

· 斑蝥素的抗肿瘤作用及毒理探讨 ·

[编者按] 中药抗肿瘤的研究是近年来的研究热门。尤其是一些中药的有效成分,早在20世纪就已经有报导对癌细胞具有一定的杀伤效果。由于文献中记载的抗肿瘤的中药,大部分都具有一定的毒性。因此,通过配伍联合用药以达到抗肿瘤增效减毒的目的一直是研究的主要方向。研究清楚中药有效成分的毒性,并了解其中的机制,以筛选可以联合使用的药物是抗肿瘤药物筛选的基本法则。无论是动物实验还是细胞实验在基础研究中都是不可或缺的部分,无论是增效的研究还是减毒的研究对于抗肿瘤的基础研究都具有重要的意义。本课题组先后研究了多种中药有效成分及其衍生物,如喜树碱、斑蝥素、去甲斑蝥素等。对中药中抗肿瘤的有效成分毒性有比较深刻的认识和理解,具备比较完备的肿瘤细胞株系,并建立了多个肿瘤研究模型,可以供筛选抗肿瘤药物使用。

斑蝥素与培美曲塞对结直肠癌 HCT116 细胞的联合作用

隋彤彤, 田丽春, 张鑫, 马齐襄, 封艳艳, 胡晓炜, 罗广彬*, 马志涛*
(北京中医药大学 生命科学学院, 北京 100029)

[摘要] 目的:探究斑蝥素(cantharidin, CTD)与培美曲塞(pemetrexed, MTA)联合用药对HCT116细胞产生的影响。方法:应用长时间细胞观察及功能分析系统(IncuCyte™ ZOOM)及克隆形成实验,分析两药联合对结直肠癌HCT116细胞生长增殖的影响;应用流式细胞术检测两药联合对结直肠癌HCT116细胞凋亡的影响;采用蛋白免疫印迹法检测两药联合对HCT116细胞半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)及聚二磷酸腺苷核糖多聚酶(PARP)蛋白表达的影响;应用β-半乳糖苷酶衰老染色实验检测两药联合对结直肠癌HCT116细胞衰老的影响;应用CompuSyn软件计算联合作用指数(CI)。结果:与MTA单药组相比,MTA与CTD联合用药能够显著增加对HCT116细胞的生长抑制率($P < 0.01$);显著增加凋亡水平($P < 0.01$);明显增加衰老水平($P < 0.05$);显著减少pro-Caspase-3的表达量,增加cleaved-PARP的表达量($P < 0.01$)。同时,CompuSyn软件计算的CI < 1,表明两药具有协同作用效果。结论:MTA与CTD具有良好的联合作用效果,能够通过诱发HCT116细胞凋亡以及衰老来抑制细胞的生长增殖,发挥抗肿瘤作用。

[关键词] 培美曲塞; 斑蝥素; HCT116细胞; 细胞凋亡; 衰老; 协同效应

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5;R96 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2018)16-0043-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181618

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180523.1533.010.html>

[网络出版时间] 2018-05-24 10:21

Synergistic Effect of Cantharidin and Pemetrexed on HCT116 Colorectal Cancer Cells

SUI Tong-tong, TIAN Li-chun, ZHANG Xin, MA Qi-xiang, FENG Yan-yan,
HU Xiao-wei, LUO Guang-bin*, MA Zhi-tao*

(School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the combination of pemetrexed (MTA) and cantharidin (CTD) *in vitro*. **Method:** Human colorectal cancer HCT116 cells were treated with MTA, CTD or a combination of MTA and

[收稿日期] 20180205(011)

[基金项目] 北京中医药大学自主选题——特聘教授启动基金项目(1040053310002/002)

[第一作者] 隋彤彤, 硕士, 在读硕士, 从事肿瘤转化医学研究, E-mail: 18765929860@163.com

[通信作者] * 罗广彬, 博士, 教授, 从事肿瘤转化医学研究, Tel: 010-64286526, E-mail: luol35@hotmail.com;

