

氯化两面针碱对人卵巢癌紫杉醇耐药细胞株 A2780 Taxol 细胞耐药性的逆转作用

冯燕英, 刘华钢*, 梁燕, 张华君, 梁乔芳, 李俊威
(广西医科大学药学院, 南宁 530021)

[摘要] 目的:研究氯化两面针碱(nitidine chloride, NC)对人卵巢癌紫杉醇耐药细胞株 A2780 Taxol 细胞耐药性的逆转作用及机制。方法:氯化两面针碱干预 A2780 Taxol 后,应用 MTT 比色法检测多柔比星(adriamycin, ADM),依托泊苷(etoposide, VP-16),羟基喜树碱(hydroxycamptothecin, HCPT)对 A2780Taxol 细胞的抑制率;实时荧光定量 PCR 检测不同给药组对多药耐药基因(MDR1 mRNA)表达的影响;HE 染色法观察肿瘤细胞结构的改变;TUNEL 法分析其对细胞凋亡的影响。结果:耐药细胞 A2780 Taxol 对 ADM, VP-16, HCPT 的耐药倍数分别为 1.87, 1.07, 3.25;经氯化两面针碱干预后,降低了 A2780 Taxol 细胞对抗肿瘤药 ADM, VP-16, HCPT 的 IC₅₀ 值,可下降 A2780 Taxol 细胞的多药耐药(MDR1)基因的表达,HE 染色可见 NC 给药组改变了 A2780 Taxol 细胞的形态结构,TUNEL 染色凋亡细胞明显增多,凋亡指数为(58.03 ± 1.46)%。结论:氯化两面针碱能有效逆转 A2780 Taxol 多药耐药性,具有良好的抗肿瘤药物多药耐药逆转作用。

[关键词] 氯化两面针碱;多药耐药性;A2780 Taxol 细胞;逆转录

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)13-0095-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015130095

Reversion of Multi-drug Resistance by Nitidine Chloride on A2780 Taxol Cell FENG Yan-ying, LIU Hua-gang*, LIANG Yan, ZHANG Hua-jun, LIANG Qiao-fang, LI Jun-wei (School of Pharmacology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the reversal or effect of multi-drug resistance by nitidine chloride (NC) on A2780 Taxol cell. **Method:** The reversal efficacy of NC was determined by MTT assay. The expression of multidrug resistance 1 (MDR1) mRNA was assessed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The structural changes of A2780 Taxol cell were examined with hematoxylin and eosin staining (HE). The apoptosis of A2780 Taxol cell was detected by TUNEL assay. **Result:** The resistance fold of A2780 Taxol cell was 1.87, 1.07, 3.25 for adriamycin (ADM), etoposide (VP-16), hydroxycamptothecin (HCPT). The 50% inhibition concentration (IC₅₀) value of A2780 Taxol cell was reduced by NC (0.375, 0.75, 1.5 mg · L⁻¹) combined with ADM, VP-16 or HCPT, and NC could decrease the expression of MDR1-mRNA, change the structural of A2780 Taxol cell. The apoptosis index (AI) was (58.03 ± 1.46)% detected by TUNEL assay. **Conclusion:** Nitidine chloride can reverse the multidrug resistance of A2780 Taxol cell.

[Key words] nitidine chloride; multidrug resistance; A2780 Taxol cell; reversol

多药耐药(multi-drug resistance, MDR)是指肿瘤对一种药物具有耐药性的同时,对其他结构不同,作用靶点不同的抗肿瘤药物也具有耐药性。多药耐药性是导致抗感染药物治疗和肿瘤化疗失败的重要原因之一。因此,研究 MDR 产生的机制,寻求高

效、低毒、作用靶点广泛的多药耐药逆转剂和逆转措施,克服 MDR 现象已成为国内外的研究热点。氯化两面针碱(nitidine chloride, NC)是从广西特有的芸香科花椒属药用植物两面针 *Zanthoxylum nitidum* 的根中分离到的具有抗肿瘤活性的生物碱^[1]。本

