



· 论 著 ·

藤黄酸联合肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体诱导人结肠癌HT-29细胞凋亡的效果和机制

叶记林¹, 吴爱莲¹, 王冬艳¹, 彭建明¹, 于有江¹, 刘延庆²1. 扬州市职业大学医学院, 江苏 扬州 225009 ;
2. 扬州大学医药研究所, 江苏 扬州 225001

[摘要] 背景与目的: 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL) 能选择性地杀伤肿瘤细胞, 但多种肿瘤对其耐药。该研究旨在探讨藤黄酸 (gambogic acid, GA) 与TRAIL联合对人结肠癌HT-29细胞裸鼠移植瘤生长的影响及GA联合TRAIL抗结肠癌的作用机制。方法: 建立人结肠癌HT-29细胞裸鼠皮下移植瘤模型, 测定TRAIL和(或)GA对裸鼠移植瘤的影响, 采用H-E染色观察肿瘤组织形态结构改变, TUNEL法检测细胞凋亡状况; HT-29细胞经过siRNA干扰Nrf2表达后, 通过Annexin V-FITC/PI双染检测细胞凋亡情况, 流式细胞术检测细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 含量, RT-PCR法检测Nrf2、Bcl-2、Bax和DR5 mRNA的表达水平。结果: 联合应用GA显著促进了TRAIL对裸鼠皮下移植瘤的生长抑制 (抑瘤率达67.0%) 和诱导凋亡作用, 下调了组织中Nrf2、Bcl-2的表达, 增强了Bax和DR5的表达; 与阴性对照siRNA相比, Nrf2干扰能明显上调TRAIL诱导HT-29细胞的凋亡率, 提高ROS含量, 下调Nrf2和Bcl-2表达, 上调Bax和DR5表达。结论: GA可能是通过下调Nrf2表达, 使ROS水平升高而激活线粒体凋亡途径与死亡受体途径, 从而逆转人结肠癌HT-29细胞体内外对TRAIL的耐药性。

[关键词] 藤黄酸; 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体; HT-29细胞; Nrf2; Bcl-2; Bax; DR5

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2018.04.003

中图分类号: R730.23 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2018)04-0256-07

Effects of gambogic acid combined with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand on apoptosis of human colon cancer HT-29 cells and their mechanisms YE Jilin¹, WU Ailian¹, WANG Dongyan¹, PENG Jianming¹, YU Youjiang¹, LIU Yanqing² (1. Medical Science Department, Yangzhou Polytechnic College, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China; 2. Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Yangzhou University, Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China)

Correspondence to: YE Jilin E-mail: yejilin126@126.com

[Abstract] **Background and purpose:** Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) can selectively kill tumor cells, but many tumors are resistant to it. The aim of our study was to investigate the effects of gambogic acid (GA) combining TRAIL on the growth of subcutaneous tumor xenografts in nude mice established from human colon cancer cell line HT-29, and to explore the mechanisms related to the effects of GA combined with TRAIL on apoptosis of human colon cancer HT-29 cells. **Methods:** A nude mouse model of colon cancer was established by subcutaneous inoculation of human colon cancer cell line HT-29. The effects of TRAIL or/and GA on transplanted tumor in nude mice were measured. The histopathological changes of tumor tissues were observed by H-E staining, and the tumor cell apoptosis was detected by TUNEL assay. Transfection of HT-29 cells with the siRNA caused a significant reduction in Nrf2 protein expression. Then Annexin V-FITC apoptosis kit was used to detect the cell apoptosis, and the

generation of reactive oxygen species (ROS) was assayed using flow cytometry. The mRNA expressions of Nrf2, Bcl-2, Bax and DR5 were determined by RT-PCR. **Results:** TRAIL combined with GA significantly promoted the inhibitory effect of TRAIL on the growth of transplanted tumor in nude mice (the inhibition rate reached 67.0%), increased the apoptosis of HT-29 cells, promoted the decrease in the expression of Nrf2 and Bcl-2, and potentiated the expression of Bax and DR5. Compared with control siRNA, Nrf2 interference markedly increased the apoptosis of HT-29 cells induced by TRAIL, enhanced the ROS level, down-regulated the expression of Nrf2 and Bcl-2, and up-regulated the expression of Bax and DR5. **Conclusion:** GA reverses the TRAIL resistance in HT-29 cells *in vivo* and *in vitro* by up-regulating Nrf2 and promoting ROS-activated mitochondrial apoptosis pathway and death receptor pathway.

