

# 茛菪酰胺对人肺癌 A549/DDP 细胞耐药性的逆转作用

钱钧强<sup>1\*</sup>, 孙蓓<sup>1</sup>, 房志仲<sup>2#</sup>(1.天津医科大学肿瘤医院药学部/天津市肿瘤防治重点实验室/国家乳腺癌防治重点实验室, 天津 300060; 2.天津医科大学药学院, 天津 300070)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)47-4433-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.47.06

**摘要** 目的:研究茛菪酰胺对人肺癌 A549/顺铂(DDP)细胞耐药性的逆转作用。方法:A549/DDP 细胞经 0、20、30  $\mu\text{mol/L}$  茛菪酰胺作用 48 h 后,用 MTS 法检测肿瘤细胞抑制率;流式细胞术检测肿瘤细胞凋亡、细胞周期、P-糖蛋白(P-gp)表达和肿瘤细胞内罗丹明 Rh123 含量的变化;Western blotting 法检测多药耐药基因(MDR1)、多药耐药相关蛋白(MRP1)、DNA 拓扑异构酶(Top) II、谷胱甘肽 S-转移酶(GST)- $\pi$ 、凋亡抑制蛋白 Survivin、周期蛋白依赖性蛋白激酶(CDK)1 和蛋白激酶(PK) $\zeta$  蛋白表达;实时荧光聚合酶链反应(RT-PCR)法检测 MDR1、MRP1、Top-II、GST- $\pi$ 、Survivin 和 CDK1 mRNA 表达;酶标仪检测含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase)-3、8 活性。结果:A549/DDP 细胞经 0、20、30  $\mu\text{mol/L}$  茛菪酰胺作用 48 h 后,DDP 对肿瘤细胞增殖的抑制率明显升高;与 0  $\mu\text{mol/L}$  比较,20、30  $\mu\text{mol/L}$  茛菪酰胺作用 48 h 后,DDP 导致的细胞凋亡率和 G<sub>2</sub> 期/M 期明显升高,P-gp 表达明显减弱,Rh-123 浓度明显增加,MDR1、MRP1、Top-II、GST- $\pi$ 、Survivin、CDK1 和 PKC $\zeta$  蛋白表达明显减弱,MDR1、MRP1、Top-II、GST- $\pi$ 、Survivin、CDK1 mRNA 表达明显减弱,Caspase-3、8 的活性明显增强。结论:茛菪酰胺可逆转人肺癌 A549/DDP 细胞 DDP 耐药性,可能与其调节多药耐药相关基因表达有关。

**关键词** 茛菪酰胺;肺癌;耐药;顺铂;细胞;基因;逆转

## Reversal Effects of Piperlongumine on Drug Resistance of Human Lung Cancer A549/DDP Cell to Cisplatin

QIAN Jun-qiang<sup>1</sup>, SUN Bei<sup>1</sup>, FANG Zhi-zhong<sup>2</sup>(1.Dept. of Pharmacy, Tumor Hospital of Tianjin Medical University/Tianjin Key Lab of Tumor Prevention and Treatment, State Key Lab of Breast Cancer Prevention and Treatment, Tianjin 300060, China; 2.College of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE:** To study the reversal effects of piperlongumine (PL) on drug resistance of human lung cancer A549/DDP cell to cisplatin. **METHODS:** After treated with different concentrations of PL for 48 h, the inhibition rate of A549/DDP cell was determined by MTS assay. Cell apoptosis, cell cycle, P-gp expression and the content of Rh-123 were determined by flow cytometry. The protein expressions of MDR1, MRP1, Top-II, GST- $\pi$ , Survivin, CDK1 and PKC $\zeta$  were detected by Western blotting assay. The mRNA expressions of MDR1, MRP1, Top-II, GST- $\pi$ , Survivin and CDK1 were detected by RT-PCR. The activities of Caspase-3 and Caspase-8 containing aminothioproionic acid were detected by ELIASA. **RESULTS:** After treated with PL (0, 20, 30  $\mu\text{mol/L}$ ) for 48 h, inhibition rate of cisplatin to A549/DDP cell was increased significantly. Compared with 0  $\mu\text{mol/L}$  PL, 20, 30  $\mu\text{mol/L}$  PL could improve the rate of cisplatin-induced cell apoptosis and G<sub>2</sub>/M, the content of Rh-123 and the activities of Caspase-3 and Caspase-8 significantly, while decreased the expression of P-gp, the protein expression of MDR1, MRP1, Top-II, GST- $\pi$ , Survivin, CDK1 and PKC $\zeta$ , mRNA expression of MDR1, MRP1, Top-II, GST- $\pi$ , Survivin and CDK1. **CONCLUSIONS:** PL can reverse drug resistance of human lung cancer A549/DDP cell to cisplatin, which may be associated with the regulation of drug resistance-related gene expression.

