

# 蜂毒素与化疗药物的协同作用及其可能机制的实验研究

王瑞平<sup>1</sup> 黄舒然<sup>2</sup> 周锦勇<sup>1</sup> 邹 玺<sup>1</sup>

**摘要** **目的** 分别观察蜂毒素联合 5-氟尿嘧啶(5-Fu)、顺铂(DDP)、多西紫杉醇(TXT) 抗人胃癌细胞株 BGC-823 增殖的效果,并初步探讨其作用机制。**方法** 运用中效原理进行统计分析,绘制 5-Fu、DDP 和 TXT 单药及分别与蜂毒素联合用药对该肿瘤细胞生长的剂量-效应曲线,确定联合用药时对肿瘤细胞的效应(FA)与合用指数(CI)的关系,判定药物间的相互作用。运用实时荧光定量 PCR 法检测蜂毒素分别联合 5-Fu、DDP 和 TXT 作用人胃癌细胞株 BGC-823 后对化疗药物相关基因表达的改变。**结果** (1)在一定的浓度范围内蜂毒素单药与 3 种化疗药物单药均对 BGC-823 细胞显示出了明显的生长抑制效果。(2)蜂毒素联合 5-Fu 作用于 BGC-823 细胞时,FA 在 0.35~0.75 时,CI<1。蜂毒素联合 DDP 作用于 BGC-823 细胞时,FA 在 0.55 左右,CI=1;FA<0.55,CI<1。蜂毒素联合 TXT 作用于 BGC-823 细胞时,整个区间内均可见 CI<1。(3)蜂毒素分别与 3 种化疗药物联合作用于细胞后,化疗药物相关基因胸苷酸合成酶(thymidylate synthetase, TS)、切除修复交叉互补基因 1(excision repair cross-complementing gene 1, ERCC1)、乳腺癌易感基因 1(breast cancer susceptibility gene 1, BRCA1)、 $\beta$  微管蛋白 III( $\beta$ -tubulin III, TUBB3)和微管相关蛋白 tau(microtubule-associated protein tau, MAPT)的表达明显低于空白对照组( $P<0.01$ )。**结论** 蜂毒素具有增强 5-Fu、DDP、TXT 对胃癌细胞 BGC-823 生长抑制效果的协同作用,其作用机制可能与下调化疗相关基因的表达有关。

**关键词** 蜂毒素;人胃癌细胞株 BGC-823;协同作用;实时荧光定量 PCR;化疗药物相关基因

Synergistic Interaction between Melittin and Chemotherapeutic Agents and Their Possible Mechanisms: an Experimental Research WANG Rui-ping<sup>1</sup>, HUANG Shu-ran<sup>2</sup>, ZHOU Jin-yong<sup>1</sup>, and ZOU Xi<sup>1</sup> 1 Department of Tumor, Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing (210029), China; 2 First Clinical Medical College, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing (210046), China

**ABSTRACT** **Objective** To evaluate the effect of melittin and 5-Fu, DDP, and TXT on human gastric cancer cell line BGC-823 and to primarily explore their possible mechanisms. **Methods** Median effect analysis was employed to determine the interaction between melittin and 5-Fu, DDP, TXT by analyzing the relationship between fraction affected (FA) and the combination index (CI) acquired from the dose-effect curve. Expressions of chemotherapeutic agent-associated genes of BGC-823 cells with or without treatment were measured by real-time fluorescent quantitative PCR. **Results** (1) Both melittin and chemotherapeutic agents inhibited the growth of BGC-823. (2) For BGC-823 cells were acted by 5-Fu + melittin, when FA ranged between 0.35-0.75, CI was less than 1. For BGC-823 cells were acted by DDP + melittin, when FA ranged 0.55 or so, CI=1; when Fa ranged below 0.55, CI was less than 1. For BGC-823 cells were acted by TXT + melittin, CI less than 1 could be seen in the whole interval. (3) After treatment suppressed were the expressions of chemotherapeutic agent-associated genes of BGC-823 cells such as thymidylate synthetase (TS), excision repair cross-complementing gene 1 (ERCC1), breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1),  $\beta$ -tubulin III (TUBB3), and microtubule-associated protein tau (MAPT). **Conclusions** Melittin had a synergistic effect on the cytotoxicity of chemotherapeutic agents. The possible mechanisms might be

