

本文引用:王晶晶,王巍东,王萃楠,等.低氧环境下蟾毒灵联合顺铂抗食管癌 ECA109 细胞研究[J].新乡医学院学报,2016,33(3):190-192,197. DOI:10.7683/xyxyxb.2016.03.008.

【基础研究】

低氧环境下蟾毒灵联合顺铂抗食管癌 ECA109 细胞研究

王晶晶¹, 王巍东², 王萃楠¹, 康小红¹, 寇小格¹

(1. 新乡医学院第一附属医院肿瘤科, 河南 卫辉 453100; 2. 新乡医学院第三附属医院输血科, 河南 新乡 453003)

摘要: **目的** 观察低氧环境下蟾毒灵联合顺铂对人食管癌 ECA109 细胞生长的影响,探讨蟾毒灵增加顺铂抗食管癌 ECA109 细胞抗肿瘤作用的可能机制。**方法** 四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 法测定顺铂 (2.5、5.0、7.5、10.0 mg · L⁻¹) 在低氧及常氧环境下对人食管癌 ECA109 细胞增殖的影响,低氧环境下顺铂 (2.5、5.0、7.5、10.0 mg · L⁻¹) 与蟾毒灵 (10 nmol · L⁻¹) 联合对人食管癌 ECA109 细胞增殖的影响;Western blot 法检测顺铂单药及蟾毒灵联合顺铂作用于人食管癌 ECA109 后凋亡相关蛋白表达的变化情况。**结果** 常氧环境下,不同浓度的顺铂对人食管癌 ECA109 细胞生长抑制率均显著高于空白对照组 ($P < 0.05$),且呈浓度依赖性 ($P < 0.05$);低氧环境下,不同浓度的顺铂对人食管癌 ECA109 细胞生长抑制率均高于空白对照组 ($P < 0.05$),也呈浓度依赖性 ($P < 0.05$),但同一浓度顺铂对人食管癌 ECA109 细胞生长的抑制作用在低氧环境较常氧环境下显著减弱 ($P < 0.05$);低氧环境下,不同浓度的顺铂 + 蟾毒灵对人食管癌 ECA109 细胞生长抑制率均高于空白对照组 ($P < 0.05$),呈浓度依赖性 ($P < 0.05$),且同一浓度顺铂 + 蟾毒灵 10 nmol · L⁻¹ 对人食管癌 ECA109 细胞生长的抑制作用较不加蟾毒灵和常氧环境下显著增强 ($P < 0.05$)。低氧条件下,顺铂单药组随着顺铂药物浓度的增加,Bcl-2 蛋白表达轻度下调,Bax 表达轻度升高;联合蟾毒灵后,Bcl-2 表达随着顺铂药物浓度的增加明显下调,Bax 表达明显升高。**结论** 低氧环境使人食管癌 ECA109 细胞对顺铂产生耐药,而蟾毒灵可逆转 ECA109 细胞对顺铂的耐药。

关键词: 低氧;蟾毒灵;食管癌细胞;增殖

中图分类号: R735.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2016)03-0190-04

Effect of bufalin combined with cisplatin on the growth of esophageal cancer cell ECA109 under hypoxic environment

