

· 药理与临床 ·

芒果苷诱导白血病 K562 细胞凋亡机制的研究

彭志刚¹, 罗 军¹, 赖永榕¹, 宋善俊²(1. 广西医科大学第一附属医院 血液科, 广西南宁 530021; 2. 华中科技大学同济医学院
附属协和医院 血液科, 湖北 武汉 430021)

摘要:目的 研究芒果苷诱导慢粒白血病细胞系 K562 细胞凋亡的机制。方法 采用 RT-PCR 检测芒果苷 (25~200 $\mu\text{mol/L}$) 处理 (24、48、72、96 h) 后 K562 细胞中 bcl-2 mRNA、bax mRNA、survivin mRNA 基因表达变化; 采用 Western blotting 方法检测 K562 细胞 BCR/ABL 融合蛋白质 P₂₁₀ 水平。结果 芒果苷作用 K562 细胞后, P₂₁₀ 蛋白质水平下调, 并呈时间及剂量依赖性, bax 基因表达显著上调, bcl-2 基因表达轻度下调, survivin mRNA 基因表达下调。结论 芒果苷诱导 K562 细胞凋亡的机制可能是通过下调 BCR/ABL 融合蛋白质 P₂₁₀、bcl-2 和 survivin mRNA 基因表达及上调 bax 基因表达来实现的。

关键词: 芒果苷; K562 白血病细胞; 细胞凋亡

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)05-0715-05

Apoptotic mechanism of leukemic K562 cells induced by mangiferin

PENG Zhi-gang¹, LUO Jun¹, LAI Yong-rong¹, SONG Shan-jun²

(1. Department of Hematology, The First Affiliated Hospital, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China;

2. Department of Hematology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University
of Science and Technology, Wuhan 430021, China)

Abstract: Objective To study the apoptosis mechanism of K562 cell lines induced by mangiferin. **Methods** The mRNA expression levels of apoptosis-related genes including bcl-2, bax, survivin of K562 cells treated by mangiferin (25—200 $\mu\text{mol/L}$) for 24, 48, 72, and 96 h were determined by RT-PCR; the BCR/ABL protein P₂₁₀ level was detected by Western blotting. **Results** Mangiferin up-regulated bax gene of K562 cells significantly and down-regulated bcl-2 gene slightly, resulting in an enhancement of the ratio of bax/bcl-2. Mangiferin down-regulated the expression levels of P₂₁₀ in K562 cells in a time- and concentration-dependent manner and so is the expression level of survivin mRNA in K562 cells. **Conclusion** The mechanism of mangiferin-induced apoptosis in K562 leukemic cells might be involved in up-regulating the gene expression of bax and down-regulating the mRNA expression of BCR/ABL protein P₂₁₀, bcl-2, and survivin.

Key words: mangiferin; K562 leukemic cells; apoptosis

近年研究表明,肿瘤的发生发展不仅是细胞增殖失控的结果,也是由于细胞凋亡受阻所致^[1]。因此,诱导和加速肿瘤细胞凋亡已经成为目前治疗恶性肿瘤的重要手段。已有许多报道,多种天然黄酮类化合物具有诱导白血病细胞凋亡的作用^[2~5],黄华艺等^[6]研究发现从广西本地芒果树中提取的黄酮类化合物芒果苷能诱导人肝癌细胞株 BEL-7404 细胞凋亡。笔者的初步研究发现,芒果苷能显著抑制慢性粒细胞白血病细胞系 K562 细胞增殖^[7]和诱导 K562 细胞凋亡^[8],但芒果苷诱导白血病 K562 细胞

凋亡的具体机制尚不明确。为此,本实验采用 RT-PCR、免疫印迹等技术,进一步研究芒果苷抗白血病增殖作用的机制,以探讨芒果苷在白血病中是否具有潜在治疗价值。

1 材料

RPMI-1640 培养基及 Trizol 试剂购自美国 Gibco,小牛血清 (Hyclone);逆转录酶 MMLV、Taq 酶、dNTP、Oligo 均购自 Promega 公司;蛋白预染分子量标准 (大连宝生物公司)、PVDF 膜 (美国 Bio-Rad 公司)、BCR-N20 (美国 Santa Crous 公司)、辣

