A, Schwartz AL. The ubiquitin-proteasome pathway: the complexity and myriad functions of proteins death. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**(6): 2727-2730.
- [5] Peterson LF, Boyapati A, Ahn EY, *et al.* Acute myeloid leukemia with the 8q22; 21q22 translocation: secondary mutational events and alternative t(8;21) transcripts. *Blood*, 2007, **110**(3): 799-805.
- [6] Wang JX, Hoshino T, Redner RL, *et al.* ETO, fusion partner in t(8;21) acute myeloid leukemia, represses transcription by interaction with the human N-CoR/mSin3/HDAC1 complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**(18): 10860-10865.
- [7] Amann JM, Nip J, Strom DK, *et al.* ETO, a target of t(8;21) in acute leukemia, makes distinct contacts with multiple histone deacetylases and binds mSin3A through its oligomerization domain. *Mol Cell Biol*, 2001, **21**(19): 6470-6483.

- [8] Frank R., Zhang J, Uchida H, *et al.* The AML1/ETO fusion protein blocks transactivation of the GM-CSF promoter by AML1B. *Oncogene*, 1995, **11**(12): 2667–2674.
- [9] Pabst T, Mueller BU, Harakawa N, *et al.* AML1-ETO downregulates the granulocytic differentiation factor C/EBPalpha in t(8;21) myeloid leukemia. *Nat Med*, 2001, **7**(4): 444–451.
- [10] Vangala RK, Heiss-Neumann MS, Rangatia JS, *et al.* The myeloid master regulator transcription factor PU.1 is inactivated by AML1-ETO in t(8;21) myeloid leukemia. *Blood*, 2003, **101**(1): 270–277.
- [11] Linggi B, Muller-Tidow C, van de Locht L, *et al.* The t(8;21) fusion protein, AML1 ETO, specifically represses the transcription of the p14(ARF) tumor suppressor in acute myeloid leukemia. *Nat Med*, 2002, **8**(7): 743–750.
- [12] Klampfer L, Zhang J, Zelenetz AO, *et al.* The AML1/ETO fusion protein activates transcription of BCL-2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**(24): 14059–14064.
- [13] Wang YY, Zhou GB, Yin T, *et al.* AML1-ETO and C-KIT mutation/overexpression in t(8;21) leukemia: implication in stepwise leukemogenesis and response to Gleevec. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(4): 1104–1109.
- [14] Peterson LF, Zhang DE. The 8;21 translocation in leukemogenesis. *Oncogene*, 2004, **23** (24): 4255–4262.
- [15] Shimizu K, Kitabayashi I, Kamada N, *et al.* AML1-MTG8 leukemic protein induces the expression of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) receptor through the up-regulation of CCAAT/enhancer binding protein epsilon. *Blood*, 2000, **96**(1): 288–296.
- [16] Mulloy JC, Cammenga J, Berguido FJ, *et al.* Maintaining the self-renewal and differentiation potential of human CD34⁺ hematopoietic cells using a single genetic element. *Blood*, 2003, **102**(13): 4369–4376.
- [17] Chen YP, Sun HD, Lin ZW. Study on the diterpenoids of *Rabdosia coetsa*. *Acta Bot Sin*, 1990, **32**(4): 292–296.
陈一平, 孙汉董, 林中文. 细锥香茶菜二萜的研究. *植物学报*, 1990, **32**(4): 292–296.
- [18] Xu YL, Kubo I. Diterpenoid constituents from *Rabdosia coetsa*. *Phytochemistry*, 1993, **34**(2): 576–578.
- [19] Zhou GB, Kang H, Wang L *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*. *Blood*, 2007, **109**(8): 3441–3450.
- [20] Fang HT, Hu Z, Zhou GB. Establishment of a GFP-based cellular model for screening novel proteasome inhibitors. *Chin J Biotech*, 2009, **25**(3): 452–456.
方海同, 胡政, 周光飏. 一种基于绿色荧光蛋白的蛋白酶体抑制剂细胞筛选模型. *生物工程学报*, 2009, **25**(3): 452–456.
- [21] Li H, Yuan J. Deciphering the pathways of life and death. *Curr Opin Cell Biol*, 1999, **11**(2): 261–266.
- [22] Khayatd, Antoine EC, Coeffic D. Taxol in the management of cancers of the breast and the ovary. *Cancer Invest*, 2000, **18** (3): 242–260.
- [23] Asou N. A11 transretinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Intern Med*, 2007, **46**(2): 9.
- [24] Waterhouse NJ, Green DR. Mitochondria and apoptosis: HQ or high-security prison? *J Clin Immunol*, 1999, **19**(6): 378–387.