

甲异靛对JAK2/V617F杂合突变细胞系SET2细胞凋亡和增殖作用及其机制的研究

吕成兰¹ 刘晋琴¹ 陈猛¹ 陈兵² 肖志坚¹

¹中国医学科学院、北京协和医学院血液病医院(血液学研究所),实验血液学国家重点实验室,天津 300020;²南京大学医学院附属鼓楼医院 210009

吕成兰现在南京大学医学院附属鼓楼医院,210009

通信作者:肖志坚,Email:zjxiao@ihcams.ac.cn

【摘要】 目的 观察甲异靛对JAK2/V617F杂合突变细胞系SET2细胞凋亡及增殖的影响,并探讨JAK-STAT信号通路在其中所起的作用。方法 不同浓度甲异靛(0、5、10 $\mu\text{mol/L}$)作用于SET2细胞24、48、72 h后,采用流式细胞术检测细胞凋亡。不同浓度甲异靛(0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)作用于SET2细胞24、48、72、96 h后,CCK8法检测细胞增殖。不同浓度甲异靛(0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)作用于SET2细胞12 h后,在甲基纤维素半固体培养基进行集落培养,Western blot法测定JAK-STAT信号通路相关蛋白及凋亡相关蛋白表达水平。结果 在0、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 甲异靛作用于SET2细胞后24、48和72 h,细胞凋亡率均随药物浓度的增大而增高($P < 0.01$)。0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 甲异靛作用SET2细胞后,随着药物浓度增加,细胞增殖受抑制($P < 0.01$)。不同浓度甲异靛处理SET2细胞后,其集落形成率随药物浓度增加而降低[0 $\mu\text{mol/L}$ 甲异靛组为(4.48 \pm 1.19)%,20 $\mu\text{mol/L}$ 甲异靛组为(2.55 \pm 0.36)%,Dunnett $P = 0.020$]。不同浓度甲异靛作用于SET2细胞12 h后,JAK2、P-JAK2、P-STAT1、P-STAT3、P-STAT3和STAT5的表达水平均有随药物浓度增加而逐渐下调的趋势,抗凋亡蛋白BCL-2、BCL-XL的表达水平随药物浓度增加而下调,促凋亡蛋白BID、BIM的表达水平随药物浓度增加而上调。结论 甲异靛对Ph阴性骨髓增殖性肿瘤细胞系SET2细胞具有明显的促进凋亡、抑制增殖作用,伴随着抗凋亡蛋白表达下调及促凋亡蛋白表达上调,其作用机制可能与甲异靛抑制JAK-STAT信号通路有关。

【关键词】 甲异靛; JAK-STAT信号通路; SET2细胞

基金项目:实验血液学国家重点实验室自主课题(Z17-03);中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2016-I2M-1-001);协和学者与创新团队发展计划

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.01.006

The impact of meisoindigo on apoptosis and proliferation of SET2 cell line by JAK-STAT pathway

Lyu Chenglan¹, Liu Jinqin¹, Chen Meng¹, Chen Bin², Xiao Zhijian¹

¹Institute of Hematology and Blood Disease, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China; ²The Affiliated Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing Drum Tower Hospital, Nanjing 210009, China

Lyu Chenglan is working on the Affiliated Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing Drum Tower Hospital, Nanjing 210009, China

Corresponding author: Xiao Zhijian, Email: zjxiao@ihcams.ac.cn

【Abstract】 Objective To observe the effect of meisoindigo on apoptosis and proliferation of JAK2/V617F heterozygous mutation cell line-SET2 cell line to further explore the role of JAK-STAT pathway in this effect. **Methods** Cell apoptosis after treated with different concentration of meisoindigo (0, 5, and 10 $\mu\text{mol/L}$) was evaluated by flow cytometry at different time points (24, 48, 72 h). Cell proliferation with CCK8 test was evaluated at different time points (24, 48, 72, 96 h) after administered with different concentration of meisoindigo (0, 5, 10, and 20 $\mu\text{mol/L}$). After treatment with different concentration of meisoindigo (0, 5, 10, and 20 $\mu\text{mol/L}$), SET2 cells were collected after 12 h, and then

