隐丹参酮对 K562 细胞凋亡的影响及其机制

葛宇清[1]，杨　波[2]，程汝滨[2]，黄　真[2]，陈　喆[1*]

1. 浙江中医药大学第一临床医学院，浙江 杭州　310006
2. 浙江中医药大学药学院，浙江 杭州　310053

摘　要：目的　探讨隐丹参酮诱导人慢性髓系白血病 K562 细胞凋亡的作用及其线粒体途径相关机制。**方法**　MTT 法检测隐丹参酮对细胞增殖的抑制作用；Annexin V-FITC/PI 双标记流式细胞术检测丹参酮对细胞凋亡的影响，DAPI 染色法观察细胞形态的变化；Western blotting 检测丹参酮对细胞凋亡相关蛋白 Caspase-3、Caspase-9、PARP、Bax、Bcl-2 和细胞色素 C（Cyt C）表达的影响，线粒体膜电位检测试剂盒检测丹参酮对线粒体膜电位的影响；检测线粒体膜通透性转运孔（PTP）抑制剂环孢霉素 A 和 caspase 抑制剂 z-VAD-fmk 对隐丹参酮药效的影响。**结果**　隐丹参酮对 K562 细胞的生长有显著抑制作用，可引起细胞形态发生明显改变，诱导细胞发生凋亡，提高蛋白 Bax/Bcl-2 的比例，降低线粒体膜电位，促进 Cyt C 从线粒体释放到胞浆，增强促凋亡蛋白 Caspase-3、Caspase-9 和 PARP 的活性。环孢霉素 A 和 cz-VAD-fmk 均能减弱隐丹参酮抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡的作用。**结论**　隐丹参酮可显著诱导 K562 细胞凋亡，其机制与线粒体凋亡途径密切相关。

关键词：隐丹参酮；K562 细胞；细胞增殖；细胞凋亡；线粒体途径

中图分类号：R979.19　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2013)22 - 3188 - 07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.22.017

Effect of cryptotanshinone on apoptosis in K562 cell and its mechanism

GE Yu-qing[1], YANG Bo[2], CHENG Ru-bin[2], HUANG Zhen[2], CHEN Zhe[1]

1. The First Affiliated Hospital, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, China
2. College of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

Abstract: Objective　To investigate the apoptosis inducing effects of cryptotanshinone (CPT) in human chronic myeloid leukemia K562 cells and its molecular mechanisms. **Methods**　K562 cells were firstly treated with CPT at different concentration. Then, the inhibitory effect of CPT was detected by MTT assay; morphological changes of cells were observed by inverted microscope; cell apoptosis was detected by Annexin V-FITC/PI staining. Western blotting was carried out to determine the expression of apoptosis-related proteins, including Caspase-3, Caspase-9, PARP, Bax, Bcl-2 and cytochrome C (Cyt C). The mitochondrial membrane potential was measured using JC-1 probe. Finally, the effects of CPT on the proliferation and apoptosis were detected in the absence or presence of inhibitors for mitochondrial permeability transition pore (PTP) and caspase-family. **Results**　CPT significantly inhibited the proliferation, induced apoptosis and morphological changes of K562 cells. Furthermore, CPT increased the Bax/Bcl-2 ratio obviously, decreased the mitochondrial membrane potential, and enhanced the Cyt C release. CPT also significantly increased the activities of pro-apoptotic proteins, such as Caspase-3, Caspase-9, and PARP. The inhibitors of PTP and caspase-family reduced the pharmacodynamics of CPT obviously. **Conclusion**　These results show that CPT could significantly induce the apoptosis of human chronic myeloid leukemia cells, in which its function is related with the mitochondrial pathway.

Key words: cryptotanshinone; K562 cells; cell proliferation; apoptosis; mitochondrial pathway

隐丹参酮是从丹参中分离出的脂溶性二萜醌类化合物，药理作用广泛，在多种疾病的治疗中显示出良好的应用前景[1]。近年研究表明，隐丹参酮具有显著的体外抗肿瘤作用，可抑制多种肿瘤细胞的增殖，影响细胞周期分布[2-3]。然而关于隐丹参酮对人慢性髓系白血病细胞的影响报道较少[4-5]。本实验

收稿日期：2013-01-28

基金项目：国家自然科学基金资助项目（81202820，81303269）；浙江省自然科学基金资助项目（LQ12H28005）；浙江省中医药管理局项目（2012ZQ006）；浙江省教育厅科研项目（Y201223804）；浙江省 2012 年第 1 批省级重点科技创新团队项目（2010R50044-12）；浙江中医药大学人才专项项目（2012ZR05）

