

补肾疏肝方对人肺癌 A549 细胞及其相关干性因子的影响

邓晓明¹, 范智蕊¹, 苗学红¹, 李砺锋¹, 王淑玲^{2*}, 詹向红³

(1. 郑州大学第一附属医院, 郑州 450052; 2. 郑州大学基础医学院, 郑州 450001;
3. 河南中医学院基础医学院, 郑州 450046)

[摘要] 目的:探讨补肾疏肝方对人肺癌 A549 细胞及其相关干性因子的影响。方法:SD 雄性大鼠随机分为 6 组,每组 10 只,分别为补肾疏肝方低、高剂量组(15,30 g·kg⁻¹),顺铂组(8 g·kg⁻¹),低剂量联合顺铂组(联合低剂量组),高剂量联合顺铂组(联合高剂量组),正常组,顺铂组 *ip* 给予相应药物,补肾疏肝方 *ig* 给予相应药物,正常组给予等体积的生理盐水,制备大鼠含药血清;分别配制 10% 含补肾疏肝方低、高剂量、顺铂、低剂量联合顺铂、高剂量联合顺铂,分别与肺癌 A549 细胞共同培养,CCK8 法检测补肾疏肝方含药血清对 A549 增殖的影响;流式细胞术检测含药血清对 A549 细胞周期的影响;Annexin V/PI 双染流式细胞术观察含药血清对 A549 细胞凋亡的影响;荧光定量 PCR 检测含药血清对相关 mRNA 表达的影响;流式细胞术检测含药血清对 CD133 蛋白表达的影响。结果:补肾疏肝方以时间、剂量依赖方式抑制 A549 细胞增殖,与顺铂联合有协同增效作用,24,48,72 h 高剂量联合顺铂组的抑制率分别为 45.39% ,54.76% 及 59.94% ;与正常组比较,补肾疏肝方、联合、顺铂含药血清可促进 A549 细胞凋亡,随着浓度增加,G₂/M 期细胞的百分比明显增加,明显下调 CD133,SOX-2,OCT-4 mRNA 的表达,明显降低 CD133 蛋白表达量,均具有明显统计学差异($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论:补肾疏肝方可抑制 A549 细胞增殖,促进细胞凋亡,与顺铂联合可下调 CD133,SOX-2,OCT-4 等干性因子的表达。

[关键词] 补肾疏肝方; 肺癌; A549 细胞; 干性因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)14-0136-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2015140136

Effects of Bushen Shugan Formula on Human Lung Cancer A549 Cells and Related Stem Genes

DENG Xiao-ming¹, FAN Zhi-rui¹, MIAO Xue-hong¹, LI Li-feng¹, WANG Shu-ling^{2*}, ZHAN Xiang-hong³
(1. The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 2. Basic Medical College of Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 3. Basic Medical College of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of Bushen Shugan formula (BSSGF) on human lung cancer A549 cells and related stem genes. **Method:** SD rats were randomly divided into 6 groups: the normal group (normal saline), the cisplatin group (8 g·kg⁻¹), the low-and high-dose BSSGF groups (15, 30 g·kg⁻¹), the low-dose BSSGF plus cisplatin group and the high-dose BSSGF plus cisplatin group of 10 rats each. The rats received the corresponding medicines and the serum containing drugs were prepared. A549 cells were cultured in the drug serum with different concentrations. The cell proliferation was detected by CCK8 assay. The cell cycle was tested by the flow cytometry. The cell apoptosis was detected by using Annexin V/PI staining with flow cytometry. The related gene expression was detected by using quantitative PCR. The protein expression of CD133 was tested by using flow cytometry. **Result:** BSSGF could inhibit the proliferation of A549 in a time-and dose-dependent manner and had synergies when combined with cisplatin. The inhibition rate was 45.39% , 54.76% and 59.94% , respectively, after 24, 48 and 72 h incubation BSSGF could induce the cell apoptosis, the cell percentage in G₂/M increased with the increasing of concentration. BSSGF combined with cisplatin could reduce the gene expressions of CD133, SOX-2, OCT-4, and lowered the protein expression of CD133. **Conclusion:** BSSGF could inhibit the cell proliferation and promote the cell apoptosis of A549 cells. Combined with cisplatin,

[收稿日期] 20150115(004)

[基金项目] 河南省科技厅科技攻关项目(112300410049);河南省科技厅重点攻关项目(311700531510)

[第一作者] 邓晓明,博士,主任医师,从事恶性肿瘤防治研究,Tel:13598822767,E-mail:hndengxiaoming@126.com

[通讯作者] *王淑玲,博士,主任医师,从事中西医结合防治呼吸系病研究,Tel:0371-66915501,E-mail:hndengxiaoming@126.com

BSSGF could reduce the expression of stem factors, such as CD133, SOX-2 and OCT-4.

