

Isogarcinol 对人红白血病细胞 HEL 的抗肿瘤作用及机制*

陈 丽¹, 杨 珏^{2,3}, 邱剑飞^{2,3}, 苑春茂^{2,3}, 吴昌学³, 李艳梅^{2,3**}, 郝小江^{1**}

(1. 贵州中医药大学, 贵州 贵阳 550002; 2. 贵州省中科院天然产物化学重点实验室, 贵州 贵阳 550014; 3. 贵州医科大学, 贵州 贵阳 550025)

[摘要] 目的: 研究 Isogarcinol 对人红白血病细胞 HEL 的凋亡、增殖的影响及其作用机制。方法: 采用不同浓度的 Isogarcinol 化合物处理 HEL 细胞, 分别采用 MTT 测定细胞活力, Annexin V/PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡, 细胞计数绘制细胞生长曲线, Western blot 和 qRT-PCR 法检测胞内信号通路相关基因在蛋白和基因水平的表达, 利用 SCID 白血病小鼠模型体内评价该化合物的作用。结果: Isogarcinol 抑制人红白血病细胞 HEL 的活性, IC₅₀ 5.4 μmol/L 可显著抑制人红白血病细胞 HEL 的增殖及诱导细胞凋亡; qRT-PCR 结果显示促凋亡基因 Bax 的表达增加, 而 Caspase-3、Caspase-8 的表达发生下调, 抗凋亡基因 Bcl-2、c-Myc 的表达下调; Western blot 结果显示 Bad, Bax, Cleaved caspase-3, Cleaved caspase-8 和 Cleaved PARP 的相对表达量呈浓度依赖性上调, 而 JAK2, P-Stat3、Bcl-2、Caspase3、Caspase-8、PARP、P-ERK 1/2 和 c-Myc 的相对表达量呈浓度依赖性下调; 小鼠体内实验表明 Isogarcinol 显著延长了小鼠的存活时间, 并且增加了血红细胞比。结论: Isogarcinol 诱导人红白血病细胞 HEL 细胞凋亡和抑制 HEL 细胞增殖, 可能通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路而实现的。

[关键词] Isogarcinol; 人红白血病细胞; 细胞增殖; 细胞凋亡; JAK2/STAT3 信号通路

[中图分类号] R966 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)01-0035-07

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.01.007

The Effect and Mechanism of Isogarcinol on Apoptosis and Proliferation of Human Erythroleukemia Cell Line HEL

CHEN Li¹, YANG Jue^{2,3}, QIU Jianfei^{2,3}, YUAN Chunmao^{2,3}, WU Changxue³, LI Yanmei^{2,3}, HAO Xiaojiang¹

(1. Guizhou University of Chinese Medicine, Guiyang 550002, Guizhou, China; 2. The Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou Province and Chinese Academic of Sciences, Guiyang 550014, Guizhou, China;

3. Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect and mechanism of Isogarcinol on apoptosis and proliferation of human erythroleukemia cell line HEL. **Methods:** MTT assay was used to measure the inhibition rate of different concentration of Isogarcinol on HEL cells. Apoptosis was detected by Annexin V/PI staining using flow cytometry. Cell growth curve was drawn based on cell counting data. Expressions of intracellular signal pathway-related proteins and genes were detected by Western blot and qRT-PCR. HEL tumor-bearing SCID mice were used to evaluate antitumor effect of this compound. **Results:** Isogarcinol significantly inhibited HEL cell viability and induced HEL cellular apoptosis, and its IC₅₀ was 5.4 μmol/L. qRT-PCR results showed that the expression of proapoptotic gene Bax was increased, while the expression levels of Caspase-3 and Caspase-8 were downregulated. In addition, the expression levels of anti-apoptotic genes Bcl-2 and c-Myc were downregulated. Western blot analysis showed that the expression levels of Bad, Bax, Cleaved caspase-3, Cleaved caspase-8 and Cleaved PARP were

*[基金项目] 国家自然科学基金(81700169); 贵州省科技合作计划项目[黔科合 LG 字(2012)009]

** 通信作者 E-mail: haoxj2013@126.com, liyanmei518@hotmail.com

网络出版时间: 2019-01-18 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190118.1118.007.html>

upregulated in dose-dependent manner; while the expression levels of JAK2, P-Stat3, Bcl-2, Caspase3, Caspase-8, PARP, P-ERK 1/2 and c-Myc were down-regulated in dose-dependent manner. Moreover, Isogarcinol significantly prolonged the survival of HEL tumor-bearing mice and increased the hematocrit ratio. **Conclusion:** Isogarcinol induces apoptosis of HEL cells and inhibits HEL cell proliferation, which may be achieved by inhibiting JAK2/STAT3 signaling pathway.

