

· 基础研究 ·

南方红豆杉水提物与厄洛替尼联用抑制裸鼠 A549 肺癌移植瘤生长及其机制探析

崔庆丽^{1,2} 叶平³ 舒琦瑾² 邵梅^{2,4}

摘要 目的 研究南方红豆杉水提物联合厄洛替尼抑制裸鼠 A549 移植瘤生长及其机制。**方法** 建立荷瘤裸鼠模型,随机分为低剂量厄洛替尼组(A组)、标准剂量厄洛替尼组(B组)、低剂量厄洛替尼联合南方红豆杉水提物组(C组)、标准剂量厄洛替尼联合南方红豆杉水提物组(D组)、南方红豆杉水提物组(E组)、对照组(F组),每组 12 只,接种 24 h 后连续给药 7 周,采血 1 mL、取瘤组织,计算抑瘤率,金氏公式分析两药联合作用。**Real-time PCR** 和 **ELISA** 法分别检测表皮生长因子(EGFR)、环氧化酶(cyclooxygenase, COX)-2 及 B 细胞淋巴瘤-2(B cell lymphoma-2, BCL-2) mRNA 和蛋白水平。**结果** 与 F 组比较, B~E 组裸鼠移植瘤重均明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。低剂量厄洛替尼和南方红豆杉水提物的金氏值为 0.92,标准剂量厄洛替尼和南方红豆杉水提物的金氏值为 0.96,均为两药合用单纯相加。与 F 组比较, D、E 组 EGFR mRNA 水平、A~E 组 COX-2 mRNA 水平及 B~D 组 Bcl-2 mRNA 水平均明显降低, B~E 组 COX-2 蛋白水平及 C、D 组 Bcl-2 蛋白水平均明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 南方红豆杉水提物与低剂量厄洛替尼、标准剂量厄洛替尼均有相加抑瘤作用,两者联合抑瘤作用机制可能与下调 COX-2 和 Bcl-2 mRNA 及蛋白表达水平有关。

关键词 南方红豆杉;厄洛替尼;A549 肺癌;移植瘤;抑制作用

Study on Inhibitory Effect of Aqueous Extract of *Taxus Chinensis* var. *mairei* Combined Erlotinib on A549 Xenograft in Nude Mice and Its Mechanism CUI Qing-li^{1,2}, YE Ping³, SHU Qi-jin², and SHAO Mei^{2,4} 1 Department of Integrated Chinese and Western Medicine, Affiliated Oncology Hospital of Zhengzhou University, Henan Cancer Hospital, Zhengzhou (450008), China; 2 Department of Oncology, First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou (310006), China; 3 Department of Genito-immunology, Litongde Hospital, Hangzhou (310000), China; 4 Department of Gastroenterology, The 81st Hospital of Chinese People's Liberation Army, Nanjing (210002), China

ABSTRACT Objective To study the effect of aqueous extract of *Taxus chinensis* var. *mairei* (AETC) combined Erlotinib on the growth of A549 xenograft in nude mice and its mechanism. **Methods** The xenograft model in nude mice was established by inoculating A549 cells subcutaneously. BALB/c nude mice bearing A549 xenograft were randomly divided into six groups, i.e., the low dose Erlotinib group (A), the standard dose Erlotinib group (B), the low dose Erlotinib combined AETC group (C), the standard dose Erlotinib combined AETC group (D), the AETC group (E), the control group (F), 12 in each group. Different medication was performed for 7 successive weeks after 24 h. One mL blood was withdrawn and tumor tissues taken. The tumor inhibition rate was calculated. The combined effect was analyzed by Jin's Formula [$Q = Ea + b/(Ea + Eb - Ea \times Eb)$]. mRNA and protein expression levels of epidermal growth factor receptor (EGFR), cyclooxygenase-2 (COX-2), and B cell lymphoma-2 (Bcl-2) in xenografts were detected using real-time RT-PCR and ELISA. **Results** Compared with Group F, the xeno-

基金项目:浙江省自然科学基金项目(No.Y2081051);浙江省中医药管理局重点项目(No. 2009ZA003)

