

论 著

伊维菌素对奥沙利铂抗结肠癌耐药细胞的增效作用及其机制

汤月良, 邓冠群

广州市增城区人民医院普通外科, 广州 511300

[摘要] **目的** 探讨伊维菌素(Ive)对奥沙利铂(L-OHP)抗结肠癌HCT116/L-OHP细胞的增效作用及其机制。**方法** 利用L-OHP低浓度梯度递增和低浓度L-OHP(4 $\mu\text{mol/L}$)持续培养的方法建立结肠癌HCT116/L-OHP细胞模型, 设置空白对照组、L-OHP 25 $\mu\text{mol/L}$ 组以及L-OHP 25 $\mu\text{mol/L}$ 联合1、2、4、8 $\mu\text{mol/L}$ Ive组, 采用MTT法检测细胞活力; 设置空白对照组、L-OHP 25 $\mu\text{mol/L}$ 组、L-OHP+Ive 2 $\mu\text{mol/L}$ 组及L-OHP+Ive 4 $\mu\text{mol/L}$ 组, 采用克隆实验检测细胞克隆形成能力, 流式细胞术检测细胞凋亡和细胞周期分布情况, Western blotting检测核因子 κB p65(NF- κB p65)、孕烷X受体(PXR)和P-糖蛋白(P-gp)的表达水平。采用LPS诱导构建NF- κB p65高表达的结肠癌HCT116/L-OHP细胞模型(设置空白对照组、LPS组、LPS+L-OHP组、LPS+L-OHP+Ive 2 $\mu\text{mol/L}$ 组及LPS+L-OHP+Ive 4 $\mu\text{mol/L}$ 组), 采用慢病毒转染构建PXR高表达的结肠癌HCT116/L-OHP细胞模型(设置空白对照组、Ad-PXR组、Ad-PXR+L-OHP组、Ad-PXR+L-OHP+Ive 2 $\mu\text{mol/L}$ 组及Ad-PXR+L-OHP+Ive 4 $\mu\text{mol/L}$ 组), Western blotting检测各组细胞NF- κB p65、PXR和P-gp蛋白的表达水平。20只裸鼠皮下注射HCT116/L-OHP细胞建立结肠癌耐药细胞移植瘤模型, 设置空白对照组、L-OHP组、Ive组及Ive+L-OHP组, 每组5只, 计算肿瘤体积, 测量肿瘤重量, 采用免疫组化法检测肿瘤组织中NF- κB p65、PXR和P-gp蛋白的表达情况。**结果** Ive可增效L-OHP抑制结肠癌HCT116/L-OHP细胞的增殖和克隆形成($P<0.05$), 并促进结肠癌HCT116/L-OHP细胞凋亡和S期细胞阻滞($P<0.05$)。Western blotting检测结果显示, L-OHP+Ive 2 $\mu\text{mol/L}$ 组和L-OHP+Ive 4 $\mu\text{mol/L}$ 组结肠癌HCT116/L-OHP细胞NF- κB p65、PXR和P-gp蛋白的表达水平低于空白对照组, 且L-OHP+Ive 4 $\mu\text{mol/L}$ 组低于L-OHP组($P<0.05$)。在NF- κB p65高表达的HCT116/L-OHP细胞模型中, LPS+L-OHP+Ive 2 $\mu\text{mol/L}$ 组和LPS+L-OHP+Ive 4 $\mu\text{mol/L}$ 组NF- κB p65、PXR和P-gp蛋白的表达水平低于LPS组($P<0.05$)。在PXR高表达的HCT116/L-OHP细胞模型中, Ad-PXR+L-OHP+Ive 2 $\mu\text{mol/L}$ 组和Ad-PXR+L-OHP+Ive 4 $\mu\text{mol/L}$ 组NF- κB p65、PXR和P-gp蛋白的表达水平低于Ad-PXR组和Ad-PXR+L-OHP组, 且Ad-PXR+L-OHP+Ive 4 $\mu\text{mol/L}$ 组低于Ad-PXR+L-OHP+Ive 2 $\mu\text{mol/L}$ 组($P<0.05$)。体内实验结果显示, Ive可协同L-OHP抑制HCT116/L-OHP细胞移植瘤的生长($P<0.05$)。免疫组化检测结果显示, Ive组、L-OHP组和Ive+L-OHP组肿瘤组织中NF- κB p65、PXR及P-gp蛋白的相对表达密度低于空白对照组, 且L-OHP组、Ive+L-OHP组低于Ive组, Ive+L-OHP组低于L-OHP组($P<0.05$)。**结论** Ive对L-OHP抗结肠癌HCT116/L-OHP细胞有增效作用, 其作用机制可能是通过抑制NF- κB p65/PXR信号通路的表达, 从而减弱P-gp蛋白对L-OHP耐药的介导作用。

[关键词] 伊维菌素; 奥沙利铂; 结肠癌; 耐药

[中图分类号] R735.3

[文献标志码] A

[文章编号] 0577-7402(2021)06-0573-11

[DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.2021.06.06

Effect and mechanism of ivermectin in enhancing oxaliplatin against colon cancer drug-resistant cells

Tang Yue-Liang, Deng Guan-Qun

Department of General Surgery, Zengcheng District People's Hospital, Guangzhou 511300, China

This work was supported by the Guangdong Medical Science and Technology Research Fund Project (A2019195)

[Abstract] **Objective** To explore the effect and mechanism of ivermectin (Ive) in enhancing oxaliplatin (L-OHP) against colon cancer HCT116/L-OHP cells. **Methods** *In vitro* establishment of colon cancer HCT116/L-OHP cells model with L-OHP low-concentration gradient increasing and low-concentration L-OHP (4 $\mu\text{mol/L}$) continuous culture. Set control group, L-OHP 25 $\mu\text{mol/L}$ group, and L-OHP 25 $\mu\text{mol/L}$ combined with 1, 2, 4, and 8 $\mu\text{mol/L}$ Ive groups, and used MTT assay to detect cell viability. Set control group, L-OHP 25 $\mu\text{mol/L}$ group, L-OHP+Ive 2 $\mu\text{mol/L}$ group, and L-OHP+Ive 4 $\mu\text{mol/L}$ group, and use cloning experiment to detect cell clone formation ability and flow cytometry apoptosis and cell cycle distribution, Western blotting was used to detect the expression levels of nuclear factor κB p65 (NF- κB p65), pregnane X receptor (PXR) and P-glycoprotein

[基金项目] 广东省医学科学技术研究基金(A2019195)

[作者简介] 汤月良, 副主任医师, 主要从事胃肠肿瘤的基础与临床研究

(P-gp). The colon cancer HCT116/L-OHP cells model with high expression of NF- κ B p65 was constructed by LPS induction (setting control group, LPS group, LPS+L-OHP group, LPS+L-OHP+Ive 2 μ mol/L group and LPS+L-OHP+Ive 4 μ mol/L group), using lentiviral transfection to construct a colon cancer HCT116/L-OHP cells model with high PXR expression (setting control group, Ad-PXR group, Ad-PXR+L-OHP group, Ad-PXR+L-OHP+Ive 2 μ mol/L group and Ad-PXR+L-OHP+Ive 4 μ mol/L group), Western blotting was used to detect the expressions of NF- κ B p65, PXR and P-gp protein levels. Twenty nude mice were injected subcutaneously with HCT116/L-OHP cells to establish a colon cancer drug-resistant cell transplantation tumor model and were divided into control group, L-OHP group, Ive group and Ive+L-OHP group, 5 mice in each group, and the tumor volume was calculated, the tumor weight was measured, and use immunohistochemistry to detect the expression of NF- κ B p65, PXR and P-gp protein in the tumor tissues. **Results** Ive can potentiate L-OHP to inhibit colon cancer HCT116/L-OHP cells proliferation and clone formation ($P<0.05$), and promote colon cancer HCT116/L-OHP cells apoptosis and cell cycle S phase block ($P<0.05$). Western blotting showed that, in colon cancer HCT116/L-OHP cells, the expression levels of NF- κ B p65, PXR and P-gp proteins in L-OHP+Ive 2 μ mol/L group and L-OHP+Ive 4 μ mol/L group were lower than those in control group, those in L-OHP+Ive 4 μ mol/L group were lower than in L-OHP group ($P<0.05$). In the HCT116/L-OHP cells model with high NF- κ B p65 expression, the expression levels of the NF- κ B p65, PXR and P-gp protein in LPS+L-OHP+Ive 2 μ mol/L group and the LPS+L-OHP+Ive 4 μ mol/L group were lower than those in LPS group ($P<0.05$). In HCT116/L-OHP cells model with high PXR expression, the expression levels of the NF- κ B p65, PXR and P-gp protein in Ad-PXR+L-OHP+Ive 2 μ mol/L group and Ad-PXR+L-OHP+Ive 4 μ mol/L group were lower than those in Ad-PXR group and Ad-PXR+L-OHP group, those in Ad-PXR+L-OHP+Ive 4 μ mol/L group were lower than those in Ad-PXR+L-OHP+Ive 2 μ mol/L group ($P<0.05$). *In vivo* experimental results showed that Ive can cooperate with L-OHP to inhibit the growth of HCT116/L-OHP cells xenograft tumors ($P<0.05$). The results of immunohistochemistry showed that the relative expression density of NF- κ B p65, PXR and P-gp protein in the tumor tissues of Ive group, L-OHP group and Ive+L-OHP group was lower than that of control group. The L-OHP group and Ive+L-OHP group were lower than those in Ive group, and the Ive+L-OHP group were lower than those in L-OHP group ($P<0.05$). **Conclusion** Ive can enhance the effect of L-OHP against colon cancer HCT116/L-OHP cells, and its potential mechanism of action is to reduce the mediating effect of P-gp protein on L-OHP resistance by inhibiting the expression of NF- κ B p65/PXR signaling pathway.

