淫羊藿素联合阿霉素对人骨肉瘤 MG-63 细胞抑制作用的体外研究

林思文[1,2] 李雪芹[3] 刘素云[1] 施剑明[1,2] 徐浚怀[1,2] 毛龙火[2] 殷 明[1]

摘要 **目的** 探讨体外淫羊藿素联合阿霉素对人骨肉瘤 MG-63 细胞的抑制作用及分子机制。**方法** 设置对照组及不同浓度梯度的淫羊藿素组(10、20、40、80、160 μmol/L)、阿霉素组(1、2、4 、8、16 μg/mL)、联合组(淫羊藿素 + 阿霉素:20 μmol/L + 1 μg/mL、20 μmol/L + 2 μg/mL、20 μmol/L + 4 μg/mL、40 mol/L + 1 μg/mL、40 μmol/L + 2 μg/mL、40 μmol/L + 4 μg/mL、80 μmol/L + 1 μg/mL、80 μmol/L + 2 μg/mL、80 μmol/L +4 μg/mL),分别培养骨肉瘤 MG-63 细胞用倒置相差显微镜观察各组药物作用 24、48 h 后细胞形态;CCK-8 法测定各组的细胞增殖抑制率并计算半数抑制浓度;Annexin Ⅴ-FITC/PI 双染料流式细胞分析技术测定各组的细胞凋亡率;RT-PCR 检测 bcl-2、caspase-3 及 p21 表达。**结果** 淫羊藿素及阿霉素可明显抑制 MG-63 细胞增殖,随着淫羊藿素的浓度从 10 μmol/L 逐渐增加至 160 μmol/L,细胞增殖抑制率也随之从(9.67 ±3.62)%逐渐增加至(89.18 ±9.66)%,二者的半数抑制浓度分别为:46.93 μmol/L、3.87 μg/mL;淫羊藿素与阿霉素可致细胞早期及晚期凋亡,使 bcl-2 基因表达下调、caspase-3、p21 基因表达上调($P < 0.05$);以上改变联合组较淫羊藿素组及阿霉素组更明显($P < 0.05$)。**结论** 淫羊藿素联合阿霉素对抑制人骨肉瘤 MG-63 细胞增殖具有协同或相加效应,其作用机制可能与调控 bcl-2、caspase-3 及 p21 基因有关。

关键词 淫羊藿素;阿霉素;骨肉瘤 MG-63 细胞

Inhibition of Combination of Icaritin and Doxorubicin on Human Osteosarcoma MG-63 Cells *in vitro*

LIN Si-wen[1,2], LI Xue-qin[3], LIU Su-yun[1], SHI Jian-ming[1,2], XU Jun-huai[1,2], MAO Long-huo[2], and YIN Ming[1] *1 Department of Orthopaedics, Second Affiliated Hospital, Nanchang University, Nanchang (330006); 2 Medical School, Graduate School, Nanchang University, Nanchang (330006); 3 Basic Medical College, Jiujiang College, Jiangxi (332000)*

ABSTRACT Objective To explore the inhibition and molecular mechanism of icaritin (ICT) combined doxorubicin (DOX) on human osteosarcoma MG-63 cells *in vitro*. Methods The control group, ICT groups (10, 20, 40, 80, and 160 μmol/L), DOX groups (1, 2, 4, 8, and 16 μg/mL), and combination groups (20 μmol/L ICT +1 μg/mL DOX, 20 μmol/L ICT +2 μg/mL DOX, 20 μmol/L ICT +4 μg/mL DOX, 40 μmol/L ICT +1 μg/mL DOX, 40 μmol/L ICT +2 μg/mL DOX, 40 μmol/L ICT +4 μg/mL DOX, 80 μmol/L ICT +1 μg/mL DOX, 80 μmol/L ICT +2 μg/mL DOX, 80 μmol/L ICT +4 μg/mL DOX)were set up. Human osteosarcoma MG-63 cells were respectively cultured and their effects on morphological changes were observed using inverted phase contrast microscope after 24- and 48-h intervention. The cell proliferation inhibition rate of each group was determined using CCK-8, and IC50 calculated. The MG-63 apoptosis rate was detected using Annexin Ⅴ-FITC/PI double dye flow cytometry. Expression levels of bcl-2, caspase-3, and p21 were detected using RT-PCR. Results ICT and DOX could obviously inhibit the proliferation of MG-63 cell. Along with ICT concentration increasing from 10 μmol/L to 160 μmol/L, the cell proliferation inhibition rate also increased gradually from 9.67% ±3.62% to 89.18% ±9.66%. The IC50 was 46.93 μmol/L and 3.87 μg/mL respectively. ICT and DOX could cause either early or late stage apoptosis, down-regulate Bcl-2 gene expression, and up-regulate gene expressions of Caspase-3 and p21 respectively ($P < 0.05$). Aforesaid changes were more obviously

