

上海交通大学医学院



学者介绍

Author introduction



陶 荣 博士

主任医师、硕士生导师

TAO Rong

M.D, Ph.D

Chief Physician, Master's Supervisor

陶 荣 (1976—), 上海交通大学医学院附属新华医院血液科副主任。2002 年于华中科技大学同济医学院七年制临床医学专业获硕士学位。2008 年于香港大学医学院内科学系获博士学位。2016 年获附属新华医院血液病专业主任医师职称。现任上海医学会血液学专业委员会委员。

• 长期从事淋巴瘤的诊治研究, 对复发难治性 NK/T 细胞淋巴瘤、高危弥漫性大 B 细胞淋巴瘤有较深度的研究。建立了 MEDA 化疗治疗晚期和复发难治性 NK/T 细胞淋巴瘤, 获得良好疗效; 尤其是对于合并嗜血综合征的高危患者, 疗效突出。对高龄弥漫性大 B 细胞淋巴瘤患者及年轻高危弥漫性大 B 淋巴瘤患者开展 risk-adapted 治疗, 均取得显著的临床疗效。在基础研究领域, 发现 NK/T 细胞淋巴瘤广泛存在多种生长因子及其受体的自分泌环路, 并成为潜在的治疗靶点。发表 SCI 收录论文 10 余篇, 获得专利 2 项。曾获上海交通大学医学院首届上药杏林育才奖。入选上海市青年科技启明星计划, 2015 年入选上海市教育委员会高峰高原学科建设计划。

TAO Rong born in 1976, deputy director of Department of Hematology, Xinhua Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine. He graduated from Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology with master's degree in medicine in 2002, and received Ph.D from the faculty of medicine, the University of Hong Kong in 2008. He attained the qualification of chief physician in hematology, Xinhua Hospital in 2016. He is the member of Committee of Hematology, Shanghai Medical Association.

• Mainly engaged in the diagnosis and treatment of malignant lymphoma, Dr. TAO focuses on the seeking effective treatment for the relapsed/refractory NK/T-cell lymphoma, high-risk diffuse large B-cell lymphoma. One successful example is the establishment of a MEDA regimen in the treatment of advanced and relapsed/refractory NK/T-cell lymphoma, which has been demonstrated highly effective, even for patients with the fatal complications of high risk of hematopoietic syndrome. For the elderly diffuse large B-cell lymphoma patients and young high-risk diffuse large B-cell lymphoma patients, risk-adapted treatment also has been achieved significant efficacy. In the field of basic research, Dr. TAO found that there were a variety of growth factors and their receptor autocrine loops widely existing in the NK/T-cell lymphoma, which would become potential therapeutic targets. He has published 10 research papers in SCI journals, and successfully applied 2 patents. He was awarded "the first Shanghai Pharma-XingLinYuCai Prize", enrolled into "Shanghai Rising-Star Program". In 2015, he won "Shanghai Municipal Education Commission—Gaofeng Clinical Medicine Grant Support".



论著·基础研究

藤黄酸抗 NK/T 细胞淋巴瘤作用的研究

李高扬, 姜霁峰, 刘传绪, 陶 荣

上海交通大学 医学院附属新华医院血液科, 上海 200092

[摘要] **目的**·探讨藤黄酸 (GA) 对 NK/T 细胞淋巴瘤 (NK/TCL) 细胞株 SNK-1、SNK-6 和 SNT-8 诱导凋亡的作用及其可能机制。**方法**·以不同浓度 GA 处理 SNK-1、SNK-6 和 SNT-8 细胞株 24 h, CCK-8 法测定 GA 对细胞活力的影响; Annexin V-FITC/PI 流式细胞术检测细胞凋亡; Western blotting 方法检测凋亡和信号通路相关蛋白及磷酸化的变化。**结果**·CCK-8 法检测结果显示 GA 对 3 株细胞活力均有显著抑制作用。流式细胞术检测结果显示, GA 诱导 3 株细胞凋亡。Western blotting 检测结果显示 GA 处理的细胞出现 caspase-3 和 caspase-9 的活化及 PARP 的剪切, 且 Bcl-xl 表达下降。信号通路蛋白 STAT3 的磷酸化水平在 SNK-1 和 SNT-8 中显著下调, ERK1/2 的磷酸化水平在 SNK-1 和 SNK-6 中显著下调。**结论**·GA 对 NK/TCL 细胞株 SNK-1、SNK-6 和 SNT-8 有显著的诱导凋亡效应, 抗凋亡蛋白 Bcl-xl 以及 JAKs/STATs、MEK/MAPK 信号通路可能参与了这一过程。**[关键词]** NK/T 细胞淋巴瘤; 藤黄酸; 凋亡
[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2017.06.005 **[中图分类号]** R551.2 **[文献标志码]** A

