

四君子汤提取物对人乳腺癌 MDA-MB-468 细胞生长的抑制作用

李朵璐^{1*}, 张待娣¹, 杨 盟¹, 肖 冉¹, 段震峰^{1,2}

1. 郑州大学第一附属医院药学部 河南省精准临床药学重点实验室, 河南 郑州 450052

2. 美国加州大学洛杉矶分校 大卫格芬医学院骨科实验室, 美国 洛杉矶 90095

摘要: **目的** 探究四君子汤提取物 (Sijunzi Decoction extract, SDE) 对人三阴性乳腺癌 MDA-MB-468 细胞生长的作用。**方法** 采用不同质量浓度 SDE 作用于 MDA-MB-468 细胞, CCK-8 实验和细胞划痕实验检测 SDE 对细胞增殖和迁移能力的影响; 克隆形成实验检测 SDE 对细胞集落形成能力的影响; Hoechst33342 染色技术和流式细胞术 (FCM) 检测 SDE 对细胞凋亡和周期的影响; Western blotting 技术检测 SDE 对信号传导及转录激活蛋白 3 (STAT3) 表达的影响。**结果** 与对照组比较, SDE 对 MDA-MB-468 细胞有一定的抑制作用 ($P < 0.05$), 且呈质量浓度和时间依赖性。克隆形成实验结果表明 SDE 能够抑制细胞克隆形成。细胞迁移实验结果显示, SDE 中、高质量浓度能够明显减弱细胞划痕愈合能力 ($P < 0.001$)。FCM 检测凋亡结果显示, SDE 各质量浓度组细胞早期凋亡率和总凋亡率逐渐上升, 呈质量浓度依赖性, 且中、高质量浓度的 SDE 能显著诱导细胞凋亡 ($P < 0.01$ 、 0.001)。SDE 能够影响细胞周期, 使 G₂ 期细胞显著减少 ($P < 0.01$)。Western blotting 结果显示, SDE 处理细胞后, STAT3 蛋白表达水平显著降低。**结论** SDE 能够抑制 MDA-MB-468 细胞的增殖和克隆形成, 促进其凋亡, 使 G₂ 期细胞减少。其机制可能与调控 STAT3 通路有关。

关键词: 四君子汤; 三阴性乳腺癌; 增殖; 凋亡; 迁移; 细胞周期; 信号传导及转录激活蛋白 3

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)04-1037-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.04.030

Inhibition of Sijunzi Decoction extract on human breast cancer cells MDA-MB-468

LI Duo-lu¹, ZHANG Dai-di¹, YANG Meng¹, XIAO Ran¹, DUAN Zhen-feng^{1,2}

1. Henan Key Laboratory for Precision Clinical Pharmacy, Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

2. Sarcoma Biology Laboratory, UCLA Orthopaedic Surgery, Los Angeles 90095, USA

Abstract: **Objective** To investigate the effect of Sijunzi Decoction extract (SDE) on the growth of human triple negative breast cancer (TNBC) cell line MDA-MB-468. **Methods** MDA-MB-468 cells were treated with different concentrations of SDE. The effect of SDE on the proliferation and migration of the cells were detected by CCK-8 assay and the cell wound healing assay. The colony formation assay was performed to analyze the effect on the ability of colony formation of the cells with SDE. Hoechst 33342 staining technique and flow cytometry (FCM) were used to detect apoptosis and cell cycle of the cells. Western blotting was used to detect the expression levels of STAT3, which was related with the proliferation and apoptosis of cells. **Results** Compared with the control group, SDE had a certain inhibitory effect on MDA-MB-468 cells ($P < 0.05$), and it was dependent on the concentration and time. Cloning formation experiments showed that SDE inhibited the clonality of the cells. The cell migration experiment showed that the wound healing ability of the cells could be weakened by the extract with the medium and high dosage ($P < 0.001$). The results of FCM showed that the apoptosis rate of all SDE dosage increased gradually in a dose-dependent manner. And SDE with the medium and high dosage induced apoptosis of the cells significantly ($P < 0.01$ and 0.001). Cell cycle was affected by SDE with the obvious reduction of the cells in G₂ phase ($P < 0.01$). The results of Western blotting showed that the expression level of STAT3 was decreased significantly. **Conclusion** SDE inhibited the proliferation and clonal formation of MDA-MB-468 cells, inhibited migration, promoted apoptosis and decreased the cells of G₂ phase. which may be related to the regulation of STAT3 pathway.

