PEG 修饰的索拉非尼脂质体联合核转录因子 NF-κB 抑制剂的抗肿瘤 活性研究

陈静 1 ,陈燕 1 ,陈灿 1 ,**侯艾林** 2 ,**袁明勇** 1* (1.成都医学院第一附属医院,成都 610500; 2.广元市第一人民医院药剂科,四川 广元 628017)

摘要:目的 考察 PEG 修饰的索拉菲尼脂质体联合核转录因子 NF-кB 抑制剂吡咯烷二硫代氨基甲酸(PDTC)的体内外抗肿瘤活性。方法 采用薄膜分散法制备 PEG 修饰的索拉菲尼脂质体,体外细胞毒性试验考察游离药物与脂质体的抗肿瘤作用。同时以 5~7 周龄 SPF 裸鼠为研究对象,建立体内肿瘤模型,通过测量裸鼠体质量、肿瘤质量与体积变化情况评价药物的抗肿瘤作用,并采用免疫印迹检测手段评价索拉菲尼脂质体及不同浓度的 PDTC 联合促凋亡、抗肿瘤作用。结果采用最优处方制备的索拉菲尼脂质体包封率高、分布均匀,体外抗结肠直肠癌细胞 SW480 作用较游离药物强。体内动物试验结果显示索拉菲尼脂质体联合使用 PDTC 组能显著降低肿瘤的生长速度,具有较高的抑制肿瘤和促凋亡作用,免疫印迹结果亦进一步证实了二者的联合应用能更强地促进肿瘤细胞凋亡。结论 通过体内外试验,证实了 PEG 修饰的索拉菲尼脂质体联合核转录因子 NF-кB 抑制剂 PDTC 能显著提高药物的抗肿瘤和促凋亡作用,可为索拉菲尼新型载药系统的深入研究提供参考。

关键词:索拉菲尼;脂质体;核转录因子;抗肿瘤

中图分类号: R969 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2017)01-0037-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.01.010

Study on the Anti-tumor Activity of PEG-modified Liposomes Combined with Sorafenib Nuclear Transcription Factor NF-kB Inhibitors

CHEN Jing¹, CHEN Yan¹, CHEN Can¹, LAN Jing¹, HOU Ailin², YUAN Mingyong^{1*} (1.The First Affiliated Hospital of Chengdu Medical Colleg, Chendu 610500, China; 2.Department of Pharmacy, The First People's Hospital of Guangyuan City, Guangyuan 628017, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the anti-tumor activity of PEG-modified liposomes combined with sorafenib nuclear transcription factor NF-κB inhibitors PDTC *in vivo* and *in vitro*. METHODS The PEG-Sora-LPs were prepared by using thin-film methods. Cytotoxicity assays *in vitro* were applied to investigate the anti-tumor effect of free drug and liposomes. The *in vivo* tumor model was established based on the 5–7 weeks old SPF nudes. The weight of the nudes, the weight and size of tumors were measured to assess the anti-tumor effects. And Western blot detection means were applied to evaluate the pro-apoptotic and anti-tumor effects PEG-Sora-LPs combined with varying concentrations of PDTC. RESULTS The optimal prescription of PEG-Sora-LPs were prepared with high encapsulation efficiency and were evenly distributed. The anti-tumor effects of PEG-Sora-LPs were stronger than free drug in SW480 cells *in vitro*. *In vivo* animal studies showed that in combination with PEG-Sora-LPs, PDTC could significantly reduce the rate of tumor growth, with higher tumor inhibition and induce apoptosis functions. Western blot analysis also confirmed the joint application of these two had stronger effects to promote tumor cell apoptosis. CONCLUSION PEG-modified liposomes combined with sorafenib nuclear transcription factor NF-κB inhibitor PDTC can significantly increase the anti-tumor and pro-apoptotic effects by *in vivo* and *in vitro* experiments. This study can provide a reference for the investigation of sorafenib new drug system.