[**Key words**] Gambogic acid; Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; HT-29 cells; Nrf2; Bcl-2; Bax; DR5

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL) 能选择性地杀伤肿瘤细胞, 提高荷瘤动物生存率。然而, 包括人结肠癌在内的多种肿瘤对TRAIL耐药^[1]。虽然文献^[2-3]报道多种化疗药物能部分克服TRAIL的耐药问题, 但寻找与低价高效、不良反应小的药物联合进行抗癌非常迫切。藤黄酸 (gambogic acid, GA) 是从中药藤黄中提取的有效成分, 作为一种具有广谱抗肿瘤作用的天然药物备受关注, 对正常组织损伤较小, 尤其是对造血系统和免疫系统的安全性高^[4]。我们的前期研究^[5]表明, GA在体外通过诱导活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 升高能增强TRAIL诱导人结肠癌HT-29细胞凋亡, GA可能是TRAIL良好的耐药逆转剂。而GA能否在体内逆转结肠癌HT-29细胞对TRAIL的耐药现象及其逆转TRAIL耐药的作用机制仍不清楚。

细胞内ROS升高会导致核因子E2相关因子2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 的活化, Nrf2活化后启动抗氧化应激相关基因的表达, 使细胞能抵抗氧化应激, 对细胞产生保护作用, 故Nrf2可以提高肿瘤细胞对化疗药物的耐受性^[6]。因此, Nrf2可能成为天然抗癌药物的潜在靶点^[7]。Sadeghi等^[8]最近报道Nrf2在结肠癌中的高表达是结肠癌耐药的重要机制, 抑制Nrf2表达可能是治疗结肠癌的一条潜在合理的途径。本研究通过GA与TRAIL联合作用干预人结肠癌HT-29细胞皮下移植瘤负荷小鼠, 观察GA能否在体内逆转TRAIL抗结肠癌的耐药现象, 并探讨GA联合TRAIL抗结肠癌的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

4周龄BALB/c裸小鼠由扬州大学比较医学中心提供, 人结肠癌细胞系HT-29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细胞库, 人重组TRAIL蛋白购自美国Millipore公司, GA单体购自美国Biomol公司, McCoy's 5A培养基购自美国Gibco公司, 小牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司, H-E染色试剂盒、DAPI细胞染色液购自南京建成生物工程研究所, 原位末端标记法 (TUNEL) 细胞凋亡检测试剂盒购自瑞士Roche公司, Nrf2、Bcl-2、Bax和DR5抗体购自美国Cell Signaling Technology公司。siNrf2顺义链为5'-GCUUUUGGCGCAGACAUUCTT-3', 反义链为5'-GAAUGUCUGCGCCAA AAGCTG-3', 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。LipofectamineTM2000转染试剂购自美国Invitrogen公司, Annexin V-FITC/PI试剂盒购自德国BM公司, 二氯荧光二乙酰酯检测试剂盒 (DCFH-DA) 购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 研究方法

1.2.1 细胞培养与裸小鼠结肠癌皮下移植瘤模型的建立

HT-29细胞用含10%小牛血清的McCoy's 5A培养液, 在37 °C、CO₂体积分数为5%、饱和湿度条件下培养。取对数生长期HT-29结肠癌细胞, 制成浓度为1.0×10⁷个/mL的单细胞悬液, 无菌条件下接种于32只裸鼠左背部, 每只皮下注射

0.2 mL。接种HT-29细胞15 d后, HT-29结肠癌裸鼠移植瘤直径约为5 mm。

1.2.2 实验动物分组、处理与移植瘤测量

将裸鼠随机分为4组($n=8$): TRAIL组, 单用20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 重组人TRAIL蛋白; GA组, 单用5 mg/kg GA; TRAIL+GA组, 联合使用TRAIL蛋白(20 $\mu\text{g}/\text{kg}$)和GA(5 mg/kg); 对照组, 给予0.9%NaCl溶液0.5 mL。给药方式均采用腹腔注射, 每隔3天给药1次, 共8次。最后1次给药3 d后终止实验。实验终止后取移植瘤, 测量其体积及质量, 体积的计算公式为: 肿瘤体积= $ab^2/2$, 其中 a 、 b 分别表示瘤体的长、宽; 计算其抑瘤率, 抑瘤率=(1-用药组平均瘤质量/对照组平均瘤质量) $\times 100\%$ 。

