

· 基础研究 ·

毛蕊花苷通过上调 Max 蛋白抑制口腔鳞癌细胞的迁移和侵袭

袁毅¹, 韩筱¹, 薛明飞², 姬沐原², 束为^{2*}¹南京医科大学附属口腔医院口腔颌面外科, 江苏 南京 210029; ²江苏省中医院口腔科, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的:探讨毛蕊花苷对口腔鳞癌细胞迁移和侵袭的影响及其机制。方法:质谱分析空白对照组及毛蕊花苷处理组口腔鳞癌细胞 HN4 中蛋白的表达谱,筛选毛蕊花苷处理后丰度高且表达显著增加的蛋白,用 Western blot 验证质谱分析的结果,并在 HN4 细胞中运用 shRNA 干扰关键蛋白的表达,分析毛蕊花苷处理对 HN4 细胞迁移和侵袭的影响。结果:质谱分析结果显示经毛蕊花苷处理后,HN4 细胞中 Max、TMPRSS11F、ROBO4 和 AP4E1 等 18 种蛋白表达显著升高(变化倍数>1.5),对其中改变最明显的 Max 蛋白进行 Western blot 检测,结果与质谱芯片结果一致;shRNA 干扰 HN4 细胞中 Max 的表达,qRT-PCR 和 Western blot 检测发现 HN4 细胞中 Max 的表达明显下调,运用毛蕊花苷刺激 HN4 细胞,发现毛蕊花苷可显著抑制 HN4 细胞的迁移和侵袭。然而,当敲减 Max 蛋白后,毛蕊花苷抑制 HN4 细胞迁移和侵袭的能力显著减弱。结论:毛蕊花苷可能通过增强口腔鳞癌细胞中 Max 的表达抑制口腔鳞癌细胞的迁移和侵袭。

[关键词] 口腔鳞癌;毛蕊花苷;迁移;侵袭;Max 蛋白**[中图分类号]** R739.85**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2019)01-032-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20190106

Verbascoside inhibits migration and invasion of oral squamous cell carcinoma cells by up-regulating Max protein

Yuan Yi¹, Han Xiao¹, Xue Mingfei², Ji Muyuan², Shu Wei^{2*}¹Oral and Maxillofacial Surgery, the Affiliated Stomatological Hospital of NMU, Nanjing 210029; ²Department of Stomatology, Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To analyze the effect and mechanism of verbascoside on the migration and invasion of oral squamous cell carcinoma. **Methods:** The expression profiles of HN4 protein in oral squamous cell carcinoma cells treated with verbascoside and the blank control group were analyzed by mass spectrometry. Proteins with high abundance and significantly increased expression after verbascoside treatment were screened. The results of mass spectrometry were verified by Western blotting. The expression of key proteins in HN4 cells was interfered by shRNA to analyze verbascoside. Effects of verbascoside on migration and invasion of squamous cell carcinoma HN4 cells were analyzed. **Results:** The results of mass spectrometry analysis showed that 18 proteins, including Max, MPRSS11F, ROBO4, AP4E1, and etc, was significantly increased in oral squamous cell carcinoma HN4 cells after treatment with verbascoside (fold change>1.5). The Max proteins with the most obvious changes were detected by Western blotting. The results of Western blotting were consistent with those of mass spectrometry microarray. shRNA interfered with the expression of Max in oral squamous cell carcinoma HN4 cells. qRT-PCR and Western blotting showed that the expression of Max in HN4 cells was significantly down-regulated. Further stimulation of HN4 cells with verbascoside showed that the migration and invasion of HN4 cells were significantly inhibited. However, the ability of verbascoside to inhibit the migration and invasion of HN4 cells decreased significantly after knockdown of Max protein. **Conclusion:** It is possible that verbascoside inhibits the migration and invasion of oral squamous cell carcinoma cells by enhancing the expression of Max in oral squamous cell carcinoma cells.

