

本文引用:熊万成,平贯芳,贺德栋,等.雷公藤甲素对人结直肠癌细胞奥沙利铂耐药性的影响[J].新乡医学院学报,2023,40(7):613-620. DOI:10.7683/xyxyxb.2023.07.003.

【基础研究】

雷公藤甲素对人结直肠癌细胞奥沙利铂耐药性的影响

熊万成¹, 平贯芳², 贺德栋¹, 陈发帅¹, 赫 鹏¹

(1. 新乡医学院第一附属医院普外科, 河南 卫辉 453100; 2. 新乡医学院第一附属医院药学部, 河南 卫辉 453100)

摘要: **目的** 探讨雷公藤甲素(TPL)逆转人结直肠癌细胞对奥沙利铂(Oxa)耐药的作用及机制。**方法** 采用浓度梯度递增法构建结直肠癌耐药细胞系 LoVo/Oxa。将传代培养的 LoVo/Oxa 细胞分为 LoVo/Oxa 组和 LoVo/Oxa + TPL 组,另取 LoVo 细胞作为 LoVo 组;LoVo 组、LoVo/Oxa 组细胞常规培养,LoVo/Oxa + TPL 组细胞加入无毒剂量的 TPL。采用细胞计数试剂盒-8 检测 3 组细胞的耐药性。将传代培养的 LoVo/Oxa 细胞分为 LoVo/Oxa 组和 LoVo/Oxa + TPL 组,LoVo/Oxa 组细胞常规培养,LoVo/Oxa + TPL 组细胞加入无毒剂量的 TPL。采用克隆形成实验检测 2 组细胞的增殖能力,流式细胞术检测 2 组细胞的细胞凋亡率和细胞周期,Transwell 迁移侵袭实验检测 2 组细胞的迁移和侵袭能力,免疫印迹法检测 2 组细胞中周期及耐药相关蛋白[细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)、视网膜母细胞瘤蛋白(Rb)、P 糖蛋白(P-gp)、多药耐药相关蛋白 1(MDR1)]、凋亡相关蛋白[B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、B 淋巴细胞瘤-2 基因相关的 X 蛋白(Bax)、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)、剪切型冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3(Cl-caspase-3)]及迁移侵袭相关蛋白[波形蛋白(Vimentin)、上皮细胞钙黏附蛋白(E-cad)、基质金属蛋白酶(MMP)-2、MMP-9]的表达水平。**结果** Oxa 对 LoVo/Oxa 组细胞的半抑制浓度(IC₅₀)显著高于 LoVo 组细胞($P < 0.01$),Oxa 对 LoVo/Oxa + TPL 组细胞的 IC₅₀ 显著低于 LoVo/Oxa 组细胞($P < 0.01$)。0、24 h 时,LoVo/Oxa 组和 LoVo/Oxa + TPL 组细胞的增殖能力比较差异无统计学意义($P > 0.05$);48、72、96 h 时,LoVo/Oxa + TPL 组细胞的增殖能力显著低于 LoVo/Oxa 组($P < 0.05$)。LoVo/Oxa + TPL 组细胞克隆数显著多于 LoVo/Oxa 组($P < 0.01$)。LoVo/Oxa + TPL 组细胞中 G₁、G₂ 期细胞占比显著低于 LoVo/Oxa 组($P < 0.01$),LoVo/Oxa + TPL 组细胞中 S 期细胞占比显著高于 LoVo/Oxa 组($P < 0.01$)。LoVo/Oxa + TPL 组细胞的凋亡率显著高于 LoVo/Oxa 组($P < 0.01$)。LoVo/Oxa + TPL 组迁移细胞数和侵袭细胞数显著低于 LoVo/Oxa 组($P < 0.01$)。LoVo/Oxa + TPL 组细胞中 Cyclin D1、Rb、MDR1、P-gp、Bcl-2、Vimentin、MMP-2 和 MMP-9 蛋白的相对表达量显著低于 LoVo/Oxa 组,Bax、Cl-caspase-3、E-cad 蛋白的相对表达量显著高于 LoVo/Oxa 组($P < 0.01$);2 组细胞中 caspase-3 蛋白的相对表达量比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** TPL 通过抑制细胞增殖和侵袭,以及促进细胞凋亡来逆转结直肠癌细胞对 Oxa 的耐药性。

关键词: 结直肠癌细胞;雷公藤甲素;LoVo/Oxa 细胞;奥沙利铂;耐药

中图分类号: R7365.7; R730.5 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2023)07-0613-08

Effect of triptolide on resistance of human colorectal cancer cell line to oxaliplatin

XIONG Wancheng¹, PING Guanfang², HE Dedong¹, CHEN Fashuai¹, HE Peng¹

(1. Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui 453100, Henan Province, China; 2. Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui 453100, Henan Province, China)

Abstract: **Objective** To investigate the reversal effect and mechanism of triptolide (TPL) on oxaliplatin (Oxa)-resistance human colorectal cancer cell line. **Methods** The Oxa-resistance human colorectal cancer cell line LoVo/Oxa was induced by continuously increasing the contact concentration. The subcultured LoVo/Oxa cells were divided into LoVo/Oxa group and LoVo/Oxa + TPL group, the LoVo cells were taken as the LoVo group; the cells in the LoVo/Oxa group were cultured routinely, while the cells in the LoVo/Oxa + TPL group were added with non-toxic doses of TPL. The resistance of cells in the three groups was detected by cell counting kit-8. The subcultured LoVo/Oxa cells were divided into LoVo/Oxa group and LoVo/Oxa + TPL group, the cells in the LoVo/Oxa group were cultured routinely, while the cells in the LoVo/Oxa + TPL group were added with non-toxic doses of TPL. The cell proliferation activity in the two groups was detected by colony formation assay; the apoptosis rate and cell cycle in the two groups were detected by flow cytometry; the migration and invasion activity of cells in the two groups

DOI:10.7683/xyxyxb.2023.07.003

收稿日期:2022-10-24

基金项目:河南省医学科技攻关计划联合共建项目(编号:LHGJ20210529)。

作者简介:熊万成(1986-),男,河南驻马店人,硕士,主治医师,研究方向:消化道肿瘤的化学治疗和生物治疗。

通信作者:赫 鹏(1972-),男,河北秦皇岛人,硕士,副主任医师,研究方向:消化道肿瘤的化学治疗和生物治疗;E-mail:hepeng163002@sina.com。

were detected by Transwell migration and invasion assay; the expressions of the cycle and drug resistance related protein [Cyclin D1, retinoblastoma protein (Rb), P-glycoprotein (P-gp), multidrug resistance 1 (MDR1)], apoptosis related protein [B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X (Bax), cysteine-containing aspartate-specific protease-3 (caspase-3), cleaved cysteine-containing aspartate-specific protease-3 (Cl-caspase-3)] and migration-invasion related protein [Vimentin, epithelial-cadherin (E-cad), matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9] in cells in the two groups were detected by Western blot.