Effect of gambogic acid on NK/T-cell lymphoma

Li Gao-yang, Jiang Ji-feng, Liu Chuan-xu, Tao Rong

Department of Hematology, Xinhua Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China

[Abstract] **Objective**·To identify the effect and potential mechanism of gambogic acid (GA) on natural killer/T-cell lymphoma (NK/TCL) cell lines. **Methods**·SNK-1, SNK-6 and SNT-8 were incubated with various concentrations of GA for 24 h, and cell viability was detected with CCK-8 assay. Cell apoptosis was examined by Annexin V-FITC/PI staining assay. Levels of proteins regulating cell apoptosis and phosphorylation levels of proteins in key signaling pathways were detected by Western blotting. **Results**·GA showed a potent effect on reduction of cell viability of NK/TCL cell lines in CCK-8 assay. GA increased the percentages of Annexin V positive cells and induced activation of caspase-3 and caspase-9, cleavage of PARP as well as the reduction of Bcl-xl. GA also inhibited the phosphorylation levels of STAT3 in SNK-1 and SNT-8, and ERK1/2 in SNK-1 and SNK-6 significantly. **Conclusion**·GA induces cell apoptosis in NK/TCL cell lines SNK-1, SNK-6 and SNT-8. Anti-apoptosis protein Bcl-xl and signaling pathway JAKs/STATs and MEK/MAPK might be involved in this process. **[Key words]** NK/TCL; gambogic acid; apoptosis

NK/T 细胞淋巴瘤 (natural killer/T-cell lymphoma, NK/TCL) 是一种高侵袭性的非霍奇金淋巴瘤 (non-Hodgkin's lymphoma, NHL), 预后较差。在中国发病率相对较高, 约占 NHL 的 11%^[1-2]。患者对传统化疗不敏感, 有效药物少。目前临床上将左旋门冬酰胺酶为主的化疗作为一线治疗方案, 早期患者总体反应较好^[3-5], 5 年总体生存率为 60.3% ~ 73%^[4, 6]; 但缓解后复发率较高, 为 19.2% ~ 29.6%^[3-5]。复发患者再次用该方案治疗后缓解率低, 预后较差。晚期患者中位生存时间仅为 11.3 个月^[7], 且较之早期患者, 缓解后复发率更高, 约为 42.9%^[8]。可见, 以左旋门冬酰胺酶为主的化疗方案, 疗效仍不令人满

意, 寻找新药迫在眉睫。

藤黄酸 (gambogic acid, GA) 是从藤黄科植物藤黄 (*Garcinia hanburyi* Hook.f.) 分泌的干燥树脂藤黄中提取的活性成分之一。近年来研究表明, GA 在体内外可抑制多种肿瘤细胞生长, 如肝癌、肺癌、卵巢癌和黑色素瘤等^[9-11], 同时具有毒性低、对正常组织损伤小的特点。其作用靶点广泛, 包括 NF- κ B、MEK/MAPK 及 JAKs/STATs 通路等^[12]。有研究^[13]显示, 在 NK/TCL 中, 这些通路处于异常激活状态, 提示可能与 NK/TCL 发病或预后相关。目前, GA 对于 NK/TCL 的作用未见报道。本研究观察 GA 在体外对 NK/TCL 细胞株诱导凋亡的作用, 并对其抗癌机制进行了初步探讨。

[基金项目] 上海市教育委员会高峰高原学科建设计划 (20152219); 上海市教育委员会资助项目 (13ZZ084) (Shanghai Municipal Education Commission—Gaofeng Medicine Grant Support, 20152219; Project of Shanghai Municipal Education Commission, 13ZZ084)。

[作者简介] 李高扬 (1991—), 女, 硕士生; 电子信箱: elisaLGY@126.com。

[通信作者] 陶 荣, 电子信箱: hkutao@hotmail.com。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