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81160226)

作者单位:1.南昌大学第二附属医院骨一科(南昌 330006);2.南昌大学研究生院医学部(南昌 330006);3.九江学院基础医学院(江西 332000)
通讯作者:殷 明,Tel:13970927608,E-mail:yinming0791@aliyun.com

DOI: 10.7661/CJIM.2016.06.0729

seen in combination groups than in ICT groups and DOX groups ($P < 0.05$). Conclusion　ICT combined DOX had additive or synergistic inhibition effect for the proliferation of osteosarcoma MG-63 cells, which might be related with regulating gene expressions of bcl-2, caspase-3, and p21.

KEYWORDS　icaritin; doxorubicin; osteosarcoma MG-63 cell

骨肉瘤是儿童和青少年最常见的原发性恶性的骨肿瘤,目前临床治疗骨肉瘤以手术为主,辅之以化学及放射治疗[1]。淫羊藿(*Epimedii folium*)为小檗科植物淫羊藿(*Epimedium brevicornu* Maxim.)、箭叶淫羊藿(*Epimedium sagittatum* Maxim.)、柔毛淫羊藿(*Epimedium pubescens* Maxim.)或朝鲜淫羊藿(*Epimedium koreanum* Nakai.)的干燥叶,具有补肾阳、强筋骨、祛风湿等作用。淫羊藿的有效成分为黄酮类化合物,淫羊藿素(Icaritin,ICT)为淫羊藿提取的黄酮单体淫羊藿苷的衍生物。ICT 分子式 $C_{21}H_{20}O_6$,分子量 386.4,研究发现,其对乳腺癌、前列腺癌、肝癌和肺癌等多种肿瘤细胞有抑制增殖和诱导调亡的作用[2-5],并且,ICT 也可通过诱导肿瘤细胞凋亡而抑制骨肉瘤的增殖[6,7]。阿霉素(doxorubicin,DOX)别名多柔比星,作为一种细胞毒性抗生素,是骨肉瘤常用的传统化疗药物之一。然而,DOX 的耐药性与不良反应却是困扰 DOX 发挥疗效的重要原因。本实验旨在采用 ICT 联合 DOX 作用于骨肉瘤 MG-63 细胞,观察细胞增殖、凋亡规律,探讨 ICT 对 DOX 化疗的增敏效应,以减少 DOX 剂量而降低药物耐药性和不良反应,为临床辅助化疗提供实验依据。

材料与方法

1　细胞株　人骨肉瘤细胞株 MG-63 由南昌大学第一附属医院烧伤研究所馈赠,购于中国科学院细胞库(货号:41500034)。

2　药物　ICT(20 mg/支,上海源叶生物科技有限公司,批号:20120207);注射用盐酸多柔比星(DOX,10 mg/支,浙江海正药业股份有限公司,批号:130405)。

3　主要试剂及仪器　胎牛血清(批号:NYM1035)、DMEM/高糖培养基(批号:NZG1173)购自美国 HyClone 公司;二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide,DMSO,批号:302A033)、0.25%胰蛋白酶(批号:20130326)、琼脂糖(批号:1212A0510)、Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒、Tris-乙酸(TAE,批号:20140528)均购自北京索莱宝生物科技有限公司;细胞计数试剂盒 8(Cell Counting Kit-8,CCK-8,批号:JK021)购自上海经科化学科技有限公司;HiFi-MMLV cDNA 逆转录试剂盒(批号:00021405)购自北京康为世纪生物科技有限公司;基因引物(货号:B21346)购自南京金斯瑞生物科技有限公司。超低温冰箱(型号:DW-86L386)购自青岛海尔股份有限公司;倒置相差显微镜(型号:TS100)购自日本 Nikon 公司;多功能酶标仪(型号:BioTek-Eon)、Mini 水平电泳仪(型号:DYY-2)购自美国 Bio-RAD 公司;台式室温高速离心机购自上海安亭科学仪器厂;冷冻高速离心机(型号:TGL-205M)购自长沙平凡仪器仪表有限公司;CO_2 细胞培养箱(型号:CO170R-S-0051)购自德国 Eppendorf 公司;凝胶成像系统购自美国 SIM 公司;超净工作台(型号:SW-CJ-2D)购自苏州净化设备有限公司;PCR 仪(型号:TC-E-48D)购自杭州博日科技有限公司;手提式不锈钢压力蒸气灭菌器(型号:LDZX-30KBS)购自上海申安医疗器械有限公司;流式细胞仪(型号:FACS Calibur)购自美国 BD 公司。

