

桂枝茯苓丸抑制人乳腺癌细胞 MCF-7 增殖机制

蒋时红*, 李澜, 吴耀松, 夏雷达, 张培旭
(河南中医药大学, 郑州 450046)

[摘要] **目的:**通过观察桂枝茯苓丸对人乳腺癌细胞 MCF-7 增殖的影响,并检测细胞周期的变化和蛋白表达的改变,从而探讨桂枝茯苓丸对乳腺癌细胞产生抑制的作用机制。**方法:**体外培养人乳腺癌细胞 MCF-7,以 5-氟尿嘧啶(5-Fu, 25 mg·L⁻¹)作为阳性药,噻唑蓝(MTT)比色法检测不同剂量桂枝茯苓丸培养液和在不同作用时间对细胞的抑制作用;选用 1.8, 2.7 g·L⁻¹的桂枝茯苓丸培养液作用 48 h,流式细胞技术检测 5-Fu 组和桂枝茯苓丸培养液组的周期,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测表皮生长因子(EGFR),周期素 A₂(CyclinA₂)及周期素依赖性激酶 2(Cdk2) mRNA 表达,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测其 EGFR, CyclinA₂, Cdk2 蛋白表达。**结果:**桂枝茯苓丸对人乳腺癌细胞 MCF-7 细胞有抑制作用($P < 0.05$),且具有时间-剂量依赖性。与空白组比较,1.8, 2.7 g·L⁻¹桂枝茯苓丸作用 MCF-7 细胞 48 h 后 S 期细胞明显增加($P < 0.05$), EGFR, Cdk2, CyclinA₂ mRNA 表达明显降低($P < 0.01$);桂枝茯苓丸各质量浓度组中 EGFR, Cdk2 蛋白表达均下降($P < 0.05$),但 CyclinA₂ 蛋白表达仅 2.7 g·L⁻¹组有明显降低($P < 0.05$)。**结论:**桂枝茯苓丸在 S 期阻滞 MCF-7 细胞增殖,这可能与下调 CyclinA₂, Cdk2, EGFR mRNA 和其蛋白的表达有关。

[关键词] 乳腺癌; 桂枝茯苓丸; 周期; 表皮生长因子; 周期素依赖性激酶 2; 周期素 A₂

[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)15-0132-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181211

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180329.0931.001.html>

[网络出版时间] 2018-03-29 11:13

Mechanism of Guizhi Fuling Wan in Inhibiting Proliferation of Human Breast Cancer MCF-7 Cells

JIANG Shi-hong*, LI Lan, WU Yao-song, XIA Lei-da, ZHANG Pei-xu
(Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism of Guizhi Fuling Wan in inhibiting the human breast cancer MCF-7 cell by observing its effect on MCF-7 cells and detecting the changes of cell cycle and protein expressions. **Method:** The human breast cancer MCF-7 cells were cultured *in vitro*, and 5-Fluorouracil (5-Fu, 25 mg·L⁻¹) was used as a positive control medicine to detect the effect of Guizhi Fuling Wan culture on inhibiting the proliferation of the cells under different duration and different doses with the method of 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide (MTT). Guizhi Fuling Wan cultures (1.8, 2.7 g·L⁻¹) were used for treatment for 48 h. Then the cell cycles was measured by flow cytometry (FCM) in 5-fu group and Guizhi Fuling Wan culture groups; mRNA expression levels of epidermal growth factor receptor (EGFR), CyclinA₂ and cyclin-dependent kinase (Cdk2) were detected by Real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR), and their protein expression levels were detected by Western blot. **Result:** Guizhi Fuling Wan can inhibit the proliferation of the human breast cancer MCF-7 cell in a time-dose dependent manner ($P < 0.05$). As compared with blank control group, the number of S phase cells was increased significantly after treatment by 1.8,

[收稿日期] 20171030(013)

[基金项目] 河南省基础与前沿计划项目(132300410157);河南省教育厅科学技术研究重点项目(13A360582)

