



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2017.03.009
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2017.03.009
Chinese Journal of General Surgery, 2017, 26(3):325-332.

· 基础研究 ·

甲基莲心碱逆转人结肠癌细胞奥沙利铂耐药的体外研究

屈雁玲^{1,2}, 马俊丽^{1,2}, 邓甘露^{1,2}, 尹玲^{1,2}, 郭操^{1,3}, 李易易^{1,2}, 韩莹^{2,3}, 蔡长景^{2,3}, 申竑^{1,2,3}, 曾珊^{1,2,3}

(中南大学湘雅医院 1. 医学科学研究中心 2. 肿瘤科, 湖南长沙 410008; 3. 湖南省分子放射肿瘤学重点实验室, 湖南长沙 410008)

摘要

目的: 探讨甲基莲心碱 (Nef) 对人结肠癌细胞奥沙利铂 (OXA) 耐药的逆转作用及机制。

方法: 采用 OXA 浓度逐步递增法 (2、4、8、12、24、48 $\mu\text{mol/L}$) 孵育人结肠癌 HCT116 细胞诱导构建 OXA 耐药株 HCT116/OXA; 检测 Nef 对 HCT116/OXA 细胞的细胞毒性, 确定 Nef 的最适作用浓度和时间; 分析并比较 OXA (IC_{50} 浓度) 单独处理、Nef (最适作用浓度) 单独处理、OXA (IC_{50} 浓度) 联合 Nef (最适作用浓度) 处理后, HCT116/OXA 细胞的增殖, 凋亡情况及凋亡相关蛋白 (Bcl-2, Bax, PARP, p-PARP) 的表达情况。

结果: 与亲本 HCT116 细胞比较, HCT116/OXA 细胞较对 OXA 的耐药性明显增高 (IC_{50} : 21.00 $\mu\text{mol/L}$ vs. 112.00 $\mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$), 耐药指数为 5.33。Nef 能明显抑制 HCT116/OXA 的增殖有作用 ($P < 0.05$), 并呈浓度依赖性, 其最适作用浓度、时间分别为 5 $\mu\text{mol/L}$ 、24 h (细胞存活率为 90%)。与 OXA 单独处理比较, HCT116/OXA 细胞对 OXA 联合 Nef 处理的耐受性明显降低 (IC_{50} : 112.00 $\mu\text{mol/L}$ vs. 45.47 $\mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$), 逆转倍数为 2.46; Nef 单独作用对 HCT116/OXA 细胞的凋亡影响不明显 ($P > 0.05$), 但其与 OXA 联合作用对 HCT116/OXA 细胞凋亡诱导作用明显强于 OXA 单独作用 ($P < 0.05$); 与 OXA 或 Nef 单独作用比较, OXA 联合 Nef 作用后, HCT116/OXA 细胞抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达明显下降, Bax、p-PARP 等凋亡蛋白表达明显上升 (均 $P < 0.05$)。

结论: Nef 可逆转 HCT116/OXA 对 OXA 的耐药, 机制可能与其调节 Bcl-2/Bax 表达水平, 从而与 OXA 产生协同作用有关。

关键词

结肠肿瘤; 抗药性; 肿瘤; 睡莲科; 细胞凋亡

中图分类号: R735.3

Reversal effect of neferine on oxaliplatin-resistance in human colon cancer cells in vitro

QU Yanling^{1,2}, MA Junli^{1,2}, DENG Ganlu^{1,2}, YIN Ling^{1,2}, GUO Cao^{1,3}, LI Yiyi^{1,2}, HAN Ying^{2,3}, CAI Changjing^{2,3}, SHEN Hong^{1,2,3}, ZENG Shan^{1,2,3}

(1. Institute of Medical Sciences 2. Department of Oncology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; 3. Key Laboratory for Molecular Radiation Oncology of Hunan Province, Changsha 410008, China)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30770970; 81172471; 81070362; 81372629); 湖南省自然科学基金重点资助项目 (11JJ2049)。

收稿日期: 2017-01-02; **修订日期:** 2017-02-20。

作者简介: 屈雁玲, 中南大学湘雅医院硕士研究生, 主要从事消化道肿瘤方面的研究。

通信作者: 曾珊, Email: zengshan2000@csu.edu.cn

Abstract

Objective: To investigate the reversal effect of neferine (Nef) on oxaliplatin (OXA)-resistance in human colon cancer cells and the mechanism.

Methods: Human colon cancer HCT116 cells were cultured in a step-wised exposure to increasing concentrations of OXA (2, 4, 8, 12, 24 and 48 $\mu\text{mol/L}$) to induce and create the OXA-resistant cell line HCT116/OXA; the cytotoxic effect of Nef on HCT116/OXA cells was evaluated, and its optimal treatment concentration and time were determined; in HCT116/OXA cells after exposure to OXA (IC_{50} concentration) alone, Nef (optimal treatment concentration) alone or OXA (IC_{50} concentration) plus Nef (optimal treatment concentration), the proliferation and apoptosis as well as the expressions of apoptosis-associated proteins (Bcl-2, Bax, PARP and p-PARP) were analyzed and compared.