4　检测指标及方法

4.1　细胞生长及形态学观察　培养人骨肉瘤 MG-63 细胞株,分别等量接种于 24 孔板中,培养 24 h后细胞生长良好,以不同浓度含 ICT(10、20、40、80、160 μmol/L)、DOX(1、2、4、8、16 μg/mL)及以合适浓度(ICT + DOX:20 μmol/L + 1 μg/mL、20 μmol/L + 2 μg/mL、20 μmol/L + 4 μg/mL、40 μmol/L + 1 μg/mL、40 μmol/L + 2 μg/mL、40 μmol/L + 4 μg/mL、80 μmol/L + 1 μg/mL、80 μmol/L + 2 μg/mL、80 μmol/L +4 μg/mL)两药联合的药物培养基置换原培养基,并设置对照组(不含药物,只含 0.2% DMSO 的空白培养基组),培养 48 h。ICT 预先用 DMSO 溶解配成 80 mmol/L 的母液,终浓度含 0.2% DMSO,设置各组均含 0.2% DMSO。利用倒置相差显微镜观察各时间段细胞形态。

4.2　细胞增殖抑制率检测　利用 CCK-8 法检测细胞增殖抑制率。取对数期人骨肉瘤 MG-63 细胞按 5 000/孔的密度接种于 96 孔板中,加入含不同浓度梯度的单药培养基(ICT 10、20、40、80、160 μmol/L;DOX 1、2、4、8、16 μg/mL),每个浓度设 4 个复孔和 1 个药物空白孔,培养 48 h 后,各孔加入 10 μL CCK-8 试剂,轻微震荡后 37 ℃孵育 2 h,用酶标仪测 450 nm 处吸光度值(A)。各组 OD 值 = $A_{实验组}$-$A_{对照组}$,通过公式:抑制率

$=(OD_{对照组}-OD_{实验组})/OD_{对照组}$，计算得出各浓度的细胞增殖抑制率，利用 SPSS 19.0 概率分析计算半数抑制浓度 IC_{50}。分别取各单药 IC_{50} 附近的 3 个浓度（包含略高于和略低于 IC_{50}）进行两两联合，按检测各联合浓度下细胞增殖抑制率。按金氏公式[8]计算 ICT 及 DOX 联合用药的 Q 值，判断其是否有协同或者拮抗作用，Q 值 $=E_{a+b}/(E_a+E_b-E_a\times E_b)$，$E_{a+b}$ 为联合用药时的抑制率，E_a 和 E_b 分别为单用 ICT 与 DOX 的抑制率，Q 值 0.85～1.15 为单纯相加，1.15～2.0 为协同，<0.85 为拮抗。

4.3 细胞凋亡率检测 利用 Annexin Ⅴ-FITC/PI 双染料流式细胞分析技术分析细胞凋亡率。培养人骨肉瘤 MG-63 细胞株，适量接种于 6 孔板中，待细胞生长良好后，分对照组、40 μmol/L ICT 组、2 μg/mL DOX 组及 40 μmol/L ICT +2 μg/mL DOX 组，分别加入药物培养基。培养 48 h 后，消化、洗涤，各组加入 500 μL Buffer 后再分别加入 10 μL PI 和 5 μL FITC。为调节细胞群及染料分布，每个浓度需另设立不加染料的对照组及分别只加一种染料的药物干预组。避光孵育 5～15 min 后上机测试。