作者单位:1.郑州大学附属肿瘤医院河南省肿瘤医院中西医结合科(郑州 450008);2.浙江中医药大学附属第一医院肿瘤科(杭州 310006);3.浙江省立同德医院生殖免疫科(杭州 310000);4.中国人民解放军第八十一医院消化科(南京 210002)

通讯作者:舒琦瑾, Tel:13605706566, Email:shuqijinhz@163.com

DOI: 10. 7661/CJIM. 2015. 05. 0572

graft weight was obviously lowered in Group B-E ($P < 0.05, P < 0.01$). The q value was 0.92 in Group C and 0.96 in Group D, which was obtained by simple adding of the two drugs. Compared with Group F, EGFR mRNA expression in Group D and E, COX-2 mRNA expression in Group A-E; Bcl-2 mRNA expression in Group B-D; COX-2 protein expression in Group B-E; Bcl-2 protein expression in Group C and D were obviously lowered with statistical difference ($P < 0.05, P < 0.01$). Conclusions AETC combined low dose and standard dose Erlotinib had synergistic effect on tumor inhibition. Its mechanism might be associated with down-regulating mRNA and protein expression levels of COX-2 and Bcl-2.

KEYWORDS *Taxus chinensis* var. *mairei* Cheng et L. K.; Erlotinib; A549 cell; xenograft; inhibitory effect

南方红豆杉 (*Taxus chinensis* var. *mairei* Cheng et L.K) 为红豆杉科红豆杉属, 其水提物为国内临床应用的主要形式。已有研究表明南方红豆杉水提物为多靶点抗肿瘤药物, 其作用机制与紫杉醇明显不同, 主要有效成份并非紫杉醇^[1]。南方红豆杉水提物可能通过抑制 Survivin 蛋白, 诱导凋亡^[2]等途径抑制 A549 细胞增殖^[3]起到抗肿瘤效果。厄洛替尼 (Erlotinib) 为目前常用的非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 靶向治疗药物之一, 临床发现南方红豆杉水提物与厄洛替尼联合应用可提高抗肿瘤效应, 但体内作用机制不明确。

本实验通过建立荷 A549 肺腺癌裸鼠模型, 观察不同剂量厄洛替尼及南方红豆杉水提物单用或联合给药对移植瘤影响, 判断两者联合作用类型, 并从 mRNA 和蛋白水平对其机制进行初步探析。

材料与方法

1 动物及细胞株 SPF 级 6 周龄雄性裸鼠 72 只, 购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 生产许可证号: SCXK(沪)2008-0016。由浙江中医药大学动物实验中心提供无特定病原体 (specified pathogens free, SPF) 级层流架中, 笼具、垫料、饮水、饲料均经灭菌处理, 饲养和实验处理按照无菌操作规范操作, 适应性饲养 3 天。人肺腺癌细胞株 A549, 细胞纯度 93%, 购自中国科学院上海细胞生物研究所。

2 试剂及仪器 南方红豆杉: 宁波泰康红豆杉生物工程有限公司生产, 8 g/袋。厄洛替尼, 化学名称: N-(3-乙炔苯基)-6,7-双(2-甲氧乙氧基)-4-喹啉胺盐酸盐, 分子式: $C_{22}H_{23}N_3O_4 \cdot HCl$, 分子量: 429.90, 规格: 150 mg/片, 购自上海罗氏制药有限公司, 进口药品注册账号: H20090225。Hylcone 胎牛血清 (美国 Thermo 公司), F12-K 培养液 (美国 GIBCO 公司), EGFR、COX-2、Bcl-2、GAPDH 引物: 上海生工生物工程有限公司, SYBR Premix Ex TaqTM (Per-

fect Real Time) (Takara 公司), PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Takara 公司), 氯仿、异丙醇、无水乙醇等试剂均为国产分析纯 (上海化学试剂公司), ELISA 试剂盒 (美国 R&D 公司)。Elx808 型酶标仪 (美国 BioTek 公司), BX20 型荧光显微镜摄像机 (日本 Olympus 公司), DK-80 型电热恒温水浴箱 (上海精宏实验设备有限公司), 3111 型水套式 CO₂ 细胞培养箱 (美国 Thermo 公司), SIM-F140 型制冰机 (日本 Sanyo 公司), Nanopure UV/UF 型超纯水器 (美国 Thermo 公司), NanoDrop 2000 超微量分光光度计 (美国 Thermo 公司), ABI9700PCR 扩增仪 (美国 ABI 公司), ABI7500 全自动荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司), 精密电子天平: AB204-E 型 (瑞士梅特勒-托利多集团)。