[通信作者] *蒋时红, 硕士, 教授, 硕士生导师, 从事方剂与肿瘤病机的研究, Tel: 0371-65962987, E-mail: jsh0418@126.com

2.7 g·L⁻¹ Guizhi Fuling Wan for 48 h ($P < 0.05$); the mRNA expression levels of EGFR, Cdk2 and CyclinA₂ were significantly reduced ($P < 0.01$); and the protein expression levels of EGFR and Cdk2 were also decreased ($P < 0.05$); however, the expression of CyclinA₂ was only decreased in 2.7 g·L⁻¹ group ($P < 0.05$).
Conclusion: Guizhi Fuling Wan can inhibit the proliferation of MCF-7 cell in S phase which possibly related to the expression of CyclinA₂, Cdk2 and EGFR mRNA and their proteins.

[Key words] breast cancer; Guizhi Fuling Wan; cell cycle; epidermal growth factor receptor (EGFR); cyclin-dependent kinase (Cdk2); CyclinA₂

在我国乳腺癌位于女性恶性肿瘤发病率的首位,每年的新发病例约达 21 万^[1]。而且乳腺癌的发病率、死亡率和患病率呈逐年增长趋势^[2]。乳腺癌的病因有待进一步研究,其危险性因素很大部分涉及到内分泌激素方面,目前证实雌酮及雌二醇与乳腺癌的发病有直接关系。有研究提出乳腺小叶上皮高度增生或不典型增生可能与乳腺癌的发病有关^[3]。中医有关乳腺癌的论述很多,其病因病机以正气亏虚为本,痰瘀、气郁为标^[4],预防乳腺癌以扶正祛邪为原则^[5]。近年来在临床治疗肿瘤以及实验室研究方面,桂枝茯苓丸的应用得到了广泛关注^[6],特别在妇科恶性肿瘤和术后进一步协助治疗方面具优势独特。社会应密切关注女性乳腺癌的预防工作,提高女性乳腺癌患者的生命质量^[7]。桂枝茯苓丸在抑制肿瘤细胞增殖及调控相关基因的表达、免疫调节、内分泌调节和抗炎方面的作用得到了充分证实,分子生物学也越来越广泛地应用到乳腺癌的研究中。如今分子生物学的技术方法和研究结论已经大范围应用于乳腺恶性肿瘤的治疗及康复^[8],相关单味药物的现代药理研究也很好的证明了其抗肿瘤的作用^[9]。但桂枝茯苓丸对于乳腺癌细胞的影响从分子生物学的角度研究尚未见报道,本文探讨桂枝茯苓丸对人乳腺癌细胞株 MCF-7 增殖的影响,用流式细胞仪检测其对细胞周期的干扰作用,并测定相关蛋白的变化,为临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 细胞株 人乳腺癌细胞株 MCF-7,由河南生物工程技术有限公司提供,编号 3-K0013。

1.2 桂枝茯苓丸含药培养液的制备 药材购自河南中医药大学第三附属医院,由河南中医药大学苗艳艳副研究员鉴定为正品,称取 2 倍量的药材,桂枝、茯苓、牡丹皮、桃仁、赤芍各 9 g;浸泡,煎煮,醇沉,回收乙醇并干燥,得率 70%,干燥后的药物以 1640 基础培养液 100 mL 充分溶解后离心 3 次,取上清,过滤除菌,并分装于无菌离心管中,用封口膜