1.2.3 肿瘤组织H-E染色、TUNEL法测定凋亡情况

肿瘤组织经4%多聚甲醛固定、石蜡包埋和切片处理后, 行脱蜡水化、常规H-E染色、复染、封片, 由显微镜观察荷人结肠癌裸鼠移植瘤组织形态结构改变。石蜡切片经脱蜡水化后, 参照试剂盒说明进行TUNEL染色处理, 完成后加入DAPI工作液室温湿盒避光温育5 min, 去离子水室温洗涤3次, 每次5 min。每张染色切片选取5个视野, 通过倒置荧光显微镜观察细胞凋亡状况。

1.2.4 siRNA转染HT-29细胞

转染前将对数生长期的HT-29细胞接种于6孔板, 每孔细胞总数约 2×10^5 个, 待细胞达到80%融合时, 按照LipofectamineTM2000转染试剂说明书, 分别用siNrf2和阴性对照siRNA同步进行转染, 放入细胞培养箱内进行温育, 24 h后进行后续实验。

1.2.5 Annexin V-FITC/PI实验检测细胞凋亡

将对数生长期细胞接种于6孔板内, 设空白对照组、TRAIL组(40 ng/mL)、GA组(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和40 ng/mL TRAIL+1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GA联合组, 每个处理设3个复孔, 分组处理细胞12 h后收集细胞, 按AnnexinV-FITC/PI试剂盒说明书处理细胞样品, 流式细胞仪检测凋亡率。

1.2.6 RT-PCR法检测Nrf2、Bcl-2、Bax和DR5的mRNA表达水平

取新鲜移植瘤组织或经分组处理(分组处

理方法同Annexin V-FITC/PI实验)后的HT-29细胞, 用TRIzol提取总RNA, 反转录为cDNA, 取适量cDNA为模板, PCR法检测Nrf2、Bcl-2、Bax和DR5的mRNA表达情况。Nrf2基因上游引物为5'-TCTCCATATCCCATTCCC-3', 下游引物为5'-AAGGTGCTGAGTTGTTTT-3'; Bcl-2基因上游引物为5'-AGGCACCCAGGGTGATGCAA-3', 下游引物为5'-GTGGAGGAGCTCTTCAAGGA-3'; Bax上游引物为5'-ATGTCAAACGTGCGAGTGTC-3', 下游引物为5'-TCTGTAGTAGAACTCGGGCAA-3'; DR5上游引物为5'-TCTCCATCCAACATCAC-3', 下游引物为5'-GACATCCCAAACCAAATC-3'; β -actin基因上游引物为5'-GTGGGGCGCCCCAGGCAGGCACCA-3', 下游引物为5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3'。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像仪扫描产物, 并应用凝胶图像系统分析条带, 以 β -actin作为内参照, 计算目的基因/ β -actin的比值, 表示目的基因相对水平。

1.2.7 流式细胞术测定胞内ROS水平

分组处理细胞12 h, 0.25%胰蛋白酶消化, 1 500 r/min离心5 min, 收集细胞, 磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤2次, 加200 μL PBS重悬细胞, 用DCFH-DA(终浓度为5 $\mu\text{mol}/\text{L}$)对细胞质内的ROS进行标记, 流式细胞仪检测荧光(激发光波长为488 nm, 发射光波长为530 nm)。

1.2.8 统计学处理

应用SPSS 17.0统计软件分析, 实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两样本比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组荷人结肠癌裸鼠移植瘤生长情况比较

与对照组比较, GA组和TRAIL+GA组移植瘤的体积和重量明显减小($P < 0.05$), 抑瘤率分别为30.3%和67.0%; TRAIL组瘤体体积和重量较对照组差异均无统计学意义($P > 0.05$); TRAIL+GA组分别与TRAIL组和GA组比较, 移