Results The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of Oxa on cells in the LoVo/Oxa group was significantly higher than that in the LoVo group ($P < 0.01$); the IC_{50} of Oxa on cells in the LoVo/Oxa + TPL group was significantly lower than that in the LoVo/Oxa group ($P < 0.01$). At 0, 24 h, there was no significant difference in the proliferation ability of cells between the LoVo/Oxa group and the LoVo/Oxa + TPL group ($P > 0.05$); at 48, 72, 96 h, the proliferation ability of cells in the LoVo/Oxa + TPL group was significantly lower than that in the LoVo/Oxa group ($P < 0.05$). The number of cell clones in the LoVo/Oxa + TPL group was significantly higher than that in the LoVo/Oxa group ($P < 0.01$). The percentage of G_1 and G_2 phase cells in the LoVo/Oxa + TPL group was significantly lower than that in the LoVo/Oxa group ($P < 0.01$), and the percentage of S phase cells in LoVo/Oxa + TPL group was significantly higher than that in the LoVo/Oxa group ($P < 0.01$). The apoptosis rate of cells in the LoVo/Oxa + TPL group was significantly higher than that in the LoVo/Oxa group ($P < 0.01$). The numbers of migrating and invading cells in the LoVo/Oxa + TPL group were significantly lower than those in the LoVo/Oxa group ($P < 0.01$). The numbers of migration and invasion cells in the LoVo/Oxa + TPL group were significantly lower than those in the LoVo/Oxa group ($P < 0.01$). The relative expressions of Cyclin D1, Rb, MDR1, P-gp, Bcl-2, Vimentin, MMP-2, MMP-9 protein in cells in the LoVo/Oxa + TPL group were significantly lower than those in the LoVo/Oxa + TPL group ($P < 0.01$); the relative expressions of Bax, Cl caspase-3, E-cad protein in cells in the LoVo/Oxa + TPL group were significantly higher than those in the LoVo/Oxa + TPL group ($P < 0.01$); there was no significant difference in the relative expression of caspase-3 protein in cells between the two groups ($P > 0.05$). **Conclusion** TPL can reverse the resistance of colorectal cancer cells to Oxa by inhibiting cell proliferation, invasion and promoting cell apoptosis.

Key words: colorectal cancer cell; triptolide; LoVo/Oxa cell; oxaliplatin; drug resistance

结直肠癌是全球范围内一种常见的消化道恶性肿瘤。2020 年,全球结直肠癌发病人数占所有癌症人数的 9.3%,成为仅次于肺癌和肝癌的第三大常见癌症^[1]。中国结直肠癌发病、死亡趋势与全球趋势一致,但由于中国人口基数大,导致结直肠癌发病人数、死亡人数占全球结直肠癌发病人数、死亡人数的比例较高(分别为 28.8% 和 30.6%)^[2]。尽管化学治疗和化学治疗联合放射治疗在结直肠癌患者中取得了一定的治疗效果,但患者对化学治疗药物的耐药仍是导致临床预后不良的主要原因^[3]。近年来,针对中医药研究的快速发展为耐药性结直肠癌的治疗提供了新的思路^[4]。雷公藤甲素(triptolide, TPL)是中药雷公藤的主要活性成分,具有抗炎、免疫抑制、心脏保护和抗骨质疏松等多种药理功效。有研究证实,雷公藤在前列腺癌、卵巢癌、肝癌、肺癌以及结直肠癌等多种癌症中发挥抗肿瘤作用,并能够逆转肿瘤细胞对化学治疗的耐药性^[5-25]。但 TPL 对结直肠癌细胞耐药的逆转作用鲜有报道,基于此,本研究通过构建结直肠癌耐药细胞系,探讨 TPL 对结直肠癌细胞耐药性的逆转作用及机制。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂与仪器

人结直肠癌细胞系 LoVo 由联勤保障部队第九八九医院中心实验室惠赠; TPL 购自北京索莱宝科

技有限公司, TRIzol 溶液、cDNA 合成试剂盒购自美国 Invitrogen 公司, 细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8)、细胞周期检测试剂盒以及人膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素 (Annexin V · fluorescein isothiocyanate, Annexin V-FITC)/碘化丙啶(propidium iodide, PI) 荧光双染细胞凋亡检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司, 达尔伯克改良伊格尔培养基 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) 购自美国 Hyclone 公司, 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自浙江天杭生物科技股份有限公司, 奥沙利铂 (oxaliplatin, Oxa) 购自恒瑞医药股份有限公司, 免疫印迹配胶试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司, 一抗、辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的 IgG 二抗购自武汉三鹰生物技术有限公司, 引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成; Transwell 小室购自美国 Corning 公司, 倒置显微镜购自德国 Leica 公司, 恒温培养箱购自上海赛默飞世尔科技有限公司, 全自动酶标仪购自美国 Bio-rad 公司, 流式细胞仪购自美国碧迪生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 浓度梯度递增法构建结直肠癌耐药细胞系 LoVo/Oxa

参考文献[26]中的方法构建结直肠癌耐药细胞系 LoVo/Oxa。取 LoVo 细胞接种于含体积分数

10% FBS 的 DMEM 中,在培养液中持续加入不同浓度的 Oxa。Oxa 的起始浓度为 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,传3代后浓度逐渐提高为 0.2 、 0.5 、 1.0 、 $2.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。取最终在 Oxa 浓度为 $2.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养液中稳定传代生长的细胞为结直肠癌耐药细胞系 LoVo/Oxa。

1.2.2 细胞培养及传代

将结直肠癌细胞系 LoVo 及 LoVo/Oxa 细胞分别接种于含体积分数 10% FBS、 $100 \times 10^3 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 青霉素和 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素的 DMEM 中,于 37°C 、饱和湿度、含体积分数 5% CO_2 培养箱中培养。每 2 ~ 3 d 换液 1 次,待细胞生长至融合度达到 70% ~ 80% 后,用 $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰蛋白酶消化细胞 3 min,再用完全培养基终止消化,收集脱壁细胞至 15 mL 无菌离心管中, $800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min (离心半径 10 cm),弃上清,重悬细胞进行传代。

