

肠胃清对结肠癌肝转移裸鼠生存期及肿瘤组织铜转运相关蛋白表达的影响

张勇^{1,2}, 成玲玲¹, 许建华^{1,2*}, 李鳌¹, 赵璐¹, 彭维真¹,
孙珏^{1,2}, 张强^{1,2}, 朱晏伟^{1,2}, 范忠泽^{1,2}

(1. 上海中医药大学附属普陀医院, 上海 200062;
2. 上海中医药大学中西医结合肿瘤介入研究所, 上海 200062)

[摘要] **目的:**观察肠胃清对结肠癌肝转移裸小鼠生存期、肿瘤生长及对肿瘤组织铜转运相关蛋白表达的影响,探讨肠胃清对结直肠癌化疗增效的作用机制。**方法:**BALB/C裸小鼠,采用HCT116细胞建立裸小鼠结肠癌肝转移模型,随机分为模型组、肠胃清组、化疗组、肠胃清联合化疗组(联合组),每组20只,肠胃清组*ig*给予相应药物,*ip*生理盐水,化疗组*ip*奥沙利铂(L-OHP),5-氟尿嘧啶(5-FU),*ig*给予生理盐水,联合组*ig*给予肠胃清,*ip*L-OHP,5-FU,模型组*ig*和*ip*生理盐水,连续给药3周。观察肠胃清对荷瘤小鼠生存期及肿瘤生长的影响;利用免疫组化观察肿瘤组织人铜离子转运蛋白1(hCTR1),铜转运蛋白 α 链(ATP7A)和P型铜转运ATP酶(ATP7B),多药耐药相关蛋白2(MRP2),谷胱甘肽S-转移酶- π (GST- π)蛋白表达的影响;采用TUNEL法观察移植瘤组织细胞凋亡率。**结果:**与模型组比较,肠胃清组、化疗组、联合组抑瘤率分别为45.33%,70.51%,72.07%,以联合组明显($P < 0.01$);肠胃清组、化疗组、联合组裸小鼠生存时间均长于模型组($P < 0.05$);肠胃清组、联合组肿瘤组织中hCTR1的表达阳性率均高于模型组和化疗组($P < 0.05$);肠胃清组、联合组ATP7A,ATP7B和GST- π 的表达阳性率均低于模型组和化疗组($P < 0.05$);肠胃清组、联合组的MRP2表达阳性率低于模型组($P < 0.05$);联合组凋亡指数高于化疗组和模型组($P < 0.01$)。**结论:**肠胃清能上调肝转移瘤组织hCTR1的表达,下调ATP7A和ATP7B蛋白表达,降低GST- π 和MRP2的表达,并有增加肿瘤组织内铂药物含量的趋势,同时能诱导细胞凋亡,增加肿瘤细胞凋亡率,从而提高化疗敏感性。

[关键词] 肠胃清; 结直肠癌; 生存期; 铜转运蛋白; 细胞凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)15-0092-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015150092

Effect of Changweiqing on Survival Duration and Copper-transporting Tumor Tissues-related Protein Expression of Nude Mice in Colon Carcinoma Hepatic Metastasis Model ZHANG Yong^{1,2}, CHENG Lin-lin¹, XU Jian-hua^{1,2*}, LI Ao¹, ZHAO Lu¹, PENG Wei-zhen¹, SUN Jue^{1,2}, ZHANG Qiang^{1,2}, ZHU Yan-wei^{1,2}, FAN Zhong-ze^{1,2} (1. *Affiliated Putuo Hospital to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shanghai 200062, China*; 2. *Tumor Intervention Institute of Integrated TCM and Western Medicine, Shanghai University of TCM, Shanghai 200062, China*)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Changweiqing on survival duration, tumor growth and copper-transporting tumor tissues-related protein expression of nude mice in colon carcinoma liver metastasis model, in order to discuss the synergistic mechanism of Changweiqing on the chemotherapy for colorectal cancers. **Method:** BALB/C nude mice were selected to establish the nude mice colorectal cancer hepatic metastasis model and randomly divided into the model group, the Changweiqing group, the chemotherapy group and the

[收稿日期] 20140806(011)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81073105,81273733);上海市卫生局面上项目(20114296);上海市普陀区科技创新重点项目(2012B154)

[第一作者] 张勇,硕士,副主任医师,从事中医药逆转肿瘤化疗耐药及防治术后转移工作, Tel:021-22233222, E-mail: zhangyong75@msn.com

