

# NADPH氧化酶源性活性氧介导epinodosin诱导HL-60细胞分化及细胞骨架重组

丁 兰\* 陈宗儒 陈祎平 李佩蔚 刘国安

(西北师范大学生命科学学院, 兰州 730070)

**摘要** 该文分析研究了对映-贝壳杉烷二萜epinodosin通过调节NADPH氧化酶源性活性氧诱导急性早幼粒细胞白血病细胞HL-60向成熟粒细胞分化的特征。结果显示, epinodosin在4.0~8.0  $\mu\text{mol/L}$ 浓度时抑制HL-60细胞生长, 导致其S期阻滞, 诱导HL-60细胞形成肾形核和多叶核细胞, 使细胞吞噬能力和对硝基四氮唑蓝(nitroterazolium blue chloride, NBT)的还原力显著增强、细胞表面抗原CD11b表达上调, 表明epinodosin可诱导HL-60细胞向成熟粒细胞分化; epinodosin还诱导HL-60细胞骨架重组, 显著促进微管的成束组装以及提高波形纤维含量, 上述分化特征与临床诱导分化治疗剂全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)对HL-60细胞的分化诱导特性极为相似。进一步检测显示, 抗氧化剂NAC(N-acetyl-L-cysteine)以及NADPH氧化酶抑制剂夹竹桃麻素(apocynin, APO)和联苯基三价碘(diphenyleneiodonium, DPI)均可抑制epinodosin对HL-60细胞的分化诱导作用, 表明epinodosin导致HL-60细胞活性氧浓度的升高与NADPH氧化酶活性关联, 提示epinodosin通过调节NADPH氧化酶源性活性氧诱导HL-60向粒细胞分化。

**关键词** epinodosin; HL-60细胞; 分化; 活性氧; NADPH氧化酶; 细胞骨架重组

## NADPH Oxidase-derived ROS Mediated the Differentiation and Reorganization of Cytoskeleton Induced by Epinodosin in HL-60 Cells

Ding Lan\*, Chen Zongru, Chen Yiping, Li Peiwei, Liu Guoan

(College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China)

**Abstract** In this paper, NADPH oxidase-derived reactive oxygen species (ROS) mediated the differentiation of HL-60 to mature granulocyte caused by epinodosin were studied. The results showed that the growth of HL-60 was inhibited by epinodosin under the concentration of 4.0~8.0  $\mu\text{mol/L}$ , and it was arrested at S phase. Epinodosin induced HL-60 formed kidney-shaped nuclei and lobulated nuclei, enhanced nitroterazolium blue chloride (NBT)-reducing ability, cellular uptake and the expression of CD11b of HL-60 cells. These indicated that epinodosin could induce the differentiation of human HL-60 cells to granulocyte. And also, epinodosin could induce the reorganization of cytoskeleton in HL-60 cells, improve the assembly of microtubules and vimentin filaments. All the differentiation characteristics mentioned above were similar as the results of clinical differentiation therapy all-trans retinoic acid (ATRA) acted on HL-60 cells. Further detection displayed that the inducement of differentiation by epinodosin was inhibited by N-acetyl-L-cysteine (NAC, an antioxidant) and

收稿日期: 2015-11-26 接受日期: 2016-01-20

国家自然科学基金(批准号: 30960464)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0931-7970093, E-mail: dinglan@nwnu.edu.cn

Received: November 26, 2015 Accepted: January 20, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30960464)

\*Corresponding author. Tel: +86-931-7970093, E-mail: dinglan@nwnu.edu.cn

网络出版时间: 2016-03-16 16:39:47 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160316.1639.002.html>

apocynin/diphenyleneiodonium (APO/DPI, the inhibitors of NADPH oxidase). Namely, the increase of ROS was associated with NADPH oxidase, it revealed NADPH oxidase-derived reactive oxygen species mediated HL-60 cells differentiation caused by epinodosin.

**Keywords** epinodosin; HL-60 cells; differentiation; ROS; NADPH oxidase; cytoskeleton reorganization

以靶向药物主导的分化治疗已成为解决肿瘤化疗毒副作用和提高疗效的最佳途径。维甲酸和三氧化二砷用于急性早幼粒细胞白血病[acute promyelocytic leukemia, APL, 为AML(acute myeloid leukemia)的一种亚型]临床治疗是靶向分化治疗的典范<sup>[1]</sup>, 已证明在此类疾病的大多数患者中白血病干细胞能被靶向疗法彻底地根除<sup>[2]</sup>。95%的APL患者具有典型的t(15;17)染色体易位, 导致早幼粒细胞白血病(promyelocytic leukaemia, *PML*)基因与维甲酸受体 $\alpha$ (retinoic acid receptor  $\alpha$ , *RAR* $\alpha$ )基因发生融合形成*PML/RAR* $\alpha$ 融合蛋白, 阻断粒细胞分化成熟, 并增强祖细胞自我更新以及削弱其凋亡<sup>[3]</sup>。维甲酸和三氧化二砷均可靶向作用于融合蛋白(*PML/RAR* $\alpha$ ), 它们分别与融合蛋白的*RAR* $\alpha$ 部分和*PML*部分结合, 降解融合蛋白, 使细胞向成熟粒细胞分化<sup>[2]</sup>, 两者联合使用可显著提高临床疗效, 降低血液毒性及减少感染<sup>[1]</sup>。但其抗药性问题困扰临床治疗效应, 新的分化诱导药物的研究仍然面临挑战。

活性氧(reactive oxygen species, ROS)作为细胞功能精密调节的特异性信使, 参与调控细胞生长、分化与凋亡等多种细胞过程<sup>[4]</sup>。ROS失衡形成的氧化应激以及氧化还原调节可最终通过表观遗传调节因子改变组蛋白翻译后修饰, 影响基因表达, 进而调控细胞增殖与分化<sup>[5]</sup>。目前, 靶向ROS信号途径的分化治疗药物的发现与开发已成为目前最具吸引力的研究领域<sup>[6]</sup>。研究证实, NADPH氧化酶是造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSC)等各类细胞的活性氧生成主要酶类, NADPH氧化酶的快速活化与去活化反应可精密调控胞内ROS的水平并激活氧化还原敏感信号途径<sup>[7]</sup>, 调控各类血细胞分化生成<sup>[6]</sup>, 内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)分化成熟以及胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES)向心肌细胞分化<sup>[4,8-9]</sup>。植物次生代谢产物异甘草素(isoliquiritigenin)和外源性H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>可通过调节NADPH氧化酶活性, 升高胞内ROS浓度, 诱导早幼粒白血病细胞HL-60分化; 前者上调NADPH氧化酶gp91phox和p47phox亚基表达, 作用于Nrf2/

ARE(nuclear erythroid-related factor 2/antioxidant responsive element)信号途径, 诱导HL-60细胞向单核细胞分化<sup>[10-12]</sup>, 后者通过ERK途径诱导HL-60细胞向粒细胞分化<sup>[13]</sup>。这些研究提示, 从小分子化合物筛选靶向NADPH氧化酶的分化治疗药物的潜能。植物次生代谢产物种类繁多, 分子结构变化丰富, 是筛选靶向分化药物的分子宝库。

从香茶菜属植物中分离得到的对映-贝壳杉烷二萜约500余种, 其分子构型主要分为4大类<sup>[14]</sup>。近年来, 该类化合物抗癌研究进展迅速, 发现不同分子构型的该类化合物具有不同的抗白血病靶位点, 显示了该类化合物在抗白血病方面的重要研究价值。其中, 冬凌草素(oridonin)可激活t(8;21)白血病细胞凋亡途径, 通过casp-3靶向切割白血病融合蛋白AML1-ETO, 显示了显著的抗白血病效应<sup>[15]</sup>; 川藏香茶菜乙素(pharicin B)可通过维持AML细胞*RAR* $\alpha$ 蛋白稳定增强ATRA的分化诱导的作用<sup>[16]</sup>; 川藏香茶菜甲素(pharicin A)靶向作用于纺锤体组装检点蛋白BubR1, 致使白血病Jurkat和Raji细胞M期阻滞<sup>[17]</sup>; 腺花素(adenanthin)可直接靶向作用于NB4细胞过氧化氧化还原蛋白(peroxiredoxins, Prxs)的半胱氨酸残基, 抑制其酶活, 升高活性氧浓度, 诱导NB4细胞分化<sup>[18]</sup>; 与adenanthin具有相同分子构型(C-20位未氧化型)的王枣子甲素(wangzaozin A)可介导NADPH氧化酶的调节, 诱导细胞分化<sup>[19]</sup>。本文系统研究了另一重要分子构型(延命素型)的对映-贝壳杉烷二萜epinodosin调节NADPH氧化酶源活性氧, 抑制HL-60细胞生长, 重组细胞骨架系统以及诱导HL-60细胞向成熟粒细胞分化的重要特征。这些分化特征与临床诱导分化治疗剂ATRA对HL-60细胞的分化诱导特性极为相似, 显示了该化合物潜在的重要价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