1.2.3 TPL 对 LoVo、LoVo/Oxa 细胞无毒剂量的确定

将传代培养的 LoVo 及 LoVo/Oxa 细胞分别消化、计数,制成浓度为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 的细胞悬液,接种至 96 孔细胞培养板中,置于培养箱中培养 24 h。将 TPL 用完全培养基稀释至浓度为 12.0、6.0、3.0、1.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,每个浓度点设置 6 个复孔,并设只有培养基没有细胞的调零孔和只培养细胞不加药的空白对照孔。每孔加入 100 μL TPL 继续培养 48 h 后,按照 CCK-8 试剂盒的说明书步骤进行染色,用 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ CCK-8 工作液 37°C 孵育待测细胞 2 h 后用酶标仪测波长 450 nm 处吸光度值,并计算细胞抑制率。细胞抑制率 = (空白对照孔吸光度值 - 加药孔吸光度值) / (空白对照孔吸光度值 - 调零孔吸光度值) $\times 100\%$,实验重复 3 次,取均值。应用 GraphPad Prism 8.0 软件根据抑制率绘制拟合曲线,取 TPL 作用 24 h 后 LoVo、LoVo/Oxa 2 组细胞抑制率 5% 对应的浓度为逆转耐药的无毒剂量^[27]。

1.2.4 CCK-8 法检测细胞的耐药性及 TPL 处理后的细胞增殖能力

将传代培养的 LoVo 及 LoVo/Oxa 细胞分别消化、计数,制成浓度为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 的细胞悬液,接种至 96 孔细胞培养板中,放入 37°C 、含体积分数 5% CO_2 的培养箱中培养,细胞贴壁后分为 LoVo 组、LoVo/Oxa 组和 LoVo/Oxa + TPL 组,LoVo 组、LoVo/Oxa 组细胞常规培养,LoVo/Oxa + TPL 组细胞加入无毒剂量的 TPL。用不同浓度 (0、1、2、4、8、16、32、64、128、256、512 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 Oxa 处理 3 组细胞 48 h 后,每组每个浓度点设置 6 个复孔,按照 CCK-8 说明书步骤进行染色, 37°C 孵育 2 h 后用酶

标仪测波长 450 nm 处吸光度值。实验重复 3 次,取均值。用 GraphPad Prism 8.0 软件根据抑制率绘制拟合曲线,并分别计算 3 组细胞的半抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC_{50})。

将传代培养的 LoVo/Oxa 细胞消化、计数,制成浓度为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 的细胞悬液,接种至 96 孔细胞培养板中,放入 37°C 、含体积分数 5% CO_2 的培养箱中培养,细胞贴壁后分为 LoVo/Oxa 组和 LoVo/Oxa + TPL 组,LoVo/Oxa 组细胞常规培养,LoVo/Oxa + TPL 组细胞加入无毒剂量的 TPL。分别于干预 0、24、48、72、96 h 时按照 CCK-8 说明书步骤进行染色, 37°C 孵育 2 h 后用酶标仪测波长 450 nm 处的吸光度值,以吸光度值代表细胞增殖能力。每组每个时间点设 6 个复孔,实验重复 3 次,取均值。

1.2.5 克隆形成实验检测 TPL 对 LoVo/Oxa 细胞增殖能力的影响

取传代培养的 LoVo/Oxa 细胞, $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰蛋白酶消化后,以每孔 200 个接种于 6 孔细胞培养板中,每组设 3 个复孔。放入 37°C 、含体积分数 5% CO_2 的培养箱中培养,细胞贴壁后分为 LoVo/Oxa 组和 LoVo/Oxa + TPL 组,LoVo/Oxa 组细胞常规培养,LoVo/Oxa + TPL 组细胞加入无毒剂量的 TPL。每 2 d 更换培养基,连续培养 14 d,培养板中即可出现肉眼可见的克隆。各孔细胞先用多聚甲醛固定,磷酸盐缓冲液清洗后用结晶紫溶液染色。拍照并计数各孔细胞克隆数。实验重复 3 次,取均值。

1.2.6 流式细胞术检测 TPL 对 LoVo/Oxa 细胞周期的影响

取传代培养的 LoVo/Oxa 细胞, $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰蛋白酶消化后,以每孔 1×10^5 个细胞接种至 6 孔细胞培养板中,每组设 5 个复孔。放入 37°C 、含体积分数 5% CO_2 培养箱中培养,细胞贴壁后分别为 LoVo/Oxa 组和 LoVo/Oxa + TPL 组。LoVo/Oxa 组细胞常规培养,LoVo/Oxa + TPL 组细胞加入无毒剂量的 TPL 培养 48 h 后,消化、收集上述细胞。在待测细胞中加入体积分数 70% 的乙醇固定 2 h, $800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min (离心半径 10 cm),弃上清液,磷酸盐缓冲液重悬清洗后再次离心弃上清液,加入 10 μL PI 避光作用 15 min,再加入 400 μL $1 \times$ 上样缓冲液,用流式细胞仪检测细胞周期。实验重复 3 次,取均值。

1.2.7 流式细胞术检测 TPL 对 LoVo/Oxa 细胞凋亡的影响

取传代培养的 LoVo/Oxa 细胞, $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰蛋白酶消化后,以每孔 1×10^5 个细胞接种至 6 孔细胞培养板中,每组设 5 个复孔。放入 37°C 、含体积分

数 5% CO₂ 的培养箱中培养,细胞贴壁后分别为 LoVo/Oxa 组和 LoVo/Oxa + TPL 组,LoVo/Oxa 组细胞常规培养,LoVo/Oxa + TPL 组细胞加入无毒剂量的 TPL 培养 48 h 后,消化、收集上述细胞。在待测细胞中加入 5 μL Annexin V-FITC 染色液和 5 μL PI 染色液,避光染色 15 min 后,用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。实验重复 3 次,取均值。

