

冬凌草甲素对卵巢癌细胞紫杉醇耐药性的拮抗作用及其机制研究

王汉楚¹, 沙丽晓², 陈小燕¹, 周莉¹, 郑飞云^{3*}

1. 温州医学院附属第一医院 妇产科, 浙江 温州 325000

2. 温州市第三人民医院 妇产科, 浙江 温州 325000

3. 温州医学院, 浙江 温州 325000

摘要: **目的** 探讨冬凌草甲素体内外对卵巢癌细胞紫杉醇耐药性的拮抗作用及其机制。**方法** 通过大剂量冲击法, 诱导制备耐紫杉醇的人卵巢癌 HO-8910PM 细胞株 (HO-8910PM/PIX), 用不同浓度冬凌草甲素处理 HO-8910PM/PIX 细胞; 或在冬凌草甲素作用 HO-8910PM/PIX 细胞前以 NF- κ B 激活剂 TPA 进行预处理。给药后, 细胞经 DAPI 染色, 荧光显微镜下观察细胞形态变化; CCK-8 法检测细胞增殖; 流式细胞仪检测细胞凋亡情况; Western blotting 检测卵巢癌细胞中 NF- κ B 蛋白的表达。建立裸鼠卵巢癌皮下移植瘤模型。接种后 8 周, 观察冬凌草甲素对裸鼠皮下移植瘤生长的影响; 免疫组织化学法检测肿瘤组织中 NF- κ B 的阳性表达。**结果** 与对照组相比, 冬凌草甲素呈浓度相关性抑制卵巢癌 HO-8910PM/PIX 细胞增殖, 显著诱导细胞凋亡, 而 TPA 可显著削弱冬凌草甲素诱导细胞凋亡的作用。与 HO-8910PM 细胞相比, NF- κ B 在 HO-8910PM/PIX 细胞中表达显著上调, 冬凌草甲素可抑制 HO-8910PM/PIX 细胞中 NF- κ B 的表达。冬凌草甲素可显著抑制裸鼠卵巢癌皮下移植瘤生长, 明显减弱移植瘤组织中 NF- κ B 的阳性表达。**结论** 冬凌草甲素体内外对卵巢癌细胞紫杉醇耐药性具有拮抗作用, 该作用可能通过抑制 NF- κ B 的表达而实现。

关键词: 冬凌草甲素; 卵巢癌细胞株 HO-8910PM/PIX; 紫杉醇耐药性; 细胞凋亡; 细胞增殖; NF- κ B

中图分类号: R282.710.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2012)03-0534-06

Antagonistic effect of oridonin on paclitaxel-resistance of ovarian cancer cells and its mechanism

WANG Han-chu¹, SHA Li-xiao², CHEN Xiao-yan¹, ZHOU Li¹, ZHENG Fei-yun³

1. Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China

2. Department of Obstetrics and Gynecology, the Third People's Hospital of Wenzhou, Wenzhou 325000, China

3. Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China

Abstract: **Objective** To investigate the antagonistic effect of oridonin on paclitaxel-resistance of human ovarian carcinoma cells and its mechanism. **Methods** Paclitaxel-resistant human ovarian cancer cell line (HO-8910PM/PIX) was established with HO-8910PM cells. HO-8910PM/PIX cells were treated with different concentrations of oridonin, or pretreated with NF- κ B activator TPA, then followed by the treatment of oridonin. HO-8910PM/PIX cells morphological changes were observed under the fluorescence microscopy after DAPI staining, the cellular proliferation was detected by CCK-8 assay. The flow cytometry was used to determine the apoptosis. Western blotting was used to detect the protein expression of NF- κ B in ovarian cancer cells. HO-8910PM/PIX cells were sc injected into nude mice to establish ovarian xenograft tumor model. Eight weeks after implantation, the inhibitory effect on growth of xenograft tumor in nude mice was observed. Immunohistochemistry was used to detect the positive expression of NF- κ B in the tumor tissues. **Results** The proliferation of HO-8910PM/PIX cells was significantly inhibited by oridonin with a concentration correlation. Apoptotic rate induced by oridonin was markedly higher than that in the control group. However, pretreated with TPA, the apoptosis induced by oridonin was significantly attenuated. Compared to HO-8910PM cells, NF- κ B protein expression in HO-8910PM/PIX cells was obviously up-regulated, which could be inhibited by oridonin. Oridonin could significantly inhibit the growth of xenograft tumor in nude mice and weaken the positive expression of NF- κ B in xenograft tumor tissues. **Conclusion** Oridonin has antagonistic effect on paclitaxel-resistance of human ovarian cancer cells both *in vivo* and *in vitro*, which may be related to the down-regulation of NF- κ B expression.