封口,放入 -20 ℃ 冰箱储存备用。

1.3 试剂 胰蛋白酶,BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (Solarbio 公司,批号分别为 20130424,PC0020);细胞周期检测试剂盒 (南京凯基公司,批号 KGA512);鼠抗表皮生长因子 (EGFR),周期素依赖性激酶 2 (Cdk2) 及周期素 A₂ (CyclinA₂) 单克隆抗体,羊抗鼠免疫球蛋白 (Ig) G (Boster 公司,批号分别为 AM2179b, BM0463, BM1582, BA1050);内参 β-肌动蛋白 (β-actin) 单克隆抗体 (Proteintech 公司,批号 20536-1-AP);5-氟尿嘧啶 (5-Fu,上海旭东海普药业有限公司,国药准字 H31020593);反转录试剂盒,荧光定量试剂盒 (Tiangen 公司,批号分别为 P5024, P4919);噻唑蓝 (MTT, Sigma 公司,批号 2128);trizol (Invitrogen 公司,批号 15596026)。

1.4 仪器 CO170R 型 CO₂ 培养箱 (德国 Eppendorf 公司);DFC450C 型荧光倒置相差显微镜 (日本 Nikon 公司);FACalibur 型流式细胞仪 (美国 BD 公司);mini 型垂直电泳槽, A-14A64 型转膜仪, HOOD2 型凝胶成像扫描仪 (美国 Bio-Rad 公司);Plus 型实时荧光定量 PCR 仪 (美国 StepOne 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 从液氮罐中取出细胞后,37 ℃ 水浴中解冻,加入 1640 完全培养液 (含 10% 胎牛血清),置于 37 ℃ 5% CO₂ 培养箱中培养,按 1:3 ~ 1:4 传代。

2.2 MTT 比色法检测 MCF-7 增殖 取对数生长期的 MCF-7 细胞,按 1×10^4 个/孔加入到 96 孔板中,按实验分为空白组,5-Fu 组,桂枝茯苓丸组 (1.6, 2.1, 2.6, 3.1, 3.6 g·L⁻¹),每组 3 个复孔,分别培养 24, 48, 72 h 后,取出,于避光加入配制好的 0.5% MTT 溶液 20 μL,置于培养箱内孵育 4 h。每孔加入 DMSO 溶液 150 μL 后,于酶联免疫吸附仪上 570/630 nm 波长检测各孔吸光度 A。每组实验重复 3 次。计算细胞增殖抑制率,抑制率 = $(1 - A_{\text{实验组}} / A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

2.3 流式细胞仪检测 MCF-7 细胞周期 取对数生

长期细胞,分为空白组、桂枝茯苓丸组(1.8, 2.7 g·L⁻¹)培养 48 h,加入 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化。严格按周期试剂盒处理细胞,流式细胞仪检测,CellQuest 软件获取,ModFit LT 3.2 软件进行分析。实验重复 4 次。

2.4 实时荧光定量 PCR 检测 CyclinA₂, EGFR, Cdk2 mRNA 表达 ①提取总 RNA,细胞分组及处理同 2.3 项。作用 48 h 后,按照 trizol 法提取 mRNA。②测定 mRNA 纯度及浓度,吸取 mRNA 2 μL,紫外分光光度仪测定 mRNA 纯度及浓度及 A_{260 nm}/A_{280 nm}。③cDNA 合成,按照逆转录扩增试剂盒说明进行。逆转录后的 cDNA 样本 -20 ℃ 保存备用。④实时荧光定量 PCR,按 mRNA 实时荧光定量 PCR 试剂盒说明书操作。实验用 2 步法进行扩增。PCR 反应条件:95 ℃ 预变性 60 s;95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min (收集信号),共 40 个循环。根据 2^{-ΔΔC_t}分析 EGFR, CyclinA₂, Cdk2, GAPDH 相对表达定量。引物序列购自南京金瑞斯生物科技有限公司。GAPDH (248 bp):上游 5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3', 下游 5'-AGGGGCCATCCATCCACAGTCTTC-3'; EGFR (187 bp):上游 5'-GCACGGTGTGAGCGCC-3', 下游 5'-TCCGGCTCTCCCGATCAATA-3'; CyclinA₂ (162 bp):上游 5'-ACTTTGCGACATGCCTGAGA-3', 下游 5'-CTTGGCGTCCACATCTCCAT-3'; Cdk2 (243 bp):上游 5'-TCTTTGCTGCTGAGATGGTGA CTCG-3', 下游 5'-TGTTAGGGTCTAGTGCAGC-3'。