[Key words] oral squamous cell carcinoma; verbascoside; migration; invasion; Max protein

[Acta Univ Med Nanjing, 2019, 39(01):032-036, 093]

[基金项目] 江苏省自然科学基金(BK20151562);南京市科技计划项目(201715016);江苏省中医院创新发展基金(Y2018CX19);东南大学-南京医科大学合作研究项目(2242018K3DN18)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: sw2029@sina.com

口腔癌是临床常见的头颈部恶性肿瘤之一,每年全球新增患者高达10万例。口腔癌主要以口腔鳞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)为主^[1-2],恶性程度较高,目前临床上主要采用以手术为主、放化疗为辅的综合治疗,患者5年生存率仅为50%^[3]。因此,口腔鳞癌的治疗方法及时效评价研究对于口腔鳞癌的临床治疗具有重要意义。由于传统治疗方法或手段存在一些不足或明显的不良反应,其在临床上的基础应用受到限制。因此,寻找一些新的药物和治疗策略是目前口腔医学领域的热点。从天然中草药中分离具有药理功能的化合物或生物碱,由于其毒性低,安全有效等特点,已成为抗肿瘤研究的一个重要方向。

毛蕊花苷(verbascoside, VB),又名麦角甾苷、毛蕊花糖苷,广泛存在于马鞭草科、唇形科、玄参科、木樨科等植物中^[4]。VB归属苯乙醇苷类,目前多从肉苁蓉中提取出来。由于其生物活性强、不良反应小且来源广泛,受到国内外众多研究者的重视。已有文献报道VB对治疗糖尿病肾病^[4]、顺铂诱导的卵巢损害^[5]、抑郁症^[6]、亚急性脑损伤^[7]以及阿尔茨海默病^[8]等有显著功效。重要的是,VB还具有增强记忆、保护神经、抗氧化、抗衰老及抗肿瘤等药理作用^[9]。然而,目前关于VB抗肿瘤的作用机制仍不清楚,本课题组前期研究发现VB可有效抑制人口腔鳞癌细胞的迁移和侵袭^[10]。本实验通过研究VB处理的口腔鳞癌细胞中关键蛋白的表达,探讨VB抑制口腔鳞癌细胞迁移和侵袭的可能机制,为阐明VB的抗肿瘤作用机制提供理论和实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

人口腔鳞癌细胞株HN4(上海交通大学陈万涛教授惠赠),在37℃、5% CO₂条件下,用含有10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 μg/mL链霉素的高糖DMEM/F12培养基(pH 6.5)常规培养。

VB(中国科学院西北高原生物研究所青藏高原生物资源青海重点实验室赵晓辉副研究员惠赠),纯度为95%以上。DMEM/F12培养基、胎牛血清FBS和0.25% Trypsin-EDTA(Gibco公司,美国)、PBS和青/链霉素(HyClone公司,美国),TRIzol(Invitrogen公司,美国),DEPC水(Amersco公司,美国),Primecript RT reagent Kit和SYBR Premix Ex Taq定量PCR酶混合物试剂盒(大连宝生物),Max/GAPDH抗体(Abcam公司,英国),结晶紫染色液和BCA蛋

白定量试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),Matrigel基质胶(BD公司,美国),SDS-PAGE凝胶配制试剂盒(北京LEAGENE),台盼蓝(Life公司,美国),含有EGFP标签的对照NC shRNA和含有EGFP标签的Max shRNA(针对的靶序列5'-CAUGGAAG-AUGCAAGUAAA-3',Sigma公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 质谱分析VB处理后HN4细胞中相关蛋白的表达变化

