

一种天然植物抗菌液 PAMs 对人白血病 K562 细胞的促凋亡作用

周毅洁¹, 豆荣昆¹, 毕振飞¹, 杨亚蓝¹, 刘宗瑛¹, 邬怡然¹, 邱槿怡¹, 向飞丹州^{2,3}, 茅灿泉^{1*}

(¹西南交通大学生命科学与工程学院, 成都 610031; ²云南普洱丹州制药股份有限公司, 宁洱 665199;

³云南民族医药研究所股份有限公司, 昆明 650228)

摘要 初步研究一种天然植物抗菌液(PAMs)对白血病K562细胞的杀伤作用及抗肿瘤分子作用机制。MTT法确定PAMs对K562细胞的增殖抑制作用和具有的浓度和时间依赖性; AO-EB双染、Annexin-FITC/PI流式细胞仪染色观察显示PAMs对K562细胞的杀伤作用与细胞凋亡相关, 这也被进一步的分子水平与酶活力检测所证实。FQ-PCR基因表达检测发现, PAMs处理后, K562细胞株中 caspase-3、caspase-9、bax 等促凋亡相关基因有所上升, 而抑制凋亡基因 bcl-2 表达下降, Western blot 法检测到 PAMs 上调 caspase-3 的表达量, 同时下调抑制凋亡蛋白 survivin 的表达。这也与 caspase 酶活性测定结果相一致, PAMs 处理后的 K562, 其 caspase-3、-9 活性均有所上升。所有这些结果一方面揭示 PAMs 对白血病 K562 细胞株具有强的杀伤作用, 同时在形态和分子水平揭示其抗肿瘤抑制作用途径与诱导细胞凋亡的密切相关性, 为 PAMs 作为抗白血病抗肿瘤中药的研发提供参考。

关键词 天然植物抗菌液(PAMs); 白血病; K562 细胞; 凋亡

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2015)05-0712-07

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20150613

Promotion of apoptosis in leukemia K562 cells by natural plant-derived antimicrobial solution (PAMs)

ZHOU Yijie¹, DOU Rongkun¹, BI Zhenfei¹, YANG Yalan¹, LIU Zongying¹, WU Yiran¹, QIU Jinyi¹, XIANGFEI Danzhou^{2,3}, MAO Canquan^{1*}

¹Laboratory of Molecular Evolution and Applied Biology, School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031; ²Yunnan Puer Danzhou Pharmaceutical Co., Ltd., Ninger 665199; ³Institute of Yunnan Ethnic Traditional Medicine Co., Ltd., Kunming 650228, China

Abstract In this study, the leukemia K562 cell line was used as a model to elucidate the anticancer effects and preliminary mechanisms of PAMs. MTT assay showed that PAMs could cause cytotoxicities in K562 cells in dose- and time-dependent manners. AO-EB, Annexin-FITC/PI staining showed that the killing effects of PAMs in K562 cells were related to apoptosis, which was further confirmed by the following molecular and enzymatic assay. The mRNA levels of pro-apoptotic genes caspase-3, caspase-9 and bax were remarkably increased while the anti-apoptotic gene bcl-2 was significantly decreased determined by fluorescent quantitative PCR. Western blotting disclosed that PAMs could up-regulate caspase-3 and down-regulate anti-apoptotic survivin protein expression. The latter was also consistent with the results that PAMs could increase the enzymatic activities of both caspase-3 and caspase-9. All these results suggested that PAMs could effectively inhibit the proliferation of K562 cells and the mechanisms may be closely related to apoptosis induction. The work provides evidence basis for PAMs to be potentially developed as anti-cancer leukemia Chinese medicine.