* 马志涛, 博士, 助理研究员, 从事肿瘤转化医学研究, Tel: 010-64286526, E-mail: mzhzt@buem.edu.cn

CTD. The cell growth, apoptosis and senescence were evaluated using a colony formation assay, flow cytometry and a senescence-combined β -galactosidase assay, respectively. The expressions of pro-cysteine aspartate-specific protease (Caspase) -3 and cleaved poly adenosine diphosphate ribose polymerase (PARP) were measured using Western blot. The combination index (CI) was calculated using CompuSyn software to evaluate synergism. **Result:** In HCT116 cells, the combination therapy group ($50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MTA + $4 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CTD) showed significant decreases in cell growth ($P < 0.01$), apoptosis ($P < 0.01$) and cell senescence ($P < 0.05$) compared with those of the solitary MTA therapy group. The expression of pro-Caspase-3 was significantly decreased, and the expression of cleaved-PARP was significantly increased in the combination group ($P < 0.01$). The CI value ($\text{CI} < 1$) showed a synergistic effect in these two agents. **Conclusion:** The combination of MTA and CTD synergistically suppresses human colorectal cancer HCT116 cells *in vitro* and exerts an antitumor effect by inducing apoptosis and senescence. Therefore, the present study provides a new candidate strategy for the treatment of colorectal cancer.

[**Key words**] pemetrexed; cantharidin; HCT116 cell; apoptosis; senescence; synergistic effect

结直肠癌是世界第 3 大恶性肿瘤,在我国随着居民饮食习惯的改变,结直肠癌发病率近年来逐年上升,目前全国发病率已位居全部癌症第 4 位^[1]。目前治疗结直肠癌的主要手段是手术切除配合术后化疗^[2]。临床常用的化疗药物包括 5-氟脲嘧啶(5-Fu),奥沙利铂和依立替康^[3]。虽然这些化疗药物提高了患者生存率,但仍有大量的患者死于肿瘤复发和转移。所以新型的能够有效治疗结直肠癌的化疗方法仍有待继续研究。培美曲塞(MTA)是一种抗叶酸制剂,能够抑制叶酸依赖代谢过程中的二氢叶酸还原酶(DHFR),胸苷酸合酶(Ts)和甘氨酸酰胺核糖核苷酸甲酰转移酶(GARFT)的活性,从而阻断脱氧核糖核苷酸(DNA)的生物合成并诱导细胞周期阻滞^[4-5]。目前用于恶性胸膜间皮瘤的一线治疗和非小细胞肺癌的二线治疗^[6]。同时,大量的研究表明,培美曲塞对于结直肠癌也有较好的治疗效果^[7-8]。斑蝥素(CTD)是一种来源于斑蝥干燥体的有效的抗肿瘤中药成分,主要通过抑制蛋白磷酸酶 2 (PP2A)活性来发挥抗肿瘤作用^[9],但因其较大的毒副作用使其临床应用受到限制。因此,探究使 CTD 增效减毒的方法是其近来研究的重点。近来有研究表明,CTD 能够抑制包括结直肠癌细胞在内的多种细胞的生长增殖。基于 MTA 与 CTD 对于结直肠癌都具有良好的治疗效果,所以,本研究旨在探究两药联合对结直肠癌 HCT116 细胞产生的影响,进而希望找到一种新的可以应用到临床的治疗结直肠癌的化疗方法。

1 材料

1.1 细胞、药物与试剂 传至第 3 代的 HCT116 细胞由中科院动物研究所周光标老师课题组提供; Annexin V: FITC 细胞凋亡检测试剂盒(美国 BD

Pharmingen 公司,批号 556547); β -半乳糖苷酶衰老染色试剂盒(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号 9860);胎牛血清(美国 PAN Biotech 公司,批号 P150104);96 孔板,6 孔板,RPMI 1640 培养基(美国 Corning 公司,批号分别为 3599, 3736, 18916003); CTD(中国曼斯特公司,批号 a0167); MTA(美国 Selleck 公司,批号 S1135);蛋白裂解液(RIPA,北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司,批号 wb-0071);胰蛋白酶,结晶紫,磷酸盐缓冲液(PBS)(北京拜尔迪生物技术有限公司,批号分别为 0458, c0120, de0220);RNA 酶(碧云天生物技术有限公司,批号 ST578);二甲基亚砜(DMSO,美国 Sigma 公司,批号 34869);pro-半胱氨酸蛋白酶-3 (pro-Caspase-3)抗体(美国 Epitomics 公司,批号 YH0926);聚二磷酸腺苷核糖多聚酶(cleaved-PARP), β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号分别为 9541S, 4967S)。