2.5 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测桂枝茯苓丸对 MCF-7 细胞 EGFR, CyclinA₂, Cdk2 蛋白表达 取每组细胞,用不含 EDTA 的胰酶消化,加裂解液置于冰上裂解 60 min,BCA 法测定蛋白浓度,上样,在 180 V,100 mA 下进行电泳,加入 EGFR, CyclinA₂, Cdk2 一抗(1:500)孵育过夜,二抗(1:200)室温孵育 1 h。ECL 化学发光显色液 A 和 B 按 1:1 配置后均匀加到膜上进行显色。用凝胶图像分析仪对胶片扫描拍照,Image Lab 5.1 系统分析所需条带灰度值,计算其与内参条带的灰度值比值。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 17.0 分析,定量资料组间比较,采用重复测量数据的方差分析和单因素方差分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,LSD 两两比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 桂枝茯苓丸对 MCF-7 细胞增殖的影响 桂枝茯苓丸 1.6,2.1,2.6,3.1,3.6 g·L⁻¹ 各组细胞抑制率,具有时间和质量浓度依赖性,逐渐递增,以 3.6 g·L⁻¹ 组作用 72 h 抑制率最高。运用直线相关回归分析方法,得 48 h 桂枝茯苓丸对 MCF-7 细胞剂量效应关系的回归方程 $Y = -2\ 642.87 + 35\ 704.254x - 82\ 625.1x^2 + 67\ 650.936x^3$ ($F = 41.616, R^2 = 0.992$),其中 X 为抑制率, Y 为药物浓度。应用概率法 95% 置信区间得 20% 抑制浓度 (IC_{20}) = 1 734.18 mg·L⁻¹, IC_{50} = 3 009.33 mg·L⁻¹。选择 1.8,2.7 g·L⁻¹ 作用 48 h,作为后续实验条件。见表 1。

表 1 桂枝茯苓丸作用 24,48,72 h 对 MCF-7 细胞抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	24 h	48 h	72 h	%
空白	-	0	0	0	
5-Fu	0.025	41.49 ± 14.71 ¹⁾	52.86 ± 18.94 ¹⁾	64.45 ± 6.62 ¹⁾	
桂枝茯苓丸	1.6	10.04 ± 8.99 ^{1,2)}	19.38 ± 9.96 ^{1,2)}	23.16 ± 10.07 ^{1,2)}	
	2.1	12.07 ± 6.73 ^{1,2)}	22.74 ± 5.95 ^{1,2)}	26.76 ± 15.78 ^{1,2)}	
	2.6	23.86 ± 10.42 ^{1,2)}	36.03 ± 8.84 ^{1,2)}	42.28 ± 11.51 ^{1,2)}	
	3.1	37.71 ± 6.90 ¹⁾	51.23 ± 12.47 ¹⁾	57.59 ± 25.20 ¹⁾	
	3.6	51.90 ± 15.64 ¹⁾	59.67 ± 11.63 ¹⁾	72.27 ± 16.83 ¹⁾	

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$;与 5-Fu 组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2~4 同)。

3.2 桂枝茯苓丸对 MCF-7 细胞周期的影响 在药物作用 48 h 后,与空白组相比,桂枝茯苓丸 1.8, 2.7 g·L⁻¹ 组 S 期细胞明显升高,G₀/G₁ 期细胞明显降低($P < 0.05$)。见表 2。

3.3 桂枝茯苓丸对 MCF-7 细胞 CyclinA₂, Cdk2,

EGFR mRNA 表达的影响 作用 48 h 后,与空白组比较,桂枝茯苓丸 1.8,2.7 g·L⁻¹ 组 EGFR, Cdk2, CyclinA₂ mRNA 表达明显降低($P < 0.01$);桂枝茯苓丸 1.8,2.7 g·L⁻¹ 组间无统计学差异。见表 3。