Key words natural plant antimicrobial solution(PAMs); leukemia; K562; apoptosis

This work was supported by the Son Program of Fundamental Platform of Science and Technology Resource Condition, Ministry of Science and Technology of China (2005DKA21404) and the Fund from Yunnan Puer Danzhou Pharmaceutical Co., Ltd. Puer (No. VR01HX11131300411130)

白血病是一种异质群体疾病,源于造血细胞的畸变,主要包括急(慢)性淋巴性白血病、急(慢)性骨髓性白血病等^[1],近年来其发病率逐年增加。在我国,白血病致死率在肿瘤中位居前列,在儿童及 35 岁以下人群中致死率排名第一^[2]。目前白血病的治疗方法主要包括放疗、化疗、分子靶向治疗、生物治疗和干细胞移植等^[3]。尽管白血病发病机制的研究取得了长足的进步,临床治疗也得到了较大改善,但白血病整体治疗效果不尽如人意^[4]。化疗作为治疗白血病最主要的方法之一,虽能快速杀死肿瘤细胞,但不良反应明显,对机体的免疫力也有损伤,存在预后差,病死率较高等不足^[5]。因此,寻找高效、低不良反应的可用于包括白血病在内的各种肿瘤的抗癌药物或新型治疗方法是摆在基础和临床工作者面前的重大课题。

天然植物抗菌液(PAMs)是云南民族医药研究所股份有限公司从红花、紫草、刺天茄、芸香草等多种传统中草药中提取制备的一种复方产品。前期研究发现,PAMs 除了具有抗菌消毒、创口愈合、皮肤溃烂修复、消炎止痛等作用外,该产品在抗肿瘤方面也效果显著,对白血病、肝癌、乳腺癌、肺癌、胃癌等所有检测的十多种肿瘤细胞株均具有很强的体外杀伤作用,并且体内实验表明,PAMs 能够有效抑制小鼠 B16 黑色素瘤模型的生长,显示了其作为现代中药在抗肿瘤领域潜在的巨大前景与优势。但 PAMs 是一种药用植物源复方产品,其功效成分复杂、抗肿瘤作用机制尚不清楚。本研究以造血系统恶性肿瘤-白血病为研究对象,采用 MTT 法、琼脂糖集落实验、AO-EB 细胞双染、Annexin-FITC/PI 染色、酶活性检测、荧光定量 PCR(FQ-PCR)以及 Western blot 等多种技术与方法,初步研究和揭示 PAMs 对白血病 K562 细胞的杀伤作用及抗肿瘤分子作用机制,期望为 PAMs 作为抗白血病等多种肿瘤中药研发提供重要的前期工作基础与参考。

1 材 料

1.1 细胞、药品和试剂

人慢性髓系白血病 K562 细胞株(四川大学华

西医学院血液科惠赠);天然植物抗菌液[PAMs, 云南普洱丹州制药股份有限公司,(云)卫消证字[2011]第 0004 号,执行标准 Q/YPDZ-01-2013, 产品批号:20140901,授权专利号 201110393033.3];AO-EB 双染、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司);caspase-3、caspase-9 活性检测试剂盒,抗 caspase-3、survivin 兔单克隆抗体(碧云天生物技术公司);Total 总 RNA 提取试剂盒(美国 Omega 公司);胎牛血清、反转录试剂盒(美国 Invitrogen 公司);FastStart DNA Essential Green Master 荧光定量试剂盒(上海罗氏制药有限公司)。

1.2 仪 器

Accuri C6 流式细胞仪(美国 BD 生物公司);Lightcycler 96 实时荧光定量 PCR 仪(瑞士罗氏公司);酶标仪(美国 BioTek 公司);垂直蛋白电泳仪、半干式转膜仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方 法

2.1 PAMs 的制备

分别对红花、紫草、刺天茄和芸香草等民间药用植物进行采集、鉴定与干燥。依次取红花 30.0 g、紫草 25.0 g、刺天茄 15.0 g 和芸香草 15.0 g,混合研磨后用 75% 乙醇室温暗处理浸提 7 d,过滤后收集初滤液,将滤渣再与 75% 乙醇混合浸提并收集二次滤液;合并初、二次滤液,定容至 1 L 并储存于 4 ℃ 冰箱备用(终产品乙醇含量 50%),PAMs 活性成分以总生物碱含量为质量控制标准。

2.2 细胞培养

人慢性髓系白血病 K562 细胞株引自四川大学华西医学院血液科,由本实验室保种传代,培养在含 100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素、10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,置于 37 ℃、5% CO₂ 及饱和湿度下的细胞培养箱中培养。