[Key words] Bushen Shugan formula; lung cancer; A549 cell; stem genes

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一,严重危害人类健康。虽然化疗会产生较好的初步治疗效果,但不会长期缓解^[1-2],而基于顺铂的化疗方案对小细胞肺癌的有效率仅为30%^[3]。肺癌难根治、易复发是由于癌组织内存在具有极强自我更新和分化能力的肺癌干细胞^[4],存活的肿瘤干细胞会导致肿瘤再生,发展以及转移^[5]。寻找靶向干细胞的新的治疗方法能显著增加治疗的效果,提高患者生活质量。中医药具有多靶点效应,可能干预调节肿瘤干细胞的生物学行为^[6]。补肾疏肝方是临床经验用方,对中晚期肺癌患者疗效显著,可稳定瘤体,防止或延缓复发转移,并显著提高患者生活质量。本研究采用中药血清药理学的原理,基于补肾疏肝方治疗肺癌的临床疗效,进一步探究该中药复方对A549细胞及其干性因子的作用,探讨其对肺癌干细胞的影响,为临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物与细胞株 SD 雄性大鼠 60 只,体重 250~300 g,由郑州大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(豫)2010-0002。人肺癌 A549 细胞由郑州大学肿瘤实验中心提供,培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液(含双抗)中,37℃,5% CO₂ 培养箱内培养,取对数生长期细胞实验。

1.2 药物及试剂 补肾疏肝方由北五味子、柴胡、当归、枸杞子、菟丝子、女贞子、柴胡、车前子、瓜蒌等 18 味中药组成,单方共计 210 g,饮片购自郑州大学第一附属医院药房。按常规方法分别制成生药质量浓度为 1.25 g·mL⁻¹(低剂量),3.75 g·mL⁻¹(高剂量)的 *ig* 药液,4℃ 保存备用。注射用顺铂,冻干型粉剂,规格 20 mg/支,山东齐鲁制药有限公司,使用时临时配置成 20% 顺铂溶液。胎牛血清(杭州四季青公司,批号 141215),胰蛋白酶(北京索莱宝公司,批号 20141125),RPMI-1640 培养液(北京索莱宝公司,批号 20141226);二甲基亚砜(批号 20S00160),凯基 Annexin V/PI 细胞凋亡试剂盒(批号 20141012),PCR 试剂盒(00031406)均购自鼎国生物技术有限公司,引物由上海生工公司合成,CD133 引物:上游 5'-GCACTCTATACAAA GCGTCA-3';下游 5'-CCATACTTCTTAGTTTCCTCA-3';SOX-2 引物:上游 5'-CGAGTGGAACCTT TTGTCGGA-3';下游 5'-TGTGCAGCGCTCGCAG-3';

OCT-4 引物:上游 5'-GTGGAGAGCAACTCCGATG-3';下游 5'-TGCTCCAGCTTCTCCTTCTC-3',CD133 抗体(德国美天旎公司,批号 130090826)。

1.3 仪器 N00307126 型超净工作台(苏州净化设备有限公司),HERA cell150 型 CO₂ 细胞培养箱(德国 Heraeus 公司),00000249 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),PYX-DHS-35X40 型隔水式电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂)。

2 方法

2.1 补肾疏肝方含药血清的制备 大鼠随机分为 6 组,每组 10 只,分别为补肾疏肝方低、高剂量组,顺铂组,低剂量联合顺铂组,高剂量联合顺铂组,正常组;补肾疏肝方低、高剂量组按人与鼠体表面积换算法及血清药理学实验方法,分别给予 15,30 g·kg⁻¹ 补肾疏肝方 *ig*,连续给药 7 d;顺铂组予 *ip* 8 g·kg⁻¹ 的顺铂(第 1,3,5 天注射);低、高剂量联合顺铂组分别予 15,30 g·kg⁻¹ 补肾疏肝方 *ig* 及 *ip* 8 g·kg⁻¹ 的顺铂(第 1,3,5 天注射);正常组予 0.9% 氯化钠溶液 *ig*,连续 7 d。末次 *ig* 2 h 后水合氯醛 *ip* 麻醉,无菌条件下腹主动脉采血,分离血清,56℃ 灭活 30 min,经 0.22 μm 过滤除菌,-20℃ 保存备用。

2.2 含药培养液的配制 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 分别配制 10% 含补肾疏肝方低、高剂量、顺铂、低剂量联合顺铂、高剂量联合顺铂,0.9% 氯化钠溶液药物血清的培养液。

2.3 观察指标

2.3.1 CCK-8 法检测细胞增殖 取对数期生长期的 A549 细胞以 4.0 × 10⁴/mL 接种于 96 孔培养板中,共 6 组,每组设 6 个复孔,分别为正常组,补肾疏肝方低、高剂量组,低剂量联合顺铂组(联合低剂量组),高剂量联合顺铂组(联合高剂量组)。细胞贴壁后弃培养液,每组分别加入含有含药血清的培养液,每孔 100 μL,培养箱内继续培养 24,48,72 h 每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,孵育 1 h 后,用酶标仪测 450 nm 波长下吸光度值 *A*,并计算细胞生长抑制率:生长抑制率 = (1 - *A*_{给药组}/*A*_{正常组}) × 100%。实验在相同条件下重复 3 次。

