文章编号:1000-5404(2012)08-0729-05

论著

银杏酚酸通过抑制 PKD-2 活性提高 Tca8113 细胞对化疗药物的敏感性

戴丽娜[1],张 平[2],苏 勤[2],王金华[1] (400015 重庆,重庆医科大学附属口腔医院儿童牙病中心,重庆市口腔疾病与生物医学研究中心[1];610041 成都,四川大学口腔疾病研究国家重点实验室[2])

[摘要] **目的** 探讨蛋白激酶 D-2(protein kinase D-2, PKD-2)在银杏酚酸(ginkgolic acid,GA)提高舌鳞状细胞癌细胞株 Tca8113 对化疗药物敏感性过程中的作用。**方法** 通过 MTT 方法检测 GA 对 Tca8113 的增殖抑制及提高 Tca8113 对化疗药物敏感性;Western blot 检测在 GA 不同作用时间下 PKD-2 在 Tca8113 中的表达及磷酸化特性;利用 shRNA 干扰技术基因沉默 Tca8113 中的 PKD-2 基因;利用佛波酯(PMA)诱导 Tca8113 中的 PKD-2 高磷酸化;以 MTT 方法检测经 shRNA 干扰后的 Tca8113 和及经 PMA 诱导后的 Tca8113 细胞对 GA 及化疗药物的敏感性。**结果** GA 抑制 Tca8113 生长的半数抑制浓度(IC_{50})为 20 mg/L,GA 明显提高 Tca8113 对化疗药物卡铂(CBP)和紫杉醇(PTX)的敏感性,分别提高 4.37 倍和 39.20 倍($P<0.05$);在野生型 Tca8113 中与非磷酸化 PKD-2 蛋白质表达相比较,GA 对 Tca8113 中磷酸化 PKD-2 蛋白质的表达呈时间依赖性抑制作用($P<0.05$);经 shRNA 沉默后的 Tca8113 细胞建立稳定细胞株,同与 GA 联合用药作用相似,PKD-2 基因沉默后的 Tca8113 细胞对 CBP 和 PTX 的敏感性明显提高,分别提高 1.651 7 倍和 1.501 6 倍($P<0.05$);PMA 激活 Tca8113 中的 PKD-2 后,Tca8113 对 CBP 和 PTX 的敏感性明显降低,同时发现 GA 能明显拮抗 PMA 作用。**结论** GA 通过抑制PKD-2 活性途径提高 Tca8113 对化疗药物的敏感。

[关键词] 银杏酚酸;Tca8113;蛋白激酶 D-2
[中图法分类号] R394.2;R739.86;R979.1 [文献标志码] A

Ginkgolic acid enhances chemosensitivity of Tca8113 cells *via* suppressing PKD-2 activity

Dai Lina[1], Zhang Ping[2], Su Qin[2], Wang Jinhua[1] ([1]Children's Dental Center, Chongqing Research Center for Oral Diseases and Biomedical Science, Affiliated Hospital of Stomatology, Chongqing Medical University, Chongqing, 400015; [2]State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu, Sichuan Province, 610041, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role of protein kinase D-2 (PKD-2) in chemosensitivity enhanced by ginkgolic acid (GA) in Tca8113 cells. **Methods** The effect of different concentrations of GA on the proliferation of Tca8113 cells and the cell survival rate for single use of Carboplatin (CBP) or Paclitaxel (PTX) and combination of CBP or PTX with GA was detected by Methyl thiazolyl tetrazolium(MTT) assay. Western blot analysis was used to detect protein expression of phospho-protein kinase D (p-PKD-2) and PKD-2 in Tca8113 cells induced by GA for different times. shRNA was introduced to downregulate the expression of PKD-2 in Tca8113 cells. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) was used to induce the phosphorylation of PKD-2. MTT assay was used to detect viability after exposure of cells to drugs or combination of drugs and GA. **Results** The IC_{50} of GA which was detected by MTT was 20 mg/L. The folds of chemosensitivity of Tca8113 to CBP and PTX enhanced by GA were 4.37 and 39.20 respectively. Exposure of Tca8113 cells to GA resulted in a decrease in phospho-PKD-2 level in a time-dependent manner. Knockdown of PKD-2 with shRNA enhanced chemosensitivity of Tca8113 cells to CBP and PTX or combination with GA, with the folds of 1.651 7 and 1.501 6 respectively. GA also antagonized the function of PMA, which induced the phosphorylated activation of PKD2 and increased chemotherapy drugs resistance of Tca8113 cells. **Conclusion** GA may promote chemosensitivity of Tca8113 cells *via* inhibiting phosphorylation of PKD-2 pathway.

