

雷公藤红素抑制成人 T 细胞白血病细胞增殖及机制

方金勇, 衣凯宁, 宋早文, 陈梦云, 徐玲玲, 赵铁军

浙江师范大学 化学与生命科学学院, 浙江 金华 321004

方金勇, 衣凯宁, 宋早文, 等. 雷公藤红素抑制成人 T 细胞白血病细胞增殖及机制. 生物工程学报, 2018, 34(9): 1491-1499.

Fang JY, Yi KN, Song ZW, et al. Inhibition of proliferation of adult T-cell leukemia cells by celastrol. Chin J Biotech, 2018, 34(9): 1491-1499.

摘要: 本研究旨在分析雷公藤红素对成人 T 细胞白血病细胞增殖、凋亡的影响, 并探讨其分子机制。使用不同浓度的雷公藤红素溶液处理多种成人 T 细胞白血病细胞株, 通过四唑盐比色法 (MTT)、克隆形成实验检测细胞的增殖情况; Annexin V/PI 双染检测细胞凋亡情况; 最后通过 Western blotting 及双荧光素酶报告基因技术探究雷公藤红素抑制成人 T 细胞白血病细胞生长的调控机制。结果表明雷公藤红素能显著抑制成人 T 细胞白血病细胞增殖并诱导其凋亡, 随着雷公藤红素浓度的增加 Bax/Bcl-2 蛋白比率明显升高, 凋亡途径中 Caspase-3/7 蛋白也随之被切割活化, 同时病毒编码的癌蛋白 Tax 的表达也明显受到抑制。以上结果表明, 雷公藤红素通过调控 Bcl-2 家族蛋白, 激活了 Caspase 途径诱导细胞凋亡, 并通过抑制病毒关键蛋白 Tax 的表达, 从而有效抑制了成人 T 细胞白血病细胞的增殖。该研究为临床应用雷公藤红素治疗成人 T 细胞白血病提供了实验依据。

关键词: 雷公藤红素, 成人 T 细胞白血病, 增殖, 凋亡, Tax 蛋白

Inhibition of proliferation of adult T-cell leukemia cells by celastrol

Jinyong Fang, Kaining Yi, Zaowen Song, Mengyun Chen, Lingling Xu, and Tiejun Zhao

College of Chemistry and Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, Zhejiang, China

Abstract: We studied the effect of celastrol on the proliferation and apoptosis of adult T-cell leukemia (ATL) cells. After treating adult T-cell leukemia cell lines with different concentrations of celastrol, we analyzed the cell proliferation by MTT and colony formation assays. Flow cytometry was conducted to detect cell apoptosis by Annexin V-FITC/PI staining. Western blotting and dual-luciferase reporter assay were done to study the mechanism how celastrol suppressed the growth of adult T-cell leukemia cells. Celastrol could significantly inhibit the proliferation of adult T-cell leukemia cells, and induce apoptosis of ATL cells. With the increase of the concentration of celastrol, the ratio of Bax/Bcl-2 protein was up-regulated. The

Received: November 30, 2017; **Accepted:** April 23, 2018

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31470262), Public Welfare Technology Application Research Project of Zhejiang (No. 2015C33149), Foundation of Zhejiang Educational Committee in 2017 (No. Y201738673), the 2014 Annual Open Fund of "Biology" in the "Top Key" Discipline of Zhejiang Province (No. KFJJ2014003).

Corresponding authors: Tiejun Zhao. E-mail: tjzhao@zjnu.cn

Lingling Xu. E-mail: xll0518@zjnu.cn

国家自然科学基金 (No. 31470262), 浙江省公益性技术应用研究计划项目 (No. 2015C33149), 2017 年度浙江省教育厅项目 (No. Y201738673), 浙江省“重中之重”学科“生物学”2014 年度开放基金 (No. KFJJ2014003) 资助。

网络出版时间: 2018-06-21

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20180620.1530.001.html>

Caspase-3/7 protein was cleaved and activated after treatment with celastrol. Moreover, the expression of HTLV-1-encoded viral protein Tax was significantly inhibited in the celastrol treated cells. Taken together, these results indicated that celastrol effectively inhibited the proliferation of adult T-cell leukemia cells by regulating the expression of Bcl-2 family protein, and induced cell apoptosis by activating Caspase dependent pathway. In addition, celastrol could inhibit the expression of viral protein Tax. This study will provide an experimental basis for the clinical application of celastrol in the treatment of adult T-cell leukemia.

Keywords: celastrol, adult T-cell leukemia, proliferation, apoptosis, Tax protein

成人 T 细胞白血病 (Adult T-cell leukemia, ATL) 是一种由人类 T 细胞白血病病毒 1 型 (Human T cell leukemia virus type-1, HTLV-1) 引起的恶性淋巴系增殖性肿瘤疾病^[1-3]。在 HTLV-1 编码的一系列病毒调控蛋白中, Tax 蛋白在 ATL 的发病机制中起着重要作用^[2,4]。由于 ATL 的潜伏期长, 存在化疗耐药以及严重的免疫抑制, 预后极差^[5-8], 使得治愈成人 T 细胞白血病的情况不容乐观。目前白血病治疗方法主要是联合化学疗法、干细胞移植等^[9], 但由于其疗效的不确定, 存在毒副作用和费用昂贵等不足严重限制了其应用, 故寻找一种更为廉价、高效的治疗手段迫在眉睫。