作者简介：葛宇清，女，助理研究员，主要从事中药抗白血病功能研究。

***通信作者**　陈　喆　Tel: (0571)86620280　E-mail: cz@zjtcm.edu.cn

采用人慢性髓系白血病细胞 K562，研究隐丹参酮对 K562 细胞凋亡和线粒体凋亡途径的影响，为隐丹参酮的开发应用提供实验依据和参考。

1 材料

1.1 药品与试剂

隐丹参酮，质量分数＞98%，浙江省食品药品检验研究院，批号 110852-200305，用 DMSO 配制成 25 mmol/L 工作母液，于−20 ℃保存备用，使用前以 RPMI-1640 培养液调至所需浓度；甲磺酸伊马替尼（简称伊马替尼），瑞士诺华制药公司，批号 H20050023；线粒体膜通透性转运孔（PTP）抑制剂环孢霉素 A、caspase 家族抑制剂 z-VAD-fmk、线粒体膜电位检测试剂盒、RIPA 裂解液，碧云天生物科技有限公司；RPMI 1640 培养基、0.25%胰蛋白酶，杭州科易生物技术有限公司；胎牛血清，Hyclone 公司；细胞培养皿、96 孔板、24 孔板，Nunc 公司；四甲基偶氮唑蓝（MTT），Sigma 公司；二甲基亚砜（DMSO），无锡海硕生物有限公司；Annexin V/PI 双染试剂盒，BD 生物公司；Bax、Bcl-2 抗体，Epitomics 公司；cytochrome C（Cyt C）抗体、cleaved Caspase-3 抗体、cleaved Caspase-9 抗体、cleaved PARP 抗体、β-actin 抗体，Cell Signaling 公司。

1.2 细胞株

K562 细胞，购自中国科学院上海细胞生物学研究所。

1.3 仪器

美国 Thermo Varioskan Flash 型多功能酶标仪；日本 OlympusIX71 型倒置显微镜；超净工作台，上海上净净化设备有限公司；美国 Thermo microCL 17R 型离心机；FACSCanto II 流式细胞仪，美国 BD 公司。

2 方法

2.1 细胞培养

K562 细胞置于含 10%胎牛血清和双抗（青霉素 100 μg/L、链霉素 100 μg/L）的 RPMI 1640 培养液中，在 37 ℃、5%CO_2 培养箱中培养，每周传代 2 次，隔天换液 1 次，实验用细胞均为对数生长期细胞。

2.2 MTT 法检测细胞增殖

收集对数生长期细胞，调整细胞密度至 5×10^4/mL，接种于 96 孔板，每孔 100 μL。实验设对照组、伊马替尼阳性对照组和隐丹参酮组，对照组加入含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液，阳性对照组加入含伊马替尼 0.2 μmol/L 的 RPMI 1640 培养基，隐丹参酮组加入隐丹参酮，使其终浓度分别为 5、10、20、40 μmol/L，各组培养液体积均为 100 μL，药物干预 24 h。培养完成后每孔加入 5 g/L MTT 溶液 20 μL（终质量浓度 0.5 g/L），于细胞培养箱放置 4 h，吸弃孔内培养液，每孔加入 DMSO 150 μL，置摇床上低速振荡 10 min，使结晶物充分溶解。酶标仪测定 490 nm 处各孔的吸光度（A）值，计算细胞活力剂 IC_{50} 值。实验重复 3 次。

$$细胞活力 = A_{药物} / A_{对照}$$

2.3 DAPI 染色法观察细胞形态的变化

取对数生长期细胞，调整细胞密度至 5×10^5/mL，以 5 mL 接种于直径 60 mm 培养皿内，分别加入不含药物（对照组），含 5、10、20 μmol/L 隐丹参酮的新鲜培养液干预 24 h。离心收集上述各组细胞，甲醇固定 20 min，用预冷的磷酸盐缓冲液（PBS）清洗，加入 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚（DAPI）染色，室温下避光放置 20 min，PBS 洗 2 遍以除去未结合的染料，细胞脱水，封片，荧光显微镜下观察（×100）细胞凋亡情况。

2.4 Annexin V-FITC/PI 双标记流式细胞术检测细胞凋亡

取对数生长期细胞，调整细胞密度至 5×10^5/mL，以 5 mL 接种于直径 60 mm 培养皿内，分别加入不含药物（对照组），含 5、10、20 μmol/L 隐丹参酮的新鲜培养液干预 24 h。离心收集上述各组细胞，用预冷 PBS 洗 1 次，用稀释好的结合缓冲液重悬细胞，调整细胞密度为 5×10^5～1×10^6/mL。取 100 μL 细胞悬液于 5 mL 流式管中，加入 Annexin V-FITC 5 μL 和 10 mg/L 碘化丙啶（PI）溶液 10 μL，混匀后室温避光孵育 15 min，加入 400 μL 稀释好的结合缓冲液，流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2.5 Western blotting 法检测细胞凋亡相关蛋白的表达