Results: The resistance of HCT116/OXA cells to OXA was significantly increased compared with the parent HCT116 cells (IC_{50} : 21.00 $\mu\text{mol/L}$ vs. 112.00 $\mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$), with a resistance index of 5.33. Nef showed significant inhibitory effect on proliferation of HCT116/OXA cells in a concentration-dependent manner ($P < 0.05$), and its optimal treatment concentration and time was 5 $\mu\text{mol/L}$ and 24 h, respectively; compared with lone OXA treatment, the tolerance of HCT116/OXA cells to OXA plus Nef treatment was significantly reduced (IC_{50} : 112.00 $\mu\text{mol/L}$ vs. 45.47 $\mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$), and the reverse index was 2.46. Nef alone exerted no significant effect on apoptosis of HCT116/OXA cells ($P > 0.05$), but the apoptosis inducing effect on HCT116/OXA cells by its combination with OXA was significantly greater than that by OXA alone treatment ($P < 0.05$); compared with Nef or OXA alone treatment, the expression level of anti-apoptotic protein Bcl-2 was significantly decreased, and the expression levels of apoptotic protein Bax and p-PARP were significantly increased in HCT116/OXA cells after OXA plus Nef treatment (all $P < 0.05$).

Conclusion: Nef can reverse OXA-resistance in HCT116/OXA cells, and the mechanism may be associated with its regulating Bcl-2/Bax expression, and thereby, producing a synergistic effect with OXA.

Key words

Colonic Neoplasms; Drug Resistance, Neoplasm; Nymphaeaceae; Apoptosis

CLC number: R735.3

结肠癌是世界常见的恶性肿瘤之一，年新发病率位列第三^[1]。在中国癌症患者中，结肠癌发病率约为8.77%，为第五大常见恶性肿瘤，发病率和致死率有逐年上升趋势^[2]。目前对II、III期结肠癌治疗是以手术为主的综合治疗，化学治疗作为一种辅助治疗在结肠癌综合治疗中起着重要作用。奥沙利铂(oxaliplatin, OXA)是第三代铂类化疗药物，杀死肿瘤细胞的主要机理是抑制DNA合成，主要应用于结肠直癌、卵巢癌、胃癌、乳腺癌等化学辅助治疗。化疗耐药是结肠癌治疗失败的主要原因之一，并且与患者的不良预后密切相关。因此，能增加肿瘤细胞对化疗药物敏感性的逆转剂成为了目前研究肿瘤耐药的热点。

甲基莲心碱(neferine, Nef)是从睡莲科植物莲成熟种子的绿色胚芽中提取出的一种双苜基异喹啉生物碱^[3]。有研究发现Nef具有抗肿瘤作用并可增强肿瘤化疗敏感性。例如Nef可逆转胃癌

SGC7901/VCR细胞的多药耐药性^[4]。然而，Nef在结肠癌中研究尚未见报道。本研究通过观察Nef对耐OXA结肠癌HCT116细胞株耐受性的影响，探讨其对耐OXA细胞耐药性的逆转作用及其可能机制，为Nef应用于结肠癌的临床化疗增敏治疗提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞 人结肠癌细胞株HCT116购自中国科学院细胞库。

1.1.2 主要试剂及仪器 RARI-1640培养基(美国GIBCO公司);青霉素链霉素双抗、胎牛血清、胰蛋白酶(美国INVITROGEN公司);CCK8试剂盒(日本同仁化工)。Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒(美国BD Biosciences)。兔抗人单克隆

抗体 PARP、Bcl-2、Bax(美国 CST 公司)。HRP 标记山羊抗兔 IgG 抗体(英国 Abcam 公司产品); ChemiDoc™ XRS+ 成像系统、Elx808 型酶标仪(美国 BIO-RAD 公司), FACS Canto II 流式细胞仪(美国 BD Biosciences)。

1.1.3 药物及制备 注射用 OXA 购自法国 SANOFI-AVENTIS 公司。将 OXA 配置成 5 mmol/L 母液, 过滤除菌后分装, -20 °C 闭光保存, 2 周内使用。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及构建 OXA 耐药株 HCT116/OXA HCT116 细胞用含 10% 胎牛血清 RARI-1640 和 1% 青链霉素双抗的完全培养基, 置于 37 °C、5%CO₂ 饱和湿度的恒温孵育箱中培养。将 2 μmol/L OXA 加入 HCT116 细胞中培养, 连续 4 个周期, 依次将 4、8、12、24、48 μmol/L 的 OXA 加入 HCT116 培养基中诱导培养, 直至细胞可在含 48 μmol/L OXA 的培养基中生长, 此时 HCT116/OXA 细胞构建成功。

1.2.2 细胞增殖抑制作用检测 (1) HCT116/OXA、HCT116 对 OXA 耐受性的测定: CCK8 法检测 OXA 对 HCT116 和 HCT116/OXA 细胞的增殖抑制作用。选取对数生长期的 HCT116 和 HCT116/OXA 制成单细胞悬液, 调整浓度为每孔 5×10^3 个细胞接种于 96 孔培养板, 待细胞贴壁后分别加入 7 个梯度浓度的 OXA (0.1、1、10、20、50、100、1 000 μmol/L), 同时设置空白对照组和调零孔, 每组均设 5 个复孔。其中对照组加入细胞和完全培养基, 调零组只加入完全培养基。分别于培养 24、48 h 时加入 10% CCK8 100 μL, 孵育 3 h 后用酶标仪在 450 nm 波长检测吸光度 OD 值。采用 GraphPad Prism 5.0 软件计算各组细胞半数抑制率 (IC₅₀), $IC_{50}(\%) = [1 - (OD_{\text{实验组}} - OD_{\text{调零组}}) / (OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{调零组}})] \times 100\%$; 并计算耐药指数 (resistance index, RI) = 耐药株 IC₅₀/ 亲本细胞 IC₅₀。(2) Nef 最适逆转浓度的确定: CCK8 法检测 Nef 对 HCT116/OXA 细胞的增殖抑制作用。选取对数生长期的细胞制成单细胞悬液, 调整浓度为每孔 5×10^3 个细胞接种于 96 孔培养板, 待细胞贴壁后分别加入 7 个梯度浓度的 Nef (2.5、5、10、20、40、80、160 μmol/L), 同时设置空白对照组和调零孔, 每组均设 5 个复孔。

