

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2008.05.012

Roscovitine 和 Mimosine 在 Fas 介导白血病细胞凋亡中的作用及其可能机制

何小军¹, 龚建平^{2*}, 沈阳¹, 李培¹, 陶德定², 李小兰², 肖徽²(1. 湖北省新华医院 外一科, 武汉 430015; 2. 华中科技大学 同济医学院 附属同济医院 分子医学中心, 武汉 430030)

[摘要] 目的: 探讨细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinases, CDKs)抑制剂 roscovitine 和 DNA 合成阻滞剂含羞草碱(mimosine)在 Fas 介导的白血病细胞凋亡过程中的作用及其可能的机制。方法: 以急性成淋巴细胞白血病细胞 Molt-4 和急性 T 细胞白血病细胞 Jurkat 为靶细胞, 用 rhFasL、Roscovitine、Mimosine 分别单独作用 Molt-4 细胞 18 h (Jurkat 细胞 8 h)、24 h、24 h, 或 rhFasL 分别与后两者联合作用靶细胞, 用流式细胞术检测 cyclins 的表达和细胞凋亡率, Western blotting 法检测 CDK2 和 CDK1 的磷酸化水平。结果: Fas 介导的细胞凋亡定位于 G₁ 期, Roscovitine 和 Mimosine 作用后均可使 Fas 介导的细胞凋亡率明显增加 ($P < 0.05$)。Roscovitine 作用后 G₁ 期的 cyclin D3 和 cyclin E 表达升高, 靶细胞被阻滞在 G₁ 期的比例明显升高, 并下调 CDK2 Thr-160 位点的磷酸化水平; Roscovitine 和 rhFasL 共同作用后, CDK2 Thr-160 位点苏氨酸磷酸化水平进一步减弱。Mimosine 作用后 cyclin D3 的表达下降和 CDK2 Thr-160 位点磷酸化水平明显下降, 靶细胞被完全阻滞在 G₁ 期。Mimosine 和 rhFasL 共同作用后 cyclin D3、E、A 和 B1 均有所下降, CDK2 Thr-160 位点苏氨酸和 CDK1 Thr-161 位点苏氨酸的磷酸化水平明显减弱。结论: Roscovitine 和 Mimosine 均有协同 rhFasL 促进白血病细胞凋亡的作用, 其机制与该两制剂阻滞细胞于 G₁ 期、抑制 CDK2 活性以及影响细胞周期蛋白表达有关。

[关键词] Roscovitine; 含羞草碱; Fas; 白血病细胞; 细胞凋亡; 周期蛋白; 周期蛋白依赖性激酶

[中图分类号] R737.54; R733.7

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2008)05-0464-06

Roles of roscovitine and mimosine in Fas-mediated leukemia cell apoptosis and the possible mechanism

HE Xiao-jun¹, GONG Jian-ping^{2*}, SHEN Yang¹, LI Pei¹, TAO De-ding², LI Xiao-lan², XIAO Hui²(1. Department of General Surgery, Hubei Xinhua Hospital, Wuhan 430015, China; 2. Department of Molecular Medical Center, Tongji Hospital, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430030, China)

[Abstract] **Objective:** To assess the roles of roscovitine (an inhibitor of DCK) and mimosine (DNA synthesis inhibitor) in Fas-mediated leukemia cell apoptosis and to understand the possible mechanism. **Methods:** The target leukemia cell lines Molt-4 and Jurkat were incubated with rhFasL, roscovitine and mimosine separately or with rhFasL + roscovitine or rhFasL + mimosine for 18 h (Jurkat 8 h), 24 h, and 24 h. Apoptotic cells were examined by Annexin V method or modified API method; cyclins expression were detected by cyclin/DNA biparameter flow cytometry; CDK1 and CDK2 activities were detected by Western blotting. **Results:** Fas-mediated cell apoptosis was at G₁ phase. Both roscovitine and mimosine significantly promoted Fas-mediated apoptosis ($P < 0.05$). Moreover, mimosine increased the levels of cyclin D3 and cyclin E at G₁ phase and more cells were arrested at G₁-phase; roscovitine also lowered the phosphorylation of CDK2 Thr-160. Mimosine + rhFasL decreased the phosphorylation of CDK2 Thr-160, and the target cells were completely arrested at G₁ phase; it also decreased the levels of cyclin D3, E, A and B1 and the phosphorylation of CDK2 Thr-160 and CDK1 Thr-161. **Conclusion:** Both roscovitine and mimosine have synergistic effects with rhFasL in inducing apoptosis of leukemia cells, which is related to the G₁ phase cell arrest, inhibition of CDK2 activity and influence of cyclin proteins.