目前将植物来源的天然产物作为抗肿瘤药物是当今肿瘤治疗的一大研究热点。大量的研究表明这些天然产物在肿瘤治疗中有着重要作用。雷公藤红素 (Celastrol) 是从雷公藤属 (*Tripterygium wilfordii* Hook. f.) 植物的根皮中提取的一种五环三萜类化合物, 其分子式为 $C_{29}H_{38}O_4$ (图 1), 它具有较强的抗炎、抗氧化和抗肿瘤等药理活性^[10]。同时研究表明雷公藤红素是一种天然的蛋白酶体抑制剂, 能有效地抑制蛋白酶体活性进而诱发癌细胞凋亡^[11]。近年来, 大量研究表明雷公藤红素能显著抑制多种肿瘤细胞的恶性增殖, 如乳腺癌^[12]、非小细胞细胞肺癌^[13]、胰腺癌^[14]、神经胶质瘤^[15]、白血病^[16]和前列腺癌^[17]。然而, 其对成人 T 细胞白血病细胞增殖的抑制作用及分子机制研究未见报道。文中以成人 T 细胞白血病细胞为研究对象, 采用 MTT 法、克隆形成和流式细胞术, 检测了雷公藤红素对成人 T 细胞白血病细胞的增

殖和凋亡的影响, 并通过 Western blotting 和报告基因技术深入探究了雷公藤红素抗肿瘤作用的分子机制。该研究成果为今后临床应用雷公藤红素治疗成人 T 细胞白血病提供了实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株

成人 T 细胞白血病细胞株: ATL-T、ATL-2、MT-4、TL-Om1 均由日本京都大学松冈雅雄教授惠赠。

1.2 药品与试剂

雷公藤红素: CAS 号为 34157-83-0, 购自 MCE 公司, 产品货号为 HY-13067, HPLC 纯度为 99.90%。细胞培养基 RPMI-1640、胰蛋白酶购自 Gibco 公司; 胎牛血清 (FBS) 购自法国 Biowest

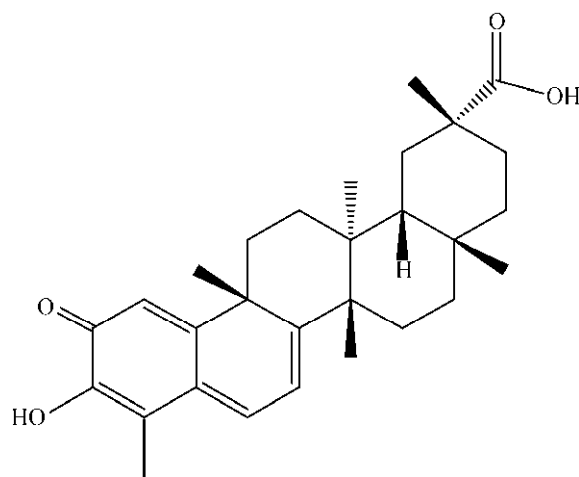


图 1 雷公藤红素化学结构式

Fig. 1 Chemical structure of celastrol.

公司；兔抗人 Caspase3、Caspase7、Bax、Bcl-2 多克隆抗体，鼠抗人 Tax、GAPDH 单克隆抗体，以及山羊抗兔 Biotin (IgG H&L)、Streptavidin-HRP 和山羊抗鼠 IgG HRP 多克隆抗体均购自 Cell Signaling Technology (CST) 公司；AnnexinV/PI 凋亡试剂盒购自北京联科生物公司；Trizol Reagent 试剂购自 Invitrogen 公司，逆转录试剂盒、双荧光素酶报告基因试剂盒购自 Promega 公司。

1.3 细胞培养

白血病细胞株培养于含 10% 胎牛血清和双抗（青、链霉素，100 IU/mL）的 RPMI-1640 完全培养基中，于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养及传代，使用对数期细胞进行实验。

1.4 MTT 法检测细胞存活率

先将 5×10^3 个/孔白血病细胞接种于 96 孔板，随后加入不同浓度的雷公藤红素溶液，同时以 DMSO 作为阴性对照（DMSO 的量与配置最高浓度雷公藤红素溶液所需母液的量相等，下同）。药物处理 0、24、48、72 h 后，每孔加入 10 μ L 的 MTT 溶液（5 mg/mL），4 h 后裂解细胞后，采用酶标仪（美国 Bio-Rad 公司）测定 595 nm 波长处各孔的吸光值（OD 值），计算细胞增殖率（%）= 实验组 OD 值 / 对照组 OD 值 \times 100。

1.5 克隆形成检测细胞增殖能力

先将 400 个/孔 ATL-T 细胞接种于 6 孔板。待细胞贴壁后，换成含有不同浓度的雷公藤红素溶液培养基。2-3 周后，用甲醇固定，再用 0.1% 结晶紫染色，最后在显微镜下记录含有 50 个以上细胞的克隆数，重复计数 3 次，计算出其平均克隆数。