4.4 凋亡相关基因检测 利用 RT-PCR 检测相关凋亡基因。骨肉瘤 MG-63 细胞适量接种于 6 孔板中，设对照组、40 μmol/L ICT 组、2 μg/mL DOX 组及 40 μmol/L ICT +2 μg/mL DOX 组，更换药物培养基。培养 48 h 后，按步骤利用 RNA 快速提取试剂盒提取总 RNA，利用逆转录试剂盒逆转录成 cDNA，以 cDNA 为模板扩增，检测 bcl-2、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3（caspase-3）、p21 mRNA 的表达。产物 DNA 以 1% 琼脂糖凝胶进行电泳后紫外灯下拍照检测条带，用 Image J 软件分析灰度值。引物序列见表 1。RT-PCR 条件见表 2。

表 1 各基因引物序列

基因	引物序列	产物大小（bp）
β-actin	上游 5′-CGGGAAATCGTGCGTGAC-3′	443
	下游 5′-TGGAAGGTGGACAGCGAGG-3′	
caspase-3	上游 5′-CATGATTAGCAAGTTACAGTGATGC-3′	110
	下游 5′-CACAGTCTTAAGTGGGGGGA-3′	
p21	上游 5′-ATTCAGCATTGTGGGAGGAG-3′	131
	下游 5′-TGGACTGTTTTCTCTCGGCT-3′	
bcl-2	上游 5′-ACCTTCATCAGGGGGTG-3′	122
	下游 5′-TGCCAGTGGTCACACG-3′	

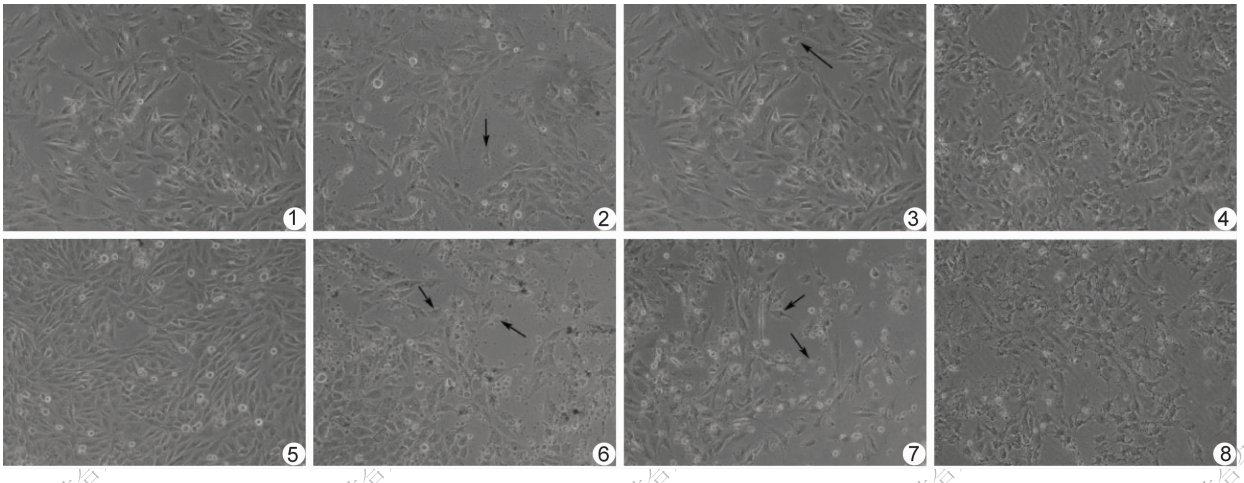
表 2 各目的基因 RT-PCR 条件

基因	预变性	变性	退火	延长	循环数
β-actin	94 ℃,1 min 30 s	94 ℃,30 s	62 ℃,30 s	72 ℃,5 min	28
caspase-3	94 ℃,1 min 30 s	94 ℃,30 s	60 ℃,30 s	72 ℃,5 min	32
p21	94 ℃,1 min 30 s	94 ℃,30 s	58 ℃,30 s	72 ℃,5 min	32
bcl-2	94 ℃,1 min 30 s	94 ℃,30 s	53 ℃,30 s	72 ℃,5 min	32

5 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件进行分析，数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间比较采用单因素方差分析，组间比较采用 t 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组细胞形态学结果比较（图 1） ICT 作用于 MG-63 细胞，24 h 后细胞生长出现明显抑制，部分细胞变小变圆，连接消失，与周围细胞脱离，折光性增强，呈现细胞凋亡的形态改变。DOX 作用于 MG-63 细胞，细胞形态改变稍迟于 ICT 组，48 h 后细胞增殖明显受抑制，部分细胞体积先增大呈多形性并伸出伪

