

· 基础研究 ·

脑瘤一号方联合替莫唑胺对裸鼠脑胶质瘤模型 MGMT、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响

袁洁 张珏 费智敏

摘要 **目的** 观察脑瘤一号方联合替莫唑胺(TMZ)对脑胶质瘤模型 O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶(MGMT)、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响。**方法** 经荧光素 mcherry 转染的人神经胶质瘤 U87 细胞(U87MG-Luc),注射于 BALB/c 裸鼠纹状体,建立裸鼠脑胶质瘤原位模型,成瘤裸鼠(荧光量 $\geq 1 \times 10^5$)24 只随机分为模型组(生理盐水 0.3 mL)、TMZ 组(TMZ 50 mg/kg)、脑瘤一号方组(脑瘤一号方 32.125 mg/g)和联合组(TMZ 50 mg/kg + 脑瘤一号方 32.125 mg/g),每组 6 只,连续灌胃 12 天,每 3 天检测 1 次裸鼠体重、肿瘤体积,给药结束后取脑组织,HE 染色检测瘤块组织病理,Western Blot 检测 MGMT、促凋亡因子 Bax 和抗凋亡因子 Bcl-2 水平。**结果** 与模型组比较,TMZ 组、脑瘤一号方组和联合组肿瘤体积减少($P < 0.05$),TMZ 组肿瘤组织 MGMT 表达升高($P < 0.05$),联合组 Bax 表达及 Bax/Bcl-2 升高($P < 0.05$),抗凋亡因子 Bcl-2 表达水平降低($P < 0.05$)。与 TMZ 组比较,联合组 MGMT 及 Bcl-2 表达降低($P < 0.05$),Bax 表达及 Bax/Bcl 升高($P < 0.05$)。**结论** 脑瘤一号方组和联合组均表现出有效的抗肿瘤作用。脑瘤一号方联合 TMZ 治疗胶质瘤能降低 TMZ 副作用,下调 MGMT 表达缓解胶质瘤细胞对 TMZ 的耐药性,同时上调 Bax 和下调 Bcl-2 表达,促进肿瘤细胞凋亡。

关键词 脑胶质瘤; 脑瘤一号方; 替莫唑胺; 耐药性; O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶

Effects of Naoliu Decoction I Combined with Temozolomide on Expression of MGMT, Bax and Bcl-2 Proteins in Glioma Nude Mice YUAN Jie, ZHANG Jue, and FEI Zhi-min Department of Neurosurgery, Shuguang Hospital, Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (200120)

ABSTRACT **Objective** To evaluate the effects of Naoliu Decoction I (ND I) combined with temozolomide (TMZ) on the expression of MGMT, Bax and Bcl-2 in the glioma mice model. **Methods** The human glioma U87 cells transfected by fluorescein mcherry (U87MG-Luc) were injected into the striatum of BALB/c nude mice to establish glioma model in nude mice. The 24 nude mice with glioma (fluorescence $\geq 1 \times 10^5$) were randomly divided into model group (saline 0.3 mL), TMZ group (TMZ 50 mg/kg), ND I group (ND I 32.125 mg/g) and combination group (TMZ 50 mg/kg + ND I 32.125 mg/g), six rats in each group, and they were administrated by gavage for 12 successive days. The body weight and tumor volume were measured every 3 days during the experiment. Brain tissue was taken after administration, and the pathology of tumor were detected by HE staining. Western Blot was used to detect O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT), pro-apoptotic factor Bax and anti-apoptotic factor Bcl-2. **Results** Compared with the model group, the tumor volume of the TMZ group, the ND I group and combination group were significantly decreased ($P < 0.05$). The expression of MGMT in the TMZ group was increased ($P < 0.05$). The expression of Bax and Bax/Bcl-2 in the combination group was increased ($P < 0.05$), meanwhile the expression level of anti-apoptotic factor Bcl-2 was decreased ($P < 0.05$). Compared with the TMZ group, the expression of MGMT and Bcl-2 in the combined group were decreased ($P < 0.05$), Bax and Bax/Bcl-2 expression were increased ($P < 0.05$). **Conclusions** Both the ND-1 group and the combined group showed an effective anti-tumor effect on the glioma tumor mice model. ND-I combined with TMZ can reduce the side effects, alleviate

作者单位: 上海中医药大学附属曙光医院神经外科(上海 200120)

通讯作者: 费智敏, Tel: 021-20256312, E-mail: tommyfei@126.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20190928.030

the resistance of glioma cells to TMZ by down-regulating the expression of MGMT, promote the apoptosis of tumor cells up-regulating Bax and down-regulating the expression of Bcl-2.