1.2.8 Transwell 实验检测 TPL 对 LoVo/Oxa 细胞迁移和侵袭能力的影响

将 Transwell 小室置于 24 孔板上,在 Transwell 小室中加入 200 μL 无血清培养基稀释的细胞悬液(1×10^4 个 LoVo/Oxa 细胞),在 24 孔板中加入 600 μL 含有体积分数 10% FBS 的完全培养基,细胞贴壁后分别为 LoVo/Oxa 组和 LoVo/Oxa + TPL 组,LoVo/Oxa 组细胞常规培养,LoVo/Oxa + TPL 组细胞加入无毒剂量的 TPL 培养 48 h 后,用棉签擦拭掉小室底膜上层细胞,对小室底膜下层细胞进行结晶紫染色。染色完成后,随机选取 5 个视野进行显微镜拍照计数,5 个视野分别计数迁移细胞数后求均值,迁移细胞数越多表示细胞迁移能力越强。

将铺好 Matrigel 基质胶的 Transwell 小室置于 24 孔板上,在 Transwell 小室中加入 200 μL 无血清培养基稀释的细胞悬液(1×10^4 个 LoVo/Oxa 细胞),在 24 孔板中加入 600 μL 含有体积分数 10% FBS 的完全培养基,细胞贴壁后分别为 LoVo/Oxa 组和 LoVo/Oxa + TPL 组,LoVo/Oxa 组细胞正常培养,LoVo/Oxa + TPL 组细胞加入无毒剂量的 TPL 培养 48 h 后,用棉签擦拭掉小室底膜上层细胞,对小室底膜下层细胞进行结晶紫染色。染色完成后,随机选取 5 个视野进行显微镜拍照计数,5 个视野分别计数侵袭细胞数后求均值,侵袭细胞数越多表示细胞侵袭能力越强。实验重复 3 次,取均值。

1.2.9 免疫印迹法检测 TPL 对 LoVo/Oxa 细胞中蛋白表达的影响

取传代培养的 LoVo/Oxa 细胞, $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰蛋白酶消化后,以每孔 1×10^5 个细胞接种至 6 孔细胞培养板中,细胞贴壁后分别为 LoVo/Oxa 组和 LoVo/Oxa + TPL 组,LoVo/Oxa 组细胞正常培养,LoVo/Oxa + TPL 组细胞加入无毒剂量的 TPL 培养 48 h 后,每组设 3 个复孔。2 组细胞裂解后提取总蛋白,对蛋白进行定量后,每孔上样 50 μg 蛋白进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳,上样后低压 80 V 电泳 30 min,高压 120 V 电泳 120 min,湿法转膜, $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 脱脂奶粉封闭结合位点 1 h;转膜封闭后,滴加细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1)、视网膜母细

胞瘤 (retinoblastoma, Rb) 易感基因、多药耐药相关蛋白 1 (multidrug resistance 1, MDR1)、P 糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp)、磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (B-cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)、Bcl-2 基因相关的 X 蛋白 (Bcl-2 associated X, Bax)、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3 (cysteine-containing aspartate-specific protease-3, caspase-3)、剪切型冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3 (cleaved cysteine-containing aspartate-specific protease-3, Cl-caspase-3)、波形蛋白 (Vimentin)、上皮细胞钙黏附蛋白 (epithelial-cadherin, E-cad)、基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP)-2 和 MMP-9 一抗 (滴度均为 1 : 1 000),4 ℃ 过夜孵育,清洗 3 次后,用 HRP 标记的山羊抗小鼠二抗在室温条件下孵育 1 h,清洗 3 次后,在暗室中用超敏发光液进行 X 光显影,采用凝胶成像分析系统扫描条带的灰度值。Cyclin D1、Rb、MDR1、P-gp、Bax、Bcl-2、caspase-3、Cl-caspase-3、Vimentin、E-cad、MMP-2 和 MMP-9 蛋白相对表达量以其条带灰度值与内参 GAPDH 条带灰度值的比值表示。

1.3 统计学处理

应用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,2 组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TPL 对 LoVo 和 LoVo/Oxa 细胞的抑制作用比较

$6.0, 3.0, 1.5 \text{ μg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TPL 对 LoVo 和 LoVo/Oxa 组细胞的抑制率比较差异无统计学意义 ($t = 1.329, P > 0.05$); $12.0 \text{ μg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TPL 对 LoVo 组细胞的抑制率显著高于 LoVo/Oxa 细胞,差异有统计学意义 ($t = 3.129, P < 0.05$) (表 1)。经线性拟合, TPL 对 LoVo/Oxa 细胞 5% 抑制率浓度为 $6.21 \text{ μg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2 LoVo 组、LoVo/Oxa 组、LoVo/Oxa + TPL 组细胞的耐药性比较

Oxa 对 LoVo、LoVo/Oxa、LoVo/Oxa + TPL 组细胞的 IC₅₀ 分别为 18.86、68.54、25.46 μmol · L⁻¹, Oxa 对 LoVo/Oxa 组细胞的 IC₅₀ 显著高于 LoVo 细胞,差异有统计学意义 ($t = -65.370, P < 0.01$); Oxa 对 LoVo/Oxa + TPL 组细胞的 IC₅₀ 显著低于 LoVo/Oxa 组细胞,差异有统计学意义 ($t = -12.520, P < 0.01$)。

2.3 LoVo/Oxa 组与 LoVo/Oxa + TPL 组细胞增殖能力比较

0、24 h 时,2 组细胞的增殖能力比较差异无统计学意义($P>0.05$);48、72、96 h 时,LoVo/Oxa + TPL 组细胞的增殖能力显著低于 LoVo/Oxa 组细胞,差异有统计学意义($P<0.05$);LoVo/Oxa + TPL 组细胞克隆数显著多于 LoVo/Oxa 组,差异有统计学意义($P<0.01$)。结果见表 2 和图 1。

表 2 2 组细胞增殖能力比较

Tab.2 Comparison of cell proliferation ability between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	细胞增殖能力(吸光度值)					克隆数目/个
		0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	
LoVo/Oxa 组	3	0.34 ± 0.22	0.92 ± 0.33	2.26 ± 0.32	2.76 ± 0.32	3.10 ± 0.10	188.20 ± 12.11
LoVo/Oxa + TPL 组	3	0.32 ± 0.14	0.60 ± 0.02	1.26 ± 0.19	1.76 ± 0.25	2.01 ± 0.30	100.81 ± 11.64
t		0.171	1.621	4.625	4.278	6.025	11.630
P		0.881	0.227	0.021	0.021	0.019	0.00