[Key words] ivermectin; oxaliplatin; colon cancer; drug resistance

全球最新的癌症统计数据显示, 2020年我国结肠直肠癌(colorectal cancer, CRC)新发病例达56万, 位居第2位, 死亡29万例, 位居第5位^[1]。奥沙利铂(oxaliplatin, L-OHP)是CRC常用的化疗药物^[2], 主要应用于转移性CRC和辅助治疗原发肿瘤完全切除的Ⅲ期(Duke's C期)结肠癌患者^[3-4]。虽然L-OHP在CRC的临床治疗中起着重要作用, 但其化疗效果不佳。肿瘤细胞对L-OHP的敏感性下降致使大部分CRC患者化疗后很快出现复发或转移, 是造成化疗失败的重要原因之一, 因此, 增强CRC细胞对L-OHP的敏感性是提高CRC化疗成功率的关键。伊维菌素(ivermectin, Ive)属于阿维菌素类, 是日本Kitsato研究所发现的一组16元环大环内酯类化合物。Ive为新型抗寄生虫药, 广泛应用于农业、兽医和水产养殖等行业, 具有高效、广谱、低毒等药理学特点^[5-6]。近年来有研究报道, Ive具有抗肿瘤的作用, 如可降低胶质母细胞瘤细胞的基础耗氧率和最大耗氧率, 从而抑制胶质母细胞瘤的增殖^[7]; 可通过氧化应激和DNA损伤而抑制肾癌细胞的生长^[8]; 可逆转乳腺癌细胞和慢性髓细胞白血病细胞对阿霉素和长春新碱的耐药性^[9]。此外, 还可抑制胃癌细胞的迁移和侵袭^[10]。由此可见, Ive在肿瘤细胞的增殖、侵袭及耐药等方面起着重要作用, 但目前其是否可增强

L-OHP抗结肠癌的作用尚不清楚。本研究建立了结肠癌耐药细胞模型, 在体内外探讨Ive增强L-OHP抗结肠癌耐药细胞的作用及其机制, 以期改善L-OHP耐药结肠癌患者的预后提供新的研究思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器 RPMI 1640培养基、胰酶、青-链霉素双抗、胎牛血清购自美国Gibco公司; MTT试剂盒、细胞凋亡和细胞周期检测试剂盒、蛋白浓度测定试剂盒、ECL发光试剂盒购自上海碧云天生物科技有限公司; Ive、L-OHP、结晶紫、脂多糖(LPS)购自美国Sigma公司; PXR慢病毒购自上海汉恒生物科技有限公司; 抗核因子 κ B p65(nuclear factor kappa-B p65, NF- κ B p65)、抗孕烷X受体(pregnane X receptor, PXR)、抗P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)及GAPDH兔抗体购自英国Abcam公司; 兔抗IgG重链和轻链抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司。微光分光光度计购自美国Merinton公司; Mini-Proten Tetra System电泳系统和ChemiDoc XRS+System凝胶成像仪购自美国Bio-Rad公司; ACCURI C6流式细胞仪购自美国BD公司; Tecan Infinite Pro全波长多功能酶标仪购自瑞士Tecan公司。

1.2 实验细胞及动物 结肠癌HCT116细胞购自中国科学院上海细胞库。20只雄性BALB/c裸鼠(体重18~20 g)购自上海斯莱克实验动物有限责任公司[实验动物生产许可证号: SCXK(沪)2017-0005], SPF级环境下饲养, 温度20~25 ℃, 相对湿度40%~70%, 实验前适应性喂养1周。本研究通过广州市增城区人民医院伦理委员会审核(DW2019-004), 实验过程符合国家和单位有关实验动物的管理和使用规定。

1.3 HCT116/L-OHP细胞的建立及培养 结肠癌HCT116细胞培养于含10%胎牛血清和1%青-链霉素双抗的RPMI 1640培养基中, 置于含5% CO₂、37 ℃培养箱中, 待细胞融合度为60%时用胰酶消化传代。

取对数生长期HCT116细胞, 向培养液中加入4 μmol/L L-OHP溶液, 48 h后更换新鲜培养液继续培养, 待细胞恢复正常生长后传代, 重复用4 μmol/L L-OHP处理48 h, L-OHP浓度每20 d增加1 μmol/L, 反复诱导直至L-OHP的浓度递增至15 μmol/L, 最终获得结肠癌HCT116 L-OHP耐药细胞株(HCT116/L-OHP), 并培养于含4 μmol/L L-OHP、10%胎牛血清和1%青-链霉素双抗的RPMI 1640培养基中^[11-12]。

1.4 MTT法检测细胞活力 将HCT116/L-OHP细胞接种于96孔板中(5.0×10^3 个/孔), 联合给予终浓度为25 μmol/L的L-OHP以及1、2、4、8 μmol/L的Ive, 并设置L-OHP 25 μmol/L组和空白对照组(等体积的培养液), 继续培养48 h; 终止培养前4 h加入10 μl MTT(5 mg/ml)工作液, 继续孵育4 h, 弃去培养液, 每孔加入150 μl DMSO, 采用酶标仪检测490 nm处的吸光度(OD)值, 计算细胞存活率。细胞存活率(%)=实验组OD/空白对照组OD × 100%。根据MTT检测结果和预实验结果进行后续实验。

1.5 克隆实验检测细胞克隆形成能力 将HCT116/L-OHP细胞接种于6孔板中(1.0×10^3 个/孔), 联合给予终浓度为25 μmol/L的L-OHP以及2、4 μmol/L的Ive, 并设置L-OHP 25 μmol/L组和空白对照组(加入等体积的培养液), 14 d后终止培养, 弃上清, PBS洗涤2次, 用4%多聚甲醛溶液固定细胞15 min, 0.1%结晶紫染色液染色20 min, 计算细胞克隆数。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡和周期变化

1.6.1 细胞凋亡 将HCT116/L-OHP细胞接种于6孔板中(2×10^5 个/孔), 联合给予终浓度为25 μmol/L的L-OHP和2、4 μmol/L的Ive, 并设置L-OHP 25 μmol/L组和空白对照组(加入等体积的培养液), 继续培养48 h, 收集细胞, PBS洗涤1次, 分别加入FITC-Annexin V和PI, 室温避光孵育5 min, 上机检测细胞凋亡情况, 计算细胞凋亡率。

1.6.2 细胞周期 将HCT116/L-OHP细胞接种于6孔板中(2×10^5 个/孔), 联合给予终浓度为25 μmol/L的L-OHP和2、4 μmol/L的Ive, 并设置L-OHP 25 μmol/L组和空白对照组(加入等体积的培养液), 继续培养48 h, 收集细胞, PBS洗涤1次, 用250 μl预冷的PBS重悬细胞, 加入750 μl预冷的无水乙醇中, -20 ℃下固定过夜; PBS洗涤, 加入RNase A及PI染色, 4 ℃下避光孵育30 min, 上机检测细胞周期分布情况。

1.7 Western blotting检测P-gp、NF-κB p65和PXR蛋白的表达水平

1.7.1 HCT116/L-OHP细胞收集 将HCT116/L-OHP细胞接种于6孔板中(2×10^5 个/孔), 联合给予终浓度为25 μmol/L的L-OHP和2、4 μmol/L的Ive, 并设置L-OHP组和空白对照组(加入等体积的培养液), 继续培养48 h, 收集细胞。