2.3 MTT 法检测细胞活力

取 K562 对数生长期细胞,按每孔 5×10^3 个细胞加入 96 孔培养板,用培养基分别稀释 PAMs 分

数为 2%、3%、4% 和 5%，每个浓度设 6 个复孔，另设空白对照组和相应浓度的乙醇对照组。置于培养箱中(37 °C, 5% CO₂)分别培养 24 和 48 h 后，每孔加入 MTT 溶液 20 μL，继续培养 4 h 后，加入 10% 的 SDS (pH 4.5)，每孔 100 μL，于 37 °C 放置过夜，测定各孔 A₅₇₀。按如下公式计算细胞增殖抑制率 = [(A_{570, control} - A_{570, PAMs}) / A_{570, control}] × 100%。

2.4 软琼脂培养克隆形成实验

将 K562 细胞置于 3% PAMs 浓度下分别培养 24 和 48 h，然后用含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基悬浮细胞。按 1:1 比例使 1.2% 的琼脂糖和 2 × DMEM 培养基(含有 2 × 抗生素和 20% 的胎牛血清)混合后，取混合液 3 mL 注入直径 6 cm 平皿中，冷却凝固作为底层琼脂，放入 CO₂ 培养箱中备用。按 1:1 比例使 0.6% 琼脂糖和 2 × DMEM 培养基在无菌试管中相混以后，再向管中注入 0.2 mL，约 2 000 个细胞。待上层琼脂凝固后，置于 37 °C、5% CO₂ 温箱中培养 10 ~ 14 d，结晶紫染色冲洗后，将平皿置于倒置显微镜下观察拍照。

2.5 叶啶橙/溴化乙锭(AO/EB)双染

取对数生长期细胞，3% PAMs 分别作用 24 和 48 h 后，收集对照组和 PAMs 处理组细胞，PBS 洗涤细胞两次，配成终浓度为每毫升含 5 × 10⁵ 个细胞的悬液；将 AO 和 EB 工作液等体积混合，加入 AO-EB 混合液 1 μL 到细胞悬液 25 μL 中，轻轻混匀后置于载玻片上，加盖玻片，荧光显微镜下观察和拍照。

2.6 细胞凋亡率检测

取对数生长期细胞，设置 PAMs 药物浓度为 3%、4%、5%，分别作用 24 和 48 h 后，收集对照组和实验组细胞，PBS 充分洗涤后，取总数为 1 × 10⁵ ~ 5 × 10⁵ 个细胞；用结合缓冲液 500 μL 悬浮细胞，分别加入 Annexin V-FITC 和 PI 各 5 μL 混匀，室温避光孵育 5 ~ 15 min，1 h 内上流式细胞仪检测分析，重复 3 次。

2.7 FQ-PCR 检测 mRNA 表达

取对数生长期细胞，3% PAMs 分别作用 24 和 48 h，采用 Trizol 试剂提取样本总 RNA，按照 Invitrogen M-MLV 第一链合成试剂盒说明书合成 cDNA。FQ-PCR 参照 FastStart DNA Green Master 试剂盒手册说明操作，在 Lightcycler 96 仪器上完成，重复 3 次。检测的基因及内参 β-actin 引物信

息如表 1 所示。

Table 1 Sequences and characteristics of primers used in FQ-PCR

Targeted genes	Primer sequence(5' to 3')	T _m /°C
caspase-3	F: TGGTTCATCCAGTCGCTTG R: TTCTGTTGCCACCTTCGG	58
caspase-9	F: CGAACTAACAGCCAAGCAC R: CACCGACATACCAAATCCTC	60
bax	F: TGGCAGCTGACATGTTTCTGAC R: TCACCCAACCACCCGTGCTT	60
bcl-2	F: TTGAGTCGGTGGGGTCA R: TGACTTCACTGTGGCCAG	60
β-actin	F: CGGGAAATCGTGCCTGAC R: CAGGAAGGAAGGCTGGAAG	60

2.8 Western blot 法检测 caspase-3、survivin 的表达

分别收集 3% PAMs 处理 0、24 和 48 h 的各组活细胞 1 × 10⁷ 个，提取细胞总蛋白，BCA 法测定蛋白浓度。取待测蛋白 40 μg，经 SDS-PAGE 电泳、PVDF 膜电转，5% 脱脂奶粉封闭 1 h，室温下分别与抗 caspase-3、survivin 兔单克隆抗体 4 °C 孵育过夜，TBST 漂洗后加入二抗常温孵育 2 h，洗膜后 ECL 显色曝光。重复 3 次，Image J 软件计算灰度比值。