KEYWORDS glioma; Naoliu Decoction I; temozolomide; resistance; O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase

1997 年替莫唑胺 (temozolomide, TMZ) 在欧洲批准上市, 目前是脑胶质瘤一线化疗药, 通过甲基化肿瘤 DNA 发挥细胞毒作用, 延长患者中位生存期, 提高患者生存率^[1]。O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶 (O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT) 是一种细胞 DNA 修复蛋白, 是人体内重要的直接修复酶, 能除去甲基或烷化基, 中和 TMZ 的细胞毒性作用^[2], 使胶质瘤细胞耐药, 因此 TMZ 的临床有效率不足 50%^[3]。研究表明, 降低 MGMT 表达可以改善胶质瘤细胞对 TMZ 的抗性^[4-6]。大量中药被证实能抑制脑胶质瘤的发展^[7,8], 其作用机制是细胞凋亡^[9]: B 细胞淋巴瘤 2 (Bcl-2) 家族通过调节促凋亡因子 (如 Bax) 与抗凋亡因子 (如 Bcl-2) 比率改变线粒体膜渗透性, 启动细胞凋亡级联反应^[10]。目前中药与化疗联合治疗脑胶质瘤的研究在抗耐药和促凋亡方面显示出一定效果^[8,11,12]。中药复方脑瘤一号方是上海中医药大学全国名老中医钱伯文先生拟定的经验方, 由当归、陈胆星、夏枯草、生牡蛎、石菖蒲、天龙等 15 味中药组成, 治疗肿瘤有一定疗效, 但具体机制尚无深入探索。本研究通过建立裸鼠脑胶质瘤原位模型, 观察脑瘤一号方联合 TMZ 对 MGMT、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达水平的影响。

材料与方

1 动物及细胞 SPF 级 BALB/c 裸小鼠 30 只, 雌性, 5 周龄, 体重 15 ~ 18 g, 购于上海灵畅生物科技有限公司, 合格证号: SCXK (沪) 2013 0018。U87MG-Luc 委托上海科远迪生物科技有限公司制备, 细胞株来源为中国科学院细胞库, 货号: AC319。本研究所有涉及动物的实验均经澎立生物医药技术上海有限公司实验室伦理委员会批准 (No.PL-IAC003)。

2 药物 脑瘤一号方组成: 当归 12 g 天南星 10 g 姜半夏 6 g 夏枯草 10 g 昆布 20 g 天竺黄 12 g 生牡蛎 30 g 石菖蒲 10 g 浙贝母 20 g 茯苓 20 g 海藻 20 g 赤芍 20 g 天龙 6 g 远志肉 10 g 黄药子 6 g, 根据小鼠与人等效剂量比值 9.1^[13], 换算成每 20 g 小鼠每日用药剂量: 当归 36.4 mg 天南星 30.3 mg 姜半夏 18.2 mg 夏枯草 30.3 mg 昆布 60.6 mg 天竺黄 36.4 mg

生牡蛎 90.9 mg 石菖蒲 30.3 mg 浙贝母 60.6 mg 茯苓 60.6 mg 海藻 60.6 mg 赤芍 60.6 mg 天龙 18.2 mg 远志肉 30.3 mg 黄药子 18.2 mg。由上海中医药大学附属曙光医院药剂科提供。TMZ 原料药 (纯度 ≥ 98%, 上海莼试生物技术有限公司, 批号: HB180221)。