[Key words] roscovitine; mimosine; Fas; leukemia cell; cell apoptosis; cyclin; cyclin-dependent kinases

[Chin J Cancer Biother, 2008, 15(5): 464-469]

[基金项目] 国家重点基础研究发展规划(973)资助项目(No. 2004CB518705); 国家自然科学基金资助项目(No. 30440024)。Supported by the Major State Basic Research Development Program of China(No. 2004CB518705); the National Natural Science Foundation of China(No. 30440024)

[作者简介] 何小军(1970-), 男, 汉族, 湖北省武汉市人, 医学博士, 副主任医师, 主要从事肿瘤的基础与临床方面的研究

* Corresponding author. E-mail: jpgong@tjh.tjmu.edu.cn

细胞内复杂的信号系统精细地调控着 Fas 介导的细胞凋亡过程,其中包括凋亡激活基因 *Bax*、*Bcl-Xs*、*ICE*、*Fas/APO-1*、*c-myc*、*nur 77*、*ich-1L*、*p53* 等,以及凋亡抑制基因 *bcl-2*、*bcl-XL*、*ich-1s* 等,同时 Fas 介导的细胞凋亡与细胞周期的运行之间存在着协同分子机制,是一个细胞周期事件。作为细胞周期运行中的核心物质事件,cyclins/CDKs 在凋亡调节基因蛋白和 Fas 介导细胞凋亡的发生中是承上启下的中间联络环节。因而,通过调节 cyclins 的表达和细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinases, CDKs)的活性来调控细胞周期运行,进而调节 Fas 介导的细胞凋亡就成为了研究的热点和防治与 Fas 介导细胞凋亡有关疾病的希望所在。人工合成的 CDK 抑制剂 roscovitine 可以特异性地抑制 CDK 的活性,DNA 合成阻滞剂含羞草碱(mimosine)具有下调 cyclin 的表达和抑制 CDK 活性的作用^[14]。本实验通过调节 cyclin 的表达和(或)CDK 的活性来调控 Fas 介导的细胞凋亡,为防治与 Fas 介导细胞凋亡有关的疾病(特别是肿瘤)提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

白血病细胞株 Molt-4(急性成淋巴细胞白血病)和 Jurkat(急性 T 细胞白血病)购自武汉大学典型物保藏中心。人重组 Fas 配体(recombinant human Fas ligand, rhFasL)购自 Sigma 公司,淋巴细胞分离液购自中国医学科学院血液学研究所。鼠抗人细胞周期蛋白 D3、E、A、B1 单克隆抗体和同型特异性抗体 IgG, FITC 标记的兔抗鼠 Ig 抗体, 1% 不含甲醇的甲醛均购自 PharMingen 公司。Roscovitine、Mimosine、CDK1 和 CDK2 购自 Cellsignal 公司。FACSsort 流式细胞仪购自 Becton Dickinson 公司。

1.2 细胞培养

Molt-4 和 Jurkat 细胞在含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、0.1 g/ml 链霉素以及 2 mmol/L 谷氨酰胺的 RPMI 1640 培养基中,置于 37 °C、5% CO₂ 条件下的恒温箱中培养至对数生长期 [(3~5) × 10⁵ 个/ml]。

1.3 细胞处理

依据各细胞发生典型细胞周期特异性凋亡的时间点,对分组后处于对数生长期的白血病细胞株再培养 24 h 后收获细胞进行处理和检测。24 h 内分别在收获细胞前按不同的时间点分组加入不同试剂,使 rhFasL(终质量浓度为 5 ng/ml)作用 Jurkat 细胞 8 h、Molt-4 细胞 18 h; Roscovitine(终浓度为 5

μmol/L)作用细胞 24 h; Mimosine(终浓度为 0.3 mmol/L)作用细胞 24 h; 对照组细胞不加任何试剂。

1.4 Annexin V/PI 法和 API 法检测细胞的凋亡

1.4.1 Annexin V/PI 法 细胞离心去上清,以预冷(4 °C)的结合缓冲液洗涤细胞,调整细胞密度为 1 × 10⁶/ml,取 100 μl 细胞加入 5 μl FITC 标记的 Annexin V 和 10 μl 碘化丙啶(PI,试剂盒配备不含任何影响细胞膜通透性的去污剂),室温避光 15 min 后流式细胞仪检测^[5-6]。

