

# 小柴胡汤及其寒热减方对结肠癌细胞增殖、脂肪及碱性磷酸酶的影响

许彬<sup>1</sup>, 梁晓峰<sup>2</sup>, 鲁佳<sup>1</sup>, 刘晓秋<sup>1\*</sup>

(1. 广州中医药大学脾胃研究所, 广州 510405;  
2. 广州中医药大学第一临床学院, 广州 510405)

**[摘要]** **目的:**观察小柴胡汤及其寒热减方对 HCT116 结肠癌细胞增殖、脂肪及碱性磷酸酶的影响,探讨其作用机制。**方法:**分别取小柴胡汤、小柴胡汤去柴胡、小柴胡汤去黄芩、小柴胡汤去半夏、小柴胡汤去生姜煎液不同质量浓度(0.5, 1.0, 1.5 g·L<sup>-1</sup>)培养 HCT116 细胞,另设不加药空白组和秋水仙碱(1.0, 2.5, 10.0 μmol·L<sup>-1</sup>)组。采用噻唑蓝(MTT)比色法检测 HCT116 细胞的增殖活力,苏丹红 IV 染色法检测脂肪,碱性磷酸酶试剂盒检测酶活性,热稳定实验区分组织特异性碱性磷酸酶和组织非特异性碱性磷酸酶(TNAP),肠型碱性磷酸酶特异抑制剂(L-苯丙氨酸)抑制实验,区分组织特异性碱性磷酸酶中的肠碱性磷酸酶(IAP)。**结果:**与空白组比较,小柴胡汤及其寒热减方对 HCT116 结肠癌细胞增殖均有不同程度的抑制作用,小柴胡汤的抑制作用更明显,秋水仙碱组细胞抑制作用最为明显。空白组脂肪累积细胞率显著高于小柴胡汤及其寒热减方 5 组( $P < 0.01$ ),小柴胡汤组脂肪累积细胞率最低( $P < 0.05$ ),小柴胡汤去柴胡组脂肪累积细胞率显著低于小柴胡汤去半夏组和小柴胡汤去生姜组( $P < 0.01$ ),小柴胡汤去黄芩组脂肪累积细胞率显著低于小柴胡汤去半夏组和小柴胡汤去生姜组( $P < 0.01$ ),秋水仙碱组无脂肪累积。小柴胡汤及其寒热减方 5 组细胞内 IAP 酶活性高于 TNAP 活性( $P < 0.01$ );培养液中 TNAP 酶活性高于 IAP 酶活性( $P < 0.01$ )。小柴胡汤去柴胡组细胞内 IAP 酶活性高于小柴胡汤去半夏组和小柴胡汤去生姜组,小柴胡汤去黄芩组细胞内 IAP 酶活性高于小柴胡汤去半夏组和小柴胡汤去生姜组( $P < 0.01$ );在培养液中,小柴胡汤去半夏组和小柴胡汤去生姜组 TNAP 酶活性均高于小柴胡汤去柴胡组( $P < 0.05$ )和小柴胡汤去黄芩组。**结论:**小柴胡汤及其寒热减方均抑制 HCT116 癌细胞增殖,小柴胡汤寒热并用全方抑制作用最强。寒药减方与热药减方对脂肪累积和碱性磷酸酶的影响不同。小柴胡汤中寒药和热药并用,分别作用于 TNAP 和 IAP,调节脂肪转运代谢,从而抑制癌细胞生长。

**[关键词]** 寒热并用; 小柴胡汤; 癌细胞增殖; 脂肪累积; 碱性磷酸酶同工酶

**[中图分类号]** R22; R242; R285.5; R273; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)14-0134-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.20181209

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180327.1320.012.html>

**[网络出版时间]** 2018-03-27 14:19

## Effect of Xiao Chaihutang and Its Cold and Hot Herb-subtracted Formulae on Human Colon Carcinoma Cell Proliferation, Lipid Accumulation and Alkaline Phosphatase

XU Bin<sup>1</sup>, LIANG Xiao-feng<sup>2</sup>, LU Jia<sup>1</sup>, LIU Xiao-qiu<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Spleen and Stomach Research, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 2. The First Clinical College of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effect of Xiao Chaihutang (XCHT) and its cold and hot herb-

