

去甲斑蝥素抗骨髓瘤作用及其机制研究

杜恒飞¹, 于路佳², 蒙艳凤¹, 吕鸿雁¹, 张金巧^{1*}

1. 河北医科大学第三医院 血液科, 河北 石家庄 050051

2. 淄博市第一医院 血液科, 山东 淄博 255200

摘要: 目的 探讨去甲斑蝥素(norcantharidin, NCTD)抗骨髓瘤作用及其相关机制。方法 MTT法检测NCTD对人骨髓瘤细胞株RPMI 8226增殖的抑制作用,并观察其对荷瘤小鼠肿瘤生长的抑制作用;流式细胞术检测细胞凋亡率,Western blotting检测核因子- κ B(NF- κ B) p65、磷酸化NF- κ B p65(p-NF- κ B p65)、NF- κ B抑制因子I κ B α 、磷酸化I κ B α (p-I κ B α)、I κ B激酶 α (IKK α)以及Survivin、Bcl-2、Bax蛋白表达水平,分光光度法检测Caspase-3活性,RT-PCR检测NF- κ B mRNA表达。结果 NCTD抑制RPMI 8226细胞增殖,促进其凋亡;其剂量为20、40 mg/kg时对荷瘤小鼠的抑瘤率分别为29.8%、53.5%。NCTD抑制胞核NF- κ B p65、p-NF- κ B p65以及胞浆p-I κ B α 、IKK α 的表达,增加胞浆I κ B α 的表达,对胞浆NF- κ B p65的表达无显著影响。NCTD还抑制Survivin、Bcl-2蛋白的表达,促进Bax的表达和RPMI 8226细胞Caspase-3的活化,Caspase-3抑制剂能部分拮抗NCTD引起的RPMI 8226细胞凋亡($P < 0.05$)。结论 NCTD对RPMI 8226细胞有抗增殖和促凋亡作用,其机制可能与NF- κ B信号通路有关。

关键词: 去甲斑蝥素; 多发性骨髓瘤; NF- κ B; Caspase-3; 细胞凋亡

中图分类号: R282.710.5; R979.19 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)12-2479-05

Anti-myeloma effects of norcantharidin and its mechanism

DU Heng-fei¹, YU Lu-jia², MENG Yan-feng¹, LV Hong-yan¹, ZHANG Jin-qiao¹

1. Department of Hematology, Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, China

2. Department of Hematology, First Hospital of Zibo, Zibo 255200, China

Abstract: Objective To explore the anti-myeloma effect of norcantharidin (NCTD) and the possible mechanism. **Methods** Human multiple myeloma (MM) cell line RPMI 8226 was treated with different concentration of NCTD. MTT was used to detect cell proliferation. The inhibition of NCTD on the growth of BALB/C nu tumor-bearing mice was observed. Flow cytometry was used to determine apoptosis. The protein expression of nuclear factor- κ B (NF- κ B) p65, phosphorylated NF- κ B p65 (p-NF- κ B p65), and its inhibitor I κ B α , phosphorylated I κ B α (p-I κ B α), I κ B kinase α (IKK α) and the protein expression of Survivin, Bcl-2, and Bax were determined by Western blotting. Spectrophotometry was used to examine the activity of Caspase-3. RT-PCR was used to determine the mRNA expression of NF- κ B. **Results** NCTD could inhibit the proliferation and induce apoptosis of RPMI 8226 cell *in vitro*. The inhibition rates to tumor-bearing mice were 29.8% and 53.3% at the dose of 20 and 40 mg/kg, respectively. NCTD inhibited the growth of transplanted tumor in mice in a dose-dependent manner. The nuclear protein expression of NF- κ B p65 and p-NF- κ B p65 and the cytoplasm expression of p-I κ B α and IKK α were inhibited by NCTD in a time-dose dependent manner. The cytoplasm expression of I κ B α was increased while the cytoplasm expression of NF- κ B p65 was unchanged. NCTD inhibited the protein expression of Survivin and Bcl-2, while the expression of Bax and the activation of Caspase-3 were improved in a dose dependent manner. The inhibitor of Caspase-3 z-DEVD-fmk could inhibit the RPMI 8226 apoptosis induced by NCTD ($P < 0.05$). **Conclusion** Our results suggest that NCTD could inhibit the proliferation and induce apoptosis in RPMI 8226 via NF- κ B/IKK α signaling pathway, for which the mechanism may be related to NF- κ B-regulated gene products including survivin, Bcl-2, Bax and Caspase-3.

