

徐长卿中的天然产物XCQ-9对Jurkat细胞增殖和凋亡的影响及机制研究^Δ

韦学耐^{1,2*}, 杨坤^{1,2}, 刘琴^{1,2}, 赵鹏^{1,2}, 晏英³, 李艳梅^{1,2#} (1. 贵州医科大学药学院, 贵阳 550025; 2. 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵阳 550014; 3. 贵州医科大学医药卫生管理学院, 贵阳 550025)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2023)01-0047-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2023.01.09



摘要 目的 探讨徐长卿中天然产物XCQ-9抑制人急性T淋巴细胞白血病Jurkat细胞增殖和凋亡的作用及可能机制。方法 以Jurkat细胞作为白血病细胞模型,采用MTT法测定0(空白对照)、2.5、5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ XCQ-9作用24、48、72 h后对Jurkat细胞增殖的抑制作用。用0(空白对照)、2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$ XCQ-9作用于Jurkat细胞24、48 h后,利用流式细胞术分析XCQ-9对细胞周期和细胞凋亡的影响,并通过Western blot实验检测上述药物作用24 h后细胞中胱天蛋白酶9(Caspase-9)、活化的Caspase-9(Cleaved Caspase-9)、Caspase-3、活化的Caspase-3(Cleaved Caspase-3)、聚腺苷二磷酸-核糖聚合酶(PARP)、活化的PARP(Cleaved PARP)、细胞周期蛋白依赖性激酶1(CDK1)和细胞周期蛋白B1(Cyclin B1)的表达情况。结果 与空白对照比较,不同浓度XCQ-9均可显著降低Jurkat细胞的存活率($P<0.01$),并呈时间和浓度依赖性趋势。5、10 $\mu\text{mol/L}$ XCQ-9作用48 h后均可显著诱导Jurkat细胞凋亡($P<0.05$ 或 $P<0.01$),将细胞周期阻滞在G₂期($P<0.01$)。10 $\mu\text{mol/L}$ XCQ-9作用24 h后,可显著下调细胞中CDK1、Caspase-9蛋白的表达($P<0.01$),上调细胞中Cyclin B1、Cleaved Caspase-9、Cleaved Caspase-3和Cleaved PARP蛋白的表达($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论 XCQ-9通过诱导G₂期阻滞抑制Jurkat细胞增殖,并激活Caspase通路促进细胞凋亡,从而发挥其抗肿瘤作用。

关键词 XCQ-9;徐长卿;人急性T淋巴细胞白血病;Jurkat细胞;细胞凋亡;细胞周期;胱天蛋白酶途径

Study on the effect of natural compound XCQ-9 of *Cynanchum paniculatum* on the proliferation and apoptosis of Jurkat cell and its mechanism

WEI Xuenai^{1,2}, YANG Kun^{1,2}, LIU Qin^{1,2}, ZHAO Peng^{1,2}, YAN Ying³, LI Yanmei^{1,2} (1. School of Pharmaceutical, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 2. Key Laboratory of Chemistry for Natural Products, Guizhou Province and Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550014, China; 3. School of Medicine and Health Management, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the inhibitory effect of natural compound XCQ-9 of *Cynanchum paniculatum* on the proliferation and apoptosis of Jurkat cell line of human T-cell acute lymphoblastic leukemia and its possible mechanism. **METHODS** Jurkat cell was used as the leukemia cell model, and MTT assay was adopted to detect the inhibitory effects of 0 (blank control), 2.5, 5, 10, 20 and 40 $\mu\text{mol/L}$ XCQ-9 on the proliferation of Jurkat cell after treated for 24, 48, 72 h. After treated with 0 (blank control), 2.5, 5, 10 $\mu\text{mol/L}$ XCQ-9 for 24 h and 48 h, the cell cycle and apoptosis were analyzed by flow cytometry. The expressions of Caspase-9, Cleaved Caspase-9, Caspase-3, Cleaved Caspase-3, poly ADP-ribose poly-merase (PARP), Cleaved-PARP, cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) and Cyclin B1 were detected by Western blot after treated for 24 h. **RESULTS** Compared with blank control group, XCQ-9 at different concentrations could significantly decrease the survival rate of Jurkat cells ($P<0.01$), and showed a dose and time-dependent manner. After 48 h treatment of 5, 10 $\mu\text{mol/L}$ XCQ-9, Jurkat cell apoptosis was induced significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$), and the cell was arrested in G₂ phase ($P<0.01$). After 24 h treatment of 10 $\mu\text{mol/L}$ XCQ-9, the protein expressions of CDK1 and Caspase-9 were remarkably down-regulated ($P<0.01$), while the protein expressions of Cyclin B1, Cleaved Caspase-9, Cleaved Caspase-3 and Cleaved PARP were significantly up-regulated ($P<0.05$ or