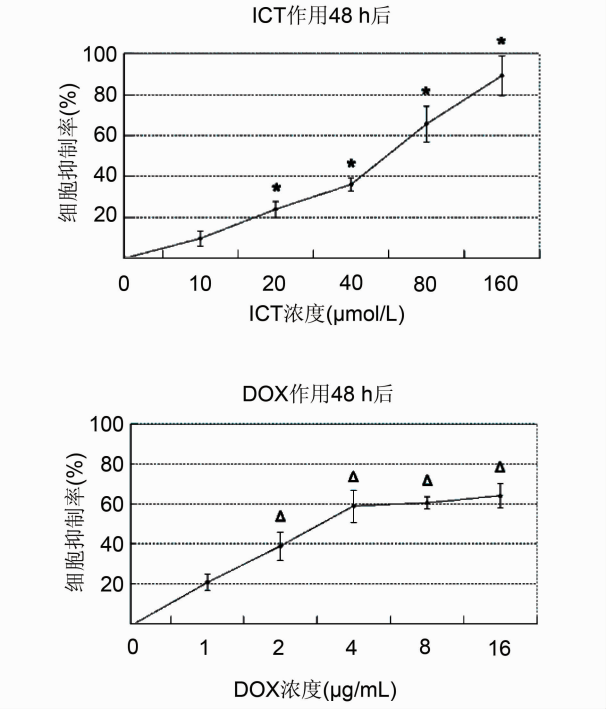


注：1 为对照组 24 h；2 为 40 μmol/L ICT24 h；3 为 2 μg/mL DOX 组 24 h；4 为联合组（40 μmol/L ICT +2 μg/mL DOX）24 h；5 为对照组 48 h；6 为 40 μmol/L ICT 48 h；7 为 2 μg/mL DOX 组 48 h；8 为联合组（40 μmol/L ICT +2 μg/mL DOX）48 h；图中箭头所示为凋亡细胞

图 1 各组细胞形态学结果 （×100）

足,继而变小变圆。ICT 组及 DOX 组细胞形态改变呈现浓度与时间依赖性,随着药物浓度的升高及作用时间的延长,凋亡细胞数量逐渐增多,细胞逐渐出现裂解,周围出现细胞碎片。联合组两种凋亡形态同时存在,与 ICT 组及 DOX 组比较,细胞凋亡数量明显增多,程度明显增强。

2　各组细胞增殖抑制率比较(图 2,表 3)　ICT 和 DOX 对 MG-63 细胞的抑制作用在一定程度上均呈剂量依赖关系($P < 0.05$)。两药 IC_{50} 分别为 46.93 μmol/L 和 3.87 μg/mL,除两个低剂量联合组(ICT 20 μmol/L + DOX 1 μg/mL、ICT 40 μmol/L + DOX 1 μg/mL)为协同作用,其余各组均表现为相加作用。



注:与 10 μmol/L 比较,$^{*}P < 0.05$;与 1 μg/mL 比较,$^{\Delta}P < 0.05$

图 2　各组细胞增殖抑制率

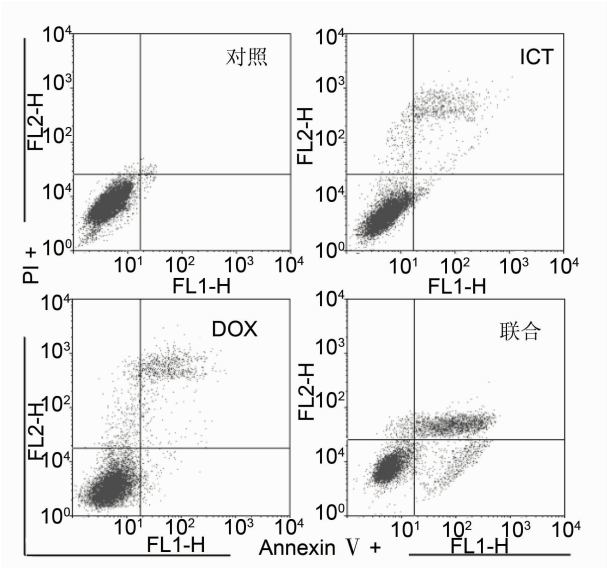
3　各组细胞凋亡率比较(图 3,表 4)　与对照组比较,各给药组细胞凋亡率均升高($P < 0.05$)。与联合组比较,ICT 组和 DOX 组细胞凋亡率降低($P < 0.05$)。