1.4.2 API 法 细胞离心去上清,以预冷(4 °C)的结合缓冲液洗涤细胞,调整细胞密度为 1 × 10⁶/ml,取 100 μl 细胞加入 5 μl FITC 标记的 Annexin V 后,室温避光 30 min,结合缓冲液洗涤 2 次,加入 1 ml 不含甲醇的 1% 甲醛,冰上固定 30 min 后结合缓冲液洗涤 2 次,加入 0.5 ml PI 染液(50 μg/ml PI, 5 μg/ml RNase, 500 μg/ml 洋地黄苷, 10 mmol/L PIPES, 2 mmol/L 氯化钙, 0.1 mmol/L 氯化钠,本实验室原创配制,洋地黄苷可以增强细胞膜的通透性,作用温和),1 h 后流式细胞仪检测^[7]。

1.5 流式细胞术检测细胞周期蛋白的表达

获取的细胞经 PBS 洗涤后,部分用 80% 的冰乙醇(-20 °C)固定用作细胞周期蛋白 E、A、B1 和同型对照分析,部分用不含甲醇的 1% 甲醛固定 15 min,再用 PBS 洗涤、离心后 80% 冰乙醇(-20 °C)固定 24~48 h 用作细胞周期蛋白 D3 分析。将固定后的细胞悬液分装于各试管中并予以标记,用 PBS 洗涤 2 次,用含 0.25% Triton X-100 的 PBS 溶液处理 5 min,加 5 ml 的 PBS 溶液洗涤、离心、去上清液吸干后,分别加入用 1% BSA 稀释的鼠抗人细胞周期蛋白 D3、E、A 和 B1 单克隆抗体和同型特异性抗体 IgG(抗体用 1% BSA 1:100 稀释),4 °C 温育过夜。次日,将温育过的细胞用 1% BSA 洗涤、离心、上清液吸干后加入标有 FITC 的兔抗鼠 Ig 抗体(抗体用 1% BSA 按 1:20 稀释),室温下避光温育 30 min 后用 1% BSA 洗涤、离心、弃上清液,加入含 10 mg/ml PI 和 0.1% RNase 的 PBS 溶液,室温下避光放置 20 min。经荧光标记后的细胞用 FACSsort 流式细胞术进行检测,获得 cyclin/DNA 双参数图像。

1.6 Western Blotting 检测细胞中 CDK1 和 CDK2 的磷酸化水平

收获细胞经 4 °C 预冷 PBS 洗涤,吸尽残液,每 1 × 10⁶ 细胞加入上样缓冲液 60 μl 混匀,100 °C 水浴处理 5 min 后 1 000 × g 离心 5 min,取上清。根据细胞数调整上样体积以使各泳道含相同细胞数。上样于 12% SDS-PAGE 凝胶。恒压(120V)电泳 1.5 h、

恒流(350 mA)电转移 70 min 后,5%脱脂牛奶封闭过夜,分别与鼠抗人 CDK1、CDK2 和 cyclins 单克隆抗体(按 1:1 000 的比例)孵育 4 h,碱性磷酸酶标记的羊抗鼠抗体(1:500)孵育 1.5 h,洗涤后 NBP/BCIP 显色,照相保存结果。

1.7 统计学处理

应用 SAS 8.1 统计分析软件进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 Roscovitine、Mimosne 与 rhFasL 诱导肿瘤细胞的凋亡

2.1.1 Roscovitine 与 FasL 介导细胞凋亡的 API 法检测结果 结果显示, rhFasL 作用于靶细胞(Jurkat

细胞 8 h 和 Molt-4 细胞 18 h)后的细胞凋亡率为 21.73% 和 16.52%,并定位于 G₁ 期。Roscovitine (5 μmol/L)作用 24 h 的细胞凋亡率为 5.35% 和 3.68%,两者共同作用的细胞凋亡率为 53.17% 和 36.39% (*P* < 0.05),并以 G₁ 期为主(图 1A)。