$P<0.01$). **CONCLUSIONS** XCQ-9 plays anti-tumor effect through inducing G₂ phase arrest to inhibit proliferation and activating Caspase pathway to increase apoptosis.

KEYWORDS XCQ-9; *Cynanchum paniculatum*; human T-cell acute lymphoblastic leukemia; Jurkat cell; cell apoptosis; cell cycle; Caspase pathway

^Δ 基金项目 国家自然科学基金资助项目(No.81872772, No.81960546, No.U1812403);贵州省科技计划项目(No.QKHPTRC[2020]5008)

* 第一作者 硕士研究生。研究方向:小分子化合物抗肿瘤基础。
E-mail:2531392591@qq.com

通信作者 研究员,硕士生导师,博士。研究方向:小分子化合物抗肿瘤基础。电话:0851-83834026。E-mail:liyanmei518@hotmail.com

急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)是以未成熟T或B淋巴细胞异常增生为特征的恶性克隆性疾病,根据免疫表型一般分为T细胞型和B细胞型^[1]。ALL多发病于2~5岁,是儿童最常见和发病率最高的恶性肿瘤,且其发病率呈逐年上升的趋势^[2-4]。其中,急性T淋巴细胞白血病(T-cell acute lymphoblastic leukemia, T-ALL)是一种侵袭性疾病,在儿童ALL病例中占10%~15%^[5]。目前临床上治疗T-ALL的化疗药物有长春新碱、柔红霉素、可的松和依托泊苷等,但上述药物具有高毒性和耐药性,这在一定程度上限制了其临床应用^[6-7]。且有研究表明,这些化疗药物的耐药性已成为T-ALL患儿复发的主要原因,严重影响患儿的预后^[8]。因此,开发新型抗T-ALL的药物是临床迫切需要的。

徐长卿 *Cynanchum paniculatum* (Bge.) Kitag. 为萝藦科鹅绒藤属多年生草本植物,以干燥根和根茎入药。其味辛,性温,归肝、肾经,具有祛风除湿、止痛止痒的功能,用于治疗风湿、牙痛、跌打伤痛、风疹、湿疹等病症^[9]。现代药理研究表明,徐长卿具有抗菌、抗病毒、调节免疫、抗肿瘤等药理作用^[10]。徐长卿中已报道的化学成分有168种,其中C₂₁甾体类成分有47种^[11]。本课题组前期对从徐长卿中提取分离得到的C₂₁甾体化合物进行了抗癌活性筛选,发现化合物XCQ-9具有抗人急性T淋巴细胞白血病Jurkat细胞的作用,其结构式见图1。本研究拟通过体外实验初步探索XCQ-9对Jurkat细胞增殖和凋亡的影响,并从经典的胱天蛋白酶(Caspase)途径和细胞周期两个方面来考察其可能的作用机制,以期为将XCQ-9开发为治疗T-ALL的药物提供实验基础。

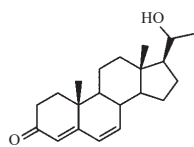


图1 XCQ-9的化学结构

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有A2型生物安全柜(美国Thermo Fisher Scientific公司)、Microfuge型台式高速冷冻离心机(美国Beckman公司)、Axi Vert AL型倒置光学显微镜(德国Zeiss公司)、Synergy2型多功能酶标仪(美国Gene公司)、PowerPac™ Basic型电泳仪(美国Bio-Rad公司)、ACEA NovoCyte型流式细胞仪[艾森生物(杭州)有限公司]、Odyssey&CLX型双色红外成像系统(美国LI-COR Odyssey公司)。