取对数生长期的HN4细胞进行计数,配制成2×10⁵个/mL细胞悬液,每孔2 mL接种于6孔板,于培养箱孵育24 h后,弃上清。用50 μmol/L VB刺激细胞24 h,提取蛋白,纯化,进行蛋白变性,加二硫苏糖醇断裂蛋白中的二硫键,加吡啶乙烷烷基化保护二硫键,酶切,上样,点靶进行质谱分析。具体检测参数为:离子源:电喷雾离子化源;正离子方式检测;电喷雾电压为5 500 V;温度550℃;源内气体1:氮气压力40 psi(1 psi=6.895 kPa);气体2:氮气压力60 psi;气帘气:氮气压力25 psi;DP:60 eV;CE:20 eV。通过比较受试者工作特征(ROC)曲线,以未加VB处理的HN4细胞为对照,分析VB处理组中差异表达的蛋白。

1.2.2 shRNA干扰实验

将细胞分别接种于6 cm培养皿及96孔板中,在37℃、5% CO₂的培液箱中培养。待细胞处于对数生长时,更换为无血清培养液,转染具体步骤为:在1.5 mL EP管中制备以下2种悬液(所述剂量为转染每孔细胞所用量),A液:用不含血清的培养液稀释1 μg NC shRNA(sh-NC组)或Max shRNA(sh-Max组),B液:用不含血清的培养液稀释2 μL脂质体;分别将A液与B液轻弹混匀,室温静置5 min;将B液与A液混合,室温静置10~15 min;把A/B液的混合液缓缓加入到细胞中;摇匀,于37℃培养箱孵育4~6 h,弃掉无血清的转染液,加入完全培养液继续培养,48 h后用荧光显微镜观察细胞的转染效率,并用CCK8分析转染后的细胞活力。同时收取细胞,提取细胞蛋白或者RNA,验证Max的敲减效率,其中设立不加shRNA处理的空白对照组(Con)。

1.2.3 实时荧光定量PCR

TRIzol法提取各组细胞的总RNA,按照试剂盒说明书合成cDNA。取1 μg cDNA为模板,按照试剂盒说明书进行体外扩增,引物由上海吉玛生物公司合成,引物序列为:Max上游引物:5'-CCTGGGCCG-TAGGAAATGAG-3';下游引物:5'-TAGAGCAGGC-

GTCCTCCAG-3'。内参GAPDH上游引物:5'-CCTC-GTCTCATAGACAAGATGGT-3';下游引物:5'-GGG-TAGAGTCATACTGGAACATG-3'。数据采用2^{-ΔCT}相对定量法进行分析。

1.2.4 免疫印迹(Western blot)

将HN4细胞接种于培养皿中,分别用NC shRNA(sh-NC组)或Max shRNA(sh-MAX组)转染细胞,或用VB刺激。24 h后细胞用PBS冲洗2遍,加入500 μL裂解液,冰上裂解20 min,使用超声破碎仪(30%强度)超声10 s。4℃、12 000 r/min离心10 min后,取上清于EP管,与蛋白上样缓冲液以4:1混合,煮沸5 min,每孔上样40 μg,行SDS-PAGE电泳后,湿转法将蛋白转至PVDF膜上,300 mA恒流转45 min。4%的BSA封闭60 min,4℃过夜孵育一抗(anti-Max、anti-GAPDH,稀释比例为1:1 000)。TBST洗3次,每次10 min,室温孵育二抗(稀释比例为1:2 000)1 h,随后TBST洗3次,每次10 min,加入发光底物进行曝光并拍照。

1.2.5 划痕实验检测细胞迁移

将HN4细胞接种于6孔板中,每孔约1×10⁶个细胞。待细胞贴壁后,转染Max shRNA,随后用VB刺激细胞,24 h后将细胞消化、离心,PBS清洗后重悬。细胞5×10⁵个/孔加入6孔板中,培养过夜使细胞铺满板底;次日用枪头划痕,用PBS洗细胞3次,

去除划下的细胞,加入无血清培养基37℃、5% CO₂培养箱培养。24 h后取样,拍照。

1.2.6 Transwell 实验检测细胞侵袭

HN4细胞根据1.2.5方法转染shRNA后,取100 μL细胞悬液(约1×10⁵个细胞)加入Transwell小室,小室底部加700 μL含20% FBS的培养基,放置37℃、5% CO₂的恒温培养箱孵育24 h,取出小室洗涤,多聚甲醛固定,结晶紫染色,擦去上层细胞,倒置显微镜观察拍照。

