

汉防己甲素对人多发性骨髓瘤干细胞增殖、 凋亡的影响及机制

李浩亮^{1*}, 王西彬¹, 左瑞婷¹, 王新立¹, 李俊辉²

(1. 河南省中医院, 郑州 450000; 2. 河南省骨科医院, 郑州 450000)

[摘要] 目的:研究汉防己甲素对人多发性骨髓瘤干细胞 CD138⁻ B 细胞增殖、凋亡的影响及作用机制。方法:利用 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)比色法检测汉防己甲素对 CD138⁻ B 细胞增殖的影响;应用流式细胞仪检测汉防己甲素对 CD138⁻ B 细胞周期的影响以及药物诱导细胞凋亡的作用;应用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测汉防己甲素对 CD138⁻ B 细胞中裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶(cleaved-Caspase)-3, cleaved-Caspase-9 蛋白表达的影响。结果:与空白组及溶剂组比较,10,20,30,40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 汉防己甲素处理 6,12,24 h 对 CD138⁻ B 细胞的增殖均具有显著的抑制作用($P < 0.01$);与空白组及溶剂组比较,汉防己甲素 30,40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, G_0/G_1 期细胞显著增多($P < 0.01$),S 期细胞明显减少($P < 0.05, P < 0.01$),汉防己甲素 10,20,30,40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞凋亡率显著增加($P < 0.01$);与空白组及溶剂组比较,20,30,40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 汉防己甲素处理后,cleaved-Caspase-3, cleaved-Caspase-9 蛋白表达显著升高($P < 0.01$),10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 汉防己甲素处理时,cleaved-Caspase-3 蛋白表达明显增高($P < 0.05$)。结论:汉防己甲素通过阻滞细胞周期在 G_0/G_1 期抑制 CD138⁻ B 细胞的增殖,通过活化细胞内与凋亡相关蛋白 cleaved-Caspase-3, cleaved-Caspase-9 促进细胞凋亡。

[关键词] 汉防己甲素; 多发性骨髓瘤干细胞; 细胞增殖; 细胞凋亡; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)10-0111-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017100111

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170308.0950.036.html>

[网络出版时间] 2017-03-08 9:50

Effect and Mechanism of Tetrandrine on Proliferation and Apoptosis in Multiple Myeloma Stem Cells

LI Hao-liang^{1*}, WANG Xi-bin¹, ZUO Rui-ting¹, WANG Xin-li¹, LI Jun-hui²

(1. Henan Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China;

2. Henan Province Orthopaedic Hospital, Zhengzhou 450000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects and mechanism of tetrandrine on proliferation and apoptosis in multiple myeloma stem cells. **Method:** Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay was used to detect the survival of cancer cell. Flow cytometer was used to detect the cell circles and apoptotic induced by tetrandrine. Western blot were used to detect the activity of cleaved-Caspase-3, cleaved-Caspase-9. **Result:** Compared with blank group and solution group, 10, 20, 30, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ tetrandrine treatment for 6, 12, 24 h could significantly inhibit the proliferation of CD138⁻ B cells ($P < 0.01$). Compared with blank group and solution group, the cells in G_0/G_1 phase increased significantly ($P < 0.01$), and the cells in S phase significantly decreased ($P < 0.05, P < 0.01$), when being treated with 30, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ tetrandrine. The apoptotic rate increased significantly at concentrations of 10, 20, 30, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of tetrandrine ($P < 0.01$). Compared with

[收稿日期] 20160824(014)

[基金项目] 河南省医学科技攻关计划项目(142300410538)

[通讯作者] *李浩亮, 硕士, 主治医师, 从事中医骨伤方面的研究, Tel:13733807578, E-mail:yhjiang1968@163.com

blank group and solution group, the expression of cleaved-Caspase-3, cleaved-Caspase-9 protein was significantly increased after being treated with 20, 30, 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ tetrandrine ($P < 0.01$), the expression of cleaved-Caspase-3 protein was significantly increased when being treated with 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ tetrandrine ($P < 0.05$).

Conclusion: Tetrandrine can arrest CD138⁻ B cell line in the G₀/G₁ phase, inhibit the cell survival, and enhance CD138⁻ B cell apoptosis by promoting the activity of cleaved-Caspase-3, cleaved-Caspase-9.