[通讯作者] *许建华,博士,教授,主任医师,博士生导师,从事中医药治疗恶性肿瘤的临床及实验研究, Tel:021-22233222, E-mail: xujianhua50@126.com

Changweiqing plus chemotherapy (combination) group, with 20 mice in each group. The Changweiqing group was orally administered with corresponding drugs and intraperitoneally injected with normal saline. The chemotherapy group was intraperitoneally injected with oxaliplatin (L-OHP) and 5-fluorouracil (5-FU) and orally administered with normal saline. The combination group was orally administered with Changweiqing and intraperitoneally injected with L-OHP and 5-FU; The model group was orally administered and intraperitoneally injected with normal saline. All group were treated for three weeks. The effect of the Changweiqing on survival duration and tumor growth of colorectal cancer hepatic metastasis in nude mice was observed. Human copper transporter 1 (hCTR1), ATPase Cu^{2+} transporting alpha polypeptide (ATP7A), copper transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B), multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) and glutathione-S-transferase- π (GST- π) protein expressions in tumor tissue were detected by the immunohistochemical method. The apoptosis rate of transplanted tumor tissues was observed by TUNEL method. **Result:** The Changweiqing group, the chemotherapy group and the Combination group revealed the tumor inhibition rate of 45.33%, 70.51%, 72.07%, particularly the Combination group ($P < 0.01$). Those group showed a longer nude mice survival time compared with the control group ($P < 0.05$). The Changweiqing group and the Combination group showed higher hCTR1 but lower ATP7A, ATP7B, MRP2, GST- π protein expressions in nude mouse tumors than the model group and the chemotherapy group ($P < 0.05$). The Combination group displayed a higher apoptosis index than the chemotherapy group and the model group ($P < 0.01$). **Conclusion:** The Changweiqing group can up-regulate the expression of hCTR1 in liver metastases tumor tissues, down-regulate ATP7A and ATP7B protein expressions, reduce GST- π and MRP2 expressions, increase platinum content in tumor tissues, induce apoptosis and increase the apoptosis rate, so as to enhance the chemosensitivity.

[**Key words**] Changweiqing; colorectal cancer; survival duration; copper transport protein; apoptosis

结、直肠癌是常见的恶性肿瘤之一,在我国位居恶性肿瘤死亡率的第 5 位,近年来国内结、直肠癌发病率呈上升趋势^[1]。约 25% 的患者诊断肠癌时已有肝转移,另有 25% 的患者术后出现肝转移^[2]。化疗是结肠癌肝转移综合治疗中的重要手段之一,含奥沙利铂的 FOLFOX 系列方案被 NCCN 指南推荐为晚期结、直肠癌患者的一线治疗方案,但是化疗耐药影响了其疗效的进一步提高^[3-4]。因此,寻找低毒、有效的化疗增敏药物具有重要意义。

肿瘤细胞内药物蓄积水平降低是耐药最基本的机制^[5]。研究表明细胞内铂浓度与细胞质膜上人铜转运蛋白 1 (hCTR1),铜转运蛋白 α 链 (ATP7A) 和 P 型铜转运 ATP 酶 (ATP7B) 等转运蛋白有关^[6]。笔者以往研究结果显示,肠胃清复方肠胃清对肠癌细胞顺铂耐药的逆转指数达到 13.02^[7],临床研究发现肠胃清对晚期结直肠癌含奥沙利铂的 FOLFOX4 方案化疗有增效作用^[8],并在实验研究中进一步证实肠胃清能够增强奥沙利铂抑制结肠癌裸鼠原位模型中移植瘤生长的作用,并提高肿瘤组织中 hCTR1 蛋白表达,降低 ATP7A/ATP7B 蛋白表达^[9-10]。本研究通过建立人结肠癌裸鼠肝转移模型,研究肠胃清对结肠癌肝转移模型裸小鼠生存期、

肿瘤生长的影响,并探讨其对移植瘤组织铜转运相关蛋白表达的影响。

1 材料

1.1 动物及细胞株 BALB/C 裸小鼠,4~6 周龄,体重(20±2)g,雄性。购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司,动物合格证号 SCXK(沪)2008-0016,饲养于本院动物房 SPF 级实验室。人结肠癌细胞株 HCT116,由本院肿瘤实验室提供。