[**Key words**] ginkgolic acid; Tca8113; protein kinase D-2

Corresponding author: Dai Lina, E-mail:362007560@qq.com

[通信作者] 戴丽娜,E-mail:362007560@qq.com

舌鳞状细胞癌是口腔临床中最常见的恶性肿瘤中,恶性程度较高,生长快,浸润性强,常累及舌肌,致舌活动受限,影响患者的进食、吞咽、语言等功能。目前,化疗是舌鳞状细胞癌的主要治疗方法之一,其对化疗药物存在固有和获得性多药耐药,如何提高舌鳞状细胞癌细胞对化疗药物的敏感性,是目前治疗的重要环节。银杏酚酸(ginkgolic acid,GA)是存在于银杏叶、果和外皮中的生物活性成分,大于0.375 mg/L的GA即可抑制人喉表皮细胞癌(human epidermis larynx carcioma cell, Hep-2)细胞的增殖,并表现出明显的剂量和时间依赖效应[1]。我们研究发现GA能通过诱导细胞周期静止和降低Bcl-2/Bax比率促进肿瘤细胞程序性死亡,并对正常细胞毒副作用较小[2]。蛋白激酶D(protein kinase D, PKD)在一系列基本生物进程中发挥重要作用,其中包括信号传导、膜运输、细胞的生存、迁移、分化与肿瘤的侵入力也密切相关[3]。PKD-2由两个位于N端的半胱氨酸区域,一个激酶底物同源区及一个催化区构成,PKD-2的活性主要由位于催化区的Ser744和Ser748磷酸化和Ser916自磷酸化[4]调控。我们之前通过对人乳腺癌细胞系的研究,发现PKD-2的高磷酸化与肿瘤细胞的耐药性升高密切相关,PKD-2的活性与肿瘤细胞的耐药性具有一定相关性[5],并证实GA能抑制PKD-2的活性,显著提高Tca8113对化疗药物的敏感性[6]。为进一步研究PKD-2在此过程中的作用,本实验采用shRNA干扰技术,基因沉默Tca8113中的pkd-2基因,并建立稳定细胞株,用MTT方法检测其对GA及化疗药物的敏感性。另一方面,利用PMA能诱导PKD-2高磷酸化的特点[7],用PMA激活Tca8113中的PKD-2,进一步探讨PKD-2在GA提高Tca8113对化疗药物敏感性过程中发挥的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料和主要试剂

人舌鳞状细胞癌细胞株Tca8113(四川大学口腔疾病研究国家重点实验室);辣根过氧化物酶标记的鼠抗兔IgG(ECL,Amersham);辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(ECL,Amersham);TaKaRa RNA-PCR试剂盒(TaKaRa Shuzo,Tokyo,Japan);银杏酚酸(上海顺勃生物工程技术公司,中国);卡铂、紫杉醇、细胞裂解液和MTT(Sigma公司,USA);RPMI1640(Gibcol公司,USA);二甲基亚砜(DMSO,西安化学试剂厂);酶联免疫检测仪(Multiskan MS353,Japan);人pkd-2-shRNA及其对照重组质粒(hushRNA pRS;OriGene,USA),引物序列5′-GGCTCCCACTCAGAGAATGCG-3′,对照含与人pkd-2-RNA不相关序列。去内毒素质粒提取试剂盒、Trizol、RT-PCR试剂盒(TaKaRa Shuzo,Tokyo,Japan);磷酸化的兔抗人PKD-2抗体(Minipore,USA);GAPDH和羊抗人PKD-2抗体(Santa Cruz Biotechnology,USA)。