[收稿日期] 20141224(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81260657)

[第一作者] 冯燕英,在读硕士,从事中药药理机制研究, Tel:18677160023, E-mail:812352196@qq.com

[通讯作者] *刘华钢,博士,教授,从事中药新剂型,新制剂及中药药理机制研究, E-mail:hgliu@263.net

课题组前期研究表明,氯化两面针碱具有抗肿瘤活性,可明显抑制 LEWIS 肺癌、人体鼻咽癌、肝癌、人口腔鳞癌 KB 细胞以及长春新碱耐药的口腔鳞癌耐药细胞 KBV200 的存活,可导致细胞周期 G₂/M 期阻滞,并诱导细胞凋亡^[2]。本实验通过研究氯化两面针碱对 A2780 Taxol 人卵巢癌紫杉醇耐药株细胞的逆转作用,为进一步推广应用提供研究基础和理论依据。

1 材料

1.1 细胞株 A2780 人卵巢癌细胞, A2780 Taxol 人卵巢癌紫杉醇耐药细胞购于上海通派生物科技有限公司,由本实验室传代培养,取对数生长期的细胞用于实验。

1.2 药物与试剂 氯化两面针(NC,中国食品药品检定研究院,批号 110848-20001,纯度 >98%),维拉帕米(VRP,上海禾丰制药有限公司,批号 121101),注射用盐酸多柔比星(ADM,深圳万乐药业有限公司,批号 1206E5),注射用硫酸长春新碱(VCR,浙江海正药业股份有限公司,批号 110501),依托泊苷(VP-16,齐鲁制药有限公司,批号 WBK1211014),注射用羟基喜树碱(HCPT,黄石李时珍药业集团武汉李时珍药业有限公司,批号 20120608),RPMI 1640 培养基(Thermo scientific 公司,批号 NZE1139),胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司,批号 140714),Trizol 试剂盒(批号 AK9506)cDNA 合成试剂盒(批号 AK2501),SYBR Premix Ex Taq™ II(批号 A1602A)均购于宝生物工程(大连)有限公司, TUNEL-细胞凋亡原位试剂盒(罗氏生物科技有限公司,批号 10279600)。

1.3 仪器 Thermo scientific 3111 型 CO₂ 培养箱(美国 Fomascientific Inc 公司),CX31 型倒置显微镜(Olympus 公司),Micro17R 型台式高效冷冻离心机(Thermo 公司),7300 型 Real Time PCR System(ABI 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 A2780 人卵巢癌细胞, A2780 Taxol 人卵巢癌紫杉醇耐药细胞置 37℃,饱和湿度,5% CO₂ 的培养箱中培养,定期观察,每周换液 3 次,传代 2 次,用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。多药耐药细胞培养液中含有 800 μg·L⁻¹ Taxol 以维持耐药性,检测前 2 周撤药。

2.2 细胞毒性实验

2.2.1 检测 A2780 Taxol 对 NC 的敏感性 将 NC 用二甲亚砜(DMSO)助溶,用基础培养基梯度稀

释,调整各浓度的 DMSO 含量一致^[3]。取指数生长期细胞多药耐药细胞,常规消化,离心,重悬细胞并调整至密度为 6 × 10⁴/mL,接种于 96 孔板,细胞贴壁后分别加入不同质量浓度 0.75, 1.5, 3, 6, 9 mg·L⁻¹ NC,每个浓度设 3 个复孔。以细胞培养基为空白对照孔,加溶剂组为阴性对照。48 h 后,采用 MTT 法检测吸光度(A),计算 NC 对 A2780 Taxol 增殖的抑制率,并确定抑制率 ≤ 10% 低毒剂量 NC 浓度,实验重复 3 次,取平均值为最终结果。