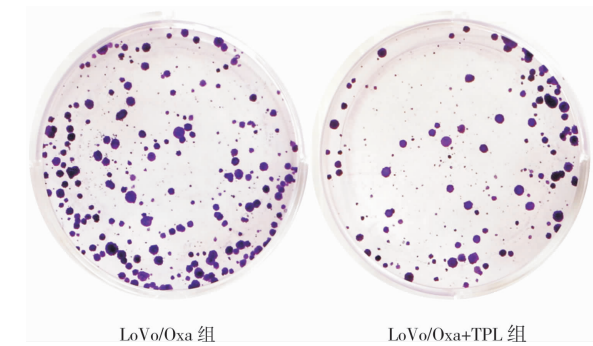


图 1 2 组细胞增殖能力(克隆形成实验)

Fig.1 Cell proliferation of in the two groups (colony formation assay)

2.4 LoVo/Oxa 组与 LoVo/Oxa + TPL 组细胞周期和细胞凋亡比较

LoVo/Oxa + TPL 组细胞中 G_1 、 G_2 期细胞占比显著低于 LoVo/Oxa 组,差异有统计学意义($P<0.01$);LoVo/Oxa + TPL 组细胞中 S 期细胞占比显著高于 LoVo/Oxa 组,差异有统计学意义($P<0.01$);LoVo/Oxa + TPL 组细胞的凋亡率显著高于 LoVo/Oxa 组,差异有统计学意义($P<0.01$)。结果见表 3 和图 2。

表 3 2 组细胞的细胞周期分布和细胞凋亡率比较

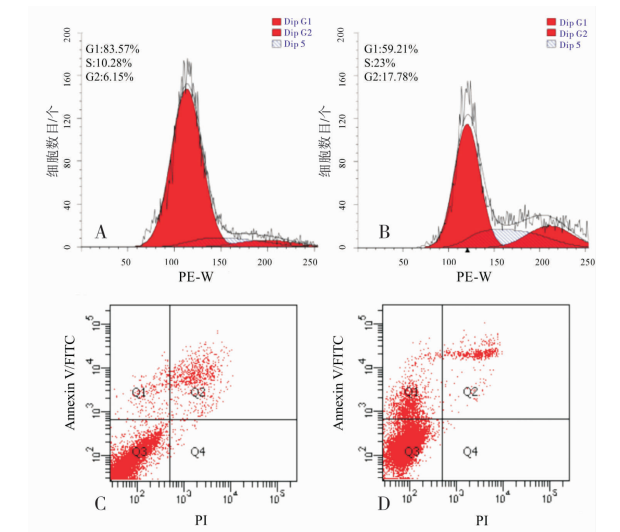
Tab.3 Comparison of cell cycle distribution,apoptosis rate between the two groups ($\%, \bar{x} \pm s$)

组别	n	细胞周期			细胞凋亡率
		G_1	S	G_2	
LoVo/Oxa 组	3	82.65 ± 1.40	10.65 ± 0.93	7.73 ± 0.86	10.49 ± 0.62
LoVo/Oxa + TPL 组	3	75.05 ± 2.46	21.32 ± 2.68	3.62 ± 0.27	16.26 ± 1.28
t		4.639	6.498	7.889	9.015
P		0.009	0.004	0.004	0.000

表 1 LoVo 组与 LoVo/Oxa 组细胞的抑制率比较

Tab.1 Comparison of inhibition rate of cells between the LoVo group and LoVo/Oxa group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	细胞抑制率/%			
		12.0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TPL	6.0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TPL	3.0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TPL	1.5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TPL
LoVo 组	3	32.36 ± 4.28	7.25 ± 1.24	5.29 ± 1.47	3.69 ± 1.61
LoVo/Oxa 组	3	24.13 ± 1.56	4.57 ± 3.19	3.94 ± 0.59	2.54 ± 0.95
t		3.129	1.356	1.476	1.066
P		0.035	0.247	0.214	0.347



A:LoVo/Oxa 组细胞周期;B:LoVo/Oxa + TPL 组细胞周期;
C:LoVo/Oxa 组细胞凋亡;D:LoVo/Oxa + TPL 组细胞凋亡。

图 2 LoVo/Oxa 组和 LoVo/Oxa + TPL 组细胞周期和细胞凋亡情况(流式细胞术)

Fig.2 Cell cycle and cell apoptosis in LoVo/Oxa group and LoVo/Oxa + TPL group(flow cytometry)

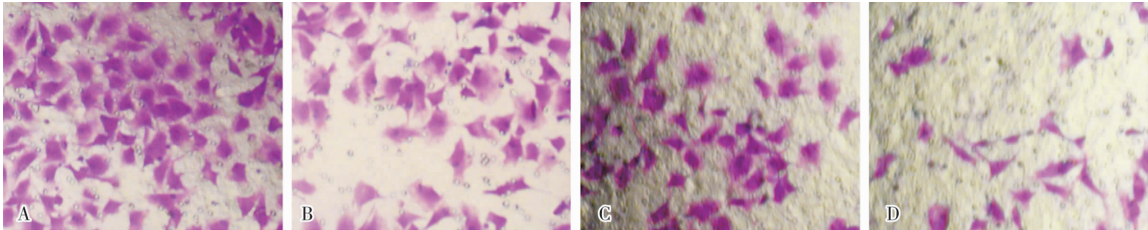
2.5 LoVo/Oxa 组与 LoVo/Oxa + TPL 组迁移细胞和侵袭细胞数比较

LoVo/Oxa + TPL 组迁移细胞数和侵袭细胞数显著低于 LoVo/Oxa 组,差异有统计学意义($P<0.01$),见图 3 和表 4。

表 4 2 组迁移细胞数和侵袭细胞数比较

Tab.4 Comparison of the number of migration and invasion of cells between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	迁移细胞数	侵袭细胞数
LoVo/Oxa 组	3	81.40 ± 11.01	54.60 ± 3.50
LoVo/Oxa + TPL 组	3	45.60 ± 3.84	27.80 ± 3.03
t		6.862	12.920
P		0.002	0.000

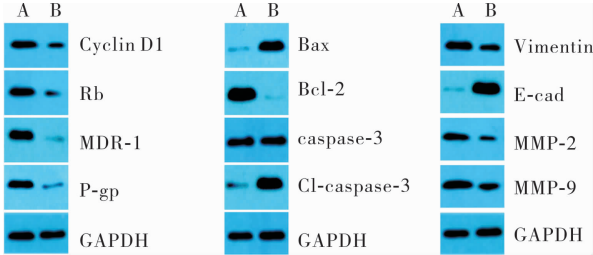


A: LoVo/Oxa 组迁移细胞; B: LoVo/Oxa + TPL 组迁移细胞; C: LoVo/Oxa 组侵袭细胞; D: LoVo/Oxa + TPL 组侵袭细胞。
图 3 2 组细胞迁移、侵袭情况(结晶紫染色, × 200)