KEY WORDS: sorafenib; liposomes; nuclear transcription factor; anti-tumor

结肠直肠癌(colorectal cancer, CRC)是一种具有高发病率和死亡率的恶性胃肠道肿瘤,是导致人类死亡的第二大肿瘤。目前,CRC 的治疗关键是早期发现和治疗,其根治的唯一方法是切除早期肿瘤。然而对于局部复发或远处转移的患者,根治性切除只有 50%的治愈几率^[1]。研究表明,采

用分子靶向药物进行治疗,CRC 患者的存活率已显著得到了改进,提高了总体的存活率。

索拉非尼是一种小分子多激酶抑制剂,对多种激酶具有选择性的抑制作用,其主要通过抑制肿瘤的生长和破坏肿瘤微血管而起到抗增殖,抗血管生成和促凋亡作用^[2-5]。研究表明,索拉菲尼

作者简介: 陈静,女,主管药师 Tel: 13880427125 E-mail: 767090590@qq.com ***通信作者:** 袁明勇,男,硕导,主任药师 Tel: (028)83016983 E-mail: 244171783@qq.com

对肾癌、肝癌和结直肠癌等恶性肿瘤均有较好的治疗作用^[6-16]。但由于化疗药物对病理部位无特异的选择性,从而导致疗效减弱,甚至产生不良反应^[17-18]。PEG 修饰的脂质体不仅能提高药物的生物利用度,减小药物的不良反应,还能避免巨噬细胞的"捕获",从而在病灶部位聚集,提高疗效。研究表明,索拉菲尼脂质体在结直肠癌细胞中显著提高了抗肿瘤活性^[6]。

核转录因子 (nuclear transcription factor, NF-кB),是参与肿瘤增殖与转移的转录因子。激活的 NF-кB 能下调下游蛋白,从而阻止癌细胞的凋亡,促进肿瘤增殖、入侵、转移等。吡咯烷二硫代氨基甲酸(PDTC)是一种 NF-кB 选择性抑制剂,能通过抑制 NF-кB 的激活而诱导肿瘤细胞凋亡^[19-20]。本实验研究索拉菲尼的化疗作用与 PDTC 的促凋亡作用联合治疗 CRC 的体内外抗肿瘤活性,以期为 CRC 的治疗提供新的思路与有价值的参考。

1 材料与方法

1.1 材料

索拉菲尼(美国 LC Laboratories, 纯度>99%, 批号: SFB-101)。大豆卵磷脂(Lipoid S100, 德国 Lipoid 公司, 批号: 790539-2)。PEG 修饰的胆固 醇(PEG2000-Chol,四川大学生物治疗国家重点实验 室赠送)。RPMI-1640 培养基(美国 Invitrogen 生命 技术公司, 批号: 10099158)。3-(4,5-二甲基噻唑 -2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT, 购自上海源叶生 物科技有限公司,批号: 1325B38)。人结肠直肠 癌细胞 SW480(ATCC, 美国菌种保藏中心)。 TUNEL 试剂盒(Promega, 批号: 11684817910)。 吡咯烷二硫代氨基甲酸(PDTC, Beyotime 生物技 术研究院, 货号 S1808)。原位细胞死亡检测试剂 盒(Roche Diagnostics K.K, 批号: 1388880)。实验 动物: Balb/c 裸鼠, SPF 级, 3, 5~7 周龄, 体质 量为 20~25 g, 购自北京维通利华实验动物技术有 限公司,动物生产许可证号: SCXK(京)2013-0001。

1.2 方法

1.2.1 索拉菲尼脂质体制备 采用薄膜分散法制备索拉菲尼脂质体。将索拉菲尼、PEG 修饰的胆固醇和磷脂以1:1:18 的摩尔比例,加入到装有氯仿和甲醇(1:4)组成的混合溶剂的茄形瓶中溶解,于旋转蒸发仪(37℃)减压去除有机溶剂,物料在茄形瓶内壁形成一层致密的薄膜。然后向茄形