基金项目:江苏省六大高峰人才项目(No.WS037);江苏省中医药管理局领军人才项目(No.LJ200908);江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)  
作者单位:1.江苏省中医院肿瘤科(南京 210029);2.南京中医药大学第一临床医学院(南京 210046)

通讯作者:邹 玺, Tel:025-86617141 转 91002, E-mail:zxverypaper@126.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.02.0224

associated with down-regulating chemotherapeutic agent-associated genes.

**KEYWORDS** melittin; human gastric cell line BGC-823; synergistic effect; Real time PCR; chemotherapeutic agent-associated gene

蜂毒是工蜂毒腺和副腺分泌出的具有芳香气味的淡黄色透明毒液,具有多种药理学和生物学活性的复杂混合物<sup>[1]</sup>。蜂毒素在蜂毒的众多成分中含量最高,约占其干重的 50% 左右。中医学应用蜂毒治疗风湿、类风湿性关节炎、肩周炎等疾病已有悠久的历史。近年来随着分离纯化技术的不断提高,在研究蜂毒成分、基本结构的基础上,探讨了其功能及作用机理,发现蜂毒素尚有抗肿瘤的作用<sup>[2,3]</sup>。而本课题组在前期实验研究中发现,小剂量的蜂毒注射可以提高小鼠的免疫功能<sup>[4]</sup>。临床研究中亦证实蜂毒注射液可以抑制肿瘤生长,与化疗合用能显著改善临床证候<sup>[5,6]</sup>。本次实验欲开展其联合临床常用化疗药物 5-氟尿嘧啶(5-Fu)、顺铂(DDP)、多西紫杉醇(TXT)对胃癌细胞 BGC-823 增殖的影响,并初步探讨作用机制。

### 材料与方法

1 细胞株 人胃癌细胞株 BGC-823 由江苏省中医院肿瘤科实验室保种并常规培养。

2 细胞培养 用含 10% 的小牛血清的 RPMI-1640 培养基,在 37℃、5% CO<sub>2</sub>、完全饱和湿度条件下常规培养,取对数生长期细胞进行实验。

3 药物及试剂 蜂毒素购自深圳伽马科技有限公司(浓度 ≥ 98%,批号:04182011);5-Fu 购自天津金耀有限公司(批号:1204021);DDP、TXT 购自山东齐鲁制药有限公司(批号:WA2A1210067、12111411);RPMI-1640 培养液购自 GIBCO 公司(批号:1074871);胰酶购自 Sigma 公司(批号:T4049);小牛血清购自杭州四季青公司(批号:120617);二甲亚砜(DMSO)、四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自 Biosharp 公司;RNA 提取试剂 TRIzol 购自 Invitrogen 公司;酚-氯仿购自 Sigma 公司;逆转录试剂盒购自 TaKaRa 公司(DRR047);TaqMan Universal PCR Master Mix 购自 Ambion 公司;TaqMan assays 探针由 Ambion 公司设计合成。

4 仪器 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司,7900HT 型号),CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(德国 herarus, HERA cell 100 型号),酶标仪(美国 BiOTEK 公司, ELX800 型号)

5 运用中效原理法测定蜂毒素与 5-Fu、DDP 及 TXT 的协同作用

5.1 实验分组 分为空白对照组、蜂毒素单药组、5-Fu 单药组、DDP 单药组、TXT 单药组、蜂毒素加 5-Fu 组、蜂毒素加 DDP 组、蜂毒素加 TXT 组,除空白对照组外,每组有 5 种不同浓度,分别用 A、B、C、D、E 表示,见表 1。