3 药物制备 按照人和动物体表面积等效剂量折算法^[4], 计算标准剂量厄洛替尼 0.02 mg/(g·d), 南方红豆杉水提物 1.04 mg/(g·d), 低剂量厄洛替尼为标准剂量厄洛替尼的 1/2。厄洛替尼磨细粉后生理盐水稀释灌胃, 厄洛替尼药品现配现用。南方红豆杉在冷水中充分浸泡 0.5 h, 加药物 5~10 倍的冷水, 煮沸后控温电炉保持微沸 30 min, 滤网过滤药渣后, 浓煎至 104 mg/mL。南方红豆杉水提物保存在 4℃ 冷藏冰柜中。

4 细胞培养及处理 用体积分数为 10% 的胎牛血清 F12-K 培养液, 在 37℃、体积分数为 5% 的 CO₂ 培养箱中培养人肺腺癌细胞株 A549。实验时取对数生长期细胞。

5 动物模型建立及分组给药 参照文献^[5], 取浓度为 1×10^7 /mL 的 A549 单细胞悬液, 每只裸鼠颈背部皮下接种 0.2 mL。接种后将 72 只裸鼠随机分为低剂量厄洛替尼组 (A 组)、标准剂量厄洛替尼组 (B 组)、低剂量厄洛替尼联合南方红豆杉水提物组 (C 组)、标准剂量厄洛替尼联合南方红豆杉水提物组 (D 组)、南方红豆杉水提物组 (E 组)、对照组 (F 组), 每

组 12 只。接种后 24 h 灌胃给药 7 周,每天 1 次,给药量分别为 A 组 0.01 mg/(g·d) 厄洛替尼、B 组 0.02 mg/(g·d) 厄洛替尼、C 组 0.01 mg/g/d 厄洛替尼加 1.04 mg/(g·d) 南方红豆杉水提物、D 组 0.02 mg/(g·d) 厄洛替尼加 1.04 mg/(g·d) 南方红豆杉水提物、E 组 1.04 mg/(g·d) 南方红豆杉水提物、F 组等体积生理盐水。10 天后 72 只裸鼠全部成瘤,瘤体大小相近,造模成功率为 100%。

6 抑瘤率检测 成瘤后每 3 日测移植瘤长径及短径,移植瘤体积按通用标准公式^[6] $V = a \times b^2 / 2$ 计算肿瘤体积(V 为移植瘤体积,单位 mm^3 , a 为移植瘤最长径, b 为移植瘤最短径,单位均为 mm)。观察肿瘤生长速度,绘制裸鼠移植瘤生长曲线。连续给药 7 周后,摘眼球取血 1 mL,脱颈椎处死后剥取瘤组织,称重、液氮保存,计算抑瘤率,采用金氏公式^[7] 判断联合作用类型。金氏公式 $Q = Ea + b / (Ea + Eb - Ea \times Eb)$ 判断两药相互作用类型,其中 $Ea + b$ 为合用药物的抑制率, Ea 、 Eb 分别为 A 药、B 药单独用药的抑制率。分别计算低剂量厄洛替尼联合南方红豆杉水提物组、标准剂量厄洛替尼联合南方红豆杉水提物组的金氏值。 Q 在 0.85 ~ 1.15 内为两药合用单纯相加, $Q > 1.15$ 为协同作用, $Q < 0.85$ 则表示两药合用有拮抗作用。