Key words: oridonin; ovarian cancer cell line HO-8910PM/PIX; paclitaxel-resistance; apoptosis; cell proliferation; NF- κ B

收稿日期: 2011-09-18

作者简介: 王汉楚, 男, 硕士, 从事妇科临床工作。

*通讯作者 郑飞云 E-mail: 1007882803@qq.com

卵巢癌是妇科中常见恶性肿瘤,其死亡率居妇科肿瘤首位。手术治疗和以紫杉醇、顺铂等为主的联合化疗方案是目前卵巢癌治疗的重要手段。而在临床治疗过程中会出现由于长期治疗而导致肿瘤细胞对化疗药物产生的耐药性,5年存活率仅45%^[1]。如何逆转卵巢癌细胞的耐药问题成为卵巢癌治疗的热点和难点。目前国内外对卵巢癌化疗耐药机制的研究多采用浓度梯度递增法建立耐药细胞株,且关于卵巢癌对紫杉醇耐药的研究较少。研究发现,提取自唇形科香茶菜属植物中的冬凌草甲素能有效抑制鼻咽癌^[2]、肝癌^[3]、肺癌^[4]、胃癌^[5-6]等多种肿瘤细胞生长,但目前尚未见冬凌草甲素对卵巢癌耐药作用的研究报道。因此,本实验模拟紫杉醇的临床大剂量冲击用药所对应的剂量和给药方式,建立人卵巢癌紫杉醇耐药细胞株(HO-8910PM/PIX),探讨冬凌草甲素对HO-8910PM/PIX细胞株的影响及其可能机制,为卵巢癌临床治疗提供参考。

1 材料

1.1 药品与试剂

冬凌草甲素(质量分数>98%),中国科学院昆明植物研究所,用二甲基亚砜(DMSO)溶液配成10 mmol/L储备液(DMSO终体积分数<0.1%);紫杉醇,海南新世通制药有限公司,批号20110401;所用药物均经0.22 μm微孔滤膜滤过除菌后分装,于-20℃冻存,临用时用不含血清的RPMI 1640培养基稀释成所需浓度。胎牛血清(FBS)、RPMI 1640培养基、含EDTA胰酶,美国Gibco公司;DAPI染色试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒、CCK-8试剂盒,上海碧云天生物技术研究;Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒,南京凯基生物发展有限公司;NF-κB抗体,美国Epitomics公司;NF-κB激活剂TPA,美国Sigma公司,用DMSO配成30 μmol/L的贮存液(DMSO终体积分数<0.1%)。

1.2 动物

BALB/c雌性小鼠,4~6周龄,体质量18~20 g,购于中国科学院上海实验动物中心,许可证号:SCXK(沪)2007-0005。

1.3 细胞

人卵巢癌细胞株HO-8910PM购自ATCC,培养在含10% FBS、100 U/mL青霉素、100 μg/mL链霉素的RPMI 1640培养液中,置于37℃、5% CO₂的培养箱中。细胞单层贴壁生长至70%~80%融合时,胰蛋白酶消化传代。

2 方法

2.1 HO-8910PM/PIX细胞株的制备

为使细胞培养体系中紫杉醇的终质量浓度与人体内有效血药浓度相近,参照郭和清等^[7]的方法,以卵巢癌患者紫杉醇临床化疗方案的用药剂量175 mg/m²计算,求得紫杉醇终质量浓度约100 μg/mL。以临床大剂量冲击疗法的用药剂量为常用剂量的3倍为标准^[8],本实验采用大剂量冲击法,以终质量浓度为300 μg/mL的紫杉醇作用于HO-8910PM细胞2 h来诱导细胞耐药。取对数生长期达80%~90%融合生长的HO-8910PM细胞,加入300 μg/mL紫杉醇作用2 h,待细胞恢复生长再进行第2次冲击,如此反复作用6次,历时5个月,最终建立耐紫杉醇的人卵巢癌细胞株HO-8910PM/PIX(耐药指数为6.70倍)。