作用 24、48 h 时加入 10% CCK8 100 μL, 孵育 3 h 后检测并计算 IC₅₀, 检测 Nef 对 HCT116/OXA 的毒性作用, 计算细胞存活率 (%) = (1 - 细胞抑制率 %)。以细胞存活率为 90% 时的 Nef 浓度作为最适逆转浓度。逆转倍数 = OXA 组 IC₅₀/ Nef+OXA 组 IC₅₀。

1.2.3 细胞凋亡检测 取对数生长期的 HCT116/OXA 细胞, 以胰酶消化制成单细胞悬液, 接种于 6 孔板内。设置空白组、OXA 组、Nef 组和 Nef+OXA 组。OXA 处理浓度为对 HCT116/OXA 的 IC₅₀ 浓度; Nef 处理浓度为最适逆转浓度。在 37 °C、5%CO₂ 条件下培养, 待细胞贴壁后给予不同处理。处理 24 h 时收集不同处理组细胞, 4 °C 预冷的 PBS 洗涤 1 次后加入 300 μL 1× 结合缓冲液重悬细胞, 加入 5 μL Annexin V-FITC 避光室温孵育 15 min, 然后加入 5 μL PI 避光孵育 5 min 后上机检测。细胞凋亡率 (%) = (早期凋亡细胞数 + 晚期凋亡细胞数) / 全部细胞数 × 100%。

1.2.4 细胞蛋白表达检测 将 HCT116/OXA 细胞接种于 6 孔板内。设置空白组、OXA 组、Nef 组和 Nef+OXA 组。不同处理组经处理 24 h 时 PBS 缓冲液洗涤细胞 3 次, 加入细胞裂解液裂解缓冲液 (含 1× 磷酸酶抑制剂混合物) 后, 置冰上 30 min 后刮取细胞, 以 500 W 功率超声处理后在 4 °C 条件下 12 000 r/min 离心 30 min, 取上清即为样品总蛋白。Western blot 法检测 Bcl-2、Bax、PARP、p-PARP 蛋白, 采集图片并分析结果。

1.3 统计学处理

数据使用 GraphPad Prism 5.0 统计软件分析。3 个及以上样本用 Kuskal-Wallis H 检验进行分析, 两样本均数比较用 Mann-Whitney U 检验, 计量资料均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人结肠癌耐 OXA 耐药株 HCT116/OXA 的建立

经过 9 个月逐步递增 OXA 浓度、间歇诱导, 获得可稳定耐受 OXA 浓度为 48 μmol/L 且能正常生长的人结肠癌耐 OXA 细胞株 HCT116/OXA。CCK8 检测结果显示, OXA 对人结肠癌细胞增殖有明显抑制作用。与 48 h 比较, 处理 24 h 时 HCT116/OXA 的增

殖抑制作用随浓度增加更为明显 ($P < 0.001$), 因此选择 24 h 作为后续实验的处理时间 (图 1)。不同浓度 OXA 处理 HCT116 及 HCT116/OXA 24 h 时, CCK8 法检测表明 HCT116/OXA 细胞对 OXA 的 IC_{50} 浓度为 $(112.00 \pm 2.31) \mu\text{mol/L}$, 而 HCT116 细胞对 OXA 的 IC_{50} 浓度为 $(21.00 \pm 0.64) \mu\text{mol/L}$, 因此 HCT116/OXA 的 RI 为 5.33 (图 2)。

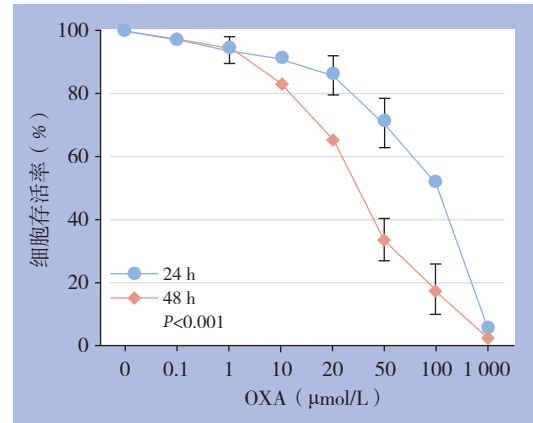


图 1 不同浓度 OXA 作用 24、48 h 对 HCT116/OXA 细胞生长的影响

Figure 1 Influences of different concentrations of OXA on growth of HCT116/OXA cells after culture for 24 and 48 h