1.2 仪器 IncuCyte™ ZOOM 型长时间细胞观察及功能分析系统(美国森西科技有限公司);IX81 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司);165-8001 型垂直电泳槽,170-3940 型半干转电转印仪,PowerPac™ Basic 型电泳仪(美国伯乐公司);FACSCanto II 型流式细胞仪(美国 BD Pharmingen 公司);1300SERIESA2-1384 型超净工作台,311 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司)。

2 方法

2.1 长时间细胞观察及功能分析系统(IncuCyte™ ZOOM)观察 HCT116 细胞增殖变化 取对数生长期的结直肠癌细胞 HCT116 以每孔 3×10^4 个/mL 接种于 96 孔细胞培养板中,每孔 100 μL ,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO₂ 的培养箱内培养 12 h。根据 IncuCyte™

ZOOM 分析的单药处理结果,确定两药的起效浓度及致死剂量,并将 MTA 与 CTD 的用药浓度确定为 MTA(25, 50, 100, 200 nmol·L⁻¹)和 CTD(1, 2, 4, 8 μmol·L⁻¹)。设置单药组及在各药浓度加倍体积减半的基础上设置联合用药组,每个组设 3 个平行孔。加药后立即放入 IncuCyte™ ZOOM 中拍照观察 96 h 内细胞增殖变化。

2.2 克隆形成实验 取对数生长期的结直肠癌细胞 HCT116,以 150 个/mL 接种于 6 孔板,每孔 2 mL。置于 37 °C 5% CO₂ 的培养箱内培养 12 h,加入不同浓度 MTA,CTD 及两药联合处理,同 2.1 项。10 d 后待细胞长成克隆,用 0.5% 的结晶紫染液对克隆进行染色,然后对形成的克隆进行计数。

2.3 CompuSyn 软件计算联合作用指数 (CI) 运用 CompuSyn 软件对由 IncuCyte™ ZOOM 统计的活细胞的密度进行联合作用效果评估。根据 Chou-Talaly 计算原理,当 CI < 1 时,两药为协同作用效果;当 CI = 1 时,两药为叠加作用效果;当 CI > 1 时,两药为拮抗作用效果^[10]。

2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡 将处于对数生长期的结直肠癌细胞 HCT116 以 6 × 10⁴ 个/mL 接种于 6 孔板中,细胞长至 50% 后,弃 6 孔板中液体。加入不同浓度 MTA,CTD 及两药联合处理,同 2.1 项。在 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后收集细胞。用不含 EDTA 0.25% 的胰酶消化后离心 (400 × g 离心 5 min),弃上清液,再用 Binding buffer 洗涤 2 次。具体操作参照 BD Annexin V: FITC 细胞凋亡检测试剂盒操作说明,分别加入 RNA 酶,PI,FITC 孵育 15 min,上流式分析仪分析细胞凋亡。

2.5 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 pro-Caspase-3,cleaved-PARP 的表达 细胞分组及处理同 2.1 项,MTA,CTD 及两药联合处理 HCT116 细胞 72 h,加入蛋白裂解液 4 °C 裂解 10 min 变性,收集裂解液,15 000 × g 离心 10 min 取上清。Loading buffer 煮样 10 min,BCA 法进行蛋白定量。配制 10% 的聚丙烯酰胺凝胶后上样,电泳,转膜 (PVDF),5% 脱脂奶粉封闭 1 h,加入 1:1 000 稀释的一抗 4 °C 过夜。次日洗膜,二抗孵育 1 h,ECL 显色、显影,用 Image J 软件进行灰度值分析。

2.6 β-半乳糖苷酶衰老染色 将处于对数生长期的结直肠癌细胞 HCT116 以 6 × 10⁴ 个/mL 接种于 6 孔板中,细胞长至 50%,弃 6 孔板中液体。加入不同浓度 MTA,CTD 及两药联合处理,同 2.1 项,96 h

