

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.04.010

氟苯达唑对人急性髓系白血病 HL-60 细胞的增殖抑制作用研究 *

蔡心颖^{1,2} 林东麒³ 陈清² 杨虹² 郭江睿⁴ 李暉^{2Δ}

(1 汕头市中心医院临床医学研究中心 广东 汕头 515000; 2 福建医科大学药学院 福建 福州 350004;

3 汕头大学医学院附属第二医院心胸外科 广东 汕头 515000;

4 福建省血液病研究所, 福建省血液病学重点实验室, 福建医科大学附属协和医院 福建 福州 350004)

摘要 目的:研究氟苯达唑对人急性髓系白血病 HL-60 细胞增殖的抑制作用,明确氟苯达唑对 HL-60 细胞周期,凋亡发生的作用机制。**方法:**噻唑蓝法(MTT)检测氟苯达唑对人急性髓系白血病 HL-60 细胞的生长抑制作用,流式细胞术检测氟苯达唑对 HL-60 细胞周期,DNA 片段化的影响,免疫印迹法检测 Caspase, Raf, Bcl-2 家族蛋白表达。**结果:**氟苯达唑抑制人急性髓系白血病 HL-60 细胞生长,HL-60 细胞 G₂/M 期增加,与阴性对照组相比,在一定的剂量和时间内,差别具有显著统计学意义;DNA 片段化上升,0.25,0.5,1 μM 组与对照组相比差别具有显著统计学意义,促使 Cleaved PARP, Cleaved-caspase 3, Cleaved-caspase 9 蛋白表达量趋势增加;Bag-1 和 Bcl-2 蛋白表达量降低;b-raf, c-raf 磷酸化蛋白表达水平逐渐降低。**结论:**氟苯达唑通过诱导 HL-60 细胞阻滞于 G₂/M 期,增加 DNA 片段化水平,激活 Caspase, Raf, Bcl-2 家族介导的凋亡相关通路抑制人急性髓系白血病 HL-60 细胞增殖,诱导人急性髓系白血病 HL-60 细胞发生凋亡而发挥抗肿瘤作用。

关键词:氟苯达唑;急性髓系白血病;周期;凋亡

中图分类号:R-33;R733.71 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)04-648-06

The Inhibitory Effect of Flubenazole on Proliferation of Human Acute Myeloid Leukemia HL-60 Cells*

CAI Xin-ying^{1,2}, LIN Dong-qir³, CHEN Qing², YANG Hong², GUO Jiang-rui⁴, LI Wei^{2Δ}

(1 Clinical Medical Research Center, Shantou Central Hospital, Shantou, Guangdong, 515000, China; 2 School of Pharmacy, Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian, 350004, China; 3 Department of Cardiothoracic Surgery, Second Affiliated Hospital of Shantou University Medical College, Shantou, Guangdong, 515000, China; 4 Fujian Institute of Hematology, Fujian Provincial Key Laboratory of Hematology, Union Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian, 350004, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the inhibitory effect of flubendazole on the proliferation of human acute myeloid leukemia HL-60 cells, and clarifying the mechanism of flubendazole on cell cycle and apoptosis of HL-60 cells. **Methods:** Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was used to evaluate the growth inhibition effects of flubendazole on human acute myeloid leukemia HL-60 cells. Flow cytometry was used to detect the effect of flubendazole on HL-60 cell cycle and DNA fragmentation. Western blotting was used to detect the expression of Caspase, Raf, and Bcl-2 family proteins. **Results:** Flubendazole inhibited the growth of human acute myeloid leukemia HL-60 cells. The G₂/M phase, the DNA fragmentation and the expression of Cleaved PARP, Cleaved-caspase 3, and Cleaved-caspase 9 of HL-60 cells increased. The expression of Bag-1 protein was decreased and the Bcl-2 was increased. The b-raf and the c-raf phosphorylation protein levels was inhibited by Flubendazole. **Conclusion:** The G₂/M phase of human acute myeloid leukemia HL-60 cells was arrested by flubendazole, and increasing DNA fragmentation level and activating Caspase, Raf, and Bcl-2 family apoptosis-related pathways which Inducing apoptosis in human acute myeloid leukemia HL-60 cells and taking anti-tumor effects.

Key words: Flubendazole; Acute myeloid leukemia; Cell Cycle; Apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R733.71 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)04-648-06

前言

急性髓系白血病(AML)是高发的血液疾病之一。白血病

发病率高,据相关统计,60 岁以下急性髓系白血病患者五年总生存率为 26%,其发病率随年龄增加而不断上升,60 岁以上急性髓系白血病患者五年总生存率达 3%-8%,且预后较差^[1,2]。是

* 基金项目:福建省自然科学基金项目(2017J01531);福建省卫生健康中青年骨干人才培养项目(2018-ZQN-33);

福建省青年科技人才创新项目(2017J05127)

作者简介:蔡心颖(1992-),女,硕士,研究方向:肿瘤药理与信号转导,E-mail:407901264@qq.com

Δ 通讯作者:李暉(1978-),男,博士,讲师,研究方向:肿瘤药理与生物技术药物,E-mail:18359140032@163.com

(收稿日期:2019-06-30 接受日期:2019-07-26)