3.4 桂枝茯苓丸对 MCF-7 细胞 CyclinA₂, Cdk2,

表 2 桂枝茯苓丸作用 48 h 后对 MCF-7 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Table 2 Effect of Guizhi Fuling Wan on MCF-7 cell cycle after 48 h ($\bar{x} \pm s, n = 4$) %

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
空白	-	59.90 ± 2.91	29.03 ± 2.48	8.21 ± 5.47
桂枝茯苓丸	1.8	45.65 ± 4.25 ¹⁾	47.06 ± 3.71 ¹⁾	5.76 ± 3.31
	2.7	49.73 ± 4.53 ¹⁾	48.83 ± 4.84 ¹⁾	1.75 ± 0.30

表 3 桂枝茯苓丸对 MCF-7 细胞 Cdk2, CyclinA₂, EGFR mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 3 Effect of Guizhi Fuling Wan on mRNA expression of Cdk2, CyclinA₂ and EGFR in MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	Cdk2	CyclinA ₂	EGFR
空白	-	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
桂枝茯苓丸	1.8	0.53 ± 0.21 ¹⁾	0.87 ± 0.26 ¹⁾	0.41 ± 0.13 ¹⁾
	2.7	0.60 ± 0.16 ¹⁾	0.78 ± 0.32 ¹⁾	0.71 ± 0.30 ¹⁾

EGFR 蛋白表达的影响 经桂枝茯苓丸作用 MCF-7 细胞 48 h 后,与空白组比较,桂枝茯苓丸 1.8, 2.7 g·L⁻¹ 组 EGFR, Cdk2 蛋白明显降低 ($P < 0.05$);桂枝茯苓丸 2.7 g·L⁻¹ 组 CyclinA₂ 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。见表 4,图 1。

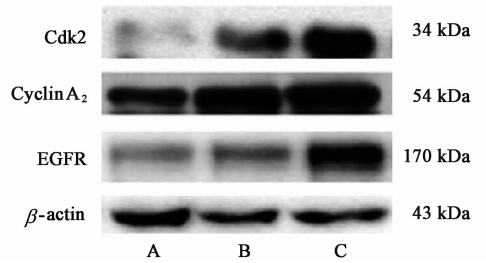
表 4 桂枝茯苓丸对 MCF-7 细胞 Cdk2, CyclinA₂, EGFR 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 4 Effect of Guizhi Fuling Wan on protein expression of Cdk2, CyclinA₂ and EGFR in MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	Cdk2 /β-actin	CyclinA ₂ /β-actin	EGFR /β-actin
空白	-	0.111 ± 0.034	1.795 ± 0.407	0.229 ± 0.071
桂枝茯苓丸	1.8	0.020 ± 0.006 ¹⁾	1.690 ± 0.228	0.134 ± 0.027 ¹⁾
	2.7	0.013 ± 0.005 ¹⁾	1.025 ± 0.197 ¹⁾	0.066 ± 0.013 ¹⁾

4 讨论

桂枝茯苓丸来源于东汉张仲景所著《金匮要略·妇人妊娠病脉证并治》中的经典方剂,由桂枝、茯苓、牡丹皮、赤芍、桃仁组成,诸药合用,达活血化瘀、消肿散结的作用^[10],用于治疗妇人癥瘕积聚。乳腺癌属于中医“乳岩”范畴,其病机多为气滞血瘀,痰瘀互结;治疗主要是疏肝解郁、活血化瘀、消肿散结、补益气血,并采用内外法兼用。桂枝茯苓丸虽然原方用于妇人腹部癥瘕,但其组方功效符合乳腺癌病机和治法。



A, B. 桂枝茯苓丸 2.7, 1.8 g·L⁻¹ 组; C. 空白组
图 1 桂枝茯苓丸对 MCF-7 细胞 Cdk2, CyclinA₂, EGFR 蛋白表达电泳

