

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.06.003

调控血红素加氧酶-1 诱导 K562A02 细胞增殖、凋亡及耐药机制研究*

柴其翔¹, 韦四喜¹, 王娅婷¹, 方 琴², 王季石^{1△}

(1. 贵阳医学院附属医院血液科; 2. 贵阳医学院附属白云医院药剂科, 贵州贵阳 550004)

[摘要] **目的** 通过血红素加氧酶-1(HO-1)诱导剂 Hemin 及抑制剂 ZNPP IX 调控 HO-1, 并联合阿霉素逆转 K562A02 细胞化疗耐药机制的研究, 为慢性髓系白血病(CML)的逆转耐药提供新的策略。**方法** 培养 K562 及 K562A02 细胞, 采用荧光原位杂交(FISH)法检测 K562A02 细胞中 bcr-abl 融合基因表达。分别用 HO-1 诱导剂 Hemin 及抑制剂 ZNPP IX 调控 HO-1 基因表达联合阿霉素处理 K562A02 细胞后; 流式细胞术检测药物诱导细胞凋亡情况。Western blot 检测耐药相关基因及凋亡基因蛋白表达水平。**结果** K562A02 细胞中 bcr-abl 融合基因阳性细胞占 94%。阿霉素处理细胞后, 随着阿霉素浓度的增加, HO-1 表达下降, 耐药相关基因 MDR1、NF- κ B(P65)、MRP1、Topo II α 、ABCD2 表达亦降低; 用 HO-1 诱导剂 Hemin、抑制剂 ZNPP IX、阿霉素单药分别及联合处理 K562A02 细胞后, 显示 HO-1 高表达后耐药相关基因表达升高, 细胞凋亡率下降。而降低 HO-1 表达, 耐药相关基因表达下降, 细胞凋亡率增加。**结论** HO-1 可作为逆转耐药的靶基因, 可以使 K562A02 对阿霉素重新敏感, 起到增敏效应。

[关键词] 白血病; 髓系; 慢性; bcr-abl 融合基因; 阿霉素; K562; K562A02; 血红素加氧酶-1**[中图分类号]** R552**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)06-0727-04**Study on regulating heme oxygenase-1 for inducing proliferation, apoptosis and drug resistance mechanism of K562A02 cell***Chai Qixiang¹, Wei Sixi¹, Wang Yating¹, Fang Qin², Wang Jishi^{1△}

(1. Department of Hematology, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang, Guizhou, 550004, China;

2. Department of Pharmacy, Affiliated Baiyun Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang, Guizhou, 550004, China)

[Abstract] **Objective** To regulate heme oxygenase-1(HO-1) by the inducer Hemin of HO-1 and inhibitor ZNPP. IX and combined with adriamycin for reversing the chemotherapeutic drug-resistance mechanism of K562A02 cells so as to provide a new strategy for chemoresistance reversion of chronic myeloid leukemia (CML). **Methods** K562 and K562A02 cells were cultured and the expression of bcr-abl fusion gene in K562A02 cells was detected by fluorescence in situ hybridization (FISH). Then the HO-1 gene expression was respectively regulated by Hemin as the HO-1 inducer and ZNPP as the inhibitor and adriamycin was combined for treating K562A02 cells with different concentrations. The apoptosis induced by medication was detected by flow cytometry. The expression levels of drug resistance related gene and apoptosis gene protein were detected by Western blot. **Results** The positive cells of bcr-abl fusion gene in the K562A02 cells accounted for 94%. The HO-1 expression was decreased with the adriamycin concentration increase after treating cells by adriamycin, the expression levels of drug resistance related genes MDR1, NF- κ B(P65), MRP1, Topo II α and ABCD2 were also decreased; after treating K562A02 cells by single drug and combination of Hemin, ZNPP. IX and adriamycin, increasing HO-1 expression elevated the expression of drug resistance related genes and decreased the cellular apoptosis, while reducing HO-1 expression could decrease the expression of drug resistance related genes and increased cellular apoptosis. **Conclusion** HO-1 can act as a target gene for drug resistance reversion and can make K562A02 cells to regain sensitivity to adriamycin, thus plays a sensitivity-increasing effect.