RPMI-1640培养基购自Gibco公司; 台盼蓝、Hoechst 33324、碘化丙啶(PI)、硝基四氮唑蓝(nitrotetrazolium blue chloride, NBT)、佛波酯(12-

O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, TPA)、夹竹桃麻素 (apocynin, APO)、联苯基三价碘 (diphenyleneiodonium, DPI)、吉姆萨、罗丹明标记的鬼笔环肽均为Sigma公司产品。Anti-Human CD11b FITC购自德国Biosciences公司。 $\alpha$ -tubulin Mouse mAb、Vimentin Rabbit mAb购自Cell Signaling Technology公司。Goat anti-mouse IgG-FITC、Goat anti-rabbit IgG-FITC购自Santa Cruz公司。活性氧检测荧光探针DCFH-DA(2,7-dichlorofluorescein-diacetate)、抗氧化剂NAC(N-acetyl-L-cysteine)购自江苏碧云天生物技术有限公司。新生小牛血清购自中国杭州四季青生物技术有限公司。吞噬荧光探针P(HPMA-FMA)由本实验室合成<sup>[20]</sup>。其他化学试剂均为国产分析纯。

对映-贝壳杉烷型二萜化合物epinodosin由本实验室从甘肃产毛叶香茶菜中分离得到, 通过波谱学方法对其结构进行了鉴定<sup>[21]</sup>, epinodosin晶体溶解于DMSO, 于4 °C保存。其化学结构式如图1。

实验所用仪器有: CO<sub>2</sub>培养箱(forma scientific公司)、正置荧光显微镜(Leica公司)、倒置显微镜(Olympas公司)、流式细胞仪(Beckman公司)、酶标仪(Bio-Rad公司)和高速低温离心机(Beckman公司)。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞培养** 人早幼粒白血病细胞株HL-60由兰州大学生命科学学院王春明教授惠赠。细胞培养于含10%小牛血清的RPMI-1640培养基(含100 U/mL青霉素与100  $\mu$ g/mL链霉素), 置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>饱和湿度的恒温箱中培养。

**1.2.2 Epinodosin对HL-60细胞的生长抑制作用的检测** 取对数期生长的HL-60细胞, 以浓度为 $2 \times 10^4$ /mL的细胞悬液接种于24孔培养板中, 37 °C培养箱中预培养24 h后, 每孔分别加入0、2.0、4.0、6.0、8.0  $\mu$ mol/L epinodosin以及1.2  $\mu$ mol/L ATRA。每隔

24 h收集细胞, 取0.4%台盼蓝以1:4与细胞悬液充分混匀, 染色5 min后吸取适量混合液, 用血球计数板计数, 所有实验组均设3个重复。

**1.2.3 细胞周期检测** 细胞接种浓度与药物处理见1.2.2。作用72 h后, 600 r/min离心5 min, 收集细胞, 预冷PBS洗2次, 弃上清。70%乙醇4 °C固定过夜。细胞经PBS洗2次后加终浓度100  $\mu$ g/mL的RNase A, 37 °C孵育30 min, 再加终浓度40  $\mu$ g/mL PI, 避光孵育30 min, 上机检测。

**1.2.4 细胞核形态变化检测** 细胞接种浓度与药物处理见1.2.2。继续培养72 h后, 600 r/min离心收集细胞, PBS洗2次后加4%甲醛室温下固定10 min或者甲醇-冰乙酸(3:1)固定30 min, 离心去除固定液, 铺片, 加终浓度10  $\mu$ g/mL Hoechst 33324染液于室温下避光染色10 min或者Gimesa工作液染色20 min, 用PBS洗2次, 封片后荧光显微镜观察并拍照。

按照上述相同的方法检测300  $\mu$ mol/L NAC或0.1  $\mu$ mol/L DPI或200  $\mu$ mol/L APO单独或分别联合8.0  $\mu$ mol/L epinodosin处理72 h后细胞核的变化。

**1.2.5 细胞NBT还原能力测定** 细胞接种浓度与药物处理见1.2.2。按Chen等<sup>[11]</sup>的方法, 略有修改。药物处理72 h后, 600 r/min离心5 min收集细胞, PBS洗2次后将待测细胞以 $10^6$ /mL密度重悬于PBS(含终浓度为2 mg/mL NBT和1  $\mu$ g/mL TPA)中, 于37 °C继续孵育30 min, 离心去上清, 将所有待测样品分为2份, 其中1份均匀涂片, 并于光镜下观察拍照; 另1份用酶标仪于570 nm测定吸光度(D)值。

按照上述相同的方法测定300  $\mu$ mol/L NAC或0.1  $\mu$ mol/L DPI或200  $\mu$ mol/L APO单独或分别联合8.0  $\mu$ mol/L epinodosin处理72 h后细胞NBT还原能力。

**1.2.6 细胞吞噬能力的测定** 细胞接种浓度与药物处理见1.2.2。继续培养72 h后, 按吴炎鹏等<sup>[20]</sup>的方法, 加终浓度30  $\mu$ g/mL的荧光颗粒P(HPMA-FMA), 37 °C孵育3 h后, 离心收集细胞, PBS洗2次, 加1 mL PBS均分, 1份取500  $\mu$ L细胞悬液进行细胞涂片, 观察并拍照; 另1份500  $\mu$ L细胞悬液用于流式细胞仪检测。

按照上述相同的方法测定300  $\mu$ mol/L NAC或0.1  $\mu$ mol/L DPI或200  $\mu$ mol/L APO单独或分别联合8.0  $\mu$ mol/L epinodosin处理72 h后细胞的吞噬能力。

**1.2.7 细胞表面抗原CD11b表达检测** 细胞接种

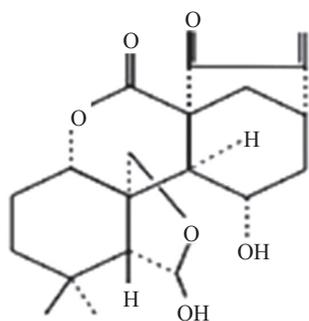


图1 Epinodosin的化学结构式

Fig.1 Chemical structure of epinodosin

浓度见1.2.2, 预培养24 h后加入0、4.0、8.0  $\mu\text{mol/L}$  epinodosin及1.2  $\mu\text{mol/L}$  ATRA。继续培养48、72 h后, 离心5 min收集细胞, PBS洗2次, 调整细胞浓度为 $10^6/\text{mL}$ , 取细胞悬液500  $\mu\text{L}$ , 加入5  $\mu\text{L}$  anti-human CD11b FITC, 于37  $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30 min, PBS洗2次, 流式细胞仪检测。

按上述相同方法继续3组实验: (1)300  $\mu\text{mol/L}$  NAC联合8.0  $\mu\text{mol/L}$  epinodosin, 或者300  $\mu\text{mol/L}$  NAC单独处理细胞72 h后, 检测其CD11b的表达; (2)200  $\mu\text{mol/L}$  APO联合8.0  $\mu\text{mol/L}$  epinodosin, 或者200  $\mu\text{mol/L}$  APO单独处理细胞72 h后, 检测其CD11b的表达; (3)0.1  $\mu\text{mol/L}$  DPI联合8.0  $\mu\text{mol/L}$  epinodosin, 或者0.1  $\mu\text{mol/L}$  DPI单独处理细胞72 h后, 检测其CD11b的表达。

**1.2.8 细胞ROS水平测定** 细胞接种浓度与药物处理见1.2.7。继续培养6、12、24 h后, 按Chen等<sup>[11]</sup>的方法, 600 r/min离心5 min, 收集细胞, PBS洗2次, 加入1 mL DCFH-DA荧光探针, 37  $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30 min, PBS洗2次, 流式细胞仪检测, 其中取6 h处理组的细胞悬液铺片, 于荧光显微镜下观察并拍照。

按照上述相同的方法测定300  $\mu\text{mol/L}$  NAC或0.1  $\mu\text{mol/L}$  DPI或200  $\mu\text{mol/L}$  APO单独或分别联合8.0  $\mu\text{mol/L}$  epinodosin处理6 h后细胞的ROS水平。