瓶中加入 4 mL 葡萄糖溶液(5%),在 60 ℃水浴条件下水化 30 min,即得索拉菲尼脂质体混悬液。最后将混悬液在 100 W 功率条件下超声 2 min,制得均匀的索拉菲尼脂质体(PEG-Sora-LPs)。采用相同的方法制备空白脂质体(非载药,PEG-LPs)备用。将制备的载药脂质体过 0.45 μm 滤膜去除未包封入脂质体中的索拉菲尼游离药,脂质体的包封率采用反相高效液相色谱仪测定。最后将得到的纯脂质体采用 HEPES 盐溶液(pH 6.8)洗 3 次后于 4 ℃ 冰箱保存,待用。

1.2.2 脂质体的表征 PEG-Sora-LPs 和 PEG-LPs 的粒径和电位采用纳米激光粒度仪(英国马尔文仪器有限公司)测定,即将脂质体与纯化水以 1:40 的比例稀释成具有均一散射强度的混合物后,于粒度仪测定。脂质体的形态学特征采用 SPI4000原子力显微镜(日本 SII NanoTechnology Inc)和 H-600 透射电子显微镜(日本 Hitachi)测定。

采用透析袋扩散法来检测 PEG-Sora-LPs 的体外释放度。取过滤掉游离药物的 PEG-Sora-LPs 0.2 mL,置于 7 支离心管中,并分别补加 0.8 mL 释放介质(含 0.6% Tween-80 的 pH 7.4 磷酸盐缓冲液),置于 37 \mathbb{C} 、100 r·min⁻¹ 水平摇床中进行释放。分别于 0,1,3,6,12,24,48 h 时取出 1 支离心管,4 \mathbb{C} 冷冻离心(13 000 r·min⁻¹)30 min,取上清液采用外标一点法测定释放介质中的 Sora 浓度,待收集其所有数据后,以时间为横坐标,累积释放百分率为纵坐标,绘制释放曲线。

1.2.3 体外细胞毒性评价 将处于对数生长期的人结直肠癌 SW480 细胞接种到 96 孔板中(1 mL,每孔 5 000 个),培养基为 RPMI-1640 培养基(含 10%胎牛血清),置于充有 5%CO₂ 的培养箱中(37 °C)。24 h 后,弃掉孔内培养基,分别加入含有不同浓度的索拉菲尼(0.1~50 μ mol·L⁻¹)游离药物、PEG-Sora-LPs 和 PEG-LPs,同时以未加药物的孔作为阴性对照,各浓度均设 6 孔。48 h 后,弃掉孔内液体,加入 20 μ L MTT 溶液(5 μ mg· μ ml)并在 37 °C条件下继续孵育 4 h。弃掉孔内液体,加入 150 μ L 二甲基亚砜溶解孔内紫色结晶体,将细胞孔 板置于酶标仪 (Multiskan MK3, Thermo Scientific,Waltham,Massachusetts)检测孔内吸光度,波长为 492 nm。通过比较试验组与阴性对照组的吸光值,计算细胞的存活率,数据以 \bar{x} ± s 表示。

试验用 Balb/c 裸鼠饲养在 SPF 级动物房。取对数 生长期的 SW480 肿瘤细胞,用 0.25%浓度的胰酶 消化,用不含 RPMI-1640 的培养基配制成浓度为 $1 \times 10^7 \cdot mL^{-1}$ 的细胞悬液,并于每只裸鼠皮下接种 0.2 mL。将纳入试验的裸鼠按体质量随机分为 4 组,每组12只。待裸鼠上肿瘤生长至一定大小(约 50 mm³)后,尾静脉注射脂质体 PEG-Sora-LPs (Sora 的给药剂量为 20 mg·kg⁻¹)和 PDTC 进行给药治 疗,每2d1次,同时以注射生理盐水组为阴性对 照,测量并记录各组裸鼠体重、肿瘤的尺寸(采用 游标卡尺进行测量,先测量肿瘤的最大径 a,再测 量与最大径线垂直的最长径线 b,单位为 mm,按 公式 $V(mm^3)=a\times b^2/2$ 计算肿瘤体积)。连续给药 14 d 后, 收集各组肿瘤组织, 并分为 2 份, 一份 立即采用含有蛋白酶抑制剂混合液(美国 Santa Cruz)的 RIPA 裂解液(美国 Santa Cruz)进行裂解, 样品离心,将上清液保存在-80℃,供免疫印迹分 析。另一份肿瘤组织先在 PBS(pH 7.4)中用多聚甲 醛固定, 然后用石蜡包埋用于组织切片。动物尸 体的处理由专业的处理公司(大硕生物科技股份有 限公司)完成。