1.2 方法

1.2.1 检测Tca8113对化疗药物及GA的敏感性 Tca8113置于体积分数为10%的小牛血清、pH=7.4的RPMI1640完全培养液中,于37℃、5% CO_2的培养箱中培养,本次试验均取其对数生长期细胞。GA(上海顺勃生物工程技术公司)用二甲基亚砜配制成0.5 mol/L的储存液,过滤分装,-20℃保存备用。取对数生长期的Tca8113以1.0×10^4个/孔的密度接种于96孔板中,再于37℃,体积分数5% CO_2培养箱中培养24 h,分别加入5、10、20、40、80 mg/L的GA和二甲基亚砜(DMSO)溶剂,同时设空白对照组,4.5 h后加入0.5 g/L的MTT液每孔20 ml,4 h后弃培养基。用MTT法检测在波长为570 nm时每孔的光密度值[$D(570)$],并计算细胞存活率。细胞存活率=[实验孔$D(570)$值-空白对照孔$D(570)$值]/阴性对照组$D(570)$值×100%。每一浓度设3复孔,试验重复3次。以化疗药物的质量浓度为横轴,细胞存活率为纵轴绘制剂量生长曲线,根据细胞存活率计算半数抑制质量浓度(50% inhibitory concentration,IC_{50})。按上述方法将Tca8113接种于96孔板培养,加入不同剂量的CBP、CBP+GA、PTX、PTX+GA。其中,CBP的质量浓度梯度为0、10、20、30、40、50 mg/L,PTX的浓度梯度为(0、3.0、6.0、12.0、24、48、96)$\times10^{-3}$ mg/L,GA取其IC_{50} 20 mg/L。以化疗药物浓度为横轴,细胞活存率为纵轴绘制剂量抑制曲线。并计算药物的IC_{50}和敏感性提高倍数,敏感性提高倍数=单独用化疗药物的IC_{50}/联合GA与化疗药物用药的IC_{50}。

1.2.2 Western blot检测GA作用前后Tca8113中PKD-2的表达和磷酸化特性 提取经20 mg/L GA诱导0、12、24、48、72 h的Tca8113总蛋白质,BCA法测定蛋白质质量。取50 μg作SDS-PAGE(十二烷基硫酸钠-聚丙烯)电泳,将蛋白质样本转移至硝酸纤维素膜上,用质量分数5%的脱脂奶粉、37℃封闭1 h,三羟甲基氨基甲烷-吐温-20缓冲液(tris buffered saline with Tween-20,TBST)洗3次,加入抗PKD-2多克隆抗体(1∶5 000),4℃过夜。分别加入过氧化物酶标记的鼠抗兔IgG(1∶5 000),脱色摇床摇1 h,TBST洗3次,每次5 min。二氨基联苯氨显色,凝胶成像系统成像拍照分析。同时以GAPDH作为内参,试验重复3次。

1.2.3 shRNA-PKD-2重组质粒的构建、转染以及shRNA稳定表达细胞株的建立 将处于对数期的Tca8113按6.0×10^5个每孔的密度种于24孔板,再将其分为野生型对照组、空载体对照组和shRNA-PKD-2转染组,转染前用不完全培养液(无小牛血清)培养6 h。Lipofectamine 2000转染按操作说明进行,核苷酸与质脂体质量比接近1∶3.5,转染12 h后换用含有体积分数10%小牛血清的培养液培养,48 h后用质量浓度为3.5 mg/L(为空白对照组细胞1周后大部分死亡的质量浓度)的嘌呤霉素筛选阳性细胞株,维持3.5 mg/L的嘌呤霉素筛选1周。局部胰酶消化法转移细胞到6孔板,1~2周后挑取单克隆扩大培

养,收集各组稳定转染建系单集落株,用半定量 RT-PCR 和蛋白质印迹技术分析并鉴定 shRNA 稳定表达细胞株中 PKD-2 在 mRNA 及其蛋白表达水平的变化。

