

人 β 防御素-1 联合冬凌草甲素对膀胱癌 T24 细胞生长抑制作用的研究

温鹏路¹, 马 亮², 葛光炬², 余大敏²

(1. 浙江省肿瘤医院, 浙江 杭州 310022;

2. 浙江大学医学院附属邵逸夫医院, 浙江 杭州 310016)

摘 要: [目的] 探讨人 β 防御素-1 联合冬凌草甲素对膀胱癌 T24 细胞的生长抑制作用及机制。[方法] 以不同浓度的 β 防御素-1、冬凌草甲素单独或联合作用于体外培养的 T24 细胞, MTT 法检测细胞生长抑制率, 应用 Hoechst 33258 荧光染色法以流式细胞仪观察细胞凋亡, 显微镜下观察细胞的形态学变化。[结果] 人 β 防御素-1 及冬凌草甲素均可抑制 T24 细胞的生长, 引起 T24 细胞溶解坏死, 并呈现明显的浓度—效应与时间—效应关系。[结论] 人 β 防御素-1、冬凌草甲素均对膀胱癌具有明显的体外抗肿瘤作用, 两者联合能对膀胱癌细胞起协同杀伤作用, 杀伤机制以细胞毒性作用为主。

关键词: β 防御素-1; 冬凌草甲素; 膀胱肿瘤; 细胞毒性

中图分类号: R737.14 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2014)12-1006-06

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2014.12.B008

Inhibition Effect of Human Beta-defensin-1 Combined with Oridonin on Bladder Cancer T24 Cell

WEN Peng-lu¹, MA Liang², GE Guang-ju², et al.

(1. Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China; 2. Sir Run Run Shaw Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310016, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the inhibitory effect of human beta-defensin-1 combined with oridonin on bladder cancer T24 cells and its mechanism. [Methods] Different concentrations of human beta-defensin-1 and oridonin were added in culture medium. The inhibitory rate of T24 cells was measured by MTT assay, cell apoptosis was observed by flowcytometry (FCM) and Hoechst 33258 fluorescence staining. Cell morphology was observed by microscopy. [Results] Human beta-defensin-1 combined with oridonin inhibited the growth of T24 cells and induced cell cytotoxicity significantly. The suppression was both in a time- and dose-dependent manner. [Conclusion] Human beta-defensin-1 combined with oridonin has inhibitory effect on bladder cancer T24 cell in vitro, which might be associated with the cell cytotoxicity.

Subject words: human beta-defensin-1; oridonin; bladder neoplasms; cytotoxicity

防御素是广泛存在于动物体内的阳离子多肽, 具有抗菌、真菌、病毒及杀伤肿瘤细胞等多功能效应。目前研究提示 β 防御素-1 (human beta-defensin-1, h β D-1) 在泌尿系统肿瘤及周围组织中的表达有特异性的改变^[1], 并可抑制泌尿系统肿瘤生长^[2]。冬凌草甲素 (oridonin) 是从唇形科 (Labtea) 香茶菜属

(Rabdosia) 植物中分离出的一种四环二萜类天然有机化合物。许多研究表明它具有较强的抗肿瘤活性^[3,4], 常被用在食管癌和肝癌的临床治疗上, 并取得良好的疗效, 且无明显不良反应^[5,6]。本实验以膀胱癌 T24 细胞为材料, 研究不同浓度 h β D-1 联合冬凌草甲素对膀胱癌细胞的生长抑制及凋亡诱导作用, 旨在探讨 h β D-1 体外抗膀胱癌的作用及其机制, 并研究 h β D-1 联合冬凌草甲素在体外对膀胱癌细胞是否具有协同杀伤作用, 为 h β D-1 应用于膀胱癌术后复发的临床治疗提供理论依据。

基金项目: 浙江省中医药科技计划项目 (2007CA064)

通讯作者: 余大敏, 主任医师, 博士; 浙江大学医学院附属邵逸夫医院 泌尿外科, 浙江省杭州市庆春路 3 号 (310016); E-mail: lyudamin@163.com