1.2 主要药品与试剂

XCQ-9为本课题组提取制备,分子式为C₂₁H₃₀O₂,纯度≥98%^[12];胎牛血清购自美国HyClone公司;RPMI

1640培养基购自美国Gibco公司;Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒(批号0315976)购自美国BD公司;二甲基亚砜、MTT和二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒(批号分别为401P031、810K052、20211213)均购自北京索莱宝科技有限公司;兔源甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(批号62u0922)购自美国Affinity公司;兔源细胞周期蛋白依赖性激酶1(cyclin-dependent kinase 1, CDK1)、细胞周期蛋白B1(Cyclin B1)抗体(批号分别为ab133327、ab32072)均购自美国Abcam公司;兔源Caspase-9、活化的Caspase-9(Cleaved Caspase-9)、Caspase-3、活化的Caspase-3(Cleaved Caspase-3)、聚腺苷二磷酸-核糖聚合酶(poly ADP-ribose polymerase, PARP)抗体和DyLight™800标记的抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗均购自美国Cell Signaling Technology公司。

1.3 细胞株

人急性T淋巴细胞白血病Jurkat细胞株购买于美国ATCC细胞库,现于本实验室保存。

2 方法

2.1 细胞培养

将Jurkat细胞接种于含5%胎牛血清的RPMI 1640培养基中,将细胞置于37℃、5%CO₂细胞培养箱中培养,取对数生长期的细胞进行后续实验。

2.2 XCQ-9对细胞增殖的影响

采用MTT法进行检测。取对数生长期的Jurkat细胞,按1×10⁵个/孔接种于96孔板中,置于培养箱中常规培养。待细胞稳定后,将其分为空白对照组(0 μmol/L)和不同浓度(2.5、5、10、20、40 μmol/L,药物浓度根据前期预实验结果设置)的XCQ-9组,每组平行设置5个复孔。分别干预24、48、72 h后,加入10 μL含5 mg/mL的MTT试剂常规孵育4 h,然后再加入三联液(500 mL三联液中含十二烷基硫酸钠50 g、异丁醇25 mL和浓盐酸0.5 mL)100 μL,孵育过夜。使用酶标仪测定各孔在570 nm波长处的吸光度(A),计算细胞存活率[细胞存活率(%)=(给药组A/空白对照组A)×100%]。实验重复3次。

2.3 XCQ-9对细胞周期的影响

采用流式细胞术进行检测。取对数生长期细胞,按4×10⁵个/孔接种于6孔板中,常规培养。待细胞稳定后,将其分为空白对照组(0 μmol/L)和不同浓度(2.5、5、10 μmol/L,浓度根据“2.2”项下MTT实验结果设置)的XCQ-9组,每组平行设置5个复孔,置于培养箱中常规培养。干预24、48 h后,以1 000 r/min离心4 min,收集细胞。用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞,然后加入500 μL预冷的70%乙醇固定过夜,再次以1 000 r/min离心4 min去除乙醇,并用预冷的PBS洗涤细胞;加入含0.1

mg/mL RNase、50 μ g/mL 碘化丙啶(propidium iodide, PI)和0.05%Triton-100的PBS,混匀,室温避光染色30 min,上样流式细胞仪测定各组细胞的细胞周期占比。实验重复3次。

2.4 XCQ-9对细胞凋亡的影响

取对数生长期细胞,按“2.3”项下方法接种、分组、给药、培养并收集细胞。用50 μ L 1 $\times$ Binding buffer混匀,并加入Annexin V-FITC和PI各2.5 μ L,避光染色15 min,上样流式细胞仪检测和分析。实验重复3次。