2.9 caspase-3、caspase-9 活性检测

3% PAMs 分别作用 24 和 48 h 后，收集细胞，PBS 洗涤后，2 × 10⁶ 个细胞加入裂解液 100 μL，重悬沉淀，冰浴裂解 15 min。4 °C，20 000 r/min 离心 15 min。将上清转移到冰浴预冷的离心管中，按照试剂盒说明书设置反应体系，测定样品 A₄₀₅ 吸收度。实验重复 3 次，与对照组相比分析 PAMs 处理组的吸收度与酶活性变化。

2.10 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件对所得数据进行统计处理，数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 t 检验。

3 结 果

3.1 PAMs 体外抑制 K562 细胞的生长

经过 PAMs 处理后的 K562 细胞与对照组相比，形态学发生显著的变化(图 1-A)，未处理的细胞为圆形，呈葡萄串珠状，而 PAMs 作用后的细胞，随着处理浓度和时间的增加，细胞分布分散，细胞形态发生改变，细胞内颗粒增多，细胞破碎。MTT 测定结果表明，PAMs 各处理组对 K562 细胞的增殖呈现强的抑制与杀伤作用，与空白对照组相比，差异均极其显著($P < 0.01$)，且呈现一定的浓度和

时间依赖性。其中,4% 和 5% 浓度的 PAMs 处理 48 h, 对 K562 细胞杀伤率分别达到 85.9% 和 99.7%。结果见图 1-B。而相应浓度的乙醇对照

组细胞的增殖和形态上与空白组对照相比无明显变化(数据未给出), 因此后续实验中未将乙醇纳入实验变量。

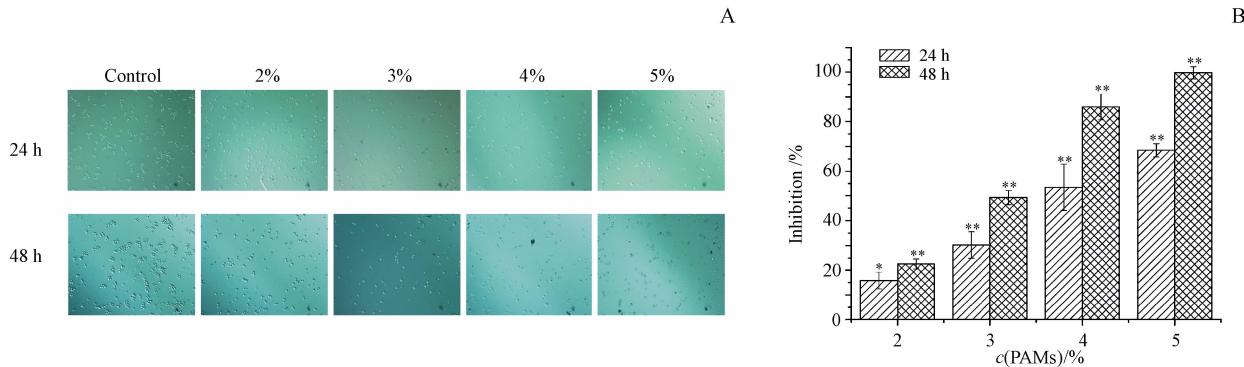


Figure 1 Inhibition and killing effects of the natural plant antimicrobial solution (PAMs) to K562 cells

A: Morphological changes after treated with different concentrations of PAMs at 24 h and 48 h respectively under an inverted light microscope ($\times 100$);

B: Inhibition of PAMs to K562 cells determined by MTT ($\bar{x} \pm s, n=3$)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

3.2 PAMs 对 K562 细胞集落形成的影响

软琼脂集落形成是测试细胞恶性程度的重要指标。从琼脂糖集落形成实验的结果可见, 与对照相比, PAMs 处理组琼脂糖集落形成能力降低, 表现为集落数目减少, 形状减小(白色箭头所示)。PAMs 作用 K562 细胞 48 h, 几乎看不到集落的产生, 见图 2。