1.6 流式细胞仪检测细胞凋亡

分别用 DMSO（阴性对照）和不同浓度的雷公藤红素溶液培养白血病细胞，24 h 后收集细胞，先用 PBS 清洗，再用 Annexin-FITC 及 PI 染色，

最后运用流式细胞仪（德国 Partec 公司）检测细胞凋亡情况。

1.7 Western blotting 定量分析凋亡相关蛋白表达水平

分别用 DMSO 和不同浓度的雷公藤红素溶液培养 ATL-T 和 TL-Oml 细胞，48 h 后用 RIPA 细胞裂解液提取总蛋白。变性后的总蛋白样进行垂直凝胶电泳及蛋白印迹转膜（美国 Bio-Rad 公司），奶粉封闭，抗体孵育，最后加入 ECL（电化学发光试剂）进行发光反应，使用蛋白曝光仪（上海天能）拍照。

1.8 双荧光素酶报告基因检测相关基因的启动子活性

将 1×10^5 个/孔白血病细胞接种于 12 孔板，12 h 后转染所需质粒，再过 12 h 加入雷公藤红素溶液，继续培养 24 h 后，收集细胞，使用 Promega 公司双荧光素酶报告基因试剂盒检测荧光素酶活性。

1.9 实时荧光定量 PCR 检测基因转录水平

使用 Trizol 法提取总 RNA，利用 Promega 公司的逆转录试剂盒进行逆转录，以 SYBR Green 为探针，使用实时荧光定量 PCR 仪（德国耶拿公司）检测基因表达，反应结束后，采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析实验数据。

1.10 统计方法

采用 Excel、SPSS19.0 统计软件进行显著性检验，* $P < 0.05$ ，表示统计学上有显著性差异；** $P < 0.01$ 表示统计学上有极显著性差异；OriginProPorable8.5 软件作图。

2 结果与分析

2.1 雷公藤红素显著抑制多种成人 T 细胞白血病细胞的恶性增殖

本实验采用 4 种成人 T 细胞白血病细胞株

(ATL-T, ATL-2, MT-4 和 TL-OM1) 研究雷公藤红素对成人 T 细胞白血病细胞增殖的影响。用 0、1.25、2.5、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 雷公藤红素溶液分别处理各细胞株, 在 0、24、48、72 h 后通过 MTT 检测各细胞株的增殖情况。结果表明 (图 2), 雷公藤红素对多种成人 T 细胞白血病株的增殖都存在显著的抑制, 且该抑制作用呈一定的剂量和时

间依赖性。

为了再次确认雷公藤红素对 ATL 细胞生长的抑制作用, 我们采用了克隆形成实验。结果显示 (图 3), 与 DMSO 处理的对照组相比, 雷公藤红素处理的 ATL-T 细胞形成克隆的个数随着浓度的增加而减少, 并且该抑制作用呈现出一定浓度依赖性。