7 移植瘤组织中各基因 mRNA 水平 Real-time PCR 检测移植瘤组织中表皮生长因子(EGFR)、环氧酶(Cyclooxygenase, COX)-2 及 B 细胞淋巴瘤-2(B cell lymphoma-2, BCL-2) mRNA 水平。取 50~100 mg 移植瘤组织放入 1.5 mL EP 管中,Trizol 法提取总 RNA, Nanodrop 2000 分光光度计测定 RNA 浓度,确定 RNA 的纯度及浓度, A260/A280 在 1.8~2.0 之间。按试剂盒说明进行 PCR 逆转录后,荧光定量 PCR 仪进行扩增。以管家基因 GAPDH 为内参基因,设计引物如下:EGFR 上游引物为 5'-ATGAAAACACCTATGCCTTAGCC-3', 下游引物为 5'-TAAGTCCGCATGGGCAGTTC-3', 扩增产物长度为 83 bp; COX-2 上游引物为 5'-CTCGG-GAACTGCTTTGTGTA-3', 下游引物为 5'-CCTC-CTCCAATTGTTCTGT-3', 扩增产物长度 80 bp。Bcl-2 上游引物为 5'-AGCGTCAACAGGGAGAT-GTC-3', 下游引物为 5'-TCAGGTACTIONCAGTCATC-CACAG-3', 扩增产物长度 64 bp; GAPDH 上游引物为 5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3', 下游引物为 5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3', 扩增产物长度 123 bp。反应条件:95 °C, 3 min, 1 个循环进行预变性, 95 °C, 5 s, 60 °C, 1 min, 循环 40 次。熔解

曲线分析:95 °C, 15 s, 20 °C/s; 60 °C, 15 s, 20 °C/s; 95 °C, 15 s, 0.1 °C/s。荧光定量结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析, 统计相对表达量 RQ (Relative Quantification) 值。

8 各组裸鼠血清中各蛋白表达 采 1 mL 血, 室温下血液凝固 1~2 h, 4 °C 冰箱过夜后用 4 °C 离心机, 3 000 r/min, 离心 10 min, 分离血清, 将血清移至无菌 EP 管, 保存于 4 °C 冰柜中。采用双抗体夹心 ELISA 法测定血清中 EGFR、COX-2 及 Bcl-2 含量, 在全波长扫描酶标仪 450 nm 处检测光密度(optical density, OD) 值。具体实验步骤参照试剂盒说明操作。

9 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件分析处理。计量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用 F 检验, 组间两两比较选用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组移植瘤重及抑瘤率结果比较(图 1, 表 1) 各组初始瘤体积组间差异无统计学意义, 瘤体大小一致性较好, 观察期间, F 组生长速度最快。裸鼠移植瘤生长曲线显示, 随用药时间延长, 各实验组与对照组瘤体生长率显示出差异性, 其中 B 组和 D 组抑瘤效果最好, C 组和 E 组抑瘤效果次之, A 组抑瘤效果较差。与 F 组比较, B~E 组裸鼠移植瘤重均明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

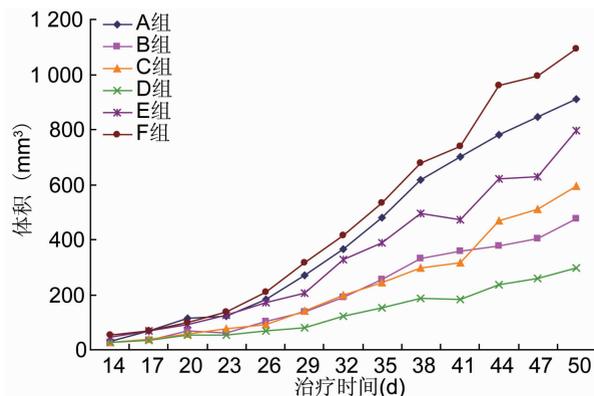


图 1 裸鼠瘤体变化

表 1 各组裸鼠 A549 移植瘤重及抑瘤率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	瘤重 (mg)	抑瘤率 (%)
A	12	722 ± 33.9	27.78
B	12	467 ± 20.2**	53.33
C	12	478 ± 31.3**	52.22
D	12	311 ± 9.7**	68.89
E	12	600 ± 15.8*	40.09
F	12	1 000 ± 75.2	—