3 试剂及仪器 胎牛血清 (FBS, 美国 Gibco 公司, 批号: 42G5176K); DMEM 培养基 (美国 Corning cellgro 公司, 批号: 19818003); 青、链霉素 (美国 Gibco 公司, 批号: 1910855); 胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司, 批号: 1930154); 缓冲液 (PBS, 美国 Corning cellgro 公司, 批号: 19117004); MGMT 抗体 (美国 Santa Cruz Biotechnology 公司, 批号: 12215); Bax 抗体 (英国 Abcam 公司, 批号: GR3180247-15); Bcl-2 (英国 Abcam 公司, 批号: GR305485-16); 二抗 (HRP 标记抗兔/抗小鼠, 上海碧云天生物技术有限公司, 批号: A0208/A0205)。HERA cell 150 CO₂ 培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司), MSC-Advantage 生物安全柜 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司), Legend MACH 1.6 离心机 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司), TS100 倒置显微镜 (日本 Nikon 公司), ALC-H 小鼠脑立体定位仪 (上海奥尔柯特生物科技), IVIS Lumina XRMS III 小动物活体成像仪 (美国 Perkin Elmer 公司), 165-8001 小型垂直电泳槽 (美国 Bio-Rad 公司), 170-3930 转印槽 (美国 Bio-Rad 公司), 164-5050 基础电源 (美国 Bio-Rad 公司), TL-2010S 组织匀浆器 (北京鼎昊源公司), TS-1 脱色摇床 (海门市其林贝尔公司)。

4 人神经胶质瘤 U87MG-Luc 细胞培养 U87MG-Luc 细胞复苏成功后, 以 DMEM 培养基添加 15% FBS (含青、链霉素) 培养于含 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱, 每 2 ~ 3 天更换 1 次新鲜培养基, 当细胞增殖到对数阶段, 用胰蛋白酶消化细胞并制备成浓度为 1 × 10⁷/mL 细胞悬液。

5 裸鼠脑胶质瘤原位模型制备 造模方法参照参考文献^[14], 取 30 只裸鼠, 将裸鼠固定于小鼠脑立体定位仪, 头皮切开暴露, 用 2 mL 注射器针头在前凶前 1.0 mm, 中线旁开 2.5 mm, 硬脑膜下 3.5 mm 处钻孔, 微量注射器吸取 10 μL (1 × 10⁵ 个细胞/只) 配制好的细胞

悬液缓慢注射于小鼠纹状体,注射后停留 10 min。待造模 7 天,动物活体成像仪检测裸鼠肿瘤荧光量达 1×10^5 时,认为造模成功,本次造模成功率 90%。

6 分组及干预方法 取 24 只成模裸鼠采用随机数字表法分为模型组、TMZ 组、脑瘤一号方组及联合组,每组 6 只。TMZ 组灌胃 TMZ (50 mg/kg, 溶解于生理盐水, 0.3 mL/d), 连续 5 天 (参照 TMZ 化疗方案 5/28^[1]); 脑瘤一号方组灌胃 脑瘤一号方 32.125 mg/g, 0.3 mL/d, 连续 12 天; 联合组灌胃 TMZ 和脑瘤一号方, 方法同前。模型组灌胃生理盐水 0.3 mL/d, 连续 12 天。

7 检测指标及方法

7.1 一般状态观察 干预期间每天观察各组动物摄食饮水量、活动情况、毛发及死亡情况。

7.2 体重及肿瘤体积检测 于干预后第 4、7、10、13 天测量裸鼠体重并采用动物活体成像仪检测肿瘤体积, 计算肿瘤相对体积, 相对肿瘤体积 (relative tumor volume, RTV) = V_t/V_0 , V_t 表示测量时的肿瘤体积, V_0 表示给药初期肿瘤的体积。

7.3 取材及病理切片制备 给药结束后, 于第 13 天脱颈椎处死裸鼠, 取各组裸鼠脑组织, 各组织一部分冰冻后进行蛋白免疫印迹检测, 一部分进行甲醛固定, 石蜡包埋, 切片 (4 μ m), HE 染色后光学显微镜 (200 \times) 下观察各组肿瘤组织细胞形态学差异。