[**Key words**] tetrandrine; multiple myeloma stem cell; cell proliferation; apoptosis; cleaved-Caspase

多发性骨髓瘤(MM)是常发于血液系统的恶性肿瘤,起源于 B 细胞系,由处于终末分化状态的 B 细胞异常增生导致,主要表现为 B 细胞恶性克隆增生,浸润骨髓后导致不同程度的骨折、贫血、出血、肾功能损伤等^[1-2]。据调查,我国骨髓瘤发病率约为 1/10 万,发病常见于老年人,随着我国老龄化人口的增多,骨髓瘤的发病率也随之逐年上升^[3]。干细胞是具有高度增殖与分化能力的一类细胞。大多数的恶性肿瘤都存在肿瘤干细胞,肿瘤干细胞像干细胞一样具备高度的自我增殖能力以及更新能力,肿瘤干细胞还具有多向分化潜能^[4]。在人类骨髓瘤细胞株和 MM 患者中大部分细胞都表达 CD138 抗原^[5],通过骨髓培养和将骨髓瘤干细胞移植入非肥胖糖尿病/重症联合免疫缺陷(NOD/SCID)小鼠体内发现,表达 CD138⁻的浆细胞具有更强的克隆生长能力,而表达 CD138⁺的浆细胞不具有继续克隆的能力。因此克隆性骨髓瘤 CD138⁻ B 细胞被认为是多发性骨髓瘤干细胞^[6-7]。多发性骨髓瘤干细胞与骨髓瘤的发生、发展、耐药及复发等密切相关^[8]。

汉防己甲素又名粉防己碱,是从防己科植物粉防己 *Stephania tetrandra* 的块根中提取得到,主要成分是双苄基异喹啉类生物碱^[9]。对汉防己碱研究发现,其不仅是天然的非选择性钙通道阻滞剂,同时也是钙调蛋白的拮抗剂^[10]。近年来研究发现汉防己甲素还具有抗肿瘤作用,对体外培养的小鼠肝癌细胞、人肝癌细胞、小鼠肉瘤 S180 细胞、白血病细胞株 HL-60 等均具有直接的生长抑制及诱导凋亡作用^[11-13]。但相关文献并未发现汉防己甲素作用于人多发性骨髓瘤干细胞的相关报道,关于其作用机制尚无深入的研究与报道。为了研究汉防己甲素对人多发性骨髓瘤干细胞作用及可能存在的机制,本研究前期对汉防己甲素作用于多发性骨髓瘤干细胞的浓度进行预实验,本文将进一步探究汉防己甲素在骨髓瘤干细胞增殖与凋亡中的作用及相关机制,以期为临床骨髓瘤的药物治疗提供理论基础。

1 材料

1.1 细胞系 克隆性骨髓瘤 CD138⁻ B 细胞由河南省中医院实验室保存。

1.2 药物及试剂 汉防己甲素(江西银涛药业有限公司,批号 150303); Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) 培养基,胰酶,四甲基乙二胺(TEMED)(美国 Sigma-Aldrich 公司,批号分别为 42430-025,20131113,WXBB2984V); 噻唑蓝(MTT)检测试剂盒(索莱宝生物科技有限公司,批号 20131113); 胎牛血清(美国 Hyclone 公司,批号 AAL210465); 细胞周期检测试剂盒(广州市锐博生物科技有限公司,批号 150221); 凋亡检测试剂盒(南京碧波生物科技有限公司,批号 BA2650); 兔抗半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶(cleaved-Caspase)-3, cleaved-Caspase-9 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司,批号分别为 sc-6260,sc-2578); 兔抗 β -肌动蛋白(β -actin)多克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(北京中杉金桥生物公司,批号分为 140925,150311)。

1.3 仪器 MCO-18AIC 型 CO₂ 培养箱(日本 Sanyo 公司),Centrifuge 5810 型离心机(德国 Eppendorf 公司),BX53 型显微镜(日本 Olympus 公司),ELX800-MV 型酶标仪(美国 Bio-Tek 公司),Cyto-FLEX 型流式细胞仪(美国 Beckman 公司),SDS-PAGE 型电泳及转印装置(美国 Bio-Rad 公司),Gel Doc XR 型凝胶成像系统(美国 Hercules 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养方法 CD138⁻ B 细胞使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 全培养基培养,将培养板置于 5% CO₂ 37 °C 培养箱内培养 3~4 d。待细胞生长至对数生长期时,使用体积浓度为 0.25% 的胰蛋白酶消化。根据实验需要稀释细胞,稀释过的细胞接种于不同的培养板中继续培养。待细胞长至实验所需密度后,继续换用不加血清的 DMEM 培养基培养,置于细胞培养箱中培养 24 h 后,即可进行实验。