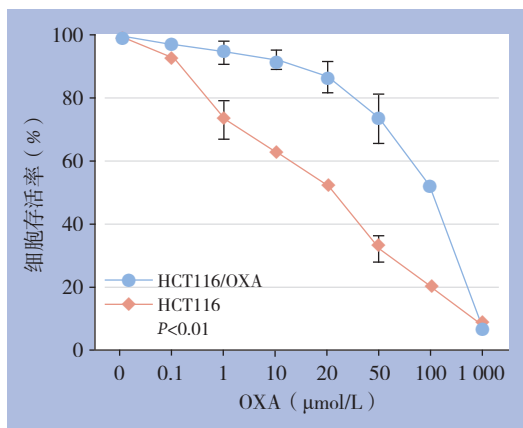
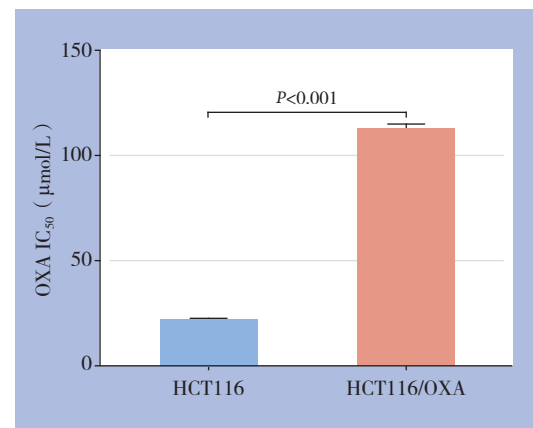


图 2 不同浓度 OXA 作用 24 h 对 HCT116/OXA 与 HCT116 细胞生长的影响及 IC_{50} 比较

Figure 2 Influences of different concentrations of OXA on growth of HCT116/OXA and HCT116 cells culture for 24 h and comparison of IC_{50} values



2.2 Nef 对 HCT116/OXA 耐药性的逆转作用

Nef 对 HCT116/OXA 的细胞毒性成一定浓度依赖关系。CCK8 检测发现处理时间为 24、48 h 时, Nef 对 HCT116/OXA 的作用差异不大 ($P > 0.05$), 因此选择 24 h 作为 Nef 的处理时间 (图 3A)。梯度浓度 Nef 作用 HCT116/OXA 24 h 时, CCK8 检测当 Nef 浓度为 $(4.95 \pm 0.68) \mu\text{mol/L}$ 时 HCT116/OXA 细胞存活率为 90%, 因此将 $5 \mu\text{mol/L}$ 设为 Nef 的最适逆转浓度。OXA 单独作用于 HCT116/OXA 细胞时 IC_{50} 为 $(112.00 \pm 2.31) \mu\text{mol/L}$; 当 $5 \mu\text{mol/L}$ 的 Nef 与梯度浓度 OXA 作用 HCT116/OXA 细胞时 IC_{50}

为 $(45.47 \pm 2.78) \mu\text{mol/L}$, 逆转倍数为 2.46, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$) (图 3B)。

2.3 Nef 联用 OXA 前后对 HCT116/OXA 细胞凋亡率的影响

流式细胞术检测结果显示, Nef 处理 HCT116/OXA 细胞 24 h 时, 细胞凋亡率无明显变化 ($P > 0.05$); OXA ($112 \mu\text{mol/L}$) 处理 HCT116/OXA 细胞 24 h 时, 细胞凋亡率增加 ($P < 0.05$); 但与 OXA 组比较, Nef ($5 \mu\text{mol/L}$) + OXA 处理组细胞凋亡率增加更为明显 ($P < 0.001$) (图 4)。

