

西黄丸组分中药调节肿瘤微环境中 Treg 细胞 PI3K/AKT 通路的抗肿瘤作用机制研究

任 瑶¹, 江一鸣², 项蓉蓉¹, 童玉春³, 宋 捷¹, 梁文波^{1*}

1. 大连大学 医学院, 辽宁 大连 116622

2. 大连大学 新华临床学院, 辽宁 大连 116000

3. 大连大学 中山医院, 辽宁 大连 116001

摘要: 目的 研究西黄丸组分中药是否与西黄丸具有相似的抗癌作用及机制。方法 4T1 乳腺癌细胞荷瘤建立动物模型, 西黄丸低、中、高剂量 (0.39、0.78、1.95 g/kg) 和西黄丸组分中药 0.3 mL (74.5 mg/kg 榄香烯、2.73 mg/kg 牛磺酸、0.52 mg/kg 麝香酮和 4.75 mg/kg 11-羰基- β 乙酯乳香酸混合物, 对应于西黄丸高剂量组) ig 给药 14 d, 剥离肿瘤组织, 称质量, 匀浆, 制备单细胞悬液, 免疫磁珠分离 Treg 细胞。流式细胞术和免疫组化检测肿瘤微环境中 Treg 细胞数量变化情况, Western Blotting 检测肿瘤微环境中 Treg 细胞磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/AKT) 蛋白表达情况, 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测肿瘤微环境中 Treg 细胞 PI3K、AKT mRNA 表达情况。结果 与模型组及西黄丸低、中剂量组比较, 西黄丸组分中药组肿瘤质量显著减少 ($P < 0.05$); 流式细胞术和免疫组化结果显示, 肿瘤微环境中 Treg 细胞数量显著减少 ($P < 0.05$); Western Blotting 和 qRT-PCR 结果显示, 肿瘤微环境中 Treg 细胞 PI3K、AKT 蛋白及 mRNA 表达显著下降 ($P < 0.05$)。与西黄丸高剂量组比较, 西黄丸组分中药组肿瘤质量、Treg 细胞数量和 PI3K、AKT 蛋白及 mRNA 表达均明显升高 ($P < 0.05$)。结论 西黄丸组分中药通过抑制肿瘤微环境中 Treg 细胞 PI3K/AKT 信号通路的表达减少 Treg 细胞数量, 进而表现与西黄丸相似的抗癌作用和机制。

关键词: 西黄丸; 组分中药; Treg 细胞; 胞磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/AKT) 信号通路

中图分类号: R965

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376 (2019) 03-0437-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.03.010

Antitumor mechanism of Xihuang Pills component-based Chinese medicine by regulating Treg cells PI3K/AKT pathway in tumor microenvironment

REN Yao¹, JIANG Yiming², XIANG Rongrong¹, TONG Yuchun, SONG Jie¹, LIANG Wenbo¹

1. Medical College of Dalian University, Dalian 116622, China

2. Xin Hua Affiliated Hospital of Dalian University, Dalian 116000, China

3. Zhong Shan Affiliated Hospital of Dalian University, Dalian 116001, China

Abstract: Objective To study whether the Xihuang Pills component-based Chinese medicine has similar anti-cancer effect and mechanism as Xihuang Pills. **Methods** 4T1 breast cancer cells were used to establish a tumor model in mice. The model mice were ig administered with Xihuang Pills of low, medium, and high doses (0.39, 0.78 and 1.95 g/kg) and Xihuang Pills component-based Chinese medicine of 0.3 mL (74.5 mg/kg elemene, 2.73 mg/kg taurine, 0.52 mg/kg Muscone and 4.75 mg/kg 11-carbonyl-beta-ethyl ester mastic acid mixture, corresponding to the high dosage group of Xihuang Pills) for 14 d. The tumor tissues were removed, weighed and homogenized to prepare single cell suspensions. Treg cells were prepared by magnetic cell sorting. The changes in number of Treg cells in the tumor microenvironment were detected by flow cytometry and immunohistochemistry. The protein expression of PI3K and AKT in Treg cells in the tumor microenvironment was detected by western blotting. The mRNA expression of PI3K and AKT in Treg cells in the tumor microenvironment was detected by the Real-time PCR (qRT-PCR). **Results** Compared

收稿日期: 2018-09-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573664)

第一作者: 任 瑶 (1993—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为抗肿瘤中药基础研究。Tel: 18234046395 E-mail: yren93@163.com