后弃上清。根据 β-半乳糖苷酶衰老染色试剂盒操作说明先后加入固定液和染色液。37 °C 避光放置过夜,倒置显微镜下观察细胞染色情况。

2.7 统计学方法 使用 SPSS 20.0 软件对数据进行统计学分析,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 来表示。检验数据正态性并运用单因素方差分析法进行组间的比较,将 $P < 0.05$ 定义为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 MTA 与 CTD 联合用药对 HCT116 细胞增殖的影响 运用 IncuCyte™ ZOOM 筛选对 HCT116 细胞有效的联合作用浓度。结果显示,MTA 与 CTD 对 HCT116 细胞生长增殖水平的抑制具有浓度和时间依赖性,且当 MTA 50 nmol·L⁻¹,CTD 4 μmol·L⁻¹ 联合用药时具有最佳联合作用效果,几乎可以完全抑制细胞的增殖。与 MTA 50 nmol·L⁻¹ 组,CTD 4 μmol·L⁻¹ 组相比,联合用药组 HCT116 细胞增殖水平降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 1。

表 1 MTA 与 CTD 联合用药对 HCT116 细胞增殖率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of MTA and CTD on growth of HCT116 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度	生长抑制率/%
空白	-	-
MTA	50 nmol·L ⁻¹	35.88 ± 8.15
CTD	4 μmol·L ⁻¹	62.41 ± 4.52
MTA + CTD	50 nmol·L ⁻¹ + 4 μmol·L ⁻¹	74.27 ± 4.19 ^{1,2)}

注:与 CTD 组比较¹⁾ $P < 0.05$;与 MTA 组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 CompuSyn 软件对联合作用效果的评价 为进一步验证 MTA 与 CTD 两药联合作用效果的存在,运用 CompuSyn 软件对 IncuCyte™ ZOOM 识别的活细胞密度计算联合作用指数 CI。结果表明当生长抑制率 $Fa < 1$ 时大部分的 CI < 1,且 Fa 越小 CI 值越小。当 Fa 介于 0.2 ~ 0.6 时,CI 介于 0.5 ~ 0.6。说明两药具有较好的联合作用效果。

3.3 MTA 与 CTD 联合用药对 HCT116 细胞克隆形成的影响 与空白组相比,单药组,MTA 50 nmol·L⁻¹ 与 CTD 4 μmol·L⁻¹ 联合用药组 HCT116 克隆形成能力显著下降 ($P < 0.01$);与 MTA 50 nmol·L⁻¹ 组,CTD 4 μmol·L⁻¹ 组相比,MTA 50 nmol·L⁻¹ 与 CTD 4 μmol·L⁻¹ 联合用药组 HCT116 克隆形成能力显著下降 ($P < 0.01$)。见图 1,表 2。

3.4 MTA 与 CTD 联合用药对 HCT116 凋亡的影响 与空白组相比,单药组,MTA 50 nmol·L⁻¹ 与 CTD

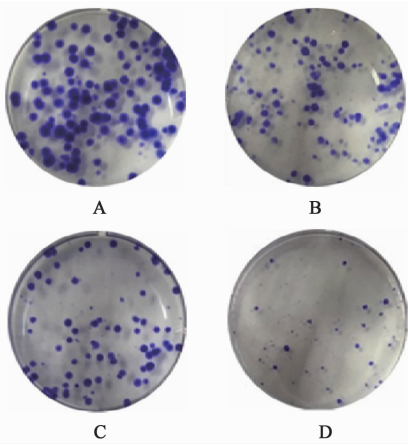


图 1 MTA 与 CTD 联合用药对 HCT116 细胞克隆形成的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 Effect of MTA and CTD on clonogenic survival of HCT116 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

表 2 MTA 与 CTD 联合用药对 HCT116 细胞克隆形成的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度	克隆数/个
空白	-	69.33 ± 9.86
MTA	50 nmol·L ⁻¹	34.66 ± 7.23 ¹⁾
CTD	4 μmol·L ⁻¹	33.66 ± 5.13 ¹⁾
MTA + CTD	50 nmol·L ⁻¹ + 4 μmol·L ⁻¹	7.00 ± 2.64 ^{1,2,3)}

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与 CTD 组比较²⁾ $P < 0.01$;与 MTA 组比较³⁾ $P < 0.01$ 。