1.1.1 主要试剂 AIM-V 培养基、AB 型人血清购于 Invitrogen 公司; 人重组实验用 IL-2 购于 Peprotech 公司; GA 粉剂购于 Selleck 公司, 纯度 >99%, 溶于二甲基亚砜 (DMSO) 中, 配制成 5 mmol/L 的储存液, 于 -20 ℃ 储存, 使用时稀释至所需浓度。CCK-8 购于日本同仁化学研究所; 细胞凋亡双染检测试剂盒购于美国 BD 公司; BCA 蛋白定量试剂盒、聚丙烯酰胺预制梯度凝胶购于 Invitrogen 公司; HRP 显色试剂盒购于 Millipore 公司; 实验用蛋白检测抗体均购于 CST 公司。

1.1.2 主要仪器 流式细胞仪 (BD FACSCalibur); CO₂ 培养箱 (Thermo); 超净工作台 (Thermo); 低温高速离心机 (Eppendorf); 多功能酶标仪 (Eppendorf); SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)、转移装置及化学发光成像系统均为 Bio-Rad 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 NK/TCL 细胞株 SNK-1、SNK-6 和 SNT-8 由日本东京医科和牙科大学 Shimizu 教授赠予。SNK-1 来源于 NK/TCL 患者外周血, SNK-6 和 SNT-8 来源于 NK/TCL 患者原发鼻腔病灶。SNK-1 和 SNK-6 具有 NK 细胞表型, SNT-8 具有细胞毒性 T 细胞表型, 三者均为 EBV 阳性细胞株。细胞用含 10% 热灭活人血清和 250 U/mL IL-2 的 AIM-V 培养基, 置于 37 ℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养, 每 2 d 换液, 取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 CCK-8 法检测细胞活力抑制率 取对数生长期的 SNK-1、SNK-6 和 SNT-8 细胞接种于 96 孔板, 每孔接种 50 μL 细胞悬液, 共 15 000 个细胞。对照组加入含 DMSO 的 AIM-V 培养基 50 μL, 实验组每孔加入含 GA 培养基 50 μL, 使 GA 终浓度为 0、1.0、1.5 及 2.5 μmol/L, 且保证每孔 DMSO 含量均为 0.1%。每组设 3 个重复孔。另设空白对照组, 加入 100 μL 培养基用于分析数据时去除背景。不同剂量 GA 作用 24 h 后, 各孔分别加 CCK-8 试剂 10 μL, 在 37 ℃ 下继续孵育 2 h, 置酶联免疫检测仪测定吸光度值 [$D(450\text{ nm})$], 计算不同给药浓度下的抑制率: $[(D(450\text{ nm})_{\text{对照}} - D(450\text{ nm})_{\text{GA}}) / D(450\text{ nm})_{\text{对照}}] \times 100\%$, 实验重复 3 次。以浓度为横坐标, 细胞活力抑制率为纵坐标, 绘制 GA 对 SNK-1、SNK-6 及 SNT-8 细胞活力抑制率的柱状图。

1.2.3 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡 根据试剂盒使用说明书进行操作。收集不同处理组细胞

(2×10^5 个), 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 漂洗 1 次后, 加入 1 mL 结合缓冲液, 漂洗细胞 1 次; 再加入 200 μL 结合缓冲液重悬细胞, 加入 5 μL Annexin V-FITC, 混匀, 避光孵育 15 min, 再加入 10 μL PI, 混匀, 避光孵育 3 min; 每管加入结合缓冲液 400 μL, 1 h 内流式细胞仪检测。