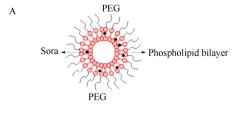
1.2.5 免疫印迹分析 肿瘤组织裂解后样品中的 总蛋白浓度采用 Bradford 蛋白测定试剂盒(美国 Bio-Rad Laboratories)进行检测。蛋白质样品首先在 12%的 SDS-PAGE 凝胶上进行电泳,然后转移到 Millipore 公司的聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,与兔抗体 Bcl-2,Bax,活化的 caspase-3 和抗β-actin 抗体按一定的比例(1:500)在 4 ℃孵育过夜,TBST洗膜 3 次。然后同时滴加入由辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔二级抗体和增强的化学发光照射剂(Immobilon™化学发光 HRP 底物),接着在室温下孵育 1 h,用 TBST 洗膜 3 次。最后将聚偏氟乙烯膜于 Bio-Rad 系统测定β-actin(美国 Santa Cruz),凝胶成像法检测相关蛋白表达情况。

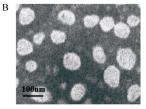
2 结果

2.1 索拉菲尼脂质体表征

PEG-Sora-LPs 的结构示意图见图 1A。疏水的索拉菲尼小分子包封于磷脂双分子层中,PEG 链伸展在双分子层外(能有效阻止脂质体被体内的巨噬细胞吞噬)。本试验最优处方制得的 PEG-Sora-LPs 包封率为 86.13%,载药量为 4.5%。3 次重复制备结果显示,PEG-Sora-LPs 和 PEG-LPs 的粒径、包封率和载药量等均无显著差异。PEG-Sora-LPs 的

原子力显微镜和透射电子显微镜表征结果见图 1B 和 1C,结果表明脂质体呈球形,分布均匀。





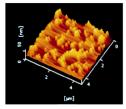


图 1 PEG-Sora-LPs 形态结构表征结果图

A-PEG-Sora-LPs 的结构示意图; B-PEG-Sora-LPs 的透射电子显微镜图; C-PEG-Sora-LPs 的原子力显微镜图。

Fig. 1 The morphological characterization results of PEG-Sora-LPs

A-schematic structural view of PEG-Sora-LPs; B-transmission electron microscope diagram of PEG-Sora-LPs; C-atomic force microscope of PEG-Sora-LPs.

PEG-Sora-LPs 的体外释放结果见图 2。结果显示, PEG-Sora-LPs 在 48 h 时仅释放了约 80%, 提示 Sora 采用 PEG 修饰后的脂质体包载后,呈现出一定的缓释特性。

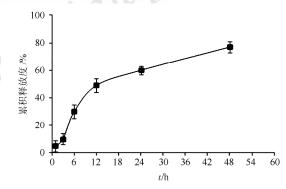


图 2 PEG-Sora-LPs 体外释放结果图

Fig. 2 The *in vitro* release results of PEG-Sora-LPs

2.2 体外细胞毒性试验

PEG-LPs,Sora 和 PEG-Sora-LPs 在 SW480 细胞中的不良反应见图 3。由图可知,阴性对照组和 PEG-LPs 组对细胞基本无毒性,提示 PEG 修饰的脂质体生物相容性良好。游离 Sora 和 PEG-Sora-LPs 对 SW480 的生长均有显著的抑制作用,且后者的作用更强。Sora 和 PEG-Sora-LPs 的半数致死浓度分别为 9.5 μ mol·L⁻¹ 和 7.6 μ mol·L⁻¹,提示游离 Sora 包封入 PEG 修饰的脂质体中后能增强