1.2 药物及试剂 肠胃清浸膏粉:黄芪,党参,白术,猪苓,薏苡仁,八月札,野葡萄藤,红藤等,由上海中医药大学水提制备成浸膏粉,每克含生药量为 8.8g。奥沙利铂(L-OHP,江苏恒瑞医药股份有限公司,批号 20110337),5-氟尿嘧啶(5-FU,上海旭东普药业有限公司,批号 FA120912),人铜离子转运蛋白 1(hCTR1)抗体(美国 Genetex 公司,批号 G131022),ATP7A 抗体(美国 Abcam 公司,批号 AB125066),ATP7B 抗体(美国 Epitomics 公司,批号 E149055),MRP2 抗体(美国 Abcam 公司,批号 AB139021),GST- π 抗体(美国 CST 公司,批号 20131022)。

1.3 仪器 Cell240 型 CO₂ 恒温培养箱(德国贺利氏公司),XD-101 型倒置光学显微镜(南京江南光电股份有限公司)。

2 方法

2.1 结肠癌肝转移模型 取对数生长期 HCT116 细胞,消化后制成密度为 1×10^7 个/mL 的细胞悬液,按 2×10^6 个/0.2 mL 的细胞数量接种到裸小鼠右前肢的腋部皮下。经过 18 ~ 21 d,待皮下肿瘤生长至直径约 1 ~ 1.2 cm 左右,选择肿瘤生长旺盛且无破溃的荷瘤鼠,作为供瘤鼠。将剥离的移植瘤块,去除坏死组织和纤维组织。取新鲜组织,将瘤体剪碎至 1 mm³ 大小的组织块。裸小鼠用戊巴比妥钠行腹腔注射麻醉后,取剑突下正中切口,长约 1 cm,逐层入腹,显露肝左叶和中叶,用眼科弯镊划破肝脏浆膜,将瘤块接种于切口内,滴一小滴医用胶(OB胶)于切口,待 10 s 左右医用胶凝固并确认无出血关腹。

2.2 分组和给药 裸小鼠接种移植瘤 4 周后,腹部肝脏部位 B 超下显示肿瘤直径为 1 cm 左右后,根据裸小鼠瘤体体积和体重随机分为 4 组:模型组、化疗组、肠胃清组、联合组,每组 20 只。模型组:ip 蒸馏水,2 次/周,生理盐水 ig,0.2 mL/次,1 次/日,周一至周五;化疗组:ip L-OHP,5-FU [5-FU ($15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,第 8 ~ 12 天和 15 ~ 19 天)和 L-OHP ($2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,第 8 天和第 15 天)];生理盐水 ig 同上;肠胃清组:肠胃清 ig 0.2 mL/次,5 次/周;ip 蒸馏水,2 次/周。联合组:ip L-OHP,5-FU 同化疗组;肠胃清给药同肠胃清组。连续给药 3 周。肠胃清 ig 0.2 mL 含 0.068 25 g 浸膏粉。

2.3 荷瘤裸小鼠的体重、瘤重及瘤重抑制率 每组随机选取 10 只裸小鼠观察裸小鼠的体重、瘤重及瘤重抑制率。体重每周测定 2 次,以体重减轻反映治疗的毒副作用。体重减轻的计算公式:(开始体重 - 最轻体重)/开始体重 $\times 100\%$ 。连续给药 3 周,停止给药后继续观察 1 周,处死后迅速剥离瘤体,称重,计算各组平均瘤重及瘤重抑制率。

$$\text{瘤重抑制率} = (\text{模型组平均瘤重} - \text{治疗组平均瘤重}) / \text{模型组平均瘤重} \times 100\%$$

2.4 荷瘤裸小鼠的生存期 从给药第 1 天开始观察裸小鼠生存期,连续给药 3 周,直至末次治疗后,继续观察裸小鼠生存期,直至裸小鼠死亡。

$$\text{生命延长率} = (\text{实验组平均生存时间} / \text{模型组平均生存时间} - 1) \times 100\%$$

2.5 免疫组化 完整剥离肿瘤组织,切成 0.5 cm \times 0.5 cm \times 0.5 cm 的组织块,经 10% 福尔马林固定 24 h 后进行脱水、石蜡包埋,4 μm 厚切片,HE 染色,光镜下定位器定位后,用内径 2 mm 取样针从供体蜡块中取样,每个蜡块取样 1 个,植入受体蜡块中,二次包埋后,制成组织芯片。柠檬酸盐缓冲液高

压热修复,EnVision 二步法染色,DAB 显色,苏木素复染。用已知阳性片作阳性对照,PBS 代替一抗作阴性对照。每个微阵点任意选取 3 个 200 倍视野拍照,光学显微镜计数,取其平均值。