1.2.4　MTT 实验　　PMA 诱导 Tca8113 细胞中的 PKD-2 高磷酸化,用 MTT 法检测细胞对化疗药物敏感性。实验分组:①shRNA-PKD-2-Tca8113 稳定表达组;②野生型对照组;③cshRNA-PKD-2-Tca8113 空载体对照组;④PMA 诱导野生型 Tca8113 组。每组设 3 复孔,调整 4 组细胞密度分别为 1×10^4/ml 并将其加入 96 孔板各孔中 200 μl,12 h 细胞贴壁后分别加入化疗药物,GA 及 PMA,72 h 后终止培养,弃培养基,每孔加20 μl MTT,置 5% CO_2、37 ℃孵箱中继续培养 3.5 h 后,倒掉培养液,每孔加 100 μl DMSO,酶联免疫检测仪检测波长 490 nm 处光密度值[D(490)]。以化疗药物的质量浓度为横轴,细胞存活率为纵轴绘制剂量生长曲线,根据细胞存活率计算 IC_{50}。

1.3　统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件,两样本的均数比较用组间 t 检验。

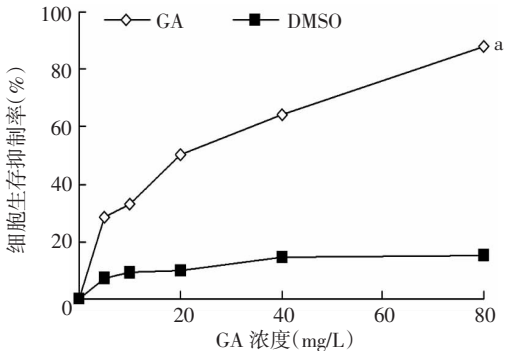
2　结果

2.1　GA 明显提高 Tca8113 对化疗药物的敏感性

GA 呈剂量依赖性抑制 Tca8113 生长($P<0.05$),IC_{50} 为(20.000 ± 0.012) mg/L。GA 对 Tca8113 的生长抑制作用与 DMSO 对照组相比较,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 1。GA + CBP、GA + PTX 联合应用于 Tca8113 时,其存活率均较单独应用 CBP 和 PTX 时明显下降($P<0.05$),见图 2。其中 GA + CBP 组的 IC_{50} 为(3.560 ± 0.036) mg/L,单独用 CBP 的 IC_{50} 为(15.570 ± 0.023) mg/L,药物敏感性提高了 4.37 倍;GA + PTX 组的 IC_{50} 为(0.290 ± 0.041) × 10^{-3} mg/L,单独用 PTX 的 IC_{50} 为(11.370 ± 0.037) × 10^{-3} mg/L,药物敏感性提高了 39.20 倍。