收稿日期: 2006-08-19

作者简介: 彭志刚 (1966—),男,湖南祁东县人,医学博士,教授,硕士生导师,广西医科大学第一附属医院血液内科副主任,中华医学会广西血液学会副主任委员兼秘书,主要从事血液肿瘤的临床和实验研究。

Tel: (0771) 5350322 E-mail: zgpeng@hotmail.com

根酶标记山羊抗兔 IgG (H+L) (北京中山生物技术公司)、Monoclonal Anti- β -Actin (Sigma 公司)、辣根酶标记山羊抗大鼠 IgG (H+L) (北京中山生物技术公司)、显色液 (Ecl A 液+Ecl B 液) (美国 Pierce 公司)、FITC 标记的抗 IgG1 (美国 Pharmingen 公司);芒果苷由广西民族医院临床医学研究所中心实验室黄华艺博士赠予,质量分数为 99.5%,用 2% NaHCO_3 配制 10 mmol/L,分装冻存。

2 实验方法

2.1 细胞培养:人慢性髓细胞白血病细胞株 K562 细胞购自中国科学院上海细胞研究所细胞库,置于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养体系中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的饱和湿度培养箱中培养。取对数生长期细胞用于实验。细胞初始浓度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$,设空白对照组,实验组 (25、50、100、150、200 $\mu\text{mol/L}$ 芒果苷) 分别作用 K562 细胞 24、48、72、96 h。

2.2 RT-PCR 检测 bcl-2、bax 及 survivin mRNA:用 Trizol RNA 提取试剂盒提取总 RNA, RNA 定量采用紫外分光光度计,取 1 μg RNA,加逆转录酶 MMLV200U,按随机六聚脱氧核苷酸引物合成法合成 cDNA。bcl-2、bax 和 survivin 基因扩增的引物及内参照 β -actin 引物均由大连宝生物公司合成, β -actin 和 bcl-2 引物序列设计参照文献方法^[9],bax 和 survivin 引物设计分别参照文献方法^[10,11], β -actin 正义链:5'-GTGGGGCGCCCCAGCACCA-3',反义链:5'-CTCCTTAATGTACGCACGATTTC-3',扩增产物长度为 548 bp;bcl-2 正义链:5'-CGACGACTTCTCCCGCCGCTACCGC-3',反义链:5'-CCGCATGCTGGGGCCGTACAGTTCC-3',扩增产物为 318 bp;bax 正义链:5'-TCCACCAAGAAGCTGAGCGAG-3',反义链:5'-GTCCAGGCCCATGATGGTTCT-3',扩增产物为 257 bp;survivin 的引物^[11]:正义链:5'-TTGGCAGGTGCCTGTTGAAT-3',反义链:5'-AGCCAGTCCC-CACAGCAT-3',扩增产物为 465 bp。bcl-2 扩增为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 50 s,扩增 30 个循环。bax 扩增为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 50 s,70 $^{\circ}\text{C}$ 退火 60 s,扩增 30 个循环。survivin 扩增为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 50 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s,扩增 30 个循环。每份样本以 β -actin 作为内参照。1.5% 琼脂糖凝胶 (含溴乙锭) 100 V 等压电泳观察结果,以目的基因与 β -actin 吸光度比值作为其相对表达量。