**[收稿日期]** 20171028(003)

**[基金项目]** 财政部特色重点学科项目(财教[2013]339号)

**[第一作者]** 许彬,在读硕士,从事调理脾胃中药分子药理及脾胃病证基础研究, Tel:020-36585077, E-mail:13535325831@163.com

**[通信作者]** \* 刘晓秋, 硕士, 副研究员, 从事调理脾胃中药分子药理及脾胃病证基础研究, Tel:020-36585077, E-mail:lxq@gzucm.edu.cn

subtracted formulae on HCT116 human colon carcinoma cell proliferation, lipid accumulation and alkaline phosphatase, and investigate its mechanism. **Method:** HCT116 cells were cultured with XCHT, XCHT-Bupleuri Radix, XCHT-Scutellariae Radix, XCHT-Pinelliae Rhizoma, and XCHT-Zingiberis Rhizoma Recens at final drug concentrations of 0.5, 1.0, 1.5 g·L<sup>-1</sup>, and in addition, another blank control group and colchicine positive control groups (1.0, 2.5, 10.0 μmol·L<sup>-1</sup>) were set in this study. The proliferation viability of HCT116 cells was detected by 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay; the lipid accumulation was detected by Sudan red IV staining; alkaline phosphatase kit was used to detect the enzyme activity; heat stable test was used to distinguish tissue specific alkaline phosphatase and tissue non-specific alkaline phosphatase (TNAP), and intestinal alkaline phosphatase specific inhibitor (*L*-phenylalanine) inhibition test was used to distinguish intestinal alkaline phosphatase (IAP) in tissue specific alkaline phosphatase. **Result:** As compared with blank control group, XCHT and its cold and hot herb-subtracted formulae all had obvious inhibitory effect on the cell proliferation activity of HCT116 human colon carcinoma cells and the inhibitory effect of XCHT was more obvious. The inhibitory effect was most obvious in colchicine positive control groups. The cell percentage of lipid accumulation in blank control group was significantly higher than that in XCHT and its cold and hot herb-subtracted formulae groups ( $P < 0.01$ ), and the cell percentage of lipid accumulation was lowest in XCHT group ( $P < 0.05$ ). The cell percentage of lipid accumulation in XCHT-Bupleuri Radix group was significantly lower than that in XCHT-Pinelliae Rhizoma group and XCHT-Zingiberis Rhizoma Recens group ( $P < 0.01$ ). The cell percentage of lipid accumulation in XCHT-Scutellariae Radix was significantly lower than that in XCHT-Pinelliae Rhizoma group and XCHT-Zingiberis Rhizoma Recens group ( $P < 0.01$ ), and there was no lipid accumulation in the colchicine positive control groups. The IAP activity was higher than TNAP activity in all the five XCHT and its cold and hot herb-subtracted formulae groups ( $P < 0.01$ ), and the TNAP activity was higher than IAP activity in culture medium ( $P < 0.01$ ). The IAP activity in cells of XCHT-Bupleuri Radix group was higher than that in XCHT-Pinelliae Rhizoma group and XCHT-Zingiberis Rhizoma Recens group, and the IAP activity in XCHT-Scutellariae Radix group was higher than that in XCHT-Pinelliae Rhizoma group and XCHT-Zingiberis Rhizoma Recens group ( $P < 0.01$ ). In the culture medium, the TNAP activity in XCHT-Pinelliae Rhizoma group and XCHT-Zingiberis Rhizoma Recens group was higher than that in XCHT-Bupleuri Radix group ( $P < 0.05$ ) and XCHT-Scutellariae Radix. **Conclusion:** XCHT and its cold and hot herb-subtracted formulae can effectively inhibit HCT116 human colon carcinoma cell proliferation and XCHT (a combination use of cold and hot herbs) exhibited the strongest inhibitory effect. There was a significant difference between the effect of cold herb-subtracted formulae and hot herb-subtracted formulae on lipid accumulation and alkaline phosphatase. A combination use of cold and hot herbs in XCHT, could act on TNAP and IAP respectively, and regulate fat transport and metabolism, thus inhibiting the growth of cancer cells.

[ **Key words** ] a combination use of cold and hot herbs; Xiao Chaihutang; cancer cell proliferation; lipid accumulation; alkaline phosphatase isoenzymes

结直肠癌是全世界第三大常见的恶性肿瘤,且其发病率以每年 1.2% 的速度逐年上升<sup>[1]</sup>。在中国,结直肠癌的发病率也呈上升趋势,截止 2010 年我国结直肠癌新发病例数已超过 27 万,死亡病例高达 13 万以上<sup>[2-3]</sup>。碱性磷酸酶(AP)是个古老的指标,随着研究水平和研究技术的提高,对它有了新的研究成果,研究发现碱性磷酸酶与癌症有着密切的联系,RAO 等<sup>[4]</sup>在研究转移性前列腺癌时发现,肿瘤产生的碱性磷酸酶能调节前列腺癌细胞的生长、

上皮间质转化及转移性前列腺癌患者无病生存。碱性磷酸酶同工酶与脂肪累积有着不一样的关系,研究证明组织非特异性碱性磷酸酶(TNAP)增加脂肪累积<sup>[5]</sup>,而肠碱性磷酸酶(IAP)参与脂质的转运和吸收,抑制脂肪累积<sup>[6-8]</sup>。脂肪是细胞的主要组成部分,它对膜的流动性、细胞分化、增殖和凋亡有着重要的作用<sup>[9-11]</sup>。研究发现脂肪累积和癌症发生发展密切相关<sup>[12-13]</sup>。目前已有研究证明靶向治疗脂质代谢是一种很有前途的癌症治疗策略<sup>[14]</sup>。

本课题组以往研究发现,小柴胡汤能降低四氯化碳/乙醇诱发小鼠肝癌时的死亡率和肝癌发生率<sup>[15]</sup>;小柴胡汤通过升高原发性肝癌患者血清总氧化抵抗,调节整体血清氧化还原微环境,改善血清高密度脂蛋白(HDL)和低密度脂蛋白(LDL)氧化抵抗<sup>[16]</sup>。小柴胡汤治疗结肠癌研究报道较少,早期蔡幼清<sup>[17]</sup>研究了小柴胡汤对1,2-二甲胍诱发大鼠结肠癌的DNA-合成酶活性的作用;近期有戴春山等<sup>[18]</sup>在研究加味小柴胡汤治疗老年癌性发热的研究中有涉及结肠癌。小柴胡汤为寒热并用经典名方,即寒凉药与温热药在同一方剂内使用,可使具有相反药效的两类中药用以治疗寒热错杂的病证。“热者寒之,寒者热之”,在中医的理论体系中是最基本的治疗法则。但是临床实际中常因为致病因素多种多样,导致病情复杂、寒热并见证候常见,若单投寒凉或温热的药物无法达到治病除根的目的,故寒热并用才是明智之举。因此,本研究基于以上研究成果及中医药理论,以人结肠癌细胞系HCT116为研究对象,探讨小柴胡汤及其寒热减方对其细胞增殖、脂肪及碱性磷酸酶及其同工酶(IAP, TNAP)的影响,为临床小柴胡汤寒热并用组方作用机制及药效机制提供理论依据。

## 1 材料

**1.1 细胞系** 人结肠癌细胞系HCT116购于上海中科院细胞库,编号BNCC337692。

**1.2 药物与试剂** 小柴胡汤及其寒热减方所用药材饮片皆购于广州中医药大学门诊部中药房,均由广州中医药大学中药鉴定教研室周诚教授鉴定属正品;RPMI 1640培养基,胎牛血清(美国Gibco公司,批号分别为31800-022,12657-029);秋水仙碱(日本Wako Pure公司,批号051-08411);噻唑蓝(MTT,美国Sigma公司,批号1502284);二甲基亚砜(DMSO,广州威佳科技有限公司,批号1260112);苏丹红IV(上海海洋生物技术有限公司,批号201007);碱性磷酸酶(AKP)测试盒,L-苯丙氨酸(广州健阳生物科技有限公司,批号分别为20170927,201608)。