2.1.2 Mimosine 与 FasL 介导细胞凋亡的 Annexin V/PI 法检测结果 结果显示, rhFasL 作用于靶细胞(Jurkat 细胞 8 h 和 Molt-4 细胞 18 h)后的细胞凋亡率为 21.73% 和 16.52%,Mimosine (0.3 mmol/L)作用 24 h 的细胞凋亡率为 8.04% 和 7.67%,使细胞阻滞在 G₁ 期,两者共同作用的细胞凋亡率为 47.51% 和 38.71% (*P* < 0.05,图 1B)。

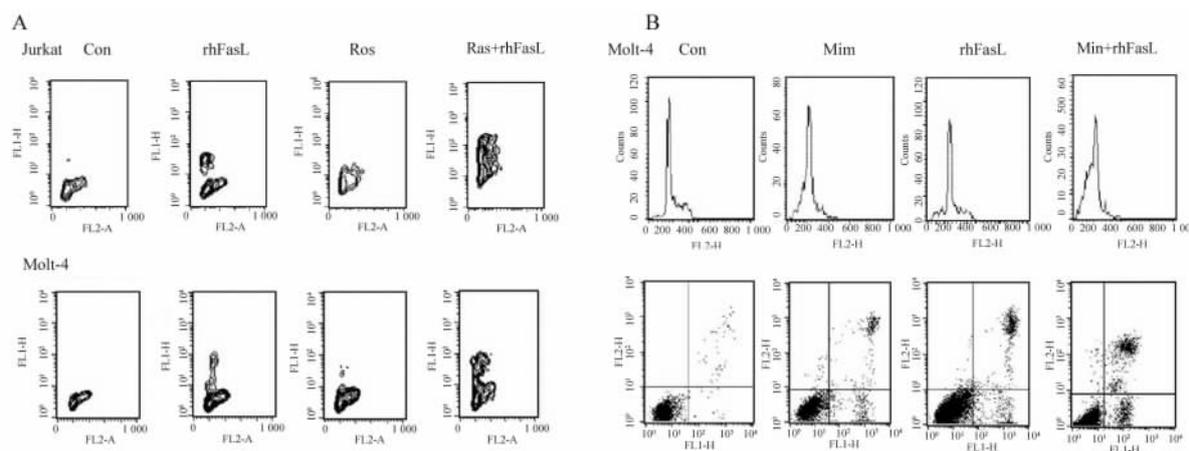


图 1 API 法 (A)、Annexin V/PI 法 (B) 检测 Roscovitine (Ros)、Mimosine (Mim) 与 rhFasL 介导的肿瘤细胞凋亡

Fig.1 Roscovitine (Ros)-, Mimosine (Mim)- and rhFasL-induced tumor cell apoptosis examined by API (A), Annexin V/PI (B) method

A: Apoptotic rates induced by rhFasL and roscovitine were respectively 21.73% and 5.35% in Jurkat cell line, 16.52% and 3.68% in Molt-4 cell line, and the apoptosis was at G₁ phase. When rhFasL and roscovitine were used together, apoptotic rates increased to 53.17% and 36.39% in Jurkat and Molt-4 cell lines, respectively, mainly in G₁ phase; B: Apoptotic rates induced by rhFasL and mimosine were respectively 21.73% and 8.04% in Jurkat cell line, 16.52% and 7.67% in Molt-4 cell line, and the apoptosis was at G₁ phase. When rhFasL and mimosine were used together, apoptotic rate increased to 47.51% and 38.71% in Jurkat and Molt-4 cell lines, respectively. The target cells were blocked at G₁ phase by mimosine.

2.2 Roscovitine、Mimosne 与 rhFasL 诱导肿瘤细胞凋亡后 cyclin 表达的变化

流式细胞术检测结果显示, Roscovitine (5 μmol/L) 作用 24 h 后 G₁ 期的 cyclins D3 和 E 明显升高, G₁ 期的细胞比例由 56.3% 升高至 67.2%; 其他无明显规律可循(图 2A)。Mimosine (0.3 mmol/L) 作用 24 h 后 G₁ 期 cyclin D3 下降和 cyclins E 升高, cyclins A 和 B1 呈非时相性表达于 G₁ 期, 细胞被完全阻滞在 G₁ 期。Mimosine 和 rhFasL 共同作用后 cyclin D3、E、A 和 B1 均有所下降(图 2B)。