注:与 F 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 下表同

表 2 各组移植瘤组织 EGFR、COX-2 及 Bcl-2 mRNA 水平结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	EGFR RQ 值	COX-2 RQ 值	Bcl-2 RQ 值
A	12	8.041 640 \pm 0.821 869	3.962 180 \pm 0.285 602 *	3.984 640 \pm 0.683 086
B	12	6.069 900 \pm 0.678 420	2.701 110 \pm 0.238 892 **	2.480 450 \pm 0.508 573 *
C	12	5.679 800 \pm 0.811 605	2.314 500 \pm 0.260 650 **	2.493 400 \pm 0.666 989 *
D	12	4.074 100 \pm 0.589 267 *	2.567 440 \pm 0.423 589 **	2.429 400 \pm 0.501 333 *
E	12	4.173 400 \pm 0.725 019 *	2.921 200 \pm 0.369 578 **	3.052 700 \pm 0.404 558
F	12	8.151 200 \pm 0.471 707	6.320 600 \pm 0.365 413	4.617 900 \pm 0.107 658

2 南方红豆杉水提取物与厄洛替尼的联合作用类型结果 根据金氏公式计算后得出,低剂量厄洛替尼和南方红豆杉水提取物的金氏值为 0.92,标准剂量厄洛替尼和南方红豆杉水提取物的金氏值为 0.96,均为两药合用单纯相加。

3 各组移植瘤组织 EGFR、COX-2 及 Bcl-2 mRNA 水平结果比较(表 2) 与 F 组比较,D、E 组 EGFR mRNA 水平、A~E 组 COX-2 mRNA 水平及 B~D 组 Bcl-2 mRNA 水平均明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

4 各组裸鼠血清中 EGFR、COX-2 及 Bcl-2 蛋白表达水平结果比较(表 3) 与 F 组比较,B~E 组 COX-2 蛋白水平及 C、D 组 Bcl-2 蛋白水平均明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 3 各组荷瘤裸鼠血清中各基因蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	EGFR	COX-2	Bcl-2
A	32.048 9 \pm 8.864 0	2.980 1 \pm 0.245 8	5.258 9 \pm 0.789 9
B	29.035 0 \pm 2.635 0	0.924 0 \pm 0.187 3 *	3.982 0 \pm 0.687 5
C	28.265 0 \pm 5.907 0	0.902 3 \pm 0.158 7 *	3.658 0 \pm 0.683 1 *
D	26.103 0 \pm 4.305 0	0.894 0 \pm 0.225 0 *	3.542 9 \pm 0.153 3 *
E	30.473 4 \pm 0.725 0	0.910 2 \pm 0.178 9 *	4.161 2 \pm 0.406 7
F	36.048 9 \pm 6.804 0	5.184 3 \pm 0.248 2	6.045 7 \pm 0.605 7

讨 论

红豆杉为常绿乔木或灌木,南方红豆杉为我国特有的红豆杉品种,其生长速度快,分布广,蕴藏量也最大。中医认为,红豆杉性味苦、平,有小毒,归心经。功效消肿散结,主治肿瘤、肾病、风湿等。南方红豆杉作为传统中药治疗肿瘤病人已有多年历史,水提取物为其常见应用方式。南方红豆杉对提高肿瘤治疗成功率及改善肿瘤患者的生活质量、延长生存期等方面都有显著疗效,其抗肿瘤作用越来越得到国际社会的认可^[8]。

肺癌是全球范围内癌发病率上升最快、病死率最高的恶性肿瘤,其中非小细胞肺癌占 80%~85%,其发生发展、侵袭转移及多药耐药均与人体内一系列相关基因的功能异常相关^[9]。厄洛替尼的主要抗肿瘤

机制为抑制 EGFR 酪氨酸激酶胞内磷酸化,可特异性地针对肿瘤细胞作用,抑制肿瘤的形成和生长。前期研究表明,南方红豆杉水提取物可能通过抑制 Survivin 蛋白,抑制 EGFR 磷酸化,起到抑制裸鼠移植瘤生长的效果^[10]。本次实验中标准剂量厄洛替尼联合南方红豆杉水提取物组裸鼠移植瘤生长速度最慢,抑瘤效果最好,标准剂量厄洛替尼组抑瘤效果次之,低剂量厄洛替尼联合南方红豆杉水提取物组抑瘤率接近于标准剂量厄洛替尼组,提示南方红豆杉水提取物可能部分替代厄洛替尼起抑瘤作用。金氏公式计算 q 值得知,低剂量、标准剂量厄洛替尼与南方红豆杉水提取物联合应用抑瘤效果均有相加作用,这与体外实验结果一致^[11]。