**1.2.9 NADPH氧化酶活性分析** 细胞接种浓度见1.2.2, 预培养24 h后, 以0、4.0、6.0、8.0  $\mu\text{mol/L}$  epinodosin处理细胞72 h, 收集细胞, PBS洗2次, 0.1% NBT溶液于37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h, 离心弃上清液, DMSO振荡溶解10 min, 用酶标仪于570 nm处测定吸光度(D)值。

**1.2.10 细胞微丝、微管和波形纤维染色及含量测定** 细胞微丝、微管和波形纤维染色及测定按Leung等<sup>[28]</sup>方法, 略有修改。细胞接种浓度见1.2.2, 预培养24 h后,

加入0、6.0  $\mu\text{mol/L}$  epinodosin以及1.2  $\mu\text{mol/L}$  ATRA。继续培养24、72 h后离心收集细胞, PBS洗3次, 4% 甲醛室温固定15 min, PBS洗3次, 加入1 mL封闭液(0.2% Triton X-100+0.1% BSA+PBS), 室温封闭30 min, 避光加入罗丹明标记的鬼笔环肽, 37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h, PBS洗3次, 分2份, 1份在荧光显微镜下观察细胞微丝并拍照, 另1份用于流式细胞仪检测。

另取2组已固定细胞分别加1 mL通透液(0.1% Triton X-100+PBS)和封闭液(5%山羊血清+0.3% Triton X-100+PBS)于湿盒中通透或封闭30 min后, 分别加一抗( $\alpha$ -tubulin Mouse mAb或Vimentin Rabbit mAb)置于4  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育过夜, PBS洗3次, 分别加二抗(Goat anti-mouse IgG-FITC或Goat anti-rabbit IgG-FITC)于37  $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅避光孵育2 h, PBS洗3次, 每组分2份, 1份在荧光显微镜下观察微管和波形纤维并拍照, 另1份用于流式细胞仪检测。

**1.2.11 数据统计** 实验数据以 $\text{mean}\pm\text{S.D.}$ 表示( $n=3$ ), 显著性差异分析用SPSS 11.0软件。 $P<0.05$ 为差异显著,  $P<0.01$ 为差异极显著。

## 2 结果

### 2.1 Epinodosin对HL-60细胞生长的影响

台盼蓝排染法检测显示, 2.0~8.0  $\mu\text{mol/L}$  epinodosin对HL-60细胞的生长具有明显的抑制作用, 并与处理时间及浓度呈正相关; 4.0~6.0  $\mu\text{mol/L}$  epinodosin与1.2  $\mu\text{mol/L}$  ATRA的抑制活性基本相当(图2A)。流式细胞术进一步检测2.0~8.0  $\mu\text{mol/L}$  epinodosin作用72 h后对HL-60细胞周期的影响。结果显示, 处理组细胞分别出现了不同程度的S期阻滞(图2B), 处理组S期细胞比率比对照组(52.1%)分别增加2.30%、5.76%、11.90%、15.36%、11.13%。

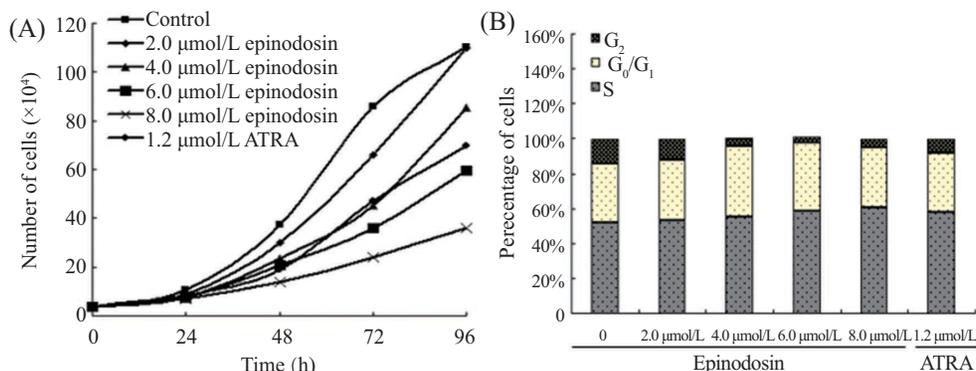
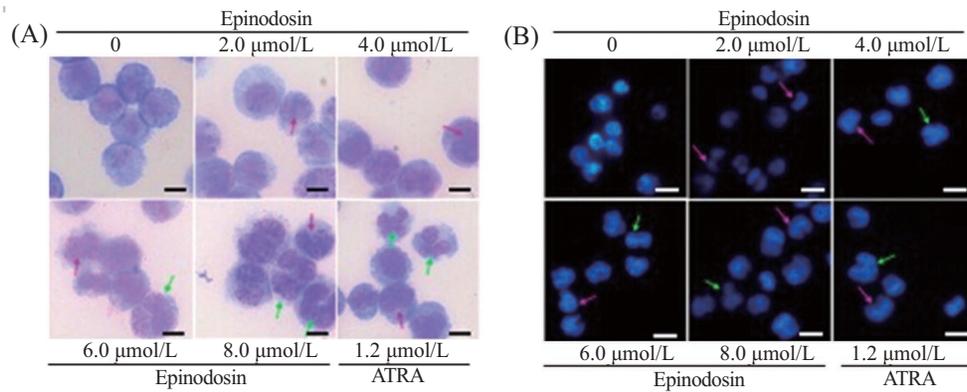


图2 Epinodosin对HL-60细胞生长(A)和细胞周期(B)的影响

Fig.2 Effects on the growth (A) and cell cycle (B) of HL-60 cells caused by epinodosin



A: 吉姆萨染色; B: Hoechst 33324染色。标尺=20 μm。

A: Giemsa staining; B: Hoechst 33324 staining. Scale bars=20 μm.

图3 Epinodosin及ATRA处理HL-60细胞72 h后细胞核的形态变化

Fig.3 The changes of HL-60 cells nuclear morphology treated with epinodosin and ATRA for 72 h

## 2.2 Epinodosin诱导HL-60细胞分化

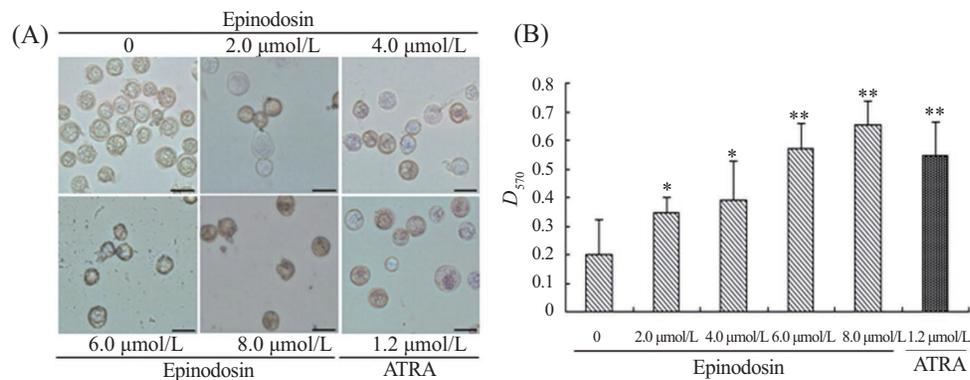
2.2.1 Epinodosin对HL-60细胞核形态的影响 不同浓度epinodosin及ATRA处理HL-60细胞72 h后, 吉姆萨染色(图3A)及Hoechst 33324染色(图3B)结果显示, 对照组细胞核多呈不规则圆形或卵圆形; 不同浓度epinodosin处理后, 细胞中肾形核(粉色箭头所示)和分叶核(绿色箭头所示)增多, 并随药物浓度升高而其比率增加。Epinodosin与ATRA处理组细胞核形的变化相似, 提示细胞向成熟粒细胞分化。

2.2.2 Epinodosin对HL-60细胞NBT还原能力的影响 不同浓度的epinodosin处理HL-60细胞后, 细胞内甲臞的沉淀增多, 细胞着色增加(图4A), 显示epinodosin使HL-60细胞的NBT还原能力增强。处理组的阳性细胞率随着药物浓度的升高而增加。如图4B所示, 与对照组相比, 2.0~4.0 μmol/L处理组细胞的吸光度

值明显增加( $P<0.05$ ); 6.0~8.0 μmol/L与1.2 μmol/L ATRA处理组显示了极显著性差异( $P<0.01$ )。

2.2.3 Epinodosin增强HL-60细胞的吞噬能力 P(HPMA-FMA)为本实验室合成的高分子荧光颗粒物<sup>[20]</sup>。荧光显微镜结合流式细胞术检测了epinodosin作用HL-60细胞72 h后, 细胞对荧光颗粒P(HPMA-FMA)吞噬能力的变化。如图5A所示, 在荧光显微镜下, 对照组细胞荧光强度很低, 所有加药组细胞荧光强度显著增加, 表明细胞对荧光颗粒的吞噬能力增强。进一步的流式细胞术检测显示, 处理组与对照组相比, 其荧光强度值均达到显著性差异( $P<0.05$ )或极显著差异( $P<0.01$ )(图5B), 表明细胞在药物作用后趋于分化成熟。