[**Key words**] isogarcinol; human erythroleukemia cell line; cell proliferation; apoptosis; JAK2/STAT3 signaling pathway

白血病是造血系统常见的恶性肿瘤,是严重危害人类健康的恶性疾病之一,化疗是治疗白血病的主要手段。传统的化疗药物在杀伤白血病细胞的同时,对人体正常细胞也产生较强的毒副作用,容易导致化疗失败^[1-3]。急性髓系白血病(acute myeloid leukaemia, AML)是一组造血干或祖细胞异常的克隆性恶性疾病,其典型特征为白血病克隆细胞成熟分化障碍而停滞在细胞发育阶段,且伴随凋亡抵抗和恶性增殖^[4]。长期以来,AML 细胞对化疗药物的凋亡抵抗是导致化疗失败和疾病复发的根源^[5]。新的药物和化疗方案在一定程度上改善了这种局面,因而急性早幼粒细胞白血病有望获得治愈。然而,大多数急性髓系白血病亚型的治疗,在目前仍然困难重重^[6]。已报道 AML 的发生与染色体易位、基因突变等多种因素有关,其致病机制尚未完全阐明^[7]。HEL(human erythroleukemia)细胞是 1982 年从红白血病患者外周血中分离的红白血细胞,经证实含有 JAK2V617F 突变。HEL 细胞在受到不同诱导因素的刺激时,有向红系、单核巨噬系或巨核系多向分化的潜能,因此具有很重要的研究价值^[8]。本研究采用不同浓度本课题组前期分离和鉴定的化合物 Isogarcinol 处理白血病细胞系 HEL 细胞^[9],探讨 Isogarcinol 对白血病细胞的凋亡和增殖的影响及可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

Isogarcinol 是本课题组前期分离和鉴定的化合物^[9],结构式如图 1。溶解于 DMSO(二甲基亚砜),储存浓度为 20 mmol/L, -20 ℃ 保存备用。RPMI 1640 培养液、胎牛血清购自美国 HyClone 公司。Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒购自美国 BD 公司,HiFiScript cDNA 合成试剂盒和 UltraSYBR 混合物购自 cwbiotech(中国北京)。引物由 Invitrogen(中国上海)制备,PARP、Cleaved PARP、ERK 1/2 和 p-ERK 1/2 等抗体均购自美国 CST 公司。流式

细胞仪为美国 BD 公司产品,实时荧光定量 PCR 仪为美国 ABI 公司产品。

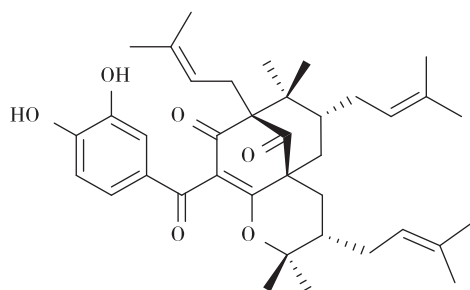


图 1 Isogarcinol 的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of Isogarcinol

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HEL 细胞来自加拿大多伦多大学,用 RPMI 1640 完全培养液(含有 10% 胎牛血清),置于 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱内培养,取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 MTT 法检测化合物 IC₅₀ 值 取对数期细胞,离心,用 10 % 胎牛血清的新鲜培养基重悬,按每孔 8 000 个细胞数接种于 96 孔板中,按浓度梯度为 20、10、5、2.5、1.25 μmol/L 加入 Isogarcinol 化合物,DMSO 为空白对照,放入培养箱中培养 72 h,每个浓度设置 4 个复孔。用显微镜采集图片,离心,去除细胞培养液,加入 10 μL 含 10% MTT 的新鲜培养液,继续培养 4 h 后,离心去除上清液,每孔加入 160 μL 的 DMSO,室温震荡 15 min,在 490 nm 光激发下用酶标仪测吸光度(OD)值。

1.2.3 细胞生长曲线测定 取对数期生长细胞,离心,用 10% 胎牛血清的新鲜培养基重悬,按每孔 8 000 个细胞数接种于 96 孔板中。待细胞稳定,加入浓度梯度为 15、10、5 μmol/L 的 Isogarcinol 化合物,DMSO 为空白对照。采用细胞计数板计数 12、24、36、48、72 h 的细胞数,并绘制细胞生长曲线。每个实验重复 3 次。