7.4 MGMT、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达检测 采用

Western Blot 检测 MGMT、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达水平。制备组织中蛋白质上清液、电泳、转印蛋白, ECL 显影后 Image J 处理图像并获取灰度值。

8 统计学方法 采用软件 SPSS 19.0 进行数据处理。计量资料满足正态性、独立性和方差齐性, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各处理组与对照组比较采用 Dunnett-t 检验, 不同处理组之间采用 LSD-t 检验; 不满足正态分布和方差齐性, 数据采用 $M (Q_{25}, Q_{75})$ 表示, 采用多组独立样本的秩和检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组裸鼠一般情况比较 模型组第 9 天出现饮食摄水量减少, 活动范围减少; TMZ 组裸鼠第 2 天出现厌食、精神差, 第 3 天皮毛干燥蜕皮, 第 4 天体重下降; 其余各组裸鼠生长状况良好, 饮食正常, 4 组在实验期间均未出现死亡。

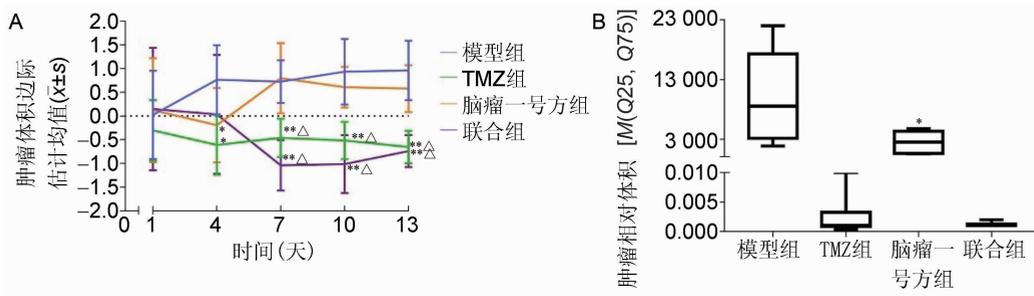
2 各组各时间点裸鼠体重比较 (表 1) 与模型组比较, TMZ 组干预第 4、7 天裸鼠体重降低 (P < 0.05)。与 TMZ 组比较, 联合组 4、7 天裸鼠体重升高 (P < 0.05)。与脑瘤一号方组比较, TMZ 组和联合组第 4、7 天裸鼠体重降低 (P < 0.05)。

3 各组裸鼠肿瘤体积与末次相对体积比较 (图 1) 与模型组比较, TMZ 组第 4~13 天肿瘤体积减小 (P < 0.01, P < 0.05), 脑瘤一号方组第 4 天肿瘤体积减小 (P < 0.05), 肿瘤末次相对体积减小 (P < 0.05),

表 1 各组各时间点裸鼠体重比较 (g, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	第 1 天	第 4 天	第 7 天	第 10 天	第 13 天
模型	6	16.33 \pm 0.17	16.58 \pm 0.22	17.67 \pm 0.46	16.63 \pm 0.84	15.45 \pm 1.27
TMZ	6	16.51 \pm 0.25	15.18 \pm 0.53 * \blacktriangle	15.32 \pm 0.43 * \blacktriangle	15.87 \pm 0.53	16.49 \pm 0.51
脑瘤一号方	6	16.88 \pm 0.25	17.56 \pm 0.29	17.74 \pm 0.28	16.90 \pm 0.29	16.58 \pm 0.59
联合	6	16.82 \pm 0.43	16.41 \pm 0.49 $\triangle\triangle$	15.92 \pm 0.58 $\triangle\triangle$	15.84 \pm 0.40	16.78 \pm 0.48

注:与模型组比较, *P < 0.05; 与 TMZ 组比较, \triangle P < 0.05; 与脑瘤一号方组比较, \blacktriangle P < 0.05