$$\text{抑制率} = 1 - (\text{实验组 } A / \text{对照组 } A) \times 100\%$$

2.2.2 检测 NC 逆转多药耐药细胞对化疗药的敏感性^[4] 实验分组如下:A. 亲本细胞组 A2780, B. 多药耐药细胞组, C. A2780 Taxol + 5 μmol·L⁻¹ VRP 组, D. A2780 Taxol + NC 组, VRP 为阳性对照^[5],取指数生长期细胞多药耐药细胞及亲本细胞,常规消化,离心,重悬细胞并调整至 6 × 10⁴/mL,接种于 96 孔板。细胞 12 h 贴壁后弃上清,分别加入 5 个不同浓度的 ADM, VCR, VP-16, HCPT,同时 C, D 组分别加不同浓度的 NC 或 VRP,设 3 个复孔。以细胞培养基为空白对照孔,加溶剂组为阴性对照。48 h 后,采用 MTT 法检测,计算半数抑制浓度(IC₅₀)及耐药倍数和逆转倍数,实验重复 3 次,取平均值为最终结果。

$$\text{耐药倍数} = \text{耐药细胞 IC}_{50} / \text{亲本细胞 IC}_{50} \text{ 及逆转倍数}$$

$$\text{逆转倍数} = \text{加逆转剂前 IC}_{50} / \text{加逆转剂后 IC}_{50}$$

2.3 检测 MDR1 mRNA 表达

2.3.1 样品的制备与引物合成 实验分组如下:A. 多药耐药细胞组 A2780 Taxol(空白组), B. 多药耐药细胞组 A2780 Taxol + DMSO 组, C. A2780 Taxol + 5 μmol·L⁻¹ VRP 组, D. A2780 Taxol + 1.5 mg·L⁻¹ NC 组, 48 h 后收集细胞,用 Trizol 提取总 RNA,用核酸检测仪测定 RNA 浓度,根据 RT-PCR 试剂盒说明书的方法逆转录成 cDNA。从 Gene Bank 查找 MDR1 以及内参 GADPH 基因的全长序列设计引物(表 1),并由宝生物工程(大连)有限公司合成。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 PCR primer sequences

基因	序列	Tm /℃	长度 /bp
GAPDH	FP:5'-GGATGCTGAAGAACAAGACG-3'	54.5	147
	RP:5'-GCTGAGGAAGGAGATGAAGAG-3'	55.7	
MDR1	FP:5'-TCACAAGCCCAAGACAGAAAAG-3'	57.9	150
	RP:5'-GAGCATGGATCGGAAAACC-3'	57.5	

2.3.2 Real-time PCR 检测 参照 SYBR Premix Ex Taq™ II 说明书进行操作,反应体系为 20 μL,内含 cDNA 60 ng,上下游引物各 0.8 μL,SYBR Green 10 μL,DEPC 水补足至 20 μL。条件优化后 PCR 反应程序:95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 5 s,60 °C 退火 31 s,40 个循环。制备目的基因与内参基因标准曲线。建立 PCR 产物的溶解曲线,扩增反应结束后继续从 60 °C 缓慢加热到 95 °C (每 0.5 °C 读板 1 次)。按以上条件,测定每个样品的 MDR1 和 GAPDH 的 C_t 值,每个样品均设复孔。采用相对定量方式表示各样品 MDR1 的 ΔC_t 值, $\Delta C_t = C_{t\text{目的基因}} - C_{t\text{内参基因}}$ 。再依据 $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t\text{处理组}} - \Delta C_{t\text{对照组}}$,计算 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。反应结束后,由电脑自动生成荧光扩增曲线,标准曲线以及溶解曲线。

2.4 观察肿瘤细胞结构的改变

2.4.1 样品制备 取指数生长期贴壁细胞多药耐药细胞及亲本细胞,胰酶消化,离心,调整细胞密度 $1 \times 10^5/\text{mL}$,滴加于盖玻片上(置于 6 孔板中),细胞 24 h 贴壁后弃上清,各组分别加入不同的药物浓度。48 h 后,取出细胞爬片,用 PBS 洗涤 3 次。