5.2 MTT 法测定药物效应 取对数生长期 BGC-823 细胞,实验时用 0.25% 胰酶常规消化收集细胞至离心管中,离心后重悬于完全培养液中,计数、调整细胞浓度为 5 × 10<sup>4</sup> 个/mL,接种于无菌的 96 孔培养板中。每孔加入含肿瘤细胞的 RPMI-1640 悬液 100 μL,培养 24 h 后吸去原有的培养液,按分组分别加入含有相应浓度药物的完全培养液 200 μL(表 1),空白对照组加入 200 μL 不含药物的完全培养液,于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养 48 h。用灭菌 PBS 小心清洗每孔 2 次,每孔加入 100 μL RPMI-1640 培养液和 20 μL MTT 溶液,继续培养 4 h,弃去全部上清,每孔加入 150 μL DMSO,振荡器振荡 10 min,使结晶完全溶解,在酶标仪波长 490 nm 处测出各孔吸光度值(OD),按抑制率计算公式计算抑制细胞的百分率。实验中每组每个浓度设 3 个平行复孔,重复 3 次,取其平均值。

5.3 药物联合应用效应评价 将 5 个浓度梯度的蜂毒素与 5 个浓度梯度的 5-Fu、DDP 及 TXT 单药或联合作用于人胃癌细胞株 BGC-823(表 1)。根据单药及联合用药效应,应用中效原理(Median-effect Principle, Chou-Talalay 联合指数法)评价药物间的相互作用<sup>[7,8]</sup>。药物作用效应即抑制率(FA) = 1 - (各组平均 OD 值/空白对照组平均 OD 值);根据中效

表 1 蜂毒素与 5-Fu、DDP 或 TXT 相互作用中药物浓度的选择 (μg/mL)

组别	蜂毒素	5-Fu	蜂毒素加 5-Fu	DDP	蜂毒素加 DDP	TXT	蜂毒素加 TXT
A	32	12	32 + 12	3	32 + 3	0.1	32 + 0.1
B	16	6	16 + 6	1.5	16 + 1.5	0.05	16 + 0.05
C	8	3	8 + 3	0.75	8 + 0.75	0.025	8 + 0.025
D	4	1.5	4 + 1.5	0.375	4 + 0.375	0.012 5	4 + 0.012 5
E	2	0.75	2 + 0.75	0.187 5	2 + 0.187 5	0.006 25	2 + 0.006 25

方程式计算出两药合用时在各种效应时的合用指数 CI。当  $CI < 1$ , 两药合用效应为协同;  $CI = 1$ , 两药合用效应为相加;  $CI > 1$ , 两药合用效应为拮抗。计算蜂毒素联合 5-Fu、DDP 及 TXT 用药组不同效应 (FA) 下的合用指数 (CI), 绘制 FA-CI 曲线, 从而评价两种药物联合应用时产生的效应是否为协同。

6 实时荧光定量 PCR 法检测蜂毒素联合 5-Fu、DDP、TXT 对相关基因表达的影响

6.1 实验分组 分为蜂毒素加 5-Fu 联合用药组 (蜂毒素 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 5-Fu 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、蜂毒素加 DDP 联合用药组 (蜂毒素 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , DDP 1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、蜂毒素加 TXT 联合用药组 (蜂毒素 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , TXT 0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 及不加蜂毒素的单药对照组 (对照组): 5-Fu 组 (6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、DDP 组 (1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 及 TXT 组 (0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。

6.2 RNA 提取 取对数生长期的人胃癌细胞 BGC-823 以  $2 \times 10^5$  个/mL 密度接种于直径 10 cm 的培养皿中, 培养 24 h 细胞贴壁后, 弃上清, 按分组分别加入含相应药物浓度的完全培养液。继续培养 6 h 后, 弃上清, 用 PBS 洗 2 次, 每皿加 1 mL TRIzol, 反复吹打后收集细胞于试管中, 每管加 0.2 mL 酚氯仿溶液萃取, 4℃ 以 10 000 r/min 离心 15 min, 取上清用异丙醇沉淀 RNA, 75% 乙醇清洗 2 次后, 取沉淀加 40  $\mu\text{L}$  无 RNA 酶水即得细胞总 RNA。