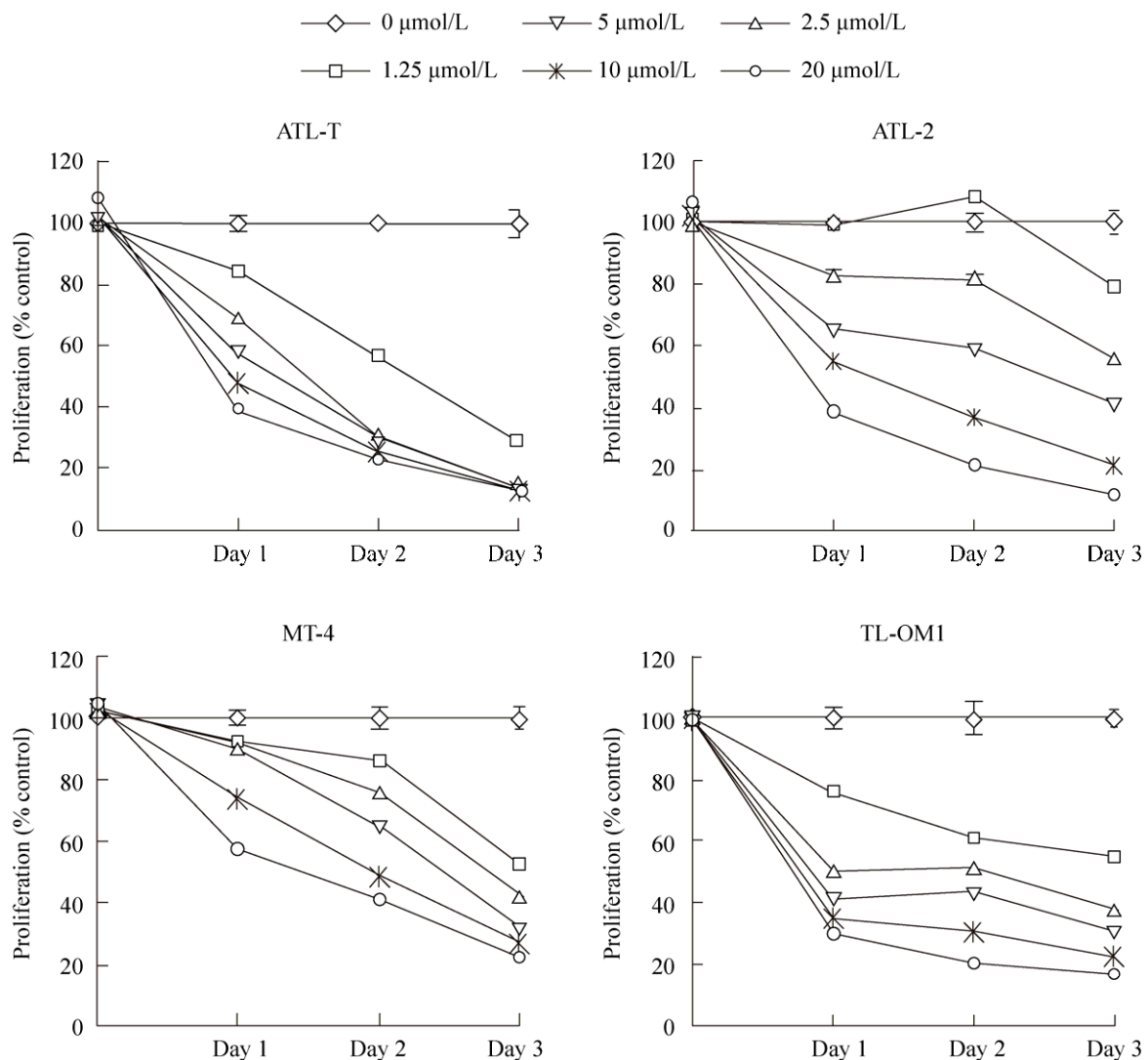


图 2 MTT 检测雷公藤红素对四种成人 T 细胞白血病细胞生长的影响

Fig. 2 Effects of celastrol on the growth of adult T-cell leukemia cells. The proliferation rate of leukemic cells was inhibited with the increase of celastrol concentration. Representative data from three independent experiments were shown.

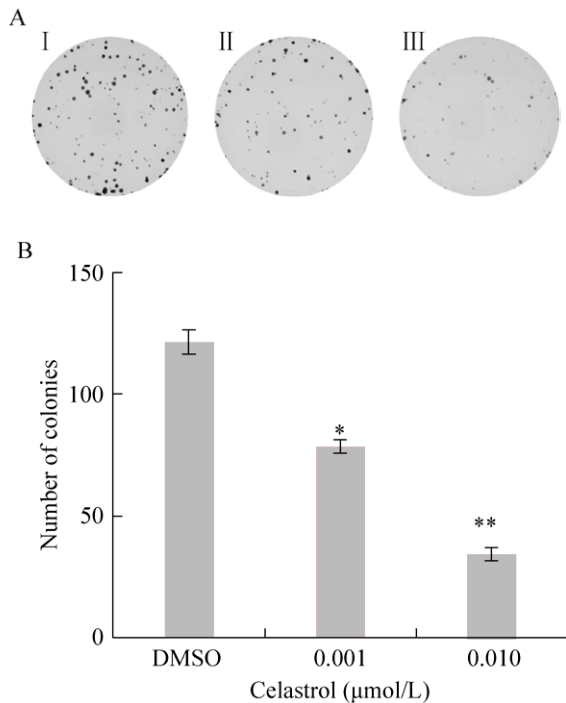


图3 克隆形成检测雷公藤红素对 ATL-T 生长的影响
Fig.3 Effects of celastrol on the growth of ATL-T cells. (A) Influence of celastrol on colony forming efficiency of ATL-T cells. I: control group; II: 0.001 $\mu\text{mol/L}$ celastrol group; III: 0.01 $\mu\text{mol/L}$ celastrol group. (B) Quantitative representation of colonies of ATL-T cells. Asterisks denote significance compared with control (DMSO). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

2.2 雷公藤红素可诱导白血病细胞凋亡

根据上述结果,我们发现雷公藤红素对 ATL-T、TL-Om1 细胞增殖的抑制效果最明显,因此选择将 ATL-T、TL-Om1 作为主要的研究对象,进一步探索雷公藤红素抑制成人 T 细胞白血病细胞增殖的分子机制。为了研究雷公藤红素是否能促进成人 T 细胞白血病细胞的凋亡,选用 0、0.5、2.5 $\mu\text{mol/L}$ 的雷公藤红素溶液处理 ATL-T、TL-Om1 细胞,24 h 后收集细胞,运用流式细胞术检测细胞的凋亡情况。结果表明(图 4),DMSO 处理组细胞的凋亡率分别为 1.2%、1.9%,随着雷公藤红素浓度增加细胞的凋亡率也明显增加,在雷公藤红素浓度为 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 时,ATL-T、TL-Om1

细胞凋亡率分别为 6.7%和 12.1%,而在 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 时 ATL-T、TL-Om1 细胞凋亡率分别达到了 23.3%和 68.7%。结果表明雷公藤红素能显著诱导成人 T 细胞白血病细胞凋亡,且该作用呈现出一定药物浓度依赖性。

2.3 雷公藤红素通过 caspase 途径诱导成人 T 细胞白血病细胞凋亡

为了进一步揭示雷公藤红素促进成人 T 细胞白血病细胞凋亡的分子机制,我们随后检测了经典 caspase 凋亡途径中的执行者 Caspase3/7 蛋白的表达,并选取甘油醛-3-磷酸脱氢酶(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)作为内参蛋白。选择 5、10 $\mu\text{mol/L}$ 的雷公藤红素溶液处理 ATL-T 细胞,由于 TL-Om1 对雷公藤红素更为敏感,故在处理 TL-Om1 细胞时选择雷公藤红素浓度为 2、4 $\mu\text{mol/L}$ 。Western blotting 检测结果显示(图 5),与对照组相比,雷公藤红素处理两种 ATL 细胞株后,Caspase3/7 蛋白均出现了剪切条带。该结果表明雷公藤红素能激活 caspase 途径,从而诱导成人 T 细胞白血病细胞凋亡。