cultured in incomplete methylcellulose-based medium for clone formation. JAK-STAT signaling pathway and apoptosis related protein by Western blot test were evaluated 12 h after administered with different concentration of meisoindigo (0, 5, 10, and 20 $\mu\text{mol/L}$). **Results** At different time points after treated with meisoindigo, the apoptosis rate of SET2 cell lines increased ($P < 0.01$) with the inhibited proliferation ($P < 0.01$), and the decreased clone formation rate of SET2 cell lines [0 $\mu\text{mol/L}$ meisoindigo: (4.48 \pm 1.19)%, 20 $\mu\text{mol/L}$ meisoindigo: (2.55 \pm 0.36)%; Dunnett $P = 0.020$] in the presence of augmented concentrations of meisoindigo. At 12 hours after administration with meisoindigo, the reduced expressions of JAK2, P-JAK2, P-STAT1, P-STAT3, P-STAT3, STAT5, the decreased anti-apoptosis proteins BCL-2, BCL-XL and the increased pro-apoptosis protein BID, BIM were observed in the presence of increased concentrations of meisoindigo. **Conclusion** Meisoindigo played an important role during the apoptosis and the inhibition of proliferation in ph-negative myeloproliferative neoplasm cell-SET2 cell lines, which might be related to the inhibition of JAK-STAT signaling pathway with up-regulation of pro-apoptosis protein and down-regulation of anti-apoptosis protein.

【Key words】 Meisoindigo; JAK-STAT signaling pathway; SET2 cell

Fund program: SKLEH-Pilot Research Grant (Z17-03); CAMS Initiative Fund for Medical Sciences (2016-I2M-1-001); Program for Peking Union Scholars and Innovative Research Team

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.01.006

甲异靛是青黛提取物靛玉红的一种衍生物,为新型的双咪唑化合物。在酪氨酸激酶抑制剂(TKI)问世前,针对甲异靛的研究主要围绕Ph阳性骨髓增殖性肿瘤(MPN)——慢性髓性白血病(CML)来展开,有关的基础及临床研究结果均提示该药对CML细胞系和患者原代细胞有增殖抑制和诱导凋亡的作用,临床上具有疗效好、不良反应少、费用低廉等优点^[1-6]。随着TKI的出现,CML的治疗得到突破性进展,同时JAK抑制剂芦可替尼已获批用于部分Ph阴性MPN如骨髓纤维化(MF)和羟基脲耐药/不耐受的真性红细胞增多症(PV)的治疗。但目前为止,Ph阴性MPN目前仍缺乏特异、高效的治疗药物。为了探讨甲异靛在Ph阴性MPN患者中可能的临床应用价值,我们选用JAK2/V617F杂合突变细胞系SET2细胞,了解甲异靛对SET2细胞凋亡及增殖功能的影响,并探讨JAK-STAT信号通路在其中所起的作用。

材料与amp;方法

1. 细胞系与细胞培养: SET2细胞由美国辛辛那提儿童医院黄刚教授赠予,培养于含20%胎牛血清的RPMI 1640培养液中,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度孵箱培养。取对数生长期细胞进行实验。

2. 主要试剂: RPMI 1640培养基和胎牛血清购于美国Gibco公司; PE-Annexin V和7-AAD购于美国Sigma公司; CCK8试剂购于日本同仁化学研究所; 兔抗人JAK2、P-JAK2 (Tyr1007/1008)、STAT1、P-STAT1 (Tyr701)、STAT3、P-STAT3 (Ser727)、P-STAT3 (Tyr705)、STAT5、P-STAT5 (Tyr694)、BIM

抗体和羊抗兔的HRP二抗均购于美国Cell Signaling公司,兔抗人BCL-2、BCL-XL、BID抗体均购于美国Proteintech公司; 甲基纤维素半固体培养基购于美国Stem Cell公司。