*通信作者: 梁文波 (1962—), 男, 教授, 主要研究方向为中药抗肿瘤药理研究。Tel: 13942666741 E-mail: dllwb@126.com

with model group and Xihuang Pills low- and medium-dose groups, the weight of tumors was significantly decreased in the Xihuang Pills component-based Chinese medicine group ($P < 0.05$); The results of flow cytometry and immunohistochemistry showed a significant decrease in the number of Treg cells in the tumor microenvironment ($P < 0.05$); Western Blotting and qRT-PCR results showed that the expression of PI3K, AKT protein and their mRNA in Treg cells in the tumor microenvironment was significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the Xihuang Pills high-dose group, the tumor weight, the number of Treg cells, and the protein expression of PI3K and AKT and their mRNA expression in the Xihuang Pills component-based Chinese medicine group were significant increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Xihuang Pills component-based Chinese medicine can reduce the number of Treg cells by inhibiting the expression of PI3K/AKT signaling pathway in Treg cells in the tumor microenvironment, and thus exhibit similar anti-cancer effects and mechanisms as Xihuang Pills.

Key words: Xihuang Pills; Xihuang Pills component-based Chinese medicine; Treg cells; PI3K/AKT signaling pathway

近年来,随着环境污染、肥胖、生活方式不规律等多种因素的影响,癌症的发生率日益增长。目前,肿瘤的临床治疗方法主要包括手术、放疗、化疗、肿瘤血管阻断治疗、免疫治疗和中医药治疗等多种方法^[1]。其中,中医药疗法可贯穿于癌症治疗的各个阶段,并发挥一定治疗作用^[2]。随着研究的进展,“组方中药”是一种新型的中药复方制剂,是在中医药理论指导下,遵循方剂配伍理论,由有效成分配伍而成的现代中药^[3],由于其具有多成分、多靶点、多途径和多环节等特点^[4],逐渐应用于肿瘤的研究与治疗。

西黄丸是中国经典抗癌名方,由牛黄、麝香、乳香、没药4味中药组成,临床上可用于多种恶性肿瘤^[5]的治疗与辅助治疗,如乳腺癌、肝癌、食道癌、胰腺癌等。牛磺酸^[6]、麝香酮^[7]、11-羧基- β 乙酯乳香酸^[8]和 β -榄香烯^[9]分别是牛黄、麝香、乳香和没药的主要抗肿瘤有效成分。故本课题组立足于方剂君臣佐使结构,以牛磺酸、麝香酮、11-羧基- β 乙酯乳香酸和 β -榄香烯按照原方配伍比例组成西黄丸组方中药,研究其抗癌疗效。本课题组前期发现西黄丸可通过减少肿瘤微环境中调节性T(Treg)细胞发挥抗肿瘤作用^[10],故本实验检测西黄丸组方中药是否具有与西黄丸相似的抗癌作用。

Treg细胞是一类具有免疫无能性和免疫抑制性的T细胞亚群^[11],其免疫抑制功能使得活化的Treg细胞可以促进肿瘤免疫逃逸的发生,进而促进肿瘤的生长。研究发现^[12],Treg细胞在乳腺癌患者的肿瘤微环境中升高,且升高数量与患者的预后呈负相关。为了阐明西黄丸与Treg细胞数量的关系,本课题组前期通过mRNA高通量筛查发现,西黄丸可通过调节肿瘤微环境中Treg细胞磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/AKT)信号通路表达^[10],从而减少肿瘤微环境中Treg细胞数量,发挥抗肿瘤作用。本研究检测西黄丸组方中药是否具有与西黄

丸相似的抗癌机制。

1 材料

1.1 动物和细胞

体质量为 (20 ± 2) g的雌性BALB/c小鼠,购于大连医科大学动物实验中心,许可证号SCXK(辽)2013-0003。

4T1小鼠乳腺癌细胞系(中国科学院细胞库)。

1.2 药物及主要试剂

西黄丸(北京同仁堂科技发展股份有限公司,批号15042128,规格3g/瓶、20粒/g)。牛磺酸(批号SBJ160629,质量分数 $\geq 98\%$)、麝香酮(批号SBJ60604,质量分数 $\geq 98\%$)、11-羧基- β 乙酯乳香酸(批号SBJ151214,质量分数 $\geq 98\%$),购于南京森贝伽生物科技有限公司。 β -榄香烯注射液(大连华立金港药业有限公司,批号H10960114,规格20mL $\times$ 8支/盒,20mL:0.1g)。

EasySep™ Mouse CD₂₅ Regulatory T cell Positive Selection Kit (STEMCELL, 加拿大);胎牛血清(FBS,天津灏洋);含双抗的RPMI 1640培养基、胰蛋白酶、BCA含量检测试剂盒、RIPA裂解液(强)、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒、4%多聚甲醛(江苏凯基生物科技股份有限公司);Triton-X-100(Sigma,德国);TBST、TBS、蛋白Marker、脱脂奶粉(CST,美国);一抗:蛋白Marker、兔抗小鼠 β -actin抗体(CST,美国)、小鼠抗小鼠AKT、兔抗小鼠PI3K(Abcam,美国),羊抗小鼠Foxp3抗体(Novus,美国);二抗:驴抗兔抗体(Alexafluor680)、驴抗小鼠抗体(Alexafluor790)(Abcam,美国),驴抗山羊抗体(Alexafluor488)(Jackson,美国);Prolong diamond antifade mountant with DAPI(Thermo,美国);流式检测试剂盒(affymetrix eBioscience,美国);小鼠肿瘤浸润组织淋巴细胞分离液(天津灏洋)。