2.4 雷公藤红素参与调控 Bax、Bcl-2 蛋白表达

Bcl-2 家族蛋白在细胞凋亡起着“主开关”作用,我们运用 Western blotting 技术检测了 Bcl-2 家族蛋白中的关键蛋白 Bax、Bcl-2 以及内参蛋白 GAPDH 的表达。结果如图 6A 所示,随着雷公藤红素浓度的增加,在 ATL-T 和 TL-Om1 细胞中的促凋亡蛋白 Bax 表达显著上调,而抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达则明显降低。为了进一步分析雷公藤红素调控 Bcl-2 家族蛋白表达的分子机制,构建了含有 Bax 启动子区域的报告基因质粒 Bax-Luc,并运用双荧光素酶报告基因实验分析了雷公藤红素对 Bax 启动子的影响。结果如图 6B 所示,随着雷公藤红素浓度的增加,Bax-Luc 的荧光强度也随之增加,表明雷公藤红素能增强 Bax 基因启动子的活性。因此,我们推测雷公藤红素通过增强 Bax

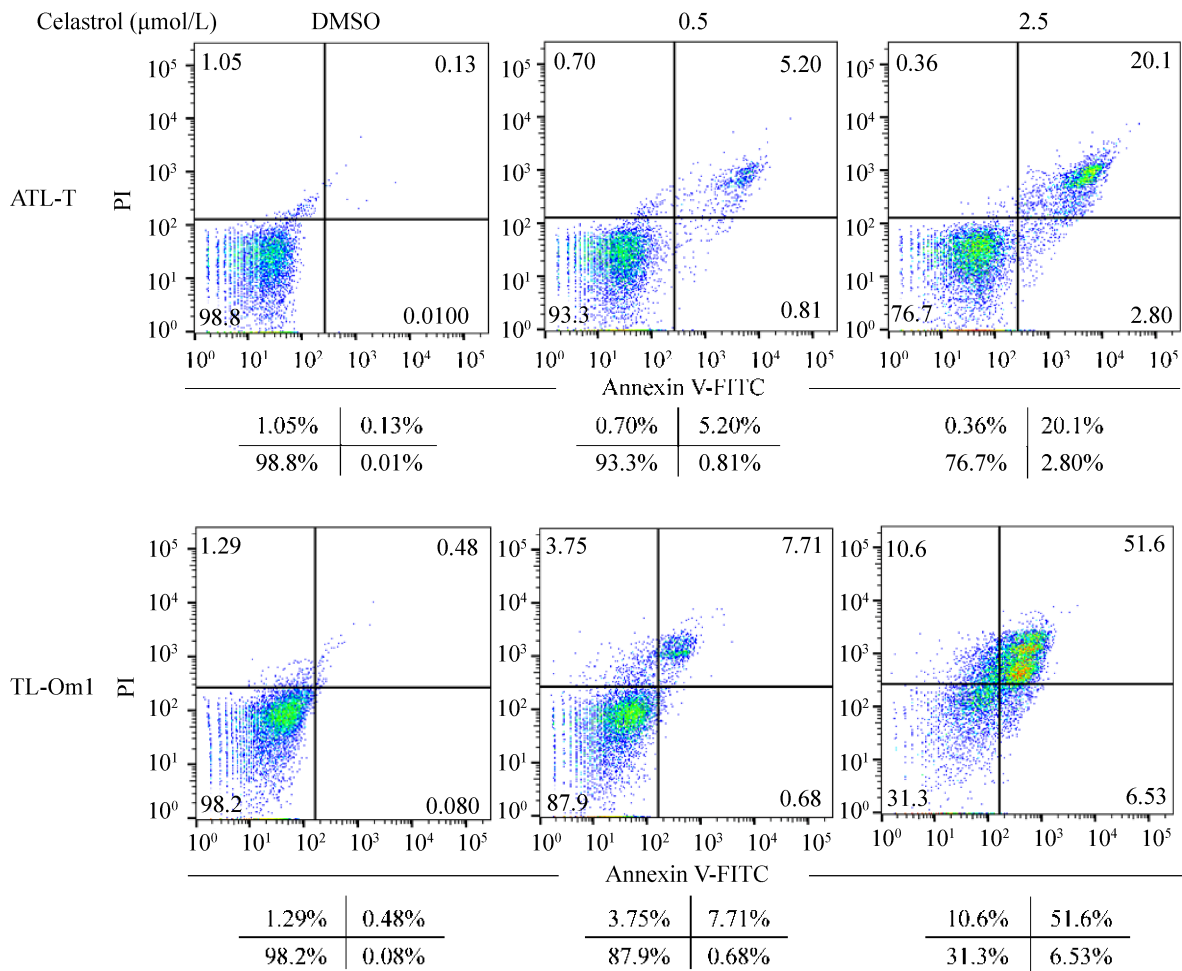


图 4 流式细胞检测雷公藤红素对 ATL-T、TL-Om1 凋亡的影响

Fig. 4 Flow cytometry shows effect of celastrol on the apoptosis of ATL-T and TL-Om1 cells. The percentages of each fraction were shown. Three major populations of cells can be observed in the cytotoxicity assay: Annexin V-/PI-cells are defined as live cells, Annexin V+/PI-cells as apoptotic cells and PI+ as dead cells (late apoptotic or necrotic).