植瘤的体积和重量均明显减小 ($P < 0.05$), 抑瘤率明显提高 (图1和表1)。

2.2 各组荷人结肠癌裸鼠移植瘤组织形态结构改变与凋亡情况

通过显微镜观察H-E染色病理切片, 与对照组相比, 经GA或TRAIL+GA干预治疗后移植瘤组织细胞呈现皱缩、核染色质边集、片状坏死等病理性改变 (图2)。经TUNEL/DAPI染色, 绿色为凋亡阳性细胞, 表现为核体积固缩及破碎, 正常阴性细胞呈蓝色均匀荧光。与对照组相比, 经GA干预治疗后移植瘤组织凋亡细胞数量增

多, 而TRAIL+GA联合作用后凋亡细胞数量进一步显著增多, 说明在体内GA能增敏TRAIL诱导结肠癌细胞凋亡。



图1 各组小鼠治疗24 d后移植瘤的大体形态

Fig. 1 Gross morphology of tumors excised from each group of mice 24 days after treatment

表1 各组肿瘤生长情况比较

Tab. 1 Comparison of the tumor growth in different groups

Groups	Tumor volume V/mm^3	Tumor weight m/g	Tumor inhibition rate/%
Control	1 238.4 ± 205.3	1.32 5± 0.286	
TRAIL	1 195.3 ± 272.6	1.263 ± 0.302	4.7
GA	861.3 ± 122.6*	0.923 ± 0.145*	30.3
TRAIL+GA	385.3 ± 42.8* [△]	0.437 ± 0.059* [△]	67.0

*: $P < 0.05$, compared with control group; [△]: $P < 0.05$, compared with TRAIL or GA group

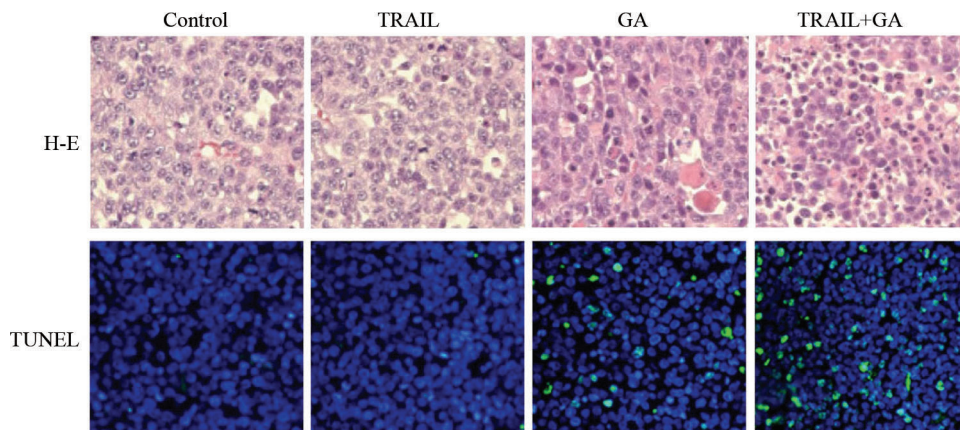


图2 H-E染色观察各组肿瘤组织形态结构、TUNEL法检测各组细胞凋亡状况

(× 100)

Fig. 2 The histopathological changes of tumor tissue in different groups were observed by H-E staining, and apoptosis in different groups was detected by TUNEL test

2.3 各组荷人结肠癌裸鼠移植瘤Nrf2、Bcl-2、Bax和DR5的mRNA的水平比较

RT-PCR检测结果显示, GA组Nrf2、Bcl-2 mRNA的水平下降, 而Bax和DR5的mRNA水平升高, Bcl-2/Bax比值下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与GA组相比, TRAIL+GA联合用

药可促进Nrf2、Bcl-2水平明显下降, Bax和DR5水平明显升高, Bcl-2/Bax比值显著下降 ($P < 0.05$, 图3)。

2.4 Nrf2干扰上调了TRAIL和 (或) GA诱导HT-29细胞的凋亡率

图4中第四象限 (Annexin V +/PI-) 和

第一象限 (AnnexinV+/PI+) 分别代表早期凋亡和晚期凋亡细胞的百分率。将Nrf2干扰系列 (Nrf2 siRNA) 与阴性对照siRNA系列 (Control siRNA) 进行比较, TRAIL组、GA组和TRAIL+GA组HT-29细胞凋亡率均明显提高