4　各组 MG-63 细胞 bcl-2、caspase-3、p21 mRNA 表达比较(图 4,表 5)　药物作用 MG-63 细胞 48 h,与对照组比较,各给药组 bcl-2 表达明显减弱,caspase-3、p21 表达明显增强($P < 0.05$)。与联合组比较,ICT 和 DOX 组 bcl-2 表达升高,caspase-3、p21 表达降低($P < 0.05$)。

表 3　ICT 联合 DOX 作用 MG-63 细胞 48 h 后细胞增值抑制率　($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

ICT (μmol/L)	DOX (μg/mL)	抑制率(%)	Q 值	药效
0	0	0	—	—
0	1	20.81 ± 9.01	—	—
0	2	38.80 ± 6.66	—	—
0	4	58.89 ± 3.31	—	—
20	0	23.93 ± 8.86	—	—
40	0	36.00 ± 14.32	—	—
80	0	65.66 ± 7.72	—	—
20	1	46.21 ± 3.40	1.162	+ +
40	1	48.59 ± 5.88	1.191	+ +
80	1	60.74 ± 6.55	1.029	+
20	2	58.76 ± 4.36	0.909	+
40	2	66.73 ± 7.10	1.097	+
80	2	78.87 ± 7.05	1.002	+
20	4	74.91 ± 7.12	0.884	+
40	4	79.14 ± 4.61	1.070	+
80	4	92.47 ± 5.77	1.077	+

注:+ 表示相加作用;+ + 表示协同作用



注:Annexin Ⅴ-FITC /PI 双染料流式细胞分析,左下象限为正常存活细胞,左上象限为坏死细胞,右下象限为早期凋亡细胞,右上象限为晚期凋亡细胞

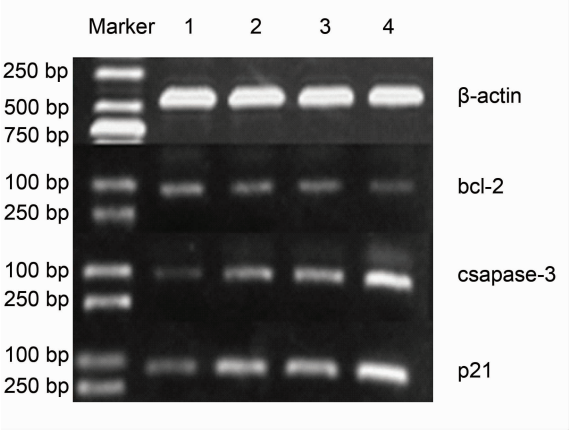
图 3　各组 MG-63 细胞凋亡率流式细胞图

表 4　各组 MG-63 细胞凋亡率比较　(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	凋亡率
对照	3	1.12 ± 0.03
ICT	3	28.23 ± 5.43 $^{*\Delta}$
DOX	3	25.67 ± 7.04 $^{*\Delta}$
联合	3	54.19 ± 7.99 *

注:与对照组比较,$^{*}P < 0.05$;与联合组比较,$^{\Delta}P < 0.05$

中国中西医结合杂志



注:1 为对照组;2 为 ICT 组;3 为 DOX 组;4 为联合组

图 4 各组 MG-63 细胞 bcl-2、caspase-3、p21 mRNA 表达

表 5 各组 MG-63 细胞 bcl-2、caspase-3、p21 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	bcl-2	caspase-3	p21
对照	4	0.73 ± 0.07	0.14 ± 0.01	0.22 ± 0.02
ICT	4	0.59 ± 0.05 $^{*\Delta}$	0.39 ± 0.04 $^{*\Delta}$	0.30 ± 0.02 $^{*\Delta}$
DOX	4	0.54 ± 0.04 $^{*\Delta}$	0.45 ± 0.03 $^{*\Delta}$	0.45 ± 0.04 $^{*\Delta}$
联合	4	0.37 ± 0.02 *	0.67 ± 0.05 *	0.88 ± 0.08 *