2.5 XCQ-9对细胞中凋亡和周期相关蛋白表达的影响

采用Western blot法进行检测。取对数生长期细胞,按12 $\times$ 10⁵个/皿接种于60 mm培养皿中,置于培养箱中常规培养。待细胞稳定后,将其分为空白对照组(0 μ mol/L)和不同浓度(2.5、5、10 μ mol/L,浓度设置依据同“2.3”项下)的XCQ-9组。干预24 h后收集细胞,用预冷的PBS清洗3次,加入80~150 μ L含有1%苯甲基磺酰氟的RIPA裂解液,冰上裂解30 min,以12 000 r/min离心15 min,去沉淀得到细胞蛋白溶液。用BCA蛋白浓度检测试剂盒检测蛋白浓度,并将5 $\times$ loading buffer和细胞蛋白溶液按1:4的体积比混匀,95 $^{\circ}$ C变性5 min,−80 $^{\circ}$ C保存备用。在10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶中,每孔加入50 μ g蛋白,待蛋白分离完全后(电泳条件为电压100 V、时间2 h),转移(转膜条件为电流220 mA、时间2 h)到0.2 μ m的聚偏二氟乙烯膜上,以3%牛血清白蛋白室温封闭1 h;加入相应的一抗(GAPDH、Cyclin B1、CDK1的稀释比例均为1:5 000,Caspase-9、Cleaved Caspase-9、Caspase-3、Cleaved Caspase-3、PARP的稀释比例均为1:1 000),4 $^{\circ}$ C孵育过夜;Tris缓冲盐溶液

(TBS)洗3次、每次5 min,加入DyLight™800标记的二抗(稀释比例均为1:30 000),避光室温孵育1.5 h;TBS洗3次、每次5 min,用双色红外成像系统检测和分析。以目的蛋白条带灰度值与内参蛋白(GAPDH)条带灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达水平。实验重复3次。

2.6 统计学方法

采用SPSS 21.0软件进行统计分析,使用GraphPad Prism 9.0软件作图。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 XCQ-9对Jurkat细胞增殖的影响

与空白对照组比较,作用24、48、72 h后,XCQ-9不同浓度组细胞的存活率均显著降低($P<0.01$),并呈时间和浓度依赖性趋势。结果见表1。

表1 XCQ-9干预不同时间后各组细胞的存活率测定结果($\bar{x} \pm s, n=5, \%$)

组别	24 h	48 h	72 h
空白对照组	100	100	100
XCQ-9 2.5 μ mol/L组	82.59 $\pm$ 1.45 ^a	77.84 $\pm$ 1.45 ^a	72.58 $\pm$ 2.40 ^a
XCQ-9 5 μ mol/L组	74.08 $\pm$ 0.73 ^a	59.14 $\pm$ 2.07 ^a	50.62 $\pm$ 1.59 ^a
XCQ-9 10 μ mol/L组	61.04 $\pm$ 2.41 ^a	44.26 $\pm$ 1.59 ^a	34.48 $\pm$ 0.56 ^a
XCQ-9 20 μ mol/L组	60.81 $\pm$ 1.51 ^a	38.19 $\pm$ 1.34 ^a	27.62 $\pm$ 1.26 ^a
XCQ-9 40 μ mol/L组	61.20 $\pm$ 1.55 ^a	33.87 $\pm$ 0.94 ^a	22.99 $\pm$ 0.14 ^a

a: 与空白对照组比较, $P<0.01$

3.2 XCQ-9对Jurkat细胞凋亡的影响

与空白对照组比较,作用24、48 h后,XCQ-9 5、10 μ mol/L组细胞的凋亡率均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且呈浓度和时间依赖性趋势。结果见图2、表2。