1.2.4 流式细胞术分析细胞凋亡 利用 Annexin V/PI 双染法通过流式细胞术检测 HEL 凋亡的情

况。用 DMSO 作对照,加入浓度梯度为 15、10、5 $\mu\text{mol/L}$ 的化合物 Isogarcinol 处理 12、24、48 h,计数每 10^6 个细胞用 100 μL $1 \times \text{binding buffer}$ 重悬,每 100 μL $1 \times \text{binding buffer}$ 各加入 5 μL 的 Annexin V 和 PI 染液,室温避光孵育 15 min,离心去除染液,用 200 μL $1 \times \text{binding buffer}$ 重悬,通过流式细胞分析仪上机检测。

1.2.5 RNA 提取和实时定量 RT-PCR (qRT-PCR)
将对数生长期 HEL 细胞以 $3 \times 10^8/\text{L}$ 浓度接种于 6 孔培养板中。培养 24 h 后,分别加入 Isogarcinol 终浓度为 5、10、15 $\mu\text{mol/L}$,对照组加入等量的 DMSO。24 h 后用 Trizol 试剂提取总 RNA,将各孔裂解液吸到 EP 管中,加入氯仿,用力振摇。室温下孵育 2~3 min,离心后,转移上层无色液体至新 EP 管中。加入异丙醇 0.5 mL,混匀。20 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 10 min,离心弃上清,沉淀加入 75% 乙醇 1 mL,用枪吹打均匀,离心后加入 DEPC 水溶解。用 cDNA 反转录试剂盒合成 cDNA, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。以反转录 cDNA 为模板, β -actin 为内参,荧光实时定量 RT-PCR 扩增 c-Myc、Bax、Bcl-2、Caspase-3、Caspase-8 基因,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Tab. 1 The sequences of primers were used in this study

基因	引物	序列(5'→3')
Caspase-8	Forward	GGGACAGGAATGGAACACACTTGG
	Reverse	TCAGGATGGTGAGAATATCATCGCC
Caspase-3	Forward	GAAATTGTGGAATTGATGCGTGTA
	Reverse	CTACAACGATCCCCTCTGAAAAA
c-Myc	Forward	TCCTGGCAAAAGGTCAGAGT
	Reverse	GTTGTGTGTTTCGCCCTCTTGA
Bax	Forward	CCCAGAGGTCITTTTCCGAG
	Reverse	CCAGCCCATGATGGTTCTGAT
Bcl-2	Forward	GTACTTAAAAATACAACATCACAG
	Reverse	CTTGATTCTGGTGTITCCC
β -actin	Forward	GCCAACACAGTGCTGTCT
	Reverse	AGGAGCAATGATCTTGATCTT

1.2.6 Western blot 实验 将对数生长期的 HEL 细胞以 $3 \times 10^8/\text{L}$ 浓度接种于 6 孔培养板中。培养 24 h 后,分别加入 Isogarcinol 终浓度为 5、10、15 $\mu\text{mol/L}$,对照组加入等量的 DMSO。24 h 后离心收集细胞沉淀,加入预冷的裂解液,冰上裂解细胞 30 min,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min,离心 12 min。取上清,即得到细胞总蛋白质。用 BCA 试剂盒测定蛋白质浓度,加入 5 \times SDS 上样缓冲液,100 $^{\circ}\text{C}$ 热变性 10 min。按相等上样量进行 SDS-PAGE,随后在冰

浴条件下进行湿转。转移完成后用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,加入一抗 PARP、cleaved PARP、ERK 1/2、p-ERK 1/2、Bax、Bad、p -Stat3、stat3、c-Myc、cleaved caspase-3、Capase-3、cleaved caspase8、Capase-8、Bcl-2、JAK2 和 β -actin 孵育,4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜。TBST 洗膜 3 次,加辣根过氧化物酶标记二抗室温作用 2 h,TBST 洗膜 3 次,然后用 LI-COR 进行扫膜。

1.2.7 小鼠体内实验 4~5 周龄的 SCID 小鼠购自北京华盛康盛科技有限公司,动物雌雄各半。随机分为生理盐水组(Blank)、DMSO 对照组、给药组按小鼠体质量 5、2.5 mg/kg Isogarcinol,腹腔注射给药,每两天注射 1 次,共注射 7 次,统计小鼠的存活时间和体质量。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 11.5 软件进行分析,结果表示为($\bar{x} \pm s$)。样本均数间的比较行方差分析,两两比较采用 t 检验,统计显著性设定为 P 值, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Isogarcinol 对人红白血病细胞系 HEL 活性及增殖能力影响