2.3 Roscovitine、Mimosine 与 rhFasL 诱导肿瘤细胞凋亡后 CDKs 磷酸化水平的变化

Roscovitine (5 μmol/L) 和/ (或) rhFasL 与靶细胞共同作用后, CDK2 Thr-160 位苏氨酸的磷酸化水平明显减弱, CDK1 Thr-161 位苏氨酸和 Try-15 位酪氨酸的磷酸化水平无明显变化; Mimosine (0.3 mmol/L) 作用靶细胞后, CDK2 Thr-160 位苏氨酸的磷酸化水平明显减弱, 而 CDK1 Thr-161 位苏氨酸和 Try-15 位酪氨酸的磷酸化水平无明显变化; Mimosine 和 rhFasL 共同作用于与靶细胞后, CDK2

Thr-160 位苏氨酸和 CDK1 Thr-161 位苏氨酸的磷酸化水平明显减弱, 而 Try-15 位酪氨酸的磷酸化水平无明显变化(图 3)。

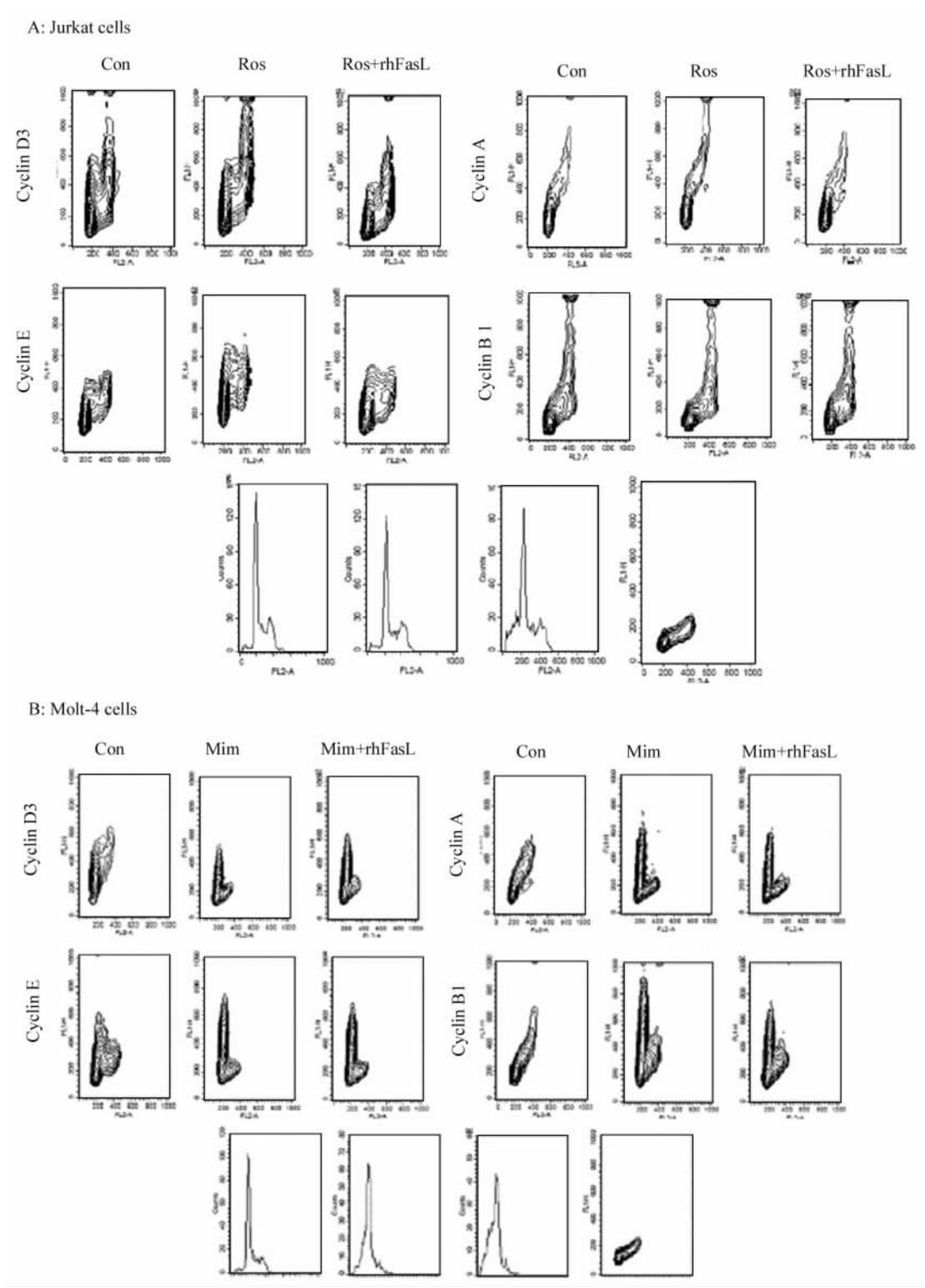


图 2 Roscovitine(Ros),Mimosine(Mim)与 rhFasL 介导的 Jurkat(A)与 Molt-4(B)细胞凋亡后细胞周期蛋白的表达
Fig.2 Expression of cyclin proteins in apoptotic cells induced by Roscovitine (Ros), Mimosine(Mim) and rhFasL
A (Jurkat cells): Cyclin D3 and E expression increased evidently when the target cells were incubated with roscovitine;
B (Molt-4 cells): Cyclin D3 expression increased when the target cells were incubated with mimosine. Meanwhile, cyclin E
expression decreased and the cells were blocked at G₁ phase

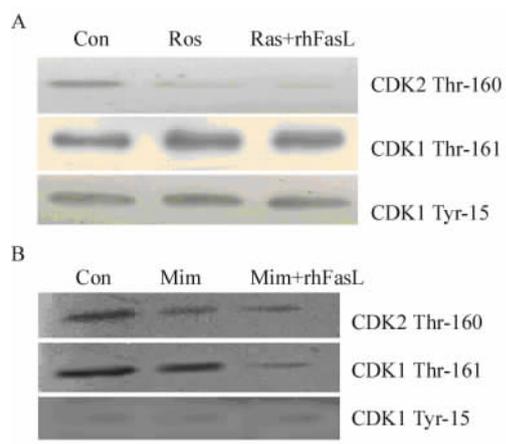