1.3 主要仪器

EasySep[®]磁极(18001, STEMCELL, 加拿大); 多功能酶标仪(SpectraMax Plus384, Bio-tek, 美国); Odyssey 双色红外激光发光仪(S/N CLX-0926, LICOR, 美国); 流式细胞仪(FACSCalibur, BD, 美国); CO₂培养箱(NU-5820E, NAURE, 美国); 匀浆器(WHEATON, 美国); Western Blotting 及转膜设备(DYY-6C, 北京六一); 正置荧光显微镜 BX51、倒置显微镜 IX73 (Olympus, 日本); 低温高速离心机(CT15RE, Hitachi, 日本)

2 方法

2.1 荷瘤小鼠模型的制备及分组给药

将4T1小鼠乳腺癌细胞株置于37℃、5% CO₂培养箱中培养, 用1640培养基(含15% FBS)培养, 并用0.25%胰蛋白酶消化后收集细胞, 用预热的PBS将细胞浓度调整为1×10⁶/mL待用。将0.2 mL(2×10⁵个)上述浓度细胞接种于SPF级BALB/c小鼠右侧腋下, 建立荷瘤小鼠模型^[10]。

荷瘤小鼠随机分为5组, 每组10只, 分别为模型组, 西黄丸低、中、高剂量(0.39、0.78、1.95 g/kg)组, 西黄丸组中药组0.3 mL(74.5 mg/kg)榄香烯、2.73 mg/kg的牛磺酸、0.52 mg/kg的麝香酮和4.75 mg/kg的11-羧基-β乙酯乳香酸混合物, 对应于西黄丸高剂量组。自造模后第2天开始给药, 每天ig给药2次, 每次0.2 mL, 连续给药14 d, 末次给药当晚禁食。第15天脱颈处死小鼠, 无菌剥离肿瘤组织并置于含有匀浆液(含20% FBS)的培养皿中, 4℃保存备用。

2.2 肿瘤质量观察

脱颈处死小鼠, 冰上无菌剥离肿瘤组织, 称质量。

2.3 制备单细胞悬液

在无菌条件下剥离肿瘤组织, 剪碎, 用玻璃匀浆器于冰上研磨, 经200目尼龙筛网过滤制备成单细胞悬液, 500×g离心15 min, 弃上清取沉淀, 用PBS洗涤1次, 收集细胞。分选淋巴细胞, 用样本稀释液将细胞浓度调整为(2~10)×10⁸/mL备用, 缓慢垂直转移至含有等体积淋巴细胞分离液的离心管中, 500×g离心25 min取白环层, 加入10倍体积清洗液, 250×g离心10 min洗涤2次。

2.4 流式细胞术检测肿瘤微环境中Treg细胞数量

用PBS将每组细胞的浓度调整为2×10⁶/mL, 并将50 μL单细胞悬液置于EP管中, 加入1 μL Anti-Mouse CD16/CD32室温避光孵育15

min, 加入50 μL Anti-Mouse CD4⁺ FITC和Anti-Mouse CD25⁺ APC抗体混合物, 4℃避光孵育30 min。加入1.5 mL Flow Cytometry Staining Buffer, 600×g离心5 min, 洗涤2次。加入1 mL Fixation/permeabilization工作液混匀, 室温避光孵育60 min。加入1 mL 1×permeabilization buffer, 600×g离心5 min洗涤2次。加入100 μL 1×permeabilization buffer重悬细胞, 加入2.5 μL Anti-Mouse mouse/rat Foxp3 PE, 室温条件下避光孵育30 min, 加入1 mL 1×permeabilization buffer, 600×g离心5 min洗涤2次。加入300 μL Flow Cytometry staining buffer重悬细胞上机检测; 用流式细胞仪数据分析软件分析各组间CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg细胞比例。

2.5 免疫磁珠分选肿瘤微环境中Treg细胞

使用试剂盒里的推荐培养基调整细胞浓度为1×10⁸/mL, 加入50 μL/mL FcR阻断剂, 混匀并室温孵育5 min。按50 μL/mL加入Positive Selection Cocktail混匀并室温孵育10 min。按20 μL/mL加入PE Selection Cocktail混匀并室温孵育5 min, 按20 μL/mL加入RapidSpheres[™]混匀并室温孵育5 min。加入推荐培养基混匀并定容至5 mL, 放入磁极中室温孵育5 min, 颠倒磁极, 倒掉推荐培养基, 此步骤重复4次, 管壁中即含有被收集的Treg细胞, 用PBS冲洗管壁, 收集细胞, 冰上备用。