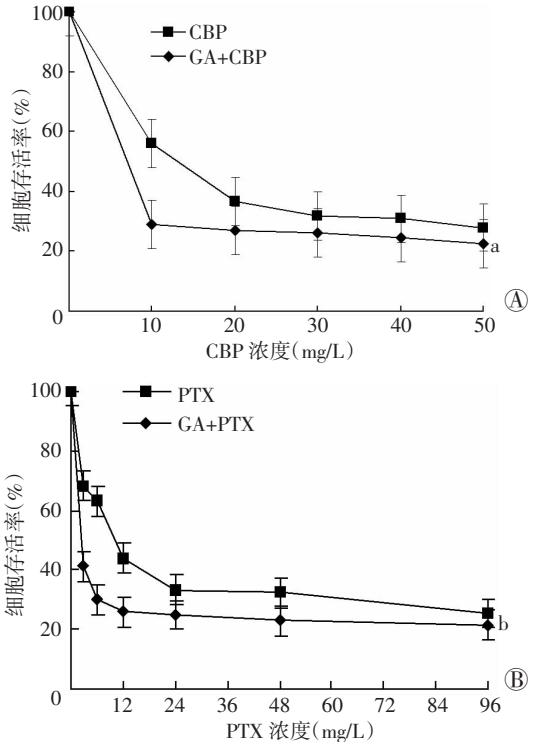
2.2　GA 明显抑制 Tca8113 的 PKD-2 磷酸化

经 GA 作用不同时间下的 Tca8113 细胞中 PKD-2 及p-PKD-2 的表达,在野生型 Tca8113 中 PKD-2 低表达、p-PKD-2 高磷酸化表达,而经 GA 作用不同时间后,p-PKD-2 的磷酸化表达明显受到抑制且抑制呈时间依赖关系,PKD-2 的表达不随 GA 的作用改变,见图 3。



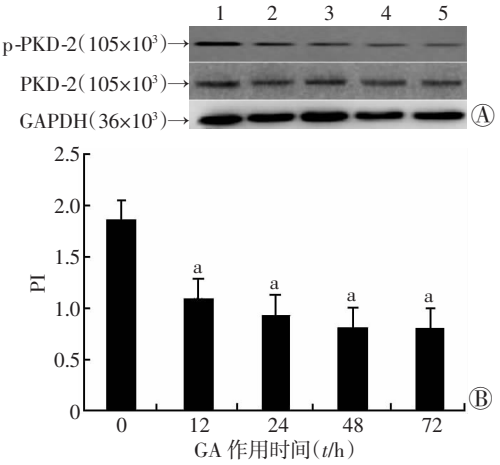
a:$P<0.05$,与 DMSO 比较

图 1　不同质量浓度的 GA 对 Tca8113 增殖的抑制作用



a:$P<0.05$,与 CBP 组比较; b:$P<0.05$,与 PTX 组比较

图2 GA 与不同质量浓度 CBP(A)和 PTX(B)联合作用下的 Tca8113 细胞存活率

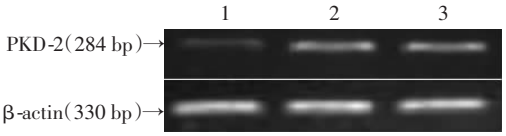


A:Western blot 检测结果 1~5:分别为 GA 作用 0、12、24、48、72 h;B:灰度值分析 PI=磷酸化 PKD-2 灰度值/PKD-2 表达的灰度值;a:$P<0.05$,与 0 h 比较

图3 GA 作用不同时间点的 p-Pkd-2 和 Pkd-2 的表达

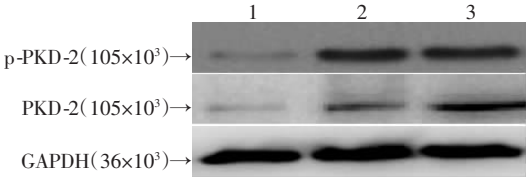
2.3 shRNA-pkd-2 Tca8113 系的建立和鉴定

与空载体对照组及野生型对照组的相比较,shRNA-pkd-2 干扰可使转染后的细胞基因沉默近 63.2%,β-actin 作为对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$,图4)。蛋白质印迹技术检测 PKD-2 蛋白质表达, Quality One 软件半定量灰度值分析干扰前后 PKD-2 蛋白质的表达分别为 0.42 和 0.08;在干扰后,细胞中 PKD-2 和 p-PKD-2 蛋白质的表达量明显下降,且差异具有统计学意义($P<0.05$,图5)。