K562 细胞经 0、10、20 μmol/L 隐丹参酮处理 24 h，离心收集细胞，用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白。蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳，然后转印至 PVDF 膜上，用含 5%脱脂奶粉的 TBST 溶液封闭 1 h，一抗孵育过夜，TBST 漂洗 3 次，加入辣根酶标记的二抗，室温作用 2 h，用显色剂 ECL 试剂盒显色。结果在化学发光成像仪上显影，利用 Quantity One 软件分析各组的灰度值，以 β-actin 为内参计算 cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9、cleaved PARP、Bax、Bcl-2、Cyt C 各蛋白的变化情况。

2.6 线粒体膜电位检测试剂盒检测线粒体膜电位

K562 细胞用 0、10、20 μmol/L 的隐丹参酮处理 24 h，收集细胞，PBS 洗 2 遍，取 1×10^6～6×10^6 个细胞，重悬于 0.5 mL 培养液，加入 0.5 mL 线粒体膜电位检测试剂盒染色工作液，颠倒混匀，37 ℃孵育 20 min，4 ℃离心收集细胞，弃上清，用预冷的线粒体膜电位检测试剂盒染色缓冲液洗 2 次，取 200 μL 缓冲液重悬，流式细胞仪检测荧光强度的变化。出现红色荧光表明线粒体膜电位比较正常，出现绿色荧光表明线粒体膜电位降低，以红色荧光和绿色荧光的比例反映细胞线粒体膜电位的变化。

2.7 环孢霉素 A 和 z-VAD-fmk 对隐丹参酮药效的影响

将 K562 细胞分成 9 组，分别为对照组、PTP 抑制剂环孢霉素 A 组、caspase 抑制剂 z-VAD-fmk 组、隐丹参酮低和高浓度组及其分别与环孢霉素 A 联合给药组、隐丹参酮低和高浓度分别与 z-VAD-fmk 联合给药组。环孢霉素 A 的质量浓度为 1 mg/mL，z-VAD-fmk 浓度为 20 μmol/L，隐丹参酮浓度分别为 10、20 μmol/L。在环孢霉素 A 干预实验中，K562 细胞经 1 mg/mL 的环孢霉素 A 处理 2 h 后，离心收集细胞，加入新鲜培养基或不同浓度的隐丹参酮；在 z-VAD-fmk 干预实验中，向 K562 细胞中加入 z-VAD-fmk、新鲜培养基或不同浓度的隐丹参酮共同处理 24 h。处理完毕后，按照“2.2”项下方法检测细胞增殖，按照“2.4”项下方法检测细胞凋亡。

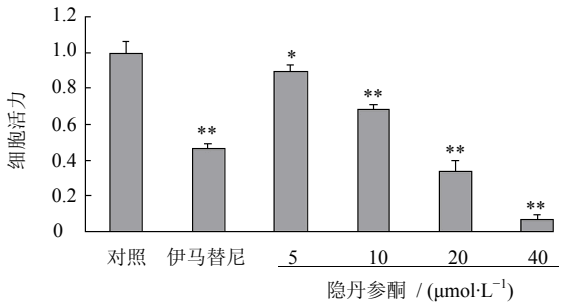
2.8 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，用 SPSS 统计软件进行数据分析，两组间比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 对 K562 细胞增殖和凋亡的影响

K562 细胞增殖实验结果显示，与对照组相比，K562 细胞经不同浓度的隐丹参酮处理 24 h 后，生长受到显著抑制（$P<0.05$、0.01），且呈明显的浓度相关性，其中隐丹参酮 20 μmol/L 对 K562 细胞增殖的抑制率为 66%，IC_{50} 值为（15.4±0.51）μmol/L。结果见图 1。



与对照组比较：$^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$，表 1 和下图同

$^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ *vs* control group, same as below Table 1 and figures

图 1 隐丹参酮对 K562 细胞增殖的影响（$\bar{x}\pm s$, $n=3$）

Fig. 1 Inhibition of CPT on K562 cell growth ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

K562 细胞凋亡实验结果显示，与对照组相比，隐丹参酮组 K562 细胞密度明显减小，细胞形态大小不一，细胞碎片增多，细胞核浓缩、碎裂成蓝色的小块状，染色质凝聚，形成典型的凋亡小体，提示隐丹参酮能够诱导 K562 细胞凋亡。结果见图 2。