WANG Jing-jing¹, WANG Wei-dong², WANG Luo-nan¹, KANG Xiao-hong¹, KOU Xiao-ge¹

(1. Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui 453100, Henan Province, China; 2. Department of Blood Transfusion Branch, the Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of bufalin combined with cisplatin on the growth of human esophageal cancer cell ECA109 and explore the potential anti-tumor mechanisms of bufalin combined with cisplatin in the hypoxic environment. **Methods** The effect of cisplatin (2.5, 5.0, 7.5, 10.0 mg · L⁻¹) on cell proliferation of human esophageal cancer ECA109 cell under hypoxic and normoxia environment was evaluated by methylthiazolyl tetrazolium (MTT) assay; the effect of bufalin (10 nmol · L⁻¹) combined with cisplatin (2.5, 5.0, 7.5, 10.0 mg · L⁻¹) on cell proliferation of human esophageal cancer ECA109 cell under hypoxic environment was evaluated by MTT. Expressions of apoptosis related proteins in ECA109 cells after given cisplatin only or bufalin combined with cisplatin were detected by Western blot. **Results** Under normoxic and hypoxic environment, the ECA109 cell growth inhibition rate in different concentrations of cisplatin group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$); and the inhibition rate increased with the increasing concentration of cisplatin ($P < 0.05$). Under the same concentration cisplatin, the ECA109 cell growth inhibition rate in hypoxic environment was lower than that in normoxic environment ($P < 0.05$). Under hypoxic environment, the ECA109 cell growth inhibition rate in different concentration of cisplatin plus bufalin group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$); and the inhibition rate increased with the increasing concentration of cisplatin ($P < 0.05$). The ECA109 cell growth inhibition rate in cisplatin plus bufalin group was higher than that in cisplatin group under the same concentration cisplatin ($P < 0.05$). Under hy-

DOI: 10.7683/xyxyxb.2016.03.008

收稿日期: 2015-10-27

作者简介: 王晶晶 (1984-), 女, 河南鹤壁人, 硕士研究生在读, 研究方向: 恶性肿瘤综合治疗。

通信作者: 康小红 (1979-), 女, 河南新乡人, 博士, 副主任医师, 研究方向: 肺癌综合治疗; E-mail: kxhgd@163.com。寇小格 (1969-), 女, 河南新乡人, 硕士, 主任医师, 教授, 研究方向: 食管癌综合治疗; E-mail: kouxiaogezlk@yahoo.com。

poxic environment,the expression of Bcl-2 decreased and the expression of Bax increased with the increasing concentration of cisplatin. After cisplatin combined with bufalin,the expression of Bcl-2 was significantly decreased,and the expression of Bax was significantly increased with increasing concentrations of cisplatin. **Conclusion** Under hypoxic environment,the ECA109 cells are resistant to cisplatin,but bufalin can inverse the resistance.

Key words: hypoxia;bufalin;esophageal cancer cell;proliferation

食管癌是我国发病率较高的一种恶性肿瘤,主要以手术治疗、放射治疗和化学治疗等多种综合治疗手段为主^[1-2]。食管癌患者早期症状不明显,发现时多为晚期,含顺铂的化学治疗方案是目前主要的一线化学治疗方案,但耐药及毒性作用是导致局部复发、治疗失败的主要原因^[3]。近年来研究发现,肿瘤乏氧微环境可能是诱导细胞化学治疗耐药的始动因素之一^[4]。因此,低氧环境下如何增加食管癌患者对化学治疗药物的敏感性一直是研究的热点,寻求能有效提高顺铂疗效的药物,是一种非常有前途的方案。蟾毒灵是一种具有显著抗肿瘤作用的中药^[5],目前尚未见低氧环境下逆转顺铂耐药方面的研究。本研究旨在观察低氧微环境下蟾毒灵与顺铂联合应用对食管癌细胞增殖及凋亡的影响,探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料 人食管癌细胞株 ECA109 由河南新乡医学院第一附属医院神经病学研究所试验中心提供。

1.2 主要试剂和仪器 蟾毒灵购于上海同田生物技术有限公司;质量分数 25% 胰蛋白酶、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid,BCA)蛋白含量测定试剂盒、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide,DMSO)、四甲基偶氮唑蓝(methylthiazolyl tetrazolium,MTT)、氯化钴(CoCl_2)购于北京索莱宝生物科技有限公司;顺铂(国药准字:H53021679)购于云南个旧生物药业有限公司;RPMI-1640(roswell park memorial institute-1640)培养基、胎牛血清(fetal calf serum,FBS)购于美国 Hyclony 公司;蛋白质印迹法用抗体 Bcl-2、Bax、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)购于北京索莱宝生物科技有限公司。层流超净台 SW-CJ-2D 购于苏州净化公司;Forma371 二氧化碳培养箱、Multiskan Spectrum 酶标仪、CL31R 多功能台式高速冷冻离心机、Scientific EC300XL 蛋白质电泳及电转移装置购于美国 Thermo 公司;底物发光试剂盒(chemiluminescence,ECL)购于上海七海复泰生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 试剂配制 顺铂质量浓度为 $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,避光常温保存备用。蟾毒灵用无水乙醇配成 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的储存液,1 mL 离心管分装, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。MTT 用生理盐水配成 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的储存液,1 mL 离心管分装, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存。以上 3 种药物用时以含体积分数 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基稀释成工作液。