2.6 免疫组化检测肿瘤微环境中Treg细胞数量

用PBS将Treg细胞浓度调整为1×10⁷/mL, 滴适量细胞于黏附载玻片上, 室温过夜晾干。滴加适量4%多聚甲醛, 固定5 min, 用PBS漂洗并晾干。滴加适量0.3% TritonX-100冰上破膜30 min, 用PBS漂洗3次。滴加适量免疫染色封闭液, 湿盒孵育30 min(避光), 用PBS漂洗3次。加入山羊抗小鼠Foxp3一抗(1:100稀释), 4℃过夜孵育, 免疫染色洗涤液漂洗3次, 加入驴抗山羊(Alexafluor488)二抗(1:100稀释), 室温避光孵育1 h, 用免疫染色洗涤液洗涤3次。滴加适量DAPI并盖上盖玻片, 室温避光孵育24 h, 荧光显微镜检测结果。

2.7 Western Blotting检测肿瘤微环境中Treg细胞PI3K、AKT蛋白表达

收集Treg细胞, 预冷的PBS洗涤2次后用RIPA裂解液重悬细胞, 剧烈震荡30 s, 冰上静置4 min, 循环5次, 在4℃下以10 000×g离心5 min, 取上清液进行BCA蛋白定量。将蛋白变性煮沸, 各组取50 μg蛋白, 于8% SDS-PAGE分离后, 湿转至PVDF膜上, 室温封闭1 h, 与一抗(1:1 000稀释)结合, 4℃

摇床过夜。TBST清洗3次(避光),加入二抗(1:10 000稀释)室温避光孵育60 min。TBST清洗3次(避光)。Odyssey CLX红外线发光仪中成像,Image J软件对图像进行灰度分析。

2.8 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测肿瘤微环境中Treg细胞PI3K、AKT mRNA表达

从分离的Treg细胞中提取总RNA,并使用Power SYBR Green Cells-to-CT试剂盒(Thermo, USA)将其逆转录为cDNA。根据制造商的说明使用CFX连接荧光定量PCR系统(Bio-Rad, USA)和Power SYBR TM Green PCR Master CCM(Thermo, USA)进行qRT-qPCR(40个循环)。结果以 C_t 值表示,并且通过使用 β -actin蛋白作为对照基因的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析基因表达的相对变化。引物序列(AuGCT,中国)见表1。

2.9 统计分析

采用SPSS 20.0软件进行单因素方差统计学分

析,实验结果均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 4T1荷瘤小鼠瘤质量变化

与模型组比较,西黄丸低、中、高剂量组4T1荷瘤小鼠瘤质量显著下降($P < 0.05$);与模型组和西黄丸低、中剂量组比较,西黄丸组分中药组小鼠瘤质量显著下降($P < 0.05$),与西黄丸高剂量组比较,其瘤质量下降显著减少($P < 0.05$)。结果见图1。

3.2 4T1荷瘤小鼠肿瘤微环境中Treg细胞数量

流式细胞术和免疫组化实验结果显示,与模型组和西黄丸低、中剂量组比较,西黄丸组分中药组4T1荷瘤小鼠肿瘤微环境中Treg细胞数量明显减少($P < 0.05$);与西黄丸高剂量组比较,Treg细胞减少数量显著下降($P < 0.05$)。结果见图2、3。

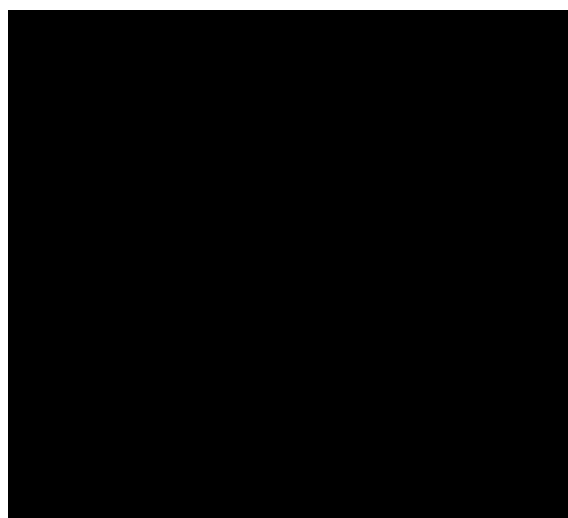
3.3 4T1荷瘤小鼠肿瘤微环境中Treg细胞PI3K、AKT蛋白表达

Western Blotting实验结果显示,与模型组和西

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	正向引物	反向引物
P110	GATTTTGGGCACTTTTGGGA	GCTGCCGAATTGCTAGGTAA
P85	GAGATCGACAAACGCATGAA	CACGTCTTCTCGTCATGGTG
AKT	GAGGATGCCAAGGAGATCAT	CTGTGCCACTGGCTGAGTAG
β -actin	CCTCTATGCCAACACAGTGC	ACATCTGCTGGAAGGTGGAC