2.4.2 实验步骤 95% 乙醇固定 20 min,PBS 浸洗 2 次,每次 1 min,去离子水漂洗 3 min,苏木素染色 2 min,流水冲洗 1 min,1% 盐酸乙醇液分化 10 s,自来水浸泡返蓝 20 min,1% 伊红液染色 2 min^[6],自来水冲洗 15 min。75%,80%,90%,95%,100% 乙醇梯度洗脱各 1 min,二甲苯透明,中性树脂封片,镜检并照相。

2.5 TUNEL 法分析 NC 对细胞凋亡的影响 取对数生长期细胞,按细胞生长密度 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于 6 孔培养板中,24 h 贴壁后各组分别加入不同浓度的药物。培养 48 h 后,收集细胞,4% 中性甲醛室温中固定 10 min。在载破片上滴加 50 ~ 100 μL 细胞悬液并使之干燥^[7]。用 PBS 洗涤 2 次,每次 5 min。然后按照 TUNEL-细胞凋亡试剂盒说明进行染色。结果判断:凋亡的细胞核呈深浅不一的棕褐色,核膜、包膜完整。未凋亡的细胞核呈蓝色。每组选择 5 个以上高倍视野进行拍照,计算出凋亡细胞的百分率,即凋亡指数(apoptois index, AI)。

2.6 统计学处理 用 SPSS 16.0 统计软件包进行统计学分析,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞毒性实验

3.1.1 A2780 Taxol 对 NC 的敏感性 由表 2 结果

可知,A2780 Taxol 经 5 个不同质量浓度的 NC 处理 48 h 后,细胞生长受到不同程度的抑制,当 NC 的质量浓度 $\geq 3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对细胞的抑制率均 $> 10\%$,当 NC 的质量浓度 $\leq 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对细胞的抑制率均 $< 10\%$,因此,选用 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NC 进行逆转肿瘤细胞多药耐药的实验。

表 2 不同质量浓度的氯化两面针碱对 A2780 Taxol 细胞的抑制率 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 2 Cell-inhibition rate of A2780 Taxol treated with different concentration of NC ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	抑制率/%
对照	-	0
NC	0.75	3.57 ± 0.62
	1.5	7.75 ± 0.42
	3	11.01 ± 0.76
	6	24.53 ± 0.20
	9	52.45 ± 0.93

3.1.2 NC 干预后 A2780 Taxol 对化疗药的敏感性 耐药细胞 A2780 Taxol 对除了长春新碱外(耐药倍数为 0)的 3 种化疗药物的抗药性均高于敏感株 A2780 ($P < 0.05$),其中 A2780 Taxol 对 ADM,VP-16,HCPT 的耐药倍数分别为 1.87,1.07,3.25。表明实验用的 A2780 Taxol 是多药耐药细胞株,可作为多药耐药逆转的研究模型,见表 3。当用阳性药 VRP 和 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NC 作用于这株细胞时,3 种药物 ADM,VP-16,HCPT 均提高了 A2780 Taxol 的敏感性 ($P < 0.05$),见表 4。结果证明 NC 具有多药耐药逆转作用, $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NC 与阳性药 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ VRP 的作用相当,故实验选用 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NC 进行后续实验。

3.2 Real-time PCR 测定 MDR1 基因的表达水平 耐药细胞株 A2780 Taxol 即使加入 DMSO 作为溶剂溶解药物对细胞的 MDR1 基因表达的影响差异无统计学意义,但经过 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ VRP 和 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NC 处理后,MDR1 基因的表达均明显下降 ($P < 0.05, P < 0.01$),且经 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NC 处理后的 A2780 Taxol MDR1 基因表达比经 VRP 处理后的 A2780 Taxol MDR1 基因表达下降得更明显。内参基因 GAPDH 和目的基因 MDR1 PCR 扩增曲线平滑,均有明显的指数扩增区。见图 1。