[Key words] leukemia, myelogenous, chronic; bcr-abl fusion gene positive; adriamycin; K562; K562A02; heme oxygenase-1

慢性髓系白血病(chronic myelogenous leukemia, CML)是一种起源于造血干细胞的获得性克隆性疾病。目前为止, 酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI)伊马替尼(imatinib, IM)仍然是治疗 CML 的首选药物。然而, 部分 CML 患者在 IM 治疗后不久复发, 表明耐药已成为影响 IM 治疗 CML 的重要问题。阿霉素, 其作为周期非特异性药物, 对合成 RNA 的抑制作用很强, 可以广泛作用于多种肿瘤, 均可杀灭各种生长周期的肿瘤细胞^[1]。常用于血液肿瘤治疗, 在使用阿霉素治疗血液肿瘤时, 阿霉素通过 P-糖蛋白(P-gp)在细胞内聚集和异常分布, 从而降低药物敏感性, 产生耐药。白血病细胞多药耐药的发生、发展为白血病化疗成功与否的主要障碍。因此, 逆转阿霉素耐药是提高化疗疗效, 延长生存期的手段之一。有

报道, 逆转阿霉素耐药的主要方法有: 多重耐药(MDR)逆转剂如环孢霉素及类似物 SDZPSC833 和抗癌药新剂型等^[2], 联合两种及两种以上药物等增加细胞对药物的敏感性, 都是通过抑制细胞中耐药相关基因 mdr-1 及 P-gp 的表达, 从而达到逆转耐药目的。下调 P-gp 的表达是逆转阿霉素耐药的最直接、最根本的方法^[3-5]。本研究利用血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)诱导剂 Hemin 及抑制剂 ZNPP 调控 HO-1, 研究调控 HO-1 诱导 K562A02 对细胞增殖、凋亡及逆转耐药可能的分子作用机制, 探讨白血病治疗新途径。

1 材料与方

1.1 材料 polybrene 购自 Sigma-Aldrich 公司。人 CML 细胞株 K562、人 CML 耐阿霉素细胞株 K562A02 由贵阳医学院

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81360501)。 作者简介: 柴其翔(1988-), 住院医师, 硕士研究生, 主要从事常见白血病耐药的机制研究。 △ 通讯作者, Tel: 13985704057; E-mail: chaiqixiang@163.com。

附属医院造血干细胞移植中心实验室冻存。阿霉素购自浙江海正药业公司, TRIzol、逆转录试剂盒均为美国 Invitrogen 公司产品。MTT、DMSO 为赛兰博科技有限公司产品。RPMI-1640 培养基、胎牛血清购自杭州四季青公司, Annexin V-FITC/PI 试剂盒(凯基生物)、 β -actin 一抗及二抗购自碧云天生物技术研究所。核因子- κ B(NF- κ B)、拓朴异构酶 II α (Topo II α)、ABCD2、MRP1 及凋亡相关基因 Caspase3、8、9、一抗购自上海晶天生物技术有限公司, HO-1 一抗购自北京博奥森生物科技有限公司, PCR 引物由上海捷瑞生物工程技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人 CML 细胞系 K562 及 K562A02 细胞培养使用含 10% 胎牛血清, 100 U/mL 青霉素及 100 mg/L 链霉素的 RPMI 1640 培养基中。37 °C、5% CO₂、100% 饱和湿度 CO₂ 培养箱培养, 细胞接种密度 (4~5) × 10⁵ 个/mL。使用处于对数生长期的细胞进行实验。

1.2.2 荧光原位杂交(FISH)法检测 K562A02 细胞中 bcr-abl 融合基因 收集待测细胞, PBS 洗涤 2 次并以 0.075 mol/L 氯化钾低渗, 用甲醇: 冰乙酸 (3: 1) 连续固定 3 次, 制片, 计数 1 000 个间期细胞, 记录杂交信号。正常间期细胞将显示随机分散的 2 红 2 绿 4 个杂交信号, 异常则出现 1 红 1 绿 2 融合的杂交信号。

1.2.3 细胞凋亡率检测 取对数生长期的 K562A02 细胞, 调整细胞密度 2 × 10⁵ 个/mL, 接种于 6 孔板, 每孔 1 mL, 同时设置空白对照组、慢病毒上调 HO-1 组、慢病毒沉默 HO-1 组。培养 24 h 后, 用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次, 加入 195 μ L Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞, 加入 5 μ L 膜联蛋白 V-FITC, 轻轻混匀。室温避光孵育 10 min。1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入 190 μ L Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞。加入 10 μ L 碘化丙啶染色液, 轻轻混匀, 冰浴避光放置。随即进行流式细胞仪检测, 每组平行实验 3 次。