Fig. 3 Cell migration and invasion in the two groups(crystal violet staining, × 200)

2.6 LoVo/Oxa 组与 LoVo/Oxa + TPL 组细胞中细胞周期蛋白、耐药相关蛋白、凋亡相关蛋白及迁移侵袭相关蛋白表达的比较

LoVo/Oxa + TPL 组细胞中 Cyclin D1、Rb、MDR1、P-gp、Bcl-2、Vimentin、MMP-2 和 MMP-9 蛋白相对表达量显著低于 LoVo/Oxa 组, Bax、Cl-caspase-3、E-cad蛋白相对表达量显著高于 LoVo/Oxa 组, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 2 组细胞中 caspase-3 蛋白相对表达量比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。结果见图 4 和表 5。



A: LoVo/Oxa 组; B: LoVo/Oxa + TPL 组。

图 4 LoVo/Oxa 组和 LoVo/Oxa + TPL 组细胞中蛋白表达(免疫印迹法)

Fig. 4 Expression of protein in cells in the two groups (Western blot)

表 5 2 组细胞中 CyclinD1、Rb、MRP1、P-gp、Bax、Bcl-2、caspase-3、Cl-caspase-3、Vimentin、E-cad、MMP-2、MMP-9 蛋白相对表达量比较

Tab. 5 Comparison of the relative expressions of CyclinD1, Rb, MRP1, P-gp, Bax, Bcl-2, caspase-3, Cl-caspase-3, Vimentin, E-cad, MMP-2, MMP-9 proteins in cells between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

指标	LoVo/Oxa 组	LoVo/Oxa + TPL 组	t	P
CyclinD1	1.35 ± 0.13	0.62 ± 0.21	5.417	0.006
Rb	1.36 ± 0.08	0.39 ± 0.11	12.200	0.000
MRP1	1.42 ± 0.20	0.20 ± 0.05	9.701	0.001
P-gp	1.27 ± 0.19	0.25 ± 0.15	7.097	0.002
Bax	0.63 ± 0.20	1.64 ± 0.13	7.006	0.002
Bcl-2	1.86 ± 0.15	0.75 ± 0.22	7.035	0.002
caspase-3	1.13 ± 0.15	1.13 ± 0.07	0.000	1.000
Cl-caspase-3	0.73 ± 0.12	1.66 ± 0.15	9.171	0.001
Vimentin	1.61 ± 0.23	0.97 ± 0.19	3.850	0.017
E-cad	0.49 ± 0.12	1.76 ± 0.15	12.020	0.000
MMP-2	1.07 ± 0.10	0.61 ± 0.12	4.961	0.007
MMP-9	1.25 ± 0.06	0.82 ± 0.11	5.909	0.004

3 讨论

结直肠癌因其高发病率和对现有化学治疗药物的耐药性导致其病死率较高,亟需寻找新的治疗药物及策略^[28]。TPL 是中草药雷公藤的主要成分之一,虽然其在临床前研究中显示出强大的抗肿瘤活性,但由于其严重的全身毒性而在临床应用中受到限制。越来越多的证据表明,低剂量 TPL 可部分缓解结直肠癌对当前化学治疗药物的耐药性,增强化学治疗药物的抗癌效果,并减轻其毒性^[6-8,14-15,19-21,23-24]。另外,有研究表明,TPL 可以抑制耐药癌细胞的恶性生物学特征^[5-25]。

本研究结果发现,TPL 可以降低 LoVo/Oxa 细胞的耐药性,并通过将细胞周期阻滞在 S 期来抑制 LoVo/Oxa 细胞的增殖和克隆形成。恶性肿瘤耐药性的发生与肿瘤细胞的增殖、凋亡异常和自噬等密切相关^[29-31]。本研究中,TPL 呈剂量依赖性抑制 LoVo 细胞和 LoVo/Oxa 细胞的增殖能力。以往有研究表明,TPL 能诱导食管鳞状细胞癌细胞周期停滞在 G₁/S 期,从而抑制细胞生长^[24]。本研究还发现,TPL 具有诱导肿瘤细胞凋亡的作用。有研究表明,TPL 通过抑制细胞增殖、阻断细胞周期、干扰肿瘤血管生成、诱导自噬和促进细胞凋亡发挥强大的抗肿瘤作用^[5-25]。本研究发现,TPL 可显著增加 LoVo/Oxa 细胞凋亡率。细胞凋亡是由凋亡相关基因控制的程序性死亡过程,caspase-3 的激活长期以来被认为是细胞凋亡的标志^[29-32],Bax、Bcl-2 是重要的凋亡相关蛋白,当线粒体通路被氧化应激等细胞凋亡信号激活时,Bax 等促凋亡蛋白表达上调^[32]。Bcl-2 相关抗凋亡作用的过度激活与癌症的发生、进展和预后相关,还可导致各种恶性肿瘤的放射和化学抗性^[8-9,17,23,25,31]。TPL 的抗肿瘤活性与诱导线粒体凋亡途径和 caspase 激活有关。本研究发现,无毒剂量的 TPL 处理 LoVo/Oxa 细胞 48 h 后可上调 Cl-caspase-3、Bax 的表达,下调 Bcl-2 的表达,提示 TPL 可能经线粒体途径诱导 LoVo/Oxa 细胞的凋亡。上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transi-

tion, EMT)是指上皮细胞在生理或病理因素的作用下转化为间充质细胞的过程,上皮细胞失去极性和与相邻细胞的连接,使得细胞的增殖能力明显增强,容易发生迁移、侵袭和凋亡抵抗^[33-35]。有研究发现,EMT 赋予肿瘤细胞在继发性肿瘤形成过程中适应不断变化的微环境能力,EMT 的发生使肿瘤细胞的抗凋亡能力增强,进而降低放射治疗、化学治疗、靶向治疗和免疫治疗的疗效^[36]。有研究证实,Wnt/ β -catenin 信号的异常激活可促进结直肠癌细胞中的 EMT 活性和一些顺铂类药物的耐受性^[37-38]。由于 EMT 诱导了结直肠癌的耐药性,因此,抑制 EMT 的激活和上皮-间质可塑性已成为解决结直肠癌对化学治疗耐药的有效方法。本研究发现,TPL 处理 LoVo/Oxa 细胞会抑制细胞的迁移和侵袭,使上皮细胞的蛋白标志物 E-cad 表达上调,Vimentin 的表达下调,同时可抑制 MMP-2、MMP-9 蛋白的表达;与先前的研究结果一致^[6,10]。