2.2.4 Epinodosin对HL-60细胞表面抗原CD11b表达的影响 利用直接免疫技术结合流式细胞仪检测

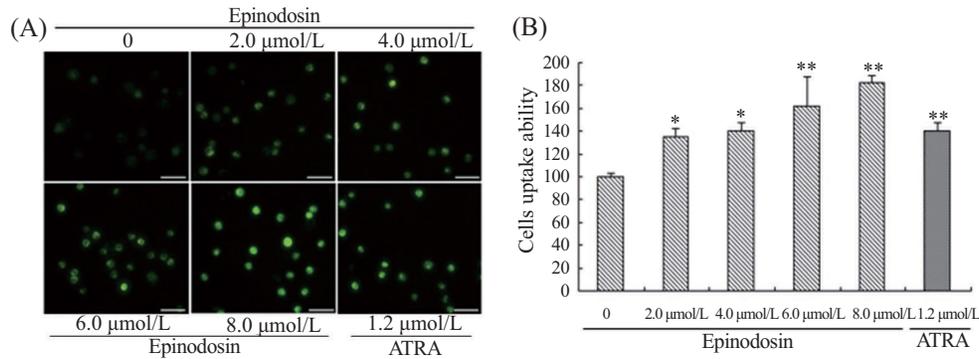


A: epinodosin及ATRA处理72 h后HL-60细胞着色变化, 标尺=50 μm; B: epinodosin及ATRA处理72 h后HL-60细胞的吸光度值, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , 与对照组比较。

A: the coloration changes of HL-60 cells treated with epinodosin and ATRA for 72 h, Scale bars=50 μm; B: the absorbance of HL-60 cells treated with epinodosin and ATRA for 72 h. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs control group.

图4 Epinodosin及ATRA对HL-60细胞NBT还原力的影响

Fig.4 The effects of epinodosin and ATRA on NBT-reducing ability of HL-60 cells

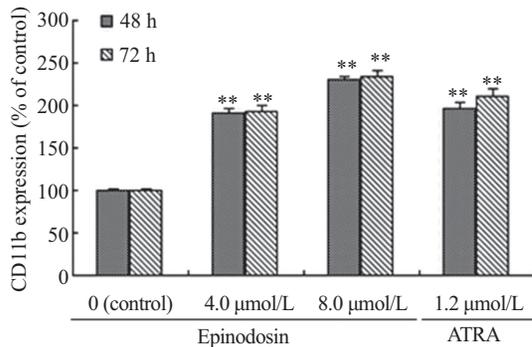


A: epinodosin及ATRA处理HL-60细胞72 h后细胞吞噬荧光颗粒P(HPMA-FMA)的荧光显微镜图像, 标尺=100  $\mu\text{m}$ ; B: epinodosin及ATRA处理HL-60细胞72 h后细胞的相对荧光强度。\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , 与对照组比较。

A: the fluorescence microscopy images of HL-60 cells treated with epinodosin or ATRA for 72 h followed by incubation with the fluorescent particles P(HPMA-FMA), Scale bars=100  $\mu\text{m}$ ; B: the fluorescence intensity of HL-60 cells treated with epinodosin and ATRA for 72 h. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs control group.

图5 Epinodosin对HL-60细胞吞噬能力的影响

Fig.5 The effects of epinodosin and ATRA on cellular uptake ability of HL-60 cells



\*\* $P<0.01$ , 与对照组比较。

\*\* $P<0.01$  vs control group.

图6 Epinodosin及ATRA对细胞CD11b表达的影响

Fig.6 The effects of epinodosin and ATRA on the expression of CD11b in HL-60 cells

epinodosin对HL-60细胞表面分化抗原CD11b表达的影响, 检测结果如图6所示。加药48 h和72 h后, 与对照组细胞相比, 处理组细胞相对荧光强度显著增加, 均显示了极显著性差异( $P<0.01$ ), 说明细胞表面抗原CD11b的表达上升。48 h处理组与72 h处理组的CD11b表达量相近; 4.0  $\mu\text{mol/L}$  epinodosin处理组与1.2  $\mu\text{mol/L}$  ATRA处理组表达量相当。

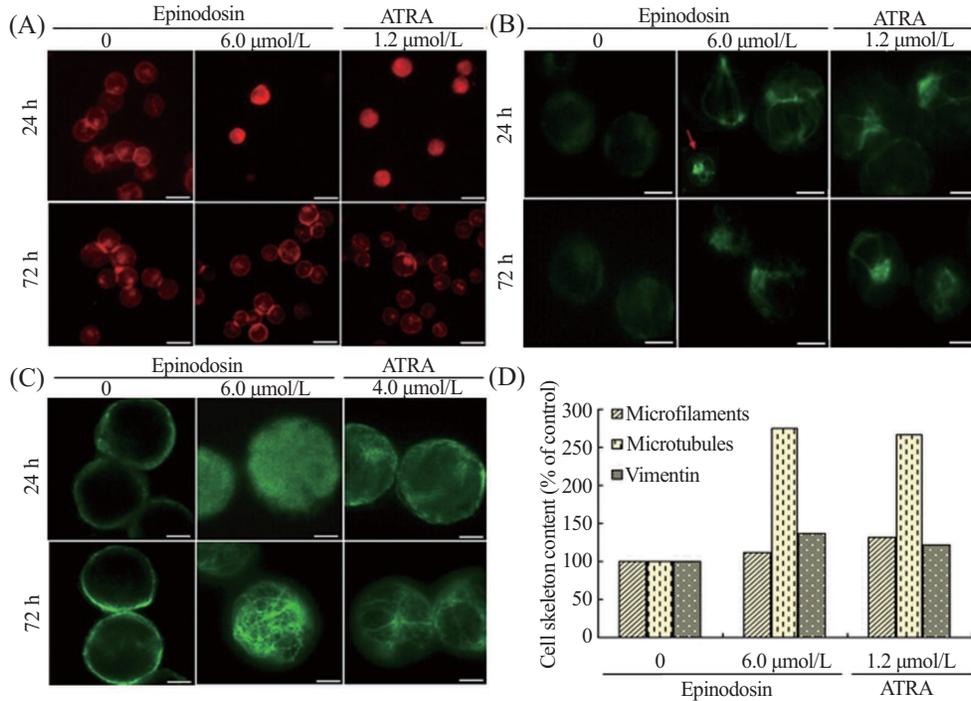
2.2.5 Epinodosin对HL-60细胞骨架的影响 细胞分化过程中细胞骨架的重组改变是其重要特征之一, 粒细胞的肾形核和多叶核的形成与细胞骨架关联<sup>[22,29]</sup>。罗丹明标记的鬼笔环肽可特异性结合细胞内纤维状肌动蛋白(微丝骨架), 荧光显微镜下可观察微丝的变化; 间接免疫荧光技术可标记HL-60细胞波形纤维和微管骨架, 荧光显微镜下可直接观察这两类骨架的变化, 进一步结合流式细胞术可测定

单个细胞荧光强度, 对微丝、微管和波形纤维进行定量分析。

6.0  $\mu\text{mol/L}$  epinodosin和1.2  $\mu\text{mol/L}$  ATRA分别作用HL-60细胞24、72 h后, 细胞微丝定性和定量分析如图7A和图7D所示。24 h后, 对照组细胞的外周可被罗丹明标记的鬼笔环肽染色, 呈环状红色荧光, 在靠近细胞中央有一红色荧光斑点; 经6.0  $\mu\text{mol/L}$  epinodosin与1.2  $\mu\text{mol/L}$  ATRA处理组的细胞荧光变强, 均匀分布于胞内。但药物作用72 h后, 6.0  $\mu\text{mol/L}$  epinodosin和1.2  $\mu\text{mol/L}$  ATRA处理组细胞呈现了与对照组相似的微丝分布特征, 即细胞外周有明亮荧光环以及细胞内有荧光亮斑; 流式细胞仪检测结果显示, 72 h处理组微丝的含量与对照组相比增加不明显, 而1.2  $\mu\text{mol/L}$  ATRA处理组微丝略有增加(图7D)。