3.3 细胞爬片形态观察 经 HE 染色,各组细胞均表现为核紫浆红。空白组核浆比增大,A2780 Taxol + DMSO 组细胞形态无明显改变,而 A2780 Taxol +

表 3 NC 处理后 A2780 Taxol 对各抗肿瘤药物的 IC₅₀ ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 3 IC₅₀ of different antitumor drug of A2780 Taxol treated with three low toxicity concentration of NC ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

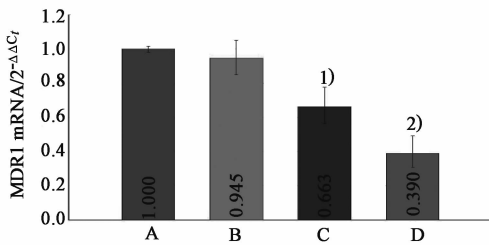
组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	IC ₅₀ /mg·L ⁻¹			
		ADM	VCR	VP-16	HCPT
A2780	-	44.47 ± 0.83	74.82 ± 0.73	85.34 ± 0.56	57.37 ± 0.12
A2780 Taxol + DMSO	-	76.88 ± 0.51 ²⁾	72.59 ± 0.48	89.95 ± 0.83 ¹⁾	155.08 ± 0.67 ²⁾
A2780 Taxol + VRP ⁴⁾	5	32.56 ± 0.89 ³⁾	-	29.58 ± 0.93 ³⁾	35.86 ± 0.84 ³⁾
A2780 Taxol + NC	0.375	75.85 ± 0.75	-	73.89 ± 0.92 ³⁾	132.40 ± 0.76 ³⁾
	0.75	57.27 ± 0.73 ³⁾	-	63.37 ± 0.57 ³⁾	82.64 ± 0.94 ³⁾
	1.5	27.18 ± 0.64 ³⁾	-	39.38 ± 0.82 ³⁾	48.76 ± 0.34 ³⁾

注:与 A2780 组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01; 与 A2780 Taxol + DMSO 组比较³⁾ P < 0.01; ⁴⁾ 浓度单位为 μmol·L⁻¹ (表 5 同)。

表 4 A2780 Taxol 的耐药倍数及在不同处理后的逆转倍数 (n = 9)

Table 4 Resistance fold of A2780 Taxol and reversal fold of A2780 Taxol in different treating group (n = 9)

药物	耐药 倍数	逆转倍数			
		VRP 5 μmol·L ⁻¹	NC 0.375 mg·L ⁻¹	NC 0.75 mg·L ⁻¹	NC 1.5 mg·L ⁻¹
ADM	1.87	2.36	1.01	1.34	2.83
VP-16	1.07	3.04	1.22	1.42	2.28
HCPT	3.25	3.65	1.04	1.88	3.18



A. A2780 Taxol; B. A2780 Taxol + DMSO; C. A2780 Taxol + 5 μmol·L⁻¹ VRP; D. A2780 Taxol + 1.5 mg·L⁻¹ NC (图 2, 3 同)。与 A2780 Taxol 组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01

图 1 不同处理组 A2780 Taxol 细胞 MDR1 基因的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 1 Expression of MDR1 in A2780 Taxol cell in different treating group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

5 μmol·L⁻¹ VRP 组和 A2780 Taxol + 1.5 mg·L⁻¹ NC 组细胞形态有明显改变,核浆比减小,胞浆膨大,核缩小。说明 1.5 mg·L⁻¹ 氯化两面针碱可以使人卵巢癌耐药细胞 A2780 Taxol 形态改变。见图 2。

3.4 对细胞凋亡的影响 与空白组相比, A2780 Taxol 耐药细胞加 DMSO 溶剂培养 24 h 后, TUNEL 法细胞阳性率很低, 差异无统计学意义。而 A2780 Taxol 用 5 μmol·L⁻¹ VRP 和 1.5 mg·L⁻¹ NC 处理后, 耐药细胞株 A2780 Taxol 的 TUNEL 细胞阳性表达率明显增高 (P < 0.01)。见图 3 和表 5。