4 μmol·L⁻¹联合用药组 HCT116 凋亡水平上升 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与 MTA 50 nmol·L⁻¹组, CTD 4 μmol·L⁻¹组相比, MTA 50 nmol·L⁻¹与 CTD 4 μmol·L⁻¹联合用药组 HCT116 凋亡水平显著上升 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 MTA 与 CTD 联合用药对 HCT116 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度	细胞凋亡率/%
空白	-	2.30 ± 0.26
MTA	50 nmol·L ⁻¹	8.33 ± 1.02 ¹⁾
CTD	4 μmol·L ⁻¹	8.73 ± 3.45 ¹⁾
MTA + CTD	50 nmol·L ⁻¹ + 4 μmol·L ⁻¹	17.30 ± 3.89 ^{2,3,4)}

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05, ^{2)} P < 0.01$;与 CTD 组比较³⁾ $P < 0.01$;与 MTA 组比较⁴⁾ $P < 0.01$ (表 4 同)。

3.5 MTA 与 CTD 联合用药对 pro-Caspase-3, cleaved-PARP 蛋白表达的影响 与空白组相比, MTA 50 nmol·L⁻¹与 CTD 4 μmol·L⁻¹联合用药组能够降低 pro-Caspase-3 蛋白表达 ($P < 0.05$), 升高 cleaved-PARP 蛋白表达 ($P < 0.01$); 与 MTA 50 nmol·L⁻¹组相比, MTA 50 nmol·L⁻¹与 CTD 4 μmol·L⁻¹联合用药组 pro-Caspase-3 蛋白表达降低 ($P < 0.01$), cleaved-PARP 蛋白表达升高 ($P < 0.01$)。见图 2, 表 4。

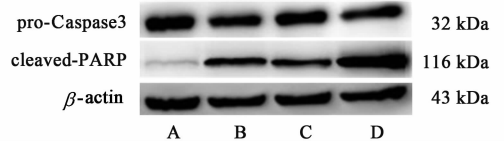


图 2 MTA 与 CTD 联合用药后 pro-Caspase-3 及 cleaved-PARP 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of MTA and CTD on pro-Caspase-3, cleaved-PARP expressions of HCT116 cells

表 4 MTA 与 CTD 联合用药对 pro-Caspase-3 及 cleaved-PARP 蛋白表达影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度	pro-Caspase-3 /β-actin	cleaved-PARP /β-actin
空白	-	1	1
MTA	50 nmol·L ⁻¹	1.08 ± 0.10 ¹⁾	5.04 ± 1.10 ²⁾
CTD	4 μmol·L ⁻¹	0.92 ± 0.03 ¹⁾	5.21 ± 0.94 ²⁾
MTA + CTD	50 nmol·L ⁻¹ + 4 μmol·L ⁻¹	0.81 ± 0.11 ^{1,4)}	8.34 ± 1.40 ^{2,3,4)}

3.6 MTA 与 CTD 联合用药对 HCT116 衰老的影响 与空白组相比, MTA 50 nmol·L⁻¹与 CTD 4 μmol·L⁻¹联合用药组 HCT116 衰老水平显著升高 ($P < 0.01$); 与 MTA 50 nmol·L⁻¹组相比, MTA 50 nmol·L⁻¹与 CTD 4 μmol·L⁻¹联合用药组 HCT116 衰老水平明显升高 ($P < 0.05$); 与 CTD 4 μmol·L⁻¹组相比, MTA 50 nmol·L⁻¹与 CTD 4 μmol·L⁻¹联合用药组 HCT116 衰老水平显著升高 ($P < 0.01$)。MTA 50 nmol·L⁻¹组与空白组相比能够诱导较多的细胞衰老 ($P < 0.01$), 而 CTD 4 μmol·L⁻¹组则无明显的细胞衰老现象。见图 3, 表 5。

4 讨论

结肠直肠癌具有早期症状不明显、易复发及易转移的特点, 目前主要的治疗手段是手术切除配合术后化疗。CTD 是一种对肾脏及肠道具有较高毒性的抗肿瘤中药成分, 本实验选择 MTA 与 CTD 联用