1.2.4 Western blotting 检测 收集经 1.0 μmol/L 和 1.5 μmol/L GA 处理 24 h 后的细胞 (2×10^6 个), PBS 漂洗, $800 \times g$ 离心 5 min $\times 2$ 次; 细胞沉淀加入 50 μL 预冷的 PBS 悬起后, 再加入等体积的 2 \times SDS 上样缓冲液 (100 mmol/L Tris 碱、4% SDS、20% 甘油和 5% β -巯基乙醇), 吹打均匀, 充分裂解细胞。100 ℃ 加热器上煮 5 min, 再冰上放置 5 min, 循环 3 次。 $10\,000 \times g$ 离心 10 min, 室温, 弃沉淀, 上清溶液即为提取的细胞总蛋白。取少量上清进行定量。剩余溶液加入上样缓冲液后可直接上样。所有蛋白样品调至等体积, 样品两侧泳道用等体积的 1 \times 上样缓冲液上样, 加入 Marker 3 μL, 用 1 \times 上样缓冲液调整至样品等体积, 以初始电压 100 V 强度进行电泳, 当 Marker 分开后换用 150 V 电泳至胶下缘 1 cm 以上结束。转膜条件为 100 V、200 mA 恒压, 转膜时间视相对分子质量而定, 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h。加入稀释好的一抗, 4 ℃ 过夜。弃一抗, 1 \times PBS 缓冲液洗膜 3 次, 5 min/次。加入辣根过氧化物酶偶联的二抗, 室温孵育 2 h。弃二抗, 1 \times PBS 缓冲液洗膜 3 次, 5 min/次。加入底物发光的 ECL (Millipore) 曝光显影, 用 ChemiDoc™ XRS+ 化学发光成像系统进行检测。

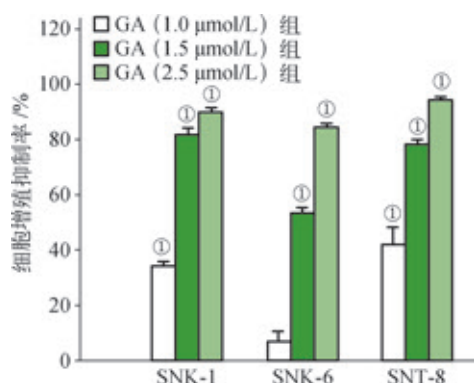
1.3 统计学分析

采用 SPSS11.0 软件进行统计学分析。定量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 Student *t* 检验, 单因素多水平比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GA 降低 SNK-1、SNK-6 和 SNT-8 细胞活性

CCK-8 检测结果显示 SNK-1、SNK-6 和 SNT-8 细胞的活力明显受到抑制, 并有浓度依赖性 (图 1)。与对照组 (未加药) 比较, 1.5 μmol/L GA 作用后, SNK-1、SNK-6 和 SNT-8 细胞 24 h 后的细胞活力抑制率分别为 $(81.8 \pm 2.3)\%$ 、 $(53.6 \pm 1.9)\%$ 和 $(78.6 \pm 1.3)\%$ 。不同细胞株对药物的敏感性存在显著差异, SNK-6 的抑制率低于 SNK-1 和 SNT-8。