2.2 细胞形态学观察

取浓度为1×10⁶/L的HO-8910PM/PIX细胞悬液0.5 mL接种于载玻片上,待过夜细胞贴壁后更换培养液,分别加入不同浓度(10、20、40 μmol/L)的冬凌草甲素培养24 h。甲醛固定,DAPI染色5 min,荧光显微镜(×400, BX51TF型, Olympus)下观察细胞形态。

2.3 CCK-8法检测细胞存活率

收集处于对数生长期的HO-8910PM/PIX细胞,调整细胞浓度为5×10⁵/mL,接种于96孔细胞培养板中,每孔10 μL。过夜待细胞贴壁后,分别加入不同浓度(10、20、40 μmol/L)冬凌草甲素,置37℃培养箱作用24 h,同时设置空白组(不加细胞加入等量双蒸水)以及阴性对照组(加细胞加入等量双蒸水)。药物作用结束前1 h,各孔加入CCK-8溶液0.01 mL,继续培养1 h,用酶标仪(ELX800型, Bio-Tek)测各孔450 nm处的吸光度(A)值,计算细胞存活率。

细胞存活率=(实验组A₄₅₀值-空白组A₄₅₀值)/(对照组A₄₅₀值-空白组A₄₅₀值)

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡

将对数生长期HO-8910PM/PIX细胞4×10⁵个,接种在6孔培养板中,生长至90%融合时加入不同浓度(10、20、40 μmol/L)冬凌草甲素作用24 h。另HO-8910PM/PIX细胞经TPA(80 nmol/L)预处理1 h后再加入冬凌草甲素(40 μmol/L)作用24 h。细胞经胰蛋白酶消化,1 000 r/min离心5 min,冷PBS洗2次,按试剂盒说明用500 μL结合缓冲液

重悬细胞, 加入 5 μL AnnexinV-FITC 混匀后, 再加入 5 μL PI, 混匀, 室温避光培养 15 min 上机检测, 检测细胞数为 1×10^4 /组。激发波长 488 nm, 发射波长 530 nm。Cell quest 软件分析。

2.5 Western blotting 检测 HO-8910PM/PIX 细胞中 NF- κ B 的表达

收集处于对数生长期的 HO-8910PM/PIX 细胞, 接种于 6 孔板, 细胞过夜贴壁后分别用冬凌草甲素 (10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 作用 24 h, RIPA 裂解液裂解细胞, 提取上清液, 采用 Bradford 法蛋白定量后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 及转膜。经脱脂奶粉封闭后滴加 NF- κ B 抗体作为一抗, HRP 标记的 IgG 为二抗, ECL 显色, X 线胶片曝光。

2.6 裸鼠卵巢癌皮下移植瘤模型制备与给药

将 4×10^7 个 HO-8910PM/PIX 细胞悬浮于 0.2 mL 无血清 RPMI 1640 培养基中, sc 至 BALB/c 裸鼠背部靠近右侧后肢, 以制备裸鼠卵巢癌皮下移植瘤模型。接种肿瘤细胞 2 周后, 待移植瘤体积长至 100 mm^3 , 将荷瘤裸鼠随机分为对照组 (ig 0.1% DMSO 0.2 mL)、紫杉醇组 (ip 20 mg/kg) 和冬凌草甲素组 (ig 40 mg/kg), 每组 10 只, 紫杉醇每周给药 1 次, 冬凌草甲素每周给药 3 次, 两给药组均连续给药 3 周, 每次给药体积均为 0.2 mL。第 8 周处死裸鼠, 取皮下移植瘤组织, 行常规病理检查, 测肿瘤质量后计算抑瘤率。