6.3 RNA 的制备及定量 细胞总 RNA 提取参照 TRIzol 试剂说明书进行, 取 2  $\mu\text{L}$  RNA 稀释后, 在紫外分光光度仪上测定 RNA 样品  $OD_{260}$  和  $OD_{280}$  值。观测此比值, 以在 1.8 ~ 2.0 之间为佳。

6.4 逆转录 按照说明书操作, 先进行去除基因组 DNA 操作: 取 1  $\mu\text{g}$  提取的总 RNA 加入 2  $\mu\text{L}$  的 Buffer 以及 1  $\mu\text{g}$  DNA Eraser, 最后加入 RNase Free  $\text{H}_2\text{O}$  使总体积达到 10  $\mu\text{L}$ , 42℃ 反应 2 min, 冷却到 4℃。逆转录反应是取上述所得 RNA 中加入 Buffer 4  $\mu\text{L}$ 、RT Enzyme Mix I 1  $\mu\text{L}$ 、RT Primer Mix 1  $\mu\text{L}$ 、RNase Free  $\text{H}_2\text{O}$  4  $\mu\text{L}$  得到总体积 20  $\mu\text{L}$  的反应液, 37℃ 孵育 15 min, 85℃ 5 s, -20℃ 冻存备用。

6.5 实时荧光定量 PCR 实验 严格按 ABI 公司试剂盒的操作说明书进行, 引物探针订自 ABI 公司, 其货号分别为 Hs99999903 (ACTB 基因), Hs00426591 (TS 基因), Hs00213491 (MAPT 基因), Hs00964965 (TUBB3 基因), Hs00157415 (ERCC1 基因), Hs00173233 (BRCA1 基因)。PCR 扩增条件为: 预变性: 50℃ 2 min, 95℃ 10 min,

循环 1 次; PCR 反应: 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 循环 40 次。以 ACTB 基因为内参, 采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  方法对结果进行分析, 计算  $\Delta\text{Ct}$  (循环数) =  $\text{Ct}_{\text{目的基因}} - \text{Ct}_{\text{内参基因}}$ ;  $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{给药组}} - \Delta\text{Ct}_{\text{对照组}}$ ; 差别倍数 =  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ , 其中正常对照组的数值设为 1。检测胸苷酸合成酶 (thymidylate synthetase, TS)、切除修复交叉互补基因 1 (excision repair cross-complementing gene 1, ERCC1)、乳腺癌易感基因 1 (breast cancer susceptibility gene 1, BRCA1)、 $\beta$  微管蛋白 III ( $\beta$ -tubulin III, TUBB3) 和微管相关蛋白 tau (microtubule-associated protein tau, MAPT), 不同基因在不同用药组中检测, 见表 2。

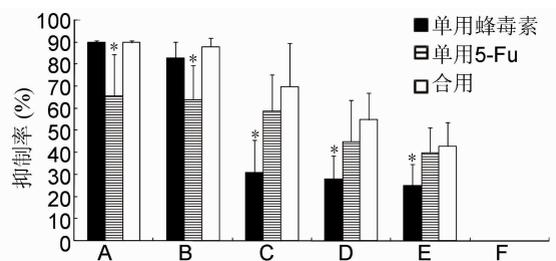
表 2 蜂毒素与 5-Fu、DDP 或 TXT 联合用药时药物浓度的选择 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

检测基因	5-Fu	蜂毒素加 5-Fu	DDP	蜂毒素加 DDP	TXT	蜂毒素加 TXT
TS	6	16 + 6	0	0	0	0
ERCC1, BRCA1	0	0	1.5	16 + 1.5	0	0
MAPT, TUBB3	0	0	0	0	0.05	16 + 0.05