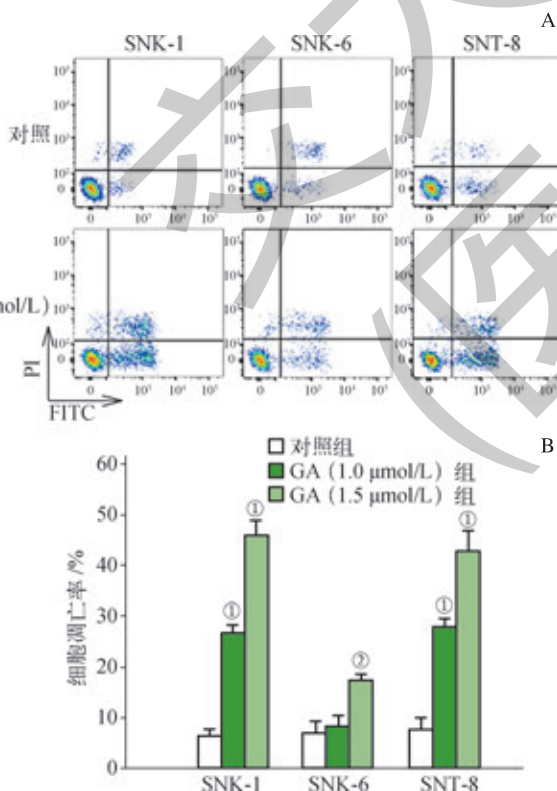
注: ^① $P=0.000$, 与对照组 (抑制率均数为 0) 比较。

图 1 GA 对 NK/TCL 细胞株活力的影响

Fig 1 Effect of GA on cell viability of NK/TCL cell lines

2.2 GA 诱导 SNK-1、SNK-6 和 SNT-8 细胞凋亡

Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率, 结果显示, 与对照组比较, GA 对 3 种细胞株均有显著的诱导凋亡作用 (图 2A)。药物对不同细胞株作用 24 h 后的细胞凋亡比例见图 2B。给药浓度为 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 时, 与对照组相比, SNK-1 与 SNT-8 的凋亡比例增高, 差异具有统计学意义 ($P<0.01$), SNK-6 凋亡比例无显著变化 ($P=0.690$)。当 3 株细胞给药浓度为 $1.5 \mu\text{mol/L}$ 时, 与对照组相比, 差异均有统计学意义 ($P<0.01$), SNK-6 细胞的凋亡比例相对较低。

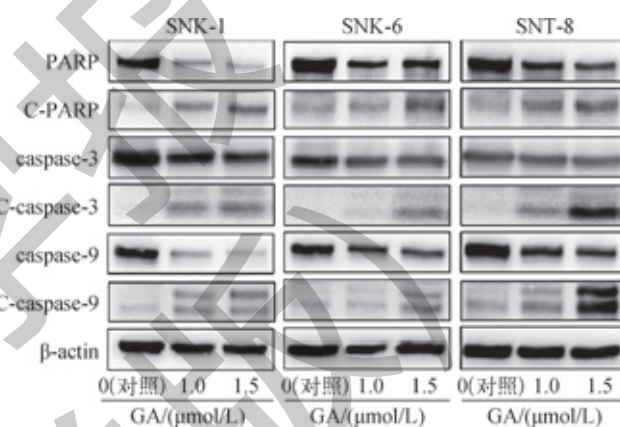


注: A. 对照组与 GA ($1.5 \mu\text{mol/L}$) 组细胞的凋亡图示; B. GA 处理 NK/TCL 细胞株后的凋亡比例。 ^① $P=0.000$, ^② $P=0.003$, 与对照组比较。

图 2 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术测定细胞凋亡

Fig 2 Cell apoptosis detected by Annexin V-FITC/PI double staining and flow cytometry

用 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 和 $1.5 \mu\text{mol/L}$ GA 分别处理 SNK-1、SNK-6 和 SNT-8 细胞 24 h 后, 收取不同浓度处理组的细胞蛋白, 进行 Western blotting 检测。结果如图 3 所示: 当 GA 浓度为 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 时, 在 SNK-1 和 SNT-8 细胞中可引起 caspase-9、caspase-3 的活化以及 PARP 的剪切。同时随着药物浓度增加, 2 株细胞中 caspase-9 和 caspase-3 的活化更加明显, 并且 PARP 的剪切体也随之增多。而 $1.0 \mu\text{mol/L}$ GA 对 SNK-6 细胞中蛋白的影响不明显。当 $1.5 \mu\text{mol/L}$ GA 作用于 SNK-6 后, 出现 caspase-9、caspase-3 的活化及 PARP 的剪切, 该结果与流式细胞术结果一致。



注: C-caspase3 为 caspase-3 的活化形式; C-caspase-9 为 caspase-9 的活化形式; C-PARP 为 PARP 的剪切形式。

图 3 GA 对 NK/TCL 细胞株 caspase-3、caspase-9 和 PARP 表达的影响

Fig 3 Effect of GA on expression of caspase-3, caspase-9, and PARP in NK/TCL cell lines

2.3 GA 对抗凋亡蛋白及信号转导通路的影响

经 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 和 $1.5 \mu\text{mol/L}$ GA 处理 24 h 后, SNK-1、SNK-6 和 SNT-8 中抗凋亡蛋白 Bcl-x1 表达下调 (图 4)。在加药后, SNK-1 和 SNK-6 中 ERK1/2 磷酸化水平显著下降。在 SNK-1 和 SNT-8 中, STAT3 磷酸化水平显著下降。