一种非均匀的血液性恶性肿瘤,临床表现主要为贫血、出血、感染、浸润等^[3,4]。临床上根据病情通常采用大剂量常规化疗进行诱导缓解后强化和维持治疗。目前 AML 常规治疗仍是以 7 天阿糖胞苷 +3 天柔红霉素 1-2 个疗程后,取得完全诱导缓解再反复给与大剂量阿糖胞苷或异体干细胞移植进行治疗。传统治疗方法并发症多发,严重影响患者生活质量^[5]。根据文献报道,氟苯达唑不仅具有良好的抗寄生虫效果,还表现出较强的抗肿瘤活性^[6-8]。氟苯达唑作为一种特殊的微管抑制剂,与微管结合在秋水仙碱结合位点,通过促使微管蛋白解聚,阻断细胞的有丝分裂^[6]。氟苯达唑与微管结合在秋水仙碱结合位点与微管破坏剂如长春碱类或微管稳定剂如紫杉醇类都不同^[9],但具体结合区域目前仍不明确。另一方面,苯并咪唑类已被发现可以抑制多种酪氨酸激酶的活性,尤其对 RAF 激酶等具有明显的抑制作用^[10],氟苯达唑作为苯并咪唑类驱虫药之一,对酪氨酸激酶活性抑制作用仍未见报道。目前关于氟苯达唑对多种恶性肿瘤的抗癌作用的报道仍较少,对急性髓系白血病的抗肿瘤作用尚未见相关报道。本课题组考察了氟苯达唑对人急性髓系白血病 HL-60 细胞的生长抑制作用,并对其作用机制进行初步探索。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

人急性髓系白血病细胞 HL-60 于中科院上海细胞研究所,为悬浮细胞;四甲基偶氮唑盐(MTT)(sigma 公司);RPMI1640 培养基粉剂(美国 Gibco);胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司);Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(Roche 公司);Bio-Rad 550 全自动酶标仪:美国 Thermo Forma 公司;流式细胞仪:美国 BD 公司;FACSCantoII;稳压稳流电泳仪:美国 BIO-RAD 公司;免疫印迹成像系统:Carestream 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人急性髓系白血病 HL-60 细胞培养于含 10%胎牛血清的 RPMI 培养液中,置于 37℃,5%CO₂ 饱和湿度培养箱中培养,取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 噻唑蓝比色法检测(MTT 法) 取对数生长期的肿瘤细胞,按 4×10^4 个/mL 接种于 96 孔培养板中,每孔 180 μ L 细胞液。实验组分别加入不同浓度的药物 20 μ L/孔,对照组不加药,另设背景对照,每组设 3 个复孔,37℃培养。在药物作用 24 h、48 h 后加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μ L/孔,继续培养 4 h 后,悬浮细胞离心 7 min 弃上清液,加入 DMSO,微量振荡仪振荡 10 min,立即用酶标仪在 570 nm 波长处测吸光度(OD 值)。

1.2.3 碘化丙啶(PI)染色法 检测细胞周期和 DNA 片段化 收集细胞,离心 1000 rpm,5 min,用新鲜培养液重悬细胞。计数,调整细胞最终浓度为 5×10^6 个/mL,2 mL/皿,设置对照组和加药组,作用 12 h;收集培养液,用预冷的 PBS 洗 2 次,离心 2000 rpm,离心 5 min 收集细胞;用 0.5 mL PBS 重悬细胞,取 4.5 mL 遇冷的 75%乙醇,将 0.5 mL 的细胞液吹打均匀,缓慢地加入乙醇中,轻轻混匀。4℃放置冷却后,转移至 -20℃冰箱中放置 24 h 以上;1000×g 离心 5 min,沉淀细胞,小心吸除上清,加入约 1 mL,冰浴预冷的 Wash Buffer,重悬细胞。再次离心沉淀细胞,小心吸除上清。染色:每管细胞样品中加入 0.5 mL PI Staining Solution,缓慢并充分重悬细胞沉淀,37℃避光温浴 30 min。染色完成后宜在 24 h 内完成流式检测。用流式细胞仪在激发

波长 488 nm 波长处检测红色荧光,同时检测光散射情况。采用分析软件进行细胞 DNA 含量分析和光散射分析。

1.2.4 免疫印迹法检测蛋白表达 取对数生长期的 HL-60 细胞,接种到培养皿,设置对照组和加药组,作用 48 h;用预冷的 PBS 洗涤,收集细胞;加入细胞裂解液,于 4℃冰上裂解 30 min,期间 5 min 震荡一次;离心,小心收集上清液,取少量上清液用 BCA 法测定蛋白含量,其余上清蛋白液加入 4× SDS Loading buffer,变性 5 min,-20℃保存,留作 Western Blot 检测电泳。取变性后的蛋白样品等量上样于 5%的浓缩胶与 10%的分离胶中(主要成分为 ddH₂O,30%聚丙烯酰胺,1.5M Tris-HCl(pH8.8)或 1.0M Tris-HCl(pH6.8)10%SDS,10%过硫酸铵,TEMED)电泳,电泳结束后,调整电压,置于冰上转膜;封闭:转膜后,用 TBST 润洗,5%的封闭液封闭 1-2 h;抗体孵育:将一抗原液用一抗稀释液按 1:500-1:1000 稀释后覆盖于 PVDF 膜上于室温下孵育 4℃过夜,用 TBST 清洗三次。将二抗按 1:5000 用封闭液稀释后,在摇床上与 PVDF 膜于室温下孵育 1-2 h,TBST 清洗 3 次;化学发光,显影,分析。

1.3 统计学方法

用 GraphPad Prism5.0 软件进行统计学分析,正态计量资料用 " $\bar{x} \pm s$ " 表示,两组计量资料组间比较采用 t 检验,三组计量资料采用方差分析(ANOVA)进行比较。