3. 流式细胞术检测细胞凋亡: 用预冷的PBS洗涤待检测的处于对数生长期的细胞,后用1 \times Annexin V缓冲液重悬细胞,加PE-Annexin V和7-AAD,室温避光孵育15 min,再加入1 \times Annexin V缓冲液重悬,用筛网过滤至测定的流式管中,上流式细胞仪检测细胞凋亡。实验分组: ①阴性对照组(即甲异靛0 $\mu\text{mol/L}$ 组); ②甲异靛5 $\mu\text{mol/L}$ 组; ③甲异靛10 $\mu\text{mol/L}$ 组。以上3个实验组再根据药物作用时间分为24、48、72 h组。同一药物浓度同一时间组实验分别重复3次。

4. CCK8法检测细胞增殖: 取生长状态良好的对数生长期细胞,每孔1 \times 10⁴个细胞,设5个复孔,接种至96孔板中,置于细胞培养箱中培养。培养指定时间后,每孔加入新鲜配制的含10 μl 的毒性检测液CCK8,置37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中继续培养2~4 h。用酶标仪测波长为450 nm的吸光度(A)值。实验分组: ①阴性对照组(即甲异靛0 $\mu\text{mol/L}$ 组); ②甲异靛5 $\mu\text{mol/L}$ 组; ③甲异靛10 $\mu\text{mol/L}$ 组; ④甲异靛20 $\mu\text{mol/L}$ 组。以上4个实验组再根据药物作用时间分为24、48、72、96 h组。同一药物浓度同一时间组实验分别重复3次。

5. 集落形成实验: 将甲基纤维素半固体培养基H4230加入15 ml离心管,加入不同浓度甲异靛(0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)处理12 h后的SET2细胞,振荡混匀,吸取混有细胞的半固体培养基接种于24孔板,

每孔1 000个细胞,设3个复孔。两周后查看细胞并拍照。集落形成率(%)=(每孔所含 ≥ 50 个细胞的集落数量/每孔接种细胞数) $\times 100\%$ 。

6. Western blot法测定JAK-STAT信号通路相关蛋白表达:收集待测细胞,加入细胞裂解液(内含蛋白酶及磷酸酶抑制剂),测定蛋白浓度后,每孔上样20 μg 总蛋白于120 g/L的SDS-聚丙烯酰胺凝胶80 V恒压电泳,并将膜上的蛋白转移到醋酸纤维素膜上。将膜放于5 g/L的脱脂奶粉中封闭1 h,加入兔抗人JAK2、P-JAK2(Tyr1007/1008)、STAT1、P-STAT1(Tyr701)、STAT3、P-STAT3(Ser727)、P-STAT3(Tyr705)、STAT5、P-STAT5(Tyr694)和 β -actin抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜后,PBST洗涤10 min $\times 3$ 次后,加入羊抗兔HRP二抗,摇床常温孵育1 h后,PBST洗涤10 min $\times 3$ 次,加入发光试剂,用显影仪显影、拍照。实验分组:①阴性对照组(即0 $\mu\text{mol/L}$ 甲异靛组);②5 $\mu\text{mol/L}$ 甲异靛组;③10 $\mu\text{mol/L}$ 甲异靛组;④20 $\mu\text{mol/L}$ 甲异靛组。

7. Western blot法检测凋亡相关蛋白:收集待测细胞,加入细胞裂解液(内含蛋白酶抑制剂),测定蛋白浓度后,每孔上样20 μg 总蛋白于120 g/L的SDS-聚丙烯酰胺凝胶80 V恒压电泳,并将膜上的蛋白转移到醋酸纤维素膜上。将膜放于5 g/L的脱脂奶粉中封闭1 h,加入兔抗人BIM、BCL-2、BCL-XL、BID和 β -actin抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,PBST洗涤10 min $\times 3$ 次后,加入羊抗兔HRP二抗,摇床常温孵育1 h后,PBST洗涤10 min $\times 3$ 次,加入发光试剂,用显影仪显影、拍照。实验分组:①阴性对照组(即0 $\mu\text{mol/L}$ 甲异靛组);②5 $\mu\text{mol/L}$ 甲异靛组;③10 $\mu\text{mol/L}$ 甲异靛组;④20 $\mu\text{mol/L}$ 甲异靛组。