7 统计学方法 统计分析采用 SPSS 13.0 软件, 数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1 蜂毒素、5-Fu 单用及联合应用时对 BGC-823 细胞增殖的影响 (图 1) 整个给药区间内, 蜂毒素加 5-Fu 组的抑制率均高于 5-Fu 单药组。在 A、B 浓度范围内, 与 5-Fu 组比较, 蜂毒素加 5-Fu 组对细胞的抑制率较高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 随着给药浓度的降低, 蜂毒素加 5-Fu 组的抑制率明显高于蜂毒素单药组, 且差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。



注: A、B、C、D、E 为不同浓度, F 为空白对照组; 与同浓度联合用药比较,  $*P < 0.05$ ; 图 2、3 同

图 1 蜂毒素、5-Fu 单用及联合应用时对 BGC-823 细胞增殖的影响

2 蜂毒素、DDP 单用及联合应用时对 BGC-823 细胞增殖的影响(图 2) 在 C、D 浓度范围内,蜂毒素加 DDP 组对胃癌细胞 BGC-823 体外增殖有着明显的抑制作用,明显高于蜂毒素单药组与 DDP 单药组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。A、B 浓度组,蜂毒素加 DDP 组的抑制率未见明显差别,而 E 浓度组中,蜂毒素加 DDP 组的抑制率均高于 DDP 单药组( $P < 0.05$ )。

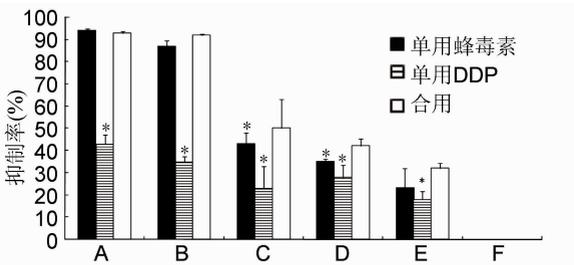


图 2 蜂毒素、DDP 单用及联合应用时对 BGC-823 细胞增殖的影响

3 蜂毒素、TXT 单用及联合应用时对 BGC-823 细胞增殖的影响(图 3) 蜂毒素对胃癌细胞 BGC-823 体外增殖有着明显的抑制作用,药物浓度越大,抑制作用越强。TXT 单药组及蜂毒素加 TXT 组在整个浓度区间对细胞均有明显的抑制。在 C、D、E 浓度区间内,蜂毒素加 TXT 组的抑制率均明显高于蜂毒素单药组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );在 B、E 浓度区间内也明显高于 TXT 组( $P < 0.05$ )。

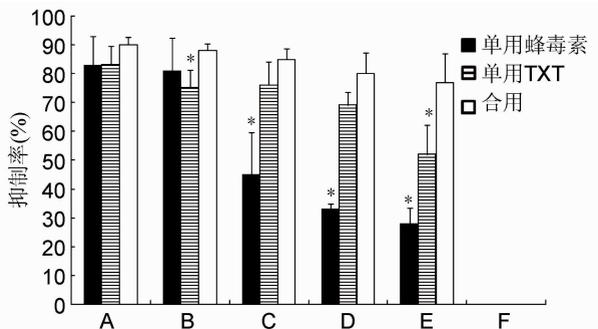


图 3 蜂毒素、TXT 单用及联合应用时对 BGC-823 细胞增殖的影响

4 蜂毒素联合 5-Fu 或 DDP 作用于 BGC-823 细胞的 CI 曲线(图 4) 蜂毒素联合 5-Fu 作用于 BGC-823 细胞时,当 FA 在 0.35 ~ 0.75 时,CI < 1。蜂毒素联合 DDP 作用后,当 FA 在 0.55 左右,即两药合用使 55% 肿瘤细胞生长受抑制时,CI = 1;当 FA < 0.55 (药物在低浓度下的联合),CI < 1。