1.3 统计学方法

采用SPSS17.0软件对所有数据进行统计学分析,计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间比较采用t检验,多组间比较采用方差分析,两两比较采用LSD-t, P ≤ 0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VB处理前后HN4细胞中蛋白表达谱的变化

质谱分析VB组HN4细胞中蛋白表达的变化,筛选出Max蛋白的丰度高且表达显著增加,结果见表1所示。

2.2 VB对HN4细胞Max mRNA和蛋白表达的影响

为了验证质谱分析结果,运用实时荧光定量PCR和Western blot分析VB处理的HN4细胞,结果见图1所示,同对照组相比,VB处理后HN4细胞中Max

表1 毛蕊花苷处理后HN4细胞中表达差异的蛋白

Table 1 The expressions of proteins in verbascoside-treated HN4 cells

蛋白质ID	基因名	描述	变化倍数	P值
G3V302	Max	Protein Max	2.23	0.030
Q6ZWK6	TMPRSS11F	Transmembrane protease serine 11F	2.19	0.020
B4DYV8	ROBO4	Roundabout homolog 4	2.18	0.040
H0YK95	AP4E1	AP-4 complex subunit epsilon-1	2.14	0.049
O75530-3	EED	Isoform 3 of Polycomb protein EED	1.99	0.020
C9J2G3	OXSM	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase, mitochondrial (Fragment)	1.95	0.040
Q86Y13	DZIP3	E3 ubiquitin-protein ligase DZIP3	1.94	<0.001
Q92828	CORO2A	Coronin-2A	1.91	0.026
P11172-2	UMPS	Isoform 2 of Uridine 5'-monophosphate synthase	1.88	<0.001
H0Y8S8	UBA6	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 6 (Fragment)	1.82	0.007
Q9NZP5	OR5AC2	Olfactory receptor 5AC2	1.80	<0.001
A0A1B0GVD1		Uncharacterized protein	1.76	0.009
Q8IV76-2	PASD1	Isoform 2 of Circadian clock protein PASD1	1.61	0.020
P41208	CETN2	Centrin-2	1.61	0.030
H0YEN0	RIC8A	Synembryn-A (Fragment)	1.58	0.020
P48775	TDO2	Tryptophan 2,3-dioxygenase	1.56	0.040
H7C4B7	DHCR24	Delta(24)-sterol reductase (Fragment)	1.54	0.002
Q8IY33-5	MICALL2	Isoform 5 of MICAL-like protein 2	1.50	0.020

mRNA和蛋白水平都有明显升高。

2.3 干扰Max明显抑制HN4细胞中Max mRNA和蛋白的表达

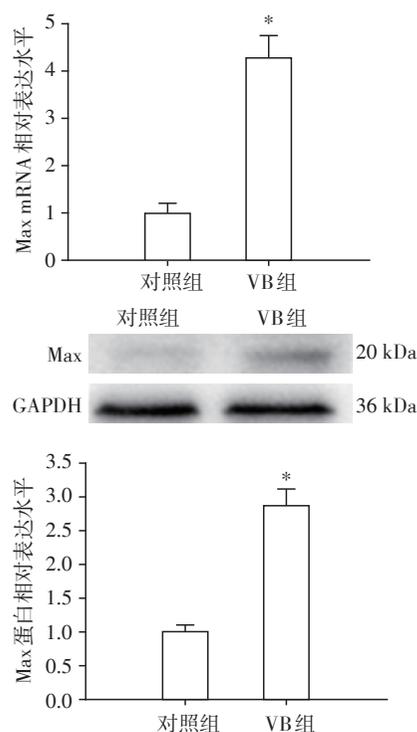
用带绿色荧光蛋白(GFP)的Max shRNA(sh-Max)转染HN4细胞,48 h后观察,发现约70%的细胞被绿色荧光标记(图2A),说明该细胞有较高的转染效率。同时,对转染后的细胞存活率进行检测,发现同空白对照组(Con)相比,无论是转染了阴性对照质粒sh-NC,还是转染了sh-Max,细胞的活力都未受到明显影响(图2B)。接着分析了细胞中Max的mRNA和蛋白水平。结果显示,sh-Max处理的细胞Max mRNA(图2C)和蛋白(图2D)水平都显著降低。