2.2 MTT 方法检测细胞增殖 取对数期的 CD138⁻ B 细胞按照 1×10^6 个/mL 接种于 96 孔板

内,置于 37 ℃ 饱和湿度,5% CO₂ 恒温细胞培养箱中进行培养,待细胞生长至 50% 左右时,将汉防己甲素 (10,20,30,40 μmol · L⁻¹) 加入 96 孔板中,同时设置空白组及溶剂 (0.1 mol · L⁻¹ 盐酸) 组。培养 6,12,24 h 后加入 MTT,置于培养箱中继续培养 4 h,之后向 96 孔板中加入二甲基亚砷 (DMSO),置于细胞培养箱中培养过夜,并使用酶标仪在 450 nm 处检测细胞的吸光度 A,进行统计。

2.3 碘化丙啶 (PI) 单染色法检测细胞周期 收集对数期的 CD138⁻ B 细胞,调整细胞密度为 1 × 10⁶ 个/mL;接种于 6 孔板中,分别加入不同浓度 (10,20,30,40 μmol · L⁻¹) 汉防己甲素,每组设 6 个复孔,培养 24 h 后收集各组细胞进行固定。之后每管样品中加入 PI 染色液进行染色,37 ℃ 避光温浴 30 min,同时设置空白组及溶剂组。反应结束后 24 h 内经流式细胞仪进行检测并分析。

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡 将生长状态良好的处于对数期的细胞接种于 6 孔板中,待细胞生长至 30% ~ 50% 时,加入汉防己甲素 (10,20,30,40 μmol · L⁻¹),处理 24 h;胰酶消化后进行计数,收集细胞,使用磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗 2 次;使用结合缓冲液重悬细胞,向所制备的细胞样品中加入细胞膜磷脂酰丝氨酸异硫氰酸荧光素 (Annexin V-FITC) 和 PI,室温条件下避光孵育 10 ~ 15 min,同时设置空白组及溶剂组,采用流式细胞仪分析。

2.5 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 cleaved-Caspase-3, cleaved-Caspase-9 蛋白表达 使用蛋白

提取试剂盒提取细胞总蛋白,采用 BCA 法测定蛋白浓度,并制备蛋白样品;配置 8% 的蛋白胶,蛋白上样,恒压 80 V 电泳,后换用 120 V 电压继续电泳,直至溴酚蓝跑至玻璃板;冰浴 100 V 进行转膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 6 h,以 cleaved-Caspase-3, cleaved-Caspase-9 抗体 (1 : 500) 4 ℃ 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (1 : 2 000),37 ℃ 孵育 1 h, TBST 清洗纤维素膜 3 次,每次 5 min;采用 Electro-Chemi-Luminescence (ECL) 发光剂显影,自动凝胶成像系统采集图像。

2.6 统计学分析 本研究数据均使用 SPSS 21.0 软件进行处理,使用 GraphPad Prism 5 统计软件进行绘图。所有的数据均以 $\bar{x} \pm s$ 来表示,多组比较采用单因素方差分析,两组比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 汉防己甲素对骨髓瘤干细胞 CD138⁻ B 的增殖的影响 与空白组及溶剂组比较,10,20,30,40 μmol · L⁻¹ 汉防己甲素分别处理 CD138⁻ B 细胞 6,12,24 h 后,CD138⁻ B 细胞的存活率显著受到抑制 (*P* < 0.01)。抑制效果呈药物浓度梯度依赖性,细胞的存活率随着药物浓度的升高而降低,说明汉防己甲素可以有效抑制骨髓瘤干细胞 CD138⁻ B 的增殖。见表 1。由于 10,20,30,40 μmol · L⁻¹ 汉防己甲素处理 6 h 时,CD138⁻ B 细胞增殖均受到显著抑制,故以下实验按照 10,20,30,40 μmol · L⁻¹ 汉防己甲素处理 6 h 条件进行处理。

表 1 汉防己甲素处理 CD138⁻ B 细胞不同时间对细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of CD138⁻ B cells treated by different concentrations of tetrandrine on cell survival at different times ($\bar{x} \pm s, n = 6$) %