收稿日期: 2014-08-19; **修回日期:** 2014-10-21

1 材料与方法

1.1 细胞培养及处理

人膀胱癌细胞株 T24 购自中国科学院上海细胞生物研究所。T24 细胞接种于含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中, 在 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养, 每 1~2d 换液 1 次, 取对数生长期的细胞进行实验。先予以人 hβD-1 (浓度为 10、20、40、80 μg/ml) 及冬凌草甲素 (浓度为 8、16、32、64 μmol/L) 分别干预细胞 12、24、48h, 再将两药物组合 (10 μg/ml+8 μmol/L, 20 μg/ml+16 μmol/L, 40 μg/ml+32 μmol/L, 80 μg/ml+64 μmol/L) 共同干预细胞 12、24、48h。不含药物的 0.1% DMSO 培养液为对照孔, 以不加细胞只加 0.1% DMSO 培养液和药物为空白孔。

1.2 试剂与仪器

重组人 β-防御素-1/47a.a (纯度>98%) 购自美国 PeproTech 公司。冬凌草甲素 (纯度>95%) 购自杭州华东医药集团康润制药有限公司。RPMI 1640 培养液购自杭州吉诺生物医药技术有限公司。小牛血清购自杭州四季青生物制品厂。Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit(K101-100) 购自美国 Bivision 公司。Hoechst33258 荧光染液为 Sigma 公司产品。

仪器包括超净工作台、CO₂ 细胞培养箱、倒置相差显微镜 (日本 Olympus 公司)、平板离心机、96 孔培养板 (美国 BDFalcon 公司产品)、EPICS XL 型流式细胞仪 (美国 BeckmanCoulter 公司)、普通及超低温水箱、电热恒温干燥箱、微量移液器等。

1.3 实验方法

1.3.1 MTT 法检测不同药物浓度 hβD-1 及冬凌草甲素对膀胱癌细胞生长的影响

采用噻唑蓝 (MTT) 还原法进行检测。取对数生长期 T24 细胞, 接种于 96 孔培养板 (每孔接种约 5×10³ 个细胞), 培养 10h 后, 以分别加入 4 种浓度 hβD-1、冬凌草甲素 (溶于 0.1% 的二甲基亚砷) 和 hβD-1+冬凌草甲素为处理孔, 以加不含药物的 0.1% DMSO 培养液为对照孔, 以不加细胞只加 0.1% DMSO 培养液和药物为空白孔; 设 4 个复孔。于 37℃、5%CO₂ 条件下继续培养 12、24、48h 后, 每孔分别加入 5mg/ml 的 MTT 溶液 20 μl, 再继续培养 4h 后取出, 离心后吸去上清液, 每孔加入 150 μl DMSO 溶解, 振荡混匀 (约 5min), 显微镜下观察着色颗粒消失后, 在 20min 内

以 570nm 为检测波长, 630nm 为参考波长, 测定吸光度 (A) 值, 计算细胞生长抑制率。

$$\text{细胞生长抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{处理}}) / A_{\text{对照}} \times 100\%$$

1.3.2 细胞凋亡率检测

按 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒说明书, 收集 4 种浓度 hβD-1 和冬凌草甲素分别处理 12、24、48h 后的 T24 细胞, 分别悬浮在 500 μl 染色缓冲液中, 再各加 5 μl Annexin V-FITC 及 IPI 溶液, 黑暗条件下室温放置 5min 后, 上机检测细胞凋亡率。

1.3.3 细胞形态学观察

收集 4 种浓度 hβD-1 和冬凌草甲素处理 48h 后的 T24 细胞, 涂片待干燥后, 用 40g/L 的甲醛液固定 10min, 蒸馏水洗片 2 次, 室温下晾干, 然后用 5mg/L 的 Hoechst33258 染液染色, 在荧光显微镜下观察细胞形态学改变。

1.4 统计学处理

采用 SPSS16.0 统计软件, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用方差分析, 组间两两比较采用 *q* 检验, 以 *P* < 0.05 为有统计学差异。