如图 2,通过 MTT 细胞活力测定 Isogarcinol 对 HEL 的活性,结果显示,Isogarcinol 对 HEL 细胞具有杀伤作用,在 Isogarcinol 浓度达到 10 $\mu\text{mol/L}$ 时,抑制率达到 85%,进一步计算得出其 IC_{50} 值为 5.4 $\mu\text{mol/L}$ 。同时通过显微镜观察发现 Isogarcinol 对 HEL 的细胞形态有影响;提示 Isogarcinol 能抑制 HEL 的细胞活性,同时用 Isogarcinol (0~15 $\mu\text{mol/L}$)处理细胞 12、24、36、48、72 h 后,采用细胞计数法绘制细胞生长曲线,显示出 Isogarcinol 显著抑制 HEL 细胞的增殖。

2.2 Isogarcinol 诱导人红白血病细胞系 HEL 凋亡

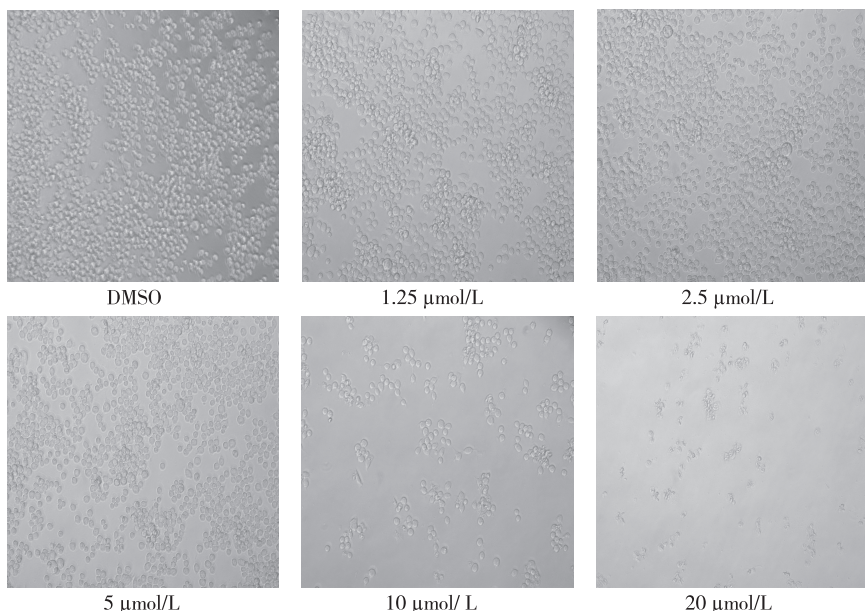
采用流式细胞仪分析了 Isogarcinol 处理后 HEL 细胞的凋亡,结果显示,不同浓度 Isogarcinol 处理后,HEL 细胞中凋亡细胞群中存在显著的剂量和时间依赖性(图 3)。在 Isogarcinol $> 10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 时,细胞凋亡率与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 < 0.01)。

2.3 Isogarcinol 在 RNA 水平上调控凋亡相关基因的表达

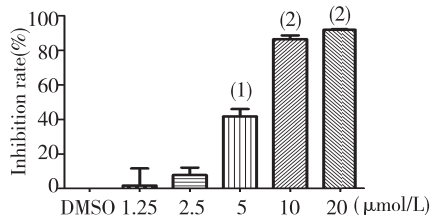
qRT-PCR 结果显示,Isogarcinol 处理 HEL 细胞后,促凋亡基因 Bax 的表达增加,Caspase-3、Caspase-8 的表达下调,抗凋亡基因 Bcl-2、c-Myc 的表达下