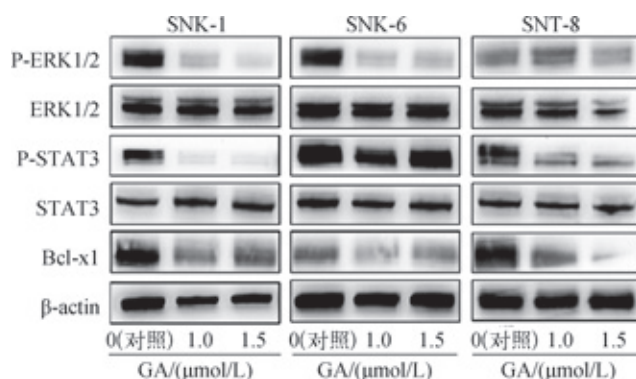


图 4 GA 对 NK/TCL 细胞株 ERK1/2、STAT3 磷酸化及 Bcl-x1 表达的影响

Fig 4 Effect of GA on phosphorylation of ERK1/2, STAT3 and expression of Bcl-x1 in NK/TCL cell lines

3 讨论

近几年,外周性T细胞淋巴瘤的治疗涌现了一些新药,如组蛋白去乙酰化酶抑制剂(belinostat、romidepsin),叶酸拮抗剂(pralatrexate),CD30单克隆抗体(brentuximab vendotoxin)。这些药物对于部分复发难治的外周T细胞淋巴瘤有效,已经用于外周T细胞淋巴瘤的二线治疗;但是由于NK/TCL的发病机制独特,这些药物均未被证明对NK/TCL有确切疗效。例如,目前研究较多的组蛋白去乙酰化酶抑制剂对NK/TCL的作用,是所有外周T细胞淋巴瘤亚型中最差的^[14]。因此,NK/TCL的新药探索尚缺乏潜在的靶标。鉴于疾病的特异性,NK/TCL的药物靶标可能是独立的,参照外周T细胞淋巴瘤的药物研发不能有效获得新的药物靶点。本研究借助NK/TCL细胞株SNK-1、SNK-6和SNT-8的体外实验,发现GA作用于3株细胞后,增殖相关通路被抑制,抗凋亡蛋白下调,显著诱导细胞凋亡。

GA是体外对NK/TCL有高度活性的小分子化合物。GA通过不同机制诱导凋亡。GA可靶向抗凋亡蛋白。Zhai等^[15]通过荧光偏振分析发现GA可竞争性结合BCL-2家族中抗凋亡蛋白(Bcl-2、Bcl-xl、Mcl-1、Bfl-1、Bcl-W和Bcl-B)的BH3结构域诱导凋亡。Prasad等^[16]发现,在多发骨髓瘤细胞中,GA也可抑制JAKs/STATs通路中的关键分子STAT3酪氨酸第705位点的磷酸化和STAT3的核转位,且抑制其与下游靶向DNA的结合力,进而使得下游靶基因如抗凋亡蛋白基因等的转录水平下降,最终导致细胞发生凋亡。另外,Wang等^[17]发现,在非小细胞肺癌中GA还可以通过抑制MEK/MAPK通路中的关键分子P38、JNK和ERK1/2磷酸化,进而导致活性氧的聚集,诱导细胞凋亡。在慢性髓系白血病细胞中发现GA还可通过抑制TNF- α 诱导的IKK的激活来抑制I κ B α 的降解,进而抑制NF- κ B的激活。该通路下游的蛋白如抗凋亡蛋白Bcl-2及Bcl-xl表达受抑制,最终导致细胞发生凋亡^[18]。在本研究中发现,GA诱导NK/TCL凋亡的效应可能与抗凋亡蛋白Bcl-xl的下调有关。Bcl-xl与线粒体途径的凋亡关系密切。线粒体途径是细胞凋亡中的一条重要途径。线粒体途径中,在受到凋亡信号刺激时,凋亡蛋白与抗凋亡蛋白之间的稳态被破坏,抗凋亡蛋白如Bcl-xl的下降使其无法拮抗凋亡蛋白Bax的功能,Bax转位到线粒体膜,导致线粒体上的膜通透性孔道开放,跨膜电位发生变化,细胞色素C被释放,caspase系统被激活。caspase家族中的启动分子caspase-9被激活后,使下游效应分子caspase-3激活。体内激活的caspase-3能剪切PARP这种与DNA修复密切相关的酶,从而使PARP失去酶活性。PARP剪切被认为是细胞凋亡的一个重要指标^[19]。