**1.3 仪器** 3110型CO<sub>2</sub>恒温细胞培养箱(Thermo Fisher Scientific公司);SW-CJ-1FD型超净工作台(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司);00017902型多功能酶标仪(瑞士Tecan公司);TH4-200型倒置相差显微镜(美国Olympus公司)。

## 2 方法

**2.1 药物制备**<sup>[19]</sup> 小柴胡汤复方:柴胡20 g,党参10 g,清半夏10 g,黄芩10 g,甘草5 g,生姜9片,大

枣6枚,加蒸馏水300 mL,水煮,煮沸后再煎15 min,6层纱布过滤药液;加蒸馏水300 mL再煎,煮沸后再煎15 min,6层纱布过滤药液,合并2次所得药液,置蒸发皿中蒸发干燥,收集所得药粉。小柴胡汤去柴胡复方制备、小柴胡汤去黄芩复方制备、小柴胡汤去半夏复方制备、小柴胡汤去干姜复方制备,分别在小柴胡汤方去除相应中药后,同小柴胡汤复方制备。各复方取粉末5 g置于蒸馏水50 mL中,4℃搅拌过夜;次日3 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min取上清,用0.2 μm过滤器过滤除菌,4℃保存备用。本研究依据药性将小柴胡汤去柴胡组、小柴胡汤去黄芩组划分为寒药减方组,小柴胡汤去半夏组、小柴胡汤去生姜组为热药减方组。

**2.2 细胞培养及加药** 取对数生长期的细胞按照1×10<sup>3</sup>个/孔接种在96孔板中,设置小柴胡汤组、小柴胡汤去柴胡组、小柴胡汤去黄芩组、小柴胡汤去半夏组、小柴胡汤去生姜组、秋水仙碱组、溶剂组(未经处理的细胞)和空白组(只有培养基),加药各组分分为3个浓度(中药为0.5,1.0,1.5 g·L<sup>-1</sup>;秋水仙碱为1.0,2.5,10.0 μmol·L<sup>-1</sup>),每个浓度设置3个复孔,按此分组每孔加入细胞悬浮液100 μL至相应的孔中,放入CO<sub>2</sub>恒温细胞培养箱培养。待细胞贴壁且融合至70%~80%,按孔加入相应的药物,100 μL/孔,放置培养箱中培养,分别于24,48,72 h进行检测。另取24孔板接种细胞(不设置空白组),接种密度为4×10<sup>3</sup>个/孔,按照以上分组每孔加入细胞悬浮液1 mL培养,进行药物干预,于72 h进行检测。

**2.3 MTT比色法检测细胞活力** 取出经不同处理的96孔板,每孔加入5 g·L<sup>-1</sup> MTT溶液10 μL,在培养箱内孵育4 h后吸去孔内培养液;加入DMSO,100 μL/孔,置摇床上低速振荡10 min,多功能酶标仪检测570 nm处各孔吸光度A。

**2.4 苏丹红IV脂肪染色**<sup>[20]</sup> 取经不同处理的24孔板细胞,弃培养基,磷酸盐缓冲液(PBS)洗1次,加入4%多聚甲醛固定细胞30 min后弃多聚甲醛,PBS洗2次;加入苏丹红IV染液,室温下孵育1 h,弃苏丹红IV染液,PBS洗去多余染料;显微镜下观察,并拍照记录。各组细胞经脂肪染色后,在显微镜下数100个细胞中已染色的细胞,随机取3个独立实验,计算脂肪累积细胞率。

**2.5 碱性磷酸酶及其同工酶活性检测** 按碱性磷酸酶试剂盒检测碱性磷酸酶活性,通过热稳定性实验<sup>[21-22]</sup>区分组织特异性碱性磷酸酶同工酶

(TSAP) 和 TNAP, 酶标本溶液在 60 °C 下预热 15 min, 再按碱性磷酸酶试剂盒检测酶活性。60 °C 处理样品的碱性磷酸酶活性与相应的未处理样品的碱性磷酸酶活性比较, TSAP 同工酶包括 IAP 和胎盘型碱性磷酸酶, 是热稳定的, TNAP 是热不稳定的。通过 IAP 特异抑制剂(L-苯丙氨酸)抑制实验<sup>[23]</sup>, 区分 TSAP 中的 IAP, 酶反应体系加入 20 mmol·L<sup>-1</sup> 苯丙氨酸孵育 15 min, 再按碱性磷酸酶试剂盒检测酶活性。

### 2.6 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计

分析, 实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析检验,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 小柴胡汤及其寒热减方对 HCT116 细胞增殖的影响

与空白组比较, 中药组细胞增殖活力降低, 且随着作用时间的延长和浓度的增加, 48 h 时各中药 1.5 g·L<sup>-1</sup> 组, 72 h 时细胞各中药 0.5, 1.0, 1.5 g·L<sup>-1</sup> 组及秋水仙碱组增殖活力显著降低 ( $P < 0.01$ ), 因此选取 1.5 g·L<sup>-1</sup> 作为各中药继续实验的质量浓度。见表 1。

表 1 小柴胡汤及其寒热减方对 HCT116 结肠癌细胞增殖活力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Effect of Xiao Chaihutang and its cold and hot herb-subtracted formulae on HCT116 human colon carcinoma cell proliferation activity ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ ) %