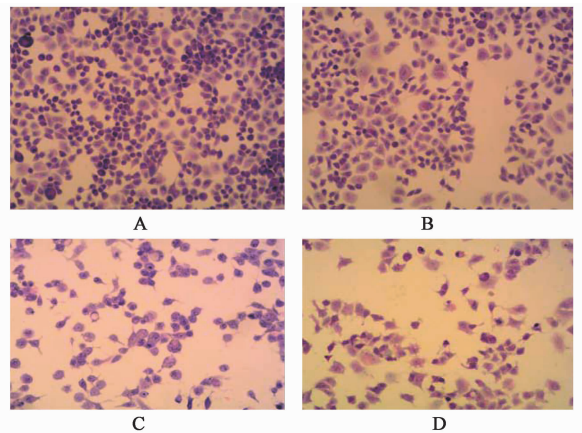


图 2 不同处理组对 A2780 Taxol 细胞形态的改变 (HE, ×20)
Fig. 2 Structural changes of A2780 Taxol in different treating group (HE, ×20)

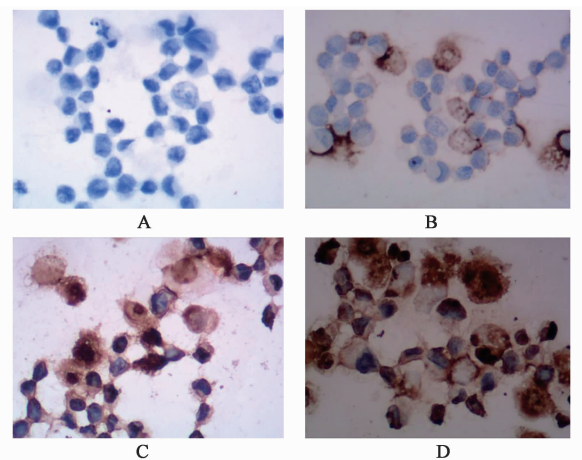


图 3 不同处理组对 A2780 Taxol 细胞凋亡的影响 (TUNEL, ×40)
Fig. 3 Effect of different treating group on apoptois index of A2780 Taxol cell (TUNEL, ×40)

4 讨论

卵巢癌细胞耐药是导致抗感染药物治疗和肿瘤化疗失败的重要原因之一。探讨产生耐药的机制并

表 5 不同处理组对 A2780 Taxol 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 5 Effect of different treating group on apoptois index of A2780 Taxol cell ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	凋亡率 /%
A2780 Taxol	-	0.00 ± 0.00
A2780 Taxol + DMSO	-	7.33 ± 1.71
A2780 Taxol + VRP ⁴⁾	5	46.60 ± 1.61 ³⁾
A2780 Taxol + NC	1.5	58.03 ± 1.46 ³⁾

积极的进行干预从而逆转耐药是研究肿瘤耐药的主要任务。目前研究肿瘤耐药机制主要是从 MDR1 基因表达的产物入手,探讨此类产物引起的耐药机制主要有 P-糖蛋白,细胞内还原型谷胱甘肽及谷胱甘肽转移酶,DNA 拓扑异构酶 I, II,多药耐药相关蛋白(MRP)和肺耐药蛋白(LRP)等^[8],其中耐药相关基因的表达异常是一个重要因素。P-gp 介导的 MDR 是一种三磷酸腺苷(ATP)依赖性转运排出泵,有与 ATP 结合的位点。当化疗药物进入细胞后,P-gp 与之结合,通过 ATP 供能将药物排除细胞外,ADM,VP-16,HCPT 等抗癌药诱导细胞 MDR1 表达是卵巢癌治疗失败的主要原因。通过抑制 MDR1 的功能,可以逆转肿瘤的耐药性。