在全球范围内,结直肠癌给医疗保健系统带来了沉重的负担^[2]。TPL 是一种具有新型抗癌作用的天然药物^[5],TPL 除了具有抗炎和免疫抑制作用外,还有较强的抗肿瘤作用,主要表现在抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡,增强某些化学治疗药物的促凋亡效果^[5-23]。关于逆转结直肠癌细胞多药耐药的研究较少。在本研究构建了结直肠癌奥沙利铂耐药细胞系 LoVo/Oxa,并利用无毒剂量的 TPL 来逆转结直肠癌对 Oxa 的耐药性,结果显示,TPL 与 Oxa 联合可使 LoVo/Oxa 细胞的 IC₅₀ 显著下降,并改变了 LoVo/Oxa 的细胞周期,提高了细胞的凋亡率,这提示 TPL 可通过诱导细胞凋亡来逆转 LoVo/Oxa 的耐药作用。本研究进一步发现,TPL 可显著下调 LoVo/Oxa 细胞中增殖与耐药相关蛋白(Cyclin D1、Rb、P-gp、MDR1)、Bax、Cl-caspase-3、Vimentin、MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达,显著上调促凋亡蛋白 Bcl-2 及上皮细胞蛋白标志物 E-cad 蛋白的表达,这从分子机制上初步阐明了 TPL 逆转结直肠癌细胞对 Oxa 耐药的原因。

4 结论

TPL 对结直肠癌耐药细胞 LoVo/Oxa 的耐药性有一定的逆转作用。但本研究仅在细胞层面证实了 TPL 可以逆转 LoVo/Oxa 的耐药性,为了进一步证实其体内的作用效果,未来的研究将对 TPL 逆转结直肠癌的耐药作用在体内的效果进行验证,以期 TPL 在临床中的应用提供更好的理论支撑。

参考文献:

[1] 曹毛毛,陈万青. GLOBOCAN 2020 全球癌症统计数据解读[J]. 中国医学前沿杂志:电子版,2021,13(3):63-69. DOI:10.12037/YXQY. 2021. 03-10.
CAO M M, CHEN W Q. Interpretation on the global cancer statistics of GLOBOCAN 2020[J]. *Chin J Front Med Sci (Electr Vers)*, 2021, 13(3):63-69. DOI:10.12037/YXQY. 2021. 03-10.

[2] 周雄,胡明,李子帅,等. 2020 年全球及中国结直肠癌流行状况分析[J]. 海军军医大学学报,2022,43(12):1356-1364.
ZHOU X, HU M, LI Z S, et al. Colorectal cancer in the world and China in 2020: an analysis of epidemic status[J]. *Acad J Naval Med Univ*, 2022, 43(12):1356-1364.

[3] 刘明顺,方明治,李敏. 结直肠癌靶向药物耐药机制研究进展[J]. 现代肿瘤医学,2021,29(15):2730-2735.
LIU M S, FANG Z M, LI M. Research progress on targeted drug resistance mechanisms against colorectal cancer[J]. *J Mod Oncol*, 2021, 29(15):2730-2735.

[4] 周跌雯,张乐吟,孙磊涛,等. 中医药逆转化疗耐药的新兴策略和有效途径[J]. 时珍国医国药,2021,32(4):927-930.
ZHOU Y W, ZHANG L Y, SUN L T, et al. Emerging strategies and effective approaches of traditional Chinese medicine for reversing chemotherapy resistance[J]. *Lishizhen Med Materia Med Res*, 2021, 32(4):927-930.

[5] ZHOU Z L, YANG Y X, DING J, et al. Triptolide: structural modifications, structure-activity relationships, bioactivities, clinical development and mechanisms[J]. *Nat Prod Rep*, 2012, 29(4):457-475.

[6] LE F, YANG L, HAN Y, et al. TPL inhibits the invasion and migration of drug-resistant ovarian cancer by targeting the PI3K/AKT/NF- κ B-signaling pathway to inhibit the polarization of M2 TAMs[J]. *Front Oncol*, 2021, 11:704001.

[7] ZHU W, LI J, WU S, et al. Triptolide cooperates with cisplatin to induce apoptosis in gemcitabine-resistant pancreatic cancer[J]. *Pancreas*, 2012, 41(7):1029-1038.

[8] WANG X, ZHANG J J, SUN Y M, et al. Triptolide induces apoptosis and synergizes with cisplatin in cisplatin-resistant HNE1/DDP nasopharyngeal cancer cells[J]. *Folia Biol (Praha)*, 2015, 61(5):195-202.

[9] CARTER B Z, MAK D H, SCHOBBER W D, et al. Triptolide induces caspase-dependent cell death mediated via the mitochondrial pathway in leukemic cells[J]. *Blood*, 2006, 108(2):630-637.

[10] PHILLIPS P A, DUDEJA V, MCCARROLL J A, et al. Triptolide induces pancreatic cancer cell death via inhibition of heat shock protein 70[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(19):9407-9416.

[11] MACKENZIE T N, MUJUMDAR N, BANERJEE S, et al. Triptolide induces the expression of miR-142-3p: a negative regulator of heat shock protein 70 and pancreatic cancer cell proliferation[J]. *Mol Cancer Ther*, 2013, 12(7):1266-1275.

[12] ACIKGOZ E, TATAR C, OKTEM G. Triptolide inhibits CD133(+) /CD44(+) colon cancer stem cell growth and migration through triggering apoptosis and represses epithelial-mesenchymal transition via downregulating expressions of snail, slug, and twist[J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121(5/6):3313-3324.