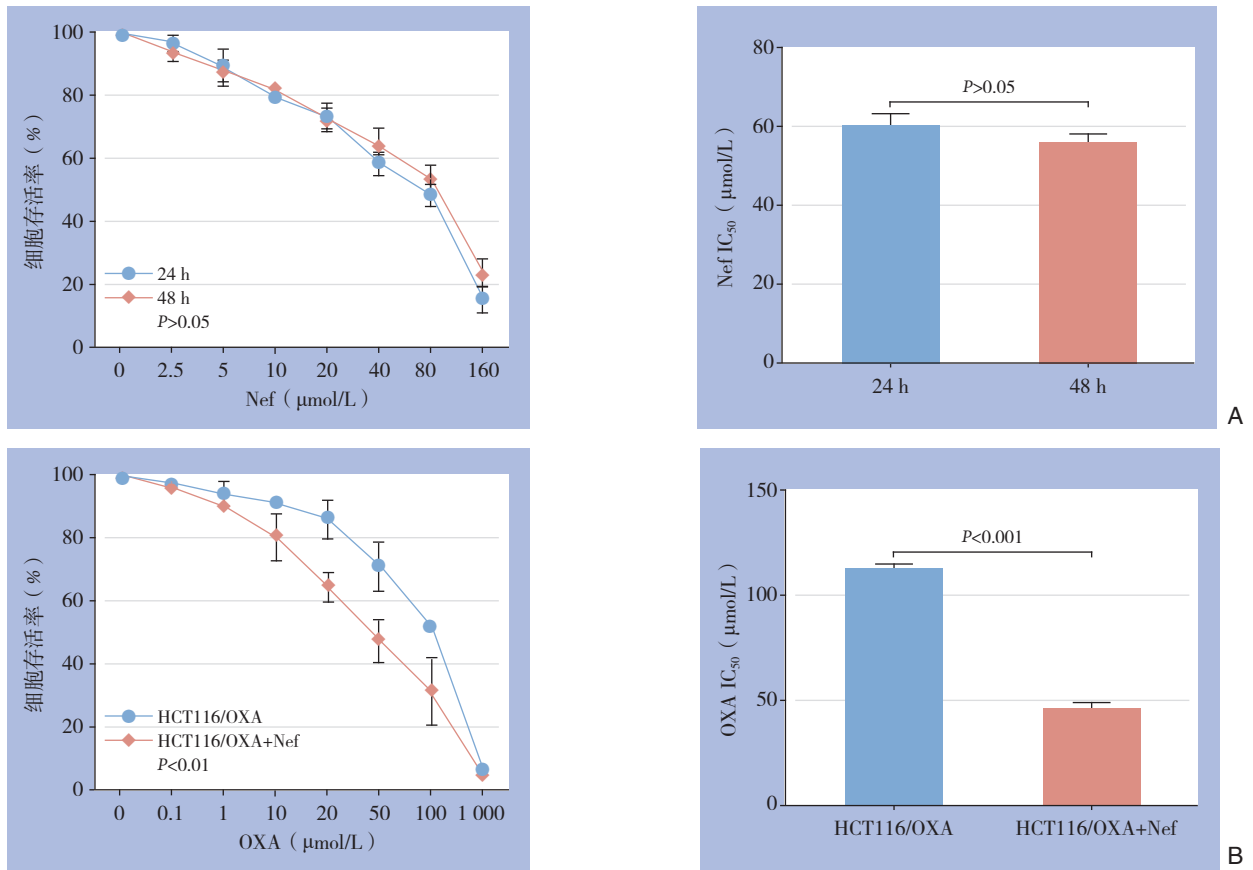


图3 Nef对HCT116/OXA细胞生长及耐药性的影响 A: 不同浓度Nef作用HCT116/OXA细胞24、48 h细胞存活率; B: 不同浓度的OXA与不同浓度的OXA联合Nef(5 μmol/L)作用24 h对HCT116/OXA细胞生长的影响及 IC_{50} 比较

Figure 3 Influences of Nef on growth and drug-resistance of HCT116/OXA cells A: Survival rates of HCT116/OXA cells after exposure to different concentrations of Nef for 24 and 48 h; B: Influences of treatment of different concentrations of OXA or different concentrations of OXA plus Nef (5 μmol/L) for 24 h and comparison of IC_{50} values

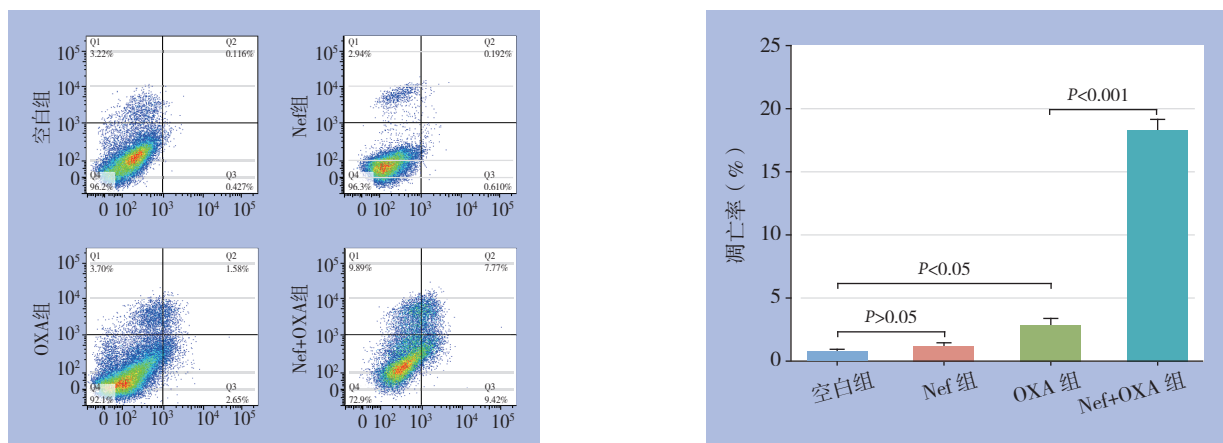


图4 细胞凋亡检测
Figure 4 Apoptosis analysis

2.4 Nef与OXA联用前后对HCT116/OXA细胞PARP、p-PARP、Bcl-2、Bax蛋白表达的影响

Western blot方法检测凋亡相关蛋白的表达结

果显示, OXA处理HCT116/OXA细胞24 h时, 促凋亡蛋白Bax表达呈上升趋势, 但与空白对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与OXA组相比较, Nef+OXA组凋亡蛋白Bax、p-PARP/PARP表

达水平均增加, 抗凋亡蛋白Bcl-2表达水平降低, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 与Nef组比较, OXA组p-PARP/PARP表达增加($P < 0.05$),