抗肿瘤活性。

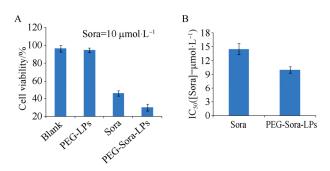


图 3 体外细胞毒性试验结果图

A-SW480 细胞存活率; B-Sora 和 PEG-Sora-LPs 的半数致死浓度。

Fig. 3 *In vitro* cytotoxicity test results A–SW480 cell viability; B–LC₅₀ of Sora and PEG-Sora-LPs.

2.3 脂质体对肿瘤的体内抑制作用

PEG-Sora-LPs 的体内抗肿瘤作用可由记录的 裸鼠体质量和肿瘤体积来评价,结果如图 4~6 和表 1。由图可知,各组裸鼠的体质量在给药期间均无显著变化,提示所给药物的安全性高。随着给药时间的延长,各组肿瘤体积也随之增加,但 PEG-Sora-LPs+PDTC(20 μ mol·L $^{-1}$)组的肿瘤体积增长速度显著低于其他组,其抑瘤率为 82.01%,显著高于其他 3 组。

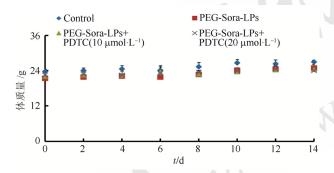


图 4 各组裸鼠体质量随给药时间的变化趋势图

Fig. 4 The weight trend of nude mice in each group varies with the time of administration

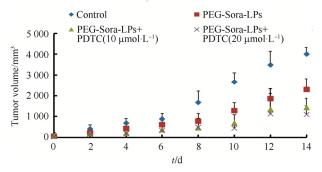


图 5 各组裸鼠肿瘤体积随给药时间的变化趋势图

Fig. 5 The tumor volume trend of nude mice in each group varies with the time of administration

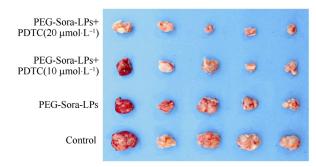


图 6 各组治疗 14 d 后的肿瘤实物图

Fig. 6 The tumor pictures of each group after being treated with 14 d

表1 裸鼠治疗14d后肿瘤质量与抑瘤率结果

Tab. 1 The tumor weight and inhibition rate results of nude after 14 d of treatment

样品分组	肿瘤质量/g	抑瘤率/%
Control	3.48±1.22	/
PEG-Sora-LPs	2.26±0.95	35.06 ± 2.26
PEG-Sora-LPs+PDTC(10 μmol·L ⁻¹)	1.03±0.88	70.52 ± 5.81
PEG-Sora-LPs+PDTC(20 μmol·L ⁻¹)	0.63±0.42	82.01±4.26

2.4 促凋亡和抗凋亡蛋白的表达

Bcl-2,Bax 和 caspase-3 蛋白与细胞的凋亡、坏死和自噬有关,调节所有主要类型的细胞死亡。本试验主要评价 PEG-Sora-LPs 的体内促细胞凋亡活性,同时考察给药前采用不同浓度的 NF- κ B 抑制剂 PDTC 预处理后细胞的凋亡情况,采用免疫印迹检测凋亡相关蛋白的量,结果见图 7。与阴性对照相比,各组脂质体作用后的 Bcl-2 蛋白均下调,Bax 和 caspase-3 蛋白均上调,且 PEG-Sora-LPs + PDTC (20 μ mol·L⁻¹)组的作用最强(P<0.05),表明PDTC 具有较强的促凋亡作用。