与模型组比较: * $P < 0.05$; 与西黄丸各组比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs model group; # $P < 0.05$ vs each group of Xihuang pills

图1 西黄丸各组治疗后荷瘤瘤质量($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig.1 Effect of Xihuang Pills on tumor-bearing quality ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

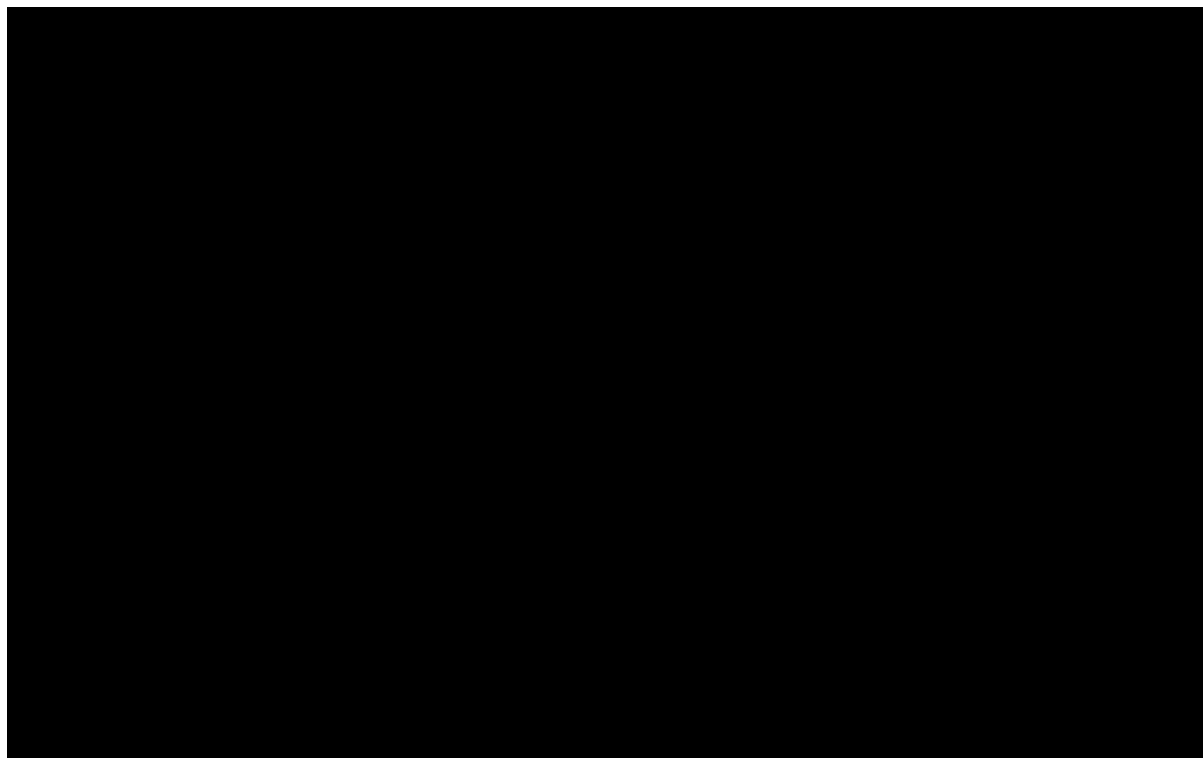
黄丸低、中剂量组比较,西黄丸组分中药组4T1荷瘤小鼠肿瘤微环境中Treg细胞PI3K、AKT蛋白表达显著下调($P < 0.05$);与西黄丸高剂量组比较,其PI3K、AKT蛋白表达升高($P < 0.05$)。结果见图4。

3.4 4T1荷瘤小鼠肿瘤微环境中Treg细胞PI3K、AKT mRNA表达

qRT-PCR实验结果显示,与模型组和西黄丸低、中剂量组比较,西黄丸组分中药组4T1荷瘤小鼠肿瘤微环境中Treg细胞PI3K、AKT mRNA蛋白表达明显下调($P < 0.05$);与西黄丸高剂量组比较,其蛋白PI3K、AKT mRNA表达升高($P < 0.05$)。结果见图5。