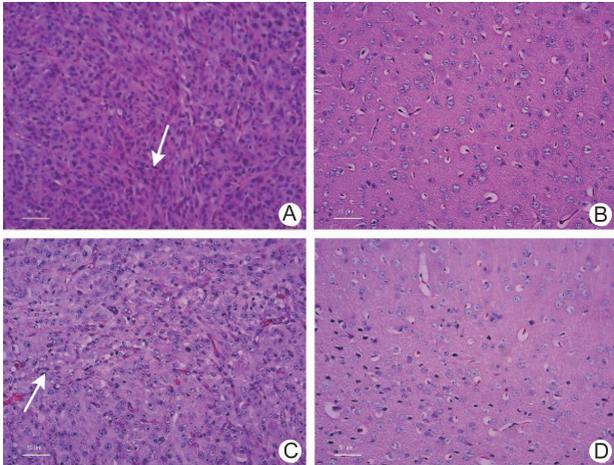


注:A 为肿瘤体积变化趋势;B 为末次相对体积;与模型组比较, *P < 0.05, **P < 0.01;与脑瘤一号方组比较, \triangle P < 0.05

图 1 各组肿瘤体积变化趋势及末次相对体积比较

联合组第 7 ~ 13 天肿瘤体积减小 ($P < 0.01$)。与脑瘤一号方组比较, TMZ 组和联合组第 7 ~ 13 天肿瘤体积减小 ($P < 0.05$)。

4 各组病理结果比较(图 2) TMZ 组和联合组病理结果呈阴性,未见病理性核分裂,模型组和脑瘤一号方组病理结果呈阳性,胶质母细胞瘤,细胞核深染,核分裂增多,呈“毛毛虫状”,血流丰富。



注:A 为模型组;B 为 TMZ 组;C 为脑瘤一号方组;D 为联合组;箭头所指为胶质母细胞瘤细胞,细胞核深染,核分裂增多,呈“毛毛虫状”

图 2 各组病理结果比较 (HE, ×200)

5 各组肿瘤组织 MGMT 蛋白表达比较(表 2, 图 3) 与模型组比较, TMZ 组 MGMT 蛋白表达增加 ($P < 0.05$)。与 TMZ 组比较,脑瘤一号方组和联合组 MGMT 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。

表 2 各组肿瘤组织中 MGMT 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MGMT/GAPDH
模型	6	0.99 ± 0.35
TMZ	6	2.57 ± 0.51 *
脑瘤一号方	6	0.45 ± 0.11 Δ
联合	6	1.06 ± 0.42 Δ

注:与模型组比较, * $P < 0.05$; 与 TMZ 组比较, $\Delta P < 0.05$

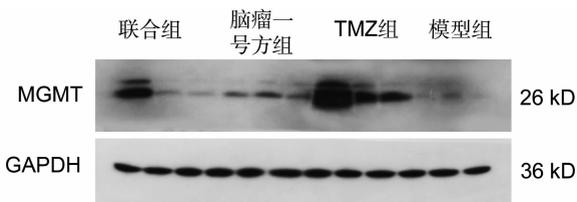


图 3 各组肿瘤组织 MGMT 蛋白表达

6 各组肿瘤组织 Bax、Bcl-2 蛋白表达及 Bax/Bcl-2 比较(表 3, 图 4) 与模型组比较,脑瘤一号方

组和联合组 Bax 蛋白表达增加 ($P < 0.05$),联合组 Bcl-2 蛋白表达降低 ($P < 0.05$),Bax/Bcl-2 升高 ($P < 0.05$)。与 TMZ 组比较,联合组 Bax 表达增加 ($P < 0.05$),Bcl-2 表达降低 ($P < 0.05$),Bax/Bcl-2 升高 ($P < 0.05$)。

表 3 各组肿瘤组织中 Bax、Bcl-2 蛋白表达及 Bax/Bcl-2 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Bax	Bcl-2	Bax/Bcl-2
模型	6	0.29 ± 0.02	1.23 ± 0.22	0.29 ± 0.07
TMZ	6	0.46 ± 0.17	1.10 ± 0.20	0.60 ± 0.31
脑瘤一号方	6	0.84 ± 0.20 *	0.83 ± 0.19	1.41 ± 0.45
联合	6	1.11 ± 0.21 * Δ	0.56 ± 0.17 * Δ	4.58 ± 1.88 * Δ