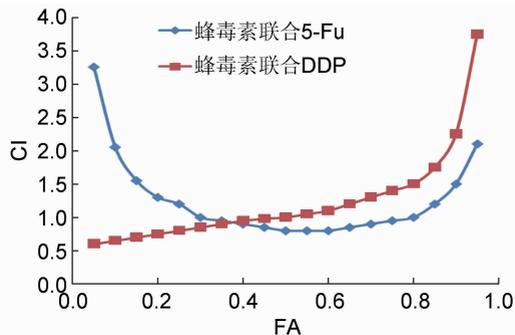


图 4 蜂毒素联合 5-Fu 或 DDP 作用于 BGC-823 的 CI 曲线

5 蜂毒素联合 TXT 作用于 BGC-823 细胞的 CI 曲线(图 5) 蜂毒素联合 TXT 作用于 BGC-823 细胞时,在整个区间内均可见 CI < 1。

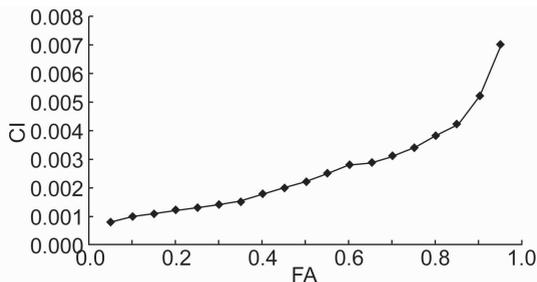
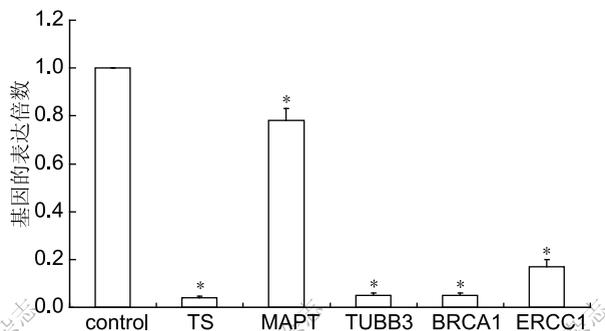


图 5 蜂毒素联合 TXT 作用于 BGC-823 的 CI 曲线

6 蜂毒素联合 5-Fu、DDP、TXT 对 TS、MART、TUBB3、BRCA1 以及 ERCC1 基因表达的影响(图 6) 蜂毒素联合 5-Fu、DDP 或 TXT 作用于人胃癌 BGC-823 细胞株 6 h 后,ERCC1、BRCA1、TUBB3、BRCA1 以及 ERCC1 基因表达水平与空白对照组比较,发生了较为明显的改变,相关基因表达水平显著下降( $P < 0.01$ )。



注:与对照组比较,\* $P < 0.01$

图 6 蜂毒素联合化疗药物作用于人胃癌细胞株 BGC-823 后基因表达的改变

## 讨 论

联合用药是肿瘤化疗的基本原则之一,其目的是为了获得协同作用,减少用药剂量,降低不良反应<sup>[9]</sup>。本实验应用中效原理,以胃癌细胞株 BGC-823 为研究对象,研究蜂毒素与 5-Fu、DDP、TXT 等常规化疗药物间的相互作用,结果显示在相应的浓度区间里,蜂毒素与这 3 个常用的化疗药物间存在着协同的作用。

目前研究显示,在与化疗药物相关的基因中,5-Fu、TXT 和 DDP 研究较多。5-Fu 作用的靶点是 TS,其以二聚体形式存在,在体内催化脱氧尿苷酸(dUMP)转变为脱氧胸苷酸(dTMP)参与 DNA 合成。5-Fu 通过与 TS 形成复合物,阻断 DNA 合成,使肿瘤细胞停止分裂<sup>[10,11]</sup>。在本次实验中,蜂毒素与 5-Fu 联合运用的过程中,细胞抑制率在 35%~75% 时 CI < 1,两药具有协同作用,同时联合用药后的 TS 基因表达显著下降,提示蜂毒素的协同机制可能与抑制了此基因的功能有关。