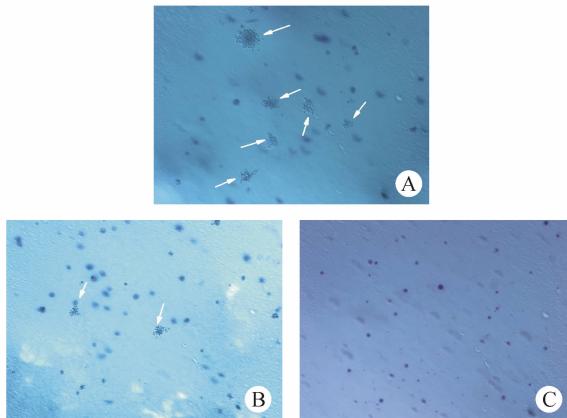


Figure 2 Colony formation of K562 cells after treated with PAMs

($\times 100$)

A: Control; B: 3% PAMs for 24 h; C: 3% PAMs for 48 h

3.3 PAMs 处理后 K562 细胞形态学观察

为了探究 PAMs 处理对 K562 细胞的作用机制, 本研究首先采用 AO/EB 荧光双染方法观察细胞形态的变化。AO 可透过活细胞膜, 将细胞核染上绿色荧光; EB 仅能透过破损的细胞膜, 使细胞核呈现橙色荧光。经过 PAMs 作用后的 K562 细胞与

对照组相比, 部分细胞形态学上发生了显著的变化。未处理的细胞呈圆形, 经蓝色激发光激发后, 呈现均一的绿色荧光, 核膜和细胞膜均完整, 核质被均匀染成绿色, 大小形状较单一; 而 PAMs 处理后, 部分细胞形状出现不规则变化, 核染色质呈橘红色, 并且呈固缩状或圆珠状, 具有典型的凋亡特征, 并且随着 PAMs 作用时间的增加, 具有凋亡特征的细胞数目也逐渐增多, 见图 3。

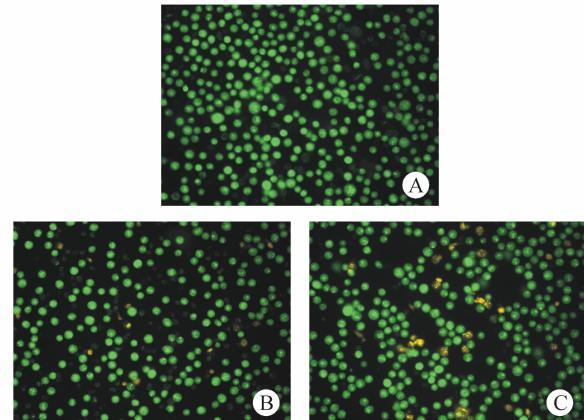


Figure 3 AO/EB staining of K562 cells treated with 3% PAMs

($\times 200$)

A: Control; B: 24 h-treatment; C: 48 h-treatment

3.4 流式细胞术检测 PAMs 对 K562 细胞凋亡的影响

为了进一步验证 PAMs 对 K562 细胞的杀伤作用是否与细胞凋亡相关, 本研究对各组细胞进行 Annexin V/PI 双染, 通过流式细胞术进行检测。

Annexin 是一种钙离子依赖性磷脂结合蛋白, 可与早期凋亡细胞细胞膜外翻的脂酰丝氨酸结合, 作为细胞早期凋亡的灵敏指标之一; 而 PI 是一种核酸染料, 不能透过完整的细胞膜, 但能透过凋亡中晚期的细胞和死细胞, 因此, 两者匹配使用, 即能将处于不同凋亡时期的细胞区分开来。实验结果表明, 3%、4%、5% 的 PAMs 作用细胞 24 和 48 h, 细胞凋亡数目显著增加, 细胞凋亡率呈时间和剂量依赖

性: 24 h 时, 对照组细胞凋亡率为零, PAMs 组细胞凋亡率分别为 3% PAMs ($8.9 \pm 2.0\%$), 4% PAMs ($19.7 \pm 3.6\%$) 和 5% PAMs ($20.3 \pm 6.0\%$); 48 h 时, 对照组凋亡率为 ($4.8 \pm 2.0\%$), PAMs 各组细胞凋亡率分别为 3% PAMs ($30.7 \pm 7.0\%$), 4% PAMs ($67.4 \pm 18.8\%$) 和 5% PAMs ($80.7 \pm 19.7\%$)。不同浓度 PAMs 与对照组比较, 差异极其显著($P < 0.01$)。见图 4。