本实验以 A2780 Taxol 人卵巢癌紫杉醇耐药细胞为研究对象,通过探讨氯化两面针碱是否也对 A2780 Taxol 细胞也具有抗癌活性。通过 MTT 法实验发现,小剂量氯化两面针碱可以提高 A2780 Taxol 细胞对抗肿瘤药物的敏感性,可初步认为氯化两面针碱对肿瘤多药耐药细胞具有逆转作用。本实验又从分子水平探讨 NC 的作用机制与耐药基因 MDR1 表达的关系,通过 Real-time PCR 测定 1.5 mg·L⁻¹ 氯化两面针碱作用于 A2780 Taxol 细胞能明显的下调 MDR1 基因的表达。后续又通过 HE 染色法也说明小剂量氯化两面针碱能使肿瘤多药耐药细胞 A2780 Taxol 的形态结构改变,进一步可认为氯化两面针碱对肿瘤多药耐药细胞具有逆转作用。为了探讨小剂量氯化两面针碱是否诱导 A2780 Taxol 耐药细胞凋亡的作用,笔者采用 TUNEL 技术法对凋亡细胞进行定量分析。结果表明,氯化两面针碱组细胞

的凋亡指数显著高于对照组,说明氯化两面针碱具有逆转肿瘤细胞多药耐药性的作用。

目前有文献报道^[9-10],NC 对多种肿瘤均有抑制作用,抗癌机制可能是多方面的,既有抑制 DNA 拓扑异构酶 I, II,阻止 DNA 复制,产生细胞毒作用;也有对 DNA 碱基对的嵌入作用,从而阻止 DNA 合成;还有分子中正电荷与生物大分子上负电荷的静电作用以及可能的化学反应,从而逆转多药耐药性。但究竟何种途径更为重要,有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 黄治勋,李志和. 氯化两面针抗肿瘤有效成分的研究[J]. 化学学报,1980,38(6):535-542.

[2] 王博龙,刘华钢,杨斌,等. 氯化两面针碱体外对口腔鳞癌多药耐药细胞 KBV200 的抗癌活性[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2007,2(6):512-515.

[3] 刘华钢,李丹妮,刘丽敏. 氯化两面针碱诱导人肝癌细胞 SMMC-7721 细胞凋亡及作用机制的研究[J]. 中成药,2009,31(8):1279-1281.

[4] 石小燕,蔡晓军,类建翔,等. PI-3K/Akt 抑制剂 LY294002 对卵巢癌细胞 A2780/Taxol 多药耐药性的逆转作用[J]. 癌症,2008,27(4):343-347.

[5] 曲正,侯培珍,曲伟,等. 川芎嗪联合维拉帕米对人胃癌耐药细胞 SGC7901/ADM 多药耐药的逆转作用研究[J]. 包头医学院学报,2005,21(4):337-338.

[6] 盛文杰,刘曙光,黄爱丽,等. 肺癌细胞 A549 和 H322 爬片巴氏及 HE 染色图像色度学定量分析[J]. 生物物理学报,2014,30(2):137-145.

[7] 郭晓红,刘立新. AnnexinV/PI 流式细胞分析法和 TUNEL 法检测肝细胞凋亡的对比研究[J]. 山西医科大学学报,2008,39(5):476-479.

[8] Hui Xu,Fan-zhen Hong,Su Li,et al. Short hairpin RNA-mediated MDR1 gene silencing increases apoptosis of human ovarian cancer cell line A2780/Taxol[J]. Chin J Cancer Res,2012,24(2):138-142.

[9] 刘丽敏,刘华钢. 氯化两面针碱的抗肝癌活性及对 DNA 拓扑异构酶的影响[J]. 中国药理学通报,2010,26(4):497-500.

[10] 欧贤红,廖柳凤,刘华钢,等. 氯化两面针碱对肝癌细胞增殖的抑制作用及机制探讨[J]. 山东医药,2011,35(51):1-2.

[责任编辑 聂淑琴]