Key words: norcantharidin (NCTD); multiple myeloma (MM); nuclear factor-kappa B (NF- κ B); Caspase-3; apoptosis

多发性骨髓瘤是一种浆细胞恶性克隆增殖性肿瘤,占造血系统肿瘤的10%。骨髓移植和硼替佐米、沙利度胺等新药的出现,明显提高了年轻骨髓瘤患者的生存期,但大部分患者病情容易复发,且有些

收稿日期: 2011-07-14

基金项目: 河北省中医药管理局资助项目(2007136)

作者简介: 杜恒飞(1986—),男,硕士研究生,研究方向为多发性骨髓瘤的基础与临床。Tel: 15200029548 E-mail: ab19840815@163.com

*通讯作者 张金巧 Tel: 13313012865 E-mail: zhjq72@163.com

患者常因经济困难或严重的不良反应,如骨髓抑制、心脏毒性、周围神经病变等,不能耐受上述治疗。因此寻找高效、低毒、廉价的抗骨髓瘤药物具有重要的临床意义。

斑蝥素是一种广泛应用于临床的抗肿瘤中药,但因具有强烈的泌尿系统刺激作用而限制了其使用。去甲斑蝥素(norcantharidin, NCTD)是将斑蝥素去除1、2位2个甲基而得,不良反应明显降低而抗肿瘤活性得以保留,对胆囊癌、乳腺癌等具有良好的抗肿瘤作用^[1-4]。前期研究发现,NCTD通过下调Survivin mRNA的表达诱导骨髓瘤细胞凋亡^[5],而Survivin受核因子- κ B(NF- κ B)的调控,可见NF- κ B通路是调控骨髓瘤增殖、凋亡及耐药的重要途径。本实验进一步研究NCTD对NF- κ B通路的影响,为NCTD治疗多发性骨髓瘤的临床应用提供依据。

1 材料

1.1 药品与主要试剂

去甲斑蝥素(NCTD,质量分数>99%),购自Sigma公司,用时溶解于PBS中。兔抗人NF- κ B p65、磷酸化NF- κ B p65(p-NF- κ B p65)、NF- κ B抑制蛋白 α (IkB α)、磷酸化IkB α (p-IkB α)、IkB激酶 α (IKK α)单抗购自Cell Signal公司;兔抗人Survivin、Bcl-2、Bax、 β -actin和LaminB单抗购自Santa Cruz公司;Annexin-V-PI凋亡检测试剂盒购自北京创根胜泰生物科技有限公司;Caspase-3分光光度法检测试剂盒购自南京凯基生物发展有限公司;Caspase-3抑制剂z-DEVD-fmk购自BioVision公司,NF- κ B引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 动物

雄性BALB/C nu小鼠,SPF级,购自中国协和医科大学肿瘤研究所,合格证号0225645。

1.3 细胞

人多发性骨髓瘤细胞株RPMI 8226,购自中国科学院细胞库,常规培养在含10%胎牛血清的PRMI 1640培养液中。

2 方法

2.1 MTT法检测细胞增殖

参照文献方法^[5],取对数生长期RPMI 8226细胞,分别加入终浓度为0、2.5、5、10、20、40、80 μ mol/L NCTD,每种浓度设3个复孔,分别培养24、48、72 h后,用MTT比色法测定细胞存活率。