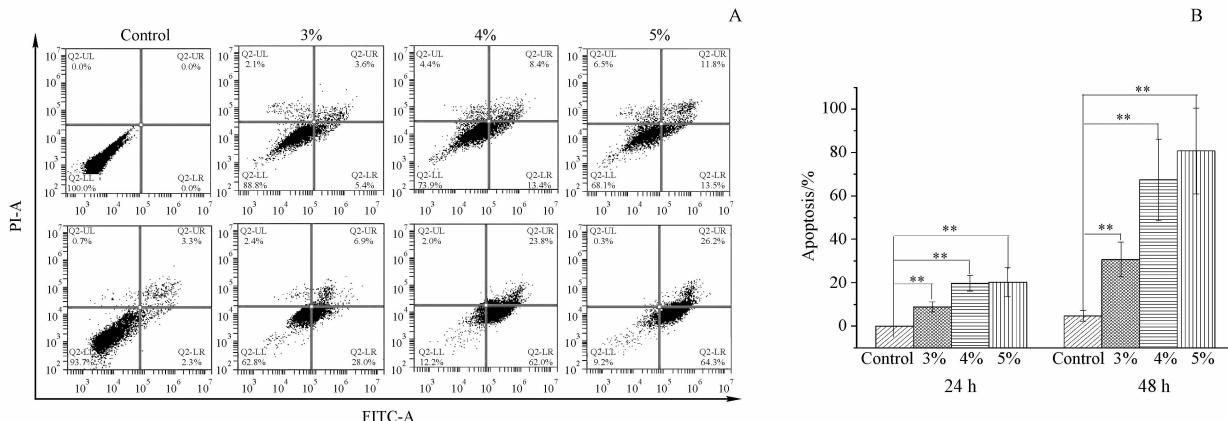


Figure 4 Effects of different concentrations of PAMs on apoptosis of K562 cells

A: Quantitative determination of apoptosis of K562 cells by flow cytometry (FCM); B: Apoptosis rate of K562 cells after treated with different concentrations of PAMs at 24 h and 48 h respectively ($\bar{x} \pm s, n=3$)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

3.5 PAMs 诱导 K562 细胞凋亡的蛋白与分子水平检测

在凋亡细胞形态学检测与分析的基础上, 针对 PAMs 诱导 K562 细胞凋亡, 本研究进一步在凋亡相关基因和蛋白(酶活性)水平检测细胞内分子水平的变化, 以确认其与细胞凋亡的密切相关性。本研究首先采用 FQ-PCR 检测 PAMs 处理 K562 细胞后与凋亡相关多个基因在 mRNA 水平的表达变化情况, 结果发现, 3% PAMs 作用 K562 细胞 24、48 h 后, 与对照组相比, PAMs 组中促凋亡基因 caspase-3、caspase-9、bax 的 mRNA 表达都有很大程度的升高, 差异极显著($P < 0.01$); 而抑制凋亡基因 bcl-2 的表达量, 与对照组相比, 则有相当程度的下降, 差异极显著($P < 0.01$), 见图 5-A。接着本研究在蛋白水平进行了 caspase-3 和抑制凋亡蛋白 survivin 表达变化的检测, Western blot 结果显示, 与对照组相比, 经 3% PAMs 分别作用 K562 细胞 24 和 48 h 后, caspase-3 被活化, 表达量增加, 与 mRNA 表达结果一致, 而抑制凋亡蛋白 survivin 则急剧下降, 见图 5-B,C。最后, 本研究在细胞酶活性水平检测

了与凋亡密切相关的 caspase 家族中比较重要的两种酶 caspase-3 和 caspase-9 的活性, 从图 5-D 可见, 与对照组相比, PAMs 组细胞内 24 h 和 48 h caspase-3 活性分别增至 125% 和 145%; caspase-9 活性则分别增至 117% 和 140%, 都有小幅度上升, 统计分析差异显著($P < 0.05$), 并且 48 h 组活性高于 24 h 组, 该结果也与 FQ-PCR 及 Western blot 结论相吻合。