2.3 Western blotting 检测 BCR/ABL 融合蛋白质 P_{210} 水平:提取总蛋白,-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。用 Lowry 法测定蛋白质的量,取 30 μg 待测蛋白质样品,加入上样缓冲液,煮沸 5 min,立即置冰上;加样,及预染 Marker,行 SDS-PAGE 电染,恒流 30 $\text{mA} \times 2 \sim 3$ h。在转膜缓冲液中进行蛋白质的电转移至 PVDF 膜,4 $^{\circ}\text{C}$ 恒流 250 $\text{mA} \times 2$ h。靶蛋白与抗体反应:PVDF 膜用 5% 脱脂奶粉 (TBST 配制) 封闭,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;TBST 漂洗 PVDF 膜 10 min $\times$ 3 次,加入 1:1 000 稀释的第一抗体 (BCR-N20),常温 2 h;PBS 漂洗 PVDF 膜 10 min $\times$ 3 次,加入 1:2 000 稀释的辣根过氧化物酶标记羊抗 IgG (H+L),常温 2 h。以 β -actin 作为内参照,操作方法同上。予 ECL 试剂盒显色,曝光,Photoshop 6.0 软件半定量分析结果。

2.4 统计学分析:各实验均重复 3 次以上,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,实验组与对照组间用独立样本 t 检验进行显著性差异比较,多组间比较采用单因素方差分析。应用统计学软件 SPSS10.0 进行统计分析处理。

3 结果

3.1 K562 细胞 bax 与 bcl-2 mRNA 表达的比值增高:经 100 $\mu\text{mol/L}$ 芒果苷作用 24~96 h 后,随作用时间延长,K562 细胞 bax mRNA 的相对表达量 (与内参照 β -actin 的比值) 逐渐增加,呈显著的时间依赖性,与同浓度点对照组相比,96 h 组的 bax mRNA 明显上调 (1.91 ± 0.02 vs 0.86 ± 0.01 , $P < 0.01$);经不同浓度芒果苷作用 24 h 后,bcl-2 mRNA 的表达则随浓度增加而略有下调,与未加药对照组相比,100 $\mu\text{mol/L}$ 芒果苷作用组使细胞 bcl-2 mRNA 相对表达量下调 (1.28 ± 0.03 vs 1.52 ± 0.05 , $P < 0.05$)。另外,对不同浓度芒果苷作用不同时间后 K562 细胞 bax 与 bcl-2 mRNA 表达的比值的检测显示,随作用浓度和时间的增加,该比值逐渐增大,与空白对照组相比,100 $\mu\text{mol/L}$ 作用 96 h 和 200 $\mu\text{mol/L}$ 作用 24 h 组的 bax/bcl-2 值均显著上调,分别为 (2.89 ± 0.05 vs 1.23 ± 0.05 , $P < 0.01$) 和 (1.86 ± 0.02 vs 1.23 ± 0.05 , $P < 0.05$)。结果见表 1 和 2、图 1 和 2。

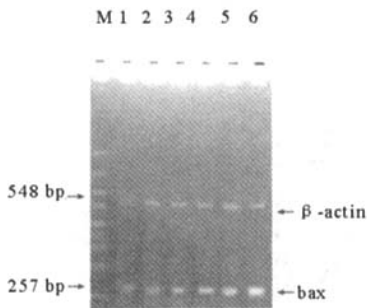
3.2 K562 细胞 survivin mRNA 的表达减弱:经 25~200 $\mu\text{mol/L}$ 芒果苷作用 24 h 后,K562 细胞 survivin mRNA 的表达水平即有降低,与未加药对照组相比,200 $\mu\text{mol/L}$ 芒果苷作用 24 h,细胞 survivin mRNA 相对表达量明显减少 (0.85 ± 0.02 vs 1.51 ± 0.02 , $P < 0.01$)。经 100 $\mu\text{mol/L}$ 芒果苷作用 K562 细胞 24~96 h 组,随作用时间延长,K562