2 结果

2.1 氟苯达唑抑制人急性髓系白血病 HL-60 细胞的生长

噻唑蓝(MTT)比色法的结果显示,氟苯达唑对 HL-60 细胞活力具有一定的抑制作用。随着药物浓度的增加,对细胞生长抑制作用越来越明显。氟苯达唑抑制 HL-60 细胞增殖的 24 h IC₅₀ 为 $0.161 \pm 0.038 \mu\text{M}$,48 h IC₅₀ $0.156 \pm 0.027 \mu\text{M}$ 。(图1)。

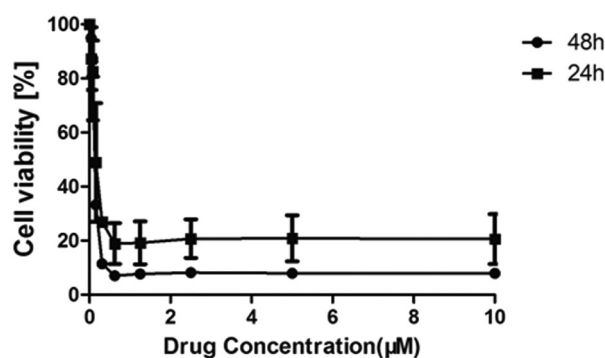


图1 不同剂量氟苯达唑对人急性髓系白血病 HL-60 细胞生长抑制作用

Fig.1 The inhibitory effects of different doses of flubendazole on human acute myeloid leukemia HL-60 cells

2.2 氟苯达唑阻滞 HL-60 细胞于 G₂/M 期

采用流式细胞仪进行 PI 单染。结果显示用不同剂量氟苯达唑处理 HL-60 细胞 12 h,G₀/G₁ 期比例与阴性对照组相比逐渐降低,G₂/M 期比例逐渐增加,在 0.5,1,2 μM 处差别具有统计学意义。用 0.5 μM 氟苯达唑处理 HL-60 细胞处理不同时间,随着时间增加,G₀/G₁ 期比例与阴性对照组相比逐渐降低,G₂/M 期比例逐渐增加,与对照组相比,4 h 组至 24 h 组差别具有统计学意义。(图2)。

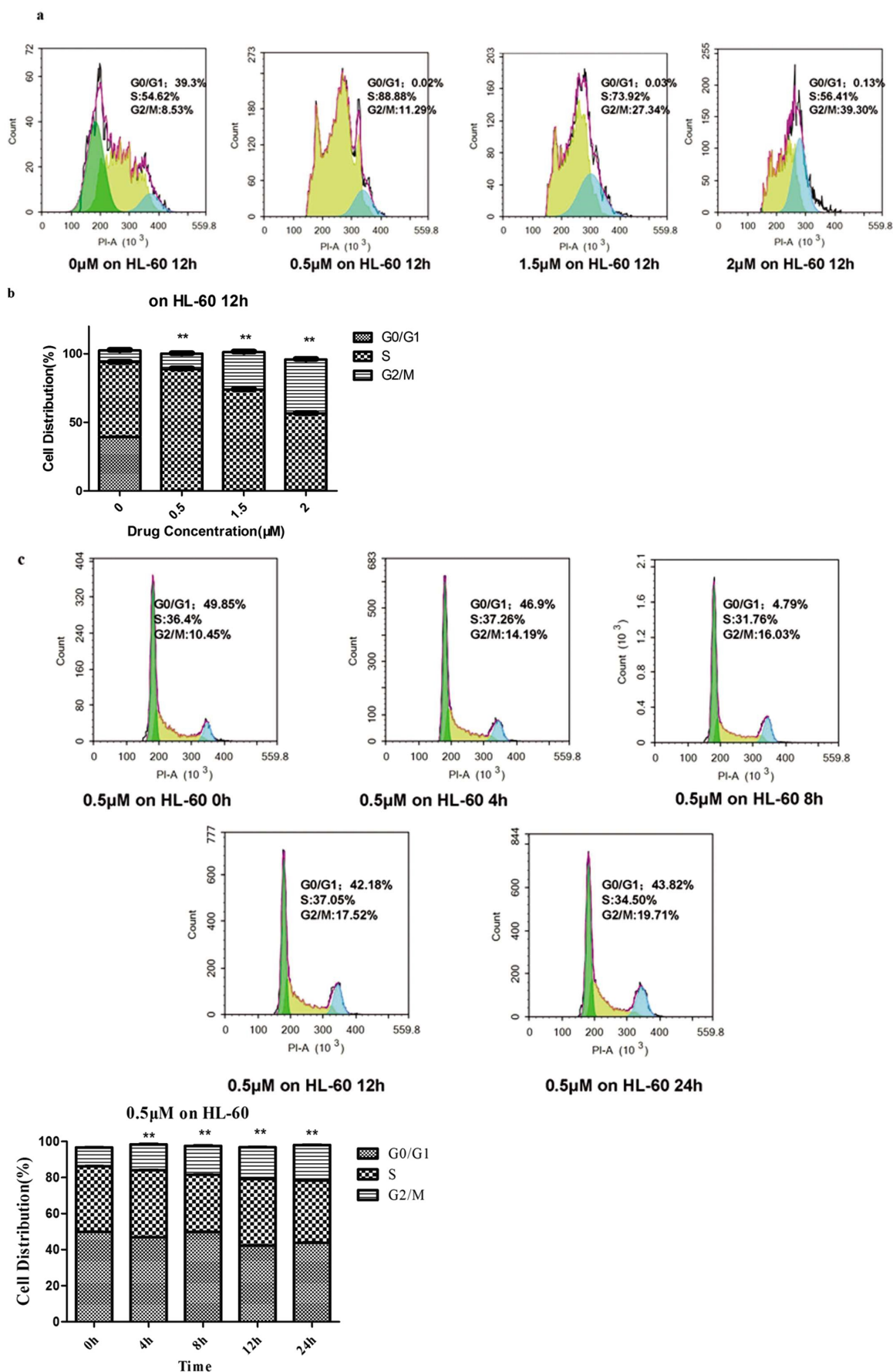


图 2 不同剂量(a,b)和时间(c,d)下氟苯达唑对人急性髓系白血病 HL-60 细胞周期的影响
与对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