($P < 0.05$), 其中TRAIL组凋亡率提高最为显著, 由 (7.4±1.8)% 上升到 (42.9±3.1)%, 表明Nrf2干扰能有效地增敏TRAIL诱导HT-29细胞凋亡的作用。

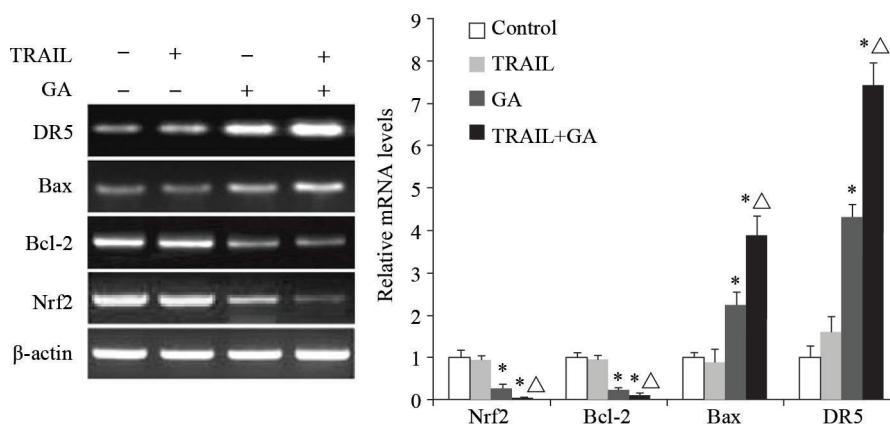


图3 RT-PCR法检测各组移植瘤Nrf2、Bcl-2、Bax和DR5 mRNA表达 ($n=3$)

Fig. 3 Nrf2, Bcl-2, Bax and DR5 mRNA expressions of tumor xenografts in different groups determined by RT-PCR

*: $P < 0.05$, compared with control group; Δ : $P < 0.05$, compared with TRAIL or GA group

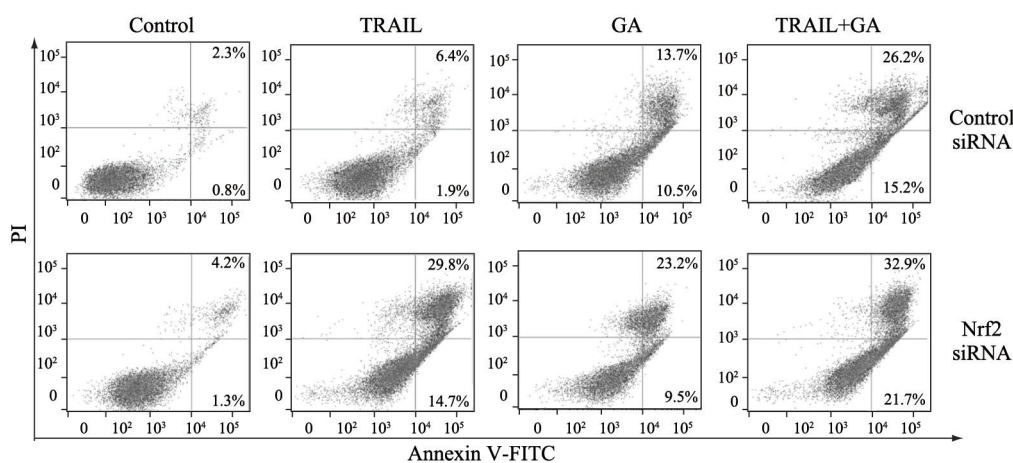


图4 Nrf2干扰上调了TRAIL诱导HT-29细胞的凋亡率 ($n=3$)