但Bax、Bcl-2蛋白的表达水平无统计学差异(均 $P > 0.05$)(图5)。

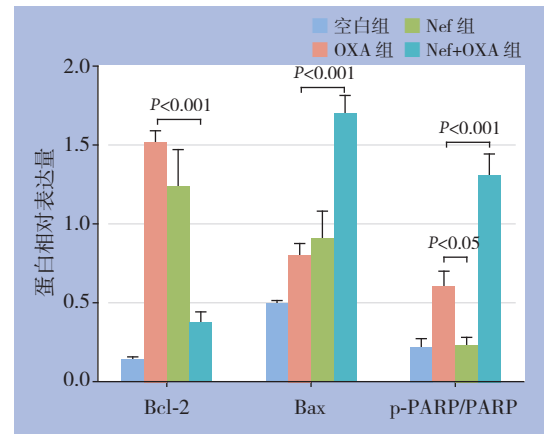
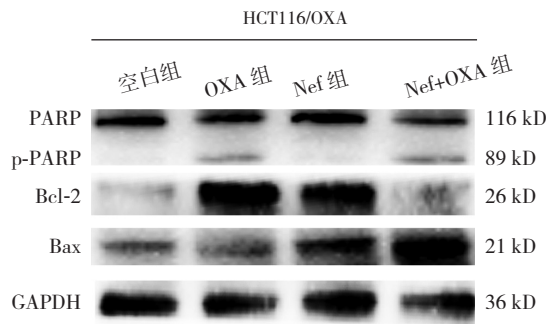


图5 凋亡相关蛋白表达检测

Figure 5 Determination of expressions of the apoptosis-related proteins

3 讨论

Nef是一种双苄基异喹啉生物碱, 具有钙离子通道阻滞剂作用, 近年来其在肿瘤的研究愈来愈多。Qin等^[5]发现Nef可通过抑制ABC转运蛋白P-gp的表达从而增加人慢性髓性白血病细胞株K562/G01对伊马替尼的药物敏感性。Huang等^[6]也证实Nef联合高热可抑制ABC转运蛋白P-gp和MDR1 mRNA的表达增加SGC7901/ADM的多药耐药性。此外, 此类作用在乳腺癌耐药株MCF-7/ADR中也被验证^[7]。Nef可通过激活P38 MAPK/JNK通路、抑制mTOR通路的激活而诱导自噬, 从而抑制卵巢癌细胞的增殖^[8]。在肺癌A549细胞株中, Poornima等^[9]研究表明Nef可通过富集氧自由基、抑制PI3K/Akt/mTOR而诱导自噬, 从而抑制肺癌细胞增殖。另外有学者艾小红等^[10]证实了在肝癌耐热细胞株中, Nef可通过下调Bcl-2的表达增加肝癌细胞对阿霉素的药物敏感性。但Nef与结肠癌细胞的相关性却未见报道。

结肠癌化疗耐药成为结肠癌患者预后不良的主要原因。目前大量研究致力于增加结肠癌的药物敏感性。结肠癌化疗耐药的主要机制有错配修复基因的缺失^[11]、CpG岛甲基化^[12]、KRAS、P53基因突变^[13-14]、慢性缺氧^[15]、上皮间质转化^[16]、细胞亚群存在^[17]等。其中细胞凋亡也是导致结肠癌耐药性的机制之一。Bcl-2、Bax是细胞凋亡家族中的重要成员, Bcl-2/Bax的比例下降则提示细胞凋

亡增加^[18]。Bcl-2与结肠癌耐药相关^[3]; 细胞凋亡的减少可诱发基因突变、免疫紊乱, 从而致使细胞对缺氧和乏养耐受增加, 从而对抗癌药物和放疗射线产生抵抗^[19]; Yang等^[20]发现在结肠癌中, 结缔组织生长因子可通过FAK/MEK/ERK通路上调Bcl-2的表达从而减少细胞凋亡, 从而增加对5-氟尿嘧啶的耐药性。然而, Manne等^[21]研究107例南美和149例高加索结肠癌患者时发现Bcl-2的高表达提示远端结直肠癌预后较好。这可能提示人种、肿瘤部位的不同, Bcl-2的表达高低与结肠癌的预后不同, 其机制有待进一步研究。

有研究^[22]表明, miR-409-3p可通过下调Beclin-1介导的自噬作用增加结肠癌细胞对OXA的敏感性。另有研究指出结肠癌患者对OXA产生耐药性可能与lncRNA长基因间的非编码RNA 152 (LincRNA00152)有关, LincRNA00152通过修饰Erb-b2受体酪氨酸激酶4来减少结肠癌细胞凋亡从而产生耐药性^[23]。Wang等^[24]研究表明转染Bcl-2促凋亡家族中BNIP3质粒的结肠癌细胞对OXA的敏感性增加。另有学者指出下调PI3K的催化亚基p110 β 可通过抑制OXA所致的细胞凋亡和细胞周期阻滞来增加结肠癌对OXA的敏感性^[25]。本实验研究发现Nef可增加HCT116/OXA细胞对OXA的敏感性, 同时发现Bax的表达水平增加, Bcl-2的表达水平明显降低, 表明Bcl-2/Bax可能参与了HCT116/OXA细胞耐药, 提示Nef可能通过下调Bcl-2/Bax表达水平逆转人结肠癌耐OXA细胞

株HCT116/OXA的耐药性。但是Nef如何调节结肠癌细胞凋亡还需要更加深入探讨。在接下来的研究中,有必要构建另一株恶性程度不同的结肠癌耐OXA细胞株,比较并研究Nef对其他结肠癌细胞的耐药增敏作用,并通过体内动物实验进一步探讨其作用机制,为结肠癌化疗增敏提供新的思路和方法。