组别	浓度/μmol · L ⁻¹	6 h	12 h	24 h
空白	-	90.7 ± 2.1	94.2 ± 2.6	97.7 ± 1.6
溶剂	-	86.7 ± 2.4	92.1 ± 2.3	95.2 ± 1.2
汉防己甲素	10	75.2 ± 2.1 ^{2,4)}	62.4 ± 1.2 ^{2,4)}	56.2 ± 2.0 ^{2,4)}
	20	68.3 ± 1.2 ^{2,4)}	59.8 ± 1.4 ^{2,4)}	50.6 ± 2.1 ^{2,4)}
	30	60.9 ± 1.1 ^{2,4)}	52.6 ± 1.3 ^{2,4)}	48.5 ± 1.3 ^{2,4)}
	40	57.6 ± 1.2 ^{2,4)}	48.4 ± 2.1 ^{2,4)}	43.2 ± 1.9 ^{2,4)}

注:与空白组比较¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01;与溶剂组比较³⁾ *P* < 0.05, ⁴⁾ *P* < 0.01 (表 2,3,图 1 同)。

3.2 汉防己甲素对骨髓瘤干细胞 CD138⁻ B 细胞周期变化的影响 汉防己甲素处理 CD138⁻ B 细胞 6 h 后,随着汉防己甲素浓度的增加,处于 G₀/G₁ 期的 CD138⁻ B 细胞逐渐增多,S 期的细胞逐渐减少,与空白组及溶剂组比较,汉防己甲素 30,40 μmol · L⁻¹ 时,G₀/G₁ 期细胞显著增多 (*P* < 0.01),S 期的细胞明显减少 (*P* < 0.05, *P* < 0.01);汉防己甲素 10,

20 μmol · L⁻¹ 时,处于 G₀/G₁ 期及 S 期的细胞变化无统计学意义。与空白组及溶剂组比较,各浓度汉防己甲素处理后,G₂/M 期细胞变化无统计学差异。见表 2。

3.3 汉防己甲素对 CD138⁻ B 细胞凋亡的影响 与空白组及溶剂组比较,汉防己甲素 10,20,30,40 μmol · L⁻¹ 时,早期凋亡率及总凋亡率均显著增加

表 2 汉防己甲素作用 6 h 后对 CD138⁻ B 细胞周期的影响 ($x \pm s, n = 6$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	%
空白	-	51.26 ± 3.23	36.37 ± 2.54	12.37 ± 1.68	
溶剂	-	49.12 ± 2.12	31.68 ± 2.32	15.63 ± 2.86	
汉防己甲素	10	56.31 ± 5.75	27.96 ± 3.32	16.76 ± 3.62	
	20	60.81 ± 3.26	24.62 ± 4.2	13.46 ± 3.03	
	30	61.32 ± 3.62 ^{2,4)}	21.62 ± 2.31 ^{1,3)}	16.82 ± 2.31	
	40	71.32 ± 3.62 ^{2,4)}	8.62 ± 2.31 ^{2,4)}	21.82 ± 2.31	

($P < 0.01$), 且随着药物浓度的升高而增加, 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 汉防己甲素早期调亡率达到最高为 (16.28 ± 2.26)%。说明汉防己甲素可诱导 CD138⁻ B 细胞调亡, 并呈浓度依赖性。见表 3。

表 3 汉防己甲素作用 6 h 后对 CD138⁻ B 细胞调亡率的影响 ($x \pm s, n = 6$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	早期调亡率	总调亡率	%
空白	-	0.41 ± 0.12	1.28 ± 0.31	
溶剂	-	0.51 ± 0.08	1.36 ± 0.22	
汉防己甲素	10	8.48 ± 0.22 ^{2,4)}	16.43 ± 0.16 ^{2,4)}	
	20	11.42 ± 2.30 ^{2,4)}	23.36 ± 2.04 ^{2,4)}	
	30	16.28 ± 2.26 ^{2,4)}	26.24 ± 2.03 ^{2,4)}	
	40	8.26 ± 0.21 ^{2,4)}	48.26 ± 2.53 ^{2,4)}	