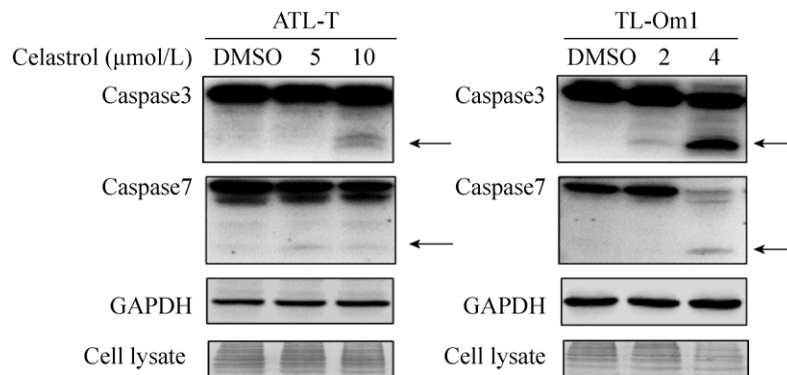


图 5 雷公藤红素对 ATL-T、TL-Om1 细胞 Caspase 家族蛋白表达的影响

Fig. 5 Effect of celastrol on Caspase family proteins expression in ATL-T and TL-Om1 cells. Protein extracts were immunoblotted with antibodies against Caspase3, Caspase7 and GAPDH (loading control). The arrow indicates the cleaved form of caspase protein.

启动子的活性从而促进了 Bax 蛋白的表达, 最终诱导成人 T 细胞白血病细胞的凋亡。

2.5 雷公藤红素能抑制病毒蛋白 Tax 的表达

研究表明雷公藤红素不仅能抑制肿瘤细胞的生长, 同时它还有一定的抗病毒活性^[18]。ATL 是由 HTLV-1 病毒感染所引起, 尤其是病毒编码的 Tax 蛋白在 ATL 发生过程中发挥着关键的作用。

因此, 我们探究了雷公藤红素是否通过调控病毒关键蛋白 Tax 的表达, 从而抑制了细胞的增殖。结果显示 (图 7), 雷公藤红素处理 ATL-T 细胞 48 h 后, 通过实时定量 PCR 和 Western blotting 检测发现不同浓度的雷公藤红素均能显著降低病毒核心蛋白 Tax 的表达量。该结果表明雷公藤红素能通过降低 Tax 蛋白的表达, 从而抑制 ATL 的恶性增殖。

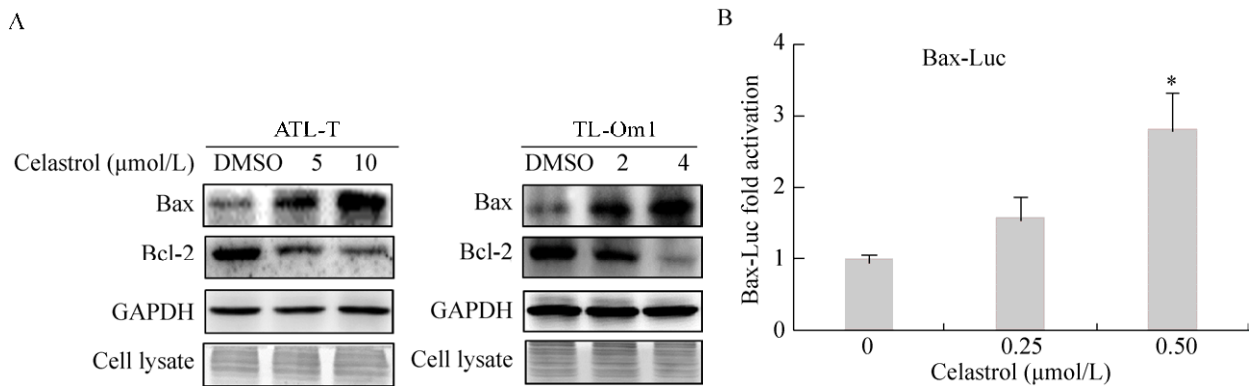


图 6 雷公藤红素对 ATL-T、TL-Om1 细胞 Bcl-2 家族蛋白表达及对 Bax 启动子活力的影响

Fig. 6 Effect of celastrol on Bcl-2 family proteins expression and Bax promoter activity. (A) Protein extracts were immunoblotted with antibodies against Bax, Bcl-2 and GAPDH (loading control). (B) Celastrol enhanced Bax promoter activity in Jurkat cells. Cells were transfected with the Bax reporter plasmid with the different celastrol concentrations. Luciferase activity was measured. Asterisks denote significance compared with control (DMSO). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