1.2.4 Western blot 检测 收集各组细胞, 提取细胞总蛋白。每份样本取 40 μ g 总蛋白, 经 10% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后转移至醋酸纤维素膜上, 经封闭液封闭过夜后加鼠抗人 β -actin 一抗 (1: 500), 兔抗人 HO-1 一抗 (1: 1 000), 兔抗人 MDR1 一抗 (1: 500), 兔抗人 MRP1 一抗 (1: 500), 兔抗人 Topo II α 一抗 (1: 1 000), 鼠抗人 ABCD2 一抗 (1: 800), 鼠抗人 NF- κ B 一抗 (1: 500) 室温摇膜 90 min, 后 TBST 洗膜, 分别加入羊抗兔 IgG 二抗 (1: 1 000) 及羊抗鼠

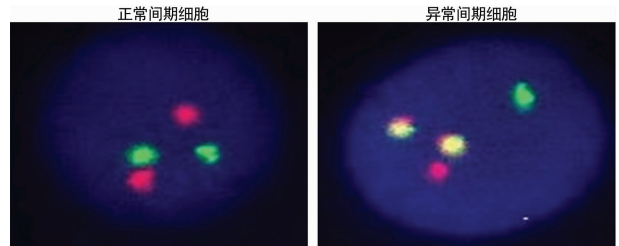
IgG 二抗 (1: 1 000) 室温孵育 60 min, TBST 洗膜后用 ECL 试剂染色后曝光。每个实验至少重复 3 次。

1.2.5 细胞分组及检测 为了证实 HO-1 在阿霉素促进 K562A02 细胞凋亡及逆转耐药中发挥重要的作用, 了解调控 HO-1 表达后对阿霉素诱导细胞凋亡和逆转耐药的影响, 将细胞分为 6 个组, 空白组 (未处理组), Hemin 组 (Hemin 10 μ mol/L 处理), ZnPP IX 组 (ZnPP IX 10 μ mol/L 处理), 阿霉素组 (32 μ g/mL 阿霉素单独处理), 阿霉素 + Hemin 组 (32 μ g/mL 阿霉素 + 10 μ mol/L Hemin 联合处理), 阿霉素 + ZnPP IX 组 (32 μ g/mL 阿霉素 + 10 μ mol/L ZnPP IX 联合处理)。Western blot 检测不同分组处理 K562A02 细胞后 HO-1、Caspase9、Caspase3、Caspase8、MDR1、Topo II α 、MRP1 及 NF- κ B 基因蛋白的表达。

1.3 统计学处理 采用 SPSS15.0 软件进行统计分析, 组间比较采用方差分析及 LSD *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FISH 法检测 K562A02 细胞株 bcr-abl 融合基因表达 K562A02 细胞在 FISH 中表达为典型的 t(9;22) (q34;q11) 杂交信号 (2 融合), bcr-abl 融合基因阳性细胞占细胞总数的 94%, 见图 1。



绿色: ABL; 红色: BCR。

图 1 FISH 双色双融合探针法检测 BCR-ABL 融合基因的荧光图

2.2 流式细胞术检测阿霉素作用 K562A02 细胞后的细胞凋亡率 阿霉素诱导 K562A02 细胞凋亡呈剂量依赖关系, K562A02 细胞凋亡率随着阿霉素浓度的增加而增加, 在浓度为 32 μ g/mL 时, 作用浓度达到峰值。阿霉素 8、16、32、64 μ g/mL 诱导 K562A02 细胞凋亡率分别为 21.09%、30.05%、69.08%、64.65%, 见图 2。