参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017[J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(1):7–30. doi: 10.3322/caac.21387.
- [2] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2):115–132. doi: 10.3322/caac.21338.
- [3] Liu S, Wang B, Li XZ, et al. Preparative separation and purification of liensinine, isoliensinine and neferine from seed embryo of *Nelumbo nucifera* GAERTN using high-speed counter-current chromatography[J]. *J Sep Sci*, 2009, 32(14):2476–2481. doi: 10.1002/jssc.200800766.
- [4] Cao JG, Tang XQ, Shi SH. Multidrug resistance reversal in human gastric carcinoma cells by neferine[J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(20):3062–3064.
- [5] Qin Q, Chen XP, Yang ZS, et al. Neferine increases STI571 chemosensitivity via inhibition of P-gp expression in STI571-resistant K562 cells[J]. *Leuk Lymphoma*, 2011, 52(4):694–700.
- [6] Huang C, Li Y, Cao P, et al. Synergistic effect of hyperthermia and neferine on reverse multidrug resistance in adriamycin-resistant SGC7901/ADM gastric cancer cells[J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2011, 31(4):488–496. doi: 10.1007/s11596-011-0478-0.
- [7] 黄程辉, 曹培国, 谢兆霞, 等. 不同方式加热联合甲基莲心碱对耐药乳腺癌MCF-7/Adr细胞 γ H2AX及mdr-1/P-gp表达的影响[J]. *中南大学学报: 医学版*, 2011, 36(4):317–322. doi:10.3969/j.issn.1672-7347.2011.04.007.
Huang CH, Cao PG, Xie ZX, et al. Effect of different heating methods combined with neferine on the expressions of γ H2AX and mdr-1/P-gp in MCF-7/Adr breast cancer cells[J]. *Journal of Central South University: Medical Science*, 2011, 36(4):317–322. doi: 10.3969/j.issn.1672-7347.2011.04.007.
- [8] Xu L, Zhang X, Li Y, et al. Neferine induces autophagy of human ovarian cancer cells via p38 MAPK/ JNK activation[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(7):8721–8729. doi: 10.1007/s13277-015-4737-8.
- [9] Poornima P, Weng C F, Padma V V. Neferine from *Nelumbo nucifera* induces autophagy through the inhibition of PI3K/ Akt/mTOR pathway and ROS hyper generation in A549 cells[J]. *Food Chem*, 2013, 141(4):3598–3605. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.05.138.
- [10] 艾小红, 唐小卿, 刘艳萍, 等. 甲基莲心碱逆转肝癌HepG2/thermotolerance细胞对阿霉素耐受性的作用[J]. *癌症*, 2007, 26(4):357–360.
Ai XH, Tang XQ, Liu YP, et al. Effect of neferine on adriamycin-resistance of thermotolerant hepatocarcinoma cell line HepG2/thermotolerance[J]. *Chinese Journal of Cancer*, 2007, 26(4):357–360.
- [11] Ma J, Zhang Y, Shen H, et al. Association between mismatch repair gene and irinotecan-based chemotherapy in metastatic colon cancer[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(12):9599–9609. doi: 10.1007/s13277-015-3723-5.
- [12] Shiovitz S, Bertagnolli MM, Renfro LA, et al. CpG island methylator phenotype is associated with response to adjuvant irinotecan-based therapy for stage III colon cancer[J]. *Gastroenterology*, 2014, 147(3):637–645. doi: 10.1053/j.gastro.2014.05.009.
- [13] Linardou H, Dahabreh IJ, Kanaloupiti D, et al. Assessment of somatic k-RAS mutations as a mechanism associated with resistance to EGFR-targeted agents: a systematic review and meta-analysis of studies in advanced non-small-cell lung cancer and metastatic colorectal cancer[J]. *Lancet Oncol*, 2008, 9(10):962–972. doi: 10.1016/S1470-2045(08)70206-7.
- [14] Li XL, Zhou J, Chen ZR, et al. P53 mutations in colorectal cancer - molecular pathogenesis and pharmacological reactivation[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(1):84–93. doi: 10.3748/wjg.v21.i1.84.
- [15] Wang L, Xue M, Chung DC. c-Myc is regulated by HIF-2 α in chronic hypoxia and influences sensitivity to 5-FU in colon cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(48):78910–78917. doi: 10.18632/oncotarget.12911.
- [16] Kubili ū tē R, Šulskytė I, Dani ū naitė K, et al. Molecular features of doxorubicin-resistance development in colorectal cancer CX-1 cell line[J]. *Medicina (Kaunas)*, 2016, 52(5):298–306. doi: 10.1016/j.medici.2016.09.003.
- [17] Xiong B, Ma L, Hu X, et al. Characterization of side population cells isolated from the colon cancer cell line SW480[J]. *Int J Oncol*, 2014, 45(3):1175–1183. doi: 10.3892/ijo.2014.2498.
- [18] Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(1):49–63. doi: 10.1038/nrm3722.
- [19] Reed JC. Dysregulation of apoptosis in cancer[J]. *J Clin Oncol*, 1999, 17(9):2941–2953.
- [20] Yang K, Gao K, Hu G, et al. CTGF enhances resistance to 5-FU-mediating cell apoptosis through FAK/MEK/ERK signal pathway in colorectal cancer[J]. *Onco Targets Ther*, 2016, 9:7285–7295.
- [21] Manne U, Weiss HL, Grizzle WE. Bcl-2 expression is associated with improved prognosis in patients with distal colorectal adenocarcinomas[J]. *Int J Cancer*, 2000, 89(5):423–430.
- [22] Tan S, Shi H, Ba M, et al. miR-409-3p sensitizes colon cancer cells to oxaliplatin by inhibiting Beclin-1-mediated autophagy[J]. *Int J*