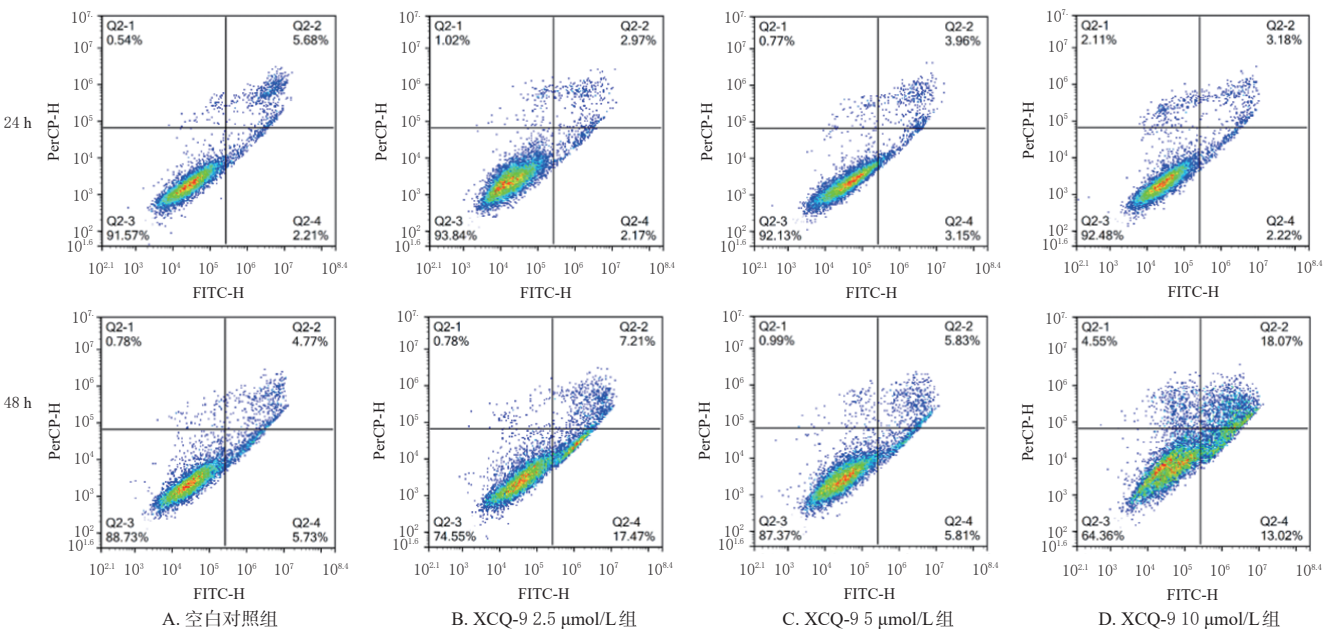


图2 XCQ-9干预24、48 h后各组细胞凋亡检测的流式细胞图

表2 XCQ-9干预24、48 h后各组细胞的凋亡率测定结果($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

组别	24 h	48 h
空白对照组	6.93±0.88	5.92±1.52
XCQ-9 2.5 μmol/L组	5.53±0.31	4.48±1.07
XCQ-9 5 μmol/L组	10.19±0.57 ^a	12.79±2.99 ^a
XCQ-9 10 μmol/L组	25.64±0.93 ^a	34.64±6.25 ^a

a: 与空白对照组比较, $P<0.01$; b: 与空白对照组比较, $P<0.05$

3.3 XCQ-9对Jurkat细胞周期的影响

与空白对照组比较, XCQ-9 10 μmol/L组干预24 h后及XCQ-9 5、10 μmol/L组干预48 h后, 细胞中处于G₂期的比例均显著升高($P<0.01$)。结果见表3、图3。

表3 XCQ-9干预24、48 h后各组细胞的细胞周期占比测定结果($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

组别	24 h			48 h		
	G ₁ 期	S期	G ₂ 期	G ₁ 期	S期	G ₂ 期
空白对照组	40.71±4.30	38.14±1.98	19.87±6.57	42.63±2.05	38.87±2.18	17.19±1.13
XCQ-9 2.5 μmol/L组	39.81±3.02	40.12±2.45	18.87±4.24	37.59±3.16	39.20±1.75	21.55±2.72
XCQ-9 5 μmol/L组	35.49±3.02	36.44±9.78	32.96±0.69	30.00±3.11	29.63±6.37	38.70±3.30 ^a
XCQ-9 10 μmol/L组	23.87±2.42	24.21±1.61	47.63±3.83 ^a	18.07±15.32	25.89±1.94	45.31±1.82 ^a

a: 与空白对照组比较, $P<0.01$

3.4 XCQ-9对细胞中凋亡和周期蛋白表达的影响结果

与空白对照组比较, XCQ-9 10 μmol/L组细胞中CDK1和Caspase-9蛋白表达显著下调($P<0.01$), XCQ-9 2.5、5、10 μmol/L组细胞中Cyclin B1、Cleaved Caspase-3和Cleaved PARP蛋白表达均显著上调($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 5、10 μmol/L组细胞中Cleaved Caspase-9蛋白表达显著上调($P<0.01$)。结果见图4、表4。