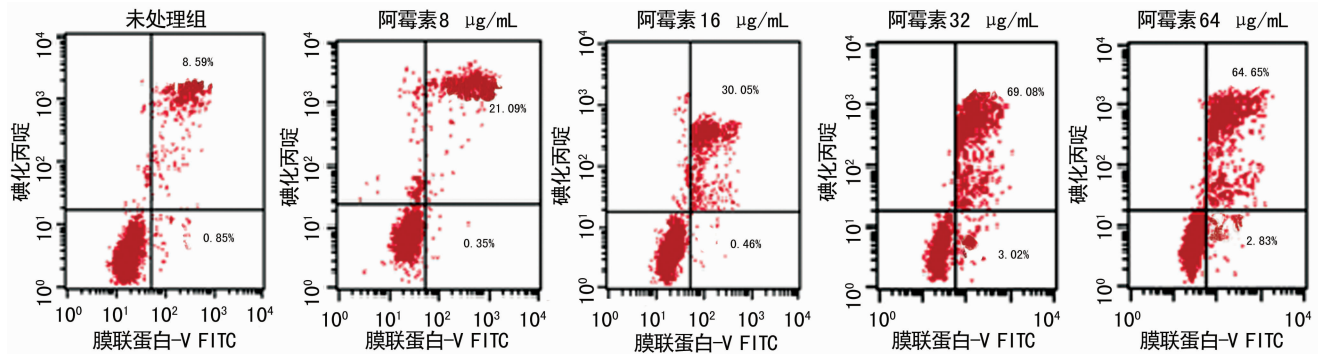


图 2 流式细胞术检测不同浓度阿霉素处理 K562A02 细胞 24 h 后的细胞凋亡率

2.3 Western blot 检测耐药相关基因 MDR1、NF- κ B(P65) 等蛋白的表达 MDR1、NF- κ B(P65)、MRP1、Topo II α 、ABCD2 及 HO-1 蛋白表达随阿霉素浓度增高而减低, 呈剂量依赖关系, 64 μ g/mL 浓度点表达最低。以 β -actin 为内参, MDR1、

NF- κ B(P65)、MRP1、Topo II α 、ABCD2 及 HO-1 各蛋白表达随阿霉素浓度增加而降低, 在 64 μ g/mL 时表达最低, 与未处理组 (0 μ mol/L) 比较, 阿霉素 8、16、32、64 μ g/mL 组蛋白表达降低 ($P < 0.05$), 见图 3。因流式细胞检测凋亡, 其作用浓度同

Realtime-PCR 浓度一致,故联合使用药物时,阿霉素作用浓度设为 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.4 调控 HO-1 表达对阿霉素诱导细胞凋亡及细胞耐药的影响 调控 HO-1 表达后对耐药及凋亡相关基因 Caspase9、Caspase3、Caspase8、MDR1、Topo II α 、MRP1 及 NF- κB 蛋白表达水平的影响,凋亡相关基因蛋白表达水平在阿霉素+Hemin 组表达最低,而阿霉素+ZnPP IX 组表达最高。耐药相关基因表达水平在阿霉素+Hemin 组表达最高,而阿霉素+ZnPP 组表达最低(图 4A)。与空白组(未处理组)比较,在 ZnPP IX 组和阿霉素组,细胞凋亡蛋白均有所增加,阿霉素+ZnPP IX 组中,HO-1 及耐药相关基因蛋白表达水平最低,而凋亡蛋白表达水平最高。组间表达差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 4B、C。

2.5 调控 HO-1 表达后对 K562A02 细胞凋亡率的影响 阿霉素+Hemin 组 K562A02 细胞的凋亡率最低,而阿霉素+ZnPP IX 组的 K562A02 细胞凋亡率最高。空白组、阿霉素组、Hemin 组、ZnPP IX 组、阿霉素+Hemin 组及阿霉素+ZnPP IX 组的凋亡率分别为 (8.71 \pm 1.09)%、(3.65 \pm 1.65)%、(36.78 \pm 0.95)%、(34.83 \pm 1.24)%、(18.83 \pm 1.52)% 及 (68.95 \pm 1.17)%;组间表达差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 5。

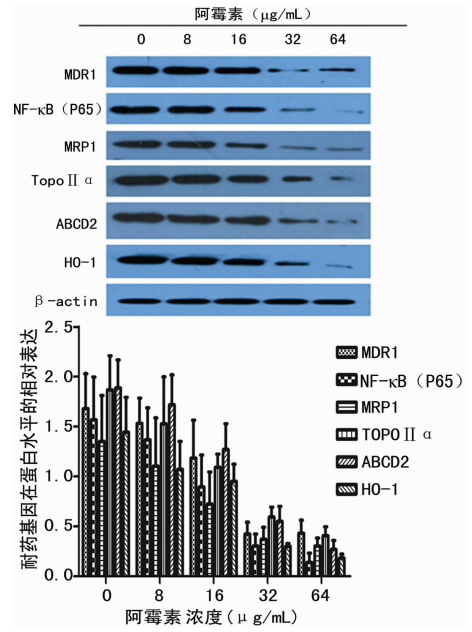
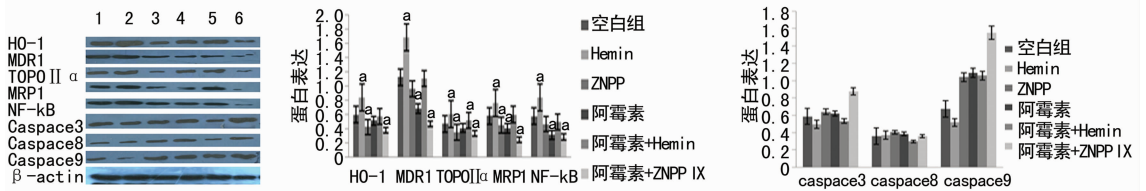