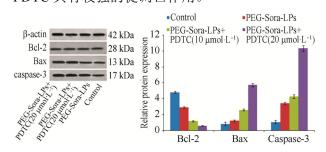


图 7 促凋亡和抗凋亡蛋白的表达结果图

Fig. 7 The results of pro-apoptotic and anti-apoptotic protein expression

2.5 核转录因子 NF-κB 的表达

NF-κB 为一种蛋白质复合物,为真核细胞常见的转录因子,与细胞炎症和凋亡等相关。磷酸化的 NF-κB(p-P65)能转位到细胞核和参与肿瘤细

胞增殖与存活的激活基因中。PDTC 为核转录因子NF-κB的抑制剂,为进一步确认 PDTC 的促凋亡作用机制,采用免疫印迹检测了肿瘤组织中 P65和 p-P65蛋白的表达情况,见图 8。结果显示,加入 PDTC 组的细胞凋亡显著增多,且促凋亡作用随着其浓度的增加而增强(P<0.05),NF-κB的表达(p-P65蛋白)受到抑制;而各组的 P65蛋白几乎无变化,提示 PDTC 促进细胞凋亡可能通过抑制NF-κB的表达来实现。

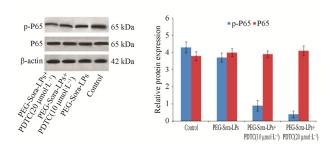


图 8 核转录因子 NF-κB 的表达结果图
Fig. 8 The expression results of nuclear transcription factor

3 讨论

NF-κB

生物体内具有的细胞摄取,外排,胞内运输或在肿瘤组织中的扩散不充分等性质,都将导致活性药物在正常人体组织和病理部位之间没有靶向选择性^[16],从而导致药物疗效降低,某些化疗药物的毒性增加。

最理想的治疗应该是将治疗药物直接运送到 病理部位。PEG 修饰的脂质体作为能增加药物对 癌细胞亲和力和摄取能力的载体,已有广泛研究。 本实验中,游离药物与脂质体的体外细胞毒性试 验结果见图 2A, 平行考察游离药物、空白脂质体 与载药脂质体对细胞的毒性,结果显示空白脂质 体对细胞基本无毒性, 载药脂质体的毒性较游离 药物大。一方面原因可能为,游离药物经脂质体 包封后,其与细胞膜的亲和力增强(磷脂与生物膜 结构相似), 其入胞能力也增强, 从而提高药物在 胞内的聚集,导致更大的毒性;另一方面,脂质 体表面虽有 PEG 链的"隐形"和"空间位阻"作 用,可能会导致毒性降低或减慢,但细胞毒性试 验的检测一般为给药后 48 h, 可能 PEG 的作用就 不明显。再者,脂质体中加入 PEG 修饰后能延长 半衰期, 因而其药效更持久, 对细胞的毒性也更 强。综上,本文的体外细胞试验表明,PEG 修饰 的索拉菲尼脂质体显著增强了细胞对脂质体的摄

取,且与文献报道一致[21]。

体内动物试验结果亦表明,PEG 修饰的索拉菲尼脂质体对裸鼠的正常生长无影响,其体质量在给药期间保持在正常范围(图 4),载药脂质体能显著抑制结肠直肠癌动物的肿瘤生长速度(图 5),能显著促进凋亡细胞的死亡,且在采用 PDTC 预处理后的分组中,其抑制作用更强。脂质体胞饮后进入细胞并释放,且细胞内释放的药物增强了活性药物在细胞内的水平,减慢药物外排,因此,化疗药物的脂质体包裹展现了对肿瘤细胞的双重效应。