2.4 干扰Max明显减弱VB对HN4细胞迁移和侵袭的抑制作用

为了分析VB是否通过调控Max表达影响HN4细胞的迁移和侵袭,将HN4细胞中Max蛋白敲减后,再用VB刺激细胞,进一步分析细胞的迁移和侵袭。将HN4细胞分为空白对照组、VB组、sh-NC+VB组(转染sh-NC后用VB刺激细胞)及sh-Max+VB组(转染sh-Max后用VB刺激细胞)。结果见图3所示,VB可显著抑制HN4细胞的迁移(图3A)和侵袭(图3B),且Max的敲减明显减弱了VB对HN4细胞迁移(图3A)和侵袭(图3B)的抑制作用。

3 讨论

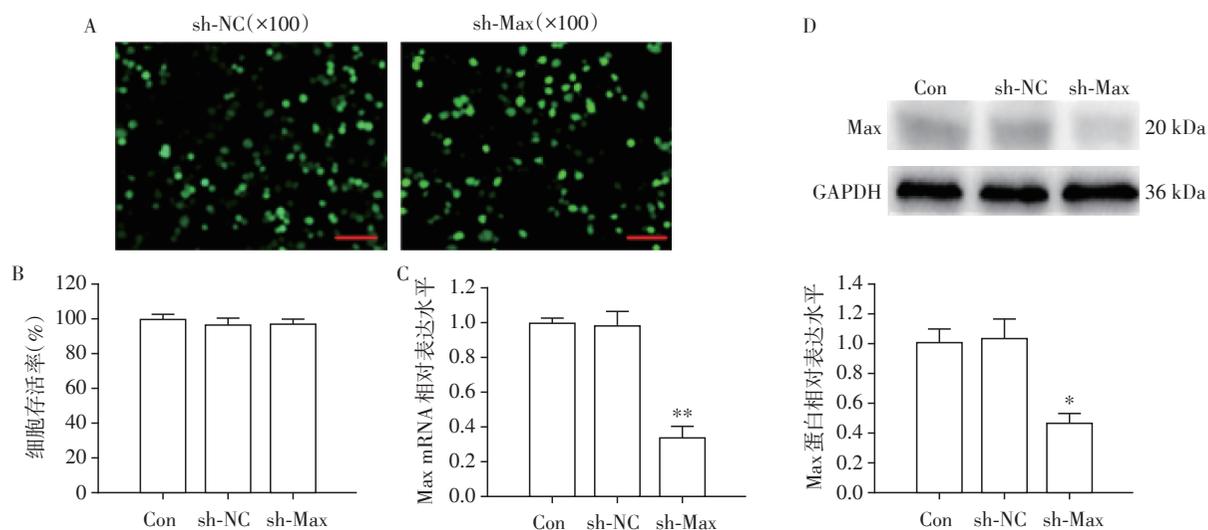
口腔鳞癌是世界第6大常见的恶性肿瘤^[11]。在



与对照组比较,* $P < 0.01$ ($n=3$)。
图1 实时荧光定量PCR和Western blot检测Max mRNA和蛋白表达

Figure 1 Expressions of Max detected by qRT-PCR and Western blot

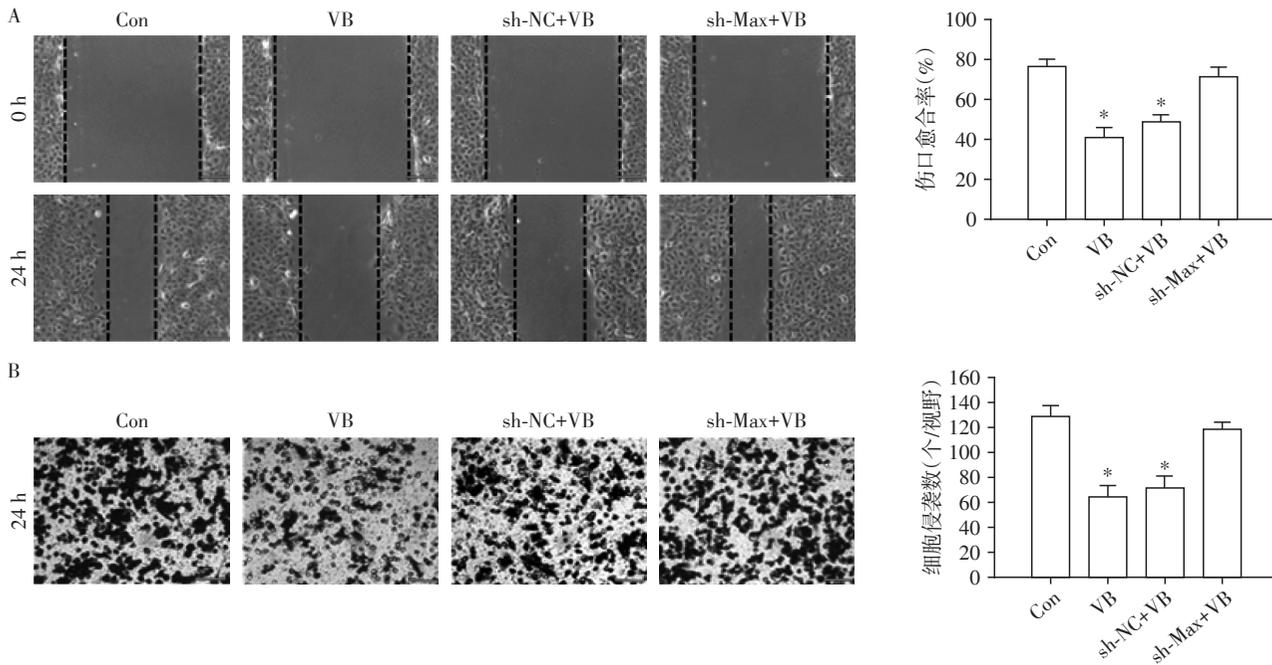
目前的治疗方法中,手术联合化疗仍是主要的治疗手段^[12]。顺铂是联合放疗治疗口腔鳞癌最常用的化疗药物^[13]。然而,顺铂具有严重的不良反应,



A:shRNA的转染效率观察;B:shRNA转染后的细胞存活率;C:Real-time PCR检测Max mRNA的表达水平;D:Western blot检测Max蛋白表达水平。与Con比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ ($n=3$)。

图2 细胞转染效率及干扰Max后细胞存活率、Max mRNA和蛋白的表达

Figure 2 Transfection efficiency and survival rate of HN4 cells after knocking out Max and the expression of Max mRNA and protein



A: 划痕实验检测 HN4 细胞迁移情况; B: Transwell 实验检测 HN4 细胞侵袭情况; 与 Con 比较, $P < 0.05 (n=3)$ 。

图3 干扰 Max 对 VB 处理的 HN4 细胞迁移和侵袭的影响 (×100)

Figure 3 Effects of VB on migratory and invasive capacities in HN6 cells after knocking out Max (×100)

如肾毒性^[14]。越来越多的证据表明,VB 可以作为一种潜在的抗癌药物。然而,VB 抗口腔鳞癌的功能机制尚不清楚。在本研究中,我们发现 VB 可能通过增强 Max 蛋白表达有效降低口腔鳞癌细胞 HN4 的迁移和侵袭。