**KEYWORDS** Piperlongumine; Lung cancer; Drug resistance; DDP; Cell; Gene; Reversal

肺癌已经成为全世界最常见的恶性肿瘤,在恶性肿瘤相关死亡原因中占第一位<sup>[1]</sup>。目前,肺癌的治疗以综合治疗为主,化学治疗在肺癌治疗中占有重要地位。顺铂(DDP)是一种常见的化疗药物,可使 DNA 发生交联,从而抑制癌细胞的 DNA 复制和转录,使肿瘤细胞停止生长、发生凋亡。DDP 作为肺癌的一线治疗药物,长期应用可引起肿瘤细胞对其产生耐药性,因此寻找肺癌细胞 DDP 逆转剂非常必要<sup>[2]</sup>。

茛菪酰胺属于生物碱酰胺类化合物,来源于胡椒科植物

\* 副主任药师。研究方向:临床药理学。E-mail: mjntlyqjq@163.com

# 通信作者:教授,硕士研究生导师。研究方向:中药药理学。电话:022-23340123

茛菪的根,也存在于长柄胡椒和瘤突胡椒等的根中<sup>[3-4]</sup>。研究发现,茛菪酰胺可显著抑制乳腺癌<sup>[5]</sup>、前列腺癌<sup>[6]</sup>、白血病细胞<sup>[7]</sup>等多种实体瘤和血液系统肿瘤的生长,诱导肿瘤细胞凋亡,并能影响肿瘤细胞的细胞周期进程,但茛菪酰胺逆转 DDP 耐受肺癌细胞的作用尚未得到充分研究。为此,笔者研究了茛菪酰胺在逆转人肺癌细胞对 DDP 耐药方面的作用。

## 1 材料

### 1.1 仪器

CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Forma Scientific 公司);超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);酶联免疫检测仪(美国 Molecular Devices 公司);流式细胞仪(美国 BD 公司);7500 型荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(美国 ABI 公司)。

## 1.2 药品与试剂

苾芩酰胺、抗 $\beta$ -actin一抗(美国Sigma公司);DDP(山东齐鲁制药有限公司,批号:20130304,规格:10 mg/瓶);RMPI 1640培养基、胎牛血清(美国Invitrogen公司);MTS试剂(美国Promega公司);细胞周期和凋亡检测试剂盒、一抗谷胱甘肽S-转移酶(GST)- $\pi$ (美国BD公司);实时荧光定量PCR试剂盒和反转录试剂盒(上海Takara公司);一抗多药耐药基因(MDR)1、多药耐药相关蛋白(MRP)1、凋亡抑制蛋白(Survivin)、周期蛋白依赖性蛋白激酶(CDK)1、蛋白解酶(PK)C $\zeta$ 和抗鼠、抗兔二抗(美国Santa Cruz公司);一抗拓普异构酶(Top) II(美国Antibodies公司);增强型化学发光(ECL)试剂盒(美国Millipore公司);含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase)3、8试剂盒、结晶紫溶液、青霉素溶液、链霉素溶液(杭州碧云天生物技术研究所);其余试剂均为分析纯。

## 1.3 癌细胞

人肺癌细胞系A549和A549/DDP购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

将人肺腺癌细胞A549和A549/DDP置于RMPI 1640培养基中,在含100 u/ml青霉素、100 mg/L链霉素和10%胎牛血清的培养液下,于37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>下培养。待细胞长满后,常规更换培养液,用0.25%胰酶消化,以1:2的比例传代。所有实验均选用处于对数生长期的细胞。