2.2 AnnexinV/PI检测试剂盒检测细胞凋亡

用终浓度为0、2.5、5、10、20 μ mol/L NCTD

处理RPMI 8226细胞24 h,收集细胞,采用AnnexinV/PI检测试剂盒检测细胞凋亡率。

2.3 Western blotting检测蛋白表达

RPMI 8226细胞用0、5、10、20 μ mol/L NCTD培养24 h,收集细胞,加入预冷的细胞裂解液。Bradford法分离、测定蛋白,用聚丙烯酰胺电泳分离蛋白,移至PVDF膜,加入适当稀释的一抗,于4 $^{\circ}$ C孵育过夜,以 β -actin作为内参;加入适当稀释的二抗,用ECL发光法检测目的条带的表达。计算目的蛋白和 β -actin比值。

2.4 分光光度法检测Caspase-3活性

用终浓度为0、2.5、5、10、20、40 μ mol/L NCTD处理细胞24 h,收集细胞,按Caspase-3分光光度法检测试剂盒操作说明检测,酶标仪测定加入各浓度NCTD细胞培养液在405 nm波长处的吸光度(A)值。用 $A_{\text{诱导剂}}/A_{\text{阴性对照}}$ 表示Caspase-3的活化程度。

2.5 RT-PCR检测NF- κ B mRNA表达

用Trizol试剂盒提取总RNA,按Trizol试剂盒说明书进行逆转录。NF- κ B正向引物:5'-GAAGAA GCGAGACCTGGAG-3',反向引物:5'-TCCGGAAC ACAATGGCCAC-3',GAPDH正向引物:5'-TCCTA GCACCATGAAGATC-3',反向引物:5'-AAACGCA GCTCAGTAACAG-3'。扩增条件:94 $^{\circ}$ C、45 s,54 $^{\circ}$ C、45 s,72 $^{\circ}$ C延伸60 s,共40个循环。PCR产物在1.5%琼脂糖凝胶上电泳,用BandScan 4.0软件进行灰度扫描,计算目的条带与GAPDH的比值。

2.6 NCTD的体内抗肿瘤作用

雄性BALB/C nu小鼠15只,每只左侧背部皮内接种RPMI 8226细胞 2×10^6 个,待肿瘤体积长至100 mm³左右时,将小鼠随机分为3组,每组5只。模型组给予生理盐水0.4 mL,给药组分别ip给予NCTD 20、40 mg/kg,每周3次,连续4周。计算肿瘤体积(V , $V=2/3 \pi r^3$, r 为肿瘤长宽高的均值),每周测量并计算1次;在实验结束时计算抑瘤率。

抑瘤率=1-给药组平均瘤体积/模型组平均瘤体积

2.7 统计学分析

各实验独立重复3次,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用SPSS 16.0统计软件处理,多个样本均数的比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD检验。

3 结果

3.1 对RPMI 8226细胞增殖的影响

MTT检测结果显示,NCTD以时间-剂量相关方式抑制RPMI 8226细胞的生长,作用24、48、72 h

的 IC_{50} 分别为 (15.4 ± 2.3) 、 (7.3 ± 1.2) 、 (4.2 ± 0.5) $\mu\text{mol/L}$ 。结果见图 1。

3.2 对 RPMI 8226 细胞凋亡的影响

与对照组比较, NCTD 作用细胞 24 h 后, 给药

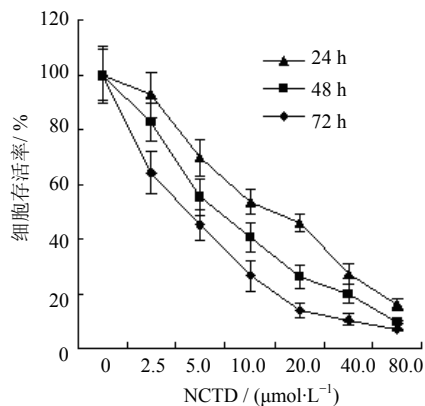


图 1 NCTD 对 RPMI 8226 细胞的增殖抑制作用
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Inhibition of NCTD on proliferation
of RPMI 8226 cell ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组细胞凋亡率随着 NCTD 浓度的增加而增加, 20 $\mu\text{mol/L}$ 时细胞凋亡率为 $(46.6 \pm 5.1)\%$, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.05$)。结果见表 1。