图3 Roscovitine(Ros)、Mimosine(Mim)与 rhFasL 介导细胞凋亡后 CDKs 磷酸化水平的变化

Fig.3 Phosphorylation of CDKs in apoptotic cells induced by Roscovitine (Ros), Mimosine (Mim) and rhFasL

A (Jurkat cells): Phosphorylation level of CDK2 Thr-160 site decreased evidently after the target cells were incubated with roscovitine (5 $\mu\text{mol/L}$); B (Molt-4 cells): Phosphorylation level of CDK2 Thr-160 and CDK1 Thr-161 site decreased evidently after the target cells were incubated simultaneously with mimosine and rhFasL

3 讨论

Fas 介导的细胞凋亡与细胞周期的运行之间存在着分子协同机制, 是一个细胞周期事件。作为细胞周期运行中的核心事件, cyclin 的表达和 (或) CDKs 的活性在基因蛋白的调节和细胞凋亡的发生中处于中间环节, 起着承上启下的作用^[14]。在过去的近 20 年中, 人们研究出了人工合成的 CDK 抑制剂如 Olomoucine、Roscovitine 等, 这些 CDK 抑制剂可以通过选择性地抑制 CDKs 的活性来直接或者与其他物质共同作用来调控细胞凋亡。Roscovitine 通过特异性地抑制 cyclins /CDKs, 在不同的细胞系中可以起着不同的作用, 同时还具有剂量和时间依赖性^[8-11]。研究^[13-14]还发现含羞草碱 (mimosine) 在将细胞阻滞在 G_1 期的同时可以通过调节凋亡相关基因蛋白和 cyclin 的表达、抑制 CDKs 的活性来影响细胞凋亡的发生。有鉴于此, 本研究就 Roscovitine 和 Mimosine 在 Fas 介导的细胞凋亡中的作用规律和机制进行探讨, 研究结果表明: (1) Roscovitine 在特定的浓度下 (5 $\mu\text{mol/L}$) 通过特异性