细胞波形纤维定性和定量分析如图7B和图7D所示。细胞培养24 h后, 对照组细胞内波形纤维较均匀分布在细胞外周, 而6.0  $\mu\text{mol/L}$  epinodosin处理组细胞波形纤维荧光增强, 并出现明显的聚集亮斑(图7B, 红色箭头所示), 油镜下观察发现, 此亮斑为束状纤维聚集, 并呈网络状分布于胞质中; 72 h后, 6.0  $\mu\text{mol/L}$  epinodosin处理组细胞内纤维状结构多向细胞一侧聚集。流式细胞仪检测显示, epinodosin处理组和ATRA处理组的波形蛋白含量相比对照略有增加(图7D)。

细胞微管定性和定量分析结果如图7C和图7D所示。细胞培养24 h后, 对照组中微管量少并集中分布于细胞外周; 药物处理24 h后, 6.0  $\mu\text{mol/L}$  epinodosin与1.2  $\mu\text{mol/L}$  ATRA处理组细胞内微管



A~C: epinodosin或ATRA作用24 h或72 h后细胞微丝(标尺=50 μm)、波形纤维及微管(标尺=20 μm)的荧光图像; D: epinodosin或ATRA作用72 h后, 3种骨架含量的变化。

A~C: the changes of microfilaments (scale bars=50 μm), vimentin and microtubules (scale bars=20 μm) in HL-60 cells treated with epinodosin or ATRA for 24 h or 72 h; D: the contents of three skeletons in HL-60 cells treated with epinodosin or ATRA for 72 h.

图7 Epinodosin和ATRA对HL-60细胞骨架的影响

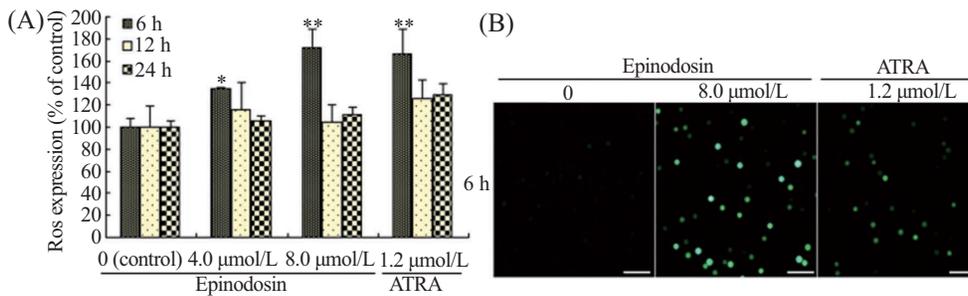
Fig.7 The effects of cytoskeletons in HL-60 cells treated with epinodosin and ATRA

较对照组明显增多, 较均匀分布于胞内。72 h后, epinodosin处理组和ATRA处理组细胞微管组装形成较粗的束状结构, 纵横交错分布于整个细胞内(图7C), 流式细胞仪检测显示, 其微管含量增加明显, 为对照组的2.5倍以上(图7D); ATRA处理组的微管变化与epinodosin处理组极为相似。

### 2.3 ROS介导epinodosin对HL-60细胞的分化作用

#### 2.3.1 Epinodosin对HL-60细胞ROS水平的影响

用流式细胞术检测药物分别作用细胞6、12、24 h后细胞内ROS变化情况。结果如图8A所示, 4.0 μmol/L和8.0 μmol/L epinodosin以及1.2 μmol/L ATRA处理6 h后能引起细胞内ROS的升高, 分别具有显著性( $P<0.05$ )或极显著差异( $P<0.01$ ); 而12 h和24 h处理组ROS浓度变化不明显。荧光显微观察显示, 8.0 μmol/L epinodosin和1.2 μmol/L ATRA在处理细胞6 h后其活性氧上升明显(图8B), 结果与流式数据一致。

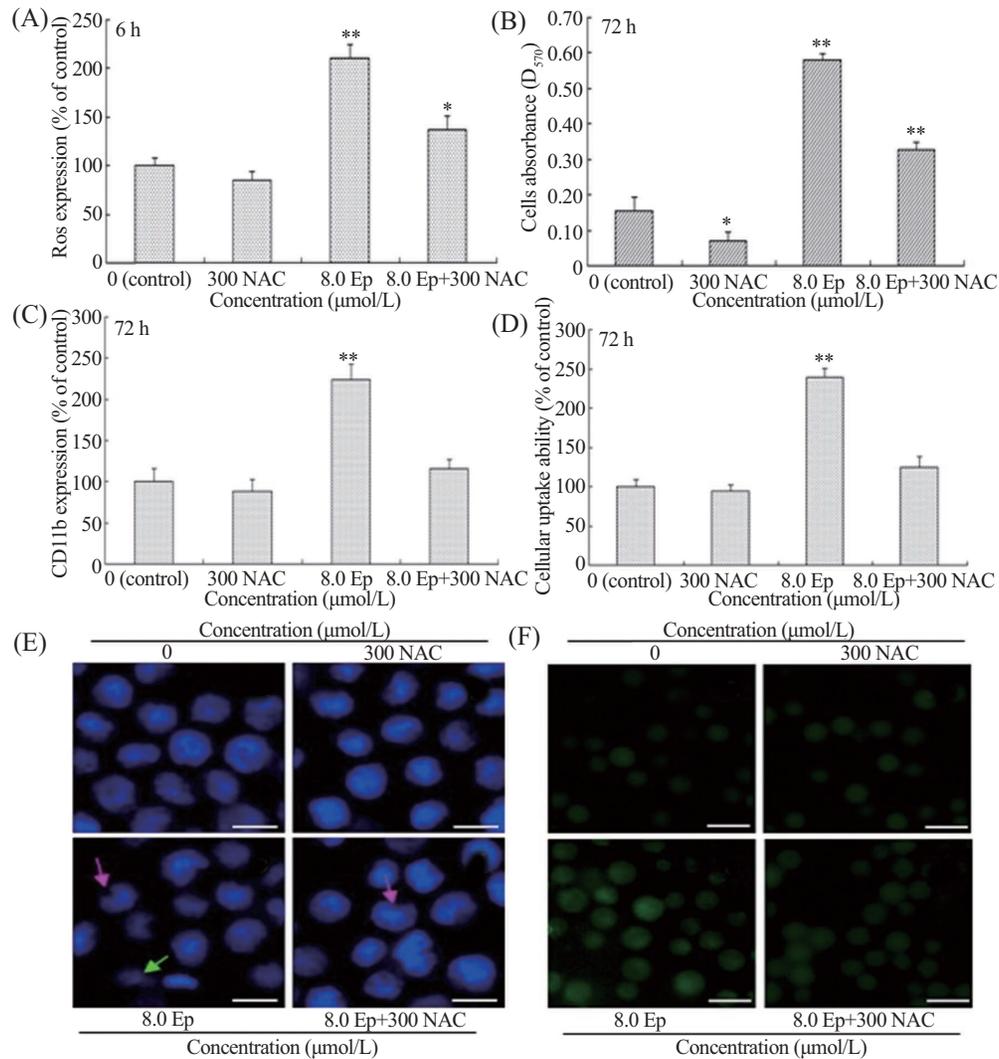


A: epinodosin及ATRA处理HL-60细胞6、12、24 h后细胞ROS水平的变化, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , 与对照组比较。B: epinodosin和ATRA处理HL-60细胞6 h后加载ROS荧光探针细胞的显微图像。标尺=150 μm。

A: changes of the ROS levels in HL-60 cells treated with 8.0 μmol/L epinodosin or 1.2 μmol/L ATRA for 6, 12, 24 h. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs control group. B: the fluorescence microscopy images of HL-60 cells treated with 8.0 μmol/L epinodosin or 1.2 μmol/L ATRA for 6 h followed by incubation with the fluorescent probe DCFH-DA. Scale bars=150 μm.