3.3 对相关蛋白表达的影响

NCTD 以剂量相关方式抑制细胞核 NF- κB p65 和 p-NF- κB p65 的表达, 而对胞浆 NF- κB p65 表达无显著影响。RT-PCR 也证实了这一结果, 见图 2 和表 2。

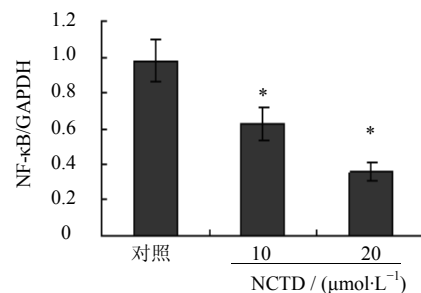
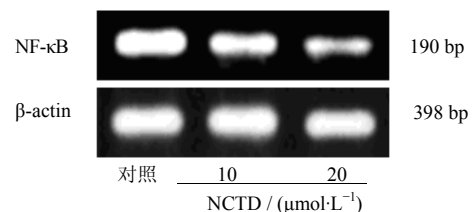
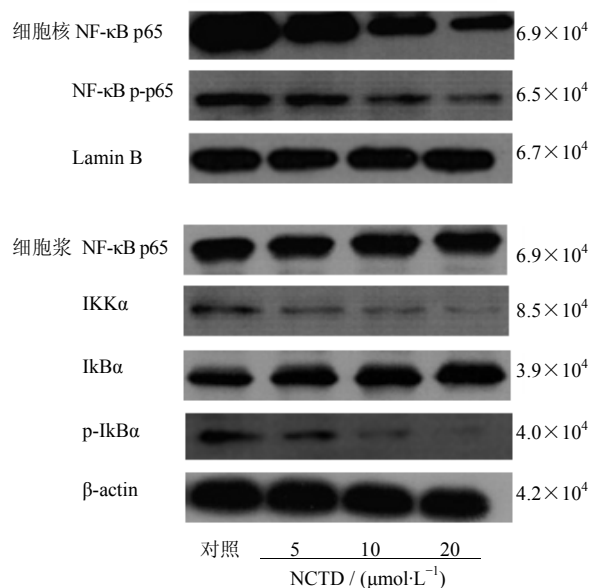
表 1 NCTD 对 RPMI 8226 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of NCTD on apoptosis of RPMI 8226 cell
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组 别	C / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	凋亡率/%
对照	—	2.7 ± 0.3
NCTD	2.5	$10.4 \pm 2.4^*$
	5.0	$15.3 \pm 3.3^*$
	10.0	$26.3 \pm 5.3^*$
	20.0	$46.6 \pm 5.1^*$

与对照组比较: $^*P < 0.05$; 表 2~4 同

$^*P < 0.05$ vs control group; Tables 2—4 are same



与对照组比较: $^*P < 0.05$

$^*P < 0.05$ vs control group

图 2 NCTD 对 RPMI 8226 细胞 NF- κB 信号通路相关蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of NCTD on correlation protein expression of RPMI 8226 cell via NF- κB signaling pathway

表 2 NCTD 对 RPMI 8226 细胞相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of NCTD on correlation protein expression of RPMI 8226 cell ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组 别	C / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	核 NF- κB p65	核 p-NF- κB p65	I $\kappa\text{B}\alpha$	p-I $\kappa\text{B}\alpha$	IKK α
对照	—	2.08 ± 0.29	0.65 ± 0.05	0.32 ± 0.03	0.39 ± 0.10	0.34 ± 0.04
NCTD	5	$1.40 \pm 0.21^*$	$0.39 \pm 0.06^*$	$0.48 \pm 0.03^*$	$0.22 \pm 0.13^*$	$0.20 \pm 0.03^*$
	10	$0.80 \pm 0.08^*$	$0.24 \pm 0.02^*$	$0.52 \pm 0.06^*$	$0.04 \pm 0.02^*$	$0.10 \pm 0.01^*$
	20	$0.46 \pm 0.05^*$	$0.12 \pm 0.01^*$	$0.71 \pm 0.07^*$	$0.04 \pm 0.02^*$	$0.03 \pm 0.01^*$