1.7.2 LPS诱导建立NF-κB高表达的HCT116/L-OHP细胞 取对数生长期HCT116/L-OHP细胞, 接种于6孔板中(1.0×10^5 个/孔), 待细胞贴壁后, 用10 μg/ml LPS刺激6 h, 联合给予终浓度为25 μmol/L的L-OHP和2、4 μmol/L的Ive, 并设置LPS组和空白对照组(加入等体积的培养液), 继续培养48 h, 收集细胞。

1.7.3 慢病毒细胞转染建立PXR高表达的HCT116/L-OHP细胞 取对数生长期HCT116/L-OHP细胞, 接种于6孔板中(1.0×10^5 个/孔), 待细胞贴壁后, 加入腺病毒(腺病毒与细胞数量比值为300)感染细胞24 h, 联合给予终浓度为25 μmol/L的L-OHP和2、4 μmol/L的Ive, 并设置Ad-PXR组和空白对照组(加入等体积的培养液), 继续培养48 h, 收集细胞。

将上述收集的细胞裂解后提取总蛋白, 用BCA法检测总蛋白浓度, 经变性、电泳、转膜和封闭后, TBST漂洗, 分别加入P-gp(1:1000)、NF-κB p65(1:1000)和PXR(1:1000)兔一抗, 4 ℃下摇床孵育过夜, TBST洗涤, 加入二抗室温孵育2 h, TBST洗涤后加入ECL发光液, 利用凝胶成像仪显影, 以GAPDH作为内参, 计算P-gp、NF-κB和PXR蛋白的相对表达量。

1.8 Ive联合L-OHP对结肠癌HCT116/L-OHP细胞裸鼠移植瘤模型的影响 取5~6周龄裸鼠20只, HCT116/L-OHP细胞用0.25%胰酶消化后, 用完全培养基制备 1.0×10^7 个/ml细胞悬液, 于裸鼠背部皮下接种100 μl细胞悬液, 待肿瘤生长至约100 mm³时, 将裸鼠随机分为空白对照组(注射等体积的生理盐水)、Ive组(2 mg/kg, 1次/d)、L-OHP组(5 mg/kg, 2次/周)与Ive(2 mg/kg, 1次/d)+L-OHP(5 mg/kg, 2次/周)组^[9,13], 每组5只。L-OHP经尾静脉注射给

药, IVE灌胃给药, 连续给药21 d。每3 d测量1次肿瘤的最长径和最短径, 计算肿瘤体积, 21 d后处死裸鼠并剥离实体瘤, 称量肿瘤重量。

1.9 免疫组化检测肿瘤组织中P-gp、NF- κ B和PXR蛋白的表达情况 肿瘤组织于4%甲醛溶液中固定5 d, 石蜡包埋、切片(厚度4 μ m), 置于65 $^{\circ}$ C恒温箱中12 h, 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇复水, 用3% H_2O_2 在37 $^{\circ}$ C下孵育10 min阻断、灭活内源性过氧化物酶, PBS洗涤, 0.01 μ mol/L枸橼酸缓冲液(pH 6.0)修复抗原, PBS洗涤; 加入P-gp(1:200)、NF- κ B p65(1:200)和PXR(1:200)兔一抗, 4 $^{\circ}$ C冰箱孵育过夜, PBS洗涤3次, 5 min/次; 加入Alexa Flour(1:200)兔二抗, 37 $^{\circ}$ C孵育15 min, PBS洗涤3次, 5 min/次; DAB反应染色, 显微镜下观察反应进度, 双蒸水充分冲洗; 苏木精复染, 脱水透明后封片, 拍照。利用ImagePro Plus软件计算P-gp、NF- κ B p65和PXR的相对表达密度值。

1.10 统计学处理 采用GraphPad Prism 8软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用LSD-*t*检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IVE增效L-OHP对结肠癌HCT116/L-OHP细胞增殖能力的影响 MTT法检测结果显示, 与空白对照组相比, L-OHP 25 μ mol/L组以及L-OHP联合IVE 1 μ mol/L、2 μ mol/L、4 μ mol/L、8 μ mol/L组结肠癌HCT116/L-OHP细胞存活率明显降低, 且呈剂量依赖性($P<0.05$, 图1)。克隆实验检测结果显示, 空白对照组、L-OHP 25 μ mol/L组、L-OHP+IVE 2 μ mol/L组和L-OHP+IVE 4 μ mol/L组的细胞克隆数依次为(257.67 \pm 29.14)个、(146.00 \pm 18.08)个、(95.33 \pm 7.02)个和(50.67 \pm 12.66)个。L-OHP 25 μ mol/L组、L-OHP+IVE 2 μ mol/L组、L-OHP+IVE 4 μ mol/L组的细胞克隆数少于空白对照组, L-OHP+IVE 2 μ mol/L组和L-OHP+IVE 4 μ mol/L组少于L-OHP 25 μ mol/L组, L-OHP+IVE 4 μ mol/L组少于L-OHP+IVE 2 μ mol/L组, 差异均有统计学意义($P<0.05$, 图2)。

2.2 IVE增效L-OHP对结肠癌HCT116/L-OHP细胞凋亡和细胞周期的影响 流式细胞术检测结肠癌HCT116/L-OHP细胞凋亡结果显示, 空白对照组、L-OHP 25 μ mol/L组、L-OHP+IVE 2 μ mol/L组和L-OHP+IVE 4 μ mol/L组结肠癌HCT116/L-OHP细胞凋亡率依次为4.83% \pm 0.45%、9.72% \pm 0.63%、20.74% \pm 1.07%、38.16% \pm 1.53%。L-OHP 25 μ mol/L组、L-OHP+IVE 2 μ mol/L组和L-OHP+IVE 4 μ mol/L

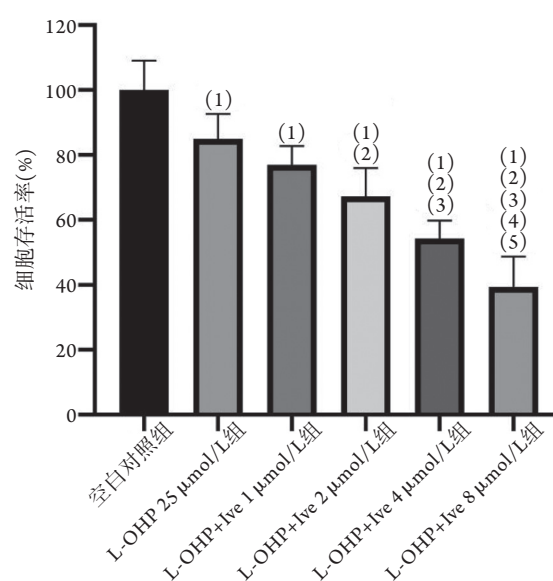


图1 MTT法检测结肠癌HCT116/L-OHP细胞的存活率($n=5$)

Fig.1 Viability of colon cancer HCT116/L-OHP cells (MTT method, $n=5$)

与空白对照组比较, (1) $P<0.05$; 与L-OHP 25 μ mol/L组比较, (2) $P<0.05$; 与L-OHP+IVE 1 μ mol/L组比较, (3) $P<0.05$; 与L-OHP+IVE 2 μ mol/L组比较, (4) $P<0.05$; 与L-OHP+IVE 4 μ mol/L组比较, (5) $P<0.05$ 。

组结肠癌HCT116/L-OHP细胞凋亡率高于空白对照组, L-OHP+IVE 2 μ mol/L组和L-OHP+IVE 4 μ mol/L组高于L-OHP 25 μ mol/L组, L-OHP+IVE 4 μ mol/L组高于L-OHP+IVE 2 μ mol/L组, 差异均有统计学意义($P<0.05$, 图3)。

流式细胞术检测结肠癌HCT116/L-OHP细胞周期结果显示, 空白对照组、L-OHP 25 μ mol/L组、L-OHP+IVE 2 μ mol/L组和L-OHP+IVE 4 μ mol/L组S期细胞百分比依次为8.65% \pm 1.70%、13.85% \pm 1.95%、19.53% \pm 2.66%、32.10% \pm 3.14%。L-OHP+IVE 2 μ mol/L组和L-OHP+IVE 4 μ mol/L组的S期细胞百分率高于空白对照组, L-OHP+IVE 4 μ mol/L组高于L-OHP 25 μ mol/L组和L-OHP+IVE 2 μ mol/L组, 差异均有统计学意义($P<0.05$, 图4)。