### 2.2 药物处理及分组

DDP用灭菌生理盐水制备成高质量浓度(1 g/L)的贮备液,使用前用培养液稀释至所需质量浓度。苾芩酰胺溶于二甲基亚砜(DMSO),贮备液浓度为20.0 mmol/L。取对数生长期的A549/DDP细胞,用0.25%的胰酶消化,制成 $1 \times 10^5$  ml<sup>-1</sup>的单细胞悬液,按100  $\mu$ l/孔分别接种于96孔板中,置于37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>条件的培养箱中培养过夜,显微镜下观察细胞贴壁后用微量移液器吸弃旧培养基,细胞用不同浓度的苾芩酰胺(0、20、30  $\mu$ mol/L)分别处理48 h,作为实验组;对照组加入0.1%二甲基亚砜(DMSO)。每组设置5个复孔。

### 2.3 MTS法检测苾芩酰胺对A549/DDP细胞耐药性的逆转作用

取对数生长期的A549/DDP细胞,经不同质量浓度的苾芩酰胺(0、20、30  $\mu$ mol/L)处理48 h后,吸弃培养基,按照试剂盒说明书加入MTS试剂,用全自动酶联免疫仪在490 nm波长处测定每孔的吸光度(A),取5个平行孔的平均值。阴性组为加细胞不加药,空白组为不加细胞不加药。细胞抑制率=[1-(实验组A-空白组A)/(阴性组A-空白组A)] $\times$ 100%。以上实验重复3次。

### 2.4 流式细胞仪检测A549/DDP细胞周期和细胞凋亡

取对数生长期的A549/DDP细胞,调整细胞密度接种于6 cm培养皿上,用不同浓度苾芩酰胺(0、20、30  $\mu$ mol/L)处理48 h后,用0.25%的胰酶消化,以离心半径为10.8 cm、2 000 r/min离心5 min,收集细胞,PBS洗2次;以离心半径为10.8 cm、2 000 r/min离心5 min,收集细胞,用500  $\mu$ l 70%乙醇固定,于4  $^{\circ}$ C下过夜。第2天,将乙醇固定的细胞于4  $^{\circ}$ C下,以离心半径为10.8 cm、2 000 r/min离心5 min,弃上层乙醇溶液,收集细胞。冷PBS洗细胞2次,每管加50 g/L的PI溶液500  $\mu$ l重悬细

胞沉淀,室温避光静置30 min染色,用流式细胞仪检测细胞周期分布。

### 2.5 流式细胞仪检测A549/DDP细胞P-糖蛋白(P-gp)表达和罗丹明(Rh)123浓度

取对数生长期的A549/DDP细胞,加入不同浓度苾芩酰胺(0、20、30  $\mu$ mol/L)孵育48 h后,用0.25%的胰酶消化,以离心半径为10.8 cm、2 000 r/min离心5 min,收集细胞,用70%乙醇4  $^{\circ}$ C固定1 h,PBS洗2次,加入适量的P-gp单抗约50  $\mu$ l,于4  $^{\circ}$ C下过夜。以离心半径为10.8 cm、2 000 r/min离心5 min,收集细胞,用PBS洗2次,加入荧光素标记的羊抗鼠免疫球蛋白(Ig)G二抗于4  $^{\circ}$ C下放置1 h后用PBS洗2次,然后用0.5 ml的PBS重悬,用流式细胞仪检测P-gp蛋白表达量。

取对数生长期的A549/DDP细胞,加入不同浓度苾芩酰胺溶液(0、20、30  $\mu$ mol/L)孵育48 h后,加入10  $\mu$ mol/L Rh-123染料,培养1 h后收集细胞,调整细胞密度至 $10^6$  ml<sup>-1</sup>,用流式细胞仪检测细胞中Rh-123的荧光强度(488 nm激发光,560 nm发射光),即Rh-123的浓度。

### 2.6 Western blot法检测A549/DDP细胞蛋白表达

取对数生长期的A549/DDP细胞,加入不同浓度苾芩酰胺溶液(0、20、30  $\mu$ mol/L)48 h后,收集细胞裂解物提取蛋白。BCA法测定细胞裂解物的蛋白含量,取等量蛋白质以12% SDS-PAGE法分离,并转移至PVDF膜上,加单克隆抗体于4  $^{\circ}$ C下过夜孵育,以检测目标蛋白。洗去一抗,以HRP连接的二抗于室温孵育2 h,洗涤后以ECL试剂盒显示免疫印迹条带,以 $\beta$ -actin作内参。