1:shRNA PKD-2 转染组; 2:空载体对照组; 3:野生型对照组

图4 转染前后 Tca8113 中 PKD-2 mRNA 的表达水平

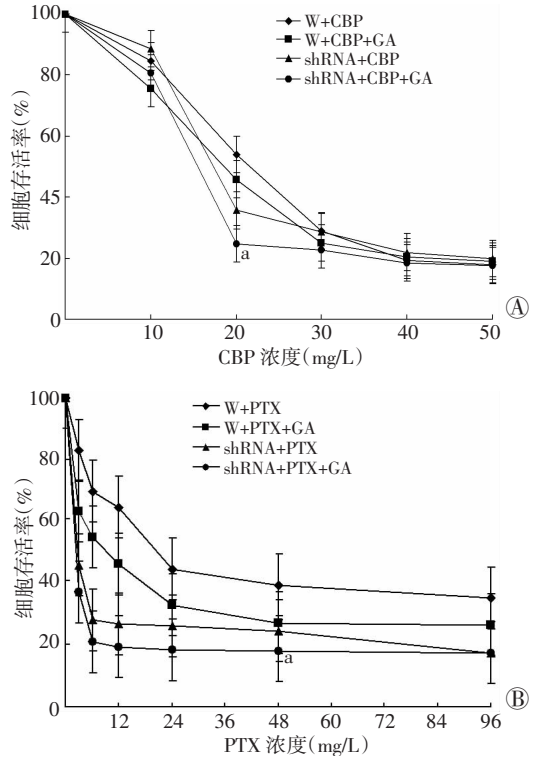


1:shRNA PKD-2 转染组; 2:空载体对照组; 3:野生型对照组

图5 转染前后 Tca8113 中 PKD-2 和 p-PKD-2 蛋白的表达水平

2.4 GA 及 shRNA 干扰技术在 Tca8113 对化疗药物敏感性中的作用

基因沉默 PKD-2 基因后的 Tca8113 细胞对化疗药物的敏感性明显提高(图6A、B)。一方面,与经化疗药物诱导过的野生型组相比,经 shRNA-PKD-2 干扰后的肿瘤细胞的 IC_{50} 明显下降,CBP 组从(15.460±0.081) mg/L 下降到和(9.330±0.103) mg/L,PTX 组从(9.760±0.057)×10^{-3} mg/L 下降到(6.100±0.046)×10^{-3} mg/L,空白对照组和野生型组的差异不大;另一方面,与经化疗药物诱导的野生型 Tca8113 细胞相比,经 shRNA 干扰后的 Tca8113 细胞在与 GA 共培养的条件下,IC_{50} 下降更明显,CBP 组从(15.460±0.039) mg/L 下降到(6.540±0.052) mg/L,PTX 组从(9.760±0.078)×10^{-3} mg/L 下降到(2.100±0.034)×10^{-3} mg/L。表明 GA 与 shRNA-PKD-2 干扰技术一样能提高 Tca8113 细胞对化疗药物的敏感性,降低 IC_{50}。