图8 Epinodosin对HL-60细胞ROS水平的影响

Fig.8 The effects of epinodosin on ROS levels in HL-60 cells

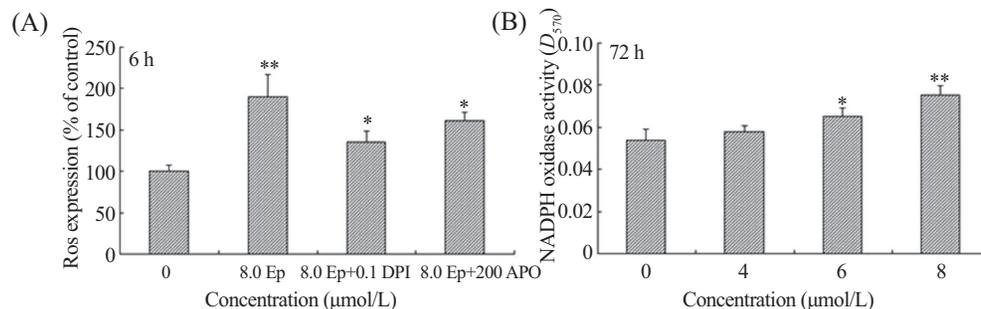


A: epinodosin联合NAC对HL-60细胞ROS水平的影响; B: epinodosin联合NAC对HL-60细胞NBT还原力的影响; C: epinodosin联合NAC对HL-60细胞CD11b表达的影响; E: epinodosin联合NAC对HL-60细胞核形态的影响, 标尺=60 μm; D,F: epinodosin联合NAC对HL-60细胞吞噬能力影响; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与对照组比较, 标尺=100 μm。Ep: epinodosin。

A: the effects of epinodosin in combination with NAC on ROS levels in HL-60 cells; B: the effects of epinodosin in combination with NAC on NBT-reducing ability of HL-60 cells; C: the effects of epinodosin in combination with NAC on the expression of CD11b in HL-60 cells; D: the morphology changes of HL-60 cells treated with epinodosin in combination with NAC, Scale bars=60 μm; D,F: the effects of epinodosin in combination with NAC on cellular uptake ability. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group. Scale bars=100 μm. Ep: epinodosin.

图9 Epinodosin联合NAC对HL-60细胞分化的影响

Fig.9 The effects of epinodosin in combination with NAC on differentiation of HL-60 cells



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与对照组比较。Ep: epinodosin。

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group. Ep: epinodosin.

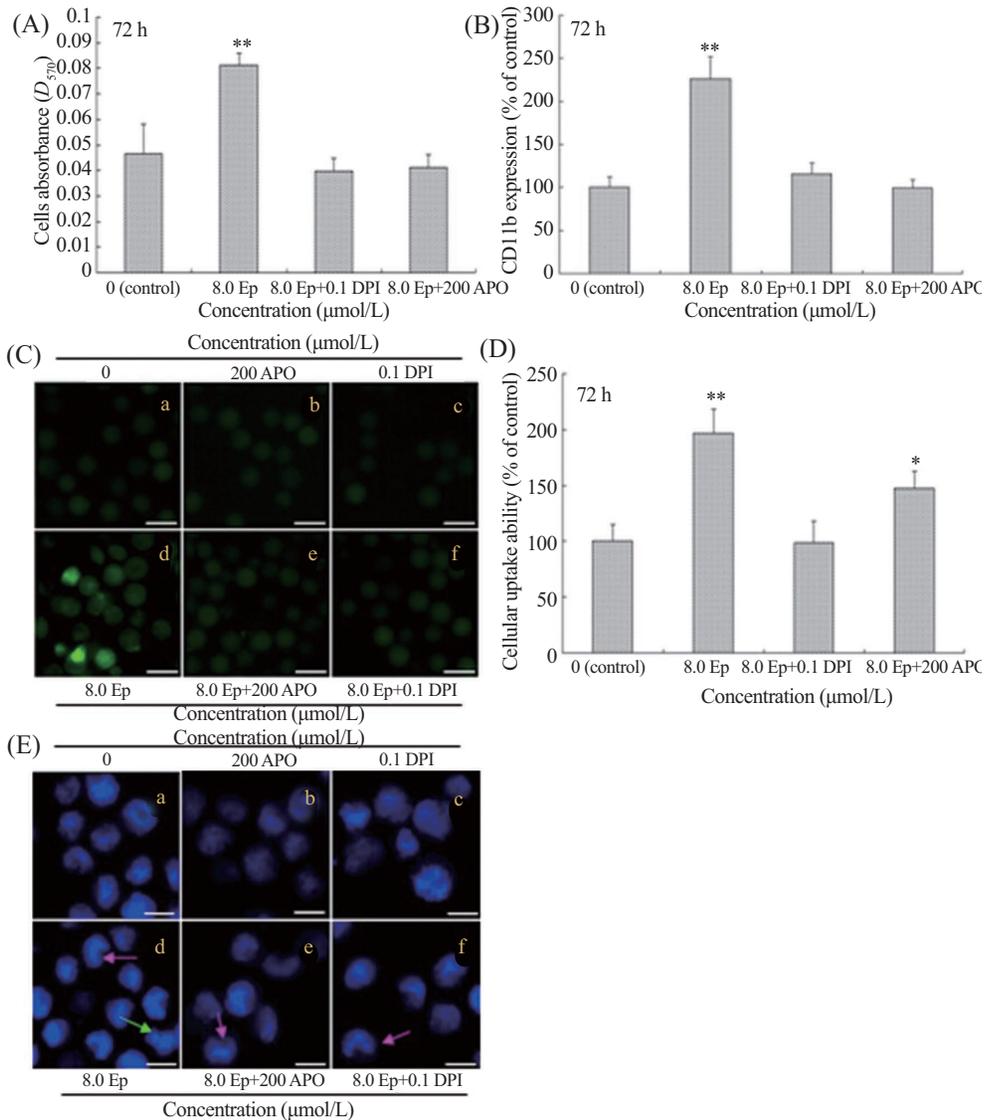
图10 Epinodosin联合APO和DPI对HL-60细胞ROS水平(A)及NADPH氧化酶活性(B)的影响

Fig.10 The effects of epinodosin in combination with APO and DPI on ROS levels (A) or the activity of NADPH oxidase (B) in HL-60 cells

2.3.2 NAC抑制epinodosin对HL-60细胞的诱导分化  
 为了进一步验证epinodosin诱导HL-60细胞的分化是否与活性氧信号相关联, 将300  $\mu\text{mol/L}$  NAC与8.0  $\mu\text{mol/L}$  epinodosin联合孵育HL-60细胞6 h或72 h后, 检测细胞ROS及CD11b的表达水平。8.0  $\mu\text{mol/L}$  epinodosin处理组的ROS浓度与对照组相比大幅度升高, 增加率为110.6%, 而8.0  $\mu\text{mol/L}$  epinodosin联合300  $\mu\text{mol/L}$  NAC处理组的ROS浓度显著低于

8.0  $\mu\text{mol/L}$  epinodosin单独处理组, 减少率为34.7%, 但高于对照组(图9A)。

如图9B~图9F所示, 8.0  $\mu\text{mol/L}$  epinodosin处理组对HL-60细胞的分化诱导作用与前面2.2.1、2.2.2、2.2.3和2.2.4中所述结果一致: 显著增加带形核或多叶核细胞数量, 增强NBT还原力和细胞吞噬力及CD11b表达量。而NAC与epinodosin联合处理组显著抑制epinodosin对HL-60细胞的分化诱导作用: 与



A: epinodosin联合APO或DPI对HL-60细胞NBT还原能力影响; B: epinodosin联合APO或DPI对HL-60细胞CD11b表达的影响; C: epinodosin联合APO或DPI处理HL-60细胞后吞噬荧光颗粒P(HPMA-FMA)的荧光显微镜图像, 标尺=100  $\mu\text{m}$ ; D: epinodosin联合APO或DPI处理HL-60细胞后的相对荧光强度; E: epinodosin联合APO或DPI对HL-60细胞核形态的影响, 标尺=50  $\mu\text{m}$ 。\* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, 与对照组比较。Ep: epinodosin。

A: the effects of epinodosin in combination with APO or DPI on NBT-reducing ability of HL-60 cells; B: the effects of epinodosin in combination with APO or DPI on the expression of CD11b in HL-60 cells; C: the fluorescence microscopy images of HL-60 cells treated with epinodosin in combination with APO or DPI for 72 h followed by incubation with the fluorescent particles P(HPMA-FMA), Scale bars=100  $\mu\text{m}$ ; D: the fluorescence intensity of HL-60 cells treated with epinodosin in combination with APO or DPI for 72 h; E: the nuclear morphology changes of HL-60 cells treated with epinodosin in combination with APO or DPI, Scale bars=50  $\mu\text{m}$ . \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01 vs control group. Ep: epinodosin.