表 1 芒果苷 (100 μmol/L) 作用 K562 细胞不同时间后 bax mRNA 表达量和 bax/bcl-2 值 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Expression of bax and ratio of bax/bcl-2 of K562 cells treated with mangiferin (100 μmol/L) for various times ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组 别	作用时间/h	bax mRNA 相对表达量	bax/bcl-2 值
对照	—	0.86±0.01	1.23±0.05
芒果苷	24	1.24±0.03**	1.79±0.04*
	48	1.51±0.02**	2.09±0.06**
	72	1.82±0.03**	2.47±0.04**
	96	1.91±0.02**	2.89±0.05**

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$
 * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group



M-Marker 1~6-0,25,50,100,150,200 μmol/L 芒果苷
 M-Marker 1~6-0, 25, 50, 100, 150, 200 μmol/L mangiferin

图 1 不同浓度芒果苷作用 K562 细胞 24 h 后 bax mRNA 的表达

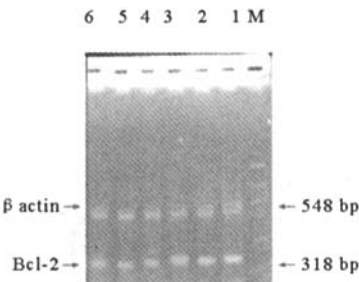
Fig. 1 Expression of bax mRNA of K562 cells treated with mangiferin for 24 h at various concentrations

表 2 不同浓度芒果苷作用 K562 细胞 24 h 后 bcl-2 mRNA 表达量和 bax/bcl-2 值 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
 Table 2 Expression of bcl-2 mRNA and ratio of bax/bcl-2 of K562 cells treated with mangiferin for 24 h at various concentrations ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组 别	剂量/(μmol · L ⁻¹)	bcl-2 mRNA 相对表达量	bax/bcl-2 值
对照	—	1.52±0.04	1.23±0.05
芒果苷	25	1.50±0.03	1.57±0.04*
	50	1.48±0.04	1.68±0.04*
	100	1.28±0.03*	1.79±0.03*
	150	1.21±0.02*	1.81±0.05*
	200	1.19±0.02*	1.86±0.04*

与对照组比较: * $P<0.05$
 * $P<0.05$ vs control group

细胞 survivin mRNA 的相对表达量逐渐下降,呈显著的时间依赖性,与同浓度点对照组相比,96 h 组 survivin mRNA 表达明显减弱 (0.79 ± 0.02 vs 1.43 ± 0.02 , $P<0.01$)。表明,芒果苷可抑制 K562 细胞 survivin mRNA 表达,且与药物作用浓度和时间有关,见表 3 和 4 及图 3。



M-Marker 1~6-0,25,50,100,150,200 μmol/L 芒果苷
 M-Marker 1~6-0, 25, 50, 100, 150, 200 μmol/L mangiferin

图 2 不同浓度芒果苷作用 K562 细胞 24 h 后 bcl-2 mRNA 的表达

Fig. 2 Expression of bcl-2 mRNA of K562 cells treated with mangiferin for 24 h at various concentrations

表 3 不同浓度芒果苷作用 K562 细胞 24 h 后 survivin mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 3 Expression of survivin mRNA of K562 cells treated with mangiferin for 24 h at various concentrations ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组 别	剂量/(μmol · L ⁻¹)	survivin mRNA 相对表达量
对照	—	1.51±0.02
芒果苷	25	1.31±0.02*
	50	1.23±0.03**
	100	1.18±0.02**
	150	0.96±0.03**
	200	0.85±0.03**

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$
 * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group

表 4 芒果苷 (100 μmol/L) 作用 K562 细胞不同时间后 survivin mRNA 的表达量 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

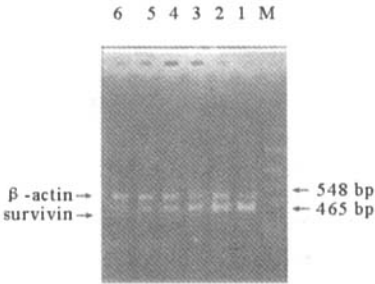
Table 4 Expression of survivin mRNA of K562 cells treated with mangiferin (100 μmol/L) for various times ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组 别	作用时间/h	survivin mRNA 相对表达量
对照	—	1.43±0.02
芒果苷	24	1.21±0.03*
	48	1.19±0.02*
	72	0.87±0.03**
	96	0.79±0.02**