EGFR 是原癌基因 c-erbB1 的表达产物,是表皮生长因子受体(HER)家族成员之一。EGFR 表达于正常上皮细胞表面,在肺癌、乳腺癌、结肠癌、食管癌、卵巢癌等多种肿瘤中过表达。配体通过与 EGFR 相互作用,激活下游 RAS/MAPK 系统、PI3K/AKT 系统、PLC/PKC 系统,从而将有丝分裂信号向下传递,调控细胞周期,调节细胞增生、存活、黏附,促进损伤修复^[12]。因此,阻断或者削弱 EGFR 信号通路是治疗非小细胞肺癌的一条有效途径。根据本实验结果,标准剂量厄洛替尼联合南方红豆杉水提取物组、南方红豆杉水提取物组移植瘤组织中 EGFR mRNA 水平明显较对照组降低($P < 0.05$),而低剂量厄洛替尼组、低剂量厄洛替尼联合南方红豆杉水提取物组、标准剂量厄洛替尼组移植瘤组织中 EGFR mRNA 及荷瘤裸鼠血清中蛋白水平均未见明显降低或增加($P > 0.05$)。因此,笔者认为南方红豆杉水提取物及厄洛替尼可能对外周血中 EGFR 蛋白表达无明显影响,同时表明移植瘤组织中 EGFR mRNA 表达水平与外周血中蛋白表达水平并非简单的线性对应关系,这与文献报道不同^[13],可能与药物调控 mRNA 转录及翻译过程有关。

COX 是前列腺素(PGs)合成过程中的主要限速酶,可将花生四烯酸(AA)代谢成各种前列腺素产物,参与机体的多种病理生理过程,如炎症、发热、出凝血机制等^[14]。COX-2 的表达在多种人类上皮细胞恶性肿瘤中异常增加^[15],并且通过多种致癌机制参与非小

细胞肺癌的发生、发展,如促进细胞增殖、抑制细胞凋亡、抑制免疫反应、促进肿瘤新生血管形成、促进肿瘤细胞转移等^[16]。SUN SY^[17]等体外实验发现 COX-2 抑制剂塞来昔布对 13 种 NSCLC 细胞株有不同程度的杀伤作用。国内亦有报道塞来昔布在体内外实验中均对 NSCLC 有抑制作用,且与诱导凋亡及抑制增殖有关^[18,19]。张爽等^[20]研究表明血清 COX-2 表达情况与肺癌组织中 COX-2 表达情况成正相关,且与肺癌分期有关,为独立不良预后因素。因此,抑制环氧化酶已成为肿瘤防治的一个新靶点。本实验各实验组裸鼠移植瘤组织中 COX-2 mRNA 水平均明显降低($P < 0.05$)。除低剂量厄洛替尼组荷瘤裸鼠血清中 COX-2 蛋白表达水平未见明显降低($P > 0.05$),余实验组荷瘤裸鼠血清中 COX-2 蛋白水平均明显降低($P < 0.05$)。提示厄洛替尼与南方红豆杉水提取物可能通过抑制 COX-2 mRNA 及蛋白表达起到抗肿瘤效果,而低剂量厄洛替尼对 COX-2 蛋白抑制作用不明显,可能与剂量不足有关。