Fig.2 The effect of flubendazole on cell cycle of human acute myeloid leukemia HL-60 at different doses (a,b)and times(c,d).

Compared with the control, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

2.3 氟苯达唑诱导 HL-60 细胞 DNA 片段化

PI 单染法检测细胞 DNA 片段化,即细胞凋亡峰。用不同浓度的甲苯咪唑处理急性髓系白血病细胞 HL-60 48 h,与对照

组相比,DNA 片段化比例上升,呈剂量依赖性,0.25,0.5,1 μM 组差别具有显著统计学意义。表明氟苯达唑能诱导 HL-60 细胞发生凋亡。(图 3)。

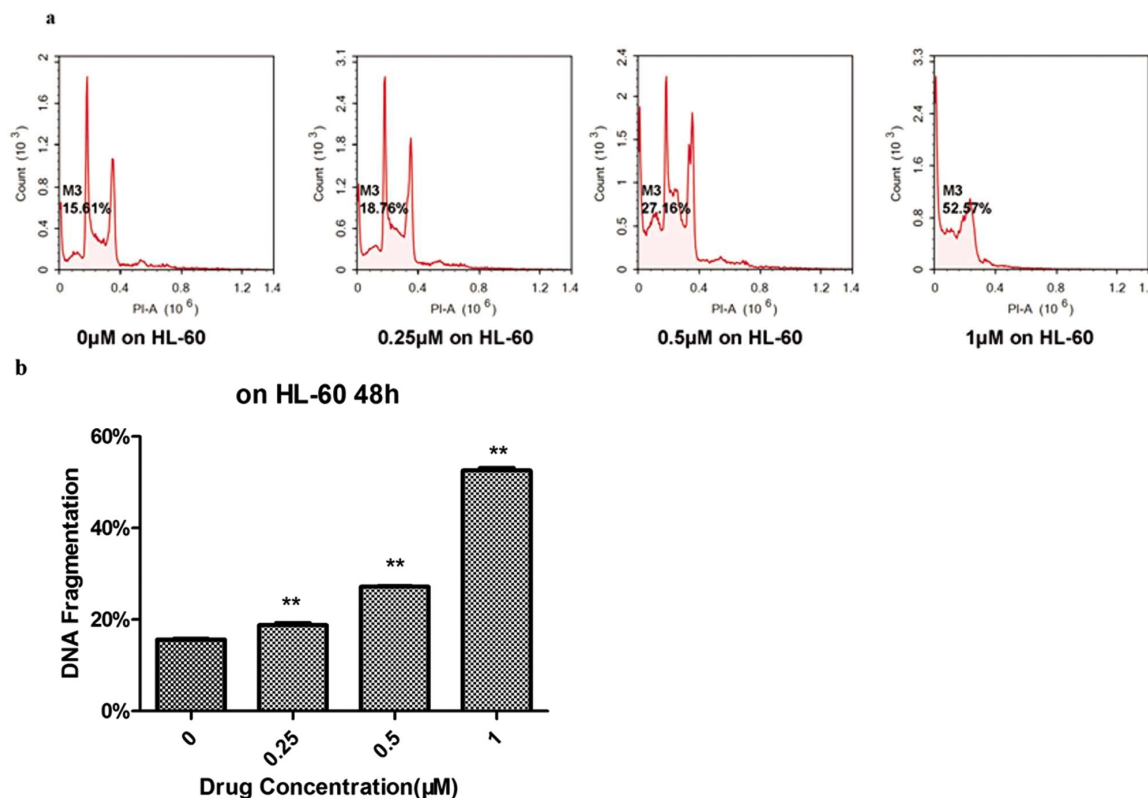


图 3 不同剂量(a,b)氟苯达唑对人急性髓系白血病 HL-60 细胞 DNA 片段化的影响

与对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

Fig.3 The effect of different doses of flubendazole on DNA fragmentation of human acute myeloid leukemia HL-60 cells(a,b)

Compared with the control, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

2.4 氟苯达唑对 HL-60 细胞凋亡相关蛋白影响

免疫印记实验结果显示, 用浓度为 0、0.25、0.5、1、1.5 μM 的氟苯达唑处理 48 h 后, caspase 家族的促凋亡相关蛋白 Cleaved-Parp、Cleaved-caspase 3、Cleaved-caspase 9 表达量呈现出增加的趋势, 其中与对照组相比, Cleaved-caspase 3 在 1.5 μM 差别具有统计学意义, Cleaved-caspase 9 在 0.5、1、1.5 μM 差别具有显著统计学意义; Raf 家族抗凋亡蛋白 B-raf-p、P-c-raf 表达量逐渐降低, 与对照组相比, B-raf-p 和 P-c-raf 在 0.25、0.5、1、1.5 μM 差别具有显著的统计学意义; Bcl-2 家族抗凋亡蛋白 Bag-1 信号逐渐减弱, Bcl-2 信号逐渐增强, 与对照组相比, Bcl-2 在 0.25、0.5、1、1.5 μM 处具有显著的统计学差异; Bag-1 在 0.5、1、1.5 μM 处具有显著的统计学差异。(图 4)。