4 讨 论

药用植物是新药研发的重要来源, 超过一半的新化合物直接或间接来源于天然植物, 一些从中药中提取的活性成分已被证明具有抗肿瘤活性。天然植物抗菌液 PAMs 是由多种传统的中草药如红花、紫草等经乙醇提取精制而成。其中, 红花已被确认具有抗肿瘤作用, 徐国钧等^[6]证明红花 70% 乙醇提取液对白血病细胞体外实验具抑制作用。紫草为传统中药, 具有广泛的药理作用, 研究发现, 紫草的主要成分紫草素以及紫草素衍生物可以通过 caspase 依赖性机制诱导肿瘤细胞的凋亡。

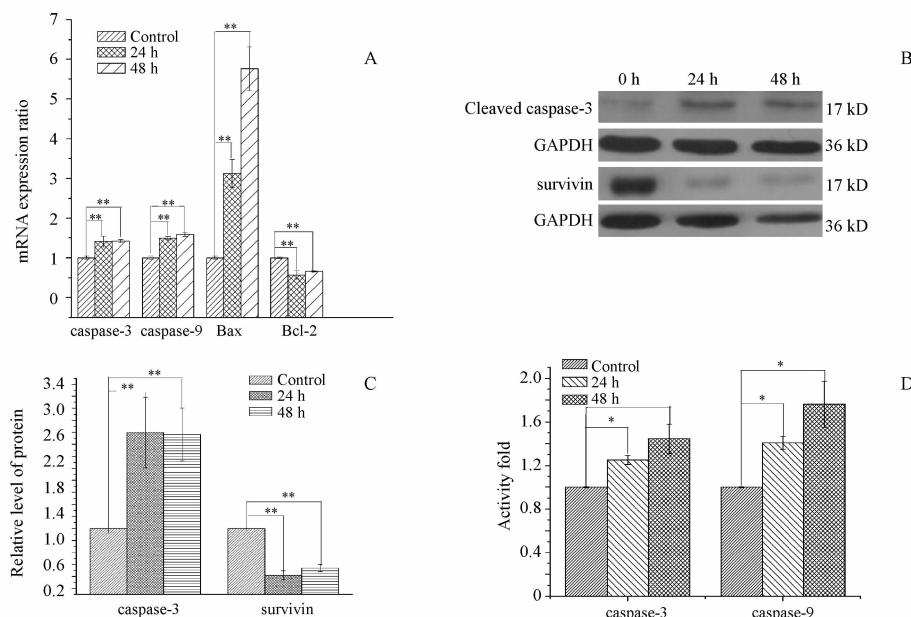


Figure 5 Effects of PAMs treatment on the expressions of different genes and proteins in K562 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

A: Correlative gene expression detected by FQ-PCR in K562 cells treated with 3% PAMs; B: Western blots of total cell protein extracts from K562 cells treated with or without PAMs; C: Quantification of protein expression in cells treated with 3% PAMs relative to control cells; D: Enzyme activities of caspase-3 and caspase-9

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

本研究结果显示, AO-EB 染色可见 K562 细胞凋亡特征性的改变, 流式细胞术检测进一步确认 PAMs 以时间和剂量依赖的方式诱导 K562 细胞凋亡, 这些结果都证明了 PAMs 对 K562 杀伤作用与诱导细胞凋亡有关。

细胞凋亡涉及多个信号通路, *bcl-2* 家族是一类重要的凋亡调节家族, 其中 *bcl-2* 是一种典型的抑制凋亡基因, 而 *bax* 则可以促进细胞凋亡^[7-8]。*bcl-2* 基因家族在 caspases 的激活中扮演了重要角色。在细胞凋亡信号的刺激下, *Bcl-2/Bax* 比率降低, 调节细胞色素 C 的释放, 细胞色素 C 募集并激活主要的凋亡启动分子之一 caspase-9, 继而激活 caspase-3^[9]。caspase-3 是 caspase 家族中的最重要的凋亡执行者之一, 是细胞凋亡过程中的主要效应因子, 能够被线粒体途径和死亡受体途径所激活^[10]。活化的 caspase-3 能够裂解 DNA, 使 DNA 片段化从而诱导细胞凋亡^[11]。survivin 属于凋亡抑制蛋白家族 IAPs 中的一员, 能够抑制细胞凋亡, 促进细胞的增殖^[12], 可以通过抑制 caspase-3、caspase-9 阻碍细胞凋亡^[13-14]。本研究中, FQ-PCR 分析表明 caspase-3、caspase-9 和 *bax* mRNA 等细胞凋亡促进基因的 mRNA 表达均呈上调趋势, 而抑