2.7 免疫组织化学法检测肿瘤组织 NF- κ B 表达

取各组新鲜肿瘤组织, 切片, 脱蜡, 微波抗原修复及阻断内源性过氧化物酶后加入兔抗人 NF- κ B 抗体, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, PBS 冲洗, 加二抗孵育 30 min, PBS 冲洗, 加 SABC 室温孵育 20 min, DAB 显色,

显微镜下控制显色时间, 苏木素轻度复染, 细胞核棕黄色染色为阳性。显微镜 ($\times 400$) 下取 10 个视野, 计数镜下染色阳性细胞所占比例。

2.8 统计学处理

计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示, 采用 SPSS 13.0 统计软件进行方差分析和 t 检验。

3 结果

3.1 对 HO-8910PM/PIX 细胞形态学的影响

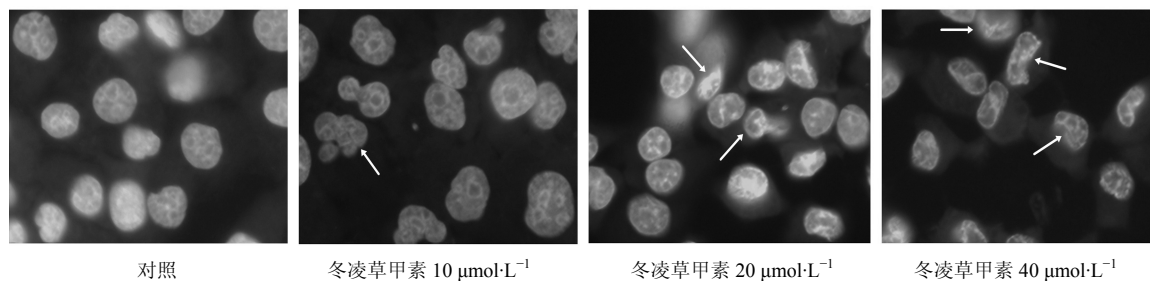
荧光显微镜下观察到对照组的 HO-8910PM/PIX 细胞核完整而规则; 经冬凌草甲素处理后 HO-8910PM/PIX 细胞出现明显核固缩和染色体凝集等凋亡特征性改变, 低浓度组细胞核逐渐出现波纹状改变, 且随着冬凌草甲素浓度的增加, 中浓度组部分染色质出现浓缩和边缘化, 高浓度冬凌草甲素作用 HO-8910PM/PIX 细胞后, 细胞核裂解为碎片, 产生大量凋亡小体。表明冬凌草甲素可明显诱导耐紫杉醇卵巢癌 HO-8910PM/PIX 细胞凋亡。结果见图 1。

3.2 对 HO-8910PM/PIX 细胞增殖的影响

HO-8910PM/PIX 细胞经不同浓度 (10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 冬凌草甲素作用 24 h 后, 细胞存活率分别为 83.1%、80.5%、75.8%, 与对照组相比较均有统计学差异 ($P < 0.05$)。结果见图 2。

3.3 对 HO-8910PM/PIX 细胞凋亡的影响

不同浓度 (10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 冬凌草甲素作用 HO-8910PM/PIX 细胞 24 h 后, 分别诱导 (6.3 ± 1.5) %、(8.1 ± 1.7) %、(10.6 ± 2.1) % 的 HO-8910PM/PIX 细胞凋亡, 与对照组 [(2.5 ± 0.6) %] 相比均有显著差异 ($P < 0.01$ 、 0.001) (图 3-A)。用 TPA 80 nmol/L 处理后对卵巢癌 HO-8910PM/PIX 细胞凋亡未见明显影响, 但以 TPA 80 nmol/L 预处理



箭头所示为细胞皱缩或核固缩、染色体凝集和凋亡小体

Arrow shows cell shrinkage or nuclear solid shrinkage, chromosome condensation, and apoptotic bodies