4 讨论

肿瘤的发生是由于受到遗传因素、环境因素和基因突变等的综合影响, 使得细胞增殖与死亡之间的稳态被

破坏, 从而导致肿瘤细胞不可控制地生长, 因此在研究抗肿瘤药物时, 通常将凋亡和周期阻滞作为抗肿瘤效果评价的两大指标^[13-14]。本研究发现, XCQ-9可以抑制Jurkat细胞的增殖, 同时促进Jurkat细胞的凋亡, 并诱导Jurkat细胞发生G₂期阻滞。这提示, XCQ-9具有一定的抗白血病活性。

凋亡是由Caspase介导的一种非炎症形式的程序性细胞死亡^[15]。其中, Caspase-9活化后(即Cleaved Caspase-9)可以启动Caspase级联反应, 使凋亡执行者Caspase-3活化(即Cleaved Caspase-3)^[16]。与Caspase家族的其他成员相比, Caspase-3处于Caspase级联的末端, 其激活是启动凋亡程序的必经之路, 可以水解底物PARP(Cleaved PARP是Cleaved Caspase-3水解的产物, 是凋亡的标志), 从而抑制DNA修复, 使细胞凋亡^[17]。本研究结果显示, XCQ-9可上调Jurkat细胞中Cleaved Caspase-9、Cleaved Caspase-3和Cleaved PARP蛋白的表达, 这可能是诱导其发生凋亡的重要原因。

细胞周期是由检查点、细胞周期蛋白依赖性激酶和细胞周期蛋白共同调节的、高度保守的、严格控制的过程^[18]。CDK1是细胞周期进程的核心, 其失调可导致肿瘤侵袭性发展、染色体不稳定和细胞增殖加强^[19]。Cyclin B1在细胞生长发育过程中发挥着重要的作用, 在细胞分裂中期达到高峰, 在分裂后期下降, 被认为是G₂期阻滞的标志^[20]。本研究结果显示, XCQ-9可下调Jurkat细胞中CDK1的表达, 上调Cyclin B1的表达, 进一步验证XCQ-9是通过阻滞G₂期来发挥作用的。

综上, XCQ-9可通过Caspase途径来促进细胞凋亡, 主要通过上调Cleaved Caspase-9、Cleaved Caspase-3、Cleaved PARP蛋白促进细胞凋亡, 下调CDK1和上调Cyclin B1蛋白使细胞发生G₂期阻滞来抑制细胞增殖,