Fig. 4 Nrf2 knockdown enhanced TRAIL-induced apoptotic rate in HT-29 cells

2.5 Nrf2干扰对TRAIL和(或)GA处理的HT-29细胞Nrf2、Bcl-2、Bax和DR5 mRNA表达的影响

结果显示, 在Control siRNA系列中, TRAIL组与空白对照组的Nrf2、Bcl-2、Bax和DR5 mRNA表达均无明显差异; 将Nrf2 siRNA系列与Control siRNA系列进行比较, TRAIL组、GA组、TRAIL+GA组HT-29细胞Nrf2和Bcl-2 mRNA表达下降, 而Bax和DR5 mRNA表达升高, 其中TRAIL组

各mRNA表达变化最为显著。表明Nrf2干扰能有效地增强TRAIL诱导HT-29细胞Nrf2和Bcl-2 mRNA表达下降、Bax和DR5 mRNA表达升高(图5)。

2.6 Nrf2干扰引起TRAIL和(或)GA处理的HT-29细胞的ROS的升高

结果显示, 将Nrf2 siRNA系列与Control siRNA系列进行比较, TRAIL组、GA组和TRAIL+GA组细胞内ROS水平均明显升高($P < 0.05$), 其中TRAIL组ROS水平升高最为显

著,表明Nrf2干扰能有效地促进了TRAIL处理的HT-29细胞ROS水平的升高(图6)。

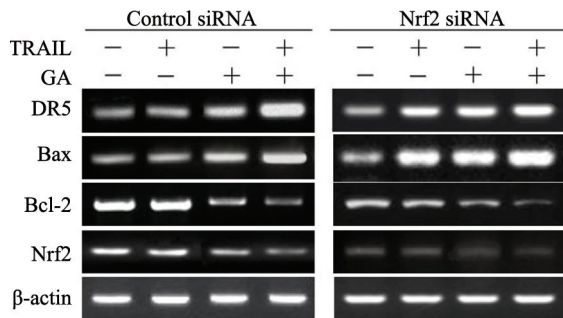


图5 Nrf2干扰对TRAIL和(或)GA诱导HT-29细胞Nrf2、Bcl-2、Bax和DR5 mRNA表达的影响($n=3$)

Fig. 5 Effects of Nrf2 knockdown on Nrf2, Bcl-2, Bax and DR5 mRNA expressions in HT-29 cells treated with TRAIL or/and GA

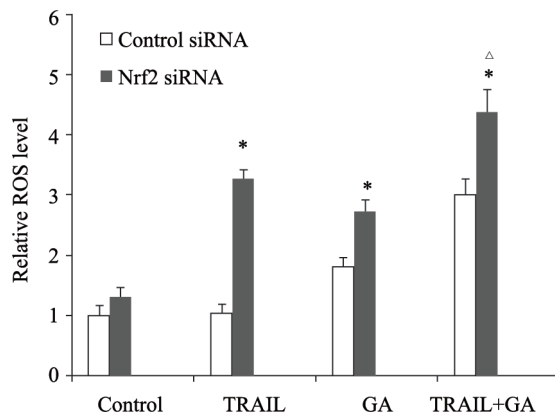


图6 Nrf2干扰引起TRAIL和(或)GA处理的HT-29细胞的ROS的升高($n=3$)

Fig. 6 Nrf2 knockdown enhanced ROS levels in HT-29 cells treated with TRAIL or/and GA

*: $P < 0.05$, compared with control group, Δ : $P < 0.05$, compared with TRAIL or GA group

3 讨 论

多种肿瘤抵抗TRAIL的机制与TRAIL相关凋亡信号通路中任何一个成员的缺陷有关,包括下调TRAIL死亡受体的表达、Bcl-2家族中的促凋亡成员Bax的功能缺失、过表达抗凋亡的Bcl-2家族成员等^[2, 9-10]。天然中草药成分GA是一种多靶点的抗肿瘤药物,主要通过诱导ROS升高、上调促凋亡蛋白、下调抗凋亡蛋白及转铁蛋白受体诱导细胞发生凋亡^[4]。本课题组前期研究^[5]证实,GA能通过诱导ROS升高在体外逆转