图11 Epinodosin联合APO或DPI对HL-60细胞分化的影响

Fig.11 The effects of epinodosin in combination with APO or DPI on differentiation of HL-60 cells

8.0  $\mu\text{mol/L}$  epinodosin单独处理组相比, 联合处理组的带形核或多叶核细胞数量减少(图9E), NBT还原力减弱(图9B), 细胞吞噬力被抑制(图9D和图9F)以及CD11b表达量减少50%(图9C)。该结果提示, ROS介导了epinodosin诱导的分化作用。

## 2.4 ROS介导了epinodosin对HL-60细胞的分化诱导

**2.4.1 Epinodosin对NADPH氧化酶源性ROS水平的影响** APO和DPI为细胞质膜NADPH氧化酶活性抑制剂, 可减弱或消除由NADPH氧化酶所产生的活性氧<sup>[23]</sup>。为了判断epinodosin上调HL-60细胞内ROS水平是否源于NADPH氧化酶, 首先, 将200  $\mu\text{mol/L}$  APO和0.1  $\mu\text{mol/L}$  DPI分别与epinodosin联合处理HL-60细胞6 h, 测定细胞ROS水平, 结果如图10A所示。APO和DPI均可抑制epinodosin对HL-60细胞ROS水平的上调, 其处理细胞ROS水平与epinodosin处理组相比显示了显著性差异。进一步检测epinodosin对HL-60细胞NADPH氧化酶活性的影响, 发现6.0、8.0  $\mu\text{mol/L}$  epinodosin均可显著增强HL-60细胞NADPH氧化酶活性, 而4.0  $\mu\text{mol/L}$ 处理组与对照组相比无显著差异(图10B)。上述2项实验表明, epinodosin诱导的HL-60细胞ROS水平上调与NADPH氧化酶活性相关联。

**2.4.2 APO或DPI抑制epinodosin对HL-60细胞的分化诱导** 检测APO和DPI分别与epinodosin的联合使用对HL-60细胞分化的影响, 可进一步判断epinodosin诱导HL-60细胞分化是否与NADPH氧化酶源性活性氧信号相关联。将200  $\mu\text{mol/L}$  APO和0.1  $\mu\text{mol/L}$  DPI分别与epinodosin联合处理HL-60细胞72 h, 结果如图11所示, 与对照组相比, 8.0  $\mu\text{mol/L}$  epinodosin单独处理组对HL-60细胞具有显著的分化诱导作用(图11A~图11E), APO和DPI单独处理组对HL-60细胞无明显的分化诱导作用(数据未显示), 而APO联合epinodosin处理组均显示了明显的对epinodosin诱导分化的减弱或抑制效应; DPI亦然: 核形态变化较小(图11E), NBT还原力无显著提高(图11A), 吞噬力提升减弱或无提升作用(图11C和图11D), 并显著抑制epinodosin上调CD11b的表达, 与epinodosin单独处理组相比, APO联合epinodosin处理组以及DPI联合epinodosin处理组的平均荧光强度减少率分别达到166.2%和56.7%(图11B)。该组实验结果表明, NADPH氧化酶介导epinodosin对HL-60细胞的分化

诱导作用。

## 3 讨论

孙汉董等<sup>[24]</sup>将对映-贝壳杉烷二萜的分子骨架分为4种主要类型: C-20位未氧化型、C-20位氧化型、螺环内酯型和延命素型。香茶菜属植物冬凌草从上世纪70年代就作为抗炎和抗癌中草药使用至今, 其主要活性成份冬凌草素(oridonin)是C-20位氧化型的典型代表, 而近年来对几种C-20位未氧化型分子有较为深入的研究, 如: pharicin A、pharicin B、adenanthin和wangzaozin A, 这些分子均对AML白血病细胞具有不同作用靶点和调控途径<sup>[14,16-18,25]</sup>, 尤其是adenanthin和wangzaozin A的分化诱导作用对于新分化诱导剂的研究发现有重要启示。本研究显示, 延命素型分子epinodosin与C-20位未氧化型的adenanthin和wangzaozin A具有相似的分化诱导作用。Epinodosin在抑制生长浓度(4.0~8.0  $\mu\text{mol/L}$ )条件下对HL-60细胞有良好的分化诱导活性, 使细胞周期阻滞于S期, 肾形和分叶核细胞比率增多, 细胞NBT还原和吞噬能力显著增强以及细胞表面抗原CD11b表达上调。这些特征均表明, epinodosin可诱导HL-60细胞向成熟粒细胞分化。

HL-60细胞是可诱导细胞分化的标准模型细胞株, 不同的分化诱导剂可诱导HL-60细胞向粒细胞或单核细胞或巨噬细胞分化<sup>[26]</sup>。维甲酸(RA)、全反式维甲酸(ATRA)和DMSO是可诱导HL-60细胞向粒细胞分化的代表性化合物, 它们的诱导特性, 如核形态、NBT还原力、吞噬能力以及CD11b表达, 与正常血液的中性粒细胞完全相同, 但诱导细胞中高比率的未成熟核细胞以及较少特异性粒蛋白又显示了与正常血液中性粒细胞的重要区别<sup>[27]</sup>。本研究显示, epinodosin与所报道的RA(或ATRA)和DMSO分化诱导HL-60细胞的特性极为相似。实验中我们使用ATRA作为阳性对照, 4.0~6.0  $\mu\text{mol/L}$ 的epinodosin与1.2  $\mu\text{mol/L}$ 的ATRA的诱导活性相近, 证实了epinodosin是良好的化学分化诱导剂。

细胞骨架重组是血细胞分化过程的另一重要特征, 不同的分化诱导剂诱导细胞骨架重组, 具有相似而又不同的特点。Leung等<sup>[28]</sup>提出RA诱导HL-60的分化程度与微丝含量差异不明显, 但与微管和波形纤维组装含量成正相关, 而分化抵抗细胞株HL-60/R3响应RA诱导后组装形成的微管和波形纤维量

显著低于HL-60及其分化敏感株HL-60/S4, 这显示了微管和波形纤维对白血病细胞分化具有重要价值<sup>[28]</sup>; Olins等<sup>[22]</sup>的研究表明, 微管骨架对于RA诱导HL-60细胞形成多叶核是关键, 而微丝与细胞多叶核形态维持相关性不大。本文采用Leung等<sup>[28]</sup>的方法, 细胞在染色过程中经Triton X-100处理并进行反复冲洗后上流式细胞仪检测, 由于可溶性蛋白流失, 检出骨架成分主要为纤维状骨架<sup>[28]</sup>。显微观察发现, epinodosin和ATRA诱导HL-60细胞分化过程中, 胞内微丝骨架经历了重组过程, 24 h与72 h的细胞微丝有明显差异, 24 h微丝含量明显升高, 72 h后下降, 其含量与对照组无明显差异; 72 h检测结果与Leung等<sup>[29]</sup>报道的RA诱导HL-60/S4细胞分化的微丝变化情况相一致。epinodosin和ATRA对HL-60细胞微管骨架的影响最为明显, 处理72 h后细胞内微管束明显增多增粗, 其含量均可增至2.5倍以上, 与Leung等<sup>[28]</sup>报道的RA分化诱导可使HL-60和HL-60/S4的微管含量显著增加相一致。Shariftabrizi等<sup>[30]</sup>提出, ATRA在诱导HL-60分化过程中通过增加细胞 $\gamma$ 微管蛋白( $\gamma$ -tubulin)含量从而促进微管组织中心形成而导致微管组装加速。我们通过对 $\alpha$ 微管蛋白的免疫荧光图片观察发现, ATRA的确促进微管组织中心组装, 许多处理组细胞呈现1~2个明亮的微管组织中心(图片未显示), 但在epinodosin诱导分化过程中未见此现象, 因此, 尽管epinodosin和ATRA两者均促进微管组装, 但其触发机制却不相同。另外, epinodosin和ATRA处理组细胞的波形纤维组装也有一定增加, 这与Leung等<sup>[28]</sup>报道RA对HL-60诱导结果一致。上述结果显示, epinodosin在诱导HL-60分化过程中不仅在核形态、NBT还原力、吞噬能力以及CD11b表达方面具与临床诱导分化治疗剂ATRA有相似的作用模式, 而且epinodosin引起的3种细胞骨架重组特征与ATRA诱导的骨架重组也很相似, 但其机制可能不尽相同, 尚需进一步研究。

本文进一步探讨了epinodosin诱导上述分化过程可能的调节机制。Epinodosin引起HL-60细胞活性氧浓度升高以及抗氧化剂NCA抑制epinodosin诱导的细胞核多叶化、NBT还原和细胞吞噬力增强以及CD11b表达上调, 说明epinodosin诱导的分化作用与胞内活性氧通路相关联; 而epinodosin显著增强HL-60细胞NADPH氧化酶活性以及NADPH氧化酶的2种抑制剂APO和DPI可抑制epinodosin上调

细胞ROS水平, 还可减弱或抑制epinodosin对HL-60细胞的分化诱导作用, 这些证据表明, NADPH氧化酶直接介导了epinodosin导致的活性氧上调以及epinodosin对HL-60细胞的分化作用。