Fig.1 Electrophoresis of Guizhi Fuling Wan on protein expression of CDK, CyclinA₂ and EGFR in MCF-7 cells

随着分子生物学的发展,乳腺癌分子靶向治疗成为一种全新生物治疗模式。包括 HER 受体家族的靶向药物,作用于血管内皮生长因子 (VEGF) 靶点和 EGFR 靶点的药物^[11-12] 被逐渐应用于临床治疗。生长因子受体可以调控细胞的存活、增殖和迁移等细胞行为,其活化对细胞增值的启动起到决定性的作用。在细胞外,配体与受体结合,导致自体磷酸化和转磷酸化,产生多种细胞内信号,传导至细胞核,激活相关细胞核蛋白,调控细胞增殖,从而促进肿瘤发展。有研究检测了乳腺癌中 EGFR 的表达越高,乳腺癌组织的恶性程度越高,侵袭性也越强^[13]。本实验结果显示,EGFR 蛋白的表达水平较对照组明显降低,说明桂枝茯苓丸对 MCF-7 增值的抑制作用与 EGFR 的表达有关。

细胞周期一般情况下分为 4 期,目前的研究结果显示,细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 (Cki), Cdk, Cyclin 是细胞周期中三大类关键的调控因子,它们互相作用,并与细胞的增殖、凋亡、分化等的通路密切相关,形成复杂的调控网络。Cdk 在细胞周期调控网络中处于中心地位,是一类依赖 Cyclin 的蛋白激酶;Cyclins 的表达具有时相特异性和典型的周期性^[14]。通过激活转录因子等诸多因素,细胞内外各种信号传导途径都可以影响 Cyclins 的作用水平,从而进一步影响相应的 Cdk,以此来调控细胞周期。现已研究证实,各种 Cyclin 含量在细胞周期呈周期性变化,但 Cdk 在整个细胞周期中表达相对恒定,相应的 Cdk 和 Cyclin 结合,形成复合物并被激活后,细胞内特定底物磷酸化并起到相应的作用^[15]。CyclinA 是其中最早被发现的周期蛋白,属 S 期和 M 期;在 S 期,CyclinA 与 Cdk2 结合,使底物磷酸化,推动细胞周期进入 G₂ 期。它的高表达与细胞增殖失控和肿瘤发生密切相关^[16]。本实验结果

发现,桂枝茯苓丸 $2.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组能有效降低 CyclinA 的表达,但 $1.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组不明显,说明桂枝茯苓丸在一定的质量浓度下能影响 CyclinA 的表达水平,并影响细胞的周期,但影响的临界浓度还有待进一步的探索。

细胞由 G_1 期进入 S 期需要 CyclinE 及 Cdk2 的共同参与。当细胞进入 S 期后, CyclinE 随之降解, Cdk2 转而与 CyclinA 结合,从而推进细胞由 S 期越过限制点进入 G_2 期。也有学者探讨了 Cdk2 阳性表达对乳腺癌的辅助化疗疗效的影响,证实 Cdk2 阳性对其有一定的参考价值^[17]。有研究表明, Cdk2 在乳头状癌^[18],胃癌^[19],非小细胞癌^[20-21]的过表达影响其肿瘤的发生发展,可作为判断预后的指标。实验结果证实,桂枝茯苓丸可降低 MCF-7 细胞中 Cdk2 蛋白的表达;流式细胞术检测结果显示桂枝茯苓丸阻滞乳腺癌细胞于 S 期。由此本研究推测,桂枝茯苓丸对 MCF-7 细胞阻滞通过降低 Cdk2 的表达,影响细胞周期进程,继而抑制肿瘤增殖。

本研究发现桂枝茯苓丸抑制了肿瘤细胞的增殖,可能通过降低了 EGFR, Cyclin A, Cdk2 蛋白的表达起到了阻滞乳腺癌细胞分裂的效果,从而达到治疗乳腺癌的作用。但进一步改变了胞内哪些信号转导途径,还需要进一步深入探讨。

[参考文献]

[1] 陈万青,张思维,曾红梅,等. 中国 2010 年恶性肿瘤发病与死亡[J]. 中国肿瘤,2014,23(1):1-10.