2.3 IVE增效L-OHP对结肠癌HCT116/L-OHP细胞NF- κ B p65、PXR及P-gp蛋白表达的影响 Western blotting检测结果显示, 空白对照组、L-OHP 25 μ mol/L组、L-OHP+IVE 2 μ mol/L组和L-OHP+IVE 4 μ mol/L组结肠癌HCT116/L-OHP细胞中NF- κ B p65的表达水平依次为0.68 \pm 0.08、0.61 \pm 0.07、0.48 \pm 0.06、0.37 \pm 0.064, PXR的表达水平依次为0.89 \pm 0.09、0.72 \pm 0.04、0.57 \pm 0.06、0.42 \pm 0.06, P-gp的表达水平依次为1.02 \pm 0.19、0.77 \pm 0.12、0.59 \pm 0.04、0.45 \pm 0.06。L-OHP组P-gp的表达水平

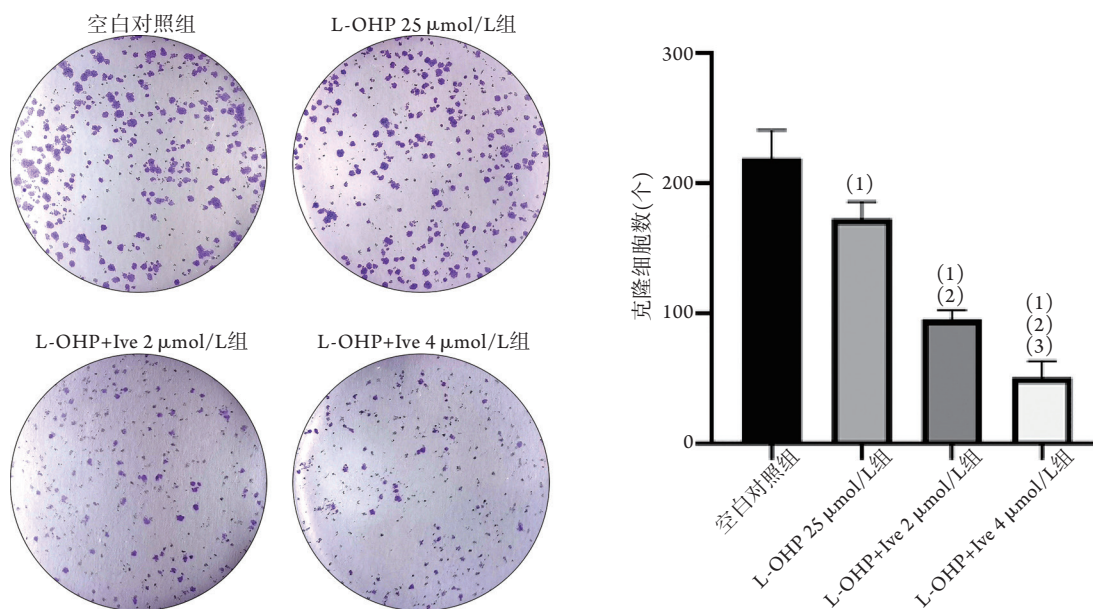


图2 细胞克隆实验检测结肠癌HCT116/L-OHP细胞的克隆形成能力(n=3)

Fig.2 The cloning ability of colon cancer HCT116/L-OHP cells (Cell cloning experiment, n=3)

与空白对照组比较, (1) $P < 0.05$; 与L-OHP 25 μmol/L组比较, (2) $P < 0.05$; 与L-OHP+Ive 2 μmol/L组比较, (3) $P < 0.05$ 。

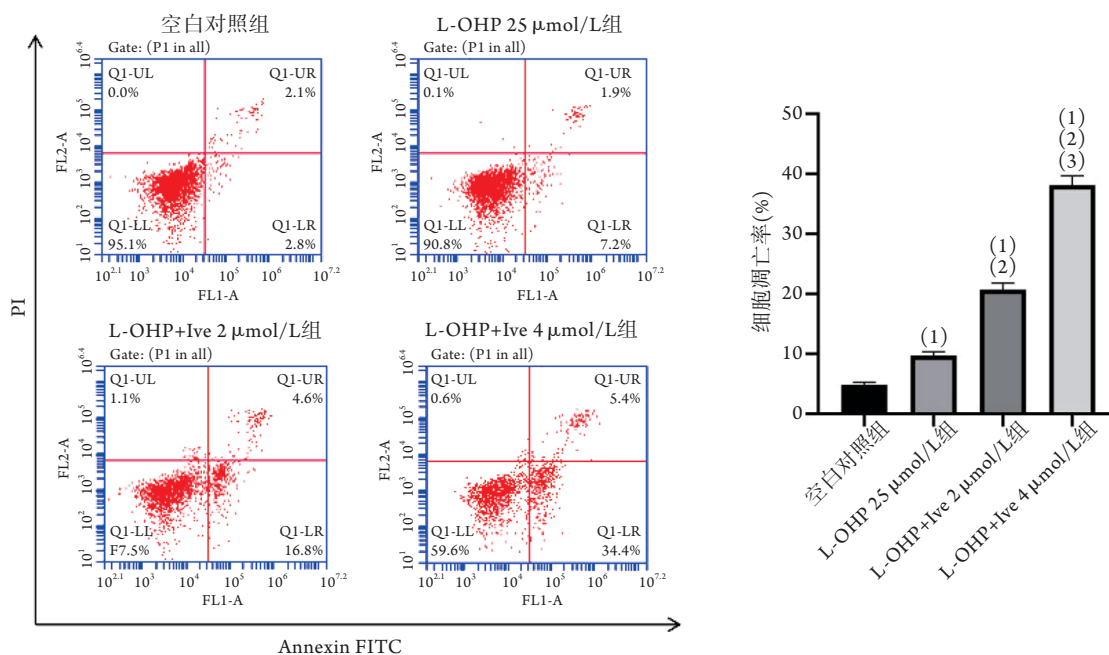


图3 流式细胞术检测结肠癌HCT116/L-OHP细胞的凋亡率(n=3)

Fig.3 The apoptosis rate of colon cancer HCT116/L-OHP cells (Flow cytometry, n=3)

与空白对照组比较, (1) $P < 0.05$; 与L-OHP 25 μmol/L组比较, (2) $P < 0.05$; 与L-OHP+Ive 2 μmol/L组比较, (3) $P < 0.05$ 。

低于空白对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); L-OHP+Ive 2 μmol/L组和L-OHP+Ive 4 μmol/L组NF-κB p65、PXR和P-gp的表达水平均低于空白对照组, L-OHP+Ive 4 μmol/L组低于L-OHP组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$, 图5)。

为进一步明确NF-κB p65、PXR和P-gp之间的调控作用及其是否为Ive发挥增效作用, 本研究利用LPS诱导建立NF-κB p65高表达的HCT116/L-OHP细胞模型和慢病毒感染建立PXR高表达的HCT116/

L-OHP细胞模型。Western blotting检测结果显示, 在NF-κB p65高表达的HCT116/L-OHP细胞模型中, 空白对照组、LPS组、LPS+L-OHP组、LPS+L-OHP+Ive 2 μmol/L组和LPS+L-OHP+Ive 4 μmol/L组NF-κB p65的表达水平依次为 0.51 ± 0.09 、 1.03 ± 0.15 、 0.85 ± 0.04 、 0.74 ± 0.03 、 0.73 ± 0.03 , PXR的表达水平依次为 0.39 ± 0.02 、 0.56 ± 0.06 、 0.48 ± 0.01 、 0.42 ± 0.03 、 0.34 ± 0.03 , P-gp的表达水平依次为 0.53 ± 0.05 、 0.65 ± 0.05 、 0.36 ± 0.03 、