调(图4)。

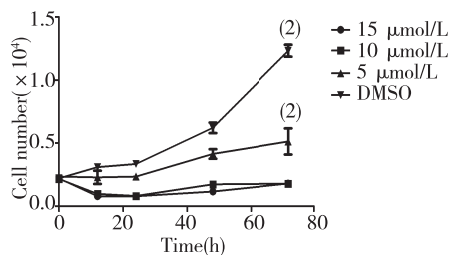
A



B



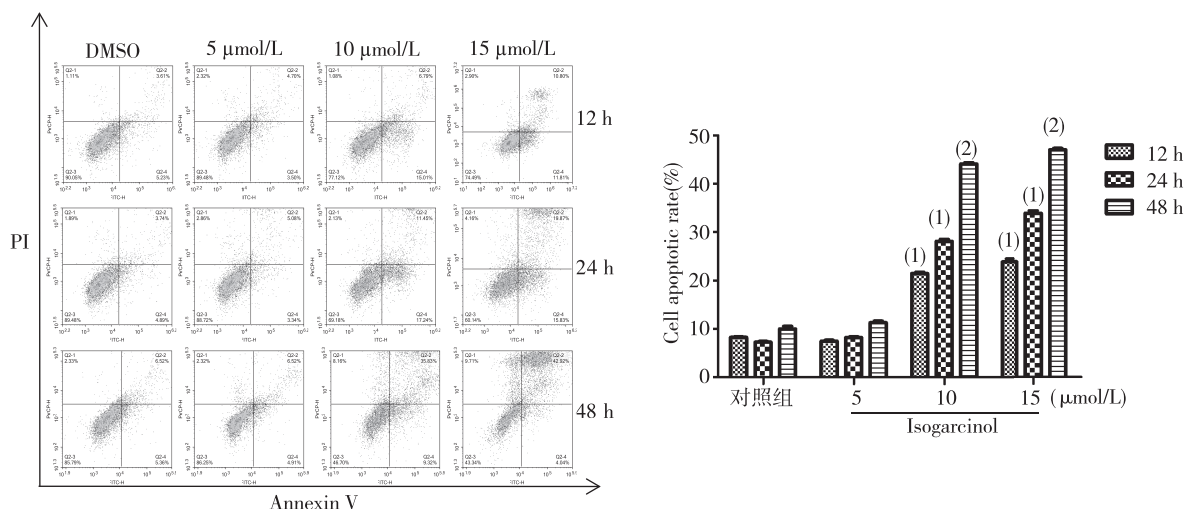
C



注:A和B示 Isogarcinol 对人红白血病细胞系 HEL 细胞活力和形态变化的影响,C 示 Isogarcinol 抑制 HEL 增殖

图2 Isogarcinol 对人红白血病细胞系 HEL 细胞活性及增殖的影响

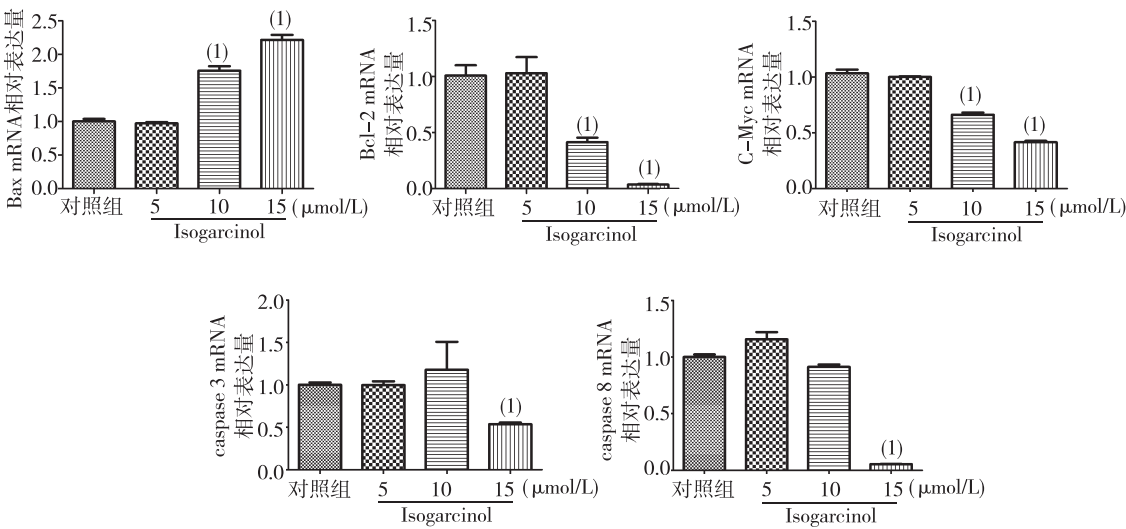
Fig. 2 The effect of Isogarcinol on viability of HEL cells



与对照组同时点比较, ⁽¹⁾ $P < 0.05$, ⁽²⁾ $P < 0.01$

图3 Isogarcinol 诱导人红白血病细胞系 HEL 细胞凋亡

Fig. 3 Isogarcinol induced HEL cell apoptosis



与对照组比较, ⁽¹⁾ $P < 0.05$

图 4 Isogarcinol 调控人红白血病细胞 HEL 中相关凋亡基因的表达 (qRT-PCR)