流式细胞仪检测结果表明，隐丹参酮能够显著地增加 K562 细胞早期凋亡率，且呈现明显量效关

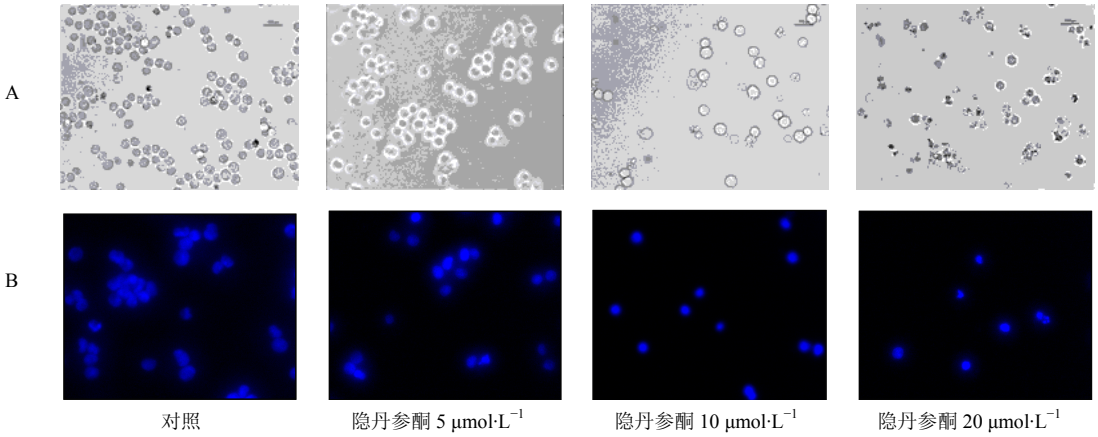


图 2 DAPI 染色前 (A) 和染色后 (B) 各组 K562 细胞形态观察

Fig. 2 Effect of CPT on K562 cell morphological changes before (A) and after (B) DAPI staining

系，对照组 K562 细胞早期凋亡率仅为 2.8%，而经 5、10、20 μmol/L 的隐丹参酮处理 24 h 后，K562 细胞的早期凋亡率分别为 6.7%、9.1%、17.2%，分别提高了 1.4、2.2、5.1 倍，表明隐丹参酮抑制 K562 细胞生长可能是通过诱导细胞凋亡实现的。结果见图 3。

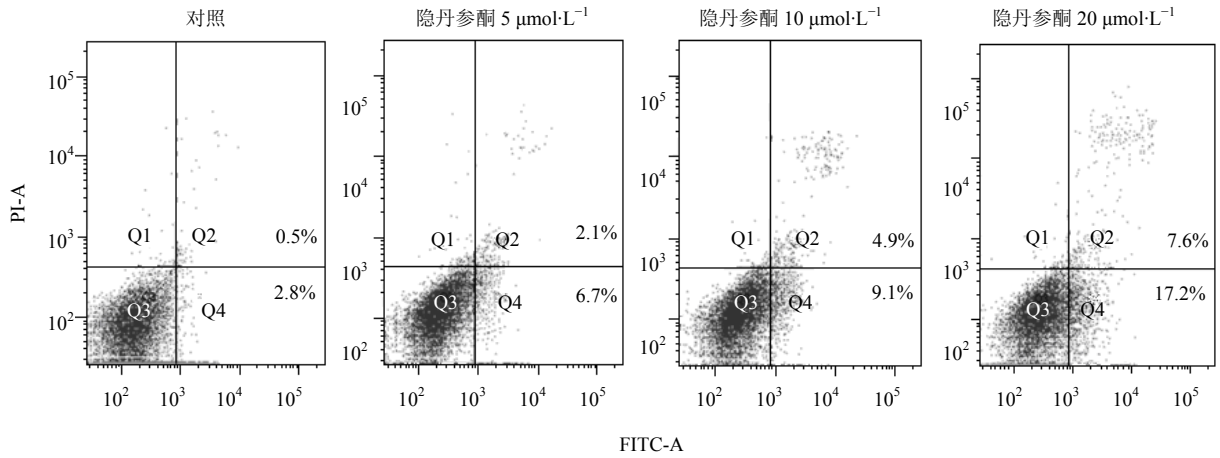


图 3 流式细胞术检测隐丹参酮对 K562 细胞凋亡的影响

Fig. 3 Effect of CPT on apoptosis of K562 cells

3.2 对细胞凋亡相关蛋白表达的影响

3.2.1 对细胞凋亡调控蛋白表达的影响 隐丹参酮显著上调 K562 细胞中促细胞凋亡蛋白 cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9 和 PARP 的表达，且呈现明显的浓度相关性。与对照组相比，隐丹参酮 20 μmol/L 组 K562 细胞内 cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9 和 PARP 的活性降解产物的表达分别提高 1.96、2.71、10.95 倍，进一步证明隐丹参酮对 K562 细胞凋亡具有诱导作用。结果见图 4。