8. 统计学处理:采用SPSS 22.0软件进行统计学分析,不同时间点多组间比较采用随机截距模型进行多水平分析,同一时间点多组间均数的比较采用单因素方差分析进行检验,组间两两比较采用Dunnett法,以阴性对照组为参考, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 甲异靛对SET2细胞凋亡的影响:SET2细胞在未加甲异靛24、48、72 h后,细胞凋亡率差异无统计学意义。在5 $\mu\text{mol/L}$ 甲异靛作用下,随着时间推移,细胞凋亡率的变化也无统计学意义。10 $\mu\text{mol/L}$ 甲异靛作用SET2细胞24、48、72 h后,细胞凋亡率

分别为(61.50 \pm 0.57)%、(77.20 \pm 0.51)%、(79.50 \pm 0.51)%。结果显示,48 h时的细胞凋亡率较24 h时有明显上升趋势,但48和72 h时的细胞凋亡率上升趋势并不显著。不同浓度(0、5、10 $\mu\text{mol/L}$)甲异靛作用于SET2细胞24 h后,细胞凋亡率分别为(17.86 \pm 0.90)%、(28.67 \pm 0.68)%、(61.50 \pm 0.57)%、呈浓度依赖性增加($P < 0.01$)。不同浓度甲异靛作用于SET2细胞48、72 h后,均呈类似的变化趋势(P 值均 < 0.01)(表1)。

表1 不同浓度的甲异靛作用于SET2细胞不同时间点细胞凋亡率(% , Mean \pm SD, 实验重复3次)

组别	作用24 h	作用48 h	作用72 h
0 $\mu\text{mol/L}$ 甲异靛处理组	17.86 \pm 0.90	13.60 \pm 0.71	15.00 \pm 0.30
5 $\mu\text{mol/L}$ 甲异靛处理组	28.67 \pm 0.68	29.93 \pm 0.45	29.76 \pm 0.61
10 $\mu\text{mol/L}$ 甲异靛处理组	61.50 \pm 0.57	77.20 \pm 0.51	79.50 \pm 0.51
F 值	30.219	10 157.363	14 231.897
P 值	< 0.01	< 0.01	< 0.01

2. 甲异靛对SET2细胞增殖及集落形成的影响:甲异靛作用SET2细胞后,随着药物浓度增加,增殖抑制率增高。20 $\mu\text{mol/L}$ 甲异靛作用SET2细胞24、48、72、96 h后,细胞增殖抑制率分别为(71.62 \pm 0.30)%、(80.10 \pm 0.45)%、(78.63 \pm 0.07)%、(73.05 \pm 1.49)%、均分别明显高于相应时间的未加药对照组的(-0.04 \pm 1.05)%、(-0.02 \pm 2.73)%、(0.02 \pm 0.21)%、(0.00 \pm 2.81)%(P 值均 < 0.01)(图1)。不同浓度(0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)甲异靛作用SET2细胞12 h后,细胞集落形成率分别为(4.48 \pm 1.19)%、(4.00 \pm 0.64)%、(3.52 \pm 0.49)%、(2.55 \pm 0.36)%、有随着药物浓度增加而降低的趋势,但统计学分析提示,0、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 甲异靛组的细胞集落形成率差异无统计学意义,而20 $\mu\text{mol/L}$ 甲异靛组的细胞集落形成率较前三组明显降低(图2)。

3. 甲异靛对SET2细胞JAK-STAT信号通路相关蛋白表达的影响:不同浓度(0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)甲异靛作用SET2细胞12 h, JAK2、P-JAK2、P-STAT1、P-STAT3(Ser727)、P-STAT3(Tyr705)、STAT5的表达水平均有随甲异靛药物浓度增加而下调的趋势(P 值均 < 0.05),但P-STAT5的表达水平无明显变化(图3)。

4. 甲异靛对SET2细胞凋亡相关蛋白表达的影响:不同浓度(0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)甲异靛作用SET2细胞12 h,抗凋亡蛋白BCL-2、BCL-XL的表达水平