在本实验中,GA作用细胞后,抗凋亡蛋白Bcl-xl下调,caspase-3、caspase-9和PARP前体减少,剪接体明显增多,并且有浓度依赖性。该结果表明GA可能通过下调Bcl-xl的表达激活了线粒体途径的凋亡,进而激活caspase级联通路的活化,最终诱导凋亡。另外GA诱导凋亡的机制可能与增殖相关通路MEK/MAPK和JAKs/STATs的磷酸化抑制有关。在肿瘤发生过程中,JAKs/STATs通路中的关键分子STAT3与MEK/MAPK通路关键分子ERK1/2的持续激活对维持细胞异常增殖有重要作用。在NK/TCL中,STAT3的持续活化是其重要特点。Coppo等^[20]发现在IL-2依赖的NK/TCL细胞株中,即使在缺乏IL-2条件下,也存在STAT3在Y705位点的持续活化,且与NK/TCL发病机制密切相关。同时,ERK1/2的异常激活也是NK/TCL的重要特征^[13]。在本实验中,GA诱导的细胞增殖通路的抑制可能与凋亡的发生相关。此外,在很多肿瘤细胞中,STAT3可调控Bcl-xl等抗凋亡蛋白的表达,其持续活化与凋亡抑制相关^[21]。本实验中,在SNK-1和SNT-8中,存在p-STAT3和Bcl-xl的明显下调,提示GA可能通过抑制STAT3的激活从而抑制Bcl-xl蛋白的表达,引起凋亡效应,但是两者是否具有直接的调控关系仍需进一步阐明。另外,GA也可能通过靶向NF- κ B通路诱导NK/TCL细胞株发生凋亡。本研究发现GA处理后的NK/TCL细胞株中出现NF- κ B经典通路的激活(数据未发表),应进一步检测NF- κ B非经典通路是否被抑制,来确定GA是否通过靶向NF- κ B通路诱导NK/TCL细胞凋亡。除此之外,由于AKT/mTOR通路在NK/TCL异常激活,且有研究表明该通路为GA诱导凋亡的靶点,因此还应检测GA处理后AKT/mTOR通路活性的变化,明确该通路是否也参与了这一凋亡诱导过程。

Zhou等^[22]利用基于质谱分析法的蛋白组学技术和细胞可渗透探针GA-yne,发现GA在HeLa和K562中的直接蛋白结合靶点,共同靶标有RPS27A、TfR等。其中TfR与GA的凋亡诱导效应密切相关。靶标RPS27A可能也具有生物学功能,抑制其可以逆转GA对细胞的凋亡诱导效应。这些靶点是否为GA诱导NK/TCL细胞株发生凋亡的直接靶点,仍需进一步探索。在本实验中,GA诱导NK/TCL凋亡的机制探索仅局限于GA对NK/TCL的间接作用。其特异性的直接作用靶点还有待进一步研究。GA诱导凋亡的其他相关通路也尚未检测,不能排除其他通路也参与了细胞凋亡的发生。

综上所述,本研究发现GA对NK/TCL细胞株具有强烈的诱导凋亡作用,有望成为治疗NK/TCL的小分子药物。深入研究GA对NK/TCL的作用机制也可能为揭示NK/TCL特异的作用靶点提供新思路,进而为其小分子抑制剂的筛选提供方向。