3 讨论

AML 是我国好发的血液恶性肿瘤疾病之一, 目前主要发现与 AML 致病机制相关的基因主要包括 FMS 样酪氨酸激酶-III 基因^[11-13], 抑癌因子 P53 基因^[14], DNA 甲基转移酶相关激酶 3A 和 Tet 甲基双加氧酶 1^[15], 染色体修饰有关的调节因子 ASTL1 和 EZH1^[16], 粘连复合物相关基因突变 STAG2 和 RAD21^[17], 细胞内的编码细胞核内外穿梭蛋白 NPM1^[18]等一系列基因突变。现临床上通常采用细胞毒药物进行化疗^[9]。这些药物毒副作用大, 效果也不够理想。新药的开发迫在眉睫, 但是新药的开发是

一个曲折、漫长的过程, 在此基础上, 药物重定位就将成为一项具有重要意义研究方向^[19]。研究表明, 苯并咪唑类驱虫药具有潜在的抗肿瘤活性, 其良好的安全性与独特的抗癌作用引起了临床医学工作者的兴趣, 目前主要进行抗肿瘤机制研究^[20-22]。

本实验首次采用氟苯达唑对人急性髓系白血病 HL-60 细胞系进行研究。根据预实验的结果选取合适的浓度梯度进行 MTT 实验。发现氟苯达唑作用于 HL-60 细胞 24 h、48 h 对细胞的增殖抑制作用具有剂量依赖性。氟苯达唑可以在较低的浓度下抑制 HL-60 细胞的增殖, 24 h IC_{50} 可达纳摩尔级别。进一步的实验发现, 氟苯达唑能将 HL-60 细胞周期阻滞于 G₂/M 期, 呈明显的剂量依赖性和时间依赖性, 与 Zhou X 的研究结果氟苯达唑阻滞神经胶质瘤细胞于 G₂/M 期相一致^[9]。MTT 实验和 PI 流式细胞术的结果表明氟苯达唑对 HL-60 细胞具有增殖抑制作用, 而 G₂/M 期阻滞也可能为氟苯达唑抑制急性髓系白血病 HL-60 细胞增殖的原因之一。

检测细胞凋亡有多种途径。凋亡细胞由于细胞核发生浓缩以及发生 DNA 片段化导致部分基因组 DNA 片段在染色过程中丢失, 这也成为细胞凋亡的特征性变化^[23,24]。本课题采用 PI 单染法检测 DNA 片段化分析, 结果显示氟苯达唑处理 HL-60 细胞 48 h, DNA 片段化水平逐渐增加, 这种变化存在剂量依赖性。这说明一定剂量的氟苯达唑能诱导 HL-60 细胞发生凋亡。