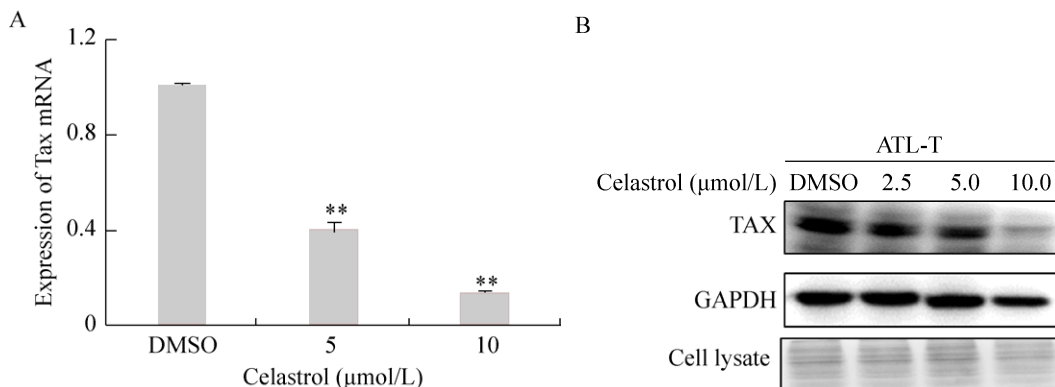


图 7 雷公藤红素对病毒蛋白 Tax 表达的影响

Fig. 7 Effect of celastrol on viral protein Tax protein expression. (A) Expression of Tax transcripts was detected by RT-PCR in ATL-T cells after treating with celastrol. (B) ATL-T cells were treated with celastrol for 48 h. The expression of Tax and GAPDH were analyzed by Western blotting. Asterisks denote significance compared with control (DMSO). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

3 讨论

近年来,有大量研究表明雷公藤红素作为一种天然的蛋白酶抑制剂能显著抑制多种肿瘤细胞的恶性增殖^[12-17]。本研究表明较低浓度的雷公藤红素能显著抑制成人 T 细胞白血病 (ATL) 细胞的增殖,且这种抑制呈现出时间及药物浓度依赖。通过流式细胞术发现雷公藤红素能诱导 ATL 细胞发生凋亡,从而抑制了细胞的增殖。

半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶 (Caspase) 家族在细胞凋亡中起着关键的作用,Lakhani 等^[19]认为 Caspase-3/7 是细胞发生凋亡的“执行者”,一旦被剪切激活就会引起级联介导的凋亡途径,从而引起细胞凋亡。而 Bcl-2 家族蛋白在细胞凋亡起着“主开关”作用,能调控线粒体膜的膜电位和通透性,促使线粒体释放促凋亡因子,从而激活了 Caspase 介导的凋亡途径^[20-21]。有文献证实在非小细胞肺癌 A549^[13]、乳腺癌^[12]等细胞中雷公藤红素能显著促进细胞色素 c、凋亡诱导因子释放,上调 Bax 蛋白表达,下调 Bcl-2 蛋白表达,从而促进肿瘤凋亡。本研究使用不同浓度的雷公藤红素处理 ATL 细胞,发现高浓度药物下 Caspase3/7 出现了明显的剪切带,并且显著降低了 Bcl-2 蛋白,上调了 Bax 蛋白,表明雷公藤红素很可能通过调控凋亡蛋白的表达,促进线粒体释放凋亡因子,从而调控细胞的凋亡。Del Poeta 等^[22]检测了急性髓型白血病患者 Bcl-2、Bax 的表达水平,发现 Bax/Bcl-2 的比值与患者的完全缓解率呈现正相关关系,表明 Bax 和 Bcl-2 可作为白血病的重要治疗靶标。本研究结果表明雷公藤红素能明显提高成人 T 细胞白血病细胞中 Bax/Bcl-2 的比值,这将为今后药物治疗成人 T 细胞白血病提供依据。

成人 T 细胞白血病 ATL 是一种由人类 T 细胞白血病病毒 1 型 (HTLV-1) 引起的侵袭性肿瘤。HTLV-1 能编码一系列调节基因 *Tax*、*Rex*、*p12*、*p21* 和 *HBZ* 等^[23]。有研究表明 *Tax* 蛋白参与调控

细胞内多条肿瘤相关信号通路,促进白血病细胞恶性增殖,从而诱导白血病的发生^[2,4]。故我们推测雷公藤红素可能影响病毒蛋白 *Tax* 的表达,从而抑制细胞生长。本研究结果发现雷公藤红素能降低 *Tax* 蛋白水平,且在转录水平也存在明显的抑制。而 Narayan 等^[18]发现雷公藤红素能显著抑制艾滋病病毒 (HIV) 前病毒基因 *Tat* 蛋白的活性,其机制是雷公藤红素通过共价修饰改变 *Tat* 蛋白的二级结构,抑制其转录激活功能,从而抑制 HIV 前病毒基因组的转录延伸。HTLV-1 中的 *Tax* 功能与 HIV 中 *Tat* 的结构和功能较为相似,*Tax* 也能促进 HTLV-1 病毒的 5'LTR 的活性,从而促进病毒蛋白的转录,故推测雷公藤红素可能通过抑制 *Tax* 的活性,抑制了 HTLV-1 病毒的 5'LTR 的活性,从而抑制了 *Tax* 自身的转录。后续研究将进一步探究其具体的分子作用机制,为今后运用雷公藤红素实现抗病毒治疗提供线索。

综上所述,雷公藤红素能显著抑制成人 T 细胞白血病细胞的增殖,并促进其凋亡,其机制可能是雷公藤红素通过调控 Bcl-2 家族蛋白,改变了线粒体膜的膜电位和通透性,促使线粒体释放促凋亡因子,激活了 Caspase 介导的凋亡途径,从而促进细胞凋亡。本研究还发现雷公藤红素能抑制 HTLV-1 病毒蛋白 *Tax* 的表达,推测雷公藤红素可能是通过下调 *Tax* 的表达,抑制 *Tax* 对细胞内各信号通路的调控作用,从而抑制 ATL 的恶性增殖。本研究将为今后进一步开展动物实验,以及最终应用于临床提供了实验依据。

REFERENCES

- [1] Bazarbachi A, Ghez D, Lepelletier Y, et al. New therapeutic approaches for adult T-cell leukaemia. *Lancet Oncol*, 2004, 5(11): 664-672.
- [2] Matsuoka M, Jeang KT. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(4): 270-280.