[13] WANG Y, MEI Y, FENG D, et al. Triptolide modulates T-cell in-

- flammatory responses and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *J Neurosci Res*, 2008, 86(11):2441-2449.
- [14] ZHOU H, LIU Y, WANG C, et al. Triptolide inhibits Epstein-Barr nuclear antigen 1 expression by increasing sensitivity of mitochondria apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1):192.
- [15] ZHONG Y, LE F, CHENG J, et al. Triptolide inhibits JAK2/STAT3 signaling and induces lethal autophagy through ROS generation in cisplatin-resistant SKOV3/DDP ovarian cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2021, 45(5):69.
- [16] HUANG M, ZHANG H, LIU T, et al. Triptolide inhibits MDM2 and induces apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells through a p53-independent pathway[J]. *Mol Cancer Ther*, 2013, 12(2):184-194.
- [17] GUO Q, NAN X X, YANG J R, et al. Triptolide inhibits the multi-drug resistance in prostate cancer cells via the downregulation of MDR1 expression[J]. *Neoplasma*, 2013, 60(6):598-604.
- [18] WANG F, AN S J, YIN Y, et al. Triptolide is a promising therapeutic approach in treating thyroid cancer based on in silico and in vitro experiment[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15:4275-4287.
- [19] LI H, HUI L, XU W, et al. Triptolide modulates the sensitivity of K562/A02 cells to adriamycin by regulating miR-21 expression[J]. *Pharm Biol*, 2012, 50(10):1233-1240.
- [20] TIAN L, ZHANG Y, WANG Y, et al. Triptolide reduces proliferation and enhances apoptosis in drug-resistant human oral cancer cells[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2019, 12(4):1204-1213.
- [21] JIANG N, DONG X P, ZHANG S L, et al. Triptolide reverses the Taxol resistance of lung adenocarcinoma by inhibiting the NF- κ B signaling pathway and the expression of NF- κ B-regulated drug-resistant genes[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(1):153-159.
- [22] JIANG W, CHEN M, XIAO C, et al. Triptolide suppresses growth of breast cancer by targeting HMGB1 in vitro and in vivo[J]. *Biol Pharm Bull*, 2019, 42(6):892-899.
- [23] SAI K, LI W Y, CHEN Y S, et al. Triptolide synergistically enhances temozolomide-induced apoptosis and potentiates inhibition of NF- κ B signaling in glioma initiating cells[J]. *Am J Chin Med*, 2014, 42(2):485-503.
- [24] 申雅静, 冯晨露, 路平. 雷公藤内酯醇联合顺铂对食管鳞癌细胞 ECA-109 增殖的影响[J]. 新乡医学院学报, 2016, 33(10):864-867.
- SHEN Y J, FENG C L, LU P. Effect of triptolide combined with cisplatin on proliferation of esophageal cancer ECA-109 cells[J]. *J Xinxiang Med Univ*, 2016, 33(10):864-867.
- [25] SHI Y F, LIU L, HE L L, et al. Combining triptolide with ABT-199 is effective against acute myeloid leukemia through reciprocal regulation of Bcl-2 family proteins and activation of the intrinsic apoptotic pathway[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(7):555.
- [26] HSU H H, CHEN M C, BASKARAN R, et al. Oxaliplatin resistance in colorectal cancer cells is mediated via activation of ABCG2 to alleviate ER stress induced apoptosis[J]. *J Cell Phys*, 2018, 233(7):5458-5467.
- [27] 李敏, 方明治. 白头翁皂苷 B4、粉防己碱对奥沙利铂耐药的结肠癌细胞的耐药逆转作用及其机制[J]. 中国癌症杂志, 2015, 25(1):38-44.
- LI M, FANG M Z. Resistance reverse effect of anemoside B4 and tetrandrine on oxaliplatin-resistant human colon cancer cells and the mechanism[J]. *Chin Oncol*, 2015, 25(1):38-44.
- [28] 朱刚, 董科显, 张春玉, 等. 结直肠癌恶性表型相关转录因子的研究进展[J]. 国际遗传学杂志, 2020, 43(1):33-39.
- ZHU G, DONG K X, ZHANG C Y, et al. Research progress of malignant phenotypic transcription factors in colorectal cancer[J]. *Inter J Genet*, 2020, 43(1):33-39.
- [29] 齐春胜, 张庆怀, 祁麟, 等. 含笑内酯通过促进自噬增强结直肠癌细胞对奥沙利铂的敏感性[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2021, 28(2):115-120.
- QI C S, ZHANG Q H, QI L, et al. Micheliolide enhances the sensitivity of colorectal cancer cells to oxaliplatin by promoting autophagy[J]. *Chin J Cancer Biother*, 2021, 28(2):115-120.
- [30] CARNEIRO B A, EL-DEIRY W S. Targeting apoptosis in cancer therapy[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2020, 17(7):395-417.
- [31] ZHANG L, LU Z, ZHAO X. Targeting Bcl-2 for cancer therapy[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2021, 1876(1):188569.
- [32] SHU B, DUAN W, YAO J, et al. Caspase 3 is involved in the apoptosis induced by triptolide in HK-2 cells[J]. *Toxicol In Vitro*, 2009, 23(4):598-602.
- [33] WILLIAMS E D, GAO D, REDFERN A, et al. Controversies around epithelial-mesenchymal plasticity in cancer metastasis[J]. *Nat Rev Cancer*, 2019, 19(12):716-732.
- [34] 李志发, 吴小兵, 罗超元, 等. miRNA-490-3p 调控 Smad2/TGF- β 影响结直肠癌 SW480 细胞的奥沙利铂敏感性[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2021, 28(5):489-494.
- LI Z F, WU X B, LUO C Y, et al. Effect of miRNA-490-3p regulating Smad2/TGF- β on sensitivity of colorectal cancer SW480 cells to oxaliplatin[J]. *Chin J Cancer Biother*, 2021, 28(5):489-494.
- [35] DU B, SHIM J S. Targeting epithelial-mesenchymal transition (EMT) to overcome drug resistance in cancer[J]. *Molecules*, 2016, 21(7):965.
- [36] LIU C A, CHANG C Y, HSUEH K W, et al. Migration/invasion of malignant gliomas and implications for therapeutic treatment[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(4):1115.
- [37] 熊万成, 郝玉玲, 平贯芳, 等. lncRNA PVT1 在结直肠癌组织和细胞中的表达及其对顺铂化疗敏感性的影响及机制[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2019, 26(7):743-750.
- XIONG W C, XI Y L, PING G F, et al. Expression of lncRNA PVT1 in colorectal cancer tissues and cells and its effect on chemo-sensitivity to cisplatin and the possible mechanisms[J]. *Chin J Cancer Biother*, 2019, 26(7):743-750.
- [38] ZHU G X, GAO D, SHAO Z Z, et al. Wnt/ β -catenin signaling: causes and treatment targets of drug resistance in colorectal cancer (review)[J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(2):105.