4 讨论

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤之一,且其致死率也在逐年增加^[13]。临床上对于乳腺癌的治疗也从单一疗法转为综合治疗,中医药整体治疗的特点使其在乳腺癌的综合治疗中占有显著地位^[14],尤其是中医药治疗可以改善乳腺癌患者的肿瘤微环境,而肿瘤微环境的形成与发展又离不开Treg细胞的

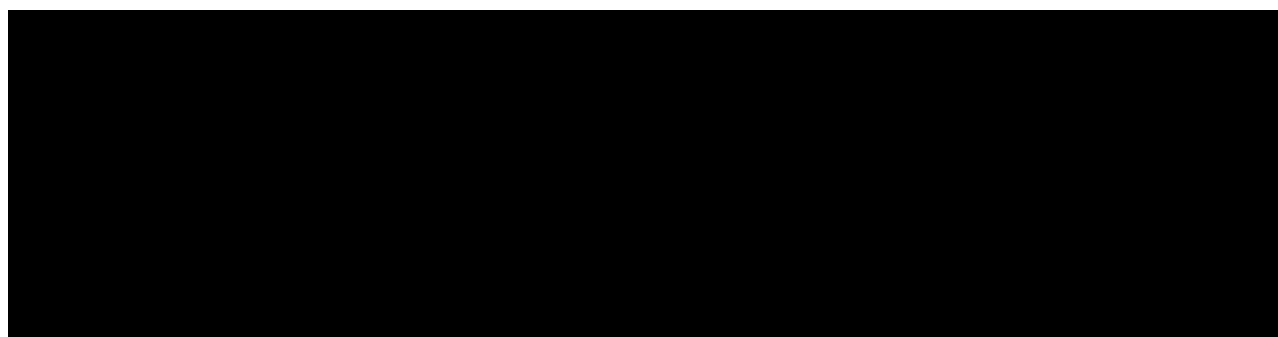


与模型组比较: * $P < 0.05$; 与西黄丸各组比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs model group; # $P < 0.05$ vs each group of Xihuang pills

图2 FCM检测肿瘤微环境中Treg细胞数量($\pm s$, $n = 6$)

Fig. 2 FCM detects the number of Treg cells on the tumor microenvironment ($\pm s$, $n = 10$)



与模型组比较: * $P < 0.05$; 与西黄丸各组比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs model group; # $P < 0.05$ vs each group of Xihuang pills

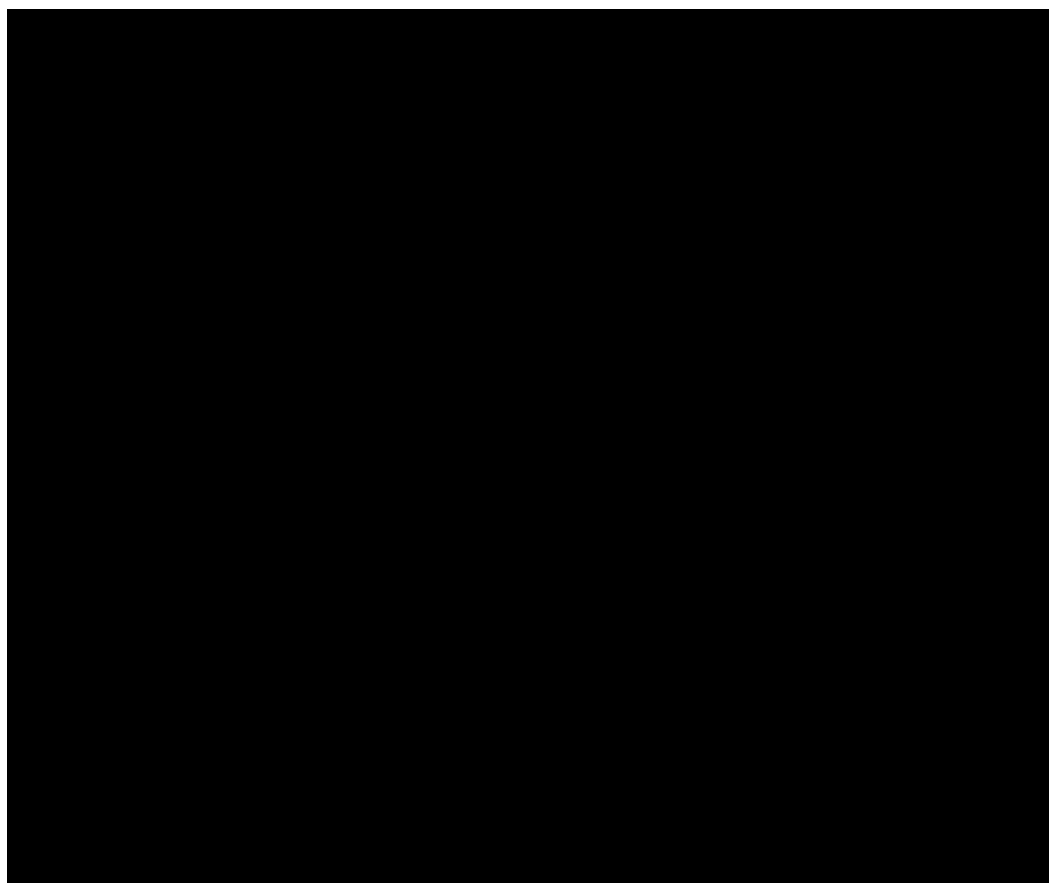
图3 IHC检测肿瘤微环境中Treg细胞数量($\pm s$, $n = 6$)