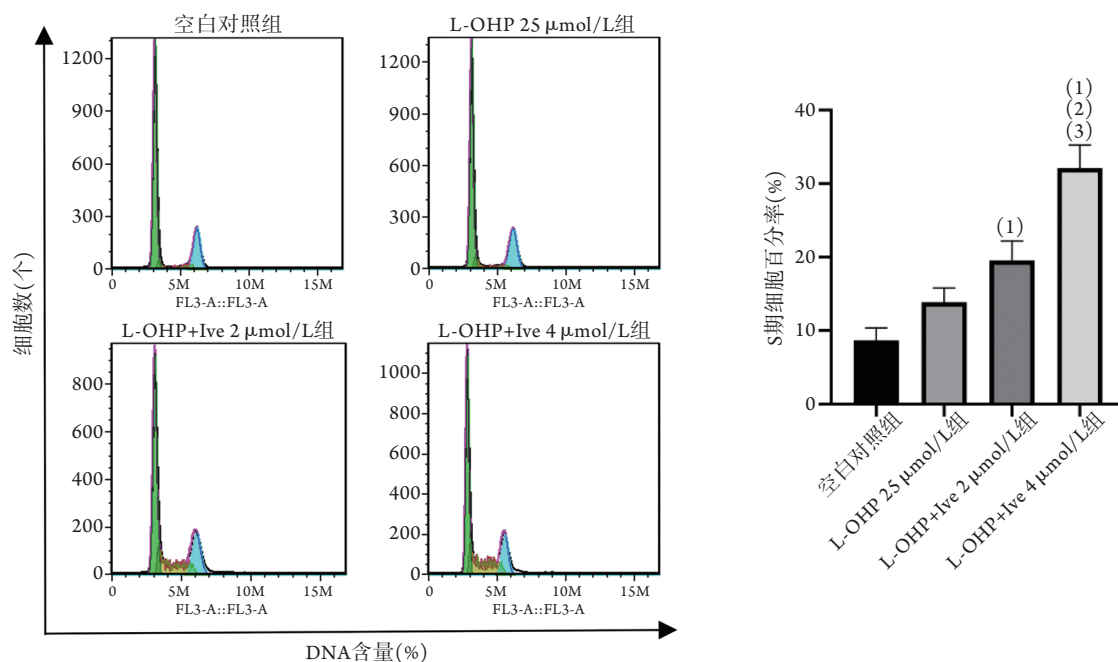


图4 流式细胞术检测结肠癌HCT116/L-OHP细胞的细胞周期分布情况(n=3)

Fig.4 Periodic distribution of colon cancer HCT116/L-OHP cells (Flow cytometry, n=3)

与空白对照组比较, (1) $P < 0.05$; 与L-OHP 25 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, (2) $P < 0.05$; 与L-OHP+Ive 2 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, (3) $P < 0.05$ 。

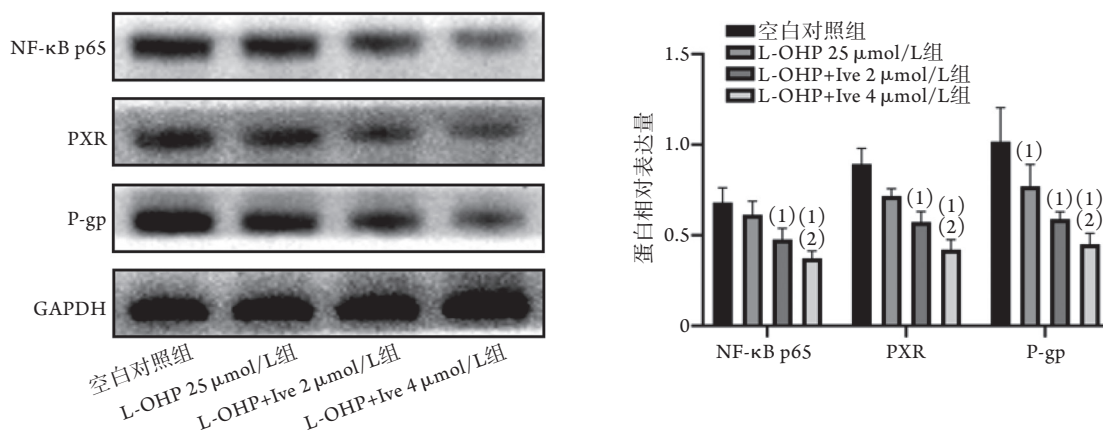


图5 结肠癌HCT116/L-OHP细胞中NF-κB p65、PXR及P-gp的表达水平(Western blotting)

Fig.5 Expression levels of NF-κB p65, PXR and P-gp in colon cancer HCT116/L-OHP cells (Western blotting)

与空白对照组比较, (1) $P < 0.05$; 与L-OHP组比较, (2) $P < 0.05$ 。

0.42 ± 0.03 、 0.35 ± 0.02 。LPS组NF-κB p65、PXR的表达水平高于空白对照组, LPS+L-OHP组NF-κB p65、P-gp的表达水平低于空白对照组和LPS组, LPS+L-OHP+Ive 2 $\mu\text{mol/L}$ 组和LPS+L-OHP+Ive 4 $\mu\text{mol/L}$ 组NF-κB p65、PXR和P-gp的表达水平均低于LPS组, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图6)。

在PXR高表达的HCT116/L-OHP细胞模型中, 空白对照组、Ad-PXR组、Ad-PXR+L-OHP组、Ad-PXR+L-OHP+Ive 2 $\mu\text{mol/L}$ 组和Ad-PXR+L-OHP+Ive 4 $\mu\text{mol/L}$ 组NF-κB p65的表达水平依次为 0.81 ± 0.03 、 0.87 ± 0.03 、 0.62 ± 0.00 、 0.46 ± 0.00 、 0.22 ± 0.00 , PXR的表达水平依次为 0.88 ± 0.01 、 1.01 ± 0.00 、 0.74 ± 0.01 、 0.54 ± 0.00 、 0.32 ± 0.05 ,

P-gp的表达水平依次为 0.67 ± 0.03 、 0.94 ± 0.04 、 0.78 ± 0.04 、 0.54 ± 0.00 、 0.37 ± 0.03 。Ad-PXR组NF-κB p65、PXR和P-gp的表达水平高于空白对照组, 而Ad-PXR+L-OHP组、Ad-PXR+L-OHP+Ive 2 $\mu\text{mol/L}$ 组和Ad-PXR+L-OHP+Ive 4 $\mu\text{mol/L}$ 组低于空白对照组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); Ad-PXR+L-OHP+Ive 2 $\mu\text{mol/L}$ 组和Ad-PXR+L-OHP+Ive 4 $\mu\text{mol/L}$ 组NF-κB p65、PXR和P-gp的表达水平低于Ad-PXR组和Ad-PXR+L-OHP组, 且Ad-PXR+L-OHP+Ive 4 $\mu\text{mol/L}$ 组低于Ad-PXR+L-OHP+Ive 2 $\mu\text{mol/L}$ 组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$, 图7)。

2.4 Ive增效L-OHP对裸鼠移植瘤生长的影响 体内实验结果显示, 空白对照组、Ive组、L-OHP组、

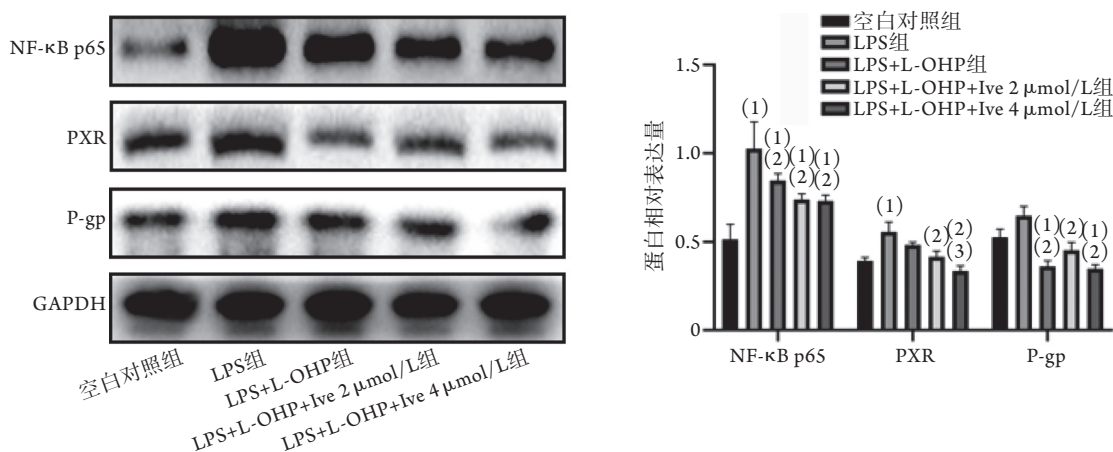


图6 NF-κB p65高表达的结肠癌HCT116/L-OHP细胞中NF-κB p65、PXR及P-gp的表达水平(Western blotting)
Fig.6 Expression levels of NF-κB p65, PXR and P-gp in colon cancer HCT116/L-OHP cells with high NF-κB p65 expression (Western blotting)

与空白对照组比较, (1) $P < 0.05$; 与LPS组比较, (2) $P < 0.05$; 与LPS+L-OHP组比较, (3) $P < 0.05$ 。