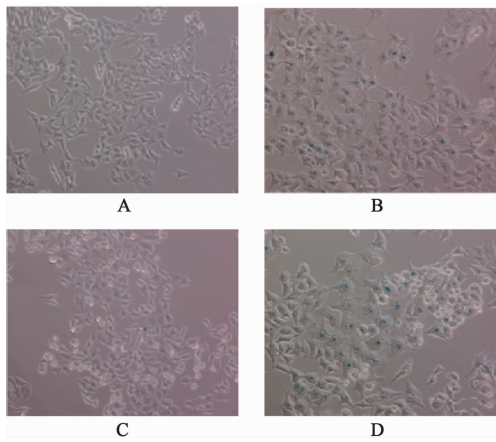


图 3 MTA 与 CTD 联合用药对 β -半乳糖苷酶衰老染色的影响 (倒置显微镜, $\times 20$)

Fig. 3 Effect of MTA and CTD on senescence-combined β -galactosidase assay (inverted microscope, $\times 20$)

表 5 MTA 与 CTD 联合用药对 β -半乳糖苷酶衰老染色的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of MTA and CTD on senescence-combined β -galactosidase assay ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度	细胞衰老率/%
空白	-	0.66 \pm 0.57
MTA	50 nmol \cdot L ⁻¹	24.66 \pm 3.05 ¹⁾
CTD	4 μ mol \cdot L ⁻¹	2.33 \pm 0.57
MTA + CTD	50 nmol \cdot L ⁻¹ + 4 μ mol \cdot L ⁻¹	30.66 \pm 4.04 ^{1, 2, 3)}

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与 CTD 组比较²⁾ $P < 0.01$;与 MTA 组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

主要是因为 MTA 具有诱导细胞衰老的功效,而衰老又是一种毒性较低的抗肿瘤作用方式,希望通过两药的联合使用来降低 CTD 的毒性并增加其功效。经过大量的细胞筛选,初步确定了两药联合对 HCT116 细胞株具有良好的联合作用效果。

从上述实验结果中可以看出,MTA,CTD 单药组能够抑制 HCT116 细胞的生长增殖,但联合用药组表现出了更为强烈的抑制作用;CompuSyn 软件计算的 $CI < 1$,从数学模型上确定了联合效果的存在;克隆形成实验则从细胞水平验证了两药的联合作用效果。

实验表明,联合用药组能够显著增加 HCT116 细胞的凋亡水平,且 pro-Caspase-3 表达量下降以及 cleaved-PARP 表达量上升,这都表明联合用药组增加了 HCT116 细胞的凋亡率^[11]。细胞凋亡是细胞在受到外部刺激时,为维持内环境稳定,由基因控制的细胞自主的有序的死亡,是大多数抗肿瘤药物起效的作用方式。但因其对分生力较旺盛的正常细胞

也具有较强的杀伤力,而表现出一定的细胞毒性。Caspase 及 PARP 蛋白的活化则是凋亡启动的重要标志^[12]。

细胞衰老染色实验表明,联合用药组能够显著增加 HCT116 细胞的衰老水平。细胞衰老能够使细胞停止分裂并产生明显的表型变化,如核膜凹陷、染色质结构变化等^[13-18]。近几年来有研究表明,复制衰老与端粒损耗有关,而端粒损耗是导致染色体不稳定和促进肿瘤发生的重要原因,因此,衰老可以防止受损细胞无限制生长,进而表现出一定的抗肿瘤活性^[19-20]。

研究表明,抗肿瘤药物主要是通过杀死细胞和抑制细胞生长两种方式发挥作用的。其中,第一种方式在杀死肿瘤细胞的同时会对正常分生细胞产生严重的副作用,包括骨髓抑制、胃肠道毒性、脱发等^[21-23]。而生长抑制由于减轻了药物细胞毒效应引起的严重副作用,已经受到越来越多学者的关注^[24]。衰老作为一种体内固有的调节机体生命活动的作用方式,极有可能是通过抑制细胞生长来发挥抗肿瘤作用的。因此,MTA 与 CTD 两药联合通过诱导细胞凋亡和衰老两条途径来发挥作用,可以在降低 CTD 用药剂量的同时通过低毒性的方式来实现抗肿瘤功能,表现出了良好的联合作用效果。

综上所述,MTA 与 CTD 联合用药能够协同抑制 HCT116 细胞的生长增殖,并且这种联合作用效果极有可能是通过诱发细胞凋亡和衰老产生的,分子及动物水平的验证还有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 王振宁. 结直肠癌 TNM 分期的现状及发展方向[J]. 中华结直肠疾病电子杂志, 2015, 4(1):5-7.