图 1 冬凌草甲素对 HO-8910PM/PIX 细胞形态学的影响

Fig. 1 Effect of oridonin on cell morphological changes in HO-8910PM/PIX

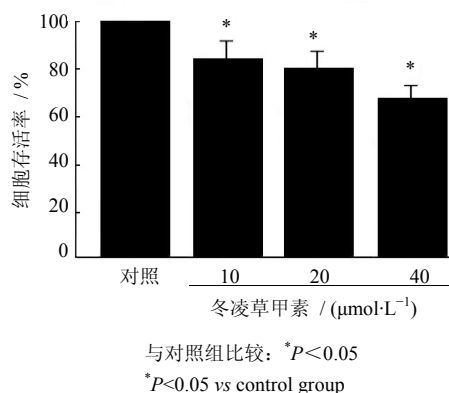


图 2 冬凌草甲素对 HO-8910PM/PIX 细胞增殖的影响

Fig. 2 Effect of oridonin on proliferation of HO-8910PM/PIX

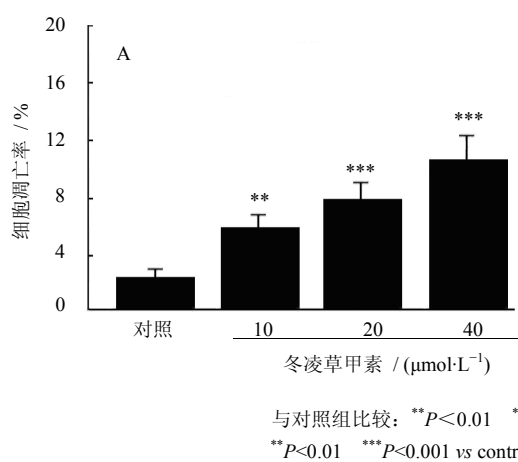


图 3 冬凌草甲素单用 (A) 及与 TPA 联合用药 (B) 对 HO-8910PM/PIX 细胞凋亡的影响

Fig. 3 Effect of oridonin single administration (A) or combined with TPA (B) on apoptosis of HO-8910PM/PIX

HO-8910PM/PIX 细胞 1 h 后再给予冬凌草甲素 $40 \mu\text{mol/L}$, 可显著减弱冬凌草甲素对 HO-8910PM/PIX 细胞凋亡的诱导作用 (图 3-B)。

3.4 对卵巢癌细胞中 NF- κ B 蛋白表达的影响

与 HO-8910PM 细胞相比较, NF- κ B 在 HO-8910PM/PIX 细胞中的表达明显上调; 而冬凌草甲素作用于卵巢癌 HO-8910PM/PIX 细胞 24 h 后, HO-8910PM/PIX 细胞中 NF- κ B 蛋白显著下调, 并呈浓度相关性。结果见图 4。

3.5 对裸鼠卵巢癌皮下移植瘤生长的影响

HO-8910PM/PIX 细胞接种于裸鼠 7 d 后, 均可在裸鼠皮下触摸到结节, 移植瘤成功率为 100%。

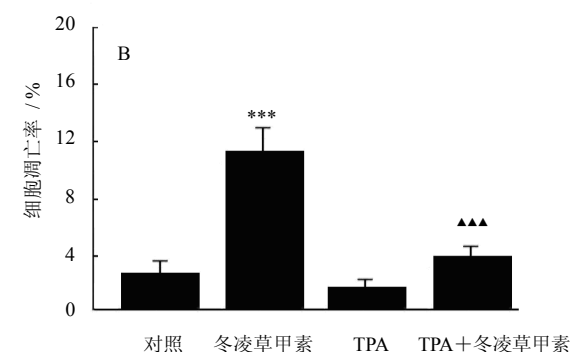
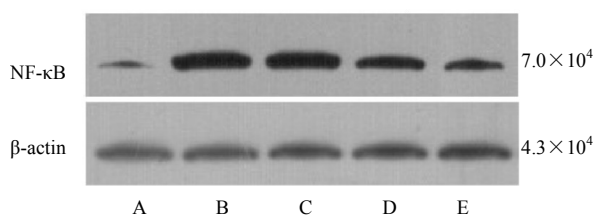


图 3 冬凌草甲素单用 (A) 及与 TPA 联合用药 (B) 对 HO-8910PM/PIX 细胞凋亡的影响

Fig. 3 Effect of oridonin single administration (A) or combined with TPA (B) on apoptosis of HO-8910PM/PIX