2 结果

2.1 hβD-1 对 T24 细胞生长的抑制情况

hβD-1 对膀胱癌 T24 细胞株增殖抑制作用明显, 其中 10~80 μg/ml 在 12、24、48h 后均可抑制细胞增殖 (*P* < 0.01)。相对抑制率 (IR) 表明 hβD-1 的抑制作用显示出浓度依赖效应, 4 种浓度 hβD-1 组内各时点抑制率比较结果显示, 12h 与 24h 间的差异均有统计学意义 (*P* < 0.05), 24 与 48h 之间的比较除 20 μg/ml 组存在统计学差异外 (*P* < 0.05), 其他各浓度组差异均无统计学意义 (*P* > 0.05) (Table 1, Figure 1)。提示 hβD-1 对 T24 细胞的抑制作用有浓度依赖性, 而抑制作用的提高在 24h 后减缓。

2.2 冬凌草甲素对 T24 细胞生长的抑制情况

冬凌草甲素对 T24 细胞生长的抑制作用也随着浓度和作用时间的增加而逐渐升高, 具有明显的时效和量效关系。4 种浓度冬凌草甲素组内各时点之间比较, 均存在统计学差异 (*P* < 0.05) (Table 2, Figure 2)。

2.3 hβD-1 对 T24 细胞凋亡诱导作用

4 种浓度 hβD-1 组均可导致 T24 细胞凋亡率上

Table 1 The inhibition rates of hβD-1 on the growth of T24 cells

Concentrations (μg/ml)	Inhibition rate (%)		
	12h	24h	48h
10	6.28±0.37	13.23±1.10	17.58±1.39
20	17.33±1.05	23.81±1.53	27.72±2.36
40	30.24±1.25	57.92±2.83	63.18±4.88
80	42.61±1.81	76.58±3.32	81.27±5.44

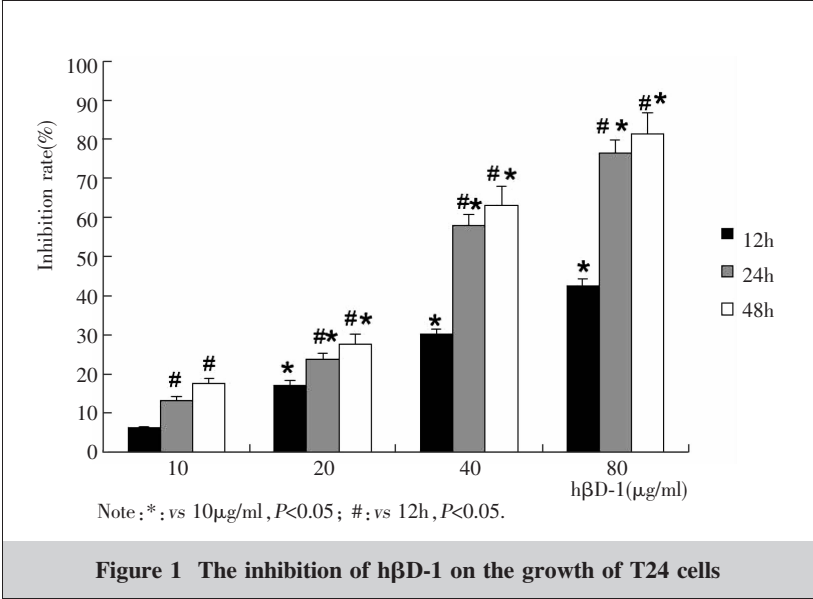
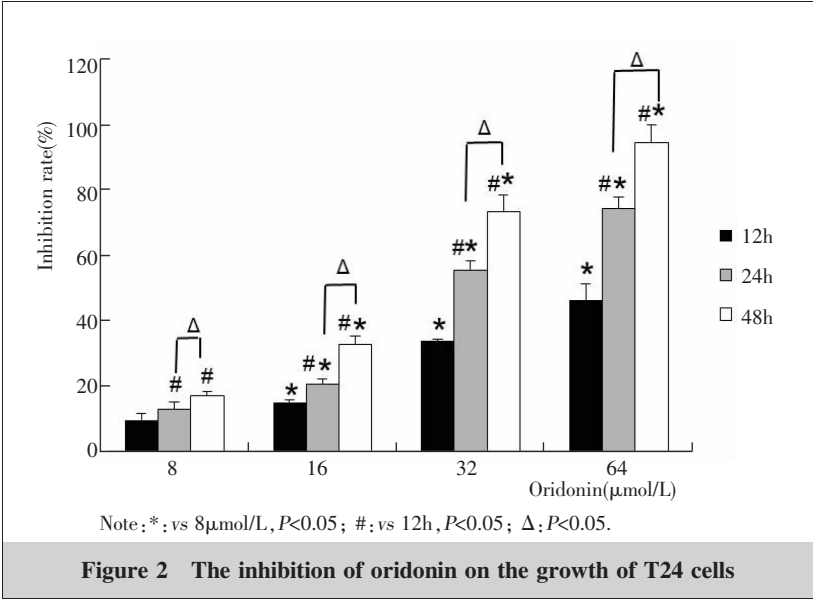