VB 作为自然界双子叶植物中具有丰富生理活性且普遍存在的重要苯乙醇苷类物质之一,受到研究者广泛关注。研究发现,VB 易溶于乙醇、甲醇、醋酸乙酯等有机溶剂,在酸性条件下具有良好的稳定性^[15]。本研究使用的 HN4 鳞癌细胞培养液 DMEM/F12 的 pH 为 6.5,从而有助于 VB 稳定并发挥功能。

Max 蛋白广泛存在于各种细胞中,研究发现 Max 蛋白可能是一个新的抑癌基因,直接参与细胞生长与分化的调控。并且,Max 蛋白还可与其他蛋白(如 MYC)形成二聚体,调控细胞的生长、分化^[16]。为了进一步探讨 VB 调控口腔鳞癌迁移、侵袭的可能机制,本实验采用质谱分析了 VB 处理的 HN4 细胞中表达差异的蛋白,结果发现同对照组相比,VB 处理后,HN4 细胞中表达显著上调(变化倍数>1.5)的蛋白有 18 个,其中 Max 的表达上调最明显,为此选择 Max 蛋白为研究的目的蛋白。随后,为了验证质谱分析结果,又用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测了 VB 处理的 HN4 细胞中 Max 蛋白的表达,发现 VB 可有效增强 HN4 细胞中 Max mRNA 和蛋白表

达。重要的是,阻断 Max 的表达后可明显减弱 VB 对 HN4 细胞迁移和侵袭的抑制作用。从而提示,VB 可能是通过增强 Max 本身的表达或增强 Max 与其他蛋白的相互作用,减弱 HN4 细胞促迁移和侵袭相关基因的表达,进而抑制 HN4 细胞的迁移和侵袭,为进一步将 VB 开发为治疗口腔鳞癌的新药提供重要依据。

[参考文献]

[1] 张凯亮,焦康礼,朱玉娟,等. 大黄素抑制人口腔鳞癌细胞 Tca8113 增殖及细胞周期进程的实验研究[J]. 南方医科大学学报,2015,35(5):665-670

[2] 赵莉琳,刘 阳. PCNA 对口腔鳞癌细胞凋亡和增殖的影响[J]. 解放军医学杂志,2014,39(10):795-799

[3] da Silva SD, Ferlito A, Takes RP, et al. Advances and applications of oral cancer basic research [J]. Oral Oncol, 2011,47(9):783-791

[4] 郑 帅,杨 敏. 毛蕊花糖苷治疗糖尿病肾病的研究进展[J]. 医学综述,2018,24(16):3232-3241

[5] 邓锦芳,熊 英,王 淳,等. 毛蕊花糖苷对顺铂诱导小鼠卵巢损害的保护作用[J]. 解剖科学进展,2017,23(3):257-261

[6] 邓海峰,孙曼利,陈 浩,等. 毛蕊花糖苷对抑郁症大鼠行为学和前额叶皮层内质网应激的影响[J]. 中国病理生理杂志,2018,34(1):101-106

[7] 高 莉,彭晓明,霍仕霞,等. 毛蕊花糖苷改善 D-半乳 (下转第 93 页)