为了确定氟苯达唑诱导 HL-60 凋亡的抗肿瘤机制, 必须确

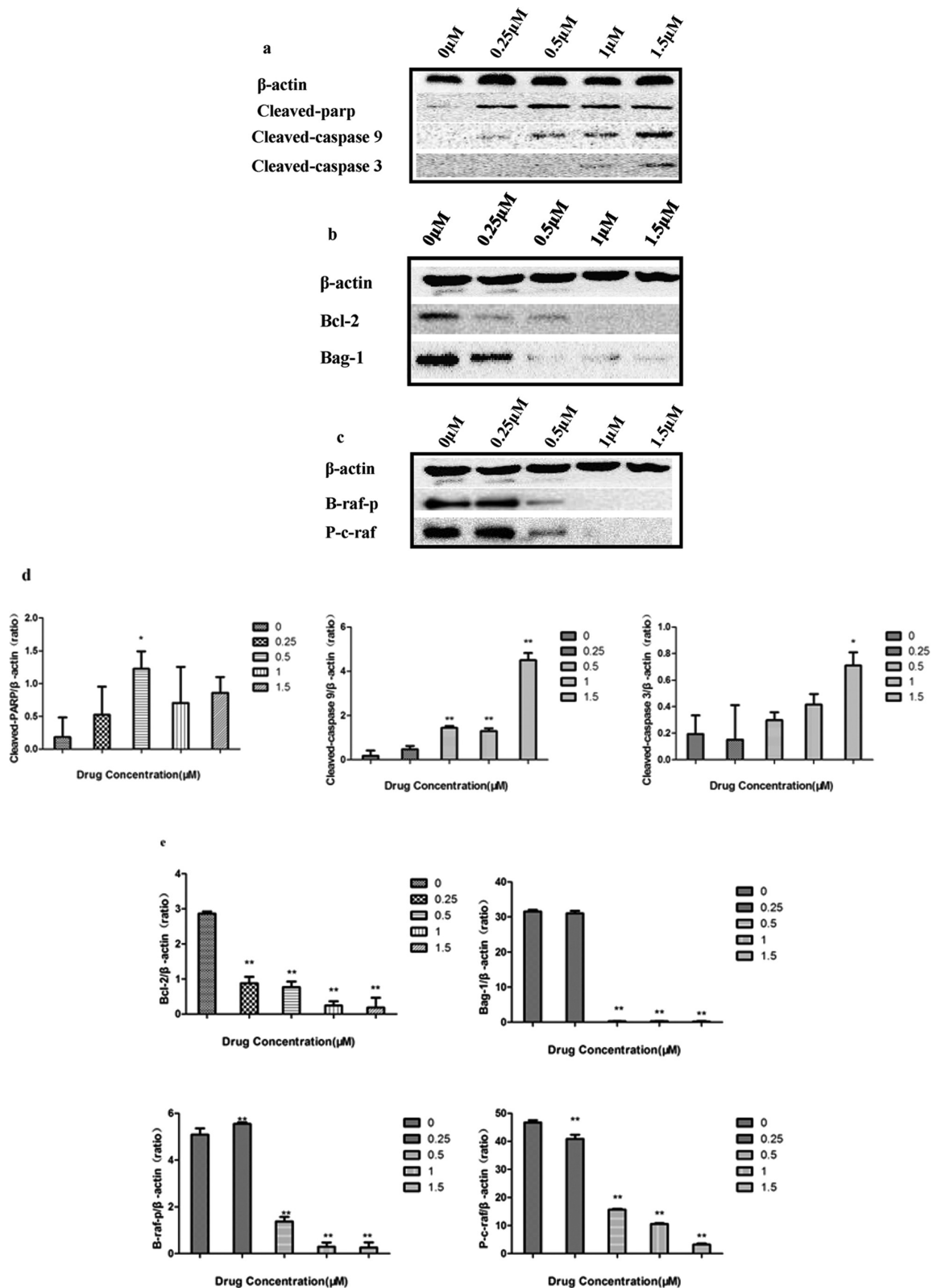


图4 不同剂量氟苯达唑对 HL-60 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

(a:caspase 家族;b:Bcl-2 家族;c: Raf 家族)

与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Fig.4 The effect of different doses of flubendazole on the expression of apoptosis-related proteins in HL-60 cells

(a:caspase family;b:Bcl-2 family;c: Raf family)

Compared with the control,* $P<0.05$,** $P<0.01$

定细胞内由 DNA 片段化所启动的事件。确定如何导致继发性 DNA 片段化,并确定通过哪些途径参与诱导人 AML HL-60 细

胞凋亡。大量的事实表明:Bcl-2 家族调控着线粒体内膜和外膜的通透性,是线粒体凋亡途径的主要调控者。Bcl-2 家族成员

Bid、Bad、Bim、Bag-1、Noxa 等可引起线粒体膜通透性改变,活化并启动 Caspase 级联反应,引起细胞凋亡^[25]。Bcl-2 蛋白在 AML 中高度表达,研究表明,AML 型细胞依赖 Bcl-2 发生 IDH1 和 IDH2 的突变,大量研究也表明 Bcl-2 抑制剂对少数 IDH 突变型患者有效。目前 ABT-199 是一中治疗 AML 的 Bcl-2 抑制剂,其治疗难治性/复发性 AML 具有一定的疗效,且安全性良好^[26]。

研究表明,Raf 激酶参与肿瘤的发生发展,Ras-Raf-MEK-ERK 通路肿瘤逃避凋亡,促进细胞增殖息息相关^[27,28]。RAF-MEK 通路抑制剂如索拉非尼等已在临床上发挥重要作用,目前着眼于 MEK 靶点的多种抑制剂如 Selumetinib^[29,30],MK162(ARRY — 438162)^[31,32]的多项临床试验正在进行中,表明 Ras-Raf-MEK-ERK 通路和白血病的靶向治疗密切相关。本实验应用免疫印迹法检测 caspase 家族成员 Cleaved-PARP、Cleaved-caspase 3、Cleaved-caspase 9、Bcl-2 家族成员 Bag-1、Bcl-2 以及 Raf 家族激酶 B-raf-p、P-c-raf,结果显示随着氟苯达唑浓度增加,促凋亡蛋白 Cleaved-PARP、Cleaved-caspase 3、Cleaved-caspase 9 表达量逐渐增加,而抗凋亡蛋白 Bag-1、B-raf-p 信号减弱。这说明氟苯达唑诱导细胞发生凋亡活化线粒体凋亡通路 caspase 家族、Bcl-2 家族成员以及 MAPK 通路相关蛋白,引发线粒体通路凋亡过程。线粒体凋亡通路中 Bcl-2 家族和 caspase 家族,Ras-Raf-MEK-ERK 通路可能是氟苯达唑促使 HL-60 细胞发生 DNA 片段化,诱导细胞发生凋亡的途径,也是氟苯达唑在 AML 中发挥抗肿瘤作用的机制之一。

综上所述,本实验采用人 AML HL-60 细胞系进行研究,发现氟苯达唑阻滞 HL-60 细胞 G₂/M 期,抑制 b-raf 蛋白的磷酸化,调控 Bcl-2 家族的相关蛋白,激活 caspase 介导的凋亡通路抑制人 AML HL-60 细胞增殖。但氟苯达唑在 AML 动物模型的抗肿瘤作用仍不明确,我们将在以后的研究中进一步探讨 AML 的致病机制及氟苯达唑的抗肿瘤机制。

参考文献(References)