Table 2 The inhibition rates of oridonin on the growth of T24 cells

Concentration (μmol/L)	Inhibition rate (%)		
	12h	24h	48h
8	9.64±1.80	12.86±2.16	16.92±1.39
16	14.97±0.72	20.63±1.53	32.85±2.36
32	33.69±0.56	55.57±2.83	73.48±4.88
64	46.28±4.91	74.43±3.32	94.49±5.44



升但幅度不大，并随药物浓度的上升凋亡率上升。组内各时点诱导 T24 细胞凋亡率比较结果显示，各浓度组 12h 与 24h 间的差异均有统计学意义 ($P<0.01$)，而 24h 与 48h 间的差异无明显统计学意义 ($P>0.05$)(Table 3, Figure 3)。

2.4 冬凌草甲素对 T24 细胞凋亡诱导作用

4 种浓度组冬凌草甲素均可导致 T24 细胞凋亡，并随药物浓度的上升凋亡率上升。组内各时点诱导 T24 细胞凋亡率比较结果显示，各浓度组 12h 与 24h 间、24 与 48 间的差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。32、64μmol/L 冬凌草甲素诱导 T24 细胞凋亡作用在统计学分析上无明显差异 ($P>0.05$)。32μmol/L 冬凌草甲素作用 48h 后凋亡率最高，达 61.8%(Table 4, Figure 4)。

2.5 hβD-1 联合冬凌草甲素对 T24 细胞凋亡诱导作用

4 种浓度的 hβD-1 联合冬凌草甲素作用后，导致 T24 细胞凋亡率的上升，与单一使用 hβD-1 或冬凌草甲素的凋亡率相比，均存在统计学差异 ($P<0.05$)，也呈现浓度、时间相关性。组内各时点诱导 T24 细胞凋亡率比较结果显示，各浓度组 12h 与 24h、24h 与 48h 之间的差异均有统计学意义 ($P<0.05$)(Table 5, Figure 5)。

2.6 hβD-1 诱导 T24 细胞形态学改变

各浓度 hβD-1 和冬凌草甲素处理组 T24 细胞形态均发生变化。细胞经 Hoechst 33258 染色后，T24 细胞表现为细胞肿大，体积增大，细胞边界模糊不清，胞质疏松，其内可见弥漫分布而大小不一空泡，出现细胞溶解现象，且随着 hβD-1 和冬凌草甲素浓度增高凋亡细胞数量增

Table 3 Apoptosis of T24 cells induced by hβD-1

Concentration (μg/ml)	Apoptosis rate (%)		
	12h	24h	48h
10	1.23±0.09	1.64±0.11	1.87±0.23
20	2.31±0.12	3.45±0.37	3.91±0.54
40	3.23±0.26	4.79±0.21	5.24±0.32
80	5.12±0.35	6.88±0.27	7.23±0.49