F-κB 是一种蛋白质复合物,是真核细胞常见 的转录因子,与细胞炎症和凋亡等相关^[22]。NF-κB 在调节凋亡细胞死亡的过程中发挥着关键的作 用。试验数据表明,在经过 PDTC 预处理的组中, 细胞凋亡显著增加(图 7 和图 8)。然而, NF-κB 的 表达在经过 PDTC 处理后显著被抑制, Bax 蛋白有 增加的趋势,这可能与 PDTC 能选择性地抑制 NF-κB 有关。Bcl-2 和 Bax 都属于 Bcl-2 家族^[23-24], 它们与凋亡和坏死有关。Bcl-2是一种抗凋亡蛋白, 起保护细胞膜的作用。然而, Bax 是促凋亡蛋白, 能诱导线粒体外膜透化,引起 caspase 活化的蛋白 质的释放,能通过阻止 Bcl-2 蛋白而保留其完整 性。Bcl-2 的下调,Bax 的上调和诱导的 caspase-3 活化通过上调细胞内凋亡通道[23, 25],最终导致凋 亡细胞的死亡^[26-27]。PDTC 已被证实能抑制 NF-κB 的活性,改善 SW480 细胞的死亡。此外,细胞的 凋亡与 PDTC 的浓度有关。综上,本试验结果表 明 PDTC 与索拉菲尼脂质体的联合抑制 NF-κB 活 性的机制可能与阻止了 NF-κB 的信号通道有关, 即 Bcl-2 表达的下调与 Bax 和 caspase-3 表达的上调。

综上,本研究结果表明,PEG 修饰的索拉菲尼脂质体载药系统代表了开发更有效的癌症治疗的一种通用框架,采用脂质体包裹活性药物后,增加了其抗肿瘤活性。PDTC 能增强由 PEG 修饰的脂质体所诱导的细胞凋亡,抑制 NF-κB 的活性能增强抗癌药物的抗肿瘤活性。双治疗方案对结肠直肠癌的治疗具有重要的意义,靶向治疗特定组合的成功可能取决于每个靶向治疗的特异性和有效性。

REFERENCES

[1] SPOLVERATO G, EJAZ A, AZAD N, et al. Surgery for

- colorectal liver metastases: the evolution of determining prognosis [J]. World J Gastrointest Oncol, 2013, 5(12): 207-221.
- [2] IBRAHIM N, YU Y, WALSH W R, et al. Molecular targeted therapies for cancer: Sorafenib mono-therapy and its combination with other therapies (Review) [J]. Oncol Rep, 2012, 27(5): 1303-1311.
- [3] DAL LAGO L, D'HONDT V, AWADA A. Selected combination therapy with sorafenib: a review of clinical data and perspectives in advanced solid tumors [J]. Oncologist, 2008, 13(8): 845-858.
- [4] WILHELM S M, ADNANE L, NEWELL P, et al. Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling [J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(10): 3129-3140.
- [5] WILHELM SM, CARTER C, TANG L, et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAFMEKERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis [J]. Cancer Res, 2004, 64(19): 7099-7109.
- [6] CHANG Y J, HSU W H, CHANG C H, et al. Combined therapeutic efficacy of 188Re liposomes and sorafenib in an experimental colorectal cancer liver metastasis model by intrasplenic injection of C26 luc murine colon cancer cells [J]. Mol Clin Oncol, 2014, 2(3): 380-384.
- [7] ESCUDIER B, EISEN T, STADLER W M, et al.TARGET study group: sorafenib in advanced clear cell renal cell carcinoma [J]. New Engl J Med, 2007, 356(2): 125-134.
- [8] LLOVET JM, RICCI S, MAZZAFERRO V, et al. SHARP investigators study group: sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma [J]. New Engl J Med, 2008, 359(4): 378-390.
- [9] SUEN A W, GALOFORO S, MARPLES B, et al. Sorafenib and radiation: a promising combination in colorectal cancer [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2010, 78(1): 213-220.
- [10] KIM Y B, JEUNG H C, JEONG I, et al. Mechanism of enhancement of radiation induced cytotoxicity by sorafenib in colorectal cancer [J]. J Radiat Res, 2013, 54(1): 52-60.
- [11] DI NICOLANTONIO F, MARTINI M, MOLINARI F, et al. Wild type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer [J]. J Clin Oncol, 2008, 26(35): 5705-5712.
- [12] RATAIN M J, EISEN T, STADLER W M, et al. Phase II placebo controlled randomized discontinuation trial of sorafenib in patients with metastatic renal cell carcinoma [J]. J Clin Oncol, 2006, 24(16): 2505-2512.
- [13] WEHLER T C, HAMDI S, MADERER A, et al. Single agent therapy with sorafenib or 5 FU is equally effective in human colorectal cancer xenograft no benefit of combination therapy [J]. Int J Colorect Dis, 2013, 28(3): 385-398.
- [14] KUO Y C, LIN W C, CHIANG I T, et al. Sorafenib sensitizes human colorectal carcinoma to radiation via suppression of NF kappaB expression *in vitro* and *in vivo* [J]. Biomed