注:与模型组比较, * $P < 0.05$; 与脑瘤一号方组比较, $\Delta P < 0.05$

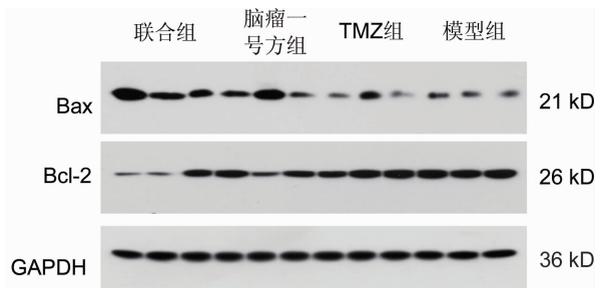


图 4 各组肿瘤组织 Bax、Bcl-2 蛋白表达

讨 论

脑胶质瘤是颅内发病率最高的原发性肿瘤,具有恶性度高、复发率高等特点,其中胶质母细胞瘤的中位生存期仅 14.6 个月^[15]。目前针对脑胶质瘤的治疗以手术为主联合放化疗。胶质母细胞瘤的一线标准治疗为术后进行为期 6 个周期的 TMZ 化疗(Stupp 方案)。如何降低 TMZ 耐药性已成为当前提高化疗疗效的研究重点。O⁶位点鸟嘌呤发生甲基化是 TMZ 发挥细胞毒性的主要机制^[16],而 MGMT 的高表达是 TMZ 耐药性的最重要因素^[17]。除了原发性耐药,周期性使用 TMZ 可使 MGMT 高表达从而出现继发耐药^[18]。本实验发现:TMZ 组 MGMT 表达较模型组增加,也证实了这一观点。

中药能从多种路径发挥抑制胶质瘤细胞的作用^[7,8,11]。本实验采用的脑瘤一号方据海藻玉壶汤加减而成,能化痰开郁、软坚散结治疗脑胶质瘤。临床经验显示,脑瘤一号方加减治疗神经胶质瘤能改善患者症状,抑制肿瘤生长与复发^[19]。本研究将脑瘤一号方与 TMZ 联合,并研究其作用机制。实验数据表明:脑瘤一号方联合 TMZ 可以在减小肿瘤体积的同时改善 TMZ 导致的体重下降、进食饮水量减少、蜕皮等副作

用以及裸鼠脑胶质瘤的病理形态。单独使用 TMZ 治疗脑胶质瘤使 MGMT 低表达的脑胶质瘤细胞转为高表达引起耐药,脑瘤一号方联合 TMZ 可降低 MGMT 表达,提示联合用药抑制了脑胶质瘤耐药。

细胞凋亡的途径涉及多种蛋白质,Bax 和 Bcl-2 基因家族是其中重要的蛋白。当细胞发生应激反应(辐射、DNA 损伤、癌基因激活等)时,促凋亡蛋白 Bax 被活化,进而通过穿透线粒体外膜(outer mitochondrial membrane, OMM)并启动胱天蛋白酶级联反应来使细胞达到其程序性死亡^[20,21]。此凋亡途径可被 Bcl-2 等各种抗凋亡蛋白和凋亡抑制因子所调控。Bcl-2 可对抗化疗药物诱导细胞凋亡,阻碍药物发挥作用,下调抗凋亡 Bcl-2 蛋白能调节细胞凋亡,降低化疗药物的耐药性^[22,23]。上调效应蛋白 Bax / Bcl-2 比率是提高线粒体介导的细胞凋亡的有效途径^[24,25]。本实验表明:联合组 Bax 表达增加($P < 0.05$),Bcl-2 表达降低($P < 0.05$),Bax/Bcl-2 升高($P < 0.05$),而 TMZ 组 Bax 表达、Bcl-2 表达及 Bax/Bcl-2 差异无统计学意义($P > 0.05$),结果可能与 TMZ 导致的耐药性有关,提示脑瘤一号方联合 TMZ 能改善化疗药耐药。