1.3.2 人食管癌 ECA109 细胞分组及处理 将人食管癌 ECA109 细胞分为 5 组:空白对照组、顺铂 $2.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、顺铂 $5.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、顺铂 $7.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组和顺铂 $10.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组,每组人食管癌 ECA109 细胞分别在常氧环境下、低氧环境下和低氧环境下 + 蟾毒灵进行培养。常氧环境:人食管癌 ECA109 细胞在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,体积分数 5% CO_2 培养箱内培养;低氧环境:人食管癌 ECA109 细胞在含有 $\text{CoCl}_2\text{ }200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 条件下培养;低氧环境下 + 蟾毒灵:人食管癌 ECA109 细胞在含有 $\text{CoCl}_2\text{ }200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 条件下加 $10\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蟾毒灵^[6]。

1.3.3 MTT 染色法测定肿瘤细胞增殖 取对数生长长期的人食管癌 ECA109 细胞,经胰蛋白酶充分消化后配成 $6\times 10^6\text{ L}^{-1}$ 的细胞悬液,接种于 96 孔板,每孔 $100\text{ }\mu\text{L}$,置于培养箱培养。24 h 后分别给予不同实验组处理,每个浓度设置 5 个复孔。加药处理 24 h 后,每孔加 $10\text{ }\mu\text{L}$ MTT($5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),在细胞培养箱中继续培养。4 h 后弃去上清液,每孔加入 $150\text{ }\mu\text{L}$ DMSO,振荡后置酶标仪上于 470 nm 处测定每孔的吸光度值。细胞生长抑制率 = (对照组细胞吸光度均值 - 给药组吸光度均值)/对照组细胞吸光度均值 $\times 100\%$ 。

1.3.4 Western blot 法检测 Bcl-2 及 Bax 凋亡相关蛋白表达水平 用 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS)洗涤人食管癌 ECA109 细胞 2 次,冰上加入含蛋白酶抑制剂的裂解液(radio-immunoprecipitation assay,RIPA),裂解 20 min 后, $12\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,收集上清液,测定蛋白浓度,蛋白上清液经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE),电泳分离后,恒压转移至硝酸

纤维素膜,用含体积分数 20% 脱脂奶粉洗液 (Tris buffered saline Tween,TBST) 封闭 2 h,一抗于 4 ℃ 孵育过夜,TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,辣根过氧化物酶标记的二抗于室温孵育 1 h,TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,膜与 ECL 化学发光底物孵育 5 min,以 GAPDH 为内参照,在暗室中 X 线片显影,图像扫描。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 16.0 统计软件进行分析,计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多样本均数的比较采用单因素方差分析,实验组均数间两两比较进行 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同条件对人食管癌 ECA109 细胞生长抑制率比较 结果见表 1。常氧环境下,不同浓度的顺铂对人食管癌 ECA109 细胞生长抑制率均显著高于空白对照组,差异有统计学意义 (*P* < 0.05),且呈浓度依赖性 (*P* < 0.05);低氧环境下,不同浓度的顺铂对人食管癌 ECA109 细胞生长抑制率均高于空白对照组 (*P* < 0.05),也呈浓度依赖性 (*P* < 0.05),但同一浓度顺铂对人食管癌 ECA109 细胞生长的抑制作用在低氧环境较常氧环境下显著减弱,差异均有统计学意义 (*P* < 0.05);低氧环境下,不同浓度的顺铂 + 蟾毒灵对人食管癌 ECA109 细胞生长抑制率均高于空白对照组 (*P* < 0.05),呈浓度依赖性 (*P* < 0.05),且同一浓度顺铂 + 蟾毒灵对人食管癌 ECA109 细胞生长的抑制作用较不加蟾毒灵和常氧环境下显著增强,差异均有统计学意义 (*P* < 0.05)。