地抑制 cyclin E/CDK2 的活性使白血病细胞阻滞在 G_1 期, 与 rhFasL 可以协同诱导细胞凋亡。Roscovitine 是 C2, N6, N9-位替代腺嘌呤家族中的一员, 通过结合 CDK 的三磷酸腺苷 (ATP) 结合位点竞争性地抑制 CDK 的活性。既往研究^[15-17]发现 Roscovitine 抑制 cyclin B/CDK1、cyclin E/CDK2 的活性使细胞阻滞在 G_2 /M 期或 G_1 /S 期; 将细胞阻滞在特定的细胞周期的同时还可以诱导细胞凋亡, 表明 Roscovitine 的作用具有细胞特异性和剂量/时间的依赖性。本试验发现 Roscovitine 在 5 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度下作用于白血病细胞系 24 h 后, cyclin D3、E 明显升高, CDK2 Thr-160 位苏氨酸的磷酸化水平明显减弱, 而其他 cyclin 和 CDK 的磷酸化位点的磷酸化水平无明显变化; DNA 直方图显示 G_1 期细胞比例明显增加; 细胞的凋亡率达到 5% 左右。这些结果说明 Roscovitine 在 5 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度下可以特异性地抑制 cyclin E/CDK2 的活性使白血病细胞阻滞在 G_1 /S 期并诱导细胞凋亡。而将 Roscovitine 和 rhFasL 共同作用于血病细胞系时发现, 除 CDK2 Thr-160 位苏氨酸的磷酸化水平进一步减弱外, cyclin D3、E、A 和 B1, CDK1 Thr-161 位苏氨酸和 Try-15 位酪氨酸的磷酸化水平无明显的变化规律可循; 细胞凋亡率比单独应用 rhFasL 诱导时明显增加。这一结果说明 Roscovitine 和 rhFasL 在诱导白血病细胞凋亡时具有明显的协同作用, 其协同作用机制与共同抑制 CDK2 的活性有着直接的关系。 (2) Mimosine 通过下调 cyclin D3 的表达和抑制 cyclin E/CDK2 的活性使白血病细胞阻滞在 G_1 期, Mimosine 与 rhFasL 可以协同诱导细胞凋亡。

Mimosine 是从豆科类植物银合欢或者含羞草的种子中提取的一种非蛋白质氨基酸。它可以特异性地将细胞阻滞在 G_1 期而且是可逆的, 所以 Mimosine 常常被作为细胞的同步化研究^[13,17]。以往的研究^[13,19-20]还表明, Mimosine 可以通过上调 p21CIP1 和 p27KIP1 的表达抑制 CDK 的活性, 下调 cyclin D1 的表达, 从而抑制肿瘤细胞的生长, 其作用同样具有细胞特异性和剂量/时间的依赖性。本实验发现, 在 0.3 mmol/L 的浓度下作用白血病细胞 24 h, Mimosine 使 cyclin D3 的表达下降、CDK2 Thr-160 位苏氨酸的磷酸化水平明显减弱, 而其他 cyclin 和 CDK 的磷酸化位点的磷酸化水平无明显变化, 所有的 cyclin 均被同步在 G_1 期; 同时还有明显的细胞凋亡发生。这一结果与以前的研究基本一致, 进一步证明了 Mimosine 抑制肿瘤细胞生长、诱导肿瘤细胞凋亡的作用。其 S 期和 G_2 /M 期的 cyclins/CDKs 在 G_1

期的非时相性表达也为细胞阻滞的可逆性提供了细胞周期运行的物质基础。将 Mimosine 和 rhFasL 共同作用于血病细胞系时发现, cyclin D3、E、A 和 B1 的表达均有所下降; CDK2 Thr-160 位苏氨酸和 CDK1 Thr-161 位苏氨酸的磷酸化水平明显下降, Try-15 位酪氨酸的磷酸化水平无明显变化; 细胞凋亡率明显增加。这些结果说明, Mimosine 和 rhFasL 可以协同诱导血病细胞凋亡, 其作用机制可能是通过下调 cyclin 的表达和抑制 CDK 的活性使得细胞周期运行速度减慢, 抑制细胞的生长, 从而在检测点的监督下充分完成 Fas 介导的细胞凋亡。

综上所述, 本研究认为 Roscovitine 和 Mimosine 可以通过调节 cyclin 的表达和 CDK 的活性来调控 Fas 介导的细胞凋亡。这一研究为通过生物学的综合治疗达到防治与 Fas 介导细胞凋亡相关的疾病提供了实验基础。

[参考文献]