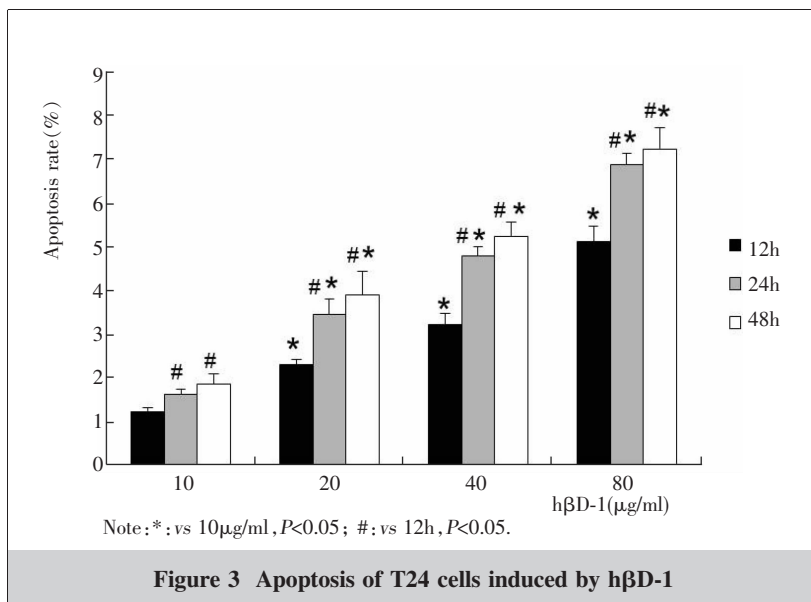


Figure 3 Apoptosis of T24 cells induced by hβD-1

Table 4 Apoptosis of T24 cells induced by oridonin

Concentration (μmol/L)	Apoptosis rate (%)		
	12h	24h	48h
8	3.87±0.40	5.23±1.15	7.53±0.55
16	6.33±0.55	13.47±1.43	22.43±0.65
32	15.23±0.75	31.87±5.05	61.80±5.22
64	19.73±2.40	46.67±0.75	50.93±1.80

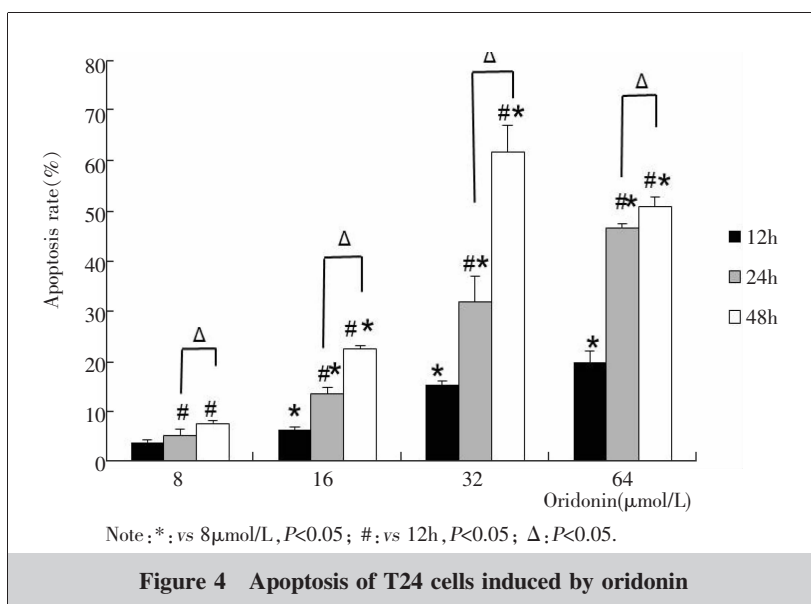


Figure 4 Apoptosis of T24 cells induced by oridonin

多。但经冬凌草甲素处理后的细胞, 凋亡出现的机率比 hβD-1 处理后的细胞高。80μg/ml hβD-1 处理组在染色图片上可见约 70% 细胞出现上述变化。少部分 T24 细胞核内染色质浓缩, 聚集在核膜边缘或贴近核膜, 部分核膜崩解, 染色质断裂呈分叶状或形成粗细不均的碎块并相互分离, 表现出细胞凋亡的典型变化。未经药物处理的 T24 细胞在各个时间段细胞核染色始终均匀, 未观察到细胞凋亡发生。