NCTD 以剂量相关方式抑制 RPMI 8226 细胞胞浆中 IKK α 的活化和 p-IkB α 蛋白表达, 促进胞浆 IkB α 的表达, 与对照组比较差异显著 ($P<0.05$)。见图 2 和表 2。

3.4 对 NF- κ B 调节基因产物的影响

随着 NCTD 浓度的增加, Survivin 和 Bcl-2 的表达下降, 而 Bax 蛋白表达增加, Bcl-2/Bax 值下降, 与对照组比较差异显著 ($P<0.05$), 见表 3 和图 3。

表 3 NCTD 对 RPMI 8226 细胞 Survivin、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 3 Effect of NCTD on protein expression of Survivin, Bcl-2, and Bax of RPMI 8226 cell ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	C / ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Survivin	Bcl-2	Bax
对照	—	1.31 $\pm$ 0.08	0.77 $\pm$ 0.06	0.08 $\pm$ 0.02
NCTD	5	0.62 $\pm$ 0.09*	0.53 $\pm$ 0.12*	0.24 $\pm$ 0.04*
	10	0.42 $\pm$ 0.06*	0.33 $\pm$ 0.06*	0.44 $\pm$ 0.05*
	20	0.06 $\pm$ 0.01*	0.18 $\pm$ 0.02*	0.66 $\pm$ 0.08*

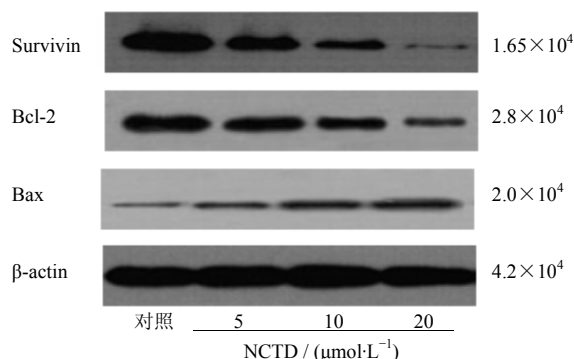


图 3 NCTD 对 RPMI 8226 细胞 Survivin、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of NCTD on protein expression of Survivin, Bcl-2, and Bax of RPMI 8226 cell

3.5 对 Caspase-3 活性的影响

RPMI 8226 细胞用 NCTD 5 $\mu\text{mol/L}$ 培养 24 h, 细胞 Caspase-3 的活化度为 6.65 ± 0.69 , 当 NCTD 浓度升至 20 $\mu\text{mol/L}$ 时, Caspase-3 的活化度升至 12.48 ± 1.53 , 明显高于对照组 (1.00 ± 0.00), 表明 NCTD 能促进 RPMI 8226 细胞 Caspase-3 的激活(表 4)。为进一步证实 Caspase-3 在 NCTD 诱导的细胞凋亡中的作用, 在加入 NCTD 20 $\mu\text{mol/L}$ 前 1 h 加入 Caspase-3 抑制剂 z-DEVD-fmk 40 $\mu\text{mol/L}$, 结果显示 z-DEVD-fmk 与 NCTD 联合给药组的细胞凋亡率明显低于 NCTD 组 ($P<0.05$), 表明 z-DEVD-fmk 可以抑制 NCTD 的细胞凋亡诱导作用, 提示 NCTD

诱导的细胞凋亡具有 Caspase-3 依赖性。此外联合给药组的凋亡率高于对照组 ($P<0.05$), 提示也有 Caspase-3 非依赖的途径参与了 NCTD 诱导的细胞凋亡。结果见表 5。

表 4 NCTD 对 RPMI 8226 细胞 Caspase-3 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of NCTD on activity of Caspase-3 of RPMI 8226 cell ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	C / ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Caspase-3 活化度
对照	—	1.00 $\pm$ 0.00
NCTD	2.5	2.23 $\pm$ 0.20*
	5.0	6.65 $\pm$ 0.69*
	10.0	10.24 $\pm$ 1.34*
	20.0	12.48 $\pm$ 1.53*