Bcl-2 是一种原癌基因,它可以抑制 Caspase-3 的激活和合成,从而抑制细胞的凋亡,破坏细胞增殖与凋亡的平衡,导致肿瘤发生。国内外多项研究证实 Bcl-2 与细胞凋亡及肿瘤的发生发展有关^[21]。Bcl-2 在小细胞肺癌中阳性率高于非小细胞肺癌,且在非小细胞肺癌中的表达与病理分化程度呈正相关。亦有学者认为 Bcl-2 的高表达不是某一肿瘤的特征,而是反映了肿瘤的增殖状态,Anagnostou VK 等^[22]则认为 Bcl-2 是非小细胞肺癌患者良好预后的标志。标准剂量厄洛替尼组、低剂量厄洛替尼联合南方红豆杉组、标准剂量厄洛替尼联合南方红豆杉水提取物组裸鼠移植瘤组织中 Bcl-2 mRNA 水平均较对照组明显降低($P < 0.05$),余治疗组裸鼠移植瘤组织中 Bcl-2 mRNA 水平未见明显降低($P > 0.05$)。两个联合用药组荷瘤裸鼠血清中 Bcl-2 蛋白水平均明显降低($P < 0.05$),余治疗组荷瘤裸鼠血清中 Bcl-2 蛋白水平未见明显降低($P > 0.05$)。单用南方红豆杉水提取物或厄洛替尼对 Bcl-2 蛋白抑制作用不明显,而联合用药组抑制作用明显,提示厄洛替尼与南方红豆杉水提取物可能通过协同相加作用抑制 Bcl-2 mRNA 及蛋白表达,从而起到抑制肿瘤生长的效果。

综上所述,南方红豆杉水提取物与低剂量厄洛替尼、标准剂量厄洛替尼均有相加抑瘤作用,提示二者联合抑瘤作用机制可能与下调 COX-2 和 Bcl-2 mRNA 及蛋白表达水平有关,且标准剂量厄洛替尼与南方红豆杉水提取物联合应用为临床最佳剂量搭配。

参 考 文 献

- [1] 徐颖扉,张晶,舒琦瑾.南方红豆杉水提取物诱导人肺腺癌 A549 细胞凋亡与紫杉醇抑瘤机制不同的研究[J].中华中医药杂志,2012,27(6):1696-1699.
- [2] 舒琦瑾,李萍,王彬彬.南方红豆杉水提取物诱导人肺腺癌 A549 细胞凋亡及其分子机制的实验研究[J].中国中西医结合杂志,2011,31(9):1243-1247.
- [3] 舒琦瑾,李萍,王彬彬,等.南方红豆杉水提取物对人肺腺癌 A549 细胞增殖抑制作用的研究[J].中华中医药杂志,2011,26(12):2982-2985.
- [4] 徐叔云,汴如濂.药理实验方法学[M].北京:人民卫生出版社,2002:1184.
- [5] Jin K, Teng L, Shen Y, et al. Patient-derived human tumour tissue xenografts in immune deficient mice: a systematic review[J]. Clin Transl Oncol, 2010, 12(7): 473-480.
- [6] Naito S, von Eschenbach AC, Giavazzi R, et al. Growth and metastasis of tumor cells isolated from human renal cell carcinoma implanted into different organs of nude mice[J]. Cancer Res, 1986,46(8):4109-4115.
- [7] 戴体俊.合并用药的定量分析[J].中国药理学通报,1998,(05):479-480.
- [8] 谢志慧,杜玲玲,李效贤,等.南方红豆杉研究新进展[J].中国药业,2009,18(15):3-5.
- [9] Ludovini V, Pistola L, Gregorc V, et al. Biological markers and DNA flow cytometric analysis in radically resected patients with non-small cell lung cancer. A study of the Perugia multidisciplinary team for thoracic tumors[J]. Tumori, 2008, 94(3):398-405.
- [10] 崔庆丽,邵梅,舒琦瑾.南方红豆杉水提取物抑制裸鼠 A549 肺癌移植瘤生长及其机制研究[J].中国中药杂志,2013,38(20):3549-3553.
- [11] 单双双,舒琦瑾.南方红豆杉水提取物协同厄洛替尼对人肺腺癌 A549 细胞 COX-2、MMP-2 表达的影响[J].新疆医科大学学报,2013,36(6):789-792.
- [12] Pal SK, Pegram M. Epidermal growth factor receptor and signal transduction: potential targets for anti-cancer therapy[J]. Anticancer Drugs, 2005, 16(5):483-494.
- [13] 郭琛,郭其森,曾洪生,等.非小细胞肺癌患者肿瘤组织与外周血中 EGFR 表达相关性研究[J].中国肺癌杂志,2010,13(12):1107-1112.
- [14] Davis TW, O'Neal JM, Pagel MD, et al. Synergy between celecoxib and radiotherapy results from inhibition of cyclooxygenase-2-derived prosta-