3.2.2 对 Bax、Bcl-2 蛋白比值的影响 Bcl-2 蛋白家族与线粒体膜通透性有关，是 Cyt C 从线粒体中释放的重要调控蛋白，其中促凋亡蛋白 Bax 和抗凋亡蛋白 Bcl-2 的比值与线粒体膜的敏感性有密切关系[6]。结果显示，与对照组比较，不同浓度的隐丹参酮处理 K562 细胞 24 h 后，细胞内 Bax 的表达上调，而 Bcl-2 的表达下调，且呈明显的浓度相关性，其中隐丹参酮 10、20 μmol/L 组 Bax 的表达分别上调 32%、65%，而 Bcl-2 的表达分别下调 18%、37%，Bax/Bcl-2 的值分别提高 62%和 1.67 倍，表明隐丹参酮通过提高线粒体细胞膜的通透性诱导细胞凋亡。结果见图 5。

3.3 对线粒体膜电位和 Cyt C 的影响

对照组 K562 细胞线粒体膜电位较高，带有红色荧光的细胞比例为 96.5%。隐丹参酮 20、10 μmol/L 组 K562 细胞线粒体膜电位显著降低，带有红色荧光的细胞比例分别降低至 65.8%、43.8%，呈现明

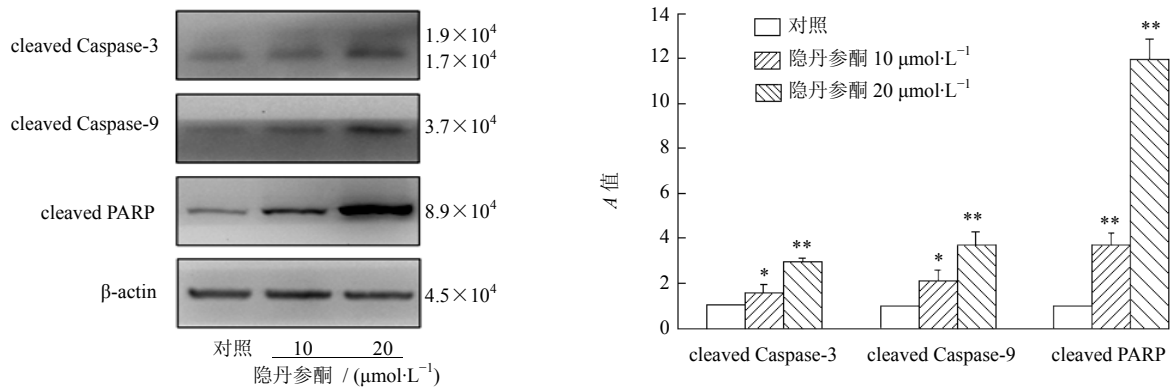


图 4 隐丹参酮对 K562 细胞凋亡调控蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 4 Effect of CPT on expressions of apoptosis-regulated proteins in K562 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