海藻是重要的生物活性抗氧化剂,海藻中的类胡萝卜素、岩藻黄质和间苯三酚在体内外实验中均显示出抗癌作用^[26,27]。间苯三酚被证明可以活化 caspase-9 和 caspase-3 以及增加促凋亡因子 Bax 表达,诱导人脑胶质瘤细胞凋亡^[28]。当归提取物正丁基苯酞也被认为能上调 p53 的表达引发线粒体凋亡途径抑制胶质瘤细胞生长,降低肿瘤体积^[29]。在神经胶质瘤体外实验中证实^[7],天龙通过上调 Bax 表达,促进细胞凋亡。单独使用这些药物能影响线粒体凋亡途径抑制胶质瘤细胞的增殖,但都无法改善胶质瘤细胞对 TMZ 的耐药性。此外,萜类和苷类化合物是夏枯草、浙贝母、茯苓和赤芍等中药中主要的有效成分,被认为具有广泛抗肿瘤作用^[30,31]。脑瘤一号方以海藻作为君药,辅以生牡蛎、夏枯草、浙贝母、当归、茯苓和天龙等,软坚散结,抗癌消积。

本文是脑瘤一号方联合 TMZ 治疗脑胶质瘤观察疗效及作用机制的初步研究,仍有许多问题值得进一步探讨:例如脑瘤一号方联合 TMZ 作用的疗效与脑瘤一号方浓度和给药时间的相关性;促进胶质瘤细胞凋亡进一步的分子机制及通路研究;脑瘤一号方降低 TMZ 导致 MGMT 高表达的机制研究。

综上所述,脑瘤一号方联合 TMZ 治疗胶质瘤疗效优于单用 TMZ,其机制可能与降低 MGMT 表达和上调

Bax/Bcl-2 比率有关。在后续的实验中,笔者将致力于研究脑瘤一号方的有效成分以及脑瘤一号方联合 TMZ 治疗胶质瘤信号通路的基因检测和下游表达论证。

(致谢:感谢上海澎立生物医药提供的实验室场地、设备、试剂、动物和技术支持,感谢段继峰博士在本实验及论文撰写过程中给予的帮助与指导)

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Stupp R, Mason WP, Vand BM, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(10): 987-996.
- [2] Ramos AA, Pedro DFN, Lima CF, et al. Development of a new application of the comet assay to assess levels of O⁶-methylguanine in genomic DNA (CoMeth) [J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 60: 41-48.
- [3] Brada M, Judson I, Beale P, et al. Phase I dose-escalation and pharmacokinetic study of temozolomide (SCH 52365) for refractory or relapsing malignancies [J]. *Br J Cancer*, 1999, 81(6): 1022-1030.
- [4] Bradshaw TD, Stevens MFG, Zhang J. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance [J]. *Curr Mol Pharmacol*, 2012, 5(1): 102-114.
- [5] Xiaoyue C, Minjie Z, Haiyun G, et al. A novel enhancer regulates MGMT expression and promotes temozolomide resistance in glioblastoma [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 2949-2962.
- [6] Biao Y, Yan-Bin M, Sheng-Hua C. Silencing SATB1 overcomes temozolomide resistance by downregulating MGMT expression and upregulating SLC22A18 expression in human glioblastoma cells [J]. *Cancer Gene Ther*, 2018, 25(11-12): 309-316.
- [7] 宋萍,王学美,谢爽,等. 鲜壁虎冻干粉诱导 C6 胶质瘤细胞凋亡的血清药理学研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2004, 24(10): 919-921.
- [8] Yiming B, Han L, Dazhuang Y, et al. β -catenin contributes to cordycepin-induced MGMT inhibition and reduction of temozolomide resistance in glioma cells by increasing intracellular reactive oxygen species [J]. *Cancer Lett*, 2018, 435: 66-79.
- [9] Pistrutto G, Trisciuglio D, Ceci C, et al. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dys-