制凋亡基因 *bcl-2* 的表达较对照组则有显著的下降。Western blot 结果也显示了 caspase-3 蛋白表达量的增加和 survivin 蛋白表达的下降。进一步的酶活性检测也与上述结果一致, PAMs 作用后的 K562 细胞中 caspase-3、caspase-9 被激活, 与对照组相比, 药物作用 24 和 48 h 后, caspase-3、-9 活性都呈显著性上升。

综合以上研究结果, 认为 PAMs 抗白血病机制与细胞凋亡密切相关, 与 caspase 家族, *Bcl-2* 家族以及 survivin 等多个基因变化有关。由于细胞凋亡是一个多阶段、多系统参与的极其复杂的过程, 其具体信号通路还需要更深入的研究。同时, 必须意识到, 由于 PAMs 组分的复杂性, 其对癌细胞株的杀伤作用可能存在多种机制。实验过程中也发现, 部分 K562 细胞在 PAMs 作用后出现细胞膜破损, 细胞变成碎片等细胞直接死亡特征。PAMs 对肿瘤细胞的毒性可能存在多种途径, 需要进一步研究验证。

参考文献

- [1] Chopra M, Bohlander SK. Disturbing the histone code in leukemia: translocations and mutations affecting histone methyl transferases [J]. *Cancer Genetics*, 2015, 208(5): 192-205.

- [2] Sun XD, Cai YH, Cao YF, et al. Investigation of the dangerous factors of child leukemia [J]. *Med J CASC*(中国航天医学杂志), 2003, **12**(5):1–3.
- [3] Asmaa MJ, Al-Jamal HA, Ang CY, et al. Apoptosis induction in MV4-11 and K562 human leukemic cells by *Pereskia sacharosa* (Cactaceae) leaf crude extract [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, **15**(1):475–481.
- [4] Li RF, Feng YQ, Chen JH, et al. Naringenin suppresses K562 human leukemia cell proliferation and ameliorates adriamycin-induced oxidative damage in polymorphonuclear leukocytes [J]. *Exp Ther Med*, 2015, **9**(3):697–706.
- [5] Schürch CM, Riether C, Ochsenbein AF. Dendritic cell-based immunotherapy for myeloid [J]. *Front Immunol*, 2013, **4**(496):1–16.
- [6] Xu GJ, Wang Q, Yu BY, et al. Color map of Chinese herbal medicine against tumor (抗肿瘤中草药彩色图谱) [M]. Fuzhou: Fujian Science and Technology Press, 2000;368.
- [7] Huang H, Liu ZC. Antitum or effect of shikonin and its derivatives [J]. *Chin J Cancer Prev Treat* (中华肿瘤防治杂志), 2005, **12**(1):75–78.
- [8] Sun J, Zhang C, Bao YL, et al. Parthenolide-induced apoptosis, autophagy and suppression of proliferation in HepG2 cells [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, **15**(12):4897–4902.
- [9] Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, et al. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation [J]. *Science*, 1984, **226** (4678):1097–1099.
- [10] Apte SS, Mattei MG, Olsen BR. Mapping of the human BAX gene to chromosome 19q13.3-q13.4 and isolation of a novel alternatively spliced transcript, BAX delta. *Genomics* [J]. *Genomics*, 1995, **26**(3):592–594.
- [11] Ouyang L, Shi Z, Zhao S, et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis [J]. *Cell Prolif*, 2012, **45**(6):487–498.
- [12] Hu Y, Benedict MA, Ding L, et al. Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase 9 activation and apoptosis [J]. *EMBO J*, 1999, **18**(13):3586–3595.
- [13] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma [J]. *Nat Med*, 1997, **3**(8):917–921.
- [14] Pennati M, Binda M, Colella G, et al. Ribozyme-mediated inhibition of survivin expression increases spontaneous and drug-induced apoptosis and decreases the tumorigenic potential of human prostate cancer cells [J]. *Oncogene*, 2004, **23**(2):386–394.