表 1 不同条件对 ECA109 细胞生长抑制率比较

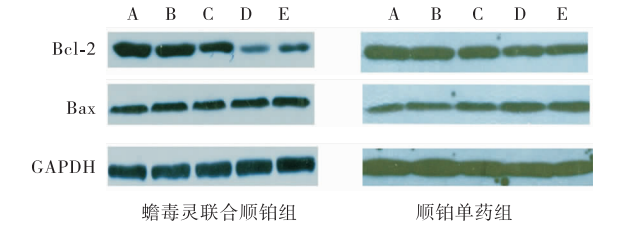
Tab.1 Comparison of inhibition rate of ECA109 cells in different environment ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	细胞抑制率/%		
		常氧 24 h	低氧 24 h	低氧 24 h + 蟾毒灵
空白对照组	5	0.000 ± 1.031	0.000 ± 1.631	0.000 ± 0.963
顺铂 2.5 mg · L ⁻¹ 组	5	16.531 ± 0.912 ^a	6.717 ± 1.043 ^{ae}	26.380 ± 3.324 ^{aef}
顺铂 5.0 mg · L ⁻¹ 组	5	20.835 ± 1.654 ^{ab}	15.311 ± 2.027 ^{abe}	38.847 ± 1.547 ^{abef}
顺铂 7.5 mg · L ⁻¹ 组	5	26.706 ± 1.267 ^{abc}	23.029 ± 1.451 ^{abce}	51.166 ± 2.216 ^{abcef}
顺铂 10.0 mg · L ⁻¹ 组	5	47.829 ± 0.862 ^{abcd}	38.195 ± 1.623 ^{abcde}	61.279 ± 0.873 ^{abcdef}

注:与空白对照组比较^a*P* < 0.05;与顺铂 2.5 mg · L⁻¹ 组比较^b*P* < 0.05;与顺铂 5.0 mg · L⁻¹ 组比较^c*P* < 0.05;与顺铂 7.5 mg · L⁻¹ 组比较^d*P* < 0.05;与常氧 24 h 比较^e*P* < 0.05;与低氧 24 h 比较^f*P* < 0.05。

2.2 低氧环境下加药 24 h 后各组 Bcl-2 及 Bax 蛋白的表达 结果见图 1。低氧条件下,单药顺铂组随着顺铂药物浓度的增加,Bcl-2 蛋白表达轻度下调,Bax 表达轻度升高;联合蟾毒灵后,Bcl-2 表达随着顺铂药物浓度的增加显著下调,Bax 表达显著

升高。



A:空白对照组;B:顺铂 2.5 mg · L⁻¹ 组;C:顺铂 5.0 mg · L⁻¹ 组;D:顺铂 7.5 mg · L⁻¹ 组;E:顺铂 10.0 mg · L⁻¹ 组。

图 1 各组人食管癌 ECA109 细胞凋亡相关蛋白表达

Fig.1 Expression of apoptosis related protein in ECA109 cells in each group

3 讨论

大多数食管癌患者明确诊断时已进展为晚期肿瘤,目前临床上化学治疗是治疗食管癌的主要手段之一。然而,抗肿瘤药的耐药性是临床工作中遇见的棘手问题。研究发现,缺氧微环境是实体肿瘤的重要特征,低氧的产生可诱导肿瘤细胞克隆选择,使肿瘤细胞凋亡机制缺陷,对化学治疗药物耐药,最终导致化学治疗方案的失败^[7]。如何逆转食管癌的化疗耐药,提高患者的生存率,是目前临床上需要迫切解决的难题。顺铂是食管癌化学治疗的主要药物,属于周期非特异性抗肿瘤药物,其主要药理作用是诱导细胞凋亡^[8]。研究表明,低氧环境可使食管癌对顺铂的敏感性降低^[9]。本研究显示,缺氧条件下,人食管癌 ECA109 细胞对顺铂所诱导的增殖抑制和凋亡增加具有抵抗作用,表明缺氧微环境参与了人食管癌 ECA109 细胞对顺铂的化疗耐药。