人结肠癌HT-29细胞对TRAIL的耐药性。而GA能否在体内逆转结肠癌HT-29细胞对TRAIL的耐药现象却未见报道。本实验通过建立BALB/c小鼠皮下人结肠癌HT-29移植瘤模型,分别应用TRAIL和(或)GA进行干预,证明在小鼠体内单独应用TRAIL治疗时,瘤体体积和重量较对照组均无明显差异,而应用GA与TRAIL联合治疗能明显抑制移植瘤的生长,抑瘤率达67.0%。通过H-E染色、TUNEL/DAPI染色实验,表明在体内GA增强TRAIL诱导结肠癌HT-29细胞凋亡是GA与TRAIL联合抑制移植瘤生长的主要原因。

线粒体凋亡途径与死亡受体途径是TRAIL介导肿瘤细胞凋亡的主要途径^[11-12]。Bcl-2家族促凋亡与抗凋亡成员之间特殊的比值在TRAIL介导细胞凋亡的线粒体途径中起到关键性作用,Bax和Bcl-2分别是Bcl-2家族中最有代表性的促凋亡和抗凋亡成员,Bcl-2/Bax的比值下降将无法维持线粒体膜的完整性,从而导致细胞色素c等凋亡因子释放,通过激活Caspase效应因子最终导致凋亡^[11];非线粒体途径即死亡受体途径,细胞表面死亡受体(death receptor, DR)的表达水平是决定肿瘤细胞对TRAIL敏感性的重要因素,TRAIL与DR(其中DR5对TRAIL的亲合力最强)结合,招募Fas相关死亡结构域蛋白(Fas-associated death domain protein, FADD),并进一步激活Caspase-8,形成死亡诱导信号复合物,最后将活化信号传递并激活Caspase-3,从而诱导细胞凋亡^[12]。RT-PCR检测各组移植瘤Bcl-2、Bax和DR5的mRNA表达,结果显示,GA联合TRAIL用药可促进Bcl-2表达明显下降,Bax和DR5表达明显升高,Bcl-2/Bax比值显著下降($P < 0.05$)。提示线粒体凋亡途径和死亡受体途径可能在GA逆转荷人结肠癌裸鼠移植瘤HT-29细胞对TRAIL的耐药性中起重要作用。

Nrf2是细胞内氧化还原状态的感受器,在清除ROS、参与抗氧化应激中起重要作用,且Nrf2的异常高表达是结肠癌耐药的重要机制^[6-8]。本课题组前期研究^[5]表明,TRAIL干预人结肠癌HT-29细胞后,ROS水平与对照组无明显变化,HT-29细胞对TRAIL耐药,而GA能

通过诱导ROS升高来逆转HT-29细胞对TRAIL的耐药性。鉴于Nrf2在清除ROS以及结肠癌细胞耐药中的重要地位, 我们设想结肠癌HT-29细胞对TRAIL耐药可能与过表达Nrf2有关。RT-PCR检测各组移植瘤Nrf2 mRNA的表达结果显示, GA组和TRAIL+GA组Nrf2 mRNA的表达显著下降, 而GA组和TRAIL+GA组能明显抑制移植瘤的生长, 提示Nrf2 mRNA表达的下降可能在GA增强TRAIL抑制HT-29移植瘤生长和诱导凋亡中起重要作用。

为进一步探讨Nrf2在GA逆转HT-29细胞对TRAIL耐药性中的作用, 我们研究Nrf2干扰是否能增强TRAIL对HT-29细胞的毒性作用。结果显示, Nrf2干扰能有效增强TRAIL诱导HT-29细胞凋亡[凋亡率由(7.4±1.8)%上升到(42.9±3.1)%], 而GA能引起Nrf2 mRNA表达明显下降且逆转HT-29细胞对TRAIL的耐药性, 提示下调Nrf2表达可能在GA逆转HT-29细胞在TRAIL耐药性中起重要作用。Nrf2 mRNA表达下降、ROS升高是诱发肿瘤细胞凋亡的早期信号^[13-15], ROS升高会导致Bcl-2/Bax比值下降而激活线粒体凋亡途径^[13-14], 同时也会引起内质网应激而激活死亡受体途径^[14-15]。本实验结果与之相一致, Nrf2干扰能增强TRAIL诱导HT-29细胞ROS水平的升高、上调Bax和DR5 mRNA表达、下调Nrf2和Bcl-2 mRNA表达。表明下调Nrf2表达是逆转HT-29细胞对TRAIL耐药的早期信号。