Fig. 3 IHC detects number of Treg cells in tumor microenvironment ($\pm s$, $n = 6$)

参与^[11]。研究发现^[12],肿瘤微环境中Treg细胞数量的增加与乳腺癌患者不良预后呈正相关。本课题组前期证实西黄丸可以减少4T1荷瘤小鼠的瘤质量,且能减少肿瘤微环境中Treg细胞数量,本实验检测西黄丸组分中药是否具有相似作用。实验结果显示,经过西黄丸组分中药治疗后4T1荷瘤小鼠肿瘤生长受到明显抑制,且流式细胞术和免疫组化实验结果均显示,肿瘤微环境中Treg细胞数量显著减少。结果说明,西黄丸组分中药可以通过减少肿瘤微环境中Treg细胞数量抑制肿瘤生长,从而发挥

抗肿瘤作用,且其药效与西黄丸相似。为了验证西黄丸组分中药是否具有和西黄丸相似的抗癌机制,本课题组检测了PI3K/AKT信号通路。

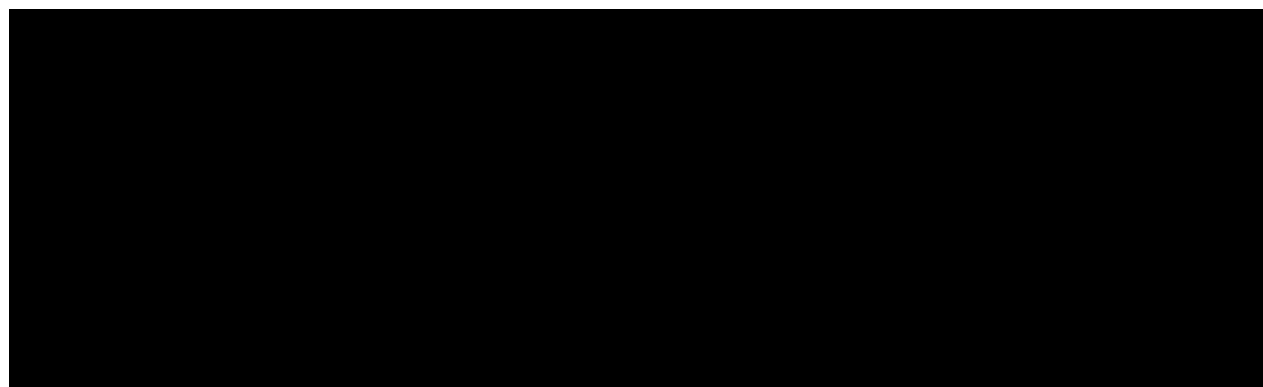
PI3K/AKT信号通路^[15]广泛存在于真核动物细胞当中,对细胞的增殖、分化具有调节作用。研究发现^[16],PI3K/AKT信号通路在抑制肿瘤细胞凋亡、促进肿瘤细胞生长方面发挥关键作用。本课题组前期实验发现,西黄丸可通过抑制肿瘤微环境中Treg细胞PI3K/AKT信号通路表达来减少Treg细胞数量,故本实验检测西黄丸组分中药是否具有相似



与模型组比较: * $P < 0.05$; 与西黄丸各组比较: # $P < 0.05$
 * $P < 0.05$ vs model group; # $P < 0.05$ vs each group of Xihuang pills

图4 WB检测结果 ($\pm s$, $n = 6$)

Fig. 4 Results of WB ($\pm s$, $n = 6$)



与模型组比较: * $P < 0.05$; 与西黄丸各组比较: # $P < 0.05$
 * $P < 0.05$ vs model group; # $P < 0.05$ vs each group of Xihuang pills

图5 RT-qPCR检测肿瘤微环境中Treg细胞PI3K、AKT mRNA表达 ($\pm s$, $n = 6$)

Fig. 5 Detection of PI3K and AKT mRNA expression in Treg cells in tumor microenvironment by RT-qPCR ($\pm s$, $n = 6$)