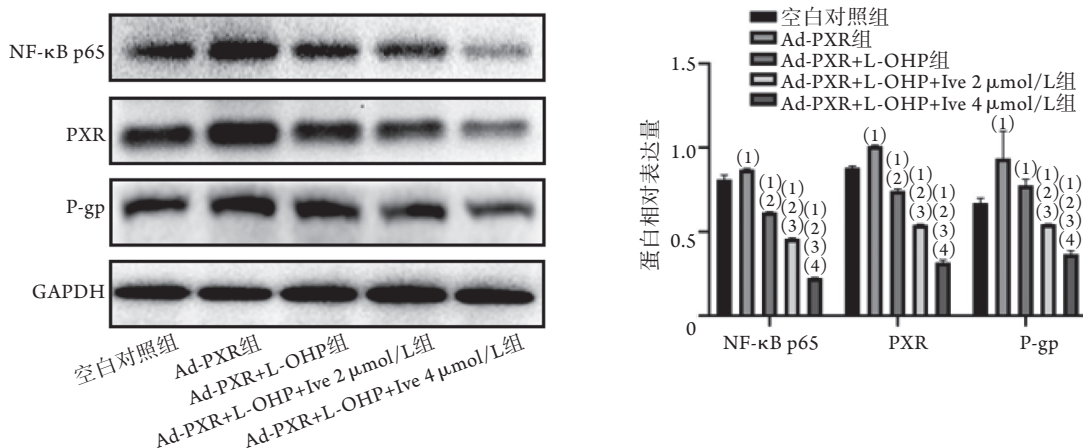


图7 PXR高表达的结肠癌HCT116/L-OHP细胞中NF-κB p65、PXR及P-gp的表达水平(Western blotting)
Fig.7 Expression levels of NF-κB p65, PXR and P-gp in colon cancer HCT116/L-OHP cells with high PXR expression (Western blotting)

与空白对照组比较, (1) $P < 0.05$; 与Ad-PXR组比较, (2) $P < 0.05$; 与Ad-PXR+L-OHP组比较, (3) $P < 0.05$; 与Ad-PXR+L-OHP+Ive 2 μmol/L组比较, (4) $P < 0.05$ 。

Ive+L-OHP组肿瘤重量依次为(1.06 ± 0.13) g、(0.69 ± 0.09) g、(0.53 ± 0.09) g、(0.19 ± 0.02) g。Ive组、L-OHP组和Ive+L-OHP组肿瘤重量低于空白对照组, L-OHP组和Ive+L-OHP组低于Ive组, Ive+L-OHP组低于L-OHP组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$, 图8)。第15、18、21天, Ive组、L-OHP组和Ive+L-OHP组肿瘤体积小于空白对照组, Ive+L-OHP组小于Ive组和L-OHP组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$, 表1)。

2.5 Ive在体内增效L-OHP对肿瘤组织中NF-κB p65、PXR及P-gp蛋白表达的影响 免疫组化检测结果显示, 空白对照组、Ive组、L-OHP组、Ive+L-OHP组肿瘤组织中NF-κB p65蛋白的相对表达密度依次为0.32 ± 0.07、0.27 ± 0.03、0.18 ± 0.01、0.12 ± 0.01, PXR蛋白的相对表达密度依次为

0.31 ± 0.05、0.25 ± 0.02、0.20 ± 0.03、0.16 ± 0.04, P-gp蛋白的相对表达密度依次为0.28 ± 0.06、0.23 ± 0.02、0.18 ± 0.03、0.14 ± 0.02。Ive组、L-OHP组和Ive+L-OHP组肿瘤组织中NF-κB p65、PXR及P-gp蛋白的相对表达密度低于空白对照组, 且L-OHP组、Ive+L-OHP组低于Ive组, Ive+L-OHP组低于L-OHP组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$, 图9)。

3 讨 论

目前, NCCN治疗指南推荐采用手术切除和化疗治疗CRC^[3], 但晚期CRC化疗成功率低。L-OHP是第三代铂类化疗药物, 与第一、二代铂类化疗药无明显交叉耐药, 已被广泛应用于治疗进展期CRC^[14]。L-OHP发挥抗癌作用的主要机制是与肿

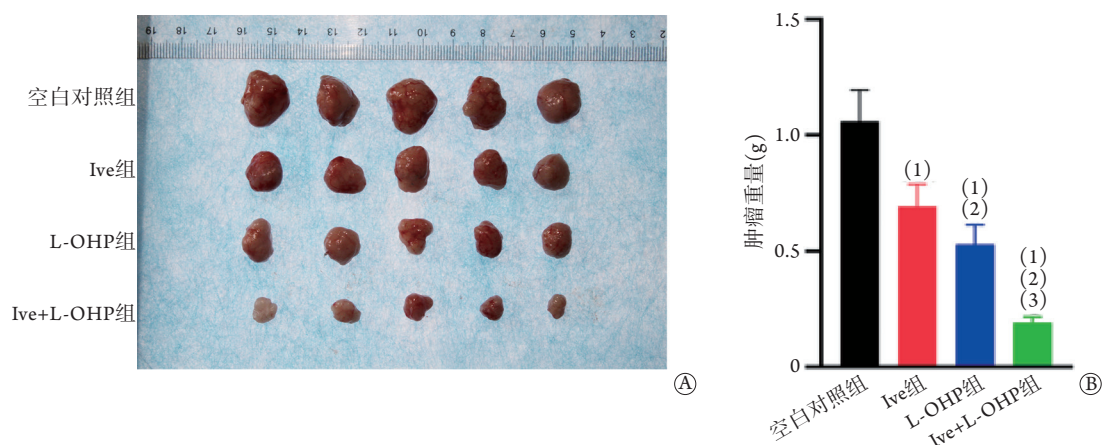


图8 Ive增效L-OHP抑制结肠癌HCT116/L-OHP细胞在体内的增殖情况($n=5$)

Fig.8 Ivermectin synergizing L-OHP to inhibit the proliferation *in vivo* of colon cancer HCT116/L-OHP cells ($n=5$)

A. 结肠癌HCT116/L-OHP耐药细胞裸鼠移植瘤; B. 肿瘤重量统计图; 与空白对照组比较, (1) $P<0.05$; 与Ive组比较, (2) $P<0.05$; 与L-OHP组比较, (3) $P<0.05$ 。

表1 结肠癌HCT116/L-OHP耐药细胞裸鼠移植瘤各时间点的肿瘤体积(mm^3 , $\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Tab.1 Tumor volume of nude mice with colon cancer HCT116/L-OHP resistant cells at each time point (mm^3 , $\bar{x}\pm s$, $n=5$)

时间	空白对照组	Ive组	L-OHP组	Ive+L-OHP组
第1天	72.48 ± 8.00	70.51 ± 10.53	72.23 ± 9.92	72.22 ± 5.45
第3天	102.31 ± 13.69	91.17 ± 10.83	91.58 ± 11.20	81.98 ± 5.11
第6天	164.76 ± 20.16	132.66 ± 11.63	130.08 ± 11.95	100.18 ± 7.96
第9天	248.44 ± 47.66	171.33 ± 17.46	166.54 ± 11.46	116.91 ± 13.57 ⁽¹⁾
第12天	438.79 ± 86.69	339.05 ± 65.42	309.71 ± 55.09 ⁽¹⁾	160.91 ± 50.27 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾
第15天	755.99 ± 96.96	526.01 ± 112.66 ⁽¹⁾	493.79 ± 79.42 ⁽¹⁾	221.16 ± 60.74 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾
第18天	1054.86 ± 129.61	710.23 ± 143.76 ⁽¹⁾	641.06 ± 95.07 ⁽¹⁾	261.70 ± 73.66 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾
第21天	1432.86 ± 170.59	1010.71 ± 71.77 ⁽¹⁾	804.22 ± 118.58 ⁽¹⁾⁽²⁾	305.99 ± 91.47 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾

与空白对照组比较, (1) $P<0.05$; 与Ive组比较, (2) $P<0.05$; 与L-OHP组比较, (3) $P<0.05$ 。

瘤细胞DNA链间或链内交联, 导致DNA损伤, 同时抑制DNA和RNA合成及触发机体的免疫反应, 促使细胞凋亡^[15]。有研究发现, 采用L-OHP标准治疗方案的进展期CRC患者中位无病生存期和总生存期均较短, 分别为10.3个月和23.7个月^[16], 分析主要原因为CRC细胞对L-OHP耐药, 化疗后期近50%的初始化疗敏感者产生获得性耐药^[17]。因此, 提高CRC患者对L-OHP的化疗敏感性是延长其生存期的关键。近年来多项研究显示, 联合给药可增效L-OHP抗结肠癌耐药细胞的作用, 如二甲双胍可诱导结肠癌HCT116耐药细胞发生线粒体凋亡, 从而逆转结肠癌细胞对L-OHP的耐药性^[18]; 葫芦巴碱可抑制Nrf-2途径以克服结肠癌细胞对L-OHP的耐药性^[19]; 人参皂苷Rh2可抑制P-gp的表达, 从而增强结肠癌LoVo耐药细胞对L-OHP的敏感性^[20]。Jiang等^[9]的研究发现, Ive在体内外均可增强长春新碱和阿霉素对结肠癌、乳腺癌、慢性髓细胞白血病耐药细胞的抗肿瘤作用。本研究体外实验结果显示, Ive可增效L-OHP抑制结肠癌HCT116/L-OHP细胞的增殖和克隆形成, 促进HCT116/L-OHP细胞的调