Key words: Sijunzi Decoction; triple negative breast cancer; proliferation; apoptosis; migration; cell cycle; signal transducers and activators of transcription 3

收稿日期: 2019-08-05

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31670895); 河南省科技发展计划项目 (182102410007)

*通信作者 李朵璐 (1979—), 女, 博士, 硕士生导师, 副教授, 从事肿瘤个体化治疗研究。E-mail: dorali1979@126.com

乳腺癌是女性最常见的肿瘤,其发病率不断增高。三阴性乳腺癌(TNBC)是乳腺癌中较为难治的特殊类型,具有雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)和人表皮生长因子受体2(HER2)免疫组化标记均为阴性的特点。相对其他乳腺癌分型,TNBC恶性程度更高、侵袭性更强,治疗手段单一和缺乏特异性靶向药物是目前该病临床治疗的最大障碍^[1-5]。中医治疗TNBC的关键在于益气健脾,益气健脾经典方药四君子汤由人参、白术、茯苓、甘草组成。已初步证明四君子汤对乳腺癌化疗、术后的并发症有明显改善作用,可显著提高乳腺癌患者的生存质量^[6-7],调节乳腺癌患者的免疫系统功能^[8]。然而,四君子汤对于肿瘤的作用机制尚不明确。因此本研究制备四君子汤提取物(Sijunzi Decoction extract, SDE)浓缩干粉,探究其对人乳腺癌MDA-MB-468细胞增殖、凋亡和迁移的影响。

1 材料

1.1 细胞

MDA-MB-468细胞购自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。

1.2 药品与试剂

四君子汤为传统中药汤剂,由人参(产地辽宁)、白术(产地江苏)、茯苓(产地湖南)、炙甘草(产地新疆)按2:2:2:1制成,购自郑州大学第一附属医院中药房,由郑州大学第一附属医院药学部主任药师王娟鉴定分别为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥成熟根、菊科草本植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的成熟干燥根茎、多孔菌科茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核、蝶形花亚科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根及根茎。

RPMI 1640培养基(HyClone公司);胎牛血清(Biological Industries公司);青霉素-链霉素混合液、1%结晶紫染液(北京索莱宝生物科技有限公司);胰蛋白酶消化液(上海碧云天生物技术有限公司);Hoechst 33342(美国Sigma公司);CCK-8试剂盒(大连美仑生物技术有限公司);多聚甲醛(北京雷根生物技术有限公司);细胞凋亡试剂盒和细胞周期试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司);兔抗人信号传导及转录激活蛋白3(STAT3)多克隆抗体(Abcom公司);鼠抗人 β -actin单克隆抗体(Proteintech公司);荧光二抗(美国LI-COR公司)。

1.3 仪器

酶标仪(美国Molecular Devices分子仪器有限公司);电子分析天平(德国Sartorius公司);水平摇床(北京沃德生物医学仪器有限公司);Odyssey红外荧光扫描成像系统(美国LI-COR公司);UHPLC-Q-Orbitrap液相色谱-质谱联用系统:Ultimate 3000超高效液相色谱仪(美国Dionex公司);串联Q-Exactive型高分辨质谱(美国Thermo Fisher Scientific公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

MDA-MB-468细胞用含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素的RPMI 1640完全培养基在37℃、饱和湿度、5% CO₂的细胞培养箱中培养,2~3 d传代1次。

2.2 SDE制备

将人参、白术、茯苓及甘草用10倍体积的水浸泡1 h,大火煎至沸腾后,小火煎煮1.5 h,煎煮2次,纱布滤过收集滤液,静置沉淀取上清液,放入旋转蒸发仪浓缩后,用烘箱干燥,得到SDE干粉。使用前用培养基溶解后,用无菌滤膜滤过除菌。采用UHPLC-Q-Orbitrap HRMS测得SDE中含有甘草酸($1\,857.8 \pm 57.0$) μ g/g,甘草酸质量分数为0.19%。

2.3 CCK-8法检测SDE对MDA-MB-468细胞活性的影响

取对数生长期的MDA-MB-468细胞,调整细胞密度为 2×10^4 个/mL,以每孔100 μ L接种于96孔板中。加入不同质量浓度(0、2、5、8、10、15、20 mg/mL)的SDE溶液作用48 h后,每孔加入10 μ L CCK-8混匀,37℃培养2 h。利用酶标仪测定450 nm处的吸光度(A)值,并计算细胞活力和半数抑制浓度(IC₅₀)。

$$\text{细胞活力} = (A_{\text{药物}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

根据IC₅₀设置合适的加药浓度,取对数生长期的细胞接种于96孔板中,加入低、中、高质量浓度(2.5、5.0、10.0 mg/mL)的SDE,作用24、48、72 h,利用CCK-8法测定细胞活力。

2.4 克隆形成实验检测SDE对MDA-MB-468细胞克隆形成能力的影响

将处于对数期生长的MDA-MB-468细胞用胰酶消化后接种于6孔板中,细胞密度为150个/孔,于37℃、5% CO₂恒温培养箱中培养24 h。分别加入不同质量浓度的SDE(2.5、5.0、10.0 mg/mL),

待出现肉眼可见细胞群落时终止培养, 采用 4% 多聚甲醛固定细胞 30~60 min, 0.1% 结晶紫染色 5 min, 弃去染液后流水冲洗细胞, 待其自然风干后, 拍照记录。

2.5 细胞划痕实验观察 SDE 对 MDA-MB-468 细胞迁移的影响

先用记号笔在 6 孔板背后划出至少 5 条均匀的横线, 将对数生长期的 MDA-MB-468 细胞接种于 6 孔板内, 每孔约 5×10^5 个细胞。第 2 天细胞生长至 100% 融合时, 用枪头垂直于横线在孔内划痕, 用 PBS 洗细胞 3 次, 加入无血清培养基及不同质量浓度 (2.5、5.0、10.0 mg/mL) 的 SDE, 放入培养箱。0、24、48 h 取样, 拍照, 使用 Image J 软件分析并计算划痕愈合率。

划痕愈合率 = (0 h 划痕面积 - 不同时间点划痕面积) / 0 h 划痕面积

2.6 Hoechst 33342 染色观察 SDE 对 MDA-MB-468 细胞凋亡的影响

取对数生长期的 MDA-MB-468 细胞, 按 1×10^5 个/mL 接种于 6 孔板内, 每孔 2 mL, 细胞贴壁后, 加入 2.5 mg/mL 的 SDE 处理细胞 24、36 h。Hoechst 33342 用 PBS 配成 1 mg/mL 的储存液, 使用前用 PBS 稀释为 10 μ g/mL 的染色工作液。将 6 孔板中药物处理后的细胞弃去培养基, PBS 洗 3 遍, 每孔加入 1 mL Hoechst 33342 染色工作液, 室温放置 15 min。吸除 Hoechst 33342 染色液, PBS 洗涤 2~3 次, 每次 3~5 min。在荧光显微镜下观察, 细胞发生凋亡时看到凋亡细胞的细胞核呈致密明亮染色。

2.7 流式细胞仪检测 SDE 对 MDA-MB-468 细胞凋亡的影响

取对数生长期的 MDA-MB-468 细胞, 按 1×10^5 个/mL 接种于 6 孔板内, 每孔 2 mL, 细胞贴壁后, 加入不同质量浓度 (2.5、5、10 mg/mL) 的 SDE 处理细胞 48 h。用不含 EDTA 的胰酶消化收集 (胰酶消化时间不易过长, 否则容易引起假阳性)。PBS 洗涤细胞 2 次, 收集 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个细胞。加入 500 μ L 的 Binding Buffer 悬浮细胞。加入 5 μ L Annexin V-FITC 混匀后, 加入 5 μ L Propidium Iodide, 混匀。室温避光反应 5~15 min, 在 1 h 内, 进行流式细胞仪的观察和检测。

2.8 流式细胞仪检测 SDE 对 MDA-MB-468 细胞周期的影响

取对数生长期的 MDA-MB-468 细胞, 按 1×10^5

个/mL 接种于 6 孔板内, 每孔 2 mL, 细胞贴壁后, 加入不同质量浓度 (2.5、5、10 mg/mL) 的 SDE 处理细胞 24 h, 终止培养, 按照试剂盒说明书的实验步骤处理细胞, 并上机检测。

2.9 Western blotting 检测 MDA-MB-468 细胞中 STAT3 蛋白表达水平

取对数生长期的 MDA-MB-468 细胞, 按 1×10^5 个/mL 接种于 6 孔板内, 每孔 2 mL, 细胞贴壁后, 加入不同质量浓度 (2.5、5、10 mg/mL) 的 SDE 处理细胞 48 h, 用细胞裂解液处理 MDA-MB-468 细胞, 提取总蛋白, 采用 BCA 法经微量紫外分光光度计测蛋白浓度, 70 $^{\circ}$ C 变性 10 min, 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 电转移至硝酸纤维素膜, 封闭液封闭 1 h 后依次加入相应的一抗 (STAT3 按 1:1 000 稀释, β -actin 按 1:5 000 稀释) 和二抗孵育。室温下 TBST 漂洗 3 次, 每次 5 min。使用 Odyssey 双色红外荧光成像系统进行扫膜曝光。通过 Image J 软件对实验结果进行半定量分析。

2.10 统计学分析

实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 25.0 软件分析数据, 通过单因素方差分析各组差异。

3 结果

3.1 SDE 对 MDA-MB-468 细胞增殖的影响

不同质量浓度 SDE 处理 MDA-MB-468 细胞 48 h 后, 采用 CCK-8 法检测细胞增殖, 并绘制生长曲线, 见图 1。结果显示, SDE 能够抑制 MDA-MB-468 细胞增殖, IC_{50} 为 9.745 mg/mL。根据 IC_{50} 选取后续实验中 SDE 低、中、高质量浓度分别为 2.5、5.0、10.0 mg/mL。CCK-8 法检测不同时间各质量浓度 SDE 对 MDA-MB-468 细胞增殖的影响。结果发现, SDE 对 MDA-MB-468 细胞增殖抑制作用具有时间和质量浓度依赖性 (图 2)。

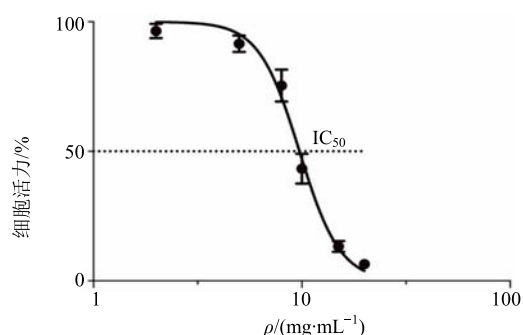


图 1 SDE 对 MDA-MB-468 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 1 Effect of SDE on cell viability of MDA-MB-468 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

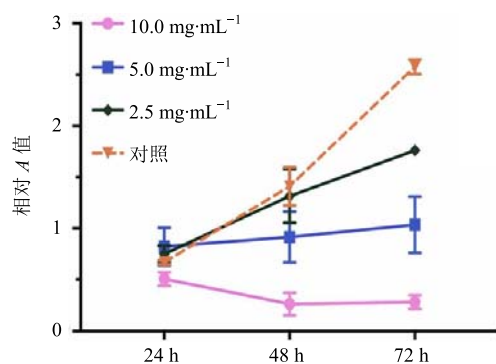


图 2 SDE 作用后 MDA-MB-468 细胞的生长曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 2 Growth curve of MDA-MB-468 cells treated with SDE ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.2 SDE 对 MDA-MB-468 细胞克隆形成能力的影响

与对照组比较, SDE 作用于 MDA-MB-468 细胞后, 细胞克隆大小和数量明显降低, SDE 高剂量组细胞几乎不能形成肉眼可见的克隆 (图 3)。结果表明, SDE 能够抑制 MDA-MB-468 细胞的克隆形成能力。

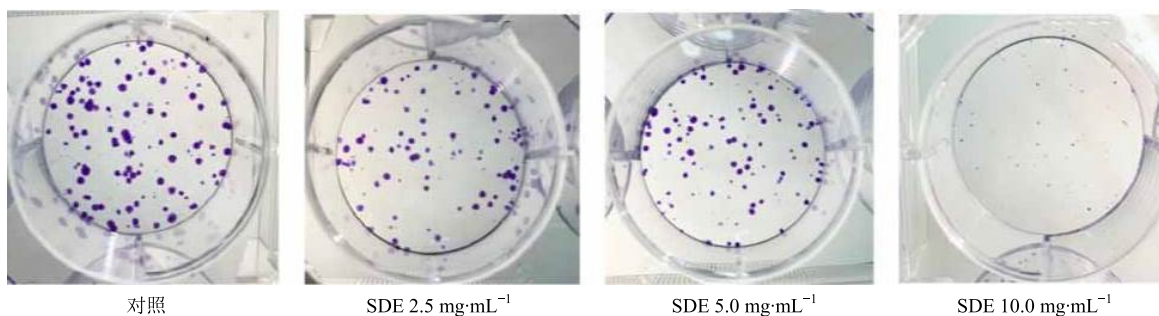


图 3 SDE 对 MDA-MB-468 细胞克隆形成能力的影响

Fig. 3 Effect of SDE on clonality of MDA-MB-468 cells

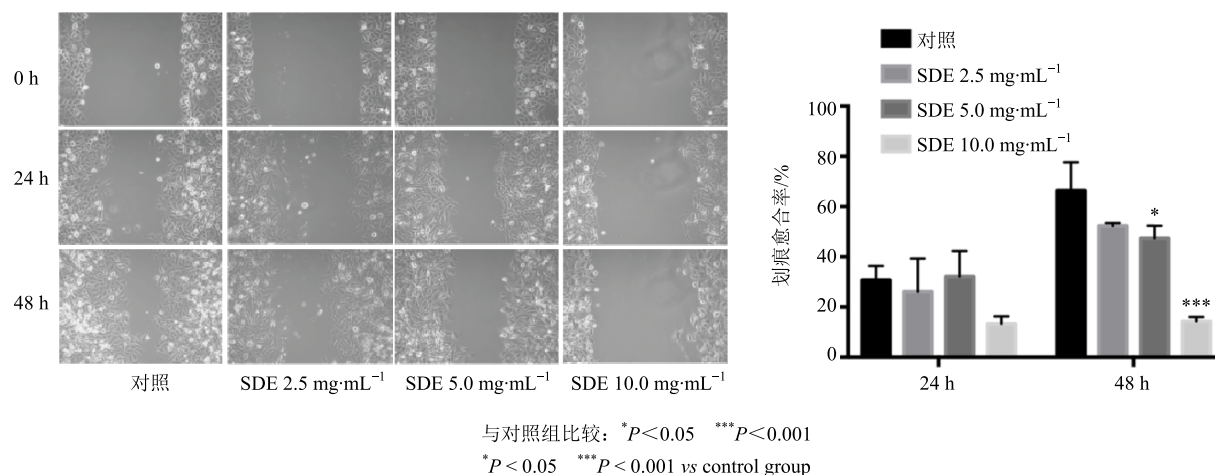


图 4 SDE 对 MDA-MB-468 细胞迁移的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 4 Effect of different concentrations of SDE on migration of MDA-MB-468 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.3 SDE 对 MDA-MB-468 细胞迁移的影响

实验结果显示 (图 4), 在划痕后 48 h, 与对照组比较, SDE 5、10 mg/mL 组细胞划痕愈合能力明显减弱 ($P < 0.05$ 、 0.001)。表明 SDE 有抑制 MDA-MB-468 细胞迁移的作用, 且呈质量浓度依赖性。

3.4 SDE 对 MDA-MB-468 细胞凋亡的影响

Hoechst 33342 染色结果如图 5 所示, 对照组细胞核呈饱满椭圆形, 染色质均匀着色, 而 SDE 各质量浓度组细胞凋亡形态比较明显, 可见染色变深, 明亮。

流式细胞仪检测结果 (图 6) 表明, SDE 作用后, MDA-MB-468 细胞早期凋亡率逐渐增加, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.05$ 、 0.001), 细胞晚期凋亡变化差异不明显。细胞总凋亡率逐渐上升, 呈质量浓度依赖性。

3.5 SDE 对 MDA-MB-468 细胞周期的影响

结果显示, 与对照组比较, SDE 5、10 mg/mL 组 G_2 期细胞明显减少, 且呈质量浓度依赖性 ($P < 0.01$, 图 7)。

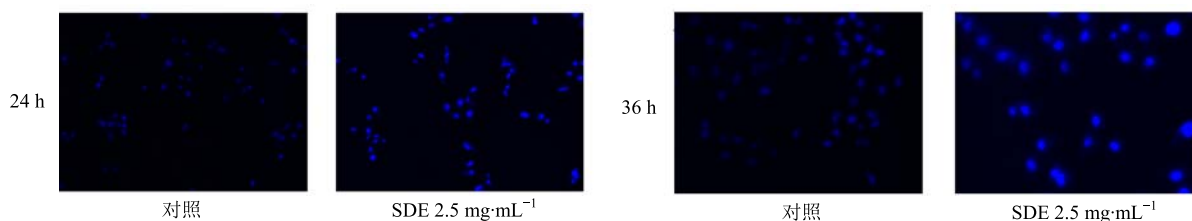
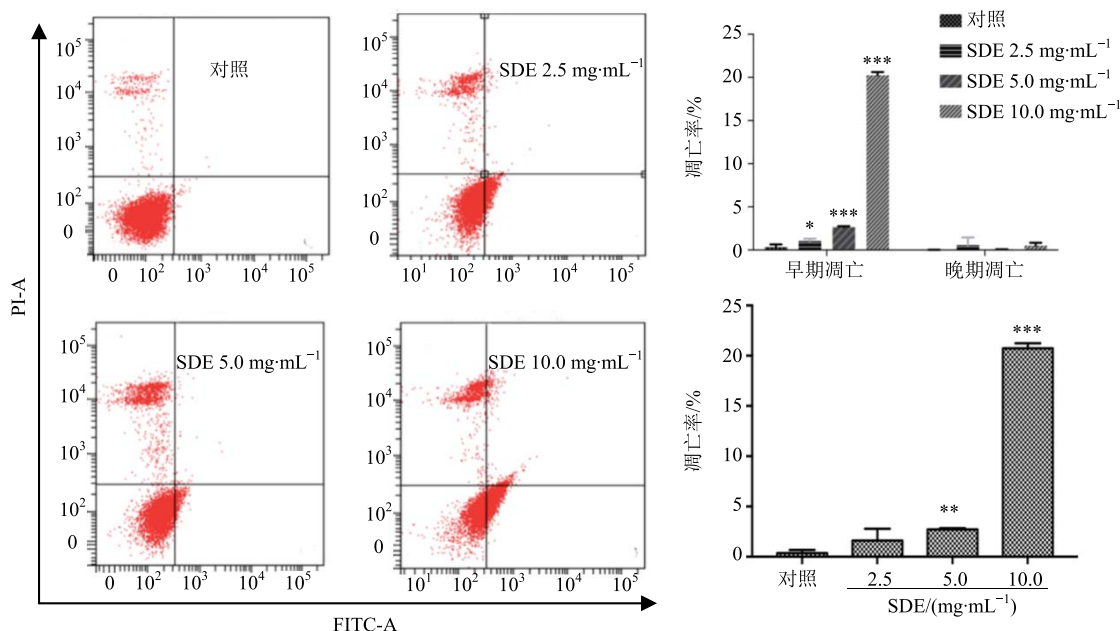


图 5 SDE 对 MDA-MB-468 凋亡的影响 (免疫荧光, $\times 100$)

Fig. 5 Effect of SDE on apoptosis of MDA-MB-468 cells (immunofluorescence, $\times 100$)



与对照组相比: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下图同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group, same as below figures

图 6 SDE 对 MDA-MB-468 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of SDE on apoptosis of MDA-MB-468 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

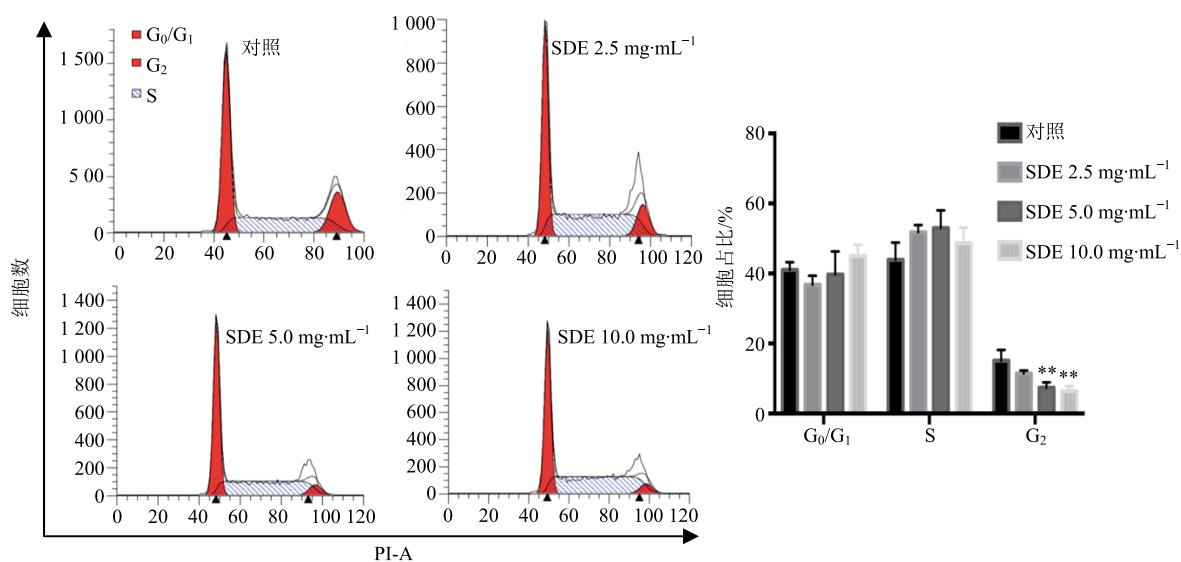


图 7 SDE 对 MDA-MB-468 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of SDE on cell cycle of MDA-MB-468 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.6 SDE 对 MDA-MB-468 细胞中 STAT3 蛋白表达的影响

结果显示,与对照组比较,SDE 不同质量浓度处理后,细胞内 STAT3 蛋白表达水平均降低,且呈质量浓度依赖性 ($P < 0.05$, 图 8)。

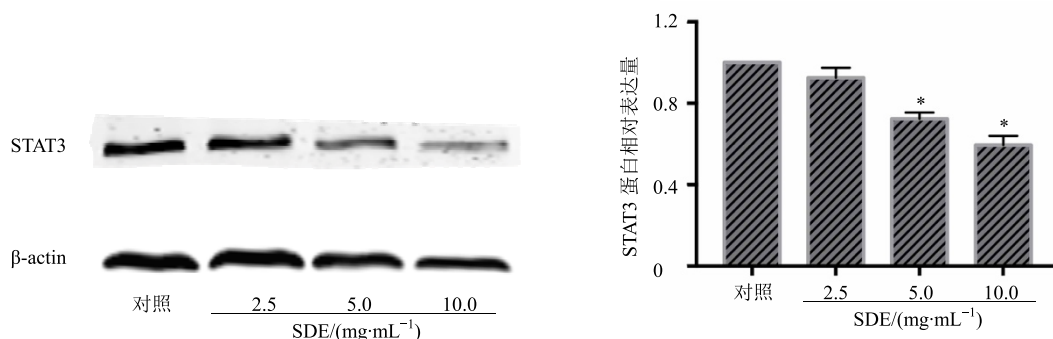


图 8 SDE 对 MDA-MB-468 细胞中 STAT3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effect of SDE on protein expression of STAT3 in MDA-MB-468 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

剂局方》,是中医重要的补益剂,具有补气、益气健脾之功效。其组成包括人参、白术、茯苓、炙甘草 4 味中药,主要化学成分是皂苷类、黄酮类、多糖类及其他成分,具有调节胃肠功能、提高机体免疫力、抗肿瘤、抗疲劳及抗衰老等药理作用^[12]。中药对于乳腺癌辅助治疗以益气健脾为主,临床实验表明,四君子汤能减少乳腺癌术后不良反应,增强患者免疫力^[6,13-14]。研究表明,四君子汤能抑制多种肿瘤的增殖,促进肿瘤细胞凋亡^[15-17]。本研究通过水煎、浓缩、干燥等一系列方法提取四君子汤,最大程度上与实际服用类似。通过 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 对 SDE 进行质控。本研究结果表明,SDE 对 MDA-MB-468 细胞的增殖有抑制作用,且随着质量浓度增高、作用时间延长抑制作用越明显。同样,克隆形成实验证实 SDE 能够抑制 MDA-MB-468 细胞的克隆形成能力,并且高剂量组几乎看不到肉眼可见的细胞克隆。Chen 等^[18]研究发现四君子汤中的人参皂苷能够抑制 MDA-MB-231 细胞的迁移。本实验在 MDA-MB-468 细胞中也得出了同样的结果。Hoechst 33342 染色和流式细胞仪检测结果表明 SDE 能够促进 MDA-MB-468 细胞凋亡,尤其是早期凋亡。细胞周期检测结果表明 SDE 能够减少 G₂ 期细胞比率。有研究表明四君子汤能将小鼠的肿瘤细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期,诱导肿瘤细胞凋亡^[19]。

STAT3 是一种存在于细胞浆中的转录因子,是酪氨酸磷酸化激活的 STATs 的家族成员之一,其参与了细胞增殖、迁移、凋亡一系列过程^[20]。研究表

4 讨论

中医治疗是世界范围内最广泛使用的癌症患者辅助疗法之一。中药通过抑制肿瘤增殖、预防并发症、改善生活质量和减少不良反应,在癌症治疗中发挥重要作用^[9-11]。四君子汤出自《太平惠民和

明,STAT3 与 TNBC 关系密切,超过 80% 的 TNBC 均会表达 STAT3^[21]。本研究检测 SDE 处理后 MDA-MB-468 细胞中 STAT3 蛋白的表达水平,结果表明 SDE 能够显著降低细胞中 STAT3 蛋白表达水平,表明其可能通过调控 STAT3 从而影响 MDA-MB-468 细胞的增殖、迁移和凋亡。

本研究表明 SDE 能够抑制 MDA-MB-468 细胞增殖,促进其凋亡,并对其迁移和周期产生影响,然而具体作用机制尚需深入探究,并需要进一步通过动物实验进行验证。

参考文献

- [1] Vikas P, Borchering N, Zhang W. The clinical promise of immunotherapy in triple-negative breast cancer [J]. *Cancer Manag Res*, 2018, doi: 10.2147/cmar.S185176.
- [2] Wang K, Li H, Xiong Y, et al. Development and validation of nomograms integrating immune-related genomic signatures with clinicopathologic features to improve prognosis and predictive value of triple-negative breast cancer: A gene expression-based retrospective study [J]. *Cancer Med*, 2019, 8(2): 686-700.
- [3] Waks A G, Winer E P. Breast cancer treatment: A review [J]. *JAMA*, 2019, 321(3): 288-300.
- [4] Yao H, He G, Yan S, et al. Triple-negative breast cancer: Is there a treatment on the horizon? [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(1): 1913-1924.
- [5] 鲍刚, 吴沁航, 高芙蓉, 等. 蓝萼甲素对三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖及细胞周期的影响 [J]. *中草药*, 2019, 50(6): 1419-1423.

- [6] 杨 阳. 加味四君子汤对乳腺癌术后脾气虚型患者症状和生命质量改善的临床研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2013.
- [7] 陈 彦. 加味四君子汤对乳腺癌化疗毒副作用的影响 [J]. 中医药导报, 2009, 15(1): 38-40.
- [8] 陈桂芬. 归芍四君子汤改善围手术期乳腺癌患者皮下积液及免疫功能低下的临床研究 [J]. 中外医疗, 2017, 36(20): 10-13.
- [9] Hong M, Wang N, Tan H, *et al.* MicroRNAs and Chinese medicinal herbs: New possibilities in cancer therapy [J]. *Cancers*, 2015, 7(3): 1643-1657.
- [10] Su C, Wang L, Grant S J, *et al.* Chinese herbal medicine for cancer-related fatigue: A systematic review of randomized clinical trials [J]. *Compl Ther Med*, 2014, 22(3): 567-579.
- [11] Chen C, Lin L, Zhang E. Standardized treatment of Chinese medicine decoction for cancer pain patients with opioid-induced constipation: A multi-center prospective randomized controlled study [J]. *Chin J Integr Med*, 2014, 20(7): 496-502.
- [12] 熊 山, 丁晓晨. 四君子汤化学成分和药理作用研究进展 [J]. 山东医学高等专科学校学报, 2017, 39(5): 371-374.
- [13] 万红霞. 中西医结合防治乳腺癌术后皮下积液和皮瓣坏死 40 例 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2013, 11(20): 54-55.
- [14] 赵 华. 四君子汤联合雷替曲塞和奥沙利铂治疗晚期肝癌的疗效及对免疫功能的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2019, 28(15): 1630-1633.
- [15] 李瑞芝, 马浩清, 金晓董, 等. 加味四君子汤对结肠癌细胞 SW620 增殖和凋亡的影响 [J]. 浙江中医杂志, 2015, 50(7): 487-489.
- [16] 孔沈燕, 杨小红. 四君子汤对脾虚证胃癌 MGC803 细胞周期凋亡及 Caspase-3 表达的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2015, 21(4): 412-415.
- [17] 聂闪闪, 李 洵, 赵玉航, 等. 加味四君子汤含药血清对胃癌细胞 SGC-7901 凋亡相关因子表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(9): 25-30.
- [18] Chen X, Qian L, Jiang H, *et al.* Ginsenoside Rg₃ inhibits CXCR4 expression and related migrations in a breast cancer cell line [J]. *Inter J Clin Oncol*, 2011, 16(5): 519-523.
- [19] 王玉荣, 王泽时. 加味四君子汤诱导小鼠肿瘤细胞凋亡的实验研究 [J]. 山西中医学院学报, 2004, 5(1): 16-18.
- [20] 吴泽奇, 田莎莎. 信号转导与转录因子 STAT3 在乳腺癌中的研究进展 [J]. 基层医学论坛, 2019, 23(22): 3231-3233.
- [21] Jackson J C, Lozano G. TNBC invasion: Downstream of STAT3 [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(13): 20517-20518.