- function of its modulators and targeted therapeutic strategies[J]. *Aging*, 2016, 8(4): 603–619.
- [10] Bleicken S, Classen M, Padmavathi PV, et al. Molecular details of Bax activation, oligomerization, and membrane insertion[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(9): 6636–6647.
- [11] Yang HC, Wang JY, Bu XY, et al. Resveratrol restores sensitivity of glioma cells to temozolamide through inhibiting the activation of Wnt signaling pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(5): 6783–6800.
- [12] Chen Z, Wei X, Shen L, et al. 20(S)-ginsenoside-Rg3 reverses temozolamide resistance and restrains epithelial-mesenchymal transition progression in glioblastoma[J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(1): 389–400.
- [13] 熊远珍. 实验动物与人用药量的新换算[J]. *江西医学院学报*, 1997, 39(4): 41.
- [14] Zeng J, See A P, Phallen J, et al. Anti-PD-1 blockade and stereotactic radiation produce long-term survival in mice with intracranial gliomas[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2013, 86(2): 343–349.
- [15] Liu Y, Yan W, Zhang W, et al. MiR-218 reverses high invasiveness of glioblastoma cells by targeting the oncogenic transcription factor LEF1[J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(3): 1013–1021.
- [16] Omar AI, Mason WP. Temozolamide: The evidence for its therapeutic efficacy in malignant astrocytomas[J]. *Core Evid*, 2010, 15(4): 93–111.
- [17] Hegi ME, Liu L, Herman JG, et al. Correlation of O⁶-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity[J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(25): 4189–4199.
- [18] Li H, Yuan X, Yan D, et al. Long non-coding RNA MALAT1 decreases the sensitivity of resistant glioblastoma cell lines to temozolamide[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(3): 1192–1201.
- [19] 钱心兰. 钱伯文运用攻补兼施治疗肿瘤的经验[J]. *上海中医药杂志*, 1993, 6(1): 1–2.
- [20] Campbell KJ, Tait S. Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer[J]. *Open Biol*, 2018, 8(5): 180002.
- [21] Edlich F. BCL-2 proteins and apoptosis: recent insights and unknowns[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 500(1): 26–34.
- [22] Han J, Chen Q. MiR-16 modulate temozolamide resistance by regulating BCL-2 in human glioma cells[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(10): 12698.
- [23] Zhu D, Tu M, Zeng B, et al. Up-regulation of miR-497 confers resistance to temozolamide in human glioma cells by targeting mTOR/Bcl-2[J]. *Cancer Med*, 2017, 6(2): 452–462.
- [24] Shi L, Chen J, Yang J, et al. MiR-21 protected human glioblastoma U87MG cells from chemotherapeutic drug temozolamide induced apoptosis by decreasing Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 activity[J]. *Brain Res*, 2010, 1352(1): 255–264.
- [25] Przemyslaw Sitarek, Ewa Skala, Monika Toma, et al. A preliminary study of apoptosis induction in glioma cells via alteration of the Bax/Bcl-2-p53 axis by transformed and non-transformed root extracts of *Leonurus sibiricus L* [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(7): 8753–8764.
- [26] Pádua D, Rocha E, Gargiulo D, et al. Bioactive compounds from brown seaweeds: phloroglucinol, fucoxanthin and fucoidan as promising therapeutic agents against breast cancer[J]. *Phytochem Lett*, 2015, 14: 91–98.
- [27] Shin T, Ahn M, Hyun JW, et al. Antioxidant marine algae phlorotannins and radioprotection: A review of experimental evidence[J]. *Acta Histochem*, 2014, 116(5): 669–674.
- [28] Lu DY, Chang CS, Yeh WL, et al. The novel phloroglucinol derivative BFP induces apoptosis of glioma cancer through reactive oxygen species and endoplasmic reticulum stress pathways[J]. *Phytomedicine*, 2012, 19(12): 1093–1100.
- [29] Tsai NM, Chen YL, Lee CC, et al. The natural compound n-butylidenephthalide derived from *Angelica sinensis* inhibits malignant brain tumor growth *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Neurochem*, 2010, 99(4): 1251–1262.
- [30] 卢丹, 刘金平, 李平亚. 三萜类化合物抗癌活性研究进展[J]. *特产研究*, 2010, 32(1): 65–69.
- [31] 吕林林, 许丽娜. 抗脑胶质瘤中药的研究进展[J]. *中国现代应用药学*, 2014, 31(8): 1024–1031.

(收稿: 2018-11-23 在线: 2019-11-12)

责任编辑: 赵芳芳