A-HO-8910PM B-HO-8910PM/PIX C-HO-8910PM/PIX + 冬凌草甲素 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ D-HO-8910PM/PIX + 冬凌草甲素 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ E-HO-8910PM/PIX + 冬凌草甲素 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
A-HO-8910PM B-HO-8910PM/PIX C-HO-8910PM/PIX + oridonin $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ D-HO-8910PM/PIX + oridonin $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ E-HO-8910PM/PIX + oridonin $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

图 4 冬凌草甲素对 HO-8910PM 中 NF- κ B 蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of oridonin on protein expression of NF- κ B in HO-8910PM

给药后第 8 周处死裸鼠, 分离皮下移植瘤, 称质量。结果显示, 与对照组瘤质量为 $(0.684 \pm 0.154) \text{ g}$ 相比, 紫杉醇组和冬凌草甲素组肿瘤分别为 $(0.514 \pm$

$0.116)$ 、 $(0.375 \pm 0.067) \text{ g}$, 差异显著 ($P<0.05$), 紫杉醇组瘤质量与冬凌草甲素组相比也有显著差异 ($P<0.05$); 紫杉醇组和冬凌草甲素组抑瘤率分别为 29.11%、47.09%。

3.6 对裸鼠肿瘤组织病理学和 NF- κ B 表达的影响

对照组裸鼠肿瘤组织血供丰富, 肿瘤细胞增殖活跃, 细胞核异型性明显; 紫杉醇组肿瘤细胞轮廓稍显模糊, 核仁不太明显; 而冬凌草甲素组肿瘤组织出现大量坏死细胞。免疫组织化学染色检测可见, 对照组肿瘤组织中大量细胞 NF- κ B 阳性表达; 与对照组相比, 紫杉醇组肿瘤切片中 NF- κ B 表达上调; 而冬凌草甲素组肿瘤组织中 NF- κ B 表达显著被抑制。各组肿瘤组织切片经 PBS 代替特异性一抗作为空白对照, 肿瘤组织镜下均无阳性表达。结果见图 5。

4 讨论

紫杉醇在卵巢癌的治疗中存在抗药性, 因此单用其治疗卵巢癌的效果不佳^[9]。在本实验中, 通过

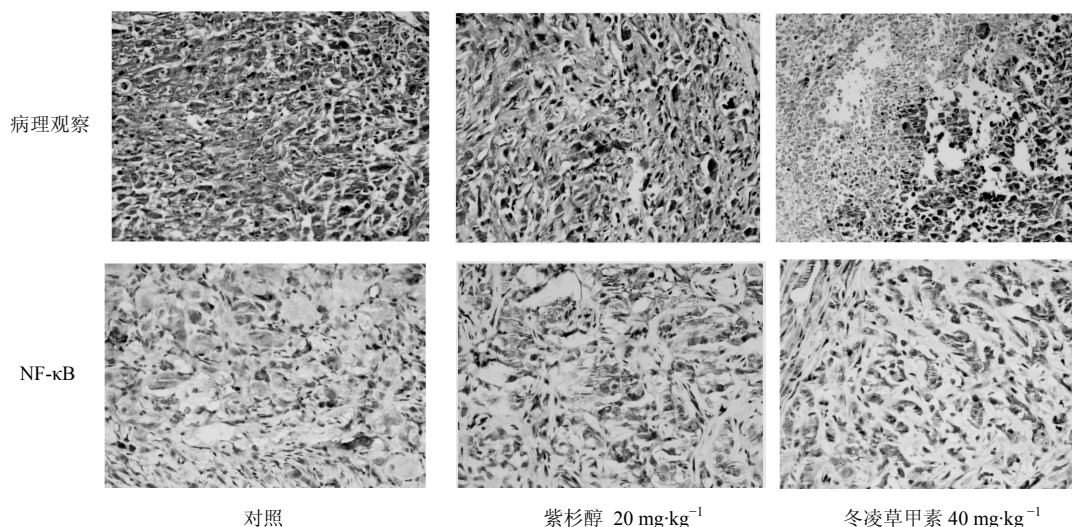


图 5 冬凌草甲素对裸鼠卵巢癌皮下移植瘤组织病理学及 NF-κB 表达的影响

Fig. 5 Effect of oridonin on ovarian xenograft tumor histopathology and NF-κB expression in nude mice