组别	浓度	24 h 细胞增殖活力	48 h 细胞增殖活力	72 h 细胞增殖活力
空白	-	100	100	100
小柴胡汤	0.5 g·L <sup>-1</sup>	108.96 ± 20.00	86.47 ± 6.06	71.35 ± 11.37 <sup>1)</sup>
	1.0 g·L <sup>-1</sup>	85.42 ± 16.16	72.83 ± 9.31	40.75 ± 6.94 <sup>1)</sup>
	1.5 g·L <sup>-1</sup>	101.33 ± 12.23	73.77 ± 5.99 <sup>1)</sup>	36.24 ± 3.32 <sup>1)</sup>
小柴胡汤去柴胡	0.5 g·L <sup>-1</sup>	96.35 ± 11.55	87.87 ± 2.61	63.57 ± 15.49 <sup>1)</sup>
	1.0 g·L <sup>-1</sup>	87.54 ± 15.69	65.43 ± 8.54	51.32 ± 4.60 <sup>1)</sup>
	1.5 g·L <sup>-1</sup>	82.71 ± 3.79	57.82 ± 8.78 <sup>1)</sup>	34.56 ± 3.31 <sup>1)</sup>
小柴胡汤去黄芩	0.5 g·L <sup>-1</sup>	87.81 ± 2.81	74.35 ± 10.74	59.33 ± 10.33 <sup>1)</sup>
	1.0 g·L <sup>-1</sup>	88.14 ± 1.93	63.93 ± 6.09	54.44 ± 1.97 <sup>1)</sup>
	1.5 g·L <sup>-1</sup>	98.39 ± 12.49	67.69 ± 7.94 <sup>1)</sup>	46.24 ± 2.32 <sup>1)</sup>
小柴胡汤去半夏	0.5 g·L <sup>-1</sup>	101.97 ± 2.48	94.61 ± 9.45	63.52 ± 3.65 <sup>1)</sup>
	1.0 g·L <sup>-1</sup>	97.06 ± 6.68	85.88 ± 14.86	54.50 ± 3.57 <sup>1)</sup>
	1.5 g·L <sup>-1</sup>	90.55 ± 12.69	67.53 ± 9.16 <sup>1)</sup>	41.57 ± 2.77 <sup>1)</sup>
小柴胡汤去生姜	0.5 g·L <sup>-1</sup>	96.82 ± 8.40	86.60 ± 12.14	61.56 ± 4.68 <sup>1)</sup>
	1.0 g·L <sup>-1</sup>	91.85 ± 3.78	80.78 ± 8.29	54.98 ± 2.31 <sup>1)</sup>
	1.5 g·L <sup>-1</sup>	98.81 ± 3.67	75.65 ± 5.88 <sup>1)</sup>	41.44 ± 4.57 <sup>1)</sup>
秋水仙碱	1.0 μmol·L <sup>-1</sup>	77.34 ± 12.88 <sup>1)</sup>	52.81 ± 6.59 <sup>1)</sup>	39.44 ± 19.67 <sup>1)</sup>
	2.5 μmol·L <sup>-1</sup>	33.48 ± 11.17 <sup>1)</sup>	17.76 ± 9.86 <sup>1)</sup>	4.49 ± 2.48 <sup>1)</sup>
	10.0 μmol·L <sup>-1</sup>	28.36 ± 5.18 <sup>1)</sup>	16.68 ± 4.86 <sup>1)</sup>	5.51 ± 4.20 <sup>1)</sup>

注: 与空白组同时时间点比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ 。

#### 3.2 小柴胡汤及其寒热减方对 HCT116 细胞脂肪累积的影响

与空白组比较, 中药组脂肪累积较少。与小柴胡汤组比较, 其余 4 组中药组脂肪累积较多。与小柴胡汤去柴胡组、小柴胡汤去黄芩组比较, 小柴胡汤去半夏组和小柴胡汤去生姜组脂肪累积增多。秋水仙碱组的癌细胞没有明显脂肪堆积, 癌细胞存活显著下降, 且随着浓度的增加, 细胞数量急剧下降或消失。见图 1。

与空白组比较, 各中药组脂肪累积细胞率显著降低 ( $P < 0.01$ )。与小柴胡汤组比较, 其余各中药组脂肪累积细胞率明显升高 ( $P < 0.05$ )。与小柴胡汤去柴胡组、小柴胡汤去黄芩组比较, 小柴胡汤去半夏组和小柴胡汤去生姜组脂肪累积细胞率显著升高 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

#### 3.3 小柴胡汤及其寒热减方对 HCT116 细胞及其培养液碱性磷酸酶及其同工酶的影响

与空白组比

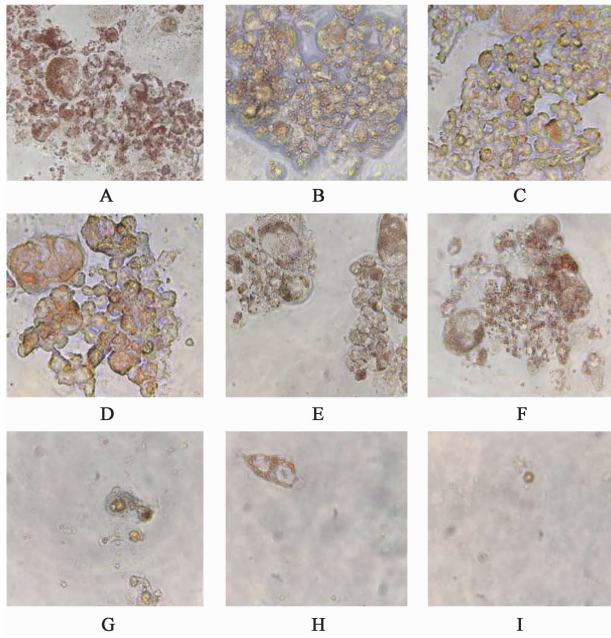


图 1 小柴胡汤及其寒热减方作用 HCT116 结肠癌细胞 72 h 后对脂肪积累的影响 (苏丹红 IV,  $\times 10$ )  
A. 空白组; B. 小柴胡汤 ( $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 组; C. 小柴胡汤去柴胡 ( $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 组; D. 小柴胡汤去黄芩 ( $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 组; E. 小柴胡汤去半夏 ( $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 组; F. 小柴胡汤去生姜 ( $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 组; G. 秋水仙碱 ( $1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 组; H. 秋水仙碱 ( $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 组; I. 秋水仙碱 ( $10.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 组

图 1 小柴胡汤及其寒热减方作用 HCT116 结肠癌细胞 72 h 后对脂肪积累的影响 (苏丹红 IV,  $\times 10$ )

Fig. 1 Effect of Xiao Chaihutang and its cold and hot herb-subtracted formulae on lipid accumulation after 72 h treatment of HCT116 human colon carcinoma cells (tonyred IV,  $\times 10$ )