表 5 Caspase-3 抑制剂 z-DEVD-fmk 对 NCTD 诱导的 RPMI 8226 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Caspase-3 inhibitor z-DEVD-fmk on NCTD-induced apoptosis of RPMI 8226 cell ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	C / ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	凋亡率/%
对照	—	2.7 $\pm$ 0.3
NCTD	20	36.9 $\pm$ 6.2*
z-DEVD-fmk	40	4.1 $\pm$ 0.3
NCTD+z-DEVD-fmk	20+40	14.7 $\pm$ 2.4* [▲]

与对照组比较: * $P<0.05$; 与 NCTD 组比较: [▲] $P<0.05$

* $P<0.05$ vs control group; [▲] $P<0.05$ vs NCTD group

3.6 NCTD 体内抗肿瘤作用

体内抑瘤实验显示, NCTD 20、40 mg/kg 均能明显抑制接种 RPMI 8226 细胞后小鼠体内肿瘤的生长, 治疗 4 周后给药组的抑瘤率分别为 29.8%、53.5%, 与模型组比较差异显著 ($P<0.05$)。

4 讨论

NCTD 是以传统抗肿瘤中药——斑蝥素为基础物质合成的一种低毒、高效的抗肿瘤药物, 也是唯一能升高白细胞和减少尿蛋白的抗肿瘤药物^[6-9], 对正常细胞无细胞毒作用, 因此是一种理想的抗骨髓瘤药物, 尤其适用于合并肾脏损害的老年患者。本实验证实了 NCTD 在体内外具有抗骨髓瘤作用, 该作用可能与诱导细胞凋亡有关。

NF- κ B 的持续活化在多发性骨髓瘤细胞的增殖、存活及耐药中起重要作用。首先 NF- κ B 的活化可以增强黏附分子(细胞间黏附分子 ICAM、血管细胞黏附分子 VCAM、E 选择素等)的表达, 促进

骨髓瘤前体细胞归巢及肿瘤细胞生长因子的产生、IL-6 的分泌,启动各种信号传导途径,促使骨髓瘤细胞大量增殖。多发性骨髓瘤患者体内调控 NF- κ B 活化的基因如 TRAF2、TRAF3、CYLD 等存在变异,导致 NF- κ B 的持续激活^[10-11]。前期研究发现^[5],NCTD 能促进多发性骨髓瘤细胞株 U266 凋亡,但作用机制是否与 NF- κ B 有关,国内外未见相关报道。通常静止细胞中 NF- κ B 和其抑制因子 I κ B 以无活性的形式存在于胞浆中,I κ B 与 NF- κ B 结合后遮盖了其核定位信号,使 NF- κ B 无法进入核内,从而抑制其转录活性。当细胞受活化刺激后,I κ B 激酶 (IKK) 激活,使 I κ B 末端的丝氨酸残基发生磷酸化和泛素化,NF- κ B/I κ B 复合物解离,释放出游离 NF- κ B 进入细胞核,促进靶基因转录。因此 IKK 激活和 I κ B 磷酸化是 NF- κ B 活化的标志和重要过程。本实验结果显示,RPMI 8226 细胞经 NCTD 处理后胞浆 IKK α 和 p-I κ B α 表达下降,I κ B α 表达增加,胞核 NF- κ B p65 表达下降,表明 NCTD 通过抑制 IKK α 活化和 I κ B α 磷酸化,抑制 NF- κ B p65 向细胞核转化和活化。