ERCC1 是第一个被发现的人类核苷酸切除修复因子,其定位于人类第 19 号染色体短臂 13.2-13.3 位点上(19q13.2-13.3),具有 DNA 链的切割和损伤识别功能,其在核苷酸切除修复系统途径中发挥着识别损伤 DNA 及链间切割等关键作用,同时研究发现,ERCC1 与 DDP 耐药的形成密切相关<sup>[12]</sup>。ERCC1 过表达可使停滞在 G<sub>2</sub>/M 期的损伤 DNA 迅速修复,尤其是 ERCC1 能使铂类诱导的 DNA 络合物清除增加,导致耐药<sup>[13]</sup>。BRCA1 是具有遗传倾向的乳腺癌和卵巢癌易感基因。既往研究表明 BRCA1 一方面可消除 DNA 损伤剂如 DDP 等引起的凋亡表型,从而增加肿瘤细胞对该类药物的耐药性<sup>[14]</sup>。另一方面,BRCA1 与 RNA 聚合酶 II 在 C 端相连,作用于组蛋白去乙酰化酶复合物,故能调节细胞核内的转录水平。而使用蜂毒素与 DDP 联合运用,实验结果显示当细胞抑制率 < 55% 时 CI < 1,说明在该抑制率的浓度区间,两药具有协同作用;同时联合用药后的 ERCC1 和 BRCA1 基因的表达均下调,说明蜂毒素可能也通过抑制了这两个基因的表达而加强了 DDP 的作用效果。

微管作为细胞骨架的重要组成成分,参与细胞形态的维持、细胞内物质的运输、细胞运动及细胞分裂增殖等活动<sup>[15]</sup>。紫杉醇通过与 β 微管蛋白 N 端的 31 个氨基酸残基和中段的 217~231 氨基酸残基结合,增加组成微管的 13 根原丝的相互作用,稳定微管蛋白构象,从而抑制微管解聚,使细胞复制中止在 M 期,进

而引起细胞凋亡<sup>[16]</sup>。许多学者分别对不同细胞系进行了各个 β 微管蛋白亚型与紫杉类药物耐药相关性的研究,均证明其表达可以影响紫杉类药物的疗效,其中包括非小细胞肺癌和卵巢癌等<sup>[17,18]</sup>。而微管相关蛋白则是一类和微管蛋白结合的蛋白质的统称,结合后即可以改变微管蛋白的性质,有的可以诱导微管蛋白聚合,有的则促进微管蛋白和其他组交联<sup>[19,20]</sup>。已有研究表明,乳腺癌及胃癌等肿瘤组织中微管相关蛋白中 MAPT 蛋白高表达与紫杉类药物耐药有关<sup>[21]</sup>。本实验结果表明蜂毒素与 TXT 在所有的浓度区间内均可见 CI < 1,提示在所有的浓度范围内均具有协同作用。而两药联用后的 MAPT 和 TUBB3 基因表达显著下调,说明蜂毒素对这两个关键的因子也起到了抑制作用。

本实验运用实时定量 PCR 的方法检测蜂毒素分别联合 5-Fu、DDP、TXT 作用于胃癌细胞株 BGC-823 后相关基因的表达。结果显示,经联合用药后,其化疗药物相关基因的表达水平均明显下降,提示,蜂毒素联合 5-Fu、DDP、TXT 可提高胃癌细胞 BGC-823 对相关化疗药物的敏感性。

综上所述,本实验证明了蜂毒素能与 5-Fu、DDP、TXT 发挥协同抗肿瘤作用,进一步的实验提示蜂毒素可能的分子机制是通过下调与 5-Fu 相关的 TS 基因,与 TXT 相关的 MAPT、TUBB3 基因,与 DDP 相关的 ERCC1、BRCA1 基因等化疗相关的基因,这为今后深入研究蜂毒素的抗肿瘤作用奠定了实验基础。