表 2 小柴胡汤及其寒热减方对 HCT116 结肠癌细胞脂肪积累的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effect of Xiao Chaihutang and its cold and hot herb-subtracted formulae on lipid accumulation in HCT116 human colon carcinoma cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	脂肪积累细胞率/%
空白	-	88.33 $\pm$ 7.02
小柴胡汤	1.5	35.67 $\pm$ 4.93 <sup>1)</sup>
小柴胡汤去柴胡	1.5	50.67 $\pm$ 7.64 <sup>1,2)</sup>
小柴胡汤去黄芩	1.5	49.33 $\pm$ 3.06 <sup>1,2)</sup>
小柴胡汤去半夏	1.5	69.67 $\pm$ 8.50 <sup>1,2,3,4)</sup>
小柴胡汤去生姜	1.5	69.00 $\pm$ 4.00 <sup>1,2,3,4)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与小柴胡汤组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ;与小柴胡汤去柴胡组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ ;与小柴胡汤去黄芩组比较<sup>4)</sup>  $P < 0.01$ 。

较,各中药组细胞内的碱性磷酸酶总体酶活性升高 ( $P < 0.01$ ), TASP 酶活性升高 ( $P < 0.01$ )。与同组细胞内 TASP 酶活性比较,各中药组 TNAP 酶活性降低 ( $P < 0.01$ )。见表 3。与空白组比较,小柴胡汤

去黄芩组、小柴胡汤去半夏组、小柴胡汤去生姜组培养液中碱性磷酸酶总体酶活性, TNAP 酶活性升高 ( $P < 0.01$ ), 小柴胡汤去柴胡组、小柴胡汤去半夏组、小柴胡汤去生姜组培养液中 TASP 酶活性升高 ( $P < 0.01$ )。与同组培养液中 TSAP 酶活性比较,各中药组 TNAP 酶活性升高 ( $P < 0.01$ ), 见表 4。细胞内和培养液中 TSAP 主要是 IAP, 见表 5, 6。

表 3 小柴胡汤及其寒热减方对细胞碱性磷酸酶同工酶 TSAP, TNAP 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effect of Xiao Chaihutang and its cold and hot herb-subtracted formulae on cell alkaline phosphatase isoenzymes (TSAP and TNAP) ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	37 °C 孵育碱性磷酸酶活性	60 °C 孵育-TSAP 活性	TNAP 活性
空白	-	0.60 $\pm$ 0.10	0.47 $\pm$ 0.12	0.13 $\pm$ 0.06
小柴胡汤	1.5	20.67 $\pm$ 4.25 <sup>1)</sup>	17.63 $\pm$ 2.56 <sup>1)</sup>	3.03 $\pm$ 1.70 <sup>2)</sup>
小柴胡汤去柴胡	1.5	21.97 $\pm$ 0.55 <sup>1)</sup>	21.00 $\pm$ 0.67 <sup>1)</sup>	0.97 $\pm$ 0.76 <sup>2)</sup>
小柴胡汤去黄芩	1.5	46.23 $\pm$ 2.04 <sup>1)</sup>	35.70 $\pm$ 5.51 <sup>1)</sup>	10.5 $\pm$ 7.46 <sup>2)</sup>
小柴胡汤去半夏	1.5	20.53 $\pm$ 1.27 <sup>1)</sup>	17.80 $\pm$ 0.35 <sup>1)</sup>	2.73 $\pm$ 1.47 <sup>2)</sup>
小柴胡汤去生姜	1.5	17.10 $\pm$ 0.17 <sup>1)</sup>	16.77 $\pm$ 0.25 <sup>1)</sup>	0.33 $\pm$ 0.42 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与同组 TASP 比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$  (表 4 同)。

表 4 小柴胡汤及其寒热减方对培养液碱性磷酸酶及其同工酶 TSAP, TNAP 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effect of Xiao Chaihutang and its cold and hot herb-subtracted formulae on alkaline phosphatase isoenzymes (TSAP and TNAP) in culture medium ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	37 °C 孵育碱性磷酸酶活性	60 °C 孵育-TSAP 活性	TNAP
空白	-	33.67 $\pm$ 2.31	13.67 $\pm$ 0.58	20.00 $\pm$ 2.65
小柴胡汤	1.5	38.67 $\pm$ 1.54	14.33 $\pm$ 0.58	24.33 $\pm$ 1.53 <sup>2)</sup>
小柴胡汤去柴胡	1.5	41.67 $\pm$ 0.58	15.67 $\pm$ 0.58 <sup>1)</sup>	26.33 $\pm$ 0.58 <sup>2)</sup>
小柴胡汤去黄芩	1.5	47.33 $\pm$ 0.58 <sup>1)</sup>	15.33 $\pm$ 0.58	31.67 $\pm$ 0.58 <sup>1,2)</sup>
小柴胡汤去半夏	1.5	53.67 $\pm$ 0.58 <sup>1)</sup>	18.33 $\pm$ 0.58 <sup>1)</sup>	35.67 $\pm$ 0.58 <sup>1,2)</sup>
小柴胡汤去生姜	1.5	56.00 $\pm$ 12.49 <sup>1)</sup>	20.00 $\pm$ 2.00 <sup>1)</sup>	36.00 $\pm$ 10.58 <sup>1,2)</sup>

在细胞内,与空白组比较,各中药组 IAP 酶活性升高 ( $P < 0.01$ )。与小柴胡汤组比较,小柴胡汤去黄芩组 IAP 酶活性升高 ( $P < 0.01$ )。与小柴胡汤去柴胡组比较,小柴胡汤去黄芩组 IAP 酶活性升高 ( $P < 0.01$ )。与小柴胡汤去黄芩组比较,小柴胡汤去半夏组和小柴胡汤去生姜组 IAP 酶活性降低 ( $P < 0.01$ )。各组细胞内 TNAP 酶活性显著低于

表 5 小柴胡汤及其寒热减方对细胞碱性磷酸酶同工酶肠型碱性磷酸酶 IAP 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

**Table 5 Effect of Xiao Chaihutang and its cold and hot herb-subtracted formulae on of cell alkaline phosphatase isoenzymes IAP ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )**