NADPH氧化酶参与epinodosin对HL-60的分化诱导作用表明, epinodosin具有与adenanthin不同的活性氧来源及靶向途径。Liu等<sup>[18]</sup>提出, adenanthin直接靶向NB4细胞Prx I和Prx II, 通过抑制其过氧化物酶活性, 升高细胞内活性氧。但没有证据显示Prx I和Prx II是adenanthin的唯一靶位点。细胞活性氧产生和清除体系的互动极为复杂, 该体系对进入细胞的有机小分子化合物的响应可能更为多维和综合。那么是否同属于对映-贝壳杉烷二萜的epinodosin也对Prx具有靶向抑制活性作用尚待研究证实。

### 参考文献 (References)

- 1 Lo-Coco F, Avvisati G, Vignetti M, Thiede C, Orlando SM, Iacobelli S, *et al.* Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med* 2013; 369(2): 111-21.
- 2 de Thé H, Le Bras M, Lallemand-Breitenbach V. The cell biology of disease: Acute promyelocytic leukemia, arsenic, and PML bodies. *J Cell Biol* 2012; 198(1): 11-21.
- 3 de Thé H, Chen Z. Acute promyelocytic leukaemia: Novel insights into the mechanisms of cure. *Nat Rev Cancer* 2010; 10(11): 775-83.
- 4 Li J, Stouffs M, Serrander L, Banfi B, Bettiol E, Charnay Y, *et al.* The NADPH oxidase NOX4 drives cardiac differentiation: Role in regulating cardiac transcription factors and MAP kinase activation. *Mol Biol Cell* 2006; 17(9): 3978-88.
- 5 Lawless MW, O'Byrne KJ, Gray SG. Targeting oxidative stress in cancer. *Expert Opin Ther Tar* 2010; 14(11): 1225-45.
- 6 Ye ZW, Zhang J, Townsend DM, Tew KD. Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta* 2015; 1850(8): 1607-21.
- 7 Guichard C, Pedruzzi E, Fay M, Ben Mkaddem S, Coant N, Daniel F, *et al.* The Nox/Duox family of ROS-generating NADPH oxidases. *Med Sci* 2006; 22(11): 953-9.
- 8 George AL, Bangalore-Prakash P, Rajoria S, Suriano R, Shanmugam A, Mittelman A, *et al.* Endothelial progenitor cell biology in disease and tissue regeneration. *J Hematol Oncol* 2011; 4(1): 24-31.
- 9 Murray TV, Smyrniak I, Shah AM, Brewer AC. NADPH oxidase 4 regulates card-iomyocyte differentiation via redox activation of c-Jun protein and the cis-regulation of GATA-4 gene transcription. *J Biol Chem* 2013; 288(22): 15745-59.
- 10 Chen N, Chen H, Yao Y, Zhang B, Zheng QS. A critical role of redox state in determining HL-60 cell differentiation. *Proc Environ Sci* 2011; 8: 653-660.
- 11 Chen H, Zhang B, Yao Y, Chen N, Chen X, Tian H, *et al.* NADPH oxidase-derived reactive oxygen species are involved in the HL-60 cell monocytic differentiation induced by

- isoliquiritigenin. *Molecules* 2012; 17(11): 13424-38.
- 12 Chen H, Zhang B, Yuan X, Yao Y, Zhao H, Sun XL, *et al.* Isoliquiritigenin-induced effects on Nrf2 mediated antioxidant defence in the HL-60 cell monocytic differentiation. *Cell Biol Int* 2013; 37(11): 1215-24.
- 13 Lin C, Wang H. NADPH oxidase is involved in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced differentiation of human promyelocytic leukaemia HL-60 cells. *Cell Biol Int* 2012; 36(4): 391-5.
- 14 丁 兰, 陈祎平, 刘国安, 吴炎鹏. Wangzaozin A调节NADPH氧化酶源性活性氧诱导HL-60细胞分化. *华中师范大学学报(自然科学版)*[Ding Lan, Chen Yiping, Liu Guoan, Wu Yanpeng. Wangzaozin A regulates NADPH oxidase-derived reactive oxygen species to induce the differentiation of HL-60 cells. *Journal of Central China Normal University (Natural Science)* 2015; 49(2): 1-9.
- 15 Zhou GB, Kang H, Wang L, Gao L, Liu P, Xie J, *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): 3441-50.
- 16 Gu ZM, Wu YL, Zhou MY, Liu CX, Xu HZ, Yan H, *et al.* Pharinic B stabilizes retinoic acid receptor-alpha and presents synergistic differentiation induction with ATRA in myeloid leukemic cells. *Blood* 2010; 116(24): 5289-97.
- 17 Xu HZ, Huang Y, Wu YL, Zhao Y, Xiao WL, Lin QS, *et al.* Pharinic A, a novel natural ent-kaurene diterpenoid, induces mitotic arrest and mitotic catastrophe of cancer cells by interfering with BubR1 function. *Cell Cycle* 2010; 9(14): 2897-907.
- 18 Liu CX, Yin QQ, Zhou HC, Wu YL, Pu JX, Xia L, *et al.* Adenanthin targets peroxire-doxin I and II to induce differentiation of leukemic cells. *Nat Chem Biol* 2012; 8(5): 486-93.
- 19 Sun HD, Huang SX, Han QB. Diterpenoids from *Isodon* species and their biological activities. *Nat Prod Rep* 2006; 23(5): 673-98.
- 20 吴炎鹏, 许卫兵, 孔花青, 何 苗, 丁 兰, 刘国安. P(HPMA+FMA)荧光探针制备、细胞毒性评估及细胞吞噬示踪检测. *功能高分子学报*(Wu Yanpeng, Xu Weibing, Kong Huaqing, He Miao, Ding Lan, Liu Guoan. P(HPMA-FMA) preparation of fluorescent probes, cell toxicity assessment and detection of phagocytic tracer. *Journal of Functional Polymers* 2014; 1: 92-8.
- 21 丁 兰, 景宏伟, 王 涛, 李 静, 马 超, 张国星, 等. 甘肃产毛叶香茶菜二萜成分及其化感潜能评估. *西北师范大学学报* (Ding Lan, Jing Hongwei, Wang Tao, Li Jin, Ma Chao, Zhang Guoxing, *et al.* Chemical constituents and all elopathic potential of *Isodo ponica* (Burman f.) Hara. *Journal of Northwest Normal University*) 2010; 46(2): 88-93.
- 22 Olins AL, Olins DE. Cytoskeletal influences on nuclear shape in granulocytic HL-60 cells. *BMC Cell Biol* 2004; 5(1): 30.
- 23 Yang CM, Lee IT, Hsu RC, Chi PL, Hsiao LD. NADPH oxidase/ROS-dependent PYK2 activation is involved in TNF- $\alpha$ -induced matrix metalloproteinase-9 expression in rat heart-derived H9c2 cells. *Toxicol Appl Pharm* 2013; 272(2): 431-42.
- 24 孙汉董, 许云龙, 姜 北. 香茶菜属植物二萜化合物. 北京: 科学出版社, 2001.
- 25 丁 兰, 第五佳丽, 田继东, 柳志军, 杨 玲, 刘国安, 等. 对映-贝壳杉烷型二萜化合物Wangzaozin A对人早幼粒白血病HL-60细胞生长抑制和凋亡诱导的作用. *第三军医大学学报* (Ding Lan, Diwu Jiali, Tian Jidong, Liu Zhijun, Yang lin, Liu Guoan, *et al.* Effect of Wangzaozin A, an ent-kaurene diterpene, on anti-proliferation and apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Journal of Third Military Medical University*) 2013; 35(8): 727-32.
- 26 Yen A. HL-60 cells as a model of growth control and differentiation: the significance of variant cells. *Hem Rev Com* 1990; 4: 5-46.
- 27 Olins AL, Herrmann H, Lichter P, Olins DE. Retinoic acid differentiation of HL-60 cells promotes cytoskeletal polarization. *Exp Cell Res* 2000; 254(1): 130-42.
- 28 Leung MF, Sokoloski JA, Sartorelli AC. Changes in microtubules, microtubule associated proteins, and intermediate filaments during the differentiation of HL-60 leukemia cells. *Cancer Res* 1992; 52(4): 949-54.
- 29 Leung MF, Lin TS, Sartorelli AC. Changes in actin and actin-binding proteins during the differentiation of HL-60 leukemia cells. *Cancer Res* 1992; 52(11): 3063-6.
- 30 Shariftabrizi A, Ahmadian S, Pazhang Y. Dynamics of  $\gamma$ -tubulin cytoskeleton in HL-60 leukemia cells undergoing differentiation and apoptosis by all-trans retinoic acid. *Mol Med Rep* 2012; 5(2): 545-51.