3.4 汉防己甲素处理对 CD138⁻ B 细胞 cleaved-Caspase-3, cleaved-Caspase-9 蛋白表达的影响 与空白组及溶剂组比较, 20, 30, 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 汉防己甲素处理后, cleaved-Caspase-3, cleaved-Caspase-9 蛋白表达均显著升高 ($P < 0.01$), 且蛋白表达具有药物浓度依赖性; 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 汉防己甲素处理后, cleaved-Caspase-3 蛋白表达明显增高 ($P < 0.05$), cleaved-Caspase 9 蛋白表达无明显变化。见图 1。

4 讨论

随着对肿瘤的深入研究, 研究者发现并不是所有的肿瘤细胞都会因基因突变获得自我更新的能力, 只有一小部分肿瘤细胞与干细胞特性十分相似, 具有自我增殖和分化的能力, 这部分细胞被称为肿瘤干细胞^[14]。肿瘤干细胞对常规的放疗、化疗很不敏感, 在治疗中很难被杀灭。已在乳腺、脑、前列腺等肿瘤组织中发现了肿瘤干细胞, 目前在人骨髓瘤患者中也成功分离出骨髓瘤干细胞^[15-17]。骨髓瘤干细胞具有与 B 细胞相似的表型, 但却具有克隆形成能力。目前对于骨髓瘤的治疗主要针对处于活跃期的细胞, 但肿瘤干细胞大多数条件下处于静止状态, 化疗药物对肿瘤干细胞的作用效果并不理想。

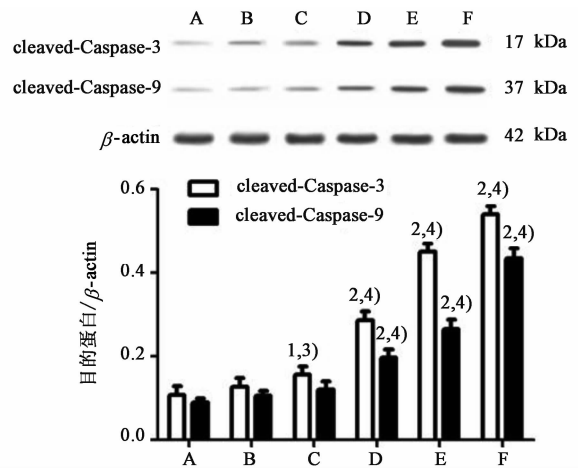


图 1 汉防己甲素处理 6 h 后对 CD138⁻ B 细胞 cleaved-Caspase-3, cleaved-Caspase-9 蛋白表达的影响 ($x \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Effect of tetrandrine on expression of cleaved-Caspase-3, cleaved-Caspase-9 protein after treated for 6 h ($x \pm s, n = 6$)

肿瘤的多药耐药性可能与肿瘤干细胞有关, 因此, 治疗多发性骨髓瘤的一个重要研究方向是针对性的杀死骨髓瘤干细胞。

汉防己甲素是从汉防己块根中提取的有效活性成分。中医学认为汉防己具有祛风除湿、行气止痛、利水消肿等作用, 主要用于治疗风湿病及炎症疾病^[18]。汉防己甲素是一种双苄基异喹啉类生物碱, 研究发现, 汉防己甲素除了有抗过敏、抗高血压等作用之外, 它还具有一定的抗肿瘤作用^[19-20]。本研究采用 MTT 法测定了不同浓度的汉防己甲素对骨髓瘤干细胞 CD138⁻ B 细胞增殖的影响, 发现汉防己甲素能有效的抑制骨髓瘤干细胞的增殖, 这种抑制呈浓度依赖性。本研究发现汉防己甲素作用后 CD138⁻ B 细胞周期被阻滞在 G₀/G₁ 期。细胞调亡的结果显示, 10, 20, 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 汉防己甲素处理能明显抑制 CD138⁻ B 细胞的早期调亡, 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 汉防己甲素时调亡率达到最大, 总调亡率则随着

药物浓度的增高而上升,呈浓度依赖性。Western blot 实验发现汉防己甲素能促进 cleaved-Caspase-3, cleaved-Caspase-9 蛋白表达。本研究认为,汉防己甲素可能是通过阻滞细胞周期以及活化凋亡相关蛋白影响骨髓瘤干细胞的增殖与凋亡。汉防己甲素与传统的抗肿瘤药物比较药物安全性很高,基本上对人体不会产生毒副作用,汉防己甲素在骨髓瘤的治疗方面具有广阔的应用前景。

[参考文献]

[1] Ipek Y, Fehmi H, Sevgi B K, et al. Thrombotic complications in multiple myeloma: a report of three cases and review of the literature [J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2012, 33(2):197-201.