U · g<sup>-1</sup>

组别	质量浓度 /g · L <sup>-1</sup>	60 °C 孵育-TSAP 活性	无抑制剂碱性磷酸酶活性	加 IAP 抑制剂 剩余酶活性	IAP
空白	-	0.47 ± 0.12	0.60 ± 0.10	0.17 ± 0.06	0.43 ± 0.06
小柴胡汤	1.5	17.63 ± 2.56	19.10 ± 2.77	1.57 ± 2.37	17.53 ± 4.45
小柴胡汤去柴胡	1.5	21.00 ± 0.67	21.63 ± 1.17	1.07 ± 1.08	20.57 ± 0.55
小柴胡汤去黄芩	1.5	35.70 ± 5.51	45.10 ± 4.12	11.70 ± 8.60	33.40 ± 9.92
小柴胡汤去半夏	1.5	17.80 ± 0.35	18.53 ± 0.29	2.37 ± 1.78	16.17 ± 1.67
小柴胡汤去生姜	1.5	16.77 ± 0.25	17.17 ± 0.21	0.67 ± 0.98	16.50 ± 1.14

表 6 小柴胡汤及其寒热减方对培养液碱性磷酸酶同工酶 IAP 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

**Table 6 Effect of Xiao Chaihutang and its cold and hot formulae on activity-inhibition of alkaline phosphatase isoenzyme IAP in culture medium ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )**

U · g<sup>-1</sup>

组别	质量浓度 /g · L <sup>-1</sup>	60 °C 孵育-TSAP 活性	无抑制剂碱性磷酸酶活性	加 IAP 抑制剂 剩余酶活性	IAP
空白	-	13.67 ± 0.58	35.00 ± 1.73	31.33 ± 1.15	3.67 ± 0.58
小柴胡汤	1.5	14.33 ± 0.58	37.67 ± 0.58	24.00 ± 1.00	13.67 ± 0.58
小柴胡汤去柴胡	1.5	15.67 ± 0.58	44.67 ± 0.58	30.67 ± 1.15	14.00 ± 1.73
小柴胡汤去黄芩	1.5	15.33 ± 0.58	44.67 ± 1.15	29.33 ± 0.58	15.33 ± 0.58
小柴胡汤去半夏	1.5	18.33 ± 0.58	52.33 ± 7.51	35.67 ± 7.23	16.67 ± 0.58
小柴胡汤去生姜	1.5	20.00 ± 2.00	54.67 ± 0.58	38.33 ± 0.58	16.33 ± 0.58

IAP 酶活性 ( $P < 0.01$ )。见表 7。

表 7 小柴胡汤及其寒热减方对 HCT116 结肠癌细胞内碱性磷酸酶同工酶的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

**Table 7 Effect of Xiao Chaihutang and its cold and hot herb-subtracted formulae on HCT116 human colon carcinomal alkaline phosphatase isoenzyme ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )**

U · g<sup>-1</sup>

组别	质量浓度 /g · L <sup>-1</sup>	TNAP	IAP
空白	-	0.13 ± 0.06	0.43 ± 0.06
小柴胡汤	1.5	3.03 ± 1.70	17.53 ± 4.45 <sup>1,5)</sup>
小柴胡汤去柴胡	1.5	0.97 ± 0.76	20.57 ± 0.55 <sup>1,5)</sup>
小柴胡汤去黄芩	1.5	10.53 ± 7.46	33.40 ± 9.92 <sup>1,2,3,5)</sup>
小柴胡汤去半夏	1.5	2.73 ± 1.47	16.17 ± 1.67 <sup>1,4,5)</sup>
小柴胡汤去生姜	1.5	0.33 ± 0.42	16.50 ± 1.14 <sup>1,4,5)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与小柴胡汤组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与小柴胡汤去柴胡组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ ;与小柴胡汤去黄芩组比较<sup>4)</sup>  $P < 0.01$ ;与同组 TNAP 比较<sup>5)</sup>  $P < 0.01$ 。

在培养液中,与空白组比较,小柴胡汤去黄芩组、小柴胡汤去半夏组、小柴胡汤去生姜组培养液中 TNAP,各中药组 IAP 酶活性均升高 ( $P < 0.01$ )。与小柴胡汤组、小柴胡汤去柴胡组比较,小柴胡汤去半夏组和小柴胡汤去生姜组培养液中 TNAP 活性升高 ( $P < 0.01$ )。各组 TNAP 酶活性均高于 IAP 酶活性

( $P < 0.01$ )。见表 8。

表 8 小柴胡汤及其寒热减方对 HCT116 结肠癌细胞培养液中碱性磷酸酶同工酶的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

**Table 8 Effect of Xiao Chaihutang and its cold and hot herb-subtracted formulae on HCT116 human colon carcinoma culture medium alkaline phosphatase isoenzyme ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )**

U · g<sup>-1</sup>

组别	质量浓度 /g · L <sup>-1</sup>	TNAP	IAP
空白	-	20.00 ± 2.65	3.67 ± 0.58
小柴胡汤	1.5	24.33 ± 1.53	13.67 ± 0.58 <sup>1,4)</sup>
小柴胡汤去柴胡	1.5	26.33 ± 0.58	14.00 ± 1.73 <sup>1,4)</sup>
小柴胡汤去黄芩	1.5	31.67 ± 0.58 <sup>1)</sup>	15.33 ± 0.58 <sup>1,4)</sup>
小柴胡汤去半夏	1.5	35.67 ± 0.58 <sup>1,2,3)</sup>	16.67 ± 0.58 <sup>1,4)</sup>
小柴胡汤去生姜	1.5	36.00 ± 10.58 <sup>1,2,3)</sup>	16.33 ± 0.58 <sup>1,4)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与小柴胡汤组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与小柴胡汤去柴胡组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ;与各组 TNAP 比较<sup>4)</sup>  $P < 0.01$ 。

#### 4 讨论

小柴胡汤出自医圣张仲景的《伤寒论》中,原方由柴胡、黄芩、半夏、生姜、人参、大枣、炙甘草组成。将小柴胡汤用于治疗结肠癌的研究及报道甚少。大肠癌是全世界与癌症相关死亡常见的第 4 原因<sup>[24]</sup>,其死亡率占有恶性肿瘤的 9%<sup>[25]</sup>。因此本