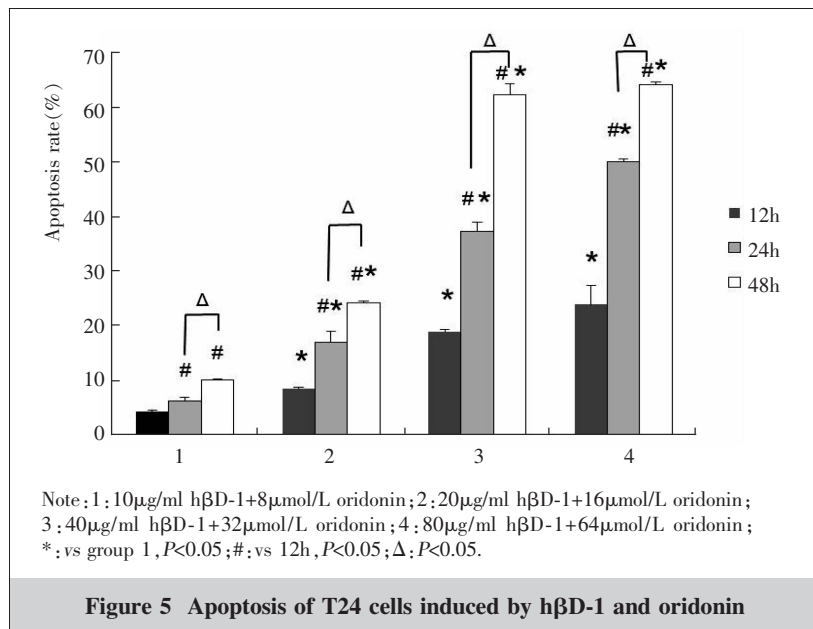
3 讨论

膀胱移行细胞癌 (bladder transitional cell carcinoma, BTCC) 是我国泌尿系统最常见的恶性肿瘤, 术后易复发, 目前多以化疗药物或卡介苗膀胱灌注预防复发, 但复发率仍比较高, 且常有尿路刺激症状、尿道狭窄、白细胞下降、肝功能损伤、感染结核等不良反应。因此, 迫切需要通过研究寻找高效、低毒抗癌药物或佐剂, 来提高膀胱癌的疗效并降低不良反应的发生。

防御素是近年来发现的一类广泛存在于动物体内的阳离子多肽, 它具有抗菌、真菌、螺旋体和部分带囊膜病毒及杀伤肿瘤细胞等多功能效应, 在解决细菌耐药、抗病毒、调节机体的免疫功能及抗肿瘤方面有重要作用, 并且一般不产生耐药性。β 防御素-1 (hβD-1) 是 Bensch 等^[7]1995 年在肾功能衰竭患者的血液透析液中发现的, 其编码基因位于 8 号染色体的短臂上, 而 8 号染色体短臂上的基因突变是膀胱癌、前列腺癌、肾癌中常见的基因变异^[8]。目前的研究表明, β-防御素在皮肤、支气管和泌尿生殖道的上皮细胞有较

Table 5 Apoptosis of T24 cells induced by hβD-1 and oridonin

hβD-1 (μg/ml)	Oridonin (μmol/L)	Apoptosis rate (%)		
		12h	24h	48h
10	8	4.23±0.34	6.15±0.74	10.02±0.17
20	16	8.52±0.12	16.89±2.04	24.18±0.31
40	32	18.93±0.40	37.19±1.75	62.24±2.12
80	64	23.87±3.42	50.10±0.49	64.07±0.59

**Figure 5 Apoptosis of T24 cells induced by hβD-1 and oridonin**

高的表达。因此可以推测 β 防御素在泌尿生殖系统肿瘤的发生发展中存在一定的作用。Donald 等^[1]最早发现在 90% 的肾细胞癌和 82% 的前列腺癌中 hβD-1 特异性的表达缺失,而在与肿瘤相邻的正常组织中, hβD-1 却呈现高表达。Sun 等^[2]在对大量前列腺癌组织和肾癌组织分析后得出结论: hβD-1 的启动子变异是引起 hβD-1 在这些组织中呈现低表达的原因之一。而在 hβD-1 对泌尿系肿瘤细胞系的作用研究后发现,重组 hβD-1 能抑制膀胱癌细胞系(TSU-Pr1)的细胞增殖。目前,已分离鉴定了 500 多种防御素,其中有 18 种防御素的抗肿瘤活性得到了证实^[9]。而且有研究表明,在相同剂量下,防御素只能杀死肿瘤细胞,对正常细胞无不良反应^[10]。