[2] 石建伟,唐智柳,蔡美玉,等. 2008-2012 年我国女性乳腺癌流行状况的系统性综述[J]. 中国妇幼保健,2014,29(10):1622-1626.

[3] 张保宁. 乳腺肿瘤学[M]. 北京:人民卫生出版社,2013:198.

[4] 高国璇,辛灵,刘倩,等. St Gallen 国际乳腺癌会议专家共识 10 年历程回顾[J]. 中国实用外科杂志,2014,34(1):70-72,76.

[5] 韩晓雪. 乳腺癌病因病机及证治的文献研究[D]. 北京:北京中医药大学,2012.

[6] 王英,高洪泉. 桂枝茯苓丸诱导卵巢癌 H08910 细胞凋亡的研究[J]. 牡丹江医学院学报,2003,24(6):1-4.

[7] 石建伟,唐智柳,蔡美玉,等. 2008-2012 年我国女性乳腺癌流行状况的系统性综述[J]. 中国妇幼保健,

2014,29(10):1622-1626.

[8] 刘丽云. 乳腺癌证治的中医文献研究[D]. 北京:北京中医药大学,2008.

[9] 于晓红,郑瑞茂,杨宝华,等. 桂枝茯苓丸中单味药实验免疫学研究进展[J]. 中医药信息,2000,17(5):31-32.

[10] 秦泗涟,马利华,贾晓斌,等. 桂枝茯苓丸物质基础及其制剂质量控制模式研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(13):270-273.

[11] Takahashi N, Iwasa S, Taniguchi H, et al. Prognostic role of ERBB2, MET and VEGFA expression in metastatic colorectal cancer patients treated with anti-EGFR antibodies [J]. Br J Cancer, 2016, doi: 10.1038/bjc.2016.74.

[12] 王学军,刘国希,赵艳玲,等. 乳腺癌治疗的新进展[J]. 中国医疗前沿,2012,7(13):16-18.

[13] 王春艳. EGFR 和 VEGF 联合检测对评估乳腺癌淋巴结转移的意义[J]. 中国实验诊断学,2015,19(3):440-442.

[14] Evan G I, Vouaden K H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer [J]. Nature, 2001, 411 (6835): 342-348.

[15] Diederichs S, Banmer N, Ji P, et al. Identification of interaction Partners and Substrates of the Cyclin A₁-CDK2 complex [J]. Biol Chem, 2004, 279 (32): 33727-33741.

[16] Pagano M, Pepperkok R, Verde F, et al. CyclinA is required at two points in the human cell cycle [J]. EMBO J, 1992,11(3):961-971.

[17] 杨丽萍,罗庆丰,吴毓东,等. 周期蛋白依赖激酶-2 表达对乳腺癌新辅助化疗的疗效判断价值[J]. 实用癌症杂志,2014,29(11):1374-1376.

[18] 李琰,张娟. MCM7、CDK2 及 Ki-67 蛋白在甲状腺癌中表达的临床意义[J]. 实用癌症杂志,2015,30(3):359-361.

[19] 刘雷,陈国昌,宋振云,等. 胃癌中 Cdk2 和 p21 的表达及其与临床病理和预后的关系[J]. 江苏医药,2014,40(17):2045-2047,1980.

[20] 刘思远,李志鹏,郑心. 肺抑制剂联合 AP 化疗方案治疗非小细胞肺癌临床疗效观察[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(3):185-190.

[21] 林炜明,罗茂春,陈彤,等. CDK2 在非小细胞肺癌组织中的表达[J]. 龙岩学院学报,2014,32(2):76-79.

[责任编辑 张丰丰]