研究将目光放在小柴胡汤及其寒热减方对人结肠癌细胞 HCT116 细胞系的影响,并探讨其产生影响的机制。

小柴胡汤是寒热并用,从病邪方面看,少阳病证,邪气踞于少阳,即有入里化热之机,又有外出走表之势,邪正相争,势均力敌,既不能里入,又不能表出;故以苦寒黄芩清半里之热,以辛凉柴胡散半表之邪,甘温人参甘草扶助正气,助正气以鼓邪外出,针对邪正相争于半表半里,正虚无力鼓邪外出<sup>[26]</sup>。从药效方面看,小柴胡汤以柴胡、黄芩之苦寒以清泄少阳之郁火;以生姜、半夏之辛温以化痰消饮祛水,共奏辛开苦降、疏通气郁、和胃降逆之功;再结合人参、大枣、甘草扶正祛邪,如此寒热并用、攻补兼施,起到和解少阳的作用<sup>[27]</sup>。从功效方面看,小柴胡汤解表清里,升清降浊,通调经络脏腑,扶正祛邪,不仅治疗少阳病证,还有疏理脾胃,疏泄肝胆,通调三焦,和解退热,散血结,除血热等功效<sup>[28]</sup>。

结直肠癌是众所周知的与肥胖相关的癌症<sup>[29]</sup>,研究发现脂肪累积和癌症发生发展密切相关,Mitra 等<sup>[12]</sup>发现,脂肪累积促进前列腺癌细胞的生长;GU 等<sup>[13]</sup>发现,CPT-Ⅱ酶低表达或功能丧失致肝细胞脂肪累积加重,对肝细胞恶性转化过程起促进作用。碱性磷酸酶有组织非特异性碱性磷酸酶、肠碱性磷酸酶、生殖型碱性磷酸酶和胚胎型碱性磷酸酶 4 种同工酶,除组织非特异性碱性磷酸酶外,其余 3 种又被称为组织特异性碱性磷酸酶。本研究纳入了 TNAP, IAP 2 个指标,是因为最新研究发现它们与脂肪有关系。Chirambo 等<sup>[5]</sup>研究发现,特异性敲除组织非特异性碱性磷酸酶 mRNA 水平能抑制 3T3-L1 脂肪细胞和 HepG2 细胞内的脂肪累积。Nakano 等<sup>[6]</sup>研究发现,小肠碱性磷酸酶基因 akp3 破坏的小鼠其脂质转运功能障碍,导致内脏脂肪堆积和脂肪肝;Hamarnah 等<sup>[8]</sup>在研究酒精性脂肪肝的大鼠时发现,肠碱性磷酸酶抑制大鼠酒精性脂肪肝的形成。总的来说,组织非特异性碱性磷酸酶促进脂肪累积;而肠碱性磷酸酶在脂质转运和脂质吸收中起着重要的作用,与脂肪累积呈负相关。

MTT 显示,与空白组比较,中药组细胞增殖活力抑制,且随着作用时间的延长和浓度的增加,细胞增殖活力抑制越明显;秋水仙碱组细胞增殖活力抑制明显。说明在中药组中,小柴胡汤寒热并用全方细胞增殖活力抑制作用最明显。

苏丹红Ⅳ染色显示未加药空白组脂肪累积最多,其次是小柴胡汤去半夏组和小柴胡汤去生姜组,

再次是小柴胡汤去柴胡组和小柴胡汤去黄芩组,小柴胡汤组脂肪累积最少。显微镜下数脂肪染色细胞结果显示,与空白组比较,各中药组脂肪累积细胞率降低。与小柴胡汤组比较,其余 4 组脂肪累积细胞率升高。与小柴胡汤去柴胡组比较,小柴胡汤去黄芩组脂肪累积细胞率降低;小柴胡汤去半夏组和小柴胡汤去生姜组脂肪累积细胞率升高。与小柴胡汤去黄芩组比较,小柴胡汤去半夏组和小柴胡汤去生姜组脂肪累积细胞率升高。说明小柴胡汤寒热并用全方脂肪累积最少,寒药减方组脂肪累积细胞率低于热药减方组。

碱性磷酸酶及其同工酶检测结果显示,在细胞内,与空白组比较,各中药组 IAP 酶活性升高。与小柴胡汤组比较,小柴胡汤去柴胡组 IAP 酶活性升高;小柴胡汤去黄芩组 IAP 酶活性最高;小柴胡汤去半夏组和小柴胡汤去生姜组 IAP 酶活性降低。与小柴胡汤去柴胡组比较,小柴胡汤去黄芩组 IAP 酶活性升高;小柴胡汤去半夏组和小柴胡汤去生姜组 IAP 酶活性降低。与小柴胡汤去黄芩组比较,小柴胡汤去半夏组和小柴胡汤去生姜组 IAP 酶活性降低。各组细胞内 TNAP 酶活性显著低于 IAP 酶活性。在培养液中,与空白组比较,小柴胡汤去黄芩组、小柴胡汤去半夏组和小柴胡汤去生姜组培养液中 TNAP 和各中药组 IAP 酶活性均升高。与小柴胡汤组比较,小柴胡汤去柴胡组、小柴胡汤去黄芩组、小柴胡汤去半夏组和小柴胡汤去生姜组培养液中 TNAP 酶活性均升高;小柴胡汤去半夏组和小柴胡汤去生姜组培养液中 TNAP 活性最高。与小柴胡汤去柴胡组、小柴胡汤去黄芩组比较,小柴胡汤去黄芩组培养液中 TNAP 酶活性升高;小柴胡汤去半夏组和小柴胡汤去生姜组培养液中 TNAP 酶活性均升高。各组 TNAP 酶活性均显著高于 IAP 酶活性。

本研究结果表明,小柴胡汤及其寒热减方均抑制 HCT116 癌细胞增殖,小柴胡汤寒热并用全方抑制作用最强。寒药减方与热药减方对脂肪累积和碱性磷酸酶(TNAP, IAP)的影响不同。小柴胡汤中寒药和热药并用,分别作用于 TNAP, IAP,调节脂肪转运代谢,从而抑制癌细胞生长,有待进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] Amisani N, Nikbakht H, Asghari J M, et al. Depression, anxiety, and health related quality of life among colorectal cancer survivors [J]. J Gastrointest Oncol, 2017, 8(1): 81-88.
- [2] CHEN W Q, ZHENG S W, ZHANG H M, et al. Report