- Pharmacother, 2012, 66(1): 12-20.
- [15] MARTINELLI E, TROIANI T, MORGILLO F, et al. Synergistic antitumor activity of sorafenib in combination with epidermal growth factor receptor inhibitors in colorectal and lung cancer cells [J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(20): 4990-5001.
- [16] GALAL K M, KHALED Z, MOURAD A M. Role of cetuximab and sorafenib in treatment of metastatic colorectal cancer [J]. Indian J Cancer, 2011, 48(1): 47-54.
- [17] ALBERTS S R, SARGENT D J, NAIR S, et al. Effect of oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without cetuximab on survival among patients with resected stage III colon cancer: a randomized trial [J]. JAMA, 2012, 307(13): 1383-1393.
- [18] GARCIA-FONCILLAS J, DIAZ-RUBIO E. Progress in metastatic colorectal cancer: growing role of cetuximab to optimize clinical outcome [J]. Clin Transl Oncol, 2010, 12(8): 533-542.
- [19] LI T, ZHANG Q, ZHANG J, et al. Fenofibrate induces apoptosis of triple-negative breast cancer cells via activation of NF-κB pathway [J]. BMC Cancer, 2014(14): 96. Doi: 10.1186/ 1471-2407-14-96.
- [20] ZHANG J, ZHANG D L, JIAO X L, et al. S100A4 regulates migration and invasion in hepatocellular carcinoma HepG2 cells via NF-κB-dependent MMP-9 signal [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2013, 17(17): 2372-2382.
- [21] GABIZON A A. Stealth liposomes and tumor trageting: one step further in the quest for the magic bullet [J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(2): 223-225.
- [22] VAIOPOULOS A G, ATHANASOULA K C H, PAPAVASSILIOU A G. NF-κB in colorectal cancer [J]. J Mol Med, 2013, 91(9): 1029-1037.
- [23] FAN X X, LI N, WU J L, et al. Celastrol induces apotosis in gefitinib-resistant non-small cell lung cancer cells via caspases-dependent pathways and Hsp90 client protein degradation [J]. Molecules, 2014, 19(3): 3508-3522.
- [24] LIAN Y Y, ZHENG Y X, YANG Y Q. Effects of Shengmai Injection on the expression of Bcl-2 and Bax following testicular torsion/detorsion in adolescent rats [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(3): 201-204.
- [25] PARK M Y, JEONG Y J, KANG G C, et al. Nitric oxide-induced apoptosis of human dental pulp cells is mediated by the mitochondria-dependent pathway [J]. Korean J Physiol Pharmacol, 2014, 18(1): 25-32.
- [26] KIM M H, KIM S H, YANG W M. Beneficial effects of astragaloside IV for hair loss via inhibition of Fas/Fas L-mediated apoptotic signaling [J]. PloS One, 2014, 9(3): e92984.
- [27] LIU G, WANG T, SONG J, et al. Effects of apoptosis-related proteins caspase-3, Bax and Bcl-2 on cerebral ischemia rats [J]. Biomed Rep, 2013, 1(6): 861-867.

收稿日期: 2016-05-27