图 3 不同浓度阿霉素处理 K562A02 细胞 24 h 后 MDR1、NF- κB (P65) 等蛋白的表达



A:电泳图;B、C:以 β -actin 为内参,HO-1 及耐药、凋亡相关基因蛋白的相对表达直方图;1:空白组;2:Hemin 组;3:ZnPP 组;4:阿霉素组;5:阿霉素+Hemin 组;6:阿霉素+ZnPP IX 组; a : $P < 0.05$,与空白组比较。

图 4 不同分组处理 K562A02 细胞后 HO-1 及耐药及凋亡基因的蛋白表达水平

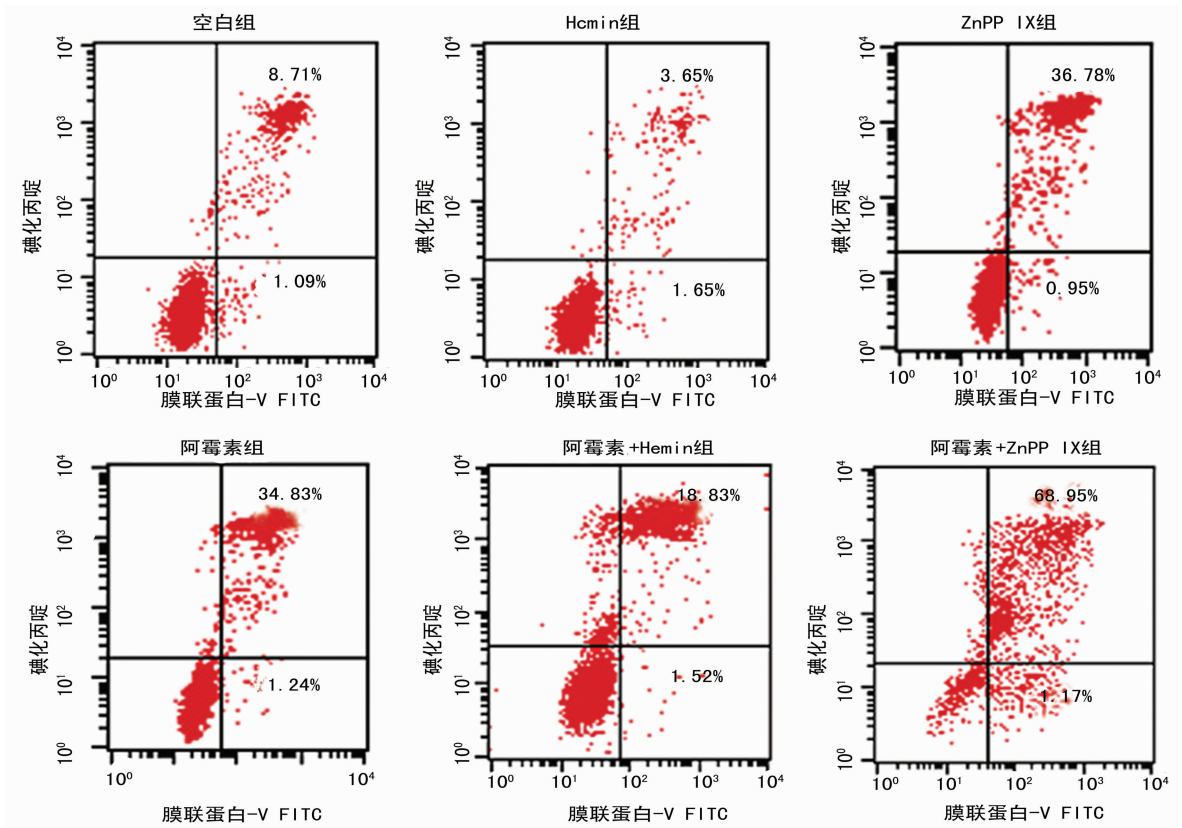


图 5 流式细胞术检测不同分组处理后 K562A02 细胞的凋亡率

3 讨 论

HO-1 作为一种抗氧化防御酶在机体中广泛存在,既往许多实验结果都显示诱导 HO-1 的表达是细胞对抗外界环境刺激的一种防御性的保护反应^[6]。有研究发现多种类型人类肿瘤高表达 HO-1,说明 HO-1 以一种特殊方式改变细胞的生长状态,认为它可能是一种肿瘤细胞生长的促进因子^[7]。仍有一部分患者出现病情复发或伴随较差的预后,其主要原因是白血病患者多药耐药的产生^[8],如何提高白血病患者对化疗的敏感性是白血病治疗的关键所在。