2.3.2 流式细胞仪检测细胞周期 取生长状态良好的细胞配制成密度为 1.0 × 10⁵/mL 接种于 24 孔板,细胞贴壁后加含药血清 1 mL,培养细胞 72 h 后用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化收集于 1.5 mL 离心

管中, 1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 用预冷的生理盐水清洗 2 次, 弃上清, 加入 1 mL 预冷的 70% 乙醇, 固定 4 ℃ 过夜。第 2 天弃掉固定液, PBS 洗 2 遍, 加 500 μL 4 ℃ 预冷的 PBS 重悬细胞, 后加入 20 μL 的 RNase A (25 g·L⁻¹) 及 2.5 μL 的 PI (10 g·L⁻¹) 室温避光染色 30 min, 上机检测细胞周期。

2.3.3 Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡率 取对数生长期细胞, 用不含 EDTA 胰蛋白酶消化, 调整细胞密度为 1.0 × 10⁵/mL, 以每孔 1 mL 接种于 24 孔板, 细胞贴壁后弃掉培养液, 分别加入各组含药血清, 常规培养 72 h 用不含 EDTA 胰蛋白酶消化收集细胞并 1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 细胞沉淀后用预冷 PBS 缓冲液冲洗 1 次, 离心弃上清液, 每孔加入 500 μL 的 Binding Buffer 悬浮细胞, 分别加入 5 μL Annexin V 混匀再加入 5 μL PI, 混匀后 4 ℃ 避光孵育 30 min, 上流式细胞仪进行检测, 激发波长 488 nm, 检测波长 560 nm, 并用随机软件进行数据分析。

2.3.4 荧光定量 PCR 检测相关 mRNA 的表达 不同浓度的药物作用 72 h 后, 用 PBS 清洗细胞, Trizol 抽提总 RNA, 根据试剂盒说明书进行反转录, 37 ℃ 孵育 15 min, 85 ℃ 孵育 5 s。应用试剂盒进行相应的荧光定量 PCR 实验。反应体系: 2 × Mix 10 μL, 上

下游引物 (1 μmol·L⁻¹) 各 4 μL, cDNA 2 μL。反应条件: 95 ℃ 5 min, 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 30 s。

2.3.5 流式细胞术检测 CD133 蛋白的表达 药物作用 72 h 后分别收集细胞, 每组细胞分为 2 管, 进行细胞表面染色, 第一管加入同型正常抗体 (IsO), 第二管加入 PE-CD133 和 Percp-7-AAD 抗体各 2 μL。室温避光孵育 15 min 后上流式细胞仪进行分析。

2.4 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件处理, 本研究的数据均为计量资料各数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 根据实验的设计多组之间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, CCK8 法测定细胞增殖能力的比较采用双因素方差分析, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 A549 细胞增殖的影响 与正常组比较, 各给药组均能明显增加 A549 细胞的抑制率 (*P* < 0.05, *P* < 0.01), 补肾疏肝方高剂量组抑制率仅次于顺铂组, 补肾疏肝方高剂量联合顺铂组对 A549 细胞抑制作用最强, 作用 24, 48, 72 h 的抑制率分别为 45.39%, 54.76% 及 59.94%, 其中 72 h 的作用最明显。见表 1。

表 1 补肾疏肝方对 A549 细胞不同时间生长的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Inhibitions of Bushen Shugan formula on growth of A549 cells at different times ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	24 h		48 h		72 h	
		A549	抑制率/%	A549	抑制率/%	A549	抑制率/%
正常	-	1.32 ± 0.06	-	1.35 ± 0.03	-	1.39 ± 0.03	-
补肾疏肝方	15	1.20 ± 0.03	9.09 ¹⁾	1.15 ± 0.02	14.81 ²⁾	1.07 ± 0.06	23.02 ²⁾
	30	1.06 ± 0.04	19.70 ²⁾	1.01 ± 0.02	25.19 ²⁾	1.00 ± 0.03	28.06 ²⁾
联合	8 + 15	0.87 ± 0.03	34.09 ²⁾	0.82 ± 0.06	39.26 ²⁾	0.81 ± 0.04	41.73 ²⁾
	8 + 30	0.72 ± 0.02	45.45 ²⁾	0.65 ± 0.03	51.85 ²⁾	0.56 ± 0.04	59.71 ²⁾
顺铂	8	1.02 ± 0.03	22.73 ²⁾	0.97 ± 0.05	28.15 ²⁾	0.91 ± 0.04	34.53 ²⁾

注: 与正常组比较¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01 (表 2, 图 1~3 同)。

3.2 对 A549 细胞周期的影响 与正常组比较, 各给药组均能明显增加 G₂/M 期细胞百分比 (*P* < 0.05, *P* < 0.01), 以高剂量联合顺铂组 G₂/M 期细胞百分比最高 (15.59%), 提示补肾疏肝方含药血清可通过诱导细