- tudinal study of patients with rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 1995, 38(1):44-48
- [3] 栗战国,张奉春,鲍春德.类风湿关节炎[M].北京:人民卫生出版社,2009:278-279
- [4] Wakefield RJ, Balint PV, Szkuclarek M, et al. Musculoskeletal ultrasound including definitions for ultrasonographic pathology[J]. *J Rheumatol*, 2005, 32(12):2485-2487
- [5] Szkuclarek M, Court-Payen M, Jacobsen S, et al. Interobserver agreement in ultrasonography of the finger and toe joints in rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2003, 48(4):955-962
- [6] Hammer HB, Bolton-King P, Bakkeheim V, et al. Examination of intra and interrater reliability with a new ultrasonographic reference atlas for scoring of synovitis in patients with rheumatoid arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2011, 70(11):1995-1998
- [7] Minowa K, Ogasawara M, Murayama G, et al. Predictive grade of ultrasound synovitis for diagnosing rheumatoid arthritis in clinical practice and the possible difference between patients with and without seropositivity [J]. *Mod Rheumatol*, 2016, 26(2):188-193
- [8] 蔡晓菡,杨舒萍,沈浩霖,等.超声评分法在类风湿性关节炎的应用研究[J]. *中国超声医学杂志*, 2015, 31(7):631-633
- [9] 李拾林,吕国荣,胡麦果,等.超声评分法评价类风湿性关节炎活动性的意义[J]. *中国超声医学杂志*, 2014, 30(3):266-269
- [10] Backhaus M, Ohrndorf S, Kellner H, et al. Evaluation of a novel 7-joint ultrasound score in daily rheumatologic practice: a pilot project [J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 61(9):1194-1201
- [11] Naredo E, Rodriguez M, Campos C, et al. Validity, reproducibility, and responsiveness of a twelve-joint simplified power doppler ultrasonographic assessment of joint inflammation in rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 59(4):515-522
- [12] Luz KR, Pinheiro MM, Petterle GS, et al. A new musculoskeletal ultrasound scoring system (US10) of the hands and wrist joints for evaluation of early rheumatoid arthritis patientst [J]. *Rev Bras Reumatol Engl Ed*, 2016, 56(5):421-431
- [13] 徐愿,宿峰,陶庆文,等.类风湿关节炎患者掌指关节2,3与掌指关节1,4,5超声表现的比较研究[J]. *中日友好医院学报*, 2014, 28(6):323-325,330
- [14] 周凌,陈凌,宋婧,等.关节超声评分在类风湿性关节炎评价中的应用价值研究[J]. *中华航海医学与高气压医学杂志*, 2016, 23(2):125-129
- [收稿日期] 2017-02-07

(上接第36页)

- 糖致亚急性衰老小鼠脑损伤的作用[J]. *中草药*, 2014, 45(1):81-85
- [8] 宋小敏,廖理曦,董馨,等.毛蕊花糖苷抑制脂多糖诱导的BV-2小胶质细胞炎症反应及机制研究[J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(13):2506-2510
- [9] Alipieva K, Korkina L, Orhan IE, et al. Verbascoside: a review of its occurrence, (bio)synthesis and pharmacological significance[J]. *Biotechnol Adv*, 2014, 32(6):1065-1076
- [10] Zhang YQ, Yuan Y, Wu HM, et al. Effect of verbascoside on apoptosis and metastasis in human oral squamous cell carcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2018, 143(4):980-991
- [11] Petruzzi MN, Cherubini K, Salum FG, et al. Role of tumour-associated macrophages in oral squamous cells carcinoma progression: an update on current knowledge [J]. *Diagn Pathol*, 2017, 12(1):32
- [12] Iqbal MS, Chaw C, Kovarik J, et al. Primary concurrent chemoradiation in head and neck cancers with weekly cisplatin chemotherapy: analysis of compliance, toxicity and survival [J]. *Int Arch Otorhinolaryngol*, 2017, 21(2):171-177
- [13] Hayashi Y, Mitsudo K, Sakuma K, et al. Clinical outcomes of retrograde intra-arterial chemotherapy concurrent with radiotherapy for elderly oral squamous cell carcinoma patients aged over 80 years old [J]. *Radiat Oncol*, 2017, 12(1):112
- [14] Yabuuchi H, Kuroiwa T, Tajima T, et al. Efficacy of intra-arterial infusion therapy using a combination of cisplatin and docetaxel for recurrent head and neck cancers compared with cisplatin alone [J]. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 2003, 15(8):467-472
- [15] 彭素萍,巩珺,苗瑞娟,等.连翘酯苷B与毛蕊花苷稳定性研究[J]. *今日药学*, 2012, 22(6):236-238
- [16] Ferré-D' Amaré AR, Prendergast GC, Edward B, et al. Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric b/HLH/Z domain[J]. *Nature*, 1993, 363(6424):38-45
- [收稿日期] 2018-10-11