2.6 TUNEL 凋亡检测 制作石蜡切片,脱蜡、水合,加 TUNEL 反应液,加 converter-POD,与底物 DAB 反应显色,光学显微镜计数并拍照。细胞核中有棕色颗粒者(以 DAB 为底物时)为阳性细胞,在显微镜 $\times 200$ 下计数,每张切片选取 3 个视野计算凋亡指数(AI)。

$$\text{AI} = \text{阳性细胞数} / \text{总细胞数} \times 100\%$$

2.7 原子分光光度法检测细胞内铂(Pt)药物含量 采用各组移植瘤组织进行肿瘤细胞原代培养,将各组处于对数生长期的细胞稀释至 1×10^5 个/mL,接种于 10 cm 平皿中,于 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 培养箱中培养 4 ~ 12 h 待贴壁至 60%。分别加入 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ L-OHP 的培养液,于 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 培养箱中培养 48 h。采用细胞裂解液 1% Triton X-100 充分裂解细胞,混匀后用于胞内 Pt 含量测定。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 15.0 软件进行统计学分析,各组数据指标用 $\bar{x} \pm s$ 表示,方差齐性检验后,采用单因素多样本均数比较,均数间两两比较采用 SNK-q 检验,方差不齐资料采用近似 F 检验 Welch 或 Brown-forsythe 法,并且各组间比较采用 Dunnett's T3 方法进行统计学检验,Kaplan-Meier 法统计生存期,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对裸小鼠体重的影响 治疗前各组裸小鼠的体重无明显差异,治疗后各组与本组治疗前相比,体重均有增加趋势,但以肠胃清联合化疗组增加最为明显,但治疗后各个组之间体重差异无统计学差异。

3.2 对瘤重及瘤重抑制率的影响 治疗后继续观察 1 周,肠胃清组、化疗组、联合组的瘤重均小于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$),联合组的瘤重抑制率达到 72.07%。见表 1。

表 1 肠胃清对 HCT116 移植瘤裸鼠瘤重、抑瘤率的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1 Effects of Changweiqing on tumor weight and tumor inhibition rate of HCT116 transplanted tumor in nude mouse ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	瘤重/g	瘤重抑制率/%
模型	-	1.41 \pm 0.49	-
肠胃清	0.341 25 ²⁾	0.77 \pm 0.59 ¹⁾	45.33
化疗	15 + 2 ³⁾	0.42 \pm 0.11 ¹⁾	70.51
联合	0.341 25 + 15 + 2	0.40 \pm 0.13 ¹⁾	72.07

注:与治疗前本组比较¹⁾ $P < 0.05$; ²⁾ 肠胃清单位为 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; ³⁾ 化疗组单位为 " $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ " (表 2 ~ 5 同)。

3.3 对裸小鼠生存期、生命延长率的影响 治疗后肠胃清组、化疗组、联合组生存时间与模型组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 联合组的生命延长率达到 91%。见表 2。

表 2 生存时间及生命延长率统计 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 2 Effects of Changweiqing on survival time of HCT116 transplanted tumor in nude mouse ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量	生存时间/d	生命延长率/%
模型	-	43.31 ± 3.29	-
肠胃清	0.341 25 ²⁾	58.95 ± 6.77	36
化疗	15 + 2 ³⁾	68.90 ± 7.61 ²⁾	59
联合	0.341 25 + 15 + 2	82.83 ± 2.08 ¹⁾	91

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$;与肠胃清组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

表 3 肠胃清对 HCT116 移植瘤裸鼠肿瘤组织中铜转运相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effects of Changweiqing on positive rate of copper transportation related protein expression of HCT116 transplanted tumor tissue in nude mouse ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	hCTR1/%	ATP7A/%	ATP7B/%	MRP2/%	GST- π /%
模型	-	49.38 ± 28.96	94.38 ± 1.77	94.38 ± 1.77	92.50 ± 2.67	90.00 ± 10.35
肠胃清	0.341 25 ³⁾	74.00 ± 26.12 ^{1,2)}	60.00 ± 24.74 ^{1,2)}	68.00 ± 24.74 ^{1,2)}	65.50 ± 27.23 ¹⁾	39.00 ± 13.70 ^{1,2)}
化疗	15 + 2 ⁴⁾	52.22 ± 37.26	91.67 ± 10.00	91.67 ± 10.00	74.44 ± 12.36 ¹⁾	75.11 ± 14.79 ¹⁾
联合	0.341 25 + 15 + 2	80.00 ± 22.14 ^{1,2)}	61.67 ± 36.83 ^{1,2)}	61.67 ± 36.83 ^{1,2)}	68.33 ± 14.72 ¹⁾	40.83 ± 16.86 ^{1,2)}