NF- κ B 进入细胞核后通过调控其下游信号分子如 Survivin、Bcl-2、Bax 以及 Caspase-3 的表达诱导细胞凋亡。NF- κ B 活化可上调 Survivin 基因表达,而 Survivin 是迄今发现的最强的细胞凋亡抑制因子,其通过阻断 Caspase-3 活化阻断细胞凋亡。NF- κ B 活化还可上调 Bcl-2 表达,上调的 Bcl-2 通过与 Bax 竞争性地结合腺苷转位因子或直接阻止 Bax 与腺苷转位因子的结合,阻断 PT 孔的开放和线粒体外膜通透性,抵抗细胞凋亡^[12-13]。Caspase 家族是一组与细胞凋亡密切相关的蛋白裂解酶,是细胞凋亡过程的主要调控蛋白,其中 Caspase-3 是最重要效应蛋白酶之一,其活化是细胞凋亡进入不可逆阶段的标志。本实验结果显示,经 NCTD 处理的 RPMI 8226 细胞,Survivin 和 Bcl-2 表达下降,Bax 表达升高,导致 Bcl-2/Bax 值下降,同时 Caspases-3 活性增强,而 Caspase-3 抑制剂 z-DEVD-fmk 能显著抑制 NCTD 诱导的细胞凋亡,提示 NCTD 通过 Survivin、Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 途径诱导 RPMI 8226 细胞凋亡。

总之,NCTD 主要通过影响 NF- κ B 信号通路及其下游的信号分子,包括 Survivin、Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 等诱导 RPMI 8226 细胞凋亡,NF- κ B 可作为 NCTD 作用的靶点。本研究为开展 NCTD 单独或联合其他药物治疗难治或复发多发性骨髓瘤的临床研究提供参考。

致谢:解放军总医院血液科达万明教授给予的指导和审阅。

参考文献

- [1] Huang Y, Liu Q, Liu K, *et al.* Suppression of growth of highly-metastatic human breast cancer cells by norcantharidin and its mechanisms of action [J]. *Cyto-technology*, 2009, 59(3): 201-208.
- [2] Fan Y Z, Fu J Y, Zhao Z M, *et al.* Inhibitory effect of norcantharidin on the growth of human gallbladder carcinoma GBC-SD cells *in vitro* [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2007, 6(1): 72-80.
- [3] 李金龙,蔡于琛,胡志明,等. 去甲斑蝥素干扰 HL-6 肿瘤细胞周期及其机制研究 [J]. 中草药, 2010, 41(8): 1315-1319.
- [4] 胡展红,周 奕,张学农,等. 乳糖化-去甲斑蝥素纳米粒的肝靶向抗癌活性研究 [J]. 中草药, 2010, 41(12): 2005-2010.
- [5] 张金巧,戴晓丽,蒙艳凤,等. 去甲斑蝥素对人多发性骨髓瘤细胞株 U266 生长调控的影响及其机制的研究 [J]. 河北医科大学学报, 2010, 31(8): 896-897.
- [6] Wang G S. Medical uses of mylabris in ancient China and recent studies [J]. *J Ethnopharmacol*, 1989, 26(2): 147-162.
- [7] McCluskey A, Ackland S P, Bowyer M C, *et al.* Cantharidin analogues: synthesis and evaluation of growth inhibition in a panel of selected tumour cell lines [J]. *Bioorg Chem*, 2003, 31(1): 68-79.
- [8] Liu F Y, Li Y, Peng Y M, *et al.* Norcantharidin ameliorates proteinuria, associated tubulointerstitial inflammation and fibrosis in protein overload nephropathy [J]. *Am J Nephrol*, 2008, 28(3): 465-477.
- [9] Liao H F, Su S L, Chen Y J, *et al.* Norcantharidin preferentially induces apoptosis in human leukemic Jurkat cells without affecting viability of normal blood mononuclear cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2007, 45(9): 1678-1687.
- [10] Keats J J, Fonseca R, Chesi M, *et al.* Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma [J]. *Cancer Cell*, 2007, 12(2): 131-144.
- [11] Sung B, Kunnumakkara A B, Sethi G, *et al.* Curcumin circumvents chemoresistance *in vitro* and potentiates the effect of thalidomide and bortezomib against human multiple myeloma in nude mice model [J]. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8(4): 959-970.
- [12] Shin S, Sung B J, Cho Y S, *et al.* An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7 [J]. *Biochemistry*, 2001, 40(4): 1117-1123.
- [13] Petros A M, Olejniczak E T, Fesik S W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1644(2/3): 83-94.