Fig.4 Effect of Isogarcinol on the mRNA expression levels of apoptosis-related genes

2.4 Isogarcinol 通过调节 JAK2/Stat3 以及凋亡蛋白的表达,诱导人红白血病细胞 HEL 的凋亡

为了阐明 Isogarcinol 诱导 HEL 细胞凋亡可能的机制,本研究通过 Western blot 检测了 Isogarcinol 处理后 HEL 细胞裂解液中 JAK2/Stat3 及相关凋亡蛋白的表达。结果显示,与对照组比较,Isogarcinol 各浓度组 Bad、Bax、cleaved caspase3、cleaved caspase8

和 cleaved PARP 的相对表达量呈浓度依赖性上调,而 Bcl-2、caspase3、caspase8、PARP、p-Erk 及 c-Myc 的相对表达量呈浓度依赖性下调 (图 5)。提示 Isogarcinol 能够下调 JAK2 及 p-Stat3 蛋白水平的表达,可能 Isogarcinol 通过调节 JAK2/ Stat3 信号通路进而影响下游相关凋亡蛋白表达,从而诱导 HEL 细胞发生凋亡。

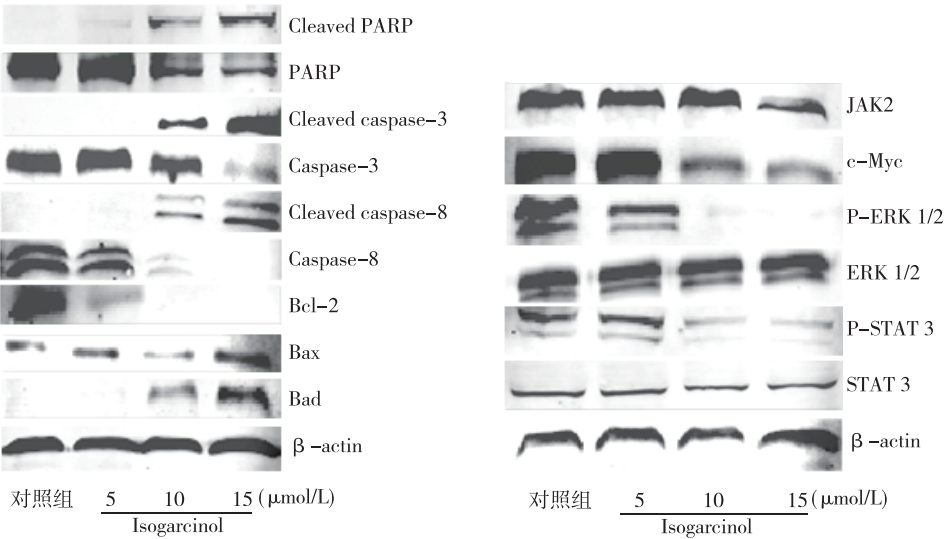


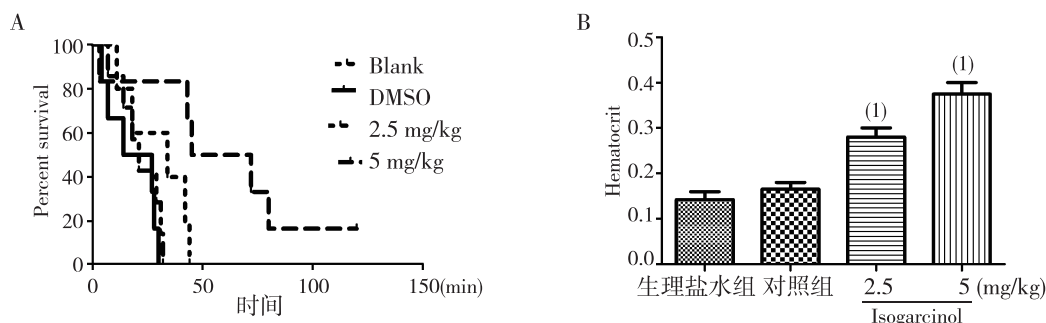
图 5 Isogarcinol 通过调控 JAK2/Stat3 途径中关键蛋白以及凋亡蛋白表达而诱导细胞凋亡

Fig.5 The effect of Isogarcinol on the expression levels of part of genes in JAK2/Stat3 pathway and apoptosis-related genes