抗癌机制。Western Blotting 和 qRT-PCR 实验结果显示,西黄丸组分中药治疗后,4T1 荷瘤小鼠肿瘤微环境中Treg 细胞PI3K 和 AKT 蛋白表达及其mRNA 表达显著下降。结果说明,西黄丸组分中药可通过下调PI3K/AKT 信号通路表达,从而减少肿瘤微环境中Treg 细胞数量,发挥抗肿瘤作用,且其抗癌机

制与西黄丸相似。

本研究发现,西黄丸组分中药药理作用和抗癌作用机制虽与西黄丸相似,但其药效存在差异。西黄丸组分中药组肿瘤抑制率和Treg 细胞数量减少情况均高于西黄丸低、中剂量组,低于西黄丸高剂量组,PI3K、AKT 蛋白及其mRNA 表达均低于西黄

丸低、中剂量组,高于西黄丸高剂量组。产生该差异的原因可能是单味中药是由多个有效组分构成^[17],中药复方又是由多味中药组成,故中药复方是由多个发挥协同作用的有效组分构成,所以组分中药与中药复方存在药效差异。尽管组分中药与中药复方药效存在差异,但西黄丸组分中药表现出优于原方中剂量的药效,且西黄丸组分中药具有药物组成明确、作用机理相对清楚、药物制备安全可控等优势^[18],为中医药的发展提供了一个新方法。

参考文献

- [1] 颜 翎. 认识癌症的治疗方法 [J]. 中华养生保健, 2015 (2):18-19.
- [2] 王 硕, 刘 杰, 林洪生. 中医药在癌症治疗中的作用 [J]. 环球中医药, 2013, 6(1): 31-35.
- [3] 张俊华, 樊官伟, 张 晗, 等. 组分中药理论的发展与应用 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(21): 4054-4058.
- [4] 岳广欣, 刘丽梅, 柏 冬, 等. "组分中药"药理研究内容和特点述评 [J]. 中国中医药信息杂志, 2015, 22(3): 121-126.
- [5] 谭 萍. 西黄丸治疗恶性肿瘤应用体会 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2001, 11(4): 244-244.
- [6] 张霞丽. 牛磺酸对肿瘤细胞凋亡的作用及其机制初步研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2012.
- [7] 刘永惠, 常 靖, 薛陆军, 等. 麝香酮对血瘀证乳腺癌生长及对 VEGF 表达的影响 [J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2014, 35(4): 547-550.
- [8] Yadav V R, Prasad S, Sung B, et al. Boswellic acid inhibits growth and metastasis of human colorectal cancer in orthotopic mouse model by downregulating inflammatory, proliferative, invasive and angiogenic biomarkers [J]. Int J Cancer, 2012, 130(9): 2176-2184.
- [9] 麻 杰, 陈 娟, 赵冰洁, 等. 抗癌药物 β -榄香烯及其衍生物的研究进展 [J]. 中草药, 2018(5): 1184-1191.
- [10] Li X Y, Su L, Jiang Y M, et al. The antitumor effect of xihuang pill on treg cells decreased in tumor microenvironment of 4T1 breast tumor-bearing mice by PI3K / AKT~AP-1 signaling pathway [J]. Evid Based Compl Alter Med, 2018, 2018: 6714829.
- [11] 谷伟伟, 叶韵斌. 调节性T细胞与肿瘤相互作用机制的研究进展 [J]. 医学综述, 2012, 18(5): 680-684
- [12] Liu F F, Lang R G, Zhao J, et al. CD8⁺ cytotoxic T cell and FOXP3⁺ regulatory T cell infiltration in relation to breast cancer survival and molecular subtypes [J]. Breast Cancer Res Treat, 2011, 130(2): 645-655.
- [13] 戴晓晓, 张永胜, 刘加豪, 等. 乳腺癌流行病学及临床病理学分析 [J]. 中国医院药学杂志, 2018: 1-5.
- [14] 吴世婷, 刘丽芳, 丁 玲, 等. 中医药治疗乳腺癌临床研究进展 [J]. 湖南中医杂志, 2015, 31(9): 170-173.
- [15] Sami A, Karsy M. Targeting the PI3K / AKT / mTOR signaling pathway in glioblastoma: novel therapeutic agents and advances in understanding [J]. Tumour Biol, 2013, 34(4): 1991-2002.
- [16] 李 建, 周怀君. PI3K/Akt 信号通路在肿瘤研究中的进展 [J]. 东南大学学报: 医学版, 2014, 33(3): 392-395.
- [17] 郭 倩, 田成旺, 任 涛, 等. 中药药效物质基础研究进展 [J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2015, 17 (3): 648-654.
- [18] 苗晋鑫, 苗明三. 组分中药研究现状、存在问题及思考 [J]. 中医学报, 2012, 27(9): 1116-1119.