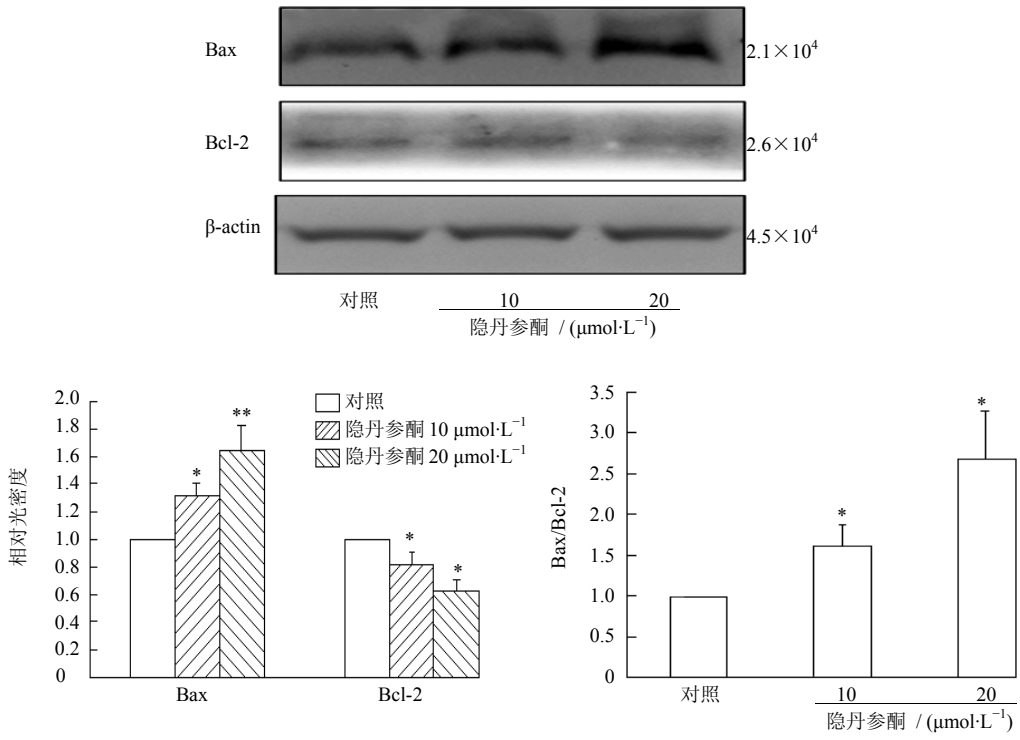


图 5　隐丹参酮对 K562 细胞 Bax、Bcl-2 蛋白表达及 Bax/Bcl-2 值的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 5　Effect of CPT on expression of Bax and Bcl-2 protein and ratio of Bax/Bcl-2 in K562 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

显的浓度相关性，表明隐丹参酮提高了细胞膜通透性。结果见图 6。Western blotting 检测结果表明，与对照组相比，隐丹参酮 10、20 μmol/L 组 K562 细胞胞浆中 Cyt C 的量分别提高 2.62、3.34 倍，进一步说明隐丹参酮可提高线粒体膜的通透性，促进 Cyt C 由线粒体向细胞质释放。上述结果表明隐丹参酮可能通过线粒体途径诱导 K562 细胞凋亡。结果见图 7。

3.4　环孢霉素 A 和 z-VAD-fmk 对隐丹参酮药效的影响

PTP 是一种跨膜多蛋白孔，与线粒体膜电位和细胞凋亡的过程密切相关。PTP 抑制剂环孢霉素 A 组 K562 细胞生长抑制率和细胞早期凋亡率分别是 4.1%、1.1%，环孢霉素 A 与隐丹参酮 20 μmol/L 联合给药，使 K562 细胞生长抑制率由隐丹参酮组的 67.4%降至 43.6%，早期凋亡率则由隐丹参酮组的 17.3%降至 10.8%。z-VAD-fmk 与隐丹参酮联合给药组 K562 细胞生长抑制率和细胞早期凋亡率也显著降低。此结果进一步说明隐丹参酮通过线粒体途径诱导细胞凋亡，进而发挥抗白血病的作用。结果见表 1。