注:与对照组比较,$^{*}P < 0.05$;与联合组比较,$^{\Delta}P < 0.05$

讨 论

研究表明,采用中药联合传统化疗药物抗肿瘤具有增加化疗药物的敏感性及降低耐药性的优势[9-12]。本研究团队前期研究表明:ICT 具有抑制骨肉瘤细胞增殖及诱导其凋亡作用,因此本研究将 ICT 与 DOX 联合,共同作用于骨肉瘤 MG-63 细胞,研究两药联合的效果。在研究过程中,首先采用 24 孔细胞培养板接种 MG-63 细胞,设计系列梯度药物浓度的 ICT 及 DOX 单药组,通过倒置相差显微镜观察,得出两药产生抑制作用的大致药物浓度范围,然后设计合理的药物浓度梯度,采用 CCK-8 法测定两单药对 MG-63 细胞的抑制率及 IC_{50},选择联合用药的药物浓度时,以两药 IC50 为参考分别设定略低于或高于 IC_{50} 的 3 个浓度进行两两联合。通过 Q 值分析结果显示:只有低浓度药物联合时(ICT 20 μmol/L + DOX 1 μg/mL、ICT 40 μmol/L + DOX 1 μg/mL)呈现协同作用(Q 值分别为 1.162、1.191),其他浓度联合则均表现为简单的相加作用。因此,笔者认为采用低浓度 ICT 联合 DOX 对骨肉瘤进行化疗可降低 DOX 的用量,同时并不影响其化疗效果,因而可降低 DOX 化疗的耐药性及副作用。

细胞形态及流式细胞仪显示,无论是 ICT 还是 DOX 均有促进 MG-63 细胞凋亡作用。前期实验表明:淫羊藿总黄酮联合 DOX 的同分异构体吡柔比星能够协同地抑制 MG-63 细胞增殖,并通过调控 p21 和 casapse-3 基因的表达诱导 MG-63 细胞凋亡[13]。本研究也得出类似结果。另外,本研究检测到 ICT 能够上调骨肉瘤 MG-63 细胞 p21 基因的表达。Bcl-2 蛋白是一类抗细胞凋亡蛋白质,保护细胞免受多种凋亡刺激物,如细胞毒性药物、辐射、热、生长因子缺乏等影响,Bcl-2 蛋白已被确定在各种人类癌症中高表达[14]。Caspase-3 是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶,同时也是 CTL 细胞杀伤机制的重要组成部分。活化的 Caspase-3 是由两个大亚基和两个小亚基构成的四聚体,它能识别关键的 P4 位点上包含天门冬氨酸残基的 4 ~5 个氨基酸序列,这个残基的羰基端被认为是细胞分裂的靶点[15]。p21 基因是位于 p53 基因下游的细胞周期素依赖性激酶抑制因子,可以和 p53 共同构成细胞周期 G1 检查站,减少了受损 DNA 的复制和积累,从而发挥抑癌作用。Xia X 等[16]发现细胞质内 P21 蛋白是一种新的顺铂耐药性的生物标记物,它可能是难治性卵巢肿瘤一个潜在的治疗靶点。Ding Y 等[17]发现 p21 过表达能通过唤醒 caspase-3 和 bax/bcl-2 级联反应而增加骨肉瘤 U2OS 细胞对顺铂的敏感性。

DOX 是 DNA 复制的抑制剂,其作用是通过化学结构的平面环在核内插入碱基对之间与 DNA 结合形成复合物,阻止双链分离,从而减少 DNA 复制和 RNA 合成,抑制肿瘤细胞生长。虽然化疗药物 DOX 对骨肉瘤细胞具有显著的杀伤作用,但长期应用后产生的耐药性和不良反应不容忽视[18]。由于本研究显示 DOX 具有促进 MG-63 细胞凋亡作用,因此采用 RT-PCR 研究 DOX 对凋亡相关基因 bcl-2、caspase-3、p21 表达的影响,发现 bcl-2 基因表达明显升高,而 caspase-3 与 p21 基因表达明显降低。并将 3 个实验组(ICT 组、DOX 组、联合组)结果进行比较,发现联合组肿瘤细胞 bcl-2 基因下调及 caspase-3、p21 基因上调幅度明显高于 ICT 组和 DOX 组。

本研究通过体外实验验证了 ICT 对于抗骨肉瘤的作用,然而实验有待进一步完善:有待积极寻找 ICT 抗骨肉瘤的有关信号通路,分析其作用机制与 DOX 的异同点,更好地指导临床用药。

综上所述,ICT 及 DOX 可以通过调控 bcl-2、caspase-3、p21 基因的表达,诱导人骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡,从而抑制肿瘤细胞增殖。并且,ICT 和 DOX 联合作用于 MG-63 细胞,对肿瘤细胞表现为协

同或相加作用。

参 考 文 献

[1] Ta HT, Dass CR, Choong PF, et al. Osteosarcoma treatment: state of the art[J]. Cancer Metastasis Rev, 2009, 28(1-2): 247-263.