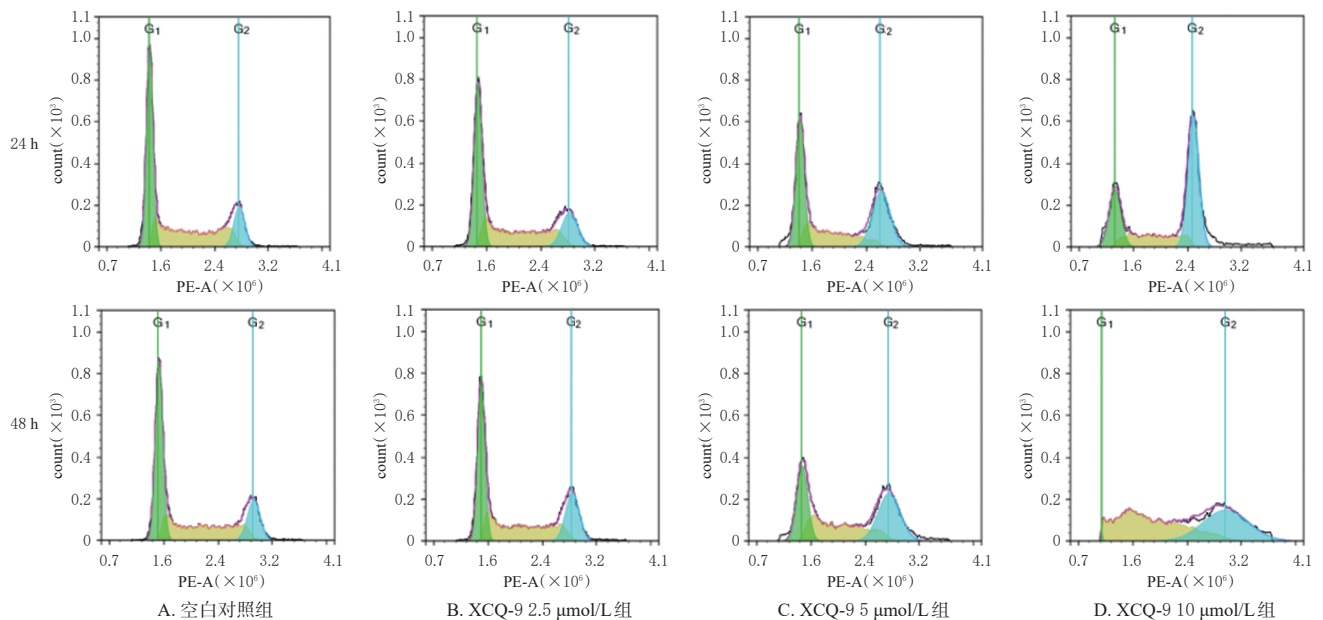
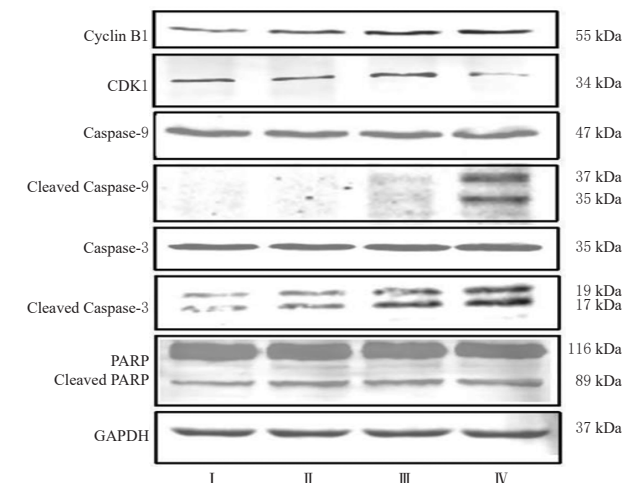


图3 XCQ-9作用24、48 h后各组细胞周期检测的流式细胞图



I :空白对照组; II :XCQ-9 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 组; III :XCQ-9 5 $\mu\text{mol/L}$ 组; IV :XCQ-9 10 $\mu\text{mol/L}$ 组

图4 各组细胞中凋亡和周期相关蛋白表达的电泳图

表4 各组细胞中凋亡和周期相关蛋白表达水平的测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Cyclin B1/ GAPDH	CDK1/ GAPDH	Caspase-9/ GAPDH	Cleaved Caspase-9/ GAPDH	Caspase-3/ GAPDH	Cleaved Caspase-3/ GAPDH	PARP/ GAPDH	Cleaved PARP/ GAPDH
空白对照组	0.52 $\pm$ 0.08	0.46 $\pm$ 0.06	1.26 $\pm$ 0.03	0.04 $\pm$ 0.00	1.28 $\pm$ 0.07	0.41 $\pm$ 0.03	2.30 $\pm$ 0.13	0.51 $\pm$ 0.01
XCQ-9 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.79 $\pm$ 0.12 ^a	0.41 $\pm$ 0.04	1.24 $\pm$ 0.08	0.04 $\pm$ 0.01	1.25 $\pm$ 0.04	0.70 $\pm$ 0.01 ^b	2.22 $\pm$ 0.13	0.72 $\pm$ 0.06 ^b
XCQ-9 5 $\mu\text{mol/L}$ 组	1.04 $\pm$ 0.16 ^a	0.46 $\pm$ 0.04	1.11 $\pm$ 0.09	0.23 $\pm$ 0.01 ^b	1.29 $\pm$ 0.04	1.29 $\pm$ 0.06 ^b	2.03 $\pm$ 0.09	0.71 $\pm$ 0.04 ^b
XCQ-9 10 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.98 $\pm$ 0.16 ^a	0.16 $\pm$ 0.01 ^b	0.76 $\pm$ 0.06 ^b	1.03 $\pm$ 0.02 ^b	1.31 $\pm$ 0.09	1.80 $\pm$ 0.06 ^b	2.09 $\pm$ 0.14	0.92 $\pm$ 0.01 ^b

a:与空白对照组比较, $P<0.01$;b:与空白对照组比较, $P<0.05$

这提示XCQ-9可能是一种具有潜力的抗T-ALL的新型候选药物。但本研究仅在体外研究了该药的抗白血病活性,尚未在体内验证其活性,之后将进一步进行体内实验验证,从而为其应用于临床奠定基础。

参考文献

[1] MALARD F, MOHTY M. Acute lymphoblastic leukaemia[J]. Lancet, 2020, 395(10230): 1146-1162.