### 2.7 RT-PCR检测A549/DDP细胞中mRNA表达水平

取对数生长期的A549/DDP细胞,加入不同浓度苾芩酰胺溶液(0、20、30  $\mu$ mol/L)孵育48 h后,用TRIzol试剂提取细胞RNA,紫外分光光度仪测定其浓度。取总RNA 2  $\mu$ g,按M-MLV逆转录试剂盒操作说明合成cDNA。以GAPDH作内参,用ABI 7500荧光定量PCR仪上SYBR Green I染料检测各基因的表达情况。反应程序:94  $^{\circ}$ C预变性3 min;95  $^{\circ}$ C变性5 s,退火温度30  $^{\circ}$ C,72  $^{\circ}$ C 95 s,72  $^{\circ}$ C延伸5 min,共35个循环。采用实时定量法分析各样品的基因表达差异。各基因引物序列见表1。

表1 基因引物序列及退火温度

Tab 1 Primer sequence and annealing temperature

| 基因名称       | 引物序列                            | 退火温度/ $^{\circ}$ C |
|------------|---------------------------------|--------------------|
| MDR1       | F:5'-AAAAAGATCAACTCGTACCACTC-3' | 65                 |
|            | R:5'-GCACAAAATACACCAACAA-3'     |                    |
| MRP1       | F:5'-TTACTCATTACAGTCTCTGTGC-3'  | 60                 |
|            | R:5'-CAGGGATTAGGGTCGTGGAT-3'    |                    |
| Top-II     | F:5'-GGCTCGATTGTTATTTCAC-3'     | 55                 |
|            | R:5'-GGTTGTAGAATTAAGAATAGG-3'   |                    |
| GST- $\pi$ | F:5'-TGGGCATCTGAAGCCTTTTG-3'    | 60                 |
|            | R:5'-GATCTGGTCACCCACGATGAA-3'   |                    |
| Survivin   | F:5'-GCATGGGTGCCCCGACGTTG-3'    | 60                 |
|            | R:5'-GCTCCGGCCAGAGGCCTCAA-3'    |                    |
| CDK1       | F:5'-GGATGTGCTTATGACGAGTACC-3'  | 60                 |
|            | R:5'-ATGTAAGTACAGGAGGATAG-3'    |                    |
| GAPDH      | F:5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAT-3'    | 60                 |
|            | R:5'-GGCTGTGTGCATCTTCTCATGG-3'  |                    |

### 2.8 酶标仪检测Caspase-3、8活性的表达

取对数生长期的A549/DDP细胞,加入不同浓度苾芩酰胺

溶液(0、20、30  $\mu\text{mol/L}$ )孵育48 h后,参考Caspase-3、8活性检测试剂盒说明书进行操作,用酶标仪测定 $\text{OD}_{405}$ 的吸光度,以此来表示Caspase-3、8的相对活性。

### 2.9 统计学方法

采用SPSS17.0软件处理分析实验数据。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间单因素比较先用单因素分析其正态分布,后以LSD法进行统计。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 萆萆酰胺对A549/DDP细胞DDP敏感性的影响

A549/DDP细胞经萆萆酰胺作用48 h后,细胞抑制率呈剂量依赖性,20  $\mu\text{mol/L}$ 萆萆酰胺抑制率为4.1%,30  $\mu\text{mol/L}$ 萆萆酰胺抑制率为7.9%,分别为无毒浓度(细胞抑制率 $< 5\%$ )和低毒浓度(细胞抑制率 $< 10\%$ ),故采用上述两种浓度进行实验。A549/DDP细胞经0、20、30  $\mu\text{mol/L}$ 萆萆酰胺处理48 h后,DDP对细胞增殖的抑制率明显上升。萆萆酰胺对A549/DDP细胞DDP敏感性的影响见图1。