- [1] Lanvin O, Guglielmi P, Fuentes V, *et al.* TGF- β 1 modulates Fas (APO-1/ CD95)- mediated apoptosis of human pre-B cell lines [J]. *Eur J Immunol*, 2003, 33(5): 1372-1381.
- [2] Mollinedo F, Gajate C. Fas/CD95 death receptor and lipid rafts: new targets for apoptosis-directed cancer therapy [J]. *Drug Resist Updat*, 2006, 9(1-2): 51-73.
- [3] Fais S, De Milito A, Lozupone F. The role of Fas to ezrin association in Fas-mediated apoptosis [J]. *Apoptosis*, 2005, 10(5): 941-947.
- [4] Borgne A, Golsteyn RM. The role of cyclin-dependent kinases in apoptosis [J]. *Prog Cell Cycle Res*, 2003, 5: 453-459.
- [5] Fadok VA, Voelker DR, Camppbell PA, *et al.* Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophage [J]. *J Immunol*, 1992, 148(7): 2207-2216.
- [6] Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, *et al.* Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression of B cells undergoing apoptosis [J]. *Blood*, 1994, 84(5): 1415-1420.
- [7] Tao D, Wu J, Feng Y, *et al.* New method for the analysis of cell cycle-specific apoptosis [J]. *Cytometry A*, 2004, 57(2): 70-74.
- [8] Damiens E, Baratte B, Marie D, *et al.* Anti-mitotic properties of indirubin-3'-monoxime, a CDK/GSK-3 inhibitor: induction of endoreplication following prophase arrest [J]. *Oncogene*, 2001, 20(29): 3786-3797.
- [9] Tirado OM, Mateo-Lozano S, Notario V, *et al.* Roscovitine is an effective inducer of apoptosis of Ewing's sarcoma family tumor cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(20): 9320-9327.
- [10] Cheok CF, Dey A, Lane DP, *et al.* Cyclin-dependent kinase inhibitors sensitize tumor cells to nutlin-induced apoptosis: a potent drug combination [J]. *Mol Cancer Res*, 2007, 5(11): 1133-1145.
- [11] Coley HM, Shotton CF, Thomas H. Seliciclib (CYC202; r-roscovitine) in combination with cytotoxic agents in human uterine sarcoma cell lines [J]. *Anticancer Res*, 2007, 27(1A): 273-278.
- [12] Meijer L, Borgne A, Mulner O, *et al.* Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5 [J]. *Eur J Biochem*, 1997, 243(1-2): 527-536.
- [13] Hallak M, Vazana L, Shpilberg O, *et al.* A molecular mechanism for mimosine-induced apoptosis involving oxidative stress and mitochondrial activation [J]. *Apoptosis*, 2008, 13(1): 147-155.
- [14] Durcan TM, Halpin ES, Casaletti L, *et al.* Centrosome duplication proceeds during mimosine-induced G₁ cell cycle arrest [J]. *J Cell Physiol*, 2008, 215(1): 182-191.
- [15] De Azevedo WF, Leclerc S, Meijer L, *et al.* Inhibition of cyclin-dependent kinase by purine analogues: crystal structure of human cdk2 complex with roscovitine [J]. *Eur J Biochem*, 1997, 243(1-2): 518-526.
- [16] Meijer L, Borgne A, Mulner O, *et al.* Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5 [J]. *Eur J Biochem*, 1997, 243(1-2): 527-536.
- [17] Crescenzi E, Palumbo G, Brady HJ. Roscovitine modulates DNA repair and senescence: implication for combination chemotherapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(22): 8158-8171.
- [18] Lalitha K, Kulothungan SR. Mimosine mitigates oxidative stress in selenium deficient seedlings of *Vigna radiata*. Part II: Mitochondrial uptake of 75 selenium and mimosine [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2007, 118(3): 269-286.
- [19] Kulp KS, Green SL, Vulliet PR. Iron deprivation inhibits cyclin-dependent kinase activity and decrease cyclin D/CDK4 protein levels in asynchronous MDA-MB-453 human breast cancer cells [J]. *Exp Cell Res*, 1996, 229(1): 60-68.
- [20] Krude T. Mimosine arrest proliferation human cells before onset of DNA replication in a dose-dependent manner [J]. *Exp Cell Res*, 1999, 247(1): 148-159.

[收稿日期] 2008 - 07 - 19

[修回日期] 2008 - 08 - 16

[本文编辑] 韩 丹