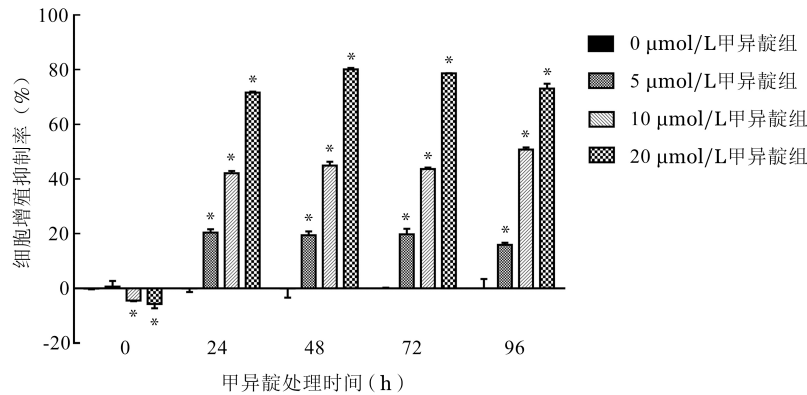
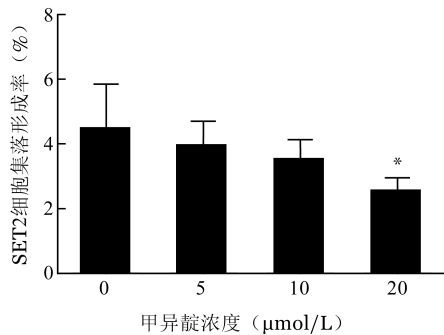


图1 不同浓度甲异靛作用SET2细胞不同时间后的细胞增殖抑制率比较(与0 μmol/L 甲异靛组比较,*P<0.05。实验重复3次)

随药物浓度增加而下调,促凋亡蛋白BID、BIM的表达水平随药物浓度增加而上调(P值均<0.05)(图4)。

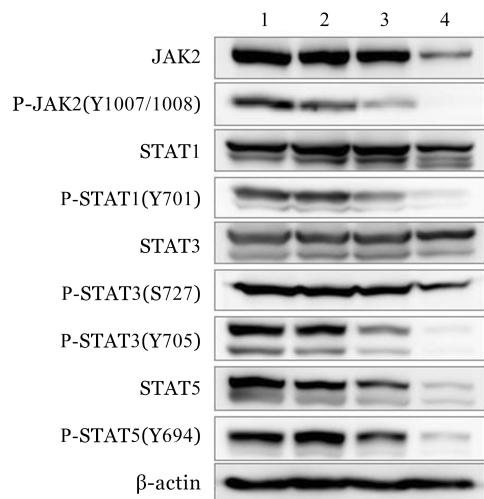


与0 μmol/L 甲异靛组比较,*P<0.05。实验设3个复孔

图2 不同浓度甲异靛作用SET2细胞12 h后细胞集落形成率比较

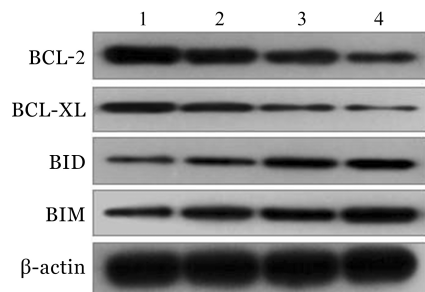
讨论

MPN是一组起源于造血干细胞,以骨髓一系或多系过度增殖为特征的疾病,主要包括CML、PV、原发性血小板增多症(ET)、原发性MF(PMF)等。TKI已成为Ph/BCR-ABL1阳性为特征的CML的一线治疗方案^[7-8]。JAK2/V617F突变见于95%的PV及50%~60%的PMF和ET。JAK-STAT信号通路的异常活化是绝大多数Ph阴性MPN的分子发病基础^[9-11]。芦可替尼是一种强效JAK1/JAK2选择性抑制剂。尽管已有数据证实该药可显著改善患者的脾脏肿大、症状负荷,以及可能延长患者总生存期,已推荐用于中、高危的MF及对羟基脲无应答/不耐受的PV患者,但由于Ⅲ~Ⅳ级的贫血和血小板减少及继发耐药,3年约有30%接受治疗的患者退出治疗^[12]。且迄今患者的基因突变仍不能对JAK抑制剂的疗效进行有效预测。因此,寻找新的治疗药物依然是MPN领域的主要研究方向。