亡和S期细胞阻滞; 体内实验结果显示, Ive可增效L-OHP抑制HCT116/L-OHP细胞移植瘤的生长, 表明Ive可增强L-OHP抗结肠癌耐药细胞的作用, 具有成为耐药结肠癌化疗增敏药物的潜力。

细胞耐药最经典的作用机制是由ATP结合盒式转运蛋白(ATP binding cassette transporters, ABC转运蛋白)介导的。P-gp是ABC转运蛋白家族的重要成员, 为血浆膜结合药物外排性转运蛋白, 在正常组织中分布广泛, 主要存在于肠道上皮、肾小管、肝小管、血脑屏障和胎盘屏障等, 在细胞中主要表达于上皮细胞内腔侧表面、顶端和黏膜侧, 其功能是与底物相结合后将底物从细胞质中排出细胞^[21]。多种内源性和外源性化合物可经P-gp转运, 但P-gp介导的药物转运会产生不利影响, 如影响药物的输送, 继而产生多药耐药并介导临床上多种药物的相互作用。研究显示, P-gp在肺癌、胃癌、乳腺癌等多种肿瘤中高表达, 且P-gp高表达与这些肿瘤细胞产生多药耐药密切相关^[22-24]。由于L-OHP是P-gp的常见底物^[25], 在结肠癌细胞中P-gp与L-OHP结合后可将L-OHP往胞外排出, 降低了其胞内浓度和药

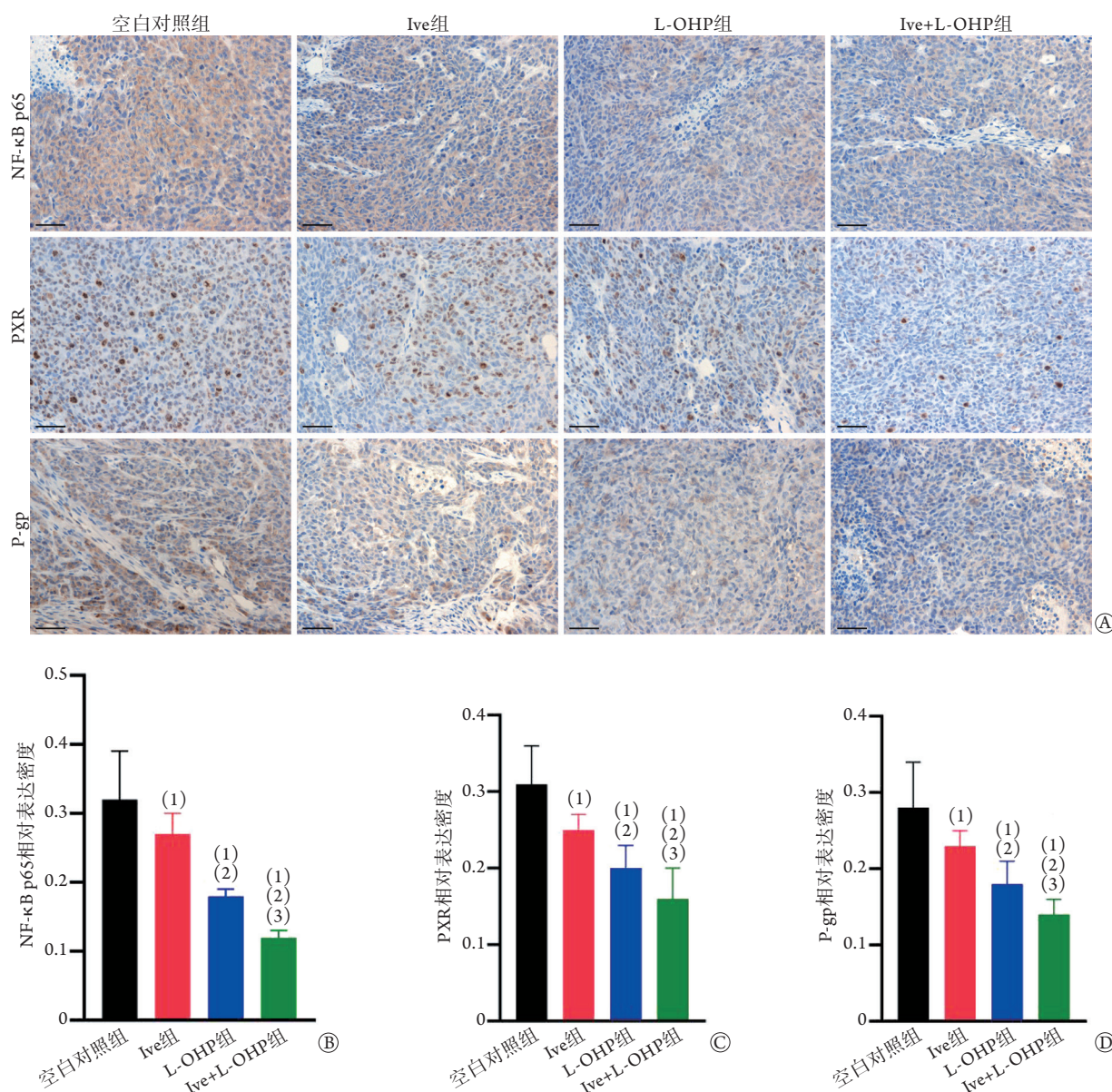


图9 免疫组化检测肿瘤组织中NF-κB p65、PXR及P-gp的表达情况

Fig.9 The expressions of NF-κB p65, PXR and P-gp in tumor tissues (Immunohistochemical detection)

A. 免疫组化图; B. 肿瘤组织中NF-κB p65相对表达量; C. 肿瘤组织中PXR相对表达量; D. 肿瘤组织中P-gp相对表达量; 与空白对照组比较, (1) $P < 0.05$; 与Ive组比较, (2) $P < 0.05$; 与L-OHP组比较, (3) $P < 0.05$ 。

物利用率, 致使细胞产生耐药性, 从而影响化疗效果。因此, 抑制P-gp的表达是增强结肠癌细胞对L-OHP化疗敏感性的重要途径。

NF-κB的经典激活途径是外源性刺激使蛋白激酶(IKK)磷酸化激活, 激活状态下的IKK可磷酸化IκB蛋白, 使NF-κB p65转位至细胞核内参与基因转录的调控^[26]。有研究发现, NF-κB p65核转位后可与PXR/RXR异源二聚体上的RXR反应元件结合, 然后PXR/RXR与P-gp基因序列的上游调节元件结合, 从而参与P-gp基因转录的调控^[27-28]。因此, 抑制NF-κB/PXR通路的表达可减弱P-gp的外排作用。有研究者在大肠癌耐药细胞株HCT-8/VCR中

发现, 抑制NF-κB的活性后, 大肠癌细胞中P-gp表达减少, 对长春新碱的敏感性明显增强^[29]。本研究结果显示, 在结肠癌HCT116/L-OHP细胞中, Ive可协同L-OHP抑制NF-κB p65、PXR及P-gp蛋白的表达; 在NF-κB p65和PXR高表达的结肠癌HCT116/L-OHP细胞中, 当仅高表达NF-κB p65时, PXR的表达水平升高, 而仅高表达PXR时, NF-κB p65和P-gp的表达水平平均升高, 提示结肠癌HCT116/L-OHP细胞中NF-κB p65与PXR相互调控, 可增加下游P-gp耐药蛋白的表达; 使用Ive处理NF-κB p65和PXR高表达的结肠癌HCT116/L-OHP细胞后, NF-κB p65、PXR及P-gp蛋白的表达被逆转, 表明

NF- κ B p65可通过正向调控PXR而促进P-gp蛋白的表达, IVE发挥增效抗耐药作用的潜在机制是通过抑制NF- κ B p65/PXR的表达而抑制P-gp蛋白的耐药作用。既往研究发现, IVE可与表皮生长因子受体结合, 抑制表皮生长因子受体的激活及其下游的ERK/Akt/NF- κ B信号通路, NF- κ B被抑制后P-gp的转录减少, 从而逆转了肿瘤细胞的耐药性^[9]。