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$;与化疗组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 4 同)。

表 4 肠胃清对 HCT116 移植瘤裸鼠肿瘤组织细胞 AI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effects of Changweiqing on apoptotic index of HCT116 transplanted tumor tissue in nude mouse ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	AI/%
模型	-	10.00 ± 9.26
肠胃清	0.341 25 ³⁾	22.50 ± 9.20 ¹⁾
化疗	15 + 2 ⁴⁾	18.33 ± 11.18 ¹⁾
联合	0.341 25 + 15 + 2	30.00 ± 6.32 ^{1,2)}

3.6 对肿瘤组织细胞内铂类药物含量的影响 原子分光光度法检测结果显示,模型组和肠胃清组 6 个样本的 Pt 含量均 $< 0.50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,为机器无法检出信号值。化疗组有 1 个样品 Pt 含量 $> 0.50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,而联合组有 3 个样品都可测出铂含量,分别为 0.72, 0.85, 2.0 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,说明联合组肿瘤组织细胞内铂含量较高。

4 讨论

结、直肠癌肝转移是影响结、直肠癌预后的重要因素,目前提倡综合治疗,化疗是综合治疗中的重要方法^[11]。铂类药物是最有效的抗癌药物之一,广泛应用在多种人类恶性肿瘤,其中奥沙利铂联合 5-氟

3.4 对铜转运相关蛋白表达的影响 治疗后,肠胃清组、联合组肿瘤组织中 hCTR1 的表达阳性率均高于模型组和化疗组 ($P < 0.05$);肠胃清组、联合组 ATP7A, ATP7B 和 GST- π 的表达阳性率均低于模型组和化疗组 ($P < 0.05$);肠胃清组、联合组的 MRP2 表达阳性率低于模型组 ($P < 0.05$),其中肠胃清组、联合组 MRP2 表达阳性率也低于化疗组,但差异无统计学意义。见表 3。

3.5 对肿瘤组织细胞凋亡指数的影响 与模型组相比,肠胃清组、化疗组、联合组凋亡指数均高于模型组,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),联合组凋亡指数高于化疗组,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 4。

尿嘧啶 (FOLFOX 方案) 是治疗结直肠癌的一线方案,研究认为 FOLFOX 方案可使 60% 初诊无法手术的患者肿瘤缩小^[12]。

肿瘤多药耐药是临床化疗失败的主要原因之一^[13],Pt 类药物与铜一样主要通过铜转运蛋白 hCTR1 的运输进入细胞;ATP7A/ATP7B 为 Pt 的输出泵,定位于细胞高尔基体上,它将胞浆中的 Pt 转运到反面高尔基网状结构,在此 Pt 被转移到血浆铜蓝蛋白等铜依赖性酶上,然后通过囊泡分泌途径排出细胞外^[14]。有研究发现,hCTR1 可调节卵巢癌细胞顺铂的摄入,hCTR1 高表达者细胞内顺铂浓度高^[15];本研究中,联合组肿瘤中 hCTR1 的表达阳性率均高于模型组和化疗组。ATP7B 高表达与接受奥沙利铂化疗的结直肠癌患者临床不良预后相关^[16]。本研究中,肠胃清联合奥沙利铂和 5-氟尿嘧啶治疗结肠癌裸鼠肝转移,肿瘤组织中 ATP7A, ATP7B 的表达均低于单独化疗组,表明肠胃清能下调肿瘤细胞中 ATP7A, ATP7B 的表达。Li W H 等^[17]发现抑制 MRP2 基因的转录可增强肝癌细胞对卡铂的化疗敏感性。本研究中,联合组肿瘤组织中 GST- π 和 MRP2 的表达阳性率也均低于化疗组。

笔者前期体外研究发现,肠胃清能通过上调hCTR1蛋白的表达,下调ATP7A,ATP7B蛋白的表达,增加细胞内铂类药物含量^[18];肠胃清药物血清能逆转人结肠癌多药耐药细胞HCT8/V的抗药性^[19],并能逆转耐奥沙利铂细胞株HCT116/L-OHP对奥沙利铂的耐药,诱导HCT116/L-OHP凋亡^[20]。