- [3] Gallo RC. Research and discovery of the first human cancer virus, HTLV-1. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2011, 24(4): 559–565.
- [4] Kfoury Y, Nasr R, Hermine O, et al. Proapoptotic regimes for HTLV-I-transformed cells: targeting Tax and the NF- κ B pathway. *Cell Death Differ*, 2005, 12 (Suppl 1): 871–877.
- [5] Bazarbachi A, Suarez F, Fields P, et al. How I treat adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood*, 2011, 118(7): 1736–1745.
- [6] Hermine O, Wattel E, Gessain A, et al. Adult T cell leukaemia. *BioDrugs*, 1998, 10(6): 447–462.
- [7] Mahieux R, Watanabe T. Forefront studies on HTLV-1 oncogenesis. *Front Microbiol*, 2013, 4: 156.
- [8] Tsukasaki K, Hermine O, Bazarbachi A, et al. Definition, prognostic factors, treatment, and response criteria of adult T-cell leukemia-lymphoma: a proposal from an international consensus meeting. *J Clin Oncol*, 2009, 27(3): 453–459.
- [9] Matsuoka M, Jeang KT. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and leukemic transformation: viral infectivity, Tax, HBZ and therapy. *Oncogene*, 2011, 30(12): 1379–1389.
- [10] Peng A, Gu Y, Lin SY. Herbal treatment for renal diseases. *Ann Acad Med Singapore*, 2005, 34(1): 44–51.
- [11] Kim Y, Kang H, Jang SW, et al. Celastrol inhibits breast cancer cell invasion via suppression of NF- κ B-mediated matrix metalloproteinase-9 expression. *Cell Physiol Biochem*, 2011, 28(2): 175–184.
- [12] Yang HS, Kim JY, Lee JH, et al. Celastrol isolated from *Tripterygium regelii* induces apoptosis through both caspase-dependent and-independent pathways in human breast cancer cells. *Food Chem Toxicol*, 2011, 49(2): 527–532.
- [13] Mou HB, Zheng Y, Zhao P, et al. Celastrol induces apoptosis in non-small-cell lung cancer A549 cells through activation of mitochondria- and Fas/FasL-mediated pathways. *Toxicol in Vitro*, 2011, 25(5): 1027–1032.
- [14] Zhang T, Hamza A, Cao XH, et al. A novel Hsp90 inhibitor to disrupt Hsp90/Cdc37 complex against pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(1): 162–170.
- [15] Huang YL, Zhou YX, Fan YS, et al. Celastrol inhibits the growth of human glioma xenografts in nude mice through suppressing VEGFR expression. *Cancer Lett*, 2008, 264(1): 101–106.
- [16] Ma YL, Yi H, Yang FL, et al. Celastrol down-regulates expression of P-Akt and cyclin D1 in HL-60 cells and induces apoptosis. *J Exp Hematol*, 2010, 18(4): 898–902 (in Chinese).
马永岚, 易虹, 杨飞兰, 等. 雷公藤红素下调 HL-60 细胞 P-Akt 与 Cyclin D1 蛋白表达及其诱导细胞凋亡的效应. *中国实验血液学杂志*, 2010, 18(4): 898–902.
- [17] Yang HJ, Chen D, Cui QC, et al. Celastrol, a triterpene extracted from the Chinese “Thunder of God Vine”, is a potent proteasome inhibitor and suppresses human prostate cancer growth in nude mice. *Cancer Res*, 2006, 66(9): 4758–4765.
- [18] Narayan V, Ravindra KC, Chiaro C, et al. Celastrol inhibits Tat-mediated human immunodeficiency virus (HIV) transcription and replication. *J Mol Biol*, 2011, 410(5): 972–983.
- [19] Lakhani SA, Masud A, Kuida K, et al. Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science*, 2006, 311(5762): 847–851.
- [20] Du YL, Yin F, Liu CJ, et al. Depression of MAD2 inhibits apoptosis of gastric cancer cells by upregulating Bcl-2 and interfering mitochondrion pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 345(3): 1092–1098.
- [21] Katoh I, Sato S, Fukunishi N, et al. Apaf-1-deficient *fog* mouse cell apoptosis involves hypo-polarization of the mitochondrial inner membrane, ATP depletion and citrate accumulation. *Cell Res*, 2008, 18(12): 1210–1219.
- [22] Del Poeta G, Venditti A, Del Principe MI, et al. Amount of spontaneous apoptosis detected by Bax/Bcl-2 ratio predicts outcome in acute myeloid leukemia (AML). *Blood*, 2003, 101(6): 2125–2131.
- [23] Gaudray G, Gachon F, Basbous J, et al. The complementary strand of the human T-cell leukemia virus type 1 RNA genome encodes a bZIP transcription factor that down-regulates viral transcription. *J Virol*, 2002, 76(24): 12813–12822.

(本文责编 郝丽芳)