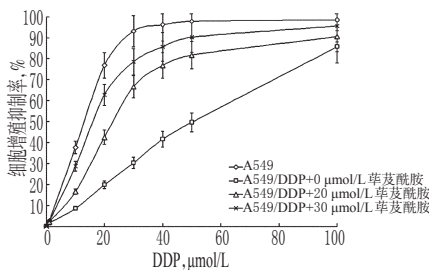


图1 萆萆酰胺对A549/DDP细胞DDP敏感性的影响

Fig 1 Effects of PL on sensitivity of DDP to A549/DDP cell to cisplatin

### 3.2 萆萆酰胺对A549/DDP细胞周期和细胞凋亡的影响

与0  $\mu\text{mol/L}$ (5.6%)比较,20、30  $\mu\text{mol/L}$ 萆萆酰胺处理48 h后, $G_2/M$ 期明显升高(分别为15.4%、24.1%);与0  $\mu\text{mol/L}$ (7.2%)比较,20、30  $\mu\text{mol/L}$ 萆萆酰胺处理48 h后,A549/DDP细胞的凋亡率明显增加(分别为18.6%、27.5%)。萆萆酰胺对A549/DDP细胞周期和细胞凋亡的影响分别见图2、图3。

### 3.3 萆萆酰胺对A549/DDP细胞内P-gp含量和Rh-123浓度的影响

与0  $\mu\text{mol/L}$ 比较,A549/DDP细胞经20、30  $\mu\text{mol/L}$ 萆萆酰胺分别作用48 h后,P-gp的荧光强度明显减弱,分别为67.3%、31.5%;同时,A549/DDP细胞吸收荧光染料Rh-123的能力却明显提高,分别提高到1.6倍和2.2倍。

### 3.4 萆萆酰胺对A549/DDP细胞内耐药基因蛋白表达的影响

与0  $\mu\text{mol/L}$ 比较,20、30  $\mu\text{mol/L}$ 萆萆酰胺可明显减弱MDR1、MRP1、Top- II、GST- $\pi$ 、Survivin、CDK1、PKC $\zeta$ 蛋白的表达,且MDR1 mRNA表达分别降低到61.2%和18.5%,MRP1 mRNA表达分别降低到72.4%和46.8%,Top- II mRNA表达分别降低到52.7%和21.7%,GST- $\pi$  mRNA表达分别降低到68.5%和35.4%,Survivin mRNA表达分别降低到32.6%和15.5%,CDK1 mRNA表达分别降低到43.6%和27.6%。萆萆酰胺对A549/DDP细胞耐药蛋白表达的影响见图4。

### 3.5 萆萆酰胺对A549/DDP细胞Caspase-3、8活性的影响

与0  $\mu\text{mol/L}$ 比较,20、30  $\mu\text{mol/L}$ 萆萆酰胺可明显增强Caspase-3、8的活性,其中Caspase-3活性分别增强到1.8倍和