1~4分别为0、5、10、20 μmol/L 甲异靛处理组

图3 Western blot方法检测不同浓度甲异靛作用SET2细胞12 h JAK-STAT信号通路蛋白表达情况



1~4分别为0、5、10、20 μmol/L 甲异靛处理组

图4 Western blot方法检测不同浓度甲异靛作用SET2细胞12 h抗凋亡蛋白及促凋亡蛋白表达情况

甲异靛是“当归龙荟丸”提取物之一靛玉红的衍生物。Hoessel等^[13]发现多种靛玉红衍生物可与细胞周期依赖性激酶结合,并抑制该激酶功能,使肿瘤细胞阻滞在某个周期,从而起到抗肿瘤的作用。但在既往的研究中,仅有少数研究发现甲异靛

有阻滞细胞周期的作用^[14-16],其中涉及的细胞系包括:人结肠癌细胞HT-29细胞、多种人急性白血病细胞和原代急性髓系白血病(AML)细胞;涉及的机制有:甲异靛可抑制Wnt通路中的GSK-3 β 磷酸化,或者作用于细胞周期相关蛋白p21和p27。有少数研究显示甲异靛可能有诱导恶性细胞分化的作用^[15-17],具体机制尚不明确。更多研究表明的是甲异靛可抑制细胞增殖及诱导细胞凋亡^[14,18-19]。王一^[18]发现,甲异靛能诱导人乳腺癌MCF-7细胞凋亡并抑制细胞增殖,其发生机制可能与下调BCL-2有关。APL细胞系NB4细胞在甲异靛的作用下,BCL-2表达下调^[15]。甲异靛对耐吉西他滨的人胰腺导管腺癌细胞系PDAC细胞诱导出的凋亡过程可能与AMPK的活化有关。此外,甲异靛可以降低肿瘤细胞内氧蓄积及糖摄取,同时增加细胞内的活性氧^[19]。还有研究发现,MAPK信号途径也参与到甲异靛诱导NB4细胞凋亡的过程中^[20]。体外通过对NB4、HL-60、U937细胞和原代AML细胞的研究表明,甲异靛除了作用于凋亡相关蛋白外,还可下调人端粒酶逆转录酶表达和加强传统化疗药物阿糖胞苷及去甲氧柔红霉素的细胞毒作用^[16]。Caspase信号通路活化后,促使抗凋亡蛋白bcl-2的表达下调,促凋亡蛋白bax上调,也可能参与到AL细胞系HL-60细胞的增殖抑制及凋亡诱导中^[21]。在Jurkat细胞的研究中,甲异靛通过活化Caspase-2、-3、-8、-9,降低AKT信号通路中相关蛋白的磷酸化水平,协同诱导细胞凋亡^[22]。在WNT信号通路方面,也有少量研究发现甲异靛可使HL-60细胞中 β -catenin和c-myc基因表达下降,明显降低细胞中c-MYC蛋白表达水平,并使细胞中 β -catenin表达下降,提示甲异靛可抑制HL-60细胞中Wnt信号通路的传导,降低癌基因和相关蛋白的表达,从而发挥治疗白血病的作用^[23]。

在TKI问世前,通过与白消安、羟基脲等治疗药物的对比,发现甲异靛治疗CML具有较高的缓解率,对骨髓不产生抑制作用,不良反应较轻^[6,24-27]。疗效机制研究证实甲异靛在细胞水平可抑制肿瘤细胞增殖、促进凋亡^[1-5]。本研究进一步证实甲异靛可有效抑制MPN细胞系SET2细胞的增殖、抑制集落形成、促进其凋亡,并呈现出明显的浓度依赖性。

既往有研究提示甲异靛抑制CML细胞系K562细胞增殖有赖于抑制STAT相关信号通路,即通过降低STAT5、ERK2蛋白含量,部分阻止BCR-ABL1细胞恶性信号的传导,从而抑制K562细胞增殖

并诱导其凋亡^[3]。JAK-STAT信号通路的异常活化被认为是绝大多数Ph阴性MPN的分子发病机制^[9-11]。本研究我们发现甲异靛通过下调JAK-STAT信号通路相关蛋白如JAK2、P-JAK2、P-STAT1、P-STAT3、STAT5的表达抑制信号传导,伴随着抗凋亡蛋白BCL-2、BCL-XL表达下调,促凋亡蛋白BID、BIM表达上调,从而抑制SET2细胞的增殖并诱导其凋亡。