蟾毒灵是华蟾素注射液的有效成分之一。研究表明,蟾毒灵可抑制肿瘤细胞生长,促进肿瘤细胞分化,诱导肿瘤细胞凋亡^[10]。蟾毒灵可通过阻断磷脂酰肌醇-3-激酶/丝苏氨酸蛋白激酶信号通路抑制肿瘤细胞增殖,通过线粒体或死亡受体介导的途径诱导肿瘤细胞凋亡^[11],可以逆转肝癌细胞对氟尿嘧啶的耐药性^[12],那么蟾毒灵能否逆转低氧诱导的顺铂耐药? 本研究结果显示,在低氧条件下,顺铂与蟾毒灵联合后较单用顺铂抑制细胞增殖作用显著增强,提示在低氧环境下,蟾毒灵具有逆转顺铂耐药的潜能。由于低氧诱导化疗药物耐药的机制与凋亡逃逸有关^[13],因此,作者应用 Western blot 法检测蟾毒灵联合顺铂对凋亡相关蛋白 Bcl-2 及 Bax 影响,

(下转第 197 页)

癌作用^[5]。本研究发现,下调 SKOV-3 细胞 miRNA-214 表达后,细胞增殖能力下降,细胞凋亡率增加,同时 SKOV-3 细胞 p21 和 p53 基因在 mRNA 和蛋白水平表达均增加。说明下调 SKOV-3 细胞 miRNA-214 表达可上调 p21 和 p53 基因表达。

参考文献:

[1] 秦瑞英,华彩虹,朱丽红. 小分子干扰 RNA 下调星形细胞上调基因 1 的表达对卵巢癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. 新乡医学院学报,2014,31(7):524-527.

[2] 王旭,严宏. microRNA 与白内障相关性的研究进展[J]. 眼科新进展,2015,35(4):387-390.

[3] 吕鑫,张育才. 微小 RNA 在脓毒症发病机制的作用研究进展[J]. 中华实用儿科临床杂志,2014,29(18):1416-1418.

[4] YANG H,KONG W,HE L,*et al.* microRNA expression profiling in human ovarian cancer:miRNA-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN[J]. *Cancer Res*,2008,68(2):425-433.

[5] 吕洋,侯慧媛,王雨生. miRNA 在脉络膜新生血管发生发展中的作用研究进展[J]. 眼科新进展,2015,35(3):283-286.

[6] 金鑫,张红. microRNA 在年龄相关性黄斑变性发病中的作用[J]. 眼科新进展,2014,34(8):787-789,793.

[7] 刘云,周晓玉. 微小 RNA 与肺发育及肺相关疾病的研究进展[J]. 中华实用儿科临床杂志,2015,30(22):1748-1750.

[8] 孙婧,沈颖. microRNA 在 IgA 肾病发病机制中的研究进展[J]. 中华实用儿科临床杂志,2014,29(22):1754-1756.

[9] WANG X,CHEN S,LI F,*et al.* miRNA-214 inhibits cell growth in hepatocellular carcinoma through suppression of β -catenin[J].

Biochem Biophy Res Commun,2012,428(4):525-531.

[10] MISIEWICS-KRZEMINSKA I,SARASQUETE M E,QUWAIDER D,*et al.* Restoration of microRNA-214 expression reduces growth of myeloma cells through positive regulation of p53 and inhibition of DNA replication[J]. *Heamatologica*,2013,98(4):640-648.

[11] PENG R Q,WAN H Y,LI H F,*et al.* microRNA-214 suppresses growth and invasiveness of cervical cancer cells by targeting UDR-N-acetyl- α -D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferase[J]. *J Biol Chem*,2012,287(17):14301-14309.

[12] DERFOUL A,JUAN A H,DIFILIPPANTONIO A J,*et al.* Decreased microRNA-214 levels in breast cancer cells coincides with increased cell proliferation,invasion and accumulation of the Polycomb Ezh 2 metiyltransferase[J]. *Carcinogenesis*,2011,32(11):1607-1614.