参·考·文·献

- [1] Sun J, Yang Q, Lu Z, et al. Distribution of lymphoid neoplasms in China: analysis of 4, 638 cases according to the World Health Organization classification [J]. *Am J Clin Pathol*, 2012, 138(3): 429-434.
- [2] Wang XM, Bassig BA, Wen J, et al. Clinical analysis of 1629 newly diagnosed malignant lymphomas in current residents of Sichuan province, China[J]. *Hematol Oncol*, 2016, 34(4): 193-199.
- [3] Jiang M, Zhang H, Jiang Y, et al. Phase 2 trial of "sandwich" L-asparaginase, vincristine, and prednisone chemotherapy with radiotherapy in newly diagnosed, stage IE to IIE, nasal type, extranodal natural killer/T-cell lymphoma [J]. *Cancer*, 2012, 118(13): 3294-3301.
- [4] Kim SJ, Yang DH, Kim JS, et al. Concurrent chemoradiotherapy followed by L-asparaginase-containing chemotherapy, VIDL, for localized nasal extranodal NK/T cell lymphoma: CISL08-01 phase II study [J]. *Ann Hematol*, 2014, 93(11): 1895-1901.
- [5] Wang L, Wang Z, Chen X, et al. First-line combination of gemcitabine, oxaliplatin, and L-asparaginase (GELOX) followed by involved-field radiation therapy for patients with stage IE/IIE extranodal natural killer/T-cell lymphoma [J]. *Cancer*, 2013, 119(2): 348-355.
- [6] Yang Y, Zhang YJ, Zhu Y, et al. Prognostic nomogram for overall survival in previously untreated patients with extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal-type: a multicenter study [J]. *Leukemia*, 2015, 29(7): 1571-1577.
- [7] Kim M, Kim TM, Kim KH, et al. Ifosfamide, methotrexate, etoposide, and prednisolone (IMEP) plus L-asparaginase as a first-line therapy improves outcomes in stage III/IV NK/T cell-lymphoma, nasal type (NTCL) [J]. *Ann Hematol*, 2015, 94(3): 437-444.
- [8] Jaccard A, Gachard N, Marin B, et al. Efficacy of L-asparaginase with methotrexate and dexamethasone (AspaMetDex regimen) in patients with refractory or relapsing extranodal NK/T-cell lymphoma, a phase 2 study[J]. *Blood*, 2011, 117(6): 1834-1839.
- [9] Liang L, Zhang Z. Gambogic acid inhibits malignant melanoma cell proliferation through mitochondrial p66shc/ROS-p53/Bax-mediated apoptosis[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 38(4): 1618-1630.
- [10] Wu L, Guo H, Sun H, et al. UNC119 mediates gambogic acid-induced cell-cycle dysregulation through the Gsk3 β / β -catenin pathway in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Anticancer Drugs*, 2016, 27(10): 988-1000.
- [11] Wang J, Yuan Z. Gambogic acid sensitizes ovarian cancer cells to doxorubicin through ROS-mediated apoptosis[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2013, 67(1): 199-206.
- [12] Kashyap D, Mondal R, Tuli HS, et al. Molecular targets of gambogic acid in cancer: recent trends and advancements[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(10): 12915-12925.
- [13] Huang Y, de Reyniès A, de Leval L, et al. Gene expression profiling identifies emerging oncogenic pathways operating in extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type [J]. *Blood*, 2010, 115(6): 1226-1237.
- [14] Chan TS, Tse E, Kwong YL. Chidamide in the treatment of peripheral T-cell lymphoma[J]. *Onco Targets Ther*, 2017, 10: 347-352.
- [15] Zhai D, Jin C, Shiao C, et al. Gambogic acid is an antagonist of antiapoptotic Bcl-2 family proteins[J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(6): 1639-1646.
- [16] Prasad S, Pandey MK, Yadav VR, et al. Gambogic acid inhibits STAT3 phosphorylation through activation of protein tyrosine phosphatase SHP-1: potential role in proliferation and apoptosis[J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2011, 4(7): 1084-1094.
- [17] Wang LH, Li Y, Yang SN, et al. Gambogic acid synergistically potentiates cisplatin-induced apoptosis in non-small-cell lung cancer through suppressing NF- κ B and MAPK/HO-1 signalling[J]. *Br J Cancer*, 2014, 110(2): 341-352.
- [18] Pandey MK, Sung B, Ahn KS, et al. Gambogic acid, a novel ligand for transferrin receptor, potentiates TNF-induced apoptosis through modulation of the nuclear factor-kappaB signaling pathway[J]. *Blood*, 2007, 110(10): 3517-3525.
- [19] Sattler M, Liang H, Nettesheim D, et al. Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis [J]. *Science*, 1997, 275(5302): 983-986.
- [20] Coppo P, Gouilleux-Gruart V, Huang Y, et al. STAT3 transcription factor is constitutively activated and is oncogenic in nasal-type NK/T-cell lymphoma [J]. *Leukemia*, 2009, 23(9): 1667-1678.
- [21] Yao S, Xu F, Chen Y, et al. Fbw7 regulates apoptosis in activated B-cell like diffuse large B-cell lymphoma by targeting Stat3 for ubiquitylation and degradation[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36(1): 10.
- [22] Zhou Y, Li W, Zhang X, et al. Global profiling of cellular targets of gambogic acid by quantitative chemical proteomics[J]. *Chem Commun (Camb)*, 2016, 52(97): 14035-14038.

[收稿日期] 2017-02-23

[本文编辑] 吴 洋