自1997年开始,有多项临床试验将甲异靛用于逾千例CML患者^[6,25-27],结果均提示甲异靛不良反应少,且对骨髓不产生抑制作用,故本研究并未设立甲异靛针对正常细胞的对照组。目前对于甲异靛与JAK抑制剂芦可替尼在Ph阴性MPN中的研究仍在进行中。

综上,本研究结果证实甲异靛对MPN细胞系SET2细胞在体外有显著的促进凋亡和抑制增殖作用,其作用机制主要是抑制了JAK-STAT信号通路。本研究提示甲异靛在Ph阴性MPN患者治疗中有一定的应用前景。但由于本研究仅为细胞系体外研究,研究结果有待今后患者原代细胞和MPN小鼠模型体内研究来进一步加以肯定。

参考文献

- [1] 宋鲁燕,钱林生. 甲异靛对K562细胞凋亡的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 1999, 19(6): 353-355.
- [2] 吴英理,邹维礼,孙关林,等. 甲异靛对K562细胞的作用及其机制的初步研究[J]. 中华血液学杂志, 2004, 25(1): 43-45.
- [3] 刘兵城,肖志坚. 甲异靛对K562细胞bcr-abl信号通路的影响以及诱导细胞凋亡机制研究[J]. 中华血液学杂志, 2008, 29(12): 815-818. DOI: 10.3321/j.issn.0253-2727.2008.12.006.
- [4] Lee CC, Lin CP, Lee YL, et al. Meisoindigo is a promising agent with in vitro and in vivo activity against human acute myeloid leukemia [J]. Leukemia Lymphoma, 2010, 51(5): 897-905. DOI: 10.3109/10428191003672115.
- [5] Huang M, Lin HS, Lee YS, et al. Evaluation of meisoindigo, an indirubin derivative: in vitro antileukemic activity and in vivo pharmacokinetics [J]. Int J Oncol, 2014, 45(4):1724-1734. DOI: 10.3892/ijo.2014.2548.
- [6] 竺晓凡,钱林生,刘鸿,等. 甲异靛治疗慢性粒细胞白血病远期疗效观察[J]. 中华血液学杂志, 1998, 19(3): 156-157.
- [7] O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia [J]. N Engl J Med, 2003, 348(11):994-1004. DOI: 10.1056/NEJMoa022457.
- [8] Palandri F, Castagnetti F, Alimena G, et al. The long-term durability of cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia treated with imatinib 600mg: the GIMEMA CML Working Party experience after a 7-year