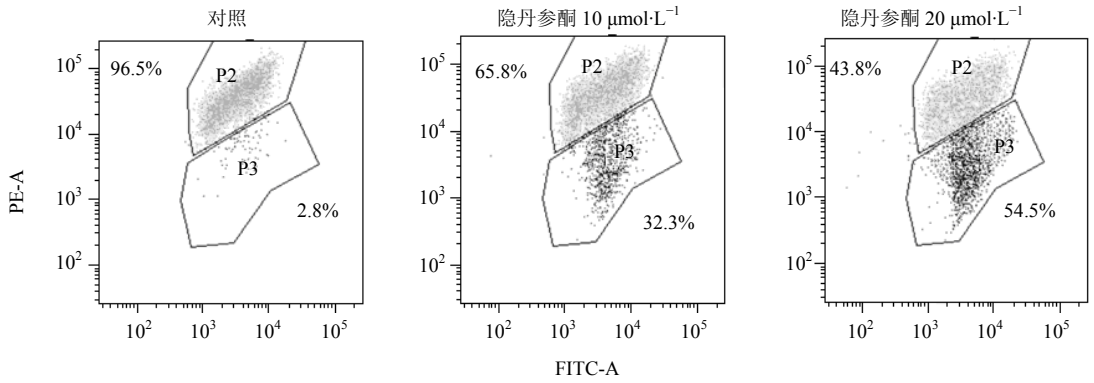


图 6　隐丹参酮对 K562 细胞线粒体膜电位的影响

Fig. 6　Effect of CPT on mitochondrial membrane potential in K562 cells

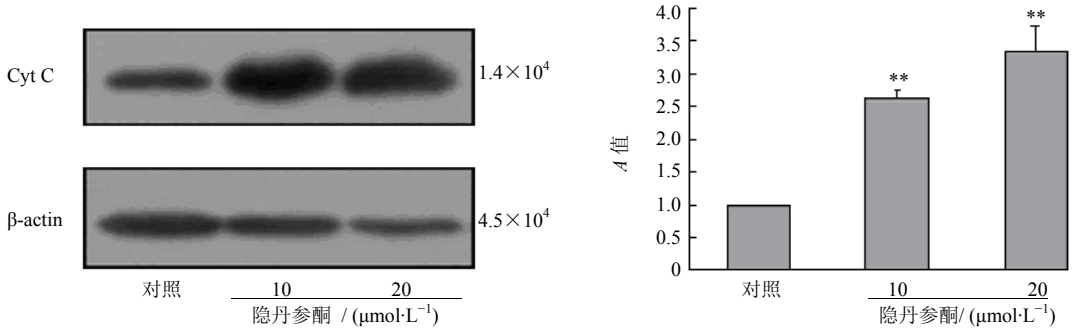


图 7 隐丹参酮对 K562 细胞 Cyt C 释放的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 7 Effect of CPT on Cyt C release in K562 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

表 1 环孢霉素 A 和 z-VAD-fmk 对隐丹参酮药效的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 1 Effect of cyclosporine A and z-VAD-fmk on pharmacodynamics of CPT ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组 别	给药量	生长抑制率 / %	细胞早期凋亡率 / %
对照	—	—	2.21±0.21
环孢霉素 A	1 mg·mL^{-1}	4.10±0.31*	1.13±0.28
z-VAD-fmk	20 μmol·L^{-1}	2.60±0.28	1.65±0.32
隐丹参酮	10 μmol·L^{-1}	31.30±0.43**	9.20±0.18**
	20 μmol·L^{-1}	67.40±0.36**	17.30±0.21**
隐丹参酮＋环孢霉素 A	10 μmol·L^{-1}＋1 mg·mL^{-1}	15.40±0.43**	5.40±0.14**
	20 μmol·L^{-1}＋1 mg·mL^{-1}	43.60±0.32**	10.80±0.17**
隐丹参酮＋z-VAD-fmk	10 μmol·L^{-1}＋20 μmol·L^{-1}	12.80±0.27**	3.60±0.12*
	20 μmol·L^{-1}＋20 μmol·L^{-1}	38.50±0.34**	8.70±0.21**

4 讨论

慢性髓系白血病是一种造血干细胞恶性肿瘤，其特征是外周血粒细胞不受控制地增长，并在血液中积累。酪氨酸激酶抑制剂伊马替尼是目前治疗慢性髓系白血病的一线化疗药物，具有很好的疗效。但由于 Bcl/Abl 基因的突变和耐药基因 mdr1 的过表达导致的伊马替尼耐药，极大地限制了其临床应用，如何克服伊马替尼耐药是当前关注慢性髓系白血病治疗的焦点之一。中药活性单体和组分在慢性髓系白血病，尤其是耐药慢性髓系白血病的治疗中显示了良好的应用前景[7-8]，因此从中药单体和组分中寻找具有抗慢性髓系白血病药物是抗肿瘤药物的研究热点[9-10]。

隐丹参酮作为丹参的主要活性成分之一，体外显示良好的抗肿瘤作用，显著抑制前列腺癌、乳腺癌、人横纹肌肉瘤、肺癌和黑色素瘤细胞的生长，诱导细胞凋亡，改变细胞周期分布，并可促进自然杀伤细胞的分化，提高 TNF-α 诱导白血病细胞 KNM-5 凋亡的功能[11-13]。前期研究结果表明，隐丹参酮可有效抑制 K562 耐药株的生长，降低真核细胞翻译起始因子 eIF4E 的表达；还可有效降低体内耐药基因 mdr1 的表达，逆转细胞耐药[4,14]。

线粒体作为生物细胞能量代谢的中心，是多种信息传递、整合的中转站，线粒体途径在人白血病细胞凋亡过程中也发挥了重要功能[15]。当白血病细胞在外界因子刺激下发生凋亡时，细胞膜通透性的增加，膜电位降低，Cyt C 释放到胞浆中的量增大，凋亡执行者 caspase-3 被激活，最终形成凋亡小体，导致细胞凋亡的发生[16]。因此评价线粒体功能的主要指标之一是线粒体膜的通透性，即线粒体膜电位的高低。PTP 的开放和关闭与线粒体膜电位的通透性和细胞凋亡密切相关，而 Bcl-2 家族蛋白中 Bax/Bcl-2 的值对 PTP 的开发和关闭起关键的调控作用。当 Bax/Bcl-2 值增大时，促凋亡蛋白 Bax 可通过与腺苷转位因子（ANT）和电压依赖性阴离子通道（VDAC）结合介导 PTP 的开放，提高线粒体膜的通透性[17]。将隐丹参酮作用于 K562 细胞后，Bax/Bcl-2 的值显著增大，线粒体膜电位降低，导致