## 参 考 文 献

- [1] Oren Z, Shai Y. Selective lysis of bacteria but not mammalian cells by diastereomers of melittin: structure-function study [J]. *Biochemistry*, 1997, 36(7): 1826-1835.
- [2] 王硕丰,杨本明,李立标,等. 蜂毒素的药理作用研究及展望 [J]. *天津药学*, 2003, 15(4): 53-57.
- [3] 黄舒然,王瑞平,邹玺. 蜂毒素抗肿瘤作用的研究进展 [J]. *江苏中医药*, 2011, 43(10): 91-93.
- [4] 戴虹,朱超林,王居祥,等. 蜂毒注射液对移植性肉瘤 S180 小鼠免疫功能的影响 [J]. *南京中医药大学学报*, 2007, 23(2): 102-103.
- [5] 王居祥,朱超林,王瑞平,等. 蜂毒注射液治疗恶性肿瘤的临床观察 [J]. *南京中医药大学学报*, 2006, 22(3): 157-159.
- [6] 王居祥,朱超林,王瑞平,等. 蜂毒注射液治疗轻、中度癌性疼痛 30 例临床观察 [J]. *南京中医药大学学报*, 2006, 22(4): 225-227.

- [7] Chou TC, Motzer RJ, Tong Y, et al. Computerized quantitation of synergism and antagonism of taxol, topotecan and cisplatin against human teratocarcinoma cell growth: a rational approach to clinical protocol design[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1994, 86(20): 1517-1524.
- [8] Kaufmann SH, Peereboom D, Buckwalter CA, et al. Cytotoxic effects of topotecan combined with various anticancer agents in human cancer cell lines[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1996, 88(11): 734-741.
- [9] Yamaguchi K, Nakagawa S, Yabusaki H, et al. Combination chemotherapy with 5-fluorouracil, cisplatin and paclitaxel for pretreated patients with advanced gastric cancer [J]. *Anticancer Res*, 2007, 27(5B): 3535-3539.
- [10] Johnston PG, Liang CM, Henry S, et al. Production and characterization of monoclonal antibodies that localize human thymidylate synthase in the cytoplasm of human cell and tissue[J]. *Cancer Res*, 1991, 51(24): 6668-6676.
- [11] Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(5): 330-338.
- [12] Kirschner K, Melton DW. Multiple roles of the ERCC1-XPF endonuclease in DNA repair and resistance to anticancer drugs [J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(9): 3223-3232.
- [13] Altaha R, Liang X, Yu JJ, et al. Excision repair cross complementing-group 1: gene expression and platinum resistance[J]. *Int J Mol Med*, 2004, 14(6): 959-970.
- [14] Rosell R, Danenberg KD, Alberola V, et al. Ribonucleotide reductase messenger RNA expression and survival in gemcitabine/cisplatin treated advanced non-small cell lung cancer patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(4): 1318-1325.
- [15] Starita LM, Parvin JD. The multiple nuclear functions of BRCA1: transcription, ubiquitination and DNA repair[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2003, 15(3): 345-350.
- [16] Swanton C, Marani M, Pardo O, et al. Regulators of mitotic arrest and ceramide metabolism are determinants of sensitivity to paclitaxel and other chemotherapeutic drugs [J]. *Cancer Cell*, 2007, 11(6): 498-512.
- [17] Wehbe H, Kearney CM, Pinney KG. Combretastatin A-4 resistance in H460 human lung carcinoma demonstrates distinctive alterations in beta-tubulin isotype expression[J]. *Anticancer Res*, 2005, 25(6B): 3865-3870.
- [18] Umezu T, Shibata K, Kaji YH, et al. Taxol resistance among the different histological subtypes of ovarian cancer may be associated with the expression of class III  $\beta$ -tubulin [J]. *Int J Gynecol Pathol*, 2008, 27(2): 207-212.
- [19] Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, et al. A protein factor essential for microtubule assembly [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1975, 72(5): 1858-1862.
- [20] Al-Bassam J, Ozer RS, Safer D, et al. MAP2 and tau bind longitudinally along the outer ridges of microtubule protofilaments[J]. *J Cell Biol*, 2002, 157(7): 1187-1196.
- [21] Andre F, Hatzis C, Anderson K, et al. Microtubule-associated protein-tau is a bifunctional predictor of endocrine sensitivity and chemotherapy resistance in estrogen receptor positive breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(7): 2061-2067.

(收稿:2013-01-11 修回:2013-11-08)