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$
 * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group

3.3 芒果苷作用后 K562 细胞 BCR/ABL 蛋白质 P₂₁₀水平降低:经 25~200 μmol/L 芒果苷作用 72 h,K562 细胞 BCR/ABL 融合蛋白质 P₂₁₀的表达水平随药物浓度的增高呈进行下降趋势,P₂₁₀的相对表达水平(与内参照 β-actin 的比值)由对照组的 1.31 ± 0.01 降至 200 μmol/L 组的 0.53 ± 0.01

($P<0.01$)；经 100 $\mu\text{mol/L}$ 芒果苷作用 0~72 h 后, P_{210} 水平随作用时间延长而趋下降 ($P<0.01$)。表明, 芒果苷以剂量和时间依赖性下调 K562 细胞 P_{210} 水平。见表 5 和 6 及图 4 和 5。



M-Marker 1~6-0,25,50,100,150,200 $\mu\text{mol/L}$ 芒果苷
M-Marker 1—6-0,25,50,100,150,200 $\mu\text{mol/L}$ mangiferin

图 3 不同浓度芒果苷作用 K562 细胞 24 h 后 survivin mRNA 的表达

Fig. 3 Expression of survivin mRNA of K562 cells treated with mangiferin for 24 h at various concentrations

表 5 不同浓度芒果苷作用 K562 细胞 72 h 后 P_{210} 的表达 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Expression of P_{210} of K562 cells treated with mangiferin for 72 h at various concentrations ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组 别	剂量/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	P_{210} 相对表达水平
对照	—	1.31 $\pm$ 0.01
芒果苷	50	0.98 $\pm$ 0.02*
	100	0.67 $\pm$ 0.03**
	200	0.53 $\pm$ 0.01**

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$
* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group

表 6 芒果苷 (100 $\mu\text{mol/L}$) 作用 K562 细胞不同时间后 P_{210} 的表达 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

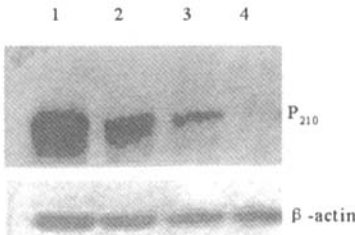
Table 6 Expression of P_{210} of K562 cells treated with mangiferin (100 $\mu\text{mol/L}$) for various times ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组 别	作用时间/h	P_{210} 相对表达水平
对照	—	1.56 $\pm$ 0.03
芒果苷	24	1.32 $\pm$ 0.01*
	48	0.92 $\pm$ 0.02**
	72	0.74 $\pm$ 0.02**

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$
* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group

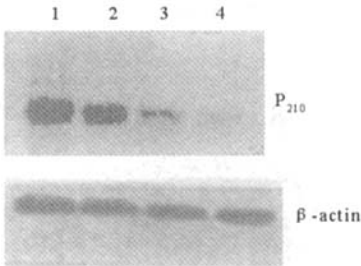
4 讨论

细胞凋亡的调控机制十分复杂, 受到多个环节, 多个因素的影响, 而 bcl-2 家族是目前最重视的调控细胞凋亡的基因家族, 分为两类: 凋亡抑制基因和



1-对照组 2~4-50,100,200 $\mu\text{mol/L}$ 芒果苷
1-control group 2—4-50, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$ mangiferin

图 4 不同浓度芒果苷作用 K562 细胞 72 h 后 P_{210} 的表达
Fig. 4 Expression of P_{210} of K562 cells treated with mangiferin for 72 h at various concentrations