[2] Ye HY, Lou YJ. Estrogenic effects of two derivatives of icariin on human breast cancer MCF-7 cells[J]. Phytomedicine, 2005, 12(10): 735-741.

[3] Huang X, Zhu D, Lou Y. A novel anticancer agent, icaritin, induced cell growth inhibition, G_1 arrest and mitochondrial transmembrane potential drop in human prostate carcinoma PC-3 cells[J]. Eur J Pharmacol, 2007, 564(1): 26-36.

[4] Wu J, Xu H, Wong PF, et al. Icaritin attenuates cigarette smoke-mediated oxidative stress in human lung epithelial cells via activation of PI3K-AKT and Nrf2 signaling[J]. Food Chem Toxicol, 2014, 64(2): 307-313.

[5] Sun L, Chen W, Qu L, et al. Icaritin reverses multidrug resistance of $HepG_2$/ADR human hepatoma cells via down-regulation of MDR1 and P-glycoprotein expression[J]. Mol Med Rep, 2013, 8(6): 1883-1887.

[6] 刘玉亮,梁广胜, 殷嫦嫦, 等. 淫羊藿总黄酮及淫羊藿素体外抗骨肉瘤的研究[J]. 中成药, 2013, 35(10): 2072-2077.

[7] 刘玉亮, 殷嫦嫦, 殷明,等. 淫羊藿素抗骨肉瘤的机制探究[J]. 中成药, 2014, 36(1): 4-9.

[8] 金正均. 合并用药中的相加[J]. 中国药理学报, 1980, 1(2): 70-76.

[9] 康小红, 龚亚斌, 王立芳, 等. 蟾毒灵联合吉非替尼对肺癌细胞 H1975 的影响及机制研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(8): 1081-1085.

[10] 刘岸,罗江, 张坚红, 等. 大黄素联合吉西他滨抑制体内外胰腺癌生长及其机制研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(5): 652-656.

[11] Chen J, Wang W, Wang H, et al. Combination treatment of ligustrazine piperazine derivate DLJ14 and adriamycin inhibits progression of resistant breast cancer through inhibition of the EGFR/PI3K/Akt survival pathway and induction of apoptosis[J]. Drug Discov Ther, 2014, 8(1): 33-41.

[12] Shen F, Cai WS, Li JL, et al. Synergism from the combination of ulinastatin and curcumin offers greater inhibition against colorectal cancer liver metastases via modulating matrix metalloproteinase-9 and E-cadherin expression[J]. Oncol Targets Ther, 2014, 7(1): 305-314.

[13] 林思文, 殷嫦嫦, 殷明,等. 淫羊藿总黄酮与吡柔比星联合抗人骨肉瘤的作用机制[J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(2): 108-112.

[14] Trieb K, Sulzbacher I, Kubista B. Bcl-2 correlates with localization but not outcome in human osteosarcoma[J]. Oncol Lett, 2013, 6(2): 559-561.

[15] Mazumder S, Plesca D, Almasan A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis[J]. Methods Mol Biol, 2008, 414(1): 13-21.

[16] Xia X, Ma Q, Li X, et al. Cytoplasmic p21 is a potential predictor for cisplatin sensitivity in ovarian cancer[J]. BMC Cancer, 2011, 11(1): 399.

[17] Ding Y, Wang Y, Chen J, et al. p21 over-expression sensitizes osteosarcoma U2OS cells to cisplatin via evoking caspase-3 and Bax/Bcl-2 cascade[J]. Tumor Biol, 2014, 35(1): 3119-3123.

[18] Zhang F, Chen A, Chen J, et al. siRNA-mediated silencing of beta-catenin suppresses invasion and chemosensitivity to doxorubicin in MG-63 osteosarcoma cells[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2011, 12(1): 239-245.

（收稿:2014-03-28　修回:2016-03-20）

中国中西医结合杂志