2.5 Isogarcinol 延长白血病小鼠存活时间,提高血红细胞比容

体内实验结果表明,与对照组相比,Isogarcinol

显著延长了小鼠的存活时间,并且增加了血红细胞比(图6),表明 Isogarcinol 能够在体内抑制白血病的发生及发展。



与对照组比较, ⁽¹⁾ $P < 0.05$

图6 Isogarcinol 延长白血病小鼠存活时间并提高血红细胞比容

Fig.6 Isogarcinol prolonged the survival of HEL tumor-bearing mice and increased hematocrit

3 讨论

目前白血病的治疗手段主要有化疗、放疗、造血干细胞移植、生物靶向治疗、细胞免疫治疗等。然而,目前的治疗手段仍远远不能满足临床需求,白血病的治疗难度依旧很大,由此带来的家庭及社会负担依旧很重。因此,迫切需要寻找新的治疗方法和药物^[10-17]。AML 是一种造血干细胞的恶性克隆性疾病。AML 可由髓系细胞分化发育过程中造血干细胞或造血祖细胞恶性转化而来,也可继发于化疗、放疗或由其他疾病如骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndrome, MDS)、骨髓增殖性肿瘤(myeloproliferative neoplasm, MPN)演变而来,继发性 AML 在分子遗传特性上与原发性 AML 不同且临床预后较差^[18]。在 AML 中有很大大一部分病例发生基因突变从而导致了相应信号转导通路的异常,在原发性 AML 中,FLT3、NPM1、DNMT3 α 等是常见的突变^[19],而在继发于 MPNs 的 AML 中, JAK2、TENT、IDH1/2、ASXL1 等突变常见, JAK2-STAT 信号通路异常活化在 AML 发生中有重要作用^[20]。

JAK 是一类非受体酪氨酸激酶,它可以通过细胞因子或生长因子与相应受体结合而被激活。JAK 家族有包括 JAK1、JAK2、JAK3 及 TYK2。JAK 与细胞因子之间不存在个体对应,这表明 JAKs 各家族成员可以通过一种细胞因子被激活,并且几种不同的细胞因子也可以激活同一 JAK^[21]。STATs 是一类可以与脱氧核糖核酸(DNA)结合的特殊蛋

白家族。STAT 家族包括 STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5 和 STAT6。JAK 被诱导磷酸化后,活化 STAT 以形成二聚体,使 STAT 以二聚体形式进入细胞核并调节靶基因的表达^[22]。JAK-STAT 信号通路参与多种生理调节过程,涉及细胞的生长、分化、造血以及免疫功能等^[23]。近年来,在血液系统肿瘤中研究发现, JAK-STAT 通路在白血病、淋巴瘤及骨髓增殖性肿瘤的发病中具有重要作用^[24]。Seido Oku 通过干扰 RNA 阻断 JAK2-STAT5 通路发现,存在 JAK2V617 的 MPN 细胞增殖明显受到抑制,认为 JAK2V617F 可磷酸化下游 STAT3 通路^[25]。

本实验通过研究 Isogarcinol 对 HEL 细胞增殖及凋亡的影响,结果显示: Isogarcinol 作用于 HEL 细胞后,与 DMSO 对照组相比,显著抑制 HEL 细胞的增殖。流式细胞术结果显示, Isogarcinol 处理 HEL 细胞 12、24、48 h 后,随着 Isogarcinol 浓度的增加和作用时间的延长, Isogarcinol 组 HEL 细胞出现明显凋亡。实时荧光定量 PCR 结果显示,促凋亡基因 Bax 明显上调,而 Bcl2、caspase3、caspase8、PARP 及 c-Myc 显著下调。蛋白质免疫印迹结果显示, Isogarcinol 作用于 HEL 细胞 24 h,发现 JAK2、p-Stat3、Bcl2、caspase3、caspase8、PARP、p-Erk 和 c-Myc 相对表达量呈浓度依赖性的下调。Bad、Bax、cleaved caspase3、cleaved caspase8 及 cleaved PARP 的相对表达量呈浓度依赖性的上调。动物体内实验结果表明, Isogarcinol 小鼠组与 DMSO 对照组比,显著延长了小鼠的存活时间,并且增加了血红细胞比,表明 Isogarcinol 能够在体内抑制白血

病的发生及发展。以上实验结果表明: Isogarcinol 可显著抑制 HEL 细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 可以得出结论: Isogarcinol 可以通过抑制 JAK2/Stat3 信号通路, 导致参与细胞凋亡的基因出现明显变化, 并且诱导细胞凋亡。