1-对照组 2~4-24,48,72 h 组
1-control group 2—4-24, 48, 72 h group

图 5 芒果苷 (100 $\mu\text{mol/L}$) 作用 K562 细胞不同时间后 P_{210} 的表达

Fig. 5 Expression of P_{210} of K562 cells treated with mangiferin (100 $\mu\text{mol/L}$) for various times

凋亡诱导基因。bcl-2 的过度表达可抑制射线、抗癌药等诱导的细胞凋亡, 是肿瘤细胞耐药的主要机制, 而 bax 过度表达可促进细胞凋亡。bax 与 bcl-2 有很高的同源性, 两者可自行或相互形成同/异源二聚体, 在线粒体上形成膜通道, 调节细胞凋亡。因此, 通过药物、单抗、反义寡核苷酸等手段上调 bax/bcl-2 值可诱导肿瘤细胞凋亡。本研究使用 RT-PCR 方法检测发现, 100 $\mu\text{mol/L}$ 芒果苷作用 K562 细胞 24~96 h 后, bax mRNA 表达随着作用时间的延长逐渐升高, 不同浓度芒果苷作用 24 h 后, bcl-2 mRNA 的表达则随浓度增加而略有下调, 同时还发现芒果苷能上调 bax/bcl-2 的值, 并呈浓度及时间依赖性, 经相关性分析, bax/bcl-2 值与细胞凋亡率呈明显正相关。故推测, 芒果苷诱导 K562 细胞凋亡可能与其调节 bax 及 bcl-2 基因的表达, 尤其上调 bax 基因表达有关。

90%~95% 的慢粒患者具有 Ph 染色体, 其分子基础是 bcr/abl 基因重组, 其基因产物 BCR/ABL 融合蛋白质 P_{210} 对 CML 细胞增殖和凋亡的调

控起重要作用。Deora 等^[12]研究发现,黄酮类化合物槲皮素、金雀异黄素能通过下调 BCR/ABL P_{210} 表达而诱导 K562 细胞凋亡和分化, IC_{50} 分别 9.2、11.8 mg/mL 的槲皮素和金雀异黄素作用 K562 细胞 72 h 后,细胞凋亡率分别为 68% 和 16%,其 P_{210} 水平也分别下降 74% 和 77.8%。本课题组发现,芒果苷能使 bcr/abl 基因的转录下调^[8],同时还发现,在体外芒果苷能以明显的剂量及时间依赖方式下调 K562 细胞 BCR/ABL 蛋白质 P_{210} 水平。且 K562 细胞凋亡率与 bcr/abl mRNA 和 P_{210} 相对表达量间呈显著负相关。故推测,芒果苷可能通过抑制 bcr/abl mRNA 和/或 P_{210} 的表达,最终促进了 K562 细胞凋亡。笔者认为,从广西本地芒果树叶中提取的芒果苷有可能拓宽应用范围,有望用于临床治疗 bcr/abl 表达阳性的白血病。

Survivin 是凋亡抑制蛋白 (IAPs) 家族中的新成员,是迄今发现的最强的凋亡抑制因子。Survivin 已被视为肿瘤相关蛋白,参与肿瘤的发生、发展,并与肿瘤的预后密切相关,因此,Survivin 有可能作为肿瘤治疗的新靶点。现已发现 Survivin 在正常分化成熟组织中无表达,在常见的肿瘤如肺癌、胃癌、黑色素瘤、结直肠癌等,以及人类造血系统恶性肿瘤白血病细胞及其白血病细胞系如 HL-60、K562 等均有 Survivin 表达^[13]。Nakayama 等^[14]研究发现,黄酮类化合物槲皮素能抑制结肠癌细胞株 survivin 的表达。本研究也表明,芒果苷能抑制白血病 K562 细胞 survivin 基因的表达,不同浓度芒果苷作用不同时间后,K562 细胞 survivin 表达量呈时间及浓度依赖性下调,并与芒果苷诱导的 K562 细胞凋亡程度呈显著相关。故认为,芒果苷抑制 survivin 表达可能是其诱导白血病细胞凋亡的另一种方式。