- glandin E₂, a survival factor for tumor and associated vasculature [J]. *Cancer Res*, 2004, 64 (1): 279 - 285.
- [15] Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, et al. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors [J]. *Cancer*, 2000, 89 (12): 2637 - 2645.
- [16] Cao Y, Prescott SM. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer [J]. *J Cell Physiol*, 2002, 190 (3): 279 - 286.
- [17] Sun SY, Schroeder CP, Yue P, et al. Enhanced growth inhibition and apoptosis induction in NSCLC cell lines by combination of celecoxib and 4HPR at clinically relevant concentrations [J]. *Cancer Biol Ther*, 2005, 4 (4): 407 - 413.
- [18] 郑惠如, 金美玲, 蔡映云. 环氧化酶-2 抑制剂在肺癌治疗中的研究进展 [J]. *国际呼吸杂志*, 2007, 27 (16): 1268 - 1271.
- [19] 张卿, 胡成平. 环氧化酶-2 与肺癌研究进展 [J]. *国外医学(生理、病理科学与临床分册)*, 2004, 24 (5): 422 - 424.
- [20] 张爽, 王杨, 丁慧鑫. 肺癌患者血清环氧化酶-2 的水平及临床意义 [J]. *中国实验诊断学*, 2009, 13 (11): 1594 - 1596.
- [21] Shivapurkar N, Reddy J, Chaudhary PM, et al. Apoptosis and lung cancer: a review [J]. *J Cell Biochem*, 2003, 88 (5): 885 - 898.
- [22] Anagnostou VK, Lowery FJ, Zolota V, et al. High expression of Bcl-2 predicts favorable outcome in non-small cell lung cancer patients with non-squamous histology [J]. *BMC Cancer*, 2010, 10: 186.
- (收稿:2013-11-07 修回:2015-02-08)

第十八届全国中西医结合大肠肛门病学术交流会征文通知

中国中西医结合学会大肠肛门病专业委员会主办,兰州军区兰州总医院承办,甘肃省医学会外科学专业委员会、甘肃省中西医结合学会大肠肛门病专业委员会、《中华胃肠外科杂志》、《结直肠肛门外科杂志》协办的第十八届全国中西医结合大肠肛门病学术交流会将于 2015 年 9 月 4—6 日在甘肃省兰州市召开,现面向全国征集论文,录取后编入会议论文集。

征文内容 大肠肛门病基础研究的新动态、新进展、新成果;结直肠肛门肿瘤的多学科治疗理念;中西医结合治疗排便障碍性疾病及炎性肠病的临床疗效及经验;中西医结合治疗肛周疾病的新方法、新经验;微创技术在结直肠外科领域的应用优势;快速康复理念在结直肠肛门外科的应用;便秘的临床基础及外科治疗;内镜下结直肠疾病的治疗进展;中医药在肛门外科的治疗优势;大肠肛门病护理的新技术、新经验。

征文要求 (1)针对征文内容的相关论著、综述、短篇、个案等中、英文稿件,以 Word 文档格式保存,不超过 4 000 字。注明作者姓名、通信地址、工作单位、E-mail、联系电话。(2)手术录像:手术录像时间不超过 10 min,采用 MPG 或 WMA 格式;录像注明术者、工作单位、病例相关信息。(3)图片展览:1~4 张图片,以结直肠肛门良性疾病、恶性肿瘤、功能性疾病为主题。可为罕、少见疾病、诊治方法、手术方式等;附简要文字说明。图片要求:对焦清晰、尺寸≥800* 600 px,分辨率≥300 dpi,格式为 jpg、tif、png。(4)登陆 www.2015cscaim.com 可在线投稿。

截稿时间 2015 年 8 月 15 日。

联系方式 联系人:徐明, Tel: 13919917550; 吴伟强, Tel: 15117202099; 宋枫, Tel: 13919760144; E-mail: zxyjh2015@163.com, 地址:兰州军区兰州总医院(甘肃省兰州市七里河区南滨河路 333 号)。