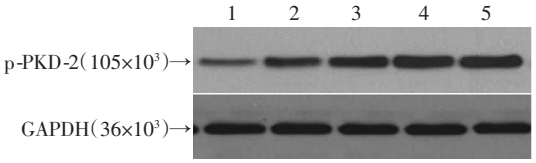


A:CBP; B:PTX; W:野生型;a:$P<0.05$,与其他3组比较

图6 PKD-2 基因沉默促进 GA 提高 Tca8113 对化疗药物敏感性

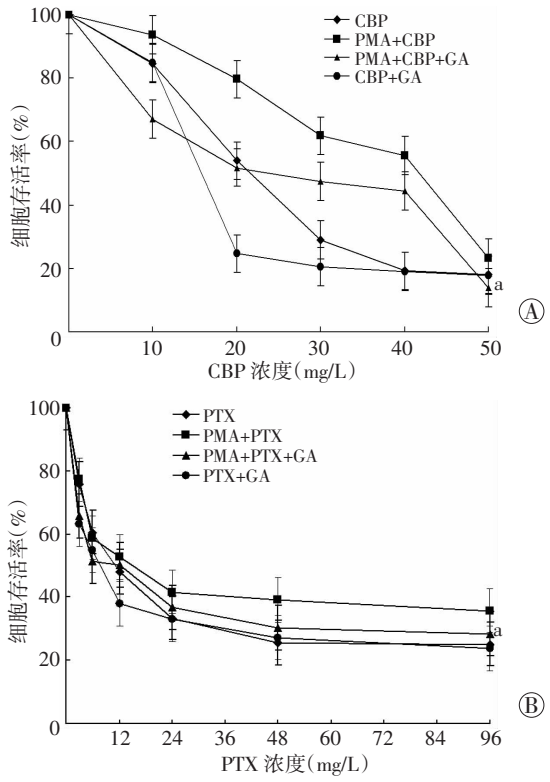
2.5 GA 拮抗 PMA 降低 Tca8113 对化疗药物敏感性作用

PMA 诱导 PKD-2 高磷酸化，且与时间呈依赖关系（图 7），与亲本 Tca8113 细胞相比，PMA 降低的癌细胞对化疗药物的敏感性、提高 IC_{50}：CBP 组 IC_{50} 从（15.463 ± 0.203）mg/L 上升到（18.291 ± 0.437）mg/L，PTX 组 IC_{50} 从（9.723 ± 0.326）$\times 10^{-3}$ mg/L 上升到（13.268 ± 0.177）$\times 10^{-3}$ mg/L；当向培养体系中加入 GA 时，与未加入 GA 组对比，IC_{50} 明显下降：CBP 组 IC_{50} 下降至（10.301 ± 0.863）mg/L，PTX 组 IC_{50} 下降至（6.672 ± 0.245）$\times 10^{-3}$ mg/L（图 8）。表明 PKD-2 的磷酸化程度与耐药性密切相关，且 GA 对 PMA 诱导的高磷酸化产生拮抗作用，有效降低 IC_{50}，逆转 Tca8113 对化疗药物的耐药性。



1～5：诱导时间分别为 0、12、24、48、72 h

图 7　Western blot 检测 PMA 诱导 PKD-2 磷酸化水平



A：CBP；B：PTX；a：$P < 0.05$，与其他 3 组比较

图 8　GA 能有效抑制 PMA 诱导的 Tca8113 细胞耐药性

3　讨论

口腔鳞状细胞癌（oral squamous cell carcinoma，OSCC）是头颈部最常见的恶性肿瘤，其死亡率占全身恶性肿瘤的第 6 位。化疗是目前临床治疗口腔鳞状细胞癌的主要手段之一。化疗过程中肿瘤细胞多药耐药的形成和对化疗药物敏感性降低是目前肿瘤治疗的最大障碍。多药耐药性（MDR）即肿瘤细胞对多种结构和功能不相关的化疗药物产生耐药性，是治疗口腔鳞状细胞癌的主要问题[8]。参与多药耐药发生的机制主有以下几方面：膜糖蛋白（P-gp）的表达增加；谷胱甘肽 S 转移酶的表达增加；DNA 修复机制增强；氧化三辛基膦Ⅱ含量减少或性质发生改变；蛋白激酶 C 的表达增加或活性增强；肿瘤细胞抗凋亡能力增强[9]。其中 P-gp 糖蛋白的过度表达或活性增强是引起 MDR 的主要机制，其在癌细胞内的过量表达是导致多种人类肿瘤细胞产生 MDR 及预后不良的原因。P-gp 是由 mdr1 基因编码的相对分子质量为 170×10^3 的 ATP 结合转运膜蛋白，研究表明许多临床化疗药物诱导及蛋白激酶 PKC、MAPK 通路参与是膜蛋白 P-gp 的过表达主要原因[10]。蛋白激酶 PKD 是 PKC 的下游基团，其激活与 MAPK、PKC 密切相关，我们之前的研究表明在人乳腺癌细胞中 PKD-2 可通过调控 P-gp 糖蛋白调节 MDR[7]。