[2] Larocca A, Cavallo F, Bringhen S, et al. Aspirin or enoxaparin thromboprophylaxis for patients with newly diagnosed multiple myeloma treated with lenalidomide [J]. *Blood*, 2012, 119(4):933-939.

[3] 王曼,李树仁. 基因工程在骨髓间充质干细胞治疗心肌梗死中的应用[J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(10):269-271.

[4] Colak S, Medema J P. Cancer stem cells-important players in tumor therapy resistance [J]. *FEBS J*, 2014, 281(21):4779-4791.

[5] Kim D, Park C Y, Medeiros B C, et al. CD19-CD45 low/- CD38 high/CD138⁺ plasma cells enrich for human tumorigenic myeloma cells [J]. *Leukemia*, 2012, 26(12):2530-2537.

[6] DING Q, Lee Y K, Schaefer E K, et al. A TALEN genome-editing system for generating human stem cell-based disease models [J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 12(2):238-251.

[7] CHU J, HE S, DENG Y, et al. Genetic modification of T cells redirected toward CS1 enhances eradication of myeloma cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(15):3989-4000.

[8] Soto H, Erasme D. Delk1 distinguishes between tumor and normal stem cells in the intestine [J]. *Nat Genet*, 2013, 45(1):98-103.

[9] WAN J, LIU T, MEI L, et al. Synergistic antitumor activity of sorafenib in combination with tetrandrine is mediated by reactive oxygen species (ROS)/Akt signaling [J]. *Br J Cancer*, 2013, 109(2):342-350.

[10] GAO S, CUI Y L, YU C Q, et al. Tetrandrine exerts antidepressant-like effects in animal models: role of

brain-derived neurotrophic factor [J]. *Behav Brain Res*, 2013, 238(1):79-85.

[11] QIN R, SHEN H, CAO Y, et al. Tetrandrine induces mitochondria-mediated apoptosis in human gastric cancer BGC-823 cells [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10):e76486.

[12] YAN T, SUN A, LIU R, et al. Simultaneous determination of fangchinoline and tetrandrine in *Stephania tetrandra* S. Moore, by using 1-alkyl-3-methylimidazolium- based ionic liquids as the RP-HPLC mobile phase additives [J]. *Anal Chim Acta*, 2013, 767(6):148-154.

[13] HUANG A C, LIAN J C, LIN M W, et al. Tetrandrine induces cell death in SAS human oral cancer cells through caspase activation-dependent apoptosis and LC3-I and LC3-II activation-dependent autophagy [J]. *Int J Oncol*, 2013, 43(2):485-494.

[14] 陈修平,唐正海,石哲,等. 肿瘤生物学研究热点与抗肿瘤中药研发策略[J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(17):3416-3422.

[15] HUANG S Y, LIN C W, LIN H H, et al. Expression of cereblon protein assessed by immunohistochemical staining in myeloma cells is associated with superior response of thalidomide and lenalidomide based treatment, but not bortezomib-based treatment, in patients with multiple myeloma [J]. *Ann Hematol*, 2014, 93(8):1371-1380.

[16] LI J, ZHU J, CAO B, et al. The mTOR signaling pathway is an emerging therapeutic target in multiple myeloma [J]. *Curr Pharm Des*, 2014, 20(1):125-135.

[17] Tucci M, Stucci S, Savonarola A, et al. An imbalance between Beclin-1 and p62 expression promotes the proliferation of myeloma cells through autophagy regulation [J]. *Exp Hematol*, 2014, 42(10):897-908.

[18] 张淑瑜,于燕莉,刘世君,等. 复方汉防己颗粒中防己的成分鉴别及含量测定[J]. *中国药事*, 2013, 27(7):725-728.

[19] QIU W, SU M, XIE F, et al. Tetrandrine blocks autophagic flux and induces apoptosis via energetic impairment in cancer cells [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5(3):463-473.

[20] 伍义文,童健,张福伟,等. 汉防己甲素对食管癌细胞凋亡相关基因 Survivin, Caspase-3 表达的影响[J]. *中药材*, 2013, 36(6):986-988.

[责任编辑 张丰丰]