冬凌草甲素对 EAC、HAC、S180、P388 及 L1210 等多种移植性肿瘤均具有明显的抑制作用^[11],其对实体瘤的治疗目前已广泛应用于临床,并且均取得了明显的临床疗效。研究表明冬凌草甲素的抗癌作用可能与降低肿瘤细胞的钠泵转运活性、抗突变作用及增强其他抗肿瘤药物的疗效有关^[12-14]。实验证

明,冬凌草甲素对膀胱癌 T24 细胞敏感,其杀伤作用效能与剂量呈正相关,与作用时间呈正相关^[15,16]。不同浓度的冬凌草甲素在不同时间内均可诱导膀胱癌 T24 细胞产生凋亡,膀胱癌 T24 细胞凋亡效能呈剂量依赖性和时间依赖性,当冬凌草甲素作用浓度为 32μmol/L,作用时间 48h 时可稳定诱导 T24 细胞凋亡的高峰,凋亡率达 61.8%。细胞抗凋亡机制与肿瘤的发生发展等生物学行为密切相关,这也是许多化疗药物通过诱导癌细胞凋亡产生抗癌作用的机制。

本实验结果显示, hβD-1 及冬凌草甲素对膀胱癌 T24 细胞生长有明显的抑制作用,其作用均呈现明显的浓度依赖性。各 hβD-1 浓度组的 12h 和 24h 两个时点之间,对 T24 细胞抑制作用作用的增强明显,而 24h 和 48h 两个时点之间,对 T24 细胞抑制作用的提升趋势减缓,差异无明显统计学意义。提示 hβD-1 在作用 24h

后,对 T24 细胞的抑制作用逐渐达到了一个平台期,这可能与纯化 hβD-1 的药物降解等因素有关。在诱导膀胱癌细胞凋亡方面,32μmol/L 冬凌草甲素作用 48h 后凋亡率最高,为 61.8%;这可能是 8、16μmol/L 冬凌草甲素由于浓度低诱导凋亡作用较弱,而 64μmol/L 由于浓度过高除诱导细胞凋亡外还引起细胞坏死。另外 hβD-1 诱导 T24 细胞凋亡的作用虽有统计学意义,但作用比较小,这与防御素对肿瘤细胞的生长抑制机制主要为细胞毒性作用有关。

从细胞形态学上看 hβD-1 对膀胱癌 T24 细胞的抑制以细胞裂解为主,伴有少量的细胞凋亡。研究证明,β 防御素通过其双亲 α 双螺旋上的正电荷与胞膜磷脂分子上的负电荷之间的静电吸引而结合,而后防御素的疏水端(酰胺基)插入疏水的胞膜中央,双亲的 α 双螺旋留在胞膜的表面,打乱了胞膜上蛋白质和脂质的原有秩序,使膜外正电荷增多,导致了膜的去极化,由于其 α 双螺旋的亲水、疏水特性,防御素分子可以相互聚集形成孔道,细胞渗透压丧失,使胞膜异化、破裂,细胞器变形,内容物外泄,

最终导致细胞的死亡。

我们的研究表明冬凌草甲素抗肿瘤作用主要通过诱导肿瘤细胞凋亡、抑制细胞周期进而抑制肿瘤生长,而 h β D-1 主要通过裂解细胞膜结构而杀伤肿瘤细胞。两者联合可对肿瘤细胞起到协同杀伤作用,有望成为一种新的治疗手段应用到膀胱癌复发的治疗中。当然,目前很多作用机制还尚未清楚,体内实验和临床实验目前仍未见报道,药理药效方面的研究有待加强,我们将对此作更加深入的研究。

参考文献:

- [1] Donald CD, Sun CQ, Lim SD, et al. Cancer-specific loss of β -defensin 1 in renal and prostatic carcinomas[J]. Lab Invest, 2003, 83(4):501-505.
- [2] Sun CQ, Arndt R, Fernandez-Golarz C, et al. Human B-defensin-1, a potential chromosome 8p tumor suppressor: control of transcription and induction of apoptosis in renal cell carcinoma [J]. Cancer Res, 2006, 66(17):8542-8549.
- [3] Fujita T, Takeda Y, Sun HD, et al. Cytotoxic and anti-tumor activities of Radosia diterpenoids[J]. Planta Med, 1988, 54(5):414-417.
- [4] Zhang CL, Wu LJ, Tashiro S, et al. Oridonin induced apoptosis HeLa cell via altering expression of Bcl-2/Bax and activating caspase-3/ICAD pathway[J]. Acta Pharmacol Sin, 2004, 25(5):691-698.
- [5] Feng CW, Pan XL, Zou JH, et al. Oridonin inhibit human leukemia K562 cells growth [J]. Journal of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, 2000, 24(3):225-226.[冯长伟,潘祥林,邹俊晖,等.冬凌草早素对人白血病细胞系 K562 细胞生长的抑制作用[J]. 山东中医药大学学报, 2000, 24(3):225-226.]
- [6] Wang RL, Wang LX. The clinical efficacy results of rubescence in the treatment for 95 cases of esophageal cancer and gastric cardia carcinoma [J]. Cancer Research on Prevention and Treatment, 1984, 11(2):86-87.[王瑞林,王留兴.冬凌草治疗食管癌、贲门癌 95 例临床疗效结果[J]. 肿瘤防治研究, 1984, 11(2):86-87.]
- [7] Bensch KW, Raida M, Mägert HJ, et al. h β D-1: a novel beta-defensin from human plasma[J]. FEBS Lett, 1995, 368(2):331-335.
- [8] Wu SQ, Hafez GR, Zhang J, et al. Identification of the prostate cancer micro-foci with chromosome 8p deletion at the tumor interface area by histopathological-FISH parallel examination [J]. Int J Oncol, 2001, 19(6):1143-1147.
- [9] Ma XT, Xu B, An LL, et al. Vaccine with β -defensin-2 transduced leukemic cells activates innate and adaptive immunity to elicit potent antileukemia responses[J]. Cancer Res, 2006, 66(2):1169-1176.
- [10] Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, et al. β -defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6 [J]. Science, 1999, 286(5439):525-528.
- [11] Wang MY, Zhang ZM. Oridonin explore the mechanism of action of several M-phase tumor cells[J]. Chinese Journal of Cancer, 1984, 8(2):84-85.[王绵英,张覃沐.冬凌草甲素对几种肿瘤细胞 M 期作用机制的探讨[J]. 癌症, 1984, 8(2):84-85.]
- [12] Yang SL, Han SY, Zhang Q, et al. Study on the antitumor of oridonin[J]. Carcinog Teratog Mutag, 2001, 13(1):8-10.
- [13] Yang SL, Zhang Q, Song AY, et al. The effect of oridonin on UDS in the primary cells of the lung and liver in rat [J]. Journal of Henan Medical University, 2001, 36(4):415-418.[杨胜利,张巧,宋爱云,等.冬凌草早素对大鼠肺及肝原代细胞非程序 DNA 合成的影响 [J]. 河南医科大学学报, 2001, 36(4):415-418.]
- [14] Wu KM, Zhang ZL, Wang QD, et al. Oridonin affect sodium pump activity against tumor cells[J]. Cancer Research on Prevention and Treatment, 1994, 21(4):208.[吴孔明,张覃林,王庆端,等.冬凌草甲素对肿瘤细胞钠泵活性的影响[J]. 肿瘤防治研究, 1994, 21(4):208.]
- [15] Zhang CL, Wu LJ, Zuo HJ, et al. Oridonin-induced A375-S2 cell apoptosis through mitochondrial pathway[J]. Chinese Herbal Medicines, 2004, 35(4):423-426.[张春玲,吴立军,左海军,等.冬凌草早素通过线粒体途径诱导人黑色素瘤 A375-S2 细胞凋亡[J]. 中草药, 2004, 35(4):423-426.]
- [16] Liu JJ, Li Q, Pan XL, et al. Apoptotic effect of oridonin on NB4 cells and its mechanism[J]. Chinese Herbal Medicines, 2005, 36(8):1188-1193.[刘加军,李桥,潘祥林,等.冬凌草早素对白血病 NB4 细胞的诱导凋亡作用及其机制[J]. 中草药, 2005, 36(8):1188-1193.]