[2] 沈琳. 结直肠癌治疗研究进展_2008 年美国临床肿瘤学会年会新进展要点[J]. 中国实用外科杂志, 2008, 28(12):1035-1036,1043.

[3] ZHANG G, XIE X, LIU T, et al. Effects of pemetrexed, gefitinib, and their combination on human colorectal cancer cells [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2013, 72 (4):767-775.

[4] ZHANG G Z, JIAO S C, MENG Z T. Pemetrexed plus cisplatin/carboplatin in previously treated locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer patients[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2010, 29:38.

[5] Dubey S, Schiller J H. Three emerging new drugs for NSCLC: pemetrexed, bortezomib, and cetuximab [J]. Oncologist, 2005, 10 (4):282-291.

- [6] Hazarika M, White R M, Johnson J R, et al. FDA drug approval summaries: pemetrexed (Alimta) [J]. *Oncologist*, 2004, 9 (5):482-488.
- [7] Latz J E, Chaudhary A, Ghosh A, et al. Population pharmacokinetic analysis of ten phase II clinical trials of pemetrexed in cancer patients [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2006, 57 (4):401-411.
- [8] Shih C, CHEN V J, Gossett L S, et al. LY231514, a pyrrolo[2,3-d] pyrimidine-based antifolate that inhibits multiple folate-requiring enzymes [J]. *Cancer Res*, 1997, 57 (6):1116-1123.
- [9] Hill T A, Stewart S G, Gordon C P, et al. Norcantharidin analogues: synthesis, anticancer activity and protein phosphatase 1 and 2A inhibition [J]. *Chem Med Chem*, 2008, 3 (12):1878-1892.
- [10] CHOU T C, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors [J]. *Adv Enzyme Regul*, 1984, 22:27-55.
- [11] 封艳艳, 马齐襄, 隋彤彤, 等. 斑蝥素对肝癌 HepG2 细胞增殖、凋亡的影响及其可能机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(15):112-117.
- [12] Eeva J, Nuutinen U, Ropponen A, et al. The involvement of mitochondria and the caspase-9 activation pathway in rituximab-induced apoptosis in FL cells [J]. *Apoptosis*, 2009, 14 (5):687-698.
- [13] Curran S D, Muellner A U, Schwartz L H. Imaging response assessment in oncology [J]. *Cancer Imaging*, 2006, 6:S126-S130.
- [14] Marcus C D, Ladam-Marcus V, Cucu C, et al. Imaging techniques to evaluate the response to treatment in oncology: current standards and perspectives [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2009, 72 (3):217-238.
- [15] Kelly C M, Power D G, Lichtman S M. Targeted therapy in older patients with solid tumors [J]. *J Clin Oncol*, 2014, 32 (24):2635-2646.
- [16] Druker B. Signal transduction inhibition: results from phase I clinical trials in chronic myeloid leukemia [J]. *Semin Hematol*, 2001, 38 (3 Suppl 8):9-14.
- [17] Brindle K. New approaches for imaging tumour responses to treatment [J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8 (2):94-107.
- [18] Alvarez R H, Valero V, Hortobagyi G N. Emerging targeted therapies for breast cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28 (20):3366-3379.
- [19] Bodnar A G, Ouellette M, Frolkis M, et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells [J]. *Science*, 1998, 279 (5349):349-352.
- [20] Hayflick L, Moorhead P S. The serial cultivation of human diploid cell strains [J]. *Exp Cell Res*, 1961, 25:585-621.
- [21] Serkova N J, Eckhardt S G. Metabolic imaging to assess treatment response to cytotoxic and cytostatic agents [J]. *Front Oncol*, 2016, 6 (3):1-9.
- [22] 范潇婷, 于睿鹏, 董瑞娟, 等. 斑蝥素及去甲斑蝥素对小鼠毒性靶器官的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(15):118-123.
- [23] 邓恺文, 封艳艳, 金琳, 等. 去甲斑蝥素对 12 类主要人类癌症细胞株生长状态的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(15):103-111.
- [24] Tol J, Koopman M, Cats A, et al. Chemotherapy, bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer [J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(6):563-572.

[责任编辑 张丰丰]