- [1] Miller KD, Siegel RL, Lin CC, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(4): 271-289
- [2] Pandolfi A, Stanley RF, Yu Y, et al. PAK1 is a therapeutic target in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome [J]. Blood, 2015, 126(9): 1118-1127
- [3] 李志中. 白血病治疗的发展趋势 [J]. 中国实用医药, 20094 (11): 244-245
- [4] 强晖. 急性白血病并发感染早期应用抗生素治疗的效果观察 [J]. 中国实用医药, 2011, 6(35): 135-136
- [5] O'Donnell MR, Tallman MS, Abboud CN, et al. Acute Myeloid Leukemia, Version 3.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology[J]. Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN, 2017, 15(7): 926-957
- [6] Kim YJ, Sung D, Oh E, et al. Flubendazole overcomes trastuzumab resistance by targeting cancer stem-like properties and HER2 signaling in HER2-positive breast cancer[J]. Cancer Lett, 2018, 412: 118-130
- [7] Zhou X, Liu J, Zhang J, et al. Flubendazole inhibits glioma proliferation by G2/M cell cycle arrest and pro-apoptosis [J]. Cell Death Discovery, 2018, 4(1): 18
- [8] Oh E, Kim YJ, An H, et al. Flubendazole elicits anti-metastatic effects in triple-negative breast cancer via STAT3 inhibition[J]. Int J Cancer, 2018, 143(8): 1978-1993
- [9] Spagnuolo PA, Hu J, Hurren R, et al. The antihelminthic fluendazole inhibits microtubule function through mechanism distinct from vinca alkaloids and displays preclinical activity in leukemia and myeloma [J]. Blood, 2010, 115(23): 4824-4833
- [10] Nygren P1, Fryknäs M, Agerup B, et al. Repositioning of the antihelminthic drug Mebendazole for the treatment for colon cancer [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2013, 139(12): 2133-2140
- [11] Fu L, Fu H, Wu Q, et al. High expression of ETS2 predicts poor prognosis in acute myeloid leukemia and may guide treatment decisions [J]. Journal of translational medicine, 2017, 15(1): 159
- [12] TJ L, C M, L D, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia [J]. The New England journal of medicine, 2013, 368: 2059-2074
- [13] Y Y, H K, Y N, et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies [J]. Blood, 2001, 97: 2434-2439
- [14] Y L, L G, X L, et al. Epigenetic silencing of microRNA-193a contributes to leukemogenesis in t(8;21) acute myeloid leukemia by activating the PTEN/PI3K signal pathway[J]. Blood, 2013, 121: 499-509
- [15] ME F, O AW, C L, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation[J]. Cancer cell, 2010, 18: 553-567
- [16] CR K, D I, D J, et al. DOT1L inhibitor EPZ-5676 displays synergistic antiproliferative activity in combination with standard of care drugs and hypomethylating agents in MLL-rearranged leukemia cells [J]. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 2014, 350: 646-656
- [17] J M, B AO, P L, et al. Cohesin loss alters adult hematopoietic stem cell homeostasis, leading to myeloproliferative neoplasms [J]. The Journal of experimental medicine, 2015, 212: 1833-1850
- [18] NI N, E A, D Z, et al. Simultaneous detection of NPM1 and FLT3-ITD mutations by capillary electrophoresis in acute myeloid leukemia[J]. Leukemia, 2005, 19: 1479-1482
- [19] 王可鉴, 石乐明, 贺林, 等. 中国药物研发的新机遇: 基于医药大数据的系统性药物重定位[J]. 科学通报, 2014, 59(18): 1790-1796
- [20] Mukhopadhyay T, Sasaki J, Ramesh R, et al. Mebendazole elicits a potent antitumor effect on human cancer cell lines both in vitro and in vivo[J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(9): 2963-2969
- [21] Nygren P1, Larsson R. Drug repositioning from bench to bedside: tumour remission by the antihelminthic drug Mebendazole in refractory metastatic colon cancer[J]. Acta Oncol, 2014, 53(3): 427-428
- [22] Simbulan-Rosenthal CM, Dakshanamurthy S, Gaur A, et al. The repurposed anthelmintic Mebendazole in combination with trametinib suppresses refractory NRASQ61K melanoma[J]. Oncotarget, 2017, 8(8): 12576-12595
- [23] Lee HG, Lee J M, Shin S J, et al. Salinomycin inhibited cell proliferation and induced apoptosis in human uterine leiomyoma cells[J]. Obstet Gynecol Sci, 2014, 57(6): 501-516
- [24] Eskes R, Desagher S, Antonsson B, et al. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane [J]. Mol Cell Biol, 2000, 20 (3): 929-935