[2] 蔡玉丽, 邹尧, 陈晓娟, 等. 982例儿童急性淋巴细胞白血病流行病学研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2020, 28(2): 371-376.

[3] MIRANDA-FILHO A, PIÑEROS M, FERLAY J, et al. Epidemiological patterns of leukaemia in 184 countries: a population-based study[J]. Lancet Haematol, 2018, 5(1): e14-e24.

[4] COCCARO N, ANELLI L, ZAGARIA A, et al. Next-generation sequencing in acute lymphoblastic leukemia[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(12): 2929.

[5] ARBER D A, ORAZI A, HASSERJIAN R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia[J]. Blood, 2016, 127(20): 2391-2405.

[6] LU H, et al. Rapid analysis of anthracycline antibiotics

doxorubicin and daunorubicin by microchip capillary electrophoresis[J]. Microchem J, 2009, 92(2): 170-173.

[7] EVANGELISTI C, CHIARINI F, MCCUBREY J A, et al. Therapeutic targeting of mTOR in T-cell acute lymphoblastic leukemia: an update[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(7): 1878.

[8] BROWN P, ZUGMAIER G, GORE L, et al. Day 15 bone marrow minimal residual disease predicts response to blinatumomab in relapsed/refractory paediatric B-ALL[J]. Br J Haematol, 2020, 188(4): e36-e39.

[9] FU M, WANG D Y, HU X, et al. Chemical constituents from *Cynanchum paniculatum* [J]. J Chin Med Mater, 2015, 38(1): 97-100.

[10] 葛朝晖, 周金川, 张海娟. 徐长卿的化学成分、药理作用及质量控制研究进展[J]. 中兽医医药杂志, 2020, 39(5): 41-45.

[11] 李葆林, 杨梦婷, 支雅婧, 等. 徐长卿化学成分和药理作用的研究进展及质量标志物(Q-Marker)预测分析[J]. 中草药, 2021, 52(12): 3725-3735.

[12] 唐攀, 陈洁, 晏英, 等. 黔产徐长卿根茎化学成分及抗烟草花叶病毒活性[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(6): 989-994, 1064.

[13] TALIB W H. Melatonin and cancer hallmarks[J]. Molecules, 2018, 23(3): 518.

[14] FUCHS Y. The therapeutic promise of apoptosis[J]. Science, 2019, 363(6431): 1050-1051.

[15] ROGERS C, FERNANDES-ALNEMRI T, MAYES L, et al. Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death[J]. Nat Commun, 2017, 8: 14128.

[16] KESAVARDHANA S, MALIREDDI R K S, KANNEGANTI T D. Caspases in cell death, inflammation, and pyroptosis[J]. Annu Rev Immunol, 2020, 38: 567-595.

[17] JIANG M X, QI L, LI L S, et al. The caspase-3/GSDME signal pathway as a switch between apoptosis and pyroptosis in cancer[J]. Cell Death Discov, 2020, 6: 112.

[18] PANAGOPOULOS A, ALTMAYER M. The hammer and the dance of cell cycle control[J]. Trends Biochem Sci, 2021, 46(4): 301-314.

[19] IZADI S, NIKKHOO A, HOJJAT-FARSANGI M, et al. CDK1 in breast cancer: implications for theranostic potential[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2020, 20(7): 758-767.

[20] LEE M H, CHO Y, JUNG B C, et al. Parkin induces G₂/M cell cycle arrest in TNF- α -treated HeLa cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 464(1): 63-69.

(收稿日期:2022-07-05 修回日期:2022-12-15)

(编辑:林 静)