阿霉素属于 Topo II 抑制剂,可通过抑制双链 DNA 的合成来诱导肿瘤细胞的凋亡而发挥抗肿瘤作用。在 CML 治疗中常出现阿霉素耐药情况的发生。因此,在 CML 的治疗中出现耐药是影响获得良好疗效的主要障碍。阿霉素通过 P-gp 在胞内聚集和异常分布,从而降低药物敏感性,产生耐药。逆转阿霉素耐药的方式有联合用药等方式下调细胞 mdr-1 mRNA 和 P-gp 的表达以抑制 P-gp 的功能。P-gp 高表达,可以导致化疗失败或耐药,其机制可能为可使作用药物从细胞内通过泵泵出细胞外,细胞内药物作用浓度变低,药物对细胞的毒性降低^[9]。

本课题使用 HO-1 作为靶基因,通过 Hemin 及 ZNPP 调控 HO-1 表达同时联合阿霉素作用于 k562A02 细胞。其耐药基因同 HO-1 表达呈现正相关性。因阿霉素的耐药逆转可促进细胞增殖抑制细胞凋亡增加血管新生受抑。故予 HO-1 作为逆转阿霉素耐药的分子靶点。随着对 HO-1 在肿瘤发生发展过程中的作用更深入研究,近年来关于 HO-1 与肿瘤耐药的相关研究已有报道,使得 HO-1 成为目前肿瘤耐药研究的热点之一^[10]。并且本实验室前期已证实了 HO-1 的高表达与 CML 的病情进展有关^[11-13]可见,HO-1 在肿瘤组织中多呈高表达与化疗耐药相关。本研究中阿霉素+Hemin 组 K562A02 细胞的凋亡率较阿霉素单独处理组降低,阿霉素+ZnPP IX 组 K562A02 细胞的凋亡率明显高于阿霉素组及阿霉素+Hemin 组。结果说明阿霉素对 K562A02 细胞有促进凋亡作用,但 HO-1 高表达时,这种促进作用会受到抑制,而 HO-1 低表达时,K562 细胞的凋亡率明显升高,说明 HO-1 对 K562A02 细胞具有保护效应。

本课题组关于 HO-1 和白血病耐药的研究也证实急性髓系白血病(acute myelogenous leukemia, AML)患者中 HO-1 表达高于健康者,抑制 HO-1 表达可以增强 AML 细胞对化疗的敏感性^[14]。因此,抑制肿瘤细胞中 HO-1 表达,可能是逆转阿霉素耐药的新思路。多药耐药相关蛋白(multidrug resistance-associated protein, MRP)是 ATP 结合盒(ATP-binding cassette, ABC)转运蛋白主要成员,MRP 通过结合 ATP 泵,将药物泵出细胞外来以降低细胞内药物浓度来介导耐药,其过度表达常常导致肿瘤 MDR 的产生^[15]。由 MDR-1 编码的 P-gp 是产生阿霉素耐药的原因之一。但是在临床治疗中许多患者耐药的发生并不能单一以 MDR-1 的过表达来解释,MDR-1 过度表达常常导致肿瘤多药耐药的产生,在不同细胞株的培养中均发现多种 MRP 蛋白高表达,且与抗肿瘤药物的耐药密切相关^[16]。MRP1 为膜转运蛋白,它产生耐药的机制是由于将抗肿瘤药物泵出细胞膜外所致^[17-18]。目前研究显示,TopoII 在肿瘤的多药耐药中发挥着重要作用,其耐药机制为:(1)活性及酶量下降,表达缺失或基因突变,从而使抗癌药的作用靶点减少或丧失;(2)通过参与其他耐药基因的调控诱导其他耐药基因的表达^[19]。

综上所述,阿霉素可抑制 K562A02 细胞增殖且诱导细胞凋亡。HO-1 基因高表达时,在 CML 耐药细胞凋亡过程中起保护作用,与促进 CML 耐药细胞的生长有关。沉默 HO-1 基因,其耐药基因相应的可通过 MRP1、Topo II α 、ABCD2、MDR1 等信号通路逆转 K562A02 耐药。