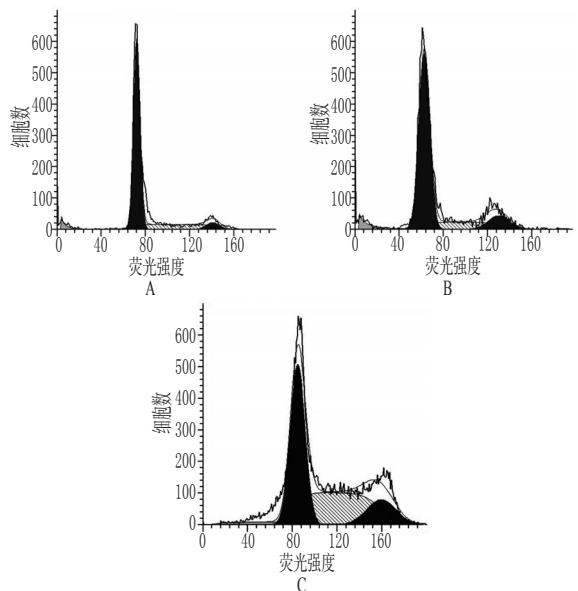


图2 萆萆酰胺对A549/DDP细胞周期的影响

A.0  $\mu\text{mol/L}$ ; B.20  $\mu\text{mol/L}$ ; C.30  $\mu\text{mol/L}$

Fig 2 Effects of PL on cell cycle of A549/DDP cell

A.0  $\mu\text{mol/L}$ ; B.20  $\mu\text{mol/L}$ ; C.30  $\mu\text{mol/L}$

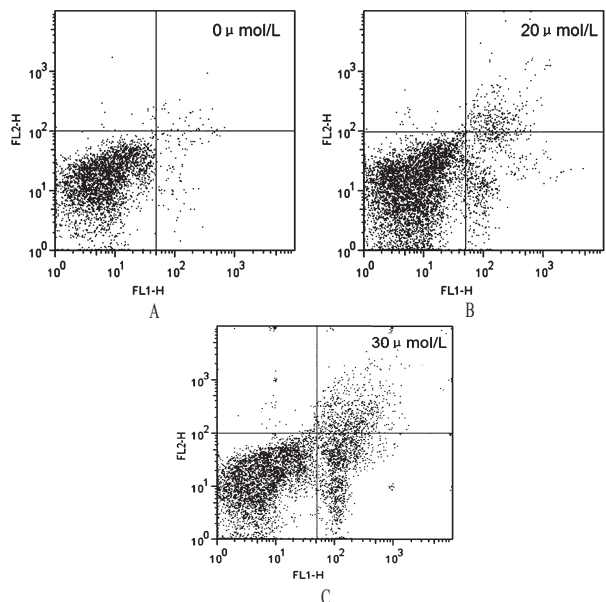


图3 萆萆酰胺对A549/DDP细胞凋亡的影响

A.0  $\mu\text{mol/L}$ ; B.20  $\mu\text{mol/L}$ ; C.30  $\mu\text{mol/L}$

Fig 3 Effects of PL on cell apoptosis of A549/DDP cell

A.0  $\mu\text{mol/L}$ ; B.20  $\mu\text{mol/L}$ ; C.30  $\mu\text{mol/L}$

2.5倍,Caspase-8活性分别增强到1.5倍和2.1倍。

## 4 讨论

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一,其发病率、死亡率近年来均呈明显上升趋势,因此积极寻找高效低毒、作用靶点广、逆转作用显著的肿瘤多药耐药逆转剂成为当前研究的热点。萆萆酰胺是一种来源于植物的生物碱/酰胺类化合物,具有抗肿瘤作用。本研究以萆萆酰胺作为DDP耐药的逆转剂,显示出其能够协同DDP明显抑制A549/DDP细胞增殖,逆转A549/DDP细胞耐药性,提高肺癌细胞对化疗药物的敏感性。

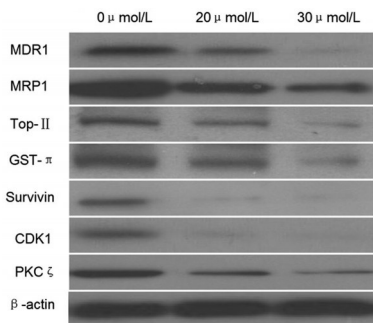


图4 茛菪酰胺对A549/DDP细胞耐药蛋白表达的影响

Fig 4 Effects of PL on protein expression of drug resistance-related gene in A549/DDP cell

肿瘤细胞对化疗药物产生耐受性的机制有很多,如过度表达MDR1、MRP等多药耐药蛋白,增加药物的外排、降低药物在细胞内蓄积和在药靶部位的有效浓度等。MDR1基因和MRP基因都能在细胞膜上过度表达它们的产物,如P-gp等跨膜糖蛋白,加强细胞的药泵作用<sup>[8-12]</sup>。本研究发现,茛菪酰胺可增加A549/DDP细胞对DDP的敏感性,且细胞对荧光染料Rh-123的吸收明显提高。Rh-123是MDR1底物,细胞内Rh-123的浓度增加可间接说明肿瘤细胞对化疗药物的外排作用降低。进一步的Western blotting和RT-PCR检测结果显示,MDR1、MRP和P-gp的蛋白和mRNA表达水平均下降,与Rh-123的研究结果一致。

近来研究发现,P-gp还具有凋亡抑制作用,其通过抑制Caspase-3、8导致MDR细胞产生凋亡抗性<sup>[13-14]</sup>。本研究结果显示,茛菪酰胺可增加A549/DDP细胞中Caspase-3、8的活性,表明茛菪酰胺可增强Caspase依赖性凋亡而发挥作用。