本研究存在一定的局限性, 如未能建立同时高表达和低表达NF- κ B p65、PXR的结肠癌HCT116/L-OHP细胞模型, 从正反方向验证IVE抗结肠癌耐药的作用机制, 以及通过细胞增殖、细胞凋亡等表型实验验证IVE对高表达和低表达NF- κ B p65、PXR的HCT116/L-OHP细胞的作用; 未在体内外实验中利用液相二级质谱技术检测L-OHP的浓度以及利用Caco-2细胞模型观察IVE对P-gp外排的影响。

综上所述, 本研究结果表明, IVE可增效L-OHP抑制结肠癌HCT116/L-OHP细胞的增殖和克隆形成, 促进HCT116/L-OHP细胞的凋亡和S期阻滞, 其可能的机制是通过抑制NF- κ B p65/PXR信号通路的表达而减弱P-gp蛋白的耐药作用。

【参考文献】

- [1] International Agency for Research on Cancer. Latest global cancer data: Cancer burden rises to 19.3 million new cases and 10.0 million cancer deaths in 2020[EB/OL]. (2021-02-04) [2021-02-26]. <https://www.iarc.fr/faq/latest-global-cancer-data-2020-qa/>.
- [2] Zhang P, Zhou J, Yang R, *et al.* The clinical efficacy and safety of SOX and XELOX in the treatment of advanced gastric cancer[J]. *Clin J Med Offic*, 2020, 48(7): 781-783. [张鹏, 周静, 杨睿, 等. 奥沙利铂联合替吉奥与奥沙利铂联合卡培他滨治疗晚期胃癌有效性及安全性比较研究[J]. *临床军医杂志*, 2020, 48(7): 781-783.]
- [3] National Comprehensive Cancer Network. NCCN clinical practice guidelines in oncology (NCCN guidelines): Colon cancer[EB/OL]. (2017-10-12) [2021-02-26]. https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/colon.pdf.
- [4] Feng J, Ren LQ, Chen SX, *et al.* Inhibitory effects of cucurbitacin B combined with oxaliplatin on proliferation and apoptosis of human colon cancer SW480 cells and their mechanisms[J]. *J Jilin Univ (Med Ed)*, 2020, 46(1): 78-83, 209-210. [冯杰, 任立群, 陈素贤, 等. 葫芦素B联合奥沙利铂对人结肠癌SW480细胞增殖和凋亡的抑制作用及其机制[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2020, 46(1): 78-83, 209-210.]
- [5] Crump A. Ivermectin: Enigmatic multifaceted 'wonder' drug continues to surprise and exceed expectations[J]. *J Antibiot*, 2017, 70(5): 495-505.
- [6] Bai SH, Ogbourne S. Eco-toxicological effects of the avermectin family with a focus on abamectin and ivermectin[J]. *Chemosphere*, 2016, 154: 204-214.
- [7] Liu Y, Fang S, Sun Q, *et al.* Anthelmintic drug ivermectin inhibits angiogenesis, growth and survival of glioblastoma through inducing mitochondrial dysfunction and oxidative stress[J]. *Biochem Bioph Res Commun*, 2016, 480(3): 415-421.
- [8] Zhu M, Li Y, Zhou Z. Antibiotic ivermectin preferentially targets renal cancer through inducing mitochondrial dysfunction and oxidative damage[J]. *Biochem Bioph Res Commun*, 2017, 492(3): 373-378.
- [9] Jiang L, Wang P, Sun YJ, *et al.* Ivermectin reverses the drug resistance in cancer cells through EGFR/ERK/Akt/NF- κ B pathway[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 265.
- [10] Xie YJ, Kuang SY, Deng HM, *et al.* Effects of ivermectin on migration and invasion of human gastric cancer cells BGC-823 and MGC-803 and its mechanism[J]. *China Pharm*, 2019, 30(5): 621-627. [谢燕娇, 邝少轶, 邓慧鸣, 等. 伊维菌素对人胃癌细胞BGC-823、MGC-803迁移和侵袭的影响及机制研究[J]. *中国药房*, 2019, 30(5): 621-627.]
- [11] Xiang Z. Establishment of an oxaliplatin-induced human colon carcinoma drug-resistant cell line and its reversion[D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2007: 15. [向征. 人结肠癌奥沙利铂耐药细胞株的建立及逆转[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2007: 15.]
- [12] Fang Z, Gong C, Yu S, *et al.* NFYB-induced high expression of E2F1 contributes to oxaliplatin resistance in colorectal cancer via the enhancement of CHK1 signaling[J]. *Cancer Lett*, 2018, 415: 58-72.
- [13] Ren HL, Wang Z, Chen Y, *et al.* SMYD2-OE promotes oxaliplatin resistance in colon cancer through MDR1/P-glycoprotein via MEK/ERK/AP1 pathway[J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 2585-2594.
- [14] O'Connell MJ. Oxaliplatin or irinotecan as adjuvant therapy for colon cancer: The results are in[J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(19): 3082-3084.
- [15] Yin C, Lu W, Ma M, *et al.* Efficacy and mechanism of combination of oxaliplatin with PKM2 knockdown in colorectal cancer[J]. *Oncol Lett*, 2020, 20(6): 312.
- [16] Petrelli F, Coiro A, Ghilardi M, *et al.* Efficacy of oxaliplatin-based chemotherapy + bevacizumab as first-line treatment for advanced colorectal cancer: A systematic review and pooled analysis of published trials[J]. *Am J Clin Oncol*, 2015, 38(2): 227-233.
- [17] Kopetz S, Hoff PM, Morris JS, *et al.* Phase II trial of infusional fluorouracil, irinotecan, and bevacizumab for metastatic colorectal cancer: efficacy and circulating angiogenic biomarkers associated with therapeutic resistance[J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(3): 453-459.
- [18] Liu C, Liu Q, Yan A, *et al.* Metformin revert insulin-induced oxaliplatin resistance by activating mitochondrial apoptosis pathway in human colon cancer HCT116 cells[J]. *Cancer Med*, 2020, 9(11): 3875-3884.
- [19] Tazehkand AP, Salehi R, Velaei K, *et al.* The potential impact of trigonelline loaded micelles on Nrf2 suppression to overcome oxaliplatin resistance in colon cancer cells[J]. *Mol Biol Rep*, 2020, 47(8): 5817-5829.
- [20] Ma J, Gao G, Lu H, *et al.* Reversal effect of ginsenoside Rh2 on oxaliplatin-resistant colon cancer cells and its mechanism[J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(1): 630-636.
- [21] Li YH, Bi HC, Huang L, *et al.* Phorbol 12-myristate 13-acetate inhibits P-glycoprotein-mediated efflux of digoxin in MDCKII-MDR1 and Caco-2 cell monolayer models[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2014, 35(2): 283-291.

- [22] Sun LR, Zhong JL, Cui SX, *et al.* Modulation of P-glycoprotein activity by the substituted quinoxalinone compound QA3 in adriamycin-resistant K562/A02 cells[J]. *Pharmacol Rep*, 2010, 62(2): 333-342.
- [23] Chen Z, Shi T, Zhang L, *et al.* Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade[J]. *Cancer Lett*, 2016, 370(1): 153-164.
- [24] Wang LH, Yang JY, Yang SN, *et al.* Suppression of NF- κ B signaling and P-glycoprotein function by gambogic acid synergistically potentiates adriamycin -induced apoptosis in lung cancer[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2014, 14(1): 91-103.
- [25] Lu QQ. Study on the effect and molecular mechanism of melatonin on 5-fluorouracil resistance in hepatocellular carcinoma[D]. Hefei: Anhui Medical University, 2019: 61. [鲁倩倩. 褪黑素对肝癌细胞5-氟尿嘧啶耐药的影响及其机制研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2019: 61.]
- [26] Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF- κ B signaling[J]. *Cell*, 2008, 132(3): 344-362.
- [27] Gu X, Ke S, Liu D, *et al.* Role of NF- κ B in regulation of PXR-mediated gene expression, a mechanism for the suppression of cytochrome P450 3A4 by pro-inflammatory agents[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(26): 17882-17889.
- [28] Urquhart BL, Tirona RG, Kim RB. Nuclear receptors and the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters: implications for interindividual variability in response to drugs[J]. *J Clin Pharmacol*, 2007, 47(5): 566-578.
- [29] Zhang X, Cai SB, Chen ZX, *et al.* Effect of Zhizhen recipe on expression of NF- κ B and P-gp in human colorectal cancer line HCT-8/VCR[J]. *Chin J Integrat Tradit West Med Digest*, 2011, 19(6): 389-393. [张旭, 蔡松柏, 陈志霞, 等. 至真方对人大肠癌多药耐药细胞株HCT-8/VCR中核因子- κ B及P糖蛋白表达的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2011, 19(6): 389-393.]

(收稿日期: 2021-03-02; 修回日期: 2021-04-20)

(责任编辑: 纪方方)