- follow-up[J]. *Haematologica*, 2009, 94(2): 205-212. DOI: 10.3324/haematol.13529.
- [9] Wernig G, Mercher T, Okabe R, et al. Expression of Jak2V617F causes a polycythemia vera-like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model [J]. *Blood*, 2006, 107(11): 4274-4281. DOI: 10.1182/blood-2005-12-4824.
- [10] Lacout C, Pisani DF, Tulliez M, et al. JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis [J]. *Blood*, 2006, 108(5): 1652-1660. DOI: 10.1182/blood.2006.02.002030.
- [11] Pikman Y, Lee BH, Mercher T, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia [J]. *PLoS Med*, 2006, 3(7):e270. DOI: 10.1371/journal.pmed.0030270.
- [12] 肖志坚. 进一步规范我国骨髓增殖性肿瘤的诊断和治疗[J]. *中国实用内科杂志*, 2018, 38(2): 89-92. DOI:10.19538/j.nk2018020101.
- [13] Hoessel R, Leclerc S, Endicott JA, et al. Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases [J]. *Nat Cell Biol*, 1999, 1(1):60-67. DOI: 10.1038/9035.
- [14] Mingxin Z, Yan L, Hongbo W, et al. The antitumor activity of meisoindigo against human colorectal cancer HT-29 cells in vitro and in vivo [J]. *J Chemother*, 2008, 20(6):728-733. DOI: 10.1179/joc.2008.20.6.728.
- [15] 王一, 刘兵城, 彭智, 等. 甲异靛对急性早幼粒细胞白血病细胞系 NB4 体外作用的研究 [J]. *白血病·淋巴瘤*, 2005, 14(3): 136-139.
- [16] Lee CC, Lin CP, Lee YL, et al. Meisoindigo is a promising agent with in vitro and in vivo activity against human acute myeloid leukemia [J]. *Leuk Lymphoma*, 2010, 51(5):897-905. DOI: 10.3109/10428191003672115.
- [17] Liu XM, Wang LG, Li HY, et al. Induction of differentiation and down-regulation of c-myb gene expression in ML-1 human myeloblastic leukemia cells by the clinically effective anti-leukemia agent meisoindigo [J]. *Biochem Pharmacol*, 1996, 51(11):1545-1551.
- [18] 王一, 连小云, 张珂, 等. 甲异靛对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖和凋亡影响的实验研究 [J]. *现代肿瘤医学*, 2011, 19(7): 1312-1315. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2011.07.16.
- [19] Cheng XL, Kim JY, Ghafoory S, et al. Methylisoidigo preferentially kills cancer stem cells by interfering cell metabolism via inhibition of LKB1 and activation of AMPK in PDACs [J]. *Mol Oncol*, 2016, 10(6): 806-824. DOI: 10.1016/j.molonc.2016.01.008.
- [20] 刘兵城, 肖志坚. 甲异靛诱导 NB4 细胞凋亡的分子机制研究 [J]. *中华血液学杂志*, 2010, 30(2):123-125. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2010.02.013.
- [21] 王一, 朱孝峰, 肖志坚, 等. 甲异靛诱导白血病细胞 HL-60 凋亡及机制探讨 [J]. *癌症*, 2005, 24(12): 1464-1468.
- [22] 刘兵城, 肖志坚. 甲异靛对 Jurkat 细胞 AKT 信号通路的影响及其在细胞凋亡中作用的研究 [J]. *临床血液学杂志*, 2008, 21(3):255-259. DOI: 10.3969/j.issn.1004-2806.2008.03.009.
- [23] 左明新, 李燕, 周建华, 等. 甲异靛对 K562 和 HL-60 细胞 Wnt 信号通路的影响 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2010, 18(3): 579-582.
- [24] 异靛甲临床治疗协作组. 异靛甲治疗 134 例慢性粒细胞白血病的临床研究 [J]. *中华血液学杂志*, 1988, 9(3): 135.
- [25] 甲异靛 III 期临床试验协作组. 甲异靛治疗慢性粒细胞白血病 III 期临床观察 [J]. *中华血液学杂志*, 1997, 18(2): 69-72.
- [26] Xiao ZJ, Qian L, Liu B, et al. Meisoindigo for the treatment of chronic myelogenous leukemia [J]. *Br J Haematol*, 2000, 111(2): 711-712.
- [27] 刘兵城, 钱林生, 王一, 等. 甲异靛治疗慢性粒细胞白血病临床及疗效机制的研究 [J]. *中国实用内科杂志*, 2000, 20(10): 610-612.

(收稿日期:2018-08-08)

(本文编辑:刘爽)

·读者·作者·编者·

关于重视引用国内文献的意见

部分作者在撰写论文时,只引用国外文献(或非中文语种的文献)。诚然,在医学的许多领域,国内的研究水平确实有待提高,有引用国外文献的必要。但是,不引用国内相关文献,将存在以下问题:①作者没有阅读国内文献,这样作者阅读的文献就不全面,作者所撰写的论文、综述等的科学性、先进性就值得商榷。②不引用国内文献,就不能准确、全面地反映国内的研究水平和进展,毕竟本刊发表的文章主要的阅读对象是中国医师。③有的作者虽然阅读了国内文献,但未引用。不引用国内文献的想法可能更为复杂,如轻视或忽略国内同行,或暗示首创权。除非是专门的国外医学文摘或国外文献综述,均应有国内文献的复习、引用和注解。本刊倡导在论文的撰写中应维护参考文献的科学性,鼓励作者在引用国外文献的同时检索并引用国内相关的文献。

本刊编辑部