[13] HUANG S D,YUAN Y,ZHANG C W,*et al.* microRNA-98 and microRNA-214 post-transcriptionally regulate enhancer of zeste homolog 2 and inhibit migration and invasion in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Mol Cancer*,2012,11:51.

[14] ZHANG X J,YE H,ZENG C W,*et al.* Dysregulation of miRNA-15a and miRNA-214 in human pancreatic cancer[J]. *J Hematol Oncol*,2010,3:46.

[15] MONAHAM P,HIMES A D,PARFIENIUK A,*et al.* p21,an important mediator of quiescence during pituitary tumor formation,is dispensable for normal pituitary development during embryogenesis[J]. *Mech Dev*,2012,128(11/12):640-652.

[16] CHEN F,WANG W,EI-DEIRY W S. Current strategies to target p53 in cancer[J]. *Biochem Pharm*,2010,80(5):724-730.

(本文编辑:李胜利 英文编辑:杨 博)

(上接第 192 页)

结果显示顺铂联合蟾毒灵较单用顺铂能明显下调 Bcl-2 蛋白的表达,显著升高 Bax 蛋白的表达。提示低氧环境下,蟾毒灵可通过影响 Bcl-2 及 Bax 凋亡相关蛋白来增强顺铂的抗肿瘤作用。

参考文献:

[1] SIEGEL R,WARD E,BRAWLEY O,*et al.* Cancer statistics,2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths[J]. *CA Cancer J Clin*,2011,61(4):212-236.

[2] SCHMITT C A. Senescence,apoptosis and therapy:cutting the life-lines of cancer[J]. *Nat Rev Cancer*,2003,3(4):286-298.

[3] PENNATHUR A,GIBSON M K,JOBE B A,*et al.* Oesophageal carcinoma[J]. *Lancet*,2013,381(9864):400-412.

[4] 何凌,朱付凡,刘毅智. 缺氧与肿瘤化疗耐药关系研究[J]. 肿瘤药学,2011,1(5):409-414.

[5] 许颖,陈美,金雪峰,等. 蟾毒灵体内外抗肿瘤作用及制剂研究进展[J]. 中国中药杂志,2014,39(15):2829-2833.

[6] 康小红,龚亚斌,王立芳,等. 蟾毒灵联合吉非替尼对肺癌细胞 H1975 的影响及机制研究[J]. 中国中西医结合杂志,2013,33(8):1081-1085.

[7] COSSE J P,MICHIELS C. Tumour hypoxia affects the responsiveness of cancer cells to chemotherapy and promotes cancer progression[J]. *Anticancer Agents Med Chem*,2008,8(7):790-797.

[8] 陈秀慧,曲军英. 不同质量浓度顺铂对宫颈癌 Hela 细胞增殖能力的影响[J]. 中国临床药理学杂志,2014,30(7):601-602.

[9] 杨联河,赵雪艳,牛春玲,等. 低氧对食管癌 ECa9706 细胞生长及顺铂敏感性的影响[J]. 河南师范大学学报(自然科学版),2015,43(5):107-111.

[10] HSIAO Y P,YU C S,YU C C,*et al.* Triggering apoptotic death of human malignant melanoma a375. s2 cells by bufalin:involvement of caspase cascade-dependent and independent mitochondrial signaling pathways[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*,2012,26(10):752-755.

[11] ZHU Z,SUN H,MA G,*et al.* Bufalin induces lung cancer cell apoptosis via the inhibition of PI3K/Akt pathway[J]. *Int J Mol Sci*,2012,13(2):2025-2035.

[12] GU W,LIU L,FANG F F,*et al.* Reversal effect of bufalin on multidrug resistance in human hepatocellular carcinoma BEL-7402/5-FU cells[J]. *Oncol Rep*,2014,31(1):216-222.

[13] WARFEL N A,EI-DEIRY W S. HIF-1 signaling in drug resistance to chemotherapy[J]. *Curr Med Chem*,2014,21(26):3021-3028.

(本文编辑:徐刚珍 英文编辑:孟 月)