参考文献

- [1] Laginha KM, Verwoert S, Charrois GJ, et al. Determination of doxorubicin levels in whole tumor and tumor nuclei in murine breast cancer tumors [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(19 Pt 1):6944-6949.
- [2] Han Z, Hong L, Han Y, et al. Phospho Akt mediates multidrug and Bax [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2007, 26(2):261-268.
- [3] Lavie Y, Harel-Orbital T, Gaffield W, et al. Inhibitory effect of steroidal alkaloids on drug transport and multidrug resistance in human cancer cells [J]. *Anticancer Res*, 2001, 21(2A):1189-1194.
- [4] Naito M, Matsuba Y, Sato S, et al. MS-209, a quinoline-type reversal agent, potentiates antitumor efficacy of docetaxel in multidrug-resistant solid tumor xenograft models [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(2):582-588.
- [5] Cuvier C, Treupel R, Millot JM, et al. Doxo nanospheres bypass tumor cell multidrug [J]. *Biochem Pharmacol*, 1992, 44(3):509-517.
- [6] Hanselmann C, Mauch C, Werner S. Haem oxygenase-1: a novel player in cutaneous wound repair and psoriasis? [J]. *Biochem J*, 2001, 353(3):459-466.
- [7] Otterbein LE, Soares MP, Yamashita K, et al. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme [J]. *Trends Immunol*, 2003, 24(8):449-455.
- [8] Koistinen P, Rätty R, Itälä M, et al. Long-term outcome of intensive chemotherapy for adults with de novo acute myeloid leukaemia (AML): the nationwide AML-92 study by the Finnish Leukaemia Group [J]. *Eur J Haematol*, 2007, 78(6):477-486.
- [9] Wong HL, Bendayan R, Rauth AM, et al. Simultaneous delivery of doxorubicin and GG918 (Elacridar) by new polymer-lipid hybrid nanoparticles (PLN) for enhanced treatment of multidrug-resistant breast cancer [J]. *J Control Release*, 2006, 116(3):275-284.
- [10] Yu HM, Wang TC. Mechanism of cisplatin resistance in human urothelial carcinoma cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50(5):1226-1237.
- [11] 王季石, 杨畅, 方琴, 等. 体外诱导 K562 细胞尼洛替尼耐药及其机制的初步探讨 [J]. *中华血液学杂志*, 2012, 33(11):906-910.
- [12] 陈焜, 王季石, 秦东, 等. 逆转录病毒介导的 HO-1 基因在尼洛替尼诱导 K562/A02 耐药细胞凋亡中的作用 [J]. *中华血液学杂志*, 2012, 33(5):383-387.
- [13] 王季石, 柴柏胜, 方琴, 等. HO-1 基因表达对伊马替尼耐药的慢性髓系白血病细胞增殖的影响 [J]. *中华血液学杂志*, 2011, 32(6):388-391.
- [14] Ma D, Fang Q, Li Y, et al. Crucial role (下转第 733 页)

减少肠源性内毒素的吸收,减轻白细胞对组织的损伤从而阻止急性胰腺炎时 SIRS 的发展,减轻多器官功能的损害^[12-13]。丹参注射液是一种应用非常广泛的中药制剂,具有活血化瘀、抗炎、防止钙超载、清除氧自由基、改善微循环、提高超氧化物歧化酶活性、降低丙二醛水平、保护胰腺血管内皮细胞、稳定细胞膜、减少胰酶释放、减少磷脂酶 A 的激活,减轻胰腺病变的作用^[14-15]。

本研究发现生长抑素能有效治疗 SAP,联用丹参或乌司他丁能缩短患者腹痛和腹胀消失时间、心率和呼吸恢复正常时间、血淀粉酶和血糖恢复正常时间及住院时间,并提高有效率,乌司他丁的疗效优于丹参,乌司他丁加丹参能进一步提高疗效,且 3 种药物不良反应发生率低。由于丹参价格低廉,应用广泛,在基层医院能普及,联用后缩短了住院时间而未增加患者费用,适用于各种患者,乌司他丁价格较高,联用后增加了患者费用,适用于经济情况较好的患者。

综上所述,生长抑素能有效地治疗 SAP,与乌司他丁或丹参联用能提高疗效,但乌司他丁的疗效优于丹参,乌司他丁与丹参联用能进一步提高疗效。

参考文献

[1] Zerem E. Treatment of severe acute pancreatitis and its complications[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(38): 13879-13892.

[2] Lankisch PG, Apte M, Banks PA. Acute pancreatitis[J]. *Lancet*, 2015, 6736(14): 60649-60658.