上述研究结果表明,芒果苷在体外诱导慢粒白血病细胞系 K562 细胞凋亡的机制可能涉及多种凋亡相关基因及蛋白,芒果苷不仅可上调 bax/bcl-2 的值及 Fas 蛋白表达,下调 survivin 基因表达,还能特异地下调 bcr/abl mRNA 表达和 BCR/ABL 蛋白质 P_{210} 水平。提示,芒果苷有望成为一种新型的抗白血病药物,尤其在 bcr/abl 表达阳性白血病的治疗中发挥作用。

References:

- [1] Thompson C B. Apoptosis in pathogenesis and treatment of disease [J]. *Science*, 1995, 267: 1465-1470.
- [2] Lee W R, Shen S S, Lin H Y, et al. Wogonin and fisetin induce apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by decrease of reactive oxygen species and activation of caspase 3 and Ca^{2+} -dependent endonuclease [J]. *Biochem Pharmacol*, 2002, 63(2): 225-236.
- [3] Decker R H, Dai Y, Grant S. The cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol induces apoptosis in human leukemia cell (U937) through the mitochondrial rather than receptor-mediated pathway [J]. *Cell Death Differ*, 2001, 8(7): 715-724.
- [4] Kajimoto S, Takanshi N, Kajimoto T, et al. Sophoranolone, extracted from a traditional Chinese medicine Shan Dou Gan, induce apoptosis in human leukemia U937 cells via formation of reactive oxygen species and opening of mitochondrial permeability transition pores [J]. *Int J Cancer*, 2002, 1999(6): 876-890.
- [5] Cipák L, Rauko P, Miadokova E, et al. Effects of flavonoids on cisplatin-induced apoptosis of HL-60 and L120 leukemia cells [J]. *Leuk Res*, 2003, 2(1): 65-72.
- [6] Huang H Y, Nong C Z, Guo L X, et al. The proliferation inhibition effect and apoptosis induction of mangiferin on BEL-7404 human hepatocellular carcinoma cell [J]. *Chin J Dig* (中华消化杂志), 2002, 22(6): 341-343.
- [7] Peng Z G, Luo J, Xia L H, et al. Inhibitory effect of mangiferin on the proliferation of K562 leukemia cells [J]. *Acta Guangxi Med Univ* (广西医科大学学报), 2004, 21(2): 168-170.
- [8] Peng Z G, Luo J, Xia L H, et al. CML cell line K562 cell apoptosis induced by mangiferin [J]. *J Exp Hematol* (中国实验血液学杂志), 2004, 12(5): 590-594.
- [9] Tu Y D, Xu F H, Liu J, et al. Upregulated expression of Bcl-2 in multiple myeloma cells induced by exposure to doxorubicin, etoposide, and hydrogen peroxide [J]. *Blood*, 1996, 88: 1805-1812.
- [10] Oltral Z N, Milliam G L, Korsmeyer S J. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death [J]. *Cell*, 1993, 74: 609-619.
- [11] Shinozawa I, Inokuchi K, Wkabayashi I, et al. Disturbed expression of the anti-apoptosis gene, survivin and EPR-1 in hematological malignancies [J]. *Leuk Res*, 2000, 24: 965-970.
- [12] Deora A B, Miranda M B, Rao S G. Down-modulation of P_{210} bcr/abl induce apoptosis/differentiation in K562 leukemia blast cells [J]. *Tumori*, 1997, 83(4): 756-761.
- [13] Adida C, Crotty P L, Mograth J, et al. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation [J]. *Am J Pathol*, 1998, 152(1): 43-49.
- [14] Nakayama Y, Sakamoto H, Satoh K, et al. Tamoxifen and gonadal steroids inhibit colon cancer growth in association with inhibition of thymidylate synthase survivin and telomerase expression through estrogen receptor beta mediated system [J]. *Cancer Lett*, 2000, 161(1): 63-71.