4 参考文献

- [1] 贾秀红, 尹宝慧, 李建厂. 黄芪注射液对 U937 细胞增殖与凋亡的影响及相关机制的探讨[J]. 中国当代儿科杂志, 2013, 15(12): 1128 - 1133.
- [2] 刘笑梦, 曹娇玲, 臧玉柱. 人参皂苷对人白血病细胞凋亡的影响[J]. 中国当代儿科杂志, 2012, 14(10): 792 - 795.
- [3] 陈菲莉, 柳约坚, 李蓉蔚, 等. 雷公藤内酯与多柔比星诱导耐药白血病细胞凋亡协同作用及其机制的探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2014, 12(10): 728 - 731.
- [4] KHWAJA A, BJORKHOLM M, GALE R E, et al. Acute myeloid leukaemia[J]. Nature Reviews Disease Primers, 1998, 19(8): 493 - 494.
- [5] COOMBS C C, TALLMAN M S, LEVINE R L. Molecular therapy for acute myeloid leukaemia[J]. NATURE Reviews Clinical Oncology, 2016, 13(5): 305.
- [6] LO-COCO F, CICONI L, BRECCIA M. Current standard treatment of adult acute promyelocytic leukaemia[J]. British Journal of Haematology, 2016, 172(6): 841 - 854.
- [7] DÖHNER H, WEISDORF D J, BLOOMFIELD C D. Acute myeloid leukemia[J]. Gan to Kagaku Ryoho Cancer & Chemotherapy, 2001, 28(9): 1136 - 1152.
- [8] DELSAL G, LODA M, PAGANO M. Cell cycle and cancer: critical events at the G1 restriction point[J]. Crit Rev Oncog, 1996, 7(1 - 2): 127 - 142.
- [9] 范翊民. 多花山竹子中 PPBS 类成分的分离与新型 Wnt 信号通路激活剂莪术醇的结构优化[D]. 贵阳: 贵州大学, 2016.
- [10] LÖWENBERG B, DOWNING J R, BURNETT A. Acute myeloid leukemia[J]. N Engl J Med, 1999, 341(14): 1051 - 1062.
- [11] SWIRSKY D M, BASTOS M D, PARISH S E, et al. Features affecting outcome during remission induction of acute myeloid leukaemia in 619 adult patients [J]. British Journal of Haematology, 2010, 64(3): 435 - 453.
- [12] BOLAÑOSMEADE J, GUO C, GOJO I, et al. A phase II study of timed sequential therapy of acute myelogenous leukemia (AML) for patients over the age of 60: two cy-

cle timed sequential therapy with topotecan, ara-C and mitoxantrone in adults with poor-risk AML [J]. Leuk Res, 2004, 28(6): 571 - 577.

- [13] CASTAIGNE S, CHEVRET S, ARCHIMBAUD E, et al. Randomized comparison of double induction and timed-sequential induction to a "3 + 7" induction in adults with AML: long-term analysis of the Acute Leukemia French Association (ALFA) 9000 study[J]. Blood, 2004, 104(8): 2467 - 2474.
- [14] BOLANOS-MEADE J, KARP J E, GUO C, et al. Timed sequential therapy of acute myelogenous leukemia in adults: a phase II study of retinoids in combination with the sequential administration of cytosine arabinoside, idarubicin and etoposide[J]. Leuk Res, 2003, 27(4): 313 - 321.
- [15] GRIMWADE D, WALKER H, OLIVER F, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties[J]. Blood, 1998, 92(7): 2322 - 2333.
- [16] PETTENATI M J, PATIL S R, WATSON M S, et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461) [J]. Blood, 2002, 100(13): 4325.
- [17] MARCUCCI G, MRÓZEK K, RUPPERT A S, et al. Abnormal cytogenetics at date of morphologic complete remission predicts short overall and disease-free survival, and higher relapse rate in adult acute myeloid leukemia: results from cancer and leukemia group B study 8461 [J]. Journal of Clinical Oncology Official Journal of the American Society of Clinical Oncology, 2004, 22(12): 2410.
- [18] RAMPAL R, MASCARENHAS J. Pathogenesis and management of acute myeloid leukemia that has evolved from a myeloproliferative neoplasm [J]. Current Opinion in Hematology, 2014, 21(2): 65 - 71.
- [19] NETWORK C G A. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia[J]. New England Journal of Medicine, 2013, 369(1): 2059 - 2074.
- [20] ZHANG S J, RAMPAL R, MANSHOURI T, et al. Genetic analysis of patients with leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms shows recurrent SRSF2 mutations that are associated with adverse outcome [J]. Blood, 2012, 119(19): 4480 - 4485.

(下转第 47 页)