为进一步探讨 PKD-2 在 GA 提高 Tca8113 对化疗药物敏感性过程中的作用，本实验采用 shRNA 干扰技术，基因沉默 pkd-2 基因，并建立稳定细胞株。与空载体对照组和野生型对照组相比，shRNA 干扰对 Tca8113 细胞的生长影响不明显，但 shRNA-PKD-2-Tca8113 转染组对化疗药物的敏感性明显提高、IC_{50} 明显降低：CBP 组 IC_{50} 从（15.460 ± 0.039）mg/L 下降到（6.540 ± 0.052）mg/L、PTX 组 IC_{50} 从（9.760 ± 0.057）$\times 10^{-3}$ mg/L 下降到（2.100 ± 0.034）$\times 10^{-3}$ mg/L；同时用 PMA 诱导 Tca8113 细胞中的 PKD-2 高磷酸化，发现癌细胞对化疗药物的敏感性明显下降，CBP 组 IC_{50} 从（15.463 ± 0.203）mg/L 上升至（18.291 ± 0.437）mg/L、PTX 组 IC_{50} 从（9.723 ± 0.326）$\times 10^{-3}$ mg/L 上升至（13.268 ± 0.177）$\times 10^{-3}$ mg/L；向反应体系中加入 GA 后，发现 GA 能明显拮抗 PMA 的降低癌细胞对化疗药物敏感性作用，与未加 GA 组对比，加 GA 后癌细胞的耐药性和 IC_{50} 明显下降：CBP 组 IC_{50} 下降至（10.301 ± 0.863）× mg/L、PTX 组 IC_{50} 下降至（6.672 ± 0.245）$\times 10^{-3}$ mg/L。

PKD-2 与 Tca8113 对化疗药物的敏感性之间存在密切联系，在 GA 提高 Tca8113 细胞对化疗药物敏感性过程中发挥重要作用，GA 除明显提高 Tca8113 细胞对化疗药物敏感性外，还能拮抗 PMA 降低癌细胞对化

疗药物敏感性作用。总之，GA对正常细胞的不良反应较小，可开发为高效低毒的抗肿瘤成分，并具有与化疗药物联合用药抑制肿瘤细胞的潜力。

参考文献：

[1] 周陈晨，杜玮，文宗，等. 天然植物银杏酸诱导喉癌Hep-2细胞凋亡的初步研究[J]. 四川大学学报:医学版，2009，40(3)：459－461.

[2] Zhou C，Li X，Du W，*et al*. Antitumor effects of ginkgolic acid in human cancer cell occur via cell cycle arrest and decrease the Bcl-2/Bax ratio to induce apoptosis[J]. Chemotherapy，2010，56(5)：393 402.

[3] Bowden E T，Barth M，Thomas D，*et al*. An invasion-related complex of cortactin，paxillin and PKCmu associates with invadopodia at sites of extracellular matrix degradation [J]. Oncogene，1999，18(31)：4440－4449.

[4] Ge X，Low B，Liang M，*et al*. Angiotensin II directly triggers endothelial exocytosis *via* protein kinase C-dependent protein kinase D2 activation[J]. J Pharmacol Sci，2007，105(2)：168－176.

[5] Chen J，Lu L B，Feng Y，*et al*. PKD2 mediates multi-drug resistance in breast cancer cells through modulation of P-glycoprotein expression [J]. Cancer Lett，2011，300(1)：48－56.

[6] 戴丽娜，苏勤，周陈晨，等. 银杏酚酸提高Tca8113对化学治疗药物敏感性的研究[J]. 国际口腔医学杂志，2011，38(3)：268－273.

[7] Manna P R，Soh J W，Stocco D M. The involvement of specific PKC isoenzymes in phorbol ester-mediated regulation of steroidogenic acute regulatory protein expression and steroid synthesis in mouse Leydig cells [J]. Endocrinology，2011，152(1)：313－325.

[8] Friedrich R E，Punke C，Reymann A. Expression of multi-drug resistance genes (mdr1，mrp1，bcrp) in primary oral squamous cell carcinoma[J]. *In Vivo*，2004，18(2)：133－147.

[9] Wesolowska O. Interaction of phenothiazines，stilbenes and flavonoids with multidrug resistance-associated transporters，P-glycoprotein and MRP1[J]. Acta Biochim Pol，2011，58(4)：433－448.

[10] Navarro G，Sawant R R，Biswas S，*et al*. P-glycoprotein silencing with siRNA delivered by DOPE-modified PEI overcomes doxorubicin resistance in breast cancer cells[J]. Nanomedicine (Lond)，2012，7(1)：65－78.

（**收稿**:2011-10-20;**修回**:2011-12-27）

（编辑　汪勤俭）