综上所述,肠胃清通过上调hCTR1的表达,降低ATP7A,ATP7B,GST- π 和MRP2的蛋白表达,促进细胞摄入奥沙利铂并抑制其排出细胞,从而增加细胞内铂类药物含量,最后达到逆转奥沙利铂耐药,诱导癌细胞凋亡,增加裸小鼠结肠癌肝转移模型化疗敏感性的目的。这些结果与笔者前期在肠癌原位移植瘤模型的结果相一致。此研究进一步表明肠胃清不仅能提高结肠原位移植肿瘤组织对奥沙利铂的敏感性,也能增强肝转移瘤对奥沙利铂化疗的敏感性。此项研究为进一步探讨肠胃清逆转铂类化疗耐药的分子机制以及肠胃清联合化疗治疗结肠癌肝转移提供实验依据。

[参考文献]

[1] 周燕荣. 恶性肿瘤死亡流行趋势与控制[J]. 中国肿瘤, 2011, 20(4): 256-258.
[2] Jemal A, Siegel R, Siegel E, et al. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2007, 57(1): 43-66.
[3] Andre T, Tournigand C, Achille E, et al. Adjuvant treatment of colon cancer MOSAIC study main results [J]. Bull Cancer, 2006, 93(1): s5-9.
[4] Mishima M, Samimi G, Kondo A, et al. The cellular pharmacology of oxaliplatin resistance [J]. Eur J Cancer, 2002, 38: 1405-1412.
[5] Holzer A K, Manorek G H, Howell S B. Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin [J]. Mol Pharmacol, 2006, 70(4): 1390-1394.
[6] Kalayda G V, Wagner C H, Buss I, et al. Altered localisation of the copper efflux transporters ATP7A and ATP7B associated with cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells [J]. BMC Cancer, 2008, 8(1): 175.
[7] 邓皖利, 许建华, 李长龙, 等. 肠胃清对人结直肠癌耐长春新碱细胞株 HCT8/V 的逆转作用[J]. 肿瘤, 2008, 28(9): 755-757.
[8] 张勇, 许建华, 孙珏, 等. 健脾解毒方联合 FOLFOX4 方案治疗晚期结直肠癌临床研究[J]. 环球中医药,

2010, 3(2): 117-120.
[9] 张勇, 许建华, 范忠泽, 等. 健脾解毒方对奥沙利铂抑制人结肠癌裸鼠原位移植瘤生长的增效作用[J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(4): 742-745.
[10] 张勇, 许建华, 范忠泽, 等. 健脾解毒方对人结肠癌裸鼠原位移植瘤铂类耐药相关铜转运蛋白 ATP7A ATP7B 表达的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(5): 943-946.
[11] 黄忠光, 蒋绍香. 结肠癌肝转移的诊断与治疗新进展 [J]. 医学综述, 2013, 19(10): 1769-1771.
[12] Alberts S R, Horvath W L, Sternfeld W C. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin for patients with unresectable liver-only metastases from colorectal cancer: a north central cancer treatment group phase II study [J]. J Clin Oncol, 2005, 23(36): 9243-9249.
[13] 张芳, 徐春蕾, 邱郑. 肠胃清逆转肿瘤细胞多药耐药研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(10): 342-348.
[14] Rabik C A, Maryon E B, Kasza K, et al. Role of copper transporters in resistance to platinating agents [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2009, 64(1): 133-142.
[15] Holzer A K, Samimi G, Katano K, et al. The copper influx transporter human copper transport protein 1 regulates the uptake of cisplatin in human ovarian carcinoma cells [J]. Mol Pharmacol, 2004, 66(4): 817-823.
[16] Martinez-Balibrea E, Martínez-Cardús A, Musulén E, et al. Increased levels of copper efflux transporter ATP7B are associated with poor outcome in colorectal cancer patients receiving oxaliplatin-based chemotherapy [J]. Int J Cancer, 2009, 124(12): 2905-2910.
[17] Li W H, Cui Y, Zhu J R. Methylated oligonucleotide inhibiting expression of human MRP2 and reversing multidrug resistance in hepatocellular carcinoma cell HepG2 [J]. Ai Zheng, 2004, 23(8): 900-904.
[18] 张勇, 孙晓文, 许建华, 等. 肠胃清对结肠癌细胞草酸铂药代动力学的影响[J]. 中西医结合学报, 2012, 10(8): 901-910.
[19] 隋华, 靳宝辉, 殷佩浩, 等. 健脾解毒方对人结肠癌多药耐药细胞的逆转作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(9): 196-200.
[20] 余文燕, 孙珏, 许建华, 等. 肠胃清药物血清协同奥沙利铂对人结肠癌耐药细胞增殖及凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(10): 182-186.

[责任编辑 周冰冰]