[3] Chen P, Hu B, Tan Q, et al. Role of neurocrine somatostatin on sphincter of Oddi contractility and intestinal ischemia reperfusion-induced acute pancreatitis in macaques [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2010, 22(8): 935-941.

[4] Andriulli A, Leandro G, Clemente R, et al. Meta-analysis of somatostatin, octreotide and gabexate mesilate in the therapy of acute pancreatitis[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 1998, 12(3): 237-245.

[5] Xiping Z, Yan P, Xinmei H, et al. Effects of dexamethasone and *Salvia miltiorrhiza* on the small intestine and immune organs of rats with severe acute pancreatitis[J]. *Inflammation*, 2010, 33(4): 259-266.

[6] Lee MF, Chang CW, Wang NM, et al. Serine protease inhibitor gabexate mesilate attenuates american cockroach

induced bronchial damage and inflammatory cytokine release[J]. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 2014, 24(5): 338-345.

[7] 王兴鹏,李兆申,袁耀宗,等. 中国急性胰腺炎诊治指南(2013,上海)[J]. *中国实用内科杂志*, 2013, 33(7): 530-535.

[8] Talukdar R, Swaroop Vege S. Early management of severe acute pancreatitis[J]. *Curr Gastroenterol Rep*, 2011, 13(2): 123-130.

[9] Harper SJ, Cheslyn-Curtis S. Acute pancreatitis[J]. *Ann Clin Biochem*, 2011, 48(Pt 1): 23-37.

[10] Li J, Wang R, Tang C. Somatostatin and octreotide on the treatment of acute pancreatitis-basic and clinical studies for three decades [J]. *Curr Pharm Des*, 2011, 17(16): 1594-1601.

[11] Abraham P, Rodrigues J, Moulick N, et al. Efficacy and safety of intravenous ulinastatin versus placebo along with standard supportive care in subjects with mild or severe acute pancreatitis [J]. *J Assoc Physicians India*, 2013, 61(8): 535-538.

[12] Hou J, Zhu MW, He XW, et al. Effect of hyperbaric oxygen and ulinastatin on plasma endotoxin, soluble CD14, endotoxin-neutralizing capacity and cytokines in acute necrotizing pancreatitis[J]. *Can J Surg*, 2010, 53(4): 241-245.

[13] Karnad DR, Bhadade R, Verma PK, et al. Intravenous administration of ulinastatin (human urinary trypsin inhibitor) in severe sepsis: a multicenter randomized controlled study[J]. *Intensive Care Med*, 2014, 40(6): 830-838.

[14] Zhang XP, Jiang J, Yu YP, et al. Effect of Danshen on apoptosis and NF- κ B protein expression of the intestinal mucosa of rats with severe acute pancreatitis or obstructive jaundice[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2010, 9(5): 537-546.

[15] Xun LL, George CY. Studies on cardiovascular actions of *salvia miltiorrhiza*[J]. *Am J Chin Med*, 2012, 14(1/2): 26-32.

(收稿日期:2015-08-21 修回日期:2015-11-07)

(上接第 730 页)

of heme oxygenase-1 in the sensitivity of acute myeloid leukemia cell line Kasumi-1 to ursolic acid[J]. *Anticancer Drugs*, 2014, 25(4): 406-414.

[15] Daood M, Tsai C, Ahdab-Barmada M, et al. ABC transporter (P-gp/ABCB1, MRP1/ABCC1, BCRP/ABCG2) expression in the developing human CNS[J]. *Neuropediatrics*, 2008, 39(4): 211-218.

[16] Kläs J, Wolburg H, Terasaki T, et al. Characterization of immortalized choroid plexus epithelial cell lines for studies of transport processes across the blood-cerebrospinal fluid barrier[J]. *Cerebrospinal Fluid Research*, 2010, 7(1)

11.

[17] Kruh GD, Belinsky MG. The MRP family of drug efflux pumps[J]. *Oncogene*, 2003, 22(47): 7537-7552.

[18] Wei XL, Ni H, Wang QS, et al. Impact of STAT4 gene silencing on the expression profile of proteins in EL-4 cells [J]. *Chin Sci Bull*, 2009, 54(18): 3265-3270.

[19] Asano T, Zwelling LA, An T, et al. Effect of transfection of a *Drosophila* topoisomerase II gene into a human brain tumour cell line intrinsically resistant to etoposide[J]. *Br J Cancer*, 1996, 73(11): 1373-1380.

(收稿日期:2015-07-19 修回日期:2015-10-24)