大剂量冲击法, 成功诱导培养 HO-8910PM/PIX 细胞株, 这种诱导耐药的方法与临床获得性耐药过程接近。前期实验显示, 冬凌草甲素对紫杉醇敏感型卵巢癌 HO-8910PM 细胞增殖有明显的抑制作用^[10]。在本实验中发现, 冬凌草甲素明显抑制耐紫杉醇的卵巢癌 HO-8910PM/PIX 细胞株生长, 细胞形态学和流式细胞术检测结果也同时证实冬凌草甲素能有效诱导细胞凋亡; 体内实验首次观察到冬凌草甲素对接种耐药的卵巢癌 HO-8910PM/PIX 细胞后皮下移植肿瘤的生长具显著抑制作用, 效果优于紫杉醇; 组织病理学观察到冬凌草甲素使裸鼠卵巢肿瘤组织出现大片坏死, 与体外实验结果相符, 显示出冬凌草甲素抗耐药型卵巢癌细胞的可喜前景。

研究发现, NF-κB 与肿瘤的发生、生长、转移及其血管生长等有密切联系^[11], 同时有文献报道紫杉醇能上调肿瘤细胞中 NF-κB 活性^[12], NF-κB 激活后转运至核内, 进而调控一系列凋亡相关蛋白如 IAPs 家族和 Bcl-2 家族^[13-14]等。IAPs 家族中最重要的凋亡抑制蛋白之一 XIAP 在大多数的肿瘤细胞株中呈过度表达状态, 可直接抑制 Caspases 级联反应, 特别是 Caspase-3 的激活而抑制细胞凋亡, 从而与肿瘤化疗耐药密切相关^[15]; 而 IAPs 家族另一重要蛋白 Survivin 则直接作用于细胞凋亡途径中的终末效应酶 Caspase-3 和 Caspase-7^[16-17], 从而直接抑制细胞凋亡; Bcl-2 家族重要蛋白 Bcl-2 不仅可阻断细胞色素 C 释放, 还可直接与凋亡活化因子 Apaf-1 结合, 阻止 Caspase 活化, 从而发挥抗凋亡作用。

这些进一步表明 NF-κB 在介导肿瘤细胞耐药中的重要地位。在本研究中, 相对原代 HO-8910PM 细胞, HO-8910PM/PIX 细胞株中 NF-κB 表达上调; 体内实验也表明, 紫杉醇给药后裸鼠皮下移植瘤组织中 NF-κB 的表达上调, 与文献报道相符^[12], 从而表明 NF-κB 与卵巢癌细胞获得性耐药关系密切, 同时提示抑制 NF-κB 能逆转卵巢癌的耐药性。

Arlt 等^[18]使用 NF-κB 抑制剂柳氮磺吡啶能增强人胰腺癌 BxPc-3、PancTu-1 和 Capan-1 细胞对吉西他滨的敏感性。在本实验中, 冬凌草甲素在体内外能有效抑制耐紫杉醇卵巢癌细胞生长, 提示其可能通过抑制卵巢癌细胞中 NF-κB 的表达而逆转卵巢癌的耐药性。为此本实验采用 TPA 预先作用于卵巢癌细胞, 观察其对卵巢癌药物敏感性的影响, 结果 TPA 可促使 IκBα 磷酸化和降解, 从而激活 NF-κB, 使 HO-8910PM/PIX 细胞对冬凌草甲素的敏感性显著减弱, 证明冬凌草甲素可能通过抑制 NF-κB 表达, 从而发挥诱导卵巢癌细胞凋亡的作用。Western blotting 检测表明, 冬凌草甲素能有效下调 NF-κB 在 HO-8910PM/PIX 细胞中的表达。在体内实验中观察到冬凌草甲素能有效抑制 NF-κB 在皮下移植瘤组织中的表达, 与体外实验结果相似。以上实验结果提示, 抑制 NF-κB 表达在冬凌草甲素发挥抗卵巢癌作用和逆转细胞耐药中起重要作用。