- 2017, 24(4): 502-513
- [7] 乔杰, 杨蕊. 高龄辅助生殖技术临床结局[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2017, 33: 64-67
- [8] Kushnir VA, Safdie M, Darmon SK, et al. Age-Specific IVF Outcomes in Infertile Women With Baseline FSH Levels ≥ 20 mIU/mL [J]. Reprod Sci, 2018, 25(6): 893-898
- [9] 李兰英, 张瑞, 周燕, 等. IVF / ICSI 临床妊娠后流产的相关因素分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2013, 21(3): 112-114
- [10] 向菁菁, 刘敏娟, 毛君, 等. 自然妊娠与辅助生殖妊娠早期流产染色体非整倍体发生的比较[J]. 转化医学电子杂志, 2018, 5(7): 5-8
- [11] 范蒙洁, 李蓉. 辅助生殖技术妊娠丢失的相关因素分析[J]. 生殖与避孕, 2016, 36(3): 223-228
- [12] 蒋海玲. 高龄女性生育力下降及诊治初探[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(100): 325-326
- [13] 段程颖, 李红, 刘敏娟, 等. 辅助生殖技术治疗后自然流产胚胎的遗传学分析及其临床效应[J]. 国际生殖健康 / 计划生育杂志, 2014, 33(3): 162-164
- [14] 曾湘晖, 王莉云, 熊正方, 等. ART 助孕后稽留流产胚胎 / 胎儿组织采用高通量基因测序技术测定染色体的研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2017, 25(12): 26-29
- [15] Rodriguez S, Goyanes V, Segrelles E, et al. Critically short telomeres are associated with sperm DNA fragmentation [J]. Fertil Steril, 2005, 84: 843-845
- [16] Rowe H, Holton S, Kirkman M, et al. Abortion: findings from women and men participating in the Understanding Fertility Management in contemporary Australia national survey [J]. Sex Health, 2017, 14(6): 566-573
- [17] Hipp H, Crawford S, Kawwass J F, et al. First trimester pregnancy loss after fresh and frozen in vitro fertilization cycles [J]. Fertil Steril, 2016, 105(3): 722-728
- [18] Shahine L, Lathi R. Recurrent pregnancy loss: evaluation and treatment[J]. Obstet Gynecol Clin North Am, 2015, 42(1): 117-134
- [19] Singh N, Malik N, Malhotra N, et al. Impact of progesterone (on hCG day)/oocyte ratio on pregnancy outcome in long agonist non donor fresh IVF/ICSI cycles [J]. Taiwan J Obstet Gynecol, 2016, 55(4): 503-506
- [20] 谭代林, 徐莉芳. β -HCG 与 β -HCG 及黄体酮在先兆流产中的表达及意义[J]. 中国临床医生, 2014, 42(3): 54-55
- [21] Goyal M, Malhotra N, Singh N, et al. Predictive value of early serum beta-human chorionic gonadotrophin for the successful outcome in women undergoing in vitro fertilization [J]. Journal of Human Reproductive Sciences, 2013, 6(4): 245
- [22] Osman A, Pundir J, Elsherbini M, et al. The effect of intrauterine HCG injection on IVF outcome: a systematic review and meta-analysis[J]. Reprod Biomed Online, 2016, 33(3): 350-359
- [23] 李艳, 项云改, 张梅, 等. 胚胎移植 14 天血 β -hCG 及孕激素对 IVF-ET 妊娠结局的预测[J]. 国际生殖健康 / 计划生育杂志, 2013, 32(1): 15-18
- [24] 赵静, 王松峰, 巩晓芸, 等. 体外受精-胚胎移植助孕后早期自然流产的相关因素分析[J]. 新疆医科大学学报, 2014, 37(7): 900-902
- [25] 孙赞, 刘平, 叶虹, 等. 黄体支持与孕激素补充共识[J]. 生殖与避孕, 2015, 35(1): 1-8
- [26] Sung N, Kwak-Kim J, Koo H S, et al. Serum hCG- β levels of postovulatory day 12 and 14 with the sequential application of hCG- β fold change significantly increased predictability of pregnancy outcome after IVF-ET cycle [J]. J Assist Reprod Genet, 2016, 33(9): 1185-1194
- [27] 刘春莲, 徐仙, 姜银芝, 等. 辅助生殖技术流产因素分析[J]. 宁夏医学杂志, 2012, 34(9): 895-896
- [28] Wang M, Hao C, Bao H, et al. Effect of elevated estradiol levels on the hCG administration day on IVF pregnancy and birth outcomes in the long GnRH-agonist protocol: analysis of 3393 cycles[J]. Arch Gynecol Obstet, 2017, 295(2): 407-414
- [29] Foroozanfar F, Moraveji S A, Taghavi S A, et al. Association Between Serum Estradiol Level on the Day of hCG Administration and IVF-ICSI Outcome[J]. J Obstet Gynaecol India, 2015, 66(3): 170-173
- [30] Tamhankar V A, Beiyu L, Junhao Y, et al. A Comparison of Pattern of Pregnancy Loss in Women with Infertility Undergoing IVF and Women with Unexplained Recurrent Miscarriages Who Conceive Spontaneously[J]. Obstet Gynecol Int, 2015, 2015: 989454

(上接第 653 页)

- [25] Miramar MD, Costantini P, Ravagnan L, et al. NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor [J]. J Biol Chem, 2001, 276(19): 16391-16398
- [26] R P, LJ H, JM B, et al. Selective BCL-2 inhibition by ABT-199 causes on-target cell death in acute myeloid leukemia [J]. Cancer discover, 2014, 4: 362-375
- [27] Hsieh M J, Chien S Y, Chou Y E, et al. Hispolon from *Phellinus linteus* possesses mediate caspases activation and induces human nasopharyngeal carcinomas cells apoptosis through ERK1/2, JNK1/2 and p38 MAPK pathway[J]. Phytomedicine, 2014, 21(12): 1746-1752
- [28] V A, DK M, SK B. PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: Structural and pharmacological perspectives [J]. European journal of medicinal chemistry, 2016, 109: 314-341
- [29] W Z, VR R, C G, et al. Evaluation of apoptosis induction by concomitant inhibition of MEK, mTOR, and Bcl-2 in human acute myelogenous leukemia cells [J]. Molecular cancer therapeutics, 2014, 13: 1848-1859
- [30] J I, E M, L M, et al. Ras pathway mutations are prevalent in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia and confer sensitivity to MEK inhibition[J]. Blood, 2014, 124: 3420-3430
- [31] K G, H Y, T V, et al. Hematopoiesis and RAS-driven myeloid leukemia differentially require PI3K isoform p110 α [J]. The Journal of clinical investigation, 2014, 124: 1794-1809
- [32] K A, V P-M, B R, et al. Synergistic cooperation between ABT-263 and MEK1/2 inhibitor: effect on apoptosis and proliferation of acute myeloid leukemia cells[J]. Oncotarget, 2016, 7: 845-859