Cyt C 的释放和胞浆中 caspase-3 活性的增强，最终引起了细胞凋亡。本实验结果表明，隐丹参酮可以有效地诱导 K562 细胞凋亡，其机制可能与线粒体途径相关，这些结果为隐丹参酮在慢性髓系白血病治疗中的应用提供了分子基础和理论依据。

参考文献

[1] 赵 杨, 陆 茵, 郑仕中, 等. 隐丹参酮的药理作用研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(11): 1839-1841.

[2] Shin D S, Kim H N, Shin K D, *et al*. Cryptotanshinone inhibits constitutive signal transducer and activator of transcription 3 function through blocking the dimerization in DU145 prostate cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(1): 193-202.

[3] Chen L, Zheng S Z, Sun Z G, *et al*. Cryptotanshinone has diverse effects on cell cycle events in melanoma cell lines with different metastatic capacity [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2011, 68(1): 17-27.

[4] Ge Y, Cheng R, Zhou Y, *et al*. Cryptotanshinone induces cell cycle arrest and apoptosis of multidrug resistant human chronic myeloid leukemia cells by inhibiting the activity of eukaryotic initiation factor 4E [J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 368(1/2): 17-25.

[5] Li H, Zhang Q, Chu T, *et al*. Growth-inhibitory and apoptosis-inducing effects of tanshinones on hematological malignancy cells and their structure-activity relationship [J]. *Anticancer Drugs*, 2012, 23(8): 846-855.

[6] Raisova M, Hossini A M, Eberle J, *et al*. The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas-mediated apoptosis [J]. *J Invest Dermatol*, 2001, 117(2): 333-340.

[7] 刘晓丹, 刘文达, 刘培庆, 等. 丹参酮 II_A 对白血病 K562 细胞的体外诱导凋亡作用研究 [J]. 中草药, 2010, 41(10): 1663-1666.

[8] 徐晓军, 石淑文, 汤永民, 等. 人参皂苷 Rh_2 抗白血病多药耐药细胞 K562 / VCR 作用研究 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1131-1135.

[9] Kim W S, Kim D O, Yoon S J, *et al*. Cryptotanshinone and tanshinone IIA enhance IL-15-induced natural killer cell differentiation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 425(2): 340-347.

[10] Kim J H, Jeong S J, Kwon TR, *et al*. Cryptotanshinone enhances TNF-alpha-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia KBM-5 cells [J]. *Apoptosis*, 2011, 16(7): 696-707.

[11] Chen W, Luo Y, Liu L, *et al*. Cryptotanshinone inhibits cancer cell proliferation by suppressing Mammalian target of rapamycin-mediated cyclin D1 expression and Rb phosphorylation [J]. *Cancer Prev Res* (*Phila*), 2010, 3(8): 1015-1025.

[12] Chen W, Liu L, Luo Y, *et al*. Cryptotanshinone activates p38/JNK and inhibits Erk1/2 leading to caspase-independent cell death in tumor cells [J]. *Cancer Prev Res* (*Phila*), 2012, 5(5): 778-787.

[13] Chen L, Zheng S Z, Sun Z G, *et al*. Cryptotanshinone has diverse effects on cell cycle events in melanoma cell lines with different metastatic capacity [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2011, 68(1): 17-27.

[14] Dai H, Li X, Li X, *et al*. Coexisted components of Salvia miltiorrhiza enhance intestinal absorption of cryptotanshinone via inhibition of the intestinal P-gp [J]. *Phytomedicine*, 2012, 19(14): 1256-1262.

[15] 尚振川, 宋霆婷, 侯严堂, 等. 线粒体途径在慢性髓系白血病信号转导中的作用 [J]. 中国实验血液学杂志, 2009, 17(2): 277-280.

[16] Gao Z, Kang X, Hu J, *et al*. Induction of apoptosis with mitochondrial membrane depolarization by a glycyrrhetinic acid derivative in human leukemia K562 cells [J]. *Cytotechnology*, 2012, 64(4): 421-428.

[17] 韩义香, 章圣辉, 吴建波, 等. 线粒体膜电位在三氧化二砷诱导 K562 细胞凋亡中的作用 [J]. 中草药, 2010, 41(3): 452-455.