Top-II是一种催化DNA断裂和重新连接DNA链的酶。肿瘤细胞耐药与细胞核内的Top-II活性降低有关<sup>[15]</sup>。有研究报道,GST-π也参与介导肿瘤多药耐药机制,且GST-π在化疗前表达高者对化疗的敏感性差。Survivin是凋亡抑制蛋白家族的成员,具有肿瘤特异性,只表达于肿瘤和胚胎组织中,其可抑制肿瘤细胞的凋亡,在人类多种癌组织中表达上调<sup>[16]</sup>。本研究结果显示,茛菪酰胺可抑制A549/DDP细胞中Top-II、GST-π及Survivin的表达。

综上所述,茛菪酰胺逆转A549/DDP的DDP耐药性可能与增加肿瘤细胞药物蓄积、诱导Caspase依赖性凋亡有关,其耐药机制可能涉及MDR1和MRP等耐药基因的抑制,以及Top-II介导的DNA修复能力增强、GST-π介导的细胞解毒功能加强和Caspase依赖性细胞凋亡机制。

### 参考文献

[1] Li C, Hong W. Research status and funding trends of lung cancer biomarkers[J]. *J Thorac Dis*, 2013, 5(5):698.  
 [2] Geiger S, Schlemmer M, Heinemann V, et al. Adjuvant cisplatin-based chemotherapy for resected NSCLC: one size fits all? [J]. *Anticancer Drugs*, 2010, 21(9):799.  
 [3] 张鹏,黄启来,华子春.茛菪酰胺的药理作用研究进展[J]. *中草药*, 2012, 43(1):201.

[4] Bezerra DP, Pessoa C, de Moraes MO, et al. Overview of the therapeutic potential of piplartine (piperlongumine) [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2012, 48(3):453.  
 [5] Raj L, Ide T, Gurkar AU, et al. Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS [J]. *Nature*, 2011, 475 (7 355):231.  
 [6] Kong EH, Kim YJ, Kim YJ, et al. Piplartine induces caspase-mediated apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2008, 20(4):785.  
 [7] Jyothi D, Vanathi P, Mangala Gowri P, et al. Diferuloylmethane augments the cytotoxic effects of piplartine isolated from Piper chaba [J]. *Toxicol In Vitro*, 2009, 23(6):1 085.  
 [8] 蔡江霞,陈思颖,张蔚鹏,等.中药单体逆转肿瘤多药耐药研究进展[J]. *中国药房*, 2013, 24(35):3 342.  
 [9] Leslie EM, Deeley RG, Cole SP. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005, 204(3):216.  
 [10] Chen YT, Feng B, Chen LB. Update of research on drug resistance in small cell lung cancer chemotherapy [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(8):3 577.  
 [11] Orlandi F, Coronello M, Bellucci C, et al. Structure-activity relationship studies in a series of N, N-bis(cyclohexanol) amine aryl esters as potent reversers of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance (MDR) [J]. *Bioorg Med Chem*, 2013, 21(2):456.  
 [12] Munic VL, Kelneric Z, Mikac L, et al. Differences in assessment of macrolide interaction with human MDR1 (ABCB1, P-gp) using rhodamine-123 efflux, ATPase activity and cellular accumulation assays [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2010, 41(1):86.  
 [13] Ruefli AA, Tainton KM, Darcy PK, et al. Glycoprotein inhibits caspase-8 activation but not formation of the death inducing signal complex (disc) following Fas ligation [J]. *Cell Death Differ*, 2002, 9(11):1 266.  
 [14] Mantovani I, Cappellini A, Tazzari PL, et al. Caspase-dependent cleavage of 170-kDa P-glycoprotein during apoptosis of human T-lymphoblastoid CEM cells [J]. *J Cell Physiol*, 2006, 207(3):836.  
 [15] Mahadevan D, Shirahatti N. Strategies for targeting the multidrug resistance-1 (MDR1)/P-gp transporter in human malignancies [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2005, 5 (6):445  
 [16] Hida T, Ariyoshi Y, Kuwabara M. Glutathion S transferase-π levels in panel of lung cancer cell line and its relation to chemoradio sensitivity [J]. *JPN J Clin Oncol*, 1993, 23(1):14.

(收稿日期:2014-06-05 修回日期:2014-08-21)