综上所述, GA可能是通过下调Nrf2表达, 使细胞清除ROS能力降低, 从而使ROS水平升高而激活线粒体凋亡途径与死亡受体途径来逆转人结肠癌HT-29细胞体内外对TRAIL的耐药性, 提示GA在体内外都是TRAIL良好的耐药逆转剂, 这为今后两者联合应用于临床治疗结肠癌提供了实验依据, 也为今后开发作用于Nrf2靶点的抗癌药物提供了参考。

[参 考 文 献]

- [1] PARK M H, KIM S Y, KIM Y J, et al. ALS2CR7 (CDK15) attenuates TRAIL induced apoptosis by inducing phosphorylation of survivin Thr34 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 450(1): 129-134.
- [2] DIMBERG L Y, ANDERSON C K, CAMIDGE R, et al. On the TRAIL to successful cancer therapy? Predicting and counteracting resistance against TRAIL-based therapeutics [J]. *Oncogene*, 2013, 32 (11): 1341-1350.
- [3] 冯 忻, 王彩霞, 欧志英, 等. 重组人TRAIL蛋白联合顺铂对人卵巢癌细胞生长及凋亡的影响 [J]. *中国癌症杂志*, 2016, 26 (8): 648-654.
- [4] KASHYAP D, MONDAL R, TULI H S, et al. Molecular targets of gambogic acid in cancer: recent trends and advancements [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(10): 12915-12925.
- [5] 叶记林, 于有江, 吴爱莲, 等. 藤黄酸增敏TRAIL诱导人结肠癌HT-29细胞凋亡 [J]. *药学报*, 2015, 50(10): 1252-1257.
- [6] PANDEY P, SINGH A K, SINGH M, et al. The see-saw of Keap1-Nrf2 pathway in cancer [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2017, 116: 89-98.
- [7] CATANZARO E, CALCABRINI C, TURRINI E, et al. Nrf2: a potential therapeutic target for naturally occurring anticancer drugs? [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2017, 21 (8): 781-793.
- [8] SADEGHI M R, JEDDI F, SOOZANGAR N, et al. The role of Nrf2-Keap1 axis in colorectal cancer, progression, and chemoresistance [J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(6): 1-10.
- [9] TRIVEDI R, MAURYA R, MISHRA D P. Medicago, a legume phytoalexin sensitizes myeloid leukemia cells to TRAIL-induced apoptosis through the induction of DR5 and activation of the ROS-JNK-CHOP pathway [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1465.
- [10] QI L, REN K, FANG F, et al. Over expression of Bcl-2 and low expression of Caspase 8 related to TRAIL resistance in brain cancer stem cells [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16(12): 4849-4852.
- [11] QUAST S A, BERGER A, PLÖTZ M, et al. Sensitization of melanoma cells for TRAIL-induced apoptosis by activation of mitochondrial pathways via Bax [J]. *Eur J Cell Biol*, 2014, 93(1-2): 42-48.
- [12] JAMES M A, SEIBEL W L, KUPERT E, et al. A novel, soluble compound, C25, sensitizes to TRAIL-induced apoptosis through upregulation of DR5 expression [J]. *Anticancer Drugs*, 2015, 26(5): 518-530.
- [13] ZHOU J, XI C, WANG W, et al. Triptolide-induced oxidative stress involved with Nrf2 contribute to cardiomyocyte apoptosis through mitochondrial dependent pathways [J]. *Toxicol Lett*, 2014, 230(3): 454-466.
- [14] JO G H, KIM G Y, KIM W J, et al. Sulforaphane induces apoptosis in T24 human urinary bladder cancer cells through a reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway: the involvement of endoplasmic reticulum stress and the Nrf2 signaling pathway [J]. *Int J Oncol*, 2014, 45(4): 1497-1506.
- [15] YANG Y, LIN X, HUANG H, et al. Sodium fluoride induces apoptosis through reactive oxygen species-mediated endoplasmic reticulum stress pathway in Sertoli cells [J]. *J Environ Sci*, 2015, 30: 81-89.

(收稿日期: 2017-10-15 修回日期: 2017-12-30)