- Mol Med, 2016, 37(4):1030–1038. doi: 10.3892/ijmm.2016.2492.
- [23] Yue B, Cai D, Liu C, et al. Linc00152 Functions as a Competing Endogenous RNA to Confer Oxaliplatin Resistance and Holds Prognostic Values in Colon Cancer[J]. Mol Ther, 2016, 24(12):2064–2077. doi: 10.1038/mt.2016.180.
- [24] Wang Z, Huang C, Zeng J, et al. Effects of the proapoptotic regulator Bcl-2/adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3 on the chemosensitivity of human colon cancer cell lines[J]. Oncol Lett, 2012, 4(6):1195–1202.
- [25] Liu W, Wang G, Cao X, et al. Down-regulation of p110beta expression increases chemosensitivity of colon cancer cell lines

to oxaliplatin[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2012, 32(2):280–286. doi: 10.1007/s11596-012-0049-z.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 屈雁玲, 马俊丽, 邓甘露, 等. 甲基莲心碱逆转人结肠癌细胞奥沙利铂耐药的体外研究[J]. 中国普通外科杂志, 2017, 26(3):325–332. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2017.03.009

Cite this article as: Qu YL, Ma JL, Deng GL, et al. Reversal effect of neferine on oxaliplatin-resistance in human colon cancer cells in vitro[J]. Chin J Gen Surg, 2017, 26(3):325–332. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2017.03.009

本刊常用词汇英文缩写表

C-反应蛋白	CRP	甲型肝炎病毒	HAV	心电图	ECG
Toll 样受体	TLRs	碱性成纤维细胞转化生长因子	bFGF	心脏监护病房	CCU
氨基末端激酶	JNK	聚合酶链反应	PCR	血管紧张素 II	AngII
白细胞	WBC	抗生物素蛋白-生物素酶复合物法	ABC 法	血管内皮生长因子	VEGF
白细胞介素	IL	辣根过氧化物酶	HRP	血管性血友病因子	vWF
半数抑制浓度	IC ₅₀	链霉抗生物素蛋白-生物素酶复合物法	SABC 法	血红蛋白	Hb
变异系数	CV	磷酸盐缓冲液	PBS	肌酐	SCr
标记的链霉抗生物素蛋白-生物素法	SP 法	绿色荧光蛋白	GFP	尿素氮	BUN
表皮生长因子	EGF	酶联免疫吸附测定	ELISA	血小板	PLT
丙氨酸转氨酶	ALT	美国食品药品监督管理局	FDA	血压	BP
丙二醛	MDA	脑电图	EEG	血氧饱和度	SO ₂
丙型肝炎病毒	HCV	内毒素/脂多糖	LPS	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸	NADPH
超氧化物歧化酶	SOD	内皮型一氧化氮合酶	eNOS	严重急性呼吸综合征	SARS
磁共振成像	MRI	内生肌酐清除率	CCr	一氧化氮	NO
极低密度脂蛋白胆固醇	VLDL-C	尿素氮	BUN	一氧化氮合酶	NOS
低密度脂蛋白胆固醇	LDL-C	凝血酶时间	TT	乙二胺四乙酸	EDTA
动脉血二氧化碳分压	PaCO ₂	凝血酶原时间	PT	乙酰胆碱	ACh
动脉血氧分压	PaO ₂	牛血清白蛋白	BSA	乙型肝炎病毒	HBV
二甲基亚砜	DMSO	热休克蛋白	HSP	乙型肝炎病毒 e 抗体	HBeAb
反转录-聚合酶链反应	RT-PCR	人类免疫缺陷病毒	HIV	乙型肝炎病毒 e 抗原	HBeAg
辅助性 T 细胞	Th	人绒毛膜促性腺激素	HCG	乙型肝炎病毒表面抗体	HBsAb
肝细胞生长因子	HGF	三磷酸腺苷	ATP	乙型肝炎病毒表面抗原	HBsAg
干扰素	IFN	三酰甘油	TG	乙型肝炎病毒核心抗体	HBeAb
高密度脂蛋白胆固醇	HDL-C	生理氯化钠溶液	NS	乙型肝炎病毒核心抗原	HBeAg
谷胱甘肽	GSH	世界卫生组织	WHO	异硫氰酸荧光素	FLTC
固相 pH 梯度	IPG	双蒸水	ddH ₂ O	诱导型一氧化氮合酶	iNOS
核糖核酸	RNA	丝裂原活化蛋白激酶	MAPK	原位末端标记法	TUNEL
核因子-κB	NF-κB	四甲基偶氮唑盐微量酶反应	MTT	杂合性缺失	LOH
红细胞	RBC	苏木精-伊红染色	HE	增强化学发光法	ECL
红细胞沉降率	ESR	胎牛血清	FBS	肿瘤坏死因子	TNF
环氧酶-2	COX-2	体质量指数	BMI	重症监护病房	ICU
活化部分凝血活酶时间	APTT	天冬氨酸氨基转移酶	AST	转化生长因子	TGF
活性氧	ROS	脱氧核糖核酸	DNA	自然杀伤细胞	NK 细胞
获得性免疫缺陷综合征	AIDS	细胞间黏附分子	ICAM	直接胆红素	DBIL
肌酐	Cr	细胞外基质	ECM	总胆固醇	TC
基质金属蛋白酶	MMP	细胞外调节蛋白激酶	ERK	总胆红素	TBIL
计算机 X 线断层照相技术	CT	纤连蛋白	FN		