本实验表明冬凌草甲素体内外对耐紫杉醇型人卵巢癌有明确的抗癌效应, 其机制可能主要是下调 NF-κB 在卵巢癌中的表达, 这为冬凌草甲素应用于

临床卵巢癌治疗提供了实验依据,使其有望成为新型抗卵巢癌药物用于临床。冬凌草甲素联合紫杉醇对卵巢癌的影响尚需进一步研究。

参考文献

- [1] Yu W, Jin C, Lou X, *et al.* Global analysis of DNA methylation by methyl-capture sequencing reveals epigenetic control of Cisplatin resistance in ovarian cancer cell [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(12): e29450.
- [2] 肖大江, 朱国臣, 王晓岚. 冬凌草甲素对人鼻咽癌细胞株 CNE-2 细胞增殖的抑制作用 [J]. 中华耳鼻喉头颈外科杂志, 2007, 42(10): 780-782.
- [3] Zhang J F, Liu J J, Liu P Q, *et al.* Oridonin inhibits cell growth by induction of apoptosis on human hepatocellular carcinoma BEL-7402 cells [J]. *Hepatol Res*, 2006, 35(2): 104-110.
- [4] Leung C H, Grill S P, Lam W, *et al.* Novel mechanism of inhibition of nuclear factor-kappa B DNA-binding activity by diterpenoids isolated from *Isodon rubescens* [J]. *Mol Pharmacol*, 2005, 68(2): 286-297.
- [5] 季宇彬, 洪 宝, 高世勇. 冬凌草甲素抑制人胃癌 SGC-7901 细胞生长的 G₂/M 期阻滞机制研究 [J]. 中草药, 2010, 41(12): 2024-2026.
- [6] 郭 萍, 李玉山, 郭远强. 冬凌草化学成分和药理活性研究进展 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(2): 144-147.
- [7] 郭和清, 鲁功成, 熊旭林, 等. 人膀胱癌耐药细胞亚株 BIU-87/ADM 抗药性逆转的研究 [J]. 中华实验外科杂志, 1997, 14(5): 306-307.
- [8] 顾美皎. 临床妇产科学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999.
- [9] 李从铸, 翟玉霞, 黄 萍, 等. 紫杉醇与环磷酰胺分别联合铂类药物治疗卵巢癌的对比研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(4): 438-440.
- [10] Chen S, Cooper M, Jones M, *et al.* Combined activity of oridonin and wogonin in advanced-stage ovarian cancer cells: sensitivity of ovarian cancer cells to phyto-active chemicals [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2011, 27(2): 133-147.
- [11] Aggarwal B B. Nuclear factor-kappa B: the enemy within [J]. *Cancer Cell*, 2004, 6(3): 203-208.
- [12] Das K C, White C W. Activation of NF-kB by anti-neoplastic agents. Role of protein kinase C [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(23): 14914-14920.
- [13] Banerjee S, Kaseb A O, Wang Z. Antitumor activity of gemcitabine and oxaliplatin is augmented by thymoquinone in pancreatic cancer [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(13): 5575-5583.
- [14] Kunnumakkara A B, Guha S, Krishnan S, *et al.* Curcumin potentiates antitumor activity of gemcitabine in an orthotopic model of pancreatic cancer through suppression of proliferation, angiogenesis, and inhibition of nuclear factor-kappa B-regulated gene products [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(8): 3853-3861.
- [15] Jost P J, Grabow S, Gray D, *et al.* XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis [J]. *Nature*, 2009, 460(7258): 1035-1039.
- [16] Devereaux Q L, Takahashi R, Salvesen G S, *et al.* X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases [J]. *Nature*, 1997, 388(6639): 300-304.
- [17] Yang L Q, Fang D C, Wang R Q, *et al.* Effect of NF-kappa B, survivin, Bcl-2 and Caspase 3 on apoptosis of gastric cancer cells induced by tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(1): 22-25.
- [18] Arlt A, Gehrz A, Muerköster S, *et al.* Role of NF-kappaB and Akt/PI3K in the resistance of pancreatic carcinoma cell lines against gemcitabine-induced cell death [J]. *Oncogene*, 2003, 22(21): 3243-3251.