- of cancer incidence and mortality in China, 2010 [J]. Chin Canc, 2014, doi: 10.3978/j. issn. 2305-5839. 2014. 04. 05.
- [ 3 ] CHEN W Q, PENG X B. *Epidemiology of colorectal cancer* [ M ]. Beijing: Military Medical Science Press, 2014;234-249.
- [ 4 ] RAO S R, Snaith A E, Marino D, et al. Tumour-derived alkaline phosphatase regulates tumour growth, epithelial plasticity and disease-free survival in metastatic prostate cancer [J]. Br J Cancer, 2017, 116(2) :227-236.
- [ 5 ] Chirambo G, van Niekerk C, Crowther N J. Specific knock-down of tissue non-specific alkaline phosphatase mRNA levels inhibits intracellular lipid accumulation in 3T3-L1 and HepG2 cells [J]. Int J Exp Pathol, 2017, 98(5) :260-268.
- [ 6 ] Nakano T, Inoue I, Koyama I, et al. Disruption of the murine intestinal alkaline phosphatase gene Akp3 impairs lipid transcytosis and induces visceral fat accumulation and hepatic steatosis [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007, 292(5) :G1439-G1449.
- [ 7 ] WANG W, WANG P, Chaudry I H. Intestinal alkaline phosphatase; role in the depressed gut lipid transport after trauma-hemorrhagic shock [J]. Shock, 1997, 8(1) :40-44.
- [ 8 ] Hamarneh S R, Kim B M, Kaliannan K, et al. Intestinal alkaline phosphatase attenuates alcohol-induced hepatosteatosis in mice [J]. Dig Dis Sci, 2017, 62(8) :2021-2034.
- [ 9 ] Ibarguren M, López D J, Escribá P V. The effect of natural and synthetic fatty acids on membrane structure, microdomain organization, cellular functions and human health [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1838(6) :1518-1528.
- [ 10 ] Rahimi Y, Mehdizadeh A, Nozad Charoudeh H, et al. Hepatocyte differentiation of human induced pluripotent stem cells is modulated by stearoyl-CoA desaturase 1 activity [J]. Dev Growth Differ, 2015, 57(9) :667-674.
- [ 11 ] Fritsche K L. The science of fatty acids and inflammation [J]. Adv Nutr, 2015, 6(3) :293-301.
- [ 12 ] Mitra R, Le T T, Gorjala P, et al. Positive regulation of prostate cancer cell growth by lipid droplet forming and processing enzymes DGAT1 and ABHD5 [J]. BMC Cancer, 2017, 17(1) :631.
- [ 13 ] GU J J, YAO M, CAI Y, et al. Dynamic expression of carnitine palmitoyltransferase II in the mitochondrial inner membrane during hepatocyte malignant transformation induced by lipid accumulation [J]. Chinese J Hep, 2017, 25(4) :279-284.
- [ 14 ] LIU Q, LUO Q, Halim A, et al. Targeting lipid metabolism of cancer cells: a promising therapeutic strategy for cancer [J]. Cancer Lett, 2017, doi: 10.1016/j. canlet. 2017. 05. 002.
- [ 15 ] 胡小剑, 刘晓秋. 小柴胡汤对四氯化碳/乙醇诱发小鼠肝癌肠-肝-脑损伤的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(23) :207-212.
- [ 16 ] 曾晓英, 朱海龙, 刘晓秋, 等. 原发性肝癌患者血清及血清高密度脂蛋白、血清低密度脂蛋白的氧化和氧化抵抗及小柴胡汤的作用 [J]. 世界华人消化杂志, 2014, 22(23) :3499-3504.
- [ 17 ] 蔡幼清. 小柴胡汤对 1,2-二甲胂诱发大鼠结肠癌的 DNA-合成酶活性的作用 [J]. 国外医学: 中医中药分册, 1994, 3:46.
- [ 18 ] 戴春山, 王雄华, 陈彬, 等. 加味小柴胡汤治疗老年癌性发热 48 例 [J]. 福建中医药, 2013, 44(2) :46.
- [ 19 ] MA Z, Otsuyama K I, LIU S Q, et al. Baicalein, a component of Scutellaria Radix from Huang-Lian-Jie-Du-Tang (HLJDT), leads to suppression of proliferation and induction of apoptosis in human myeloma cells [J]. Blood, 2005, 105(8) :3312-3318.
- [ 20 ] CUI Q, WANG G J, Balian G. Pluripotential marrow cells produce adipocytes when transplanted into steroid-treated mice [J]. Connect Tissue Res, 2000, 41(1) :45-56.
- [ 21 ] Sasajima Y, Kohama Y, Kojima-Misaizu M, et al. Simultaneous retention of thermostability and specific activity in chimeric human alkaline phosphatases [J]. Mol Biotechnol, 2014, 56(10) :953-961.
- [ 22 ] Petit Clerc C. Quantitative fractionation of alkaline phosphatase isoenzymes according to their thermostability [J]. Clin Chem, 1976, 22(1) :42-48.
- [ 23 ] Chua B, Shrago E. Effects of experimental diabetes and food intake on rat intestine and serum alkaline phosphatase [J]. J Nutr, 1978, 108(2) :196-202.
- [ 24 ] Aminisani N, Nikbakht H, Asghari Jafarabadi M, et al. Depression, anxiety, and health related quality of life among colorectal cancer survivors [J]. J Gastrointest Oncol, 2017, 8(1) :81-88.
- [ 25 ] Labianca R, Beretta G D, Kildani B, et al. Colon cancer [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2010, 74(2) :106-133.
- [ 26 ] 任小宁. 小议寒热并用的起源与发展 [J]. 湖南中医药杂志, 2012, 28(4) :139-140.
- [ 27 ] 曹慧娟, 李君, 孙淑军, 等. 黄芩素对人肺腺癌 A549 细胞的药效作用及机制探讨 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(2) :98-103.
- [ 28 ] 陈军, 周密思, 彭圆, 等. 小柴胡汤对 B16 黑色素瘤细胞黑色素合成相关基因表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(7) :139-143.
- [ 29 ] Lee J Y, Lee H S, Lee D C, et al. Visceral fat accumulation is associated with colorectal cancer in postmenopausal women [J]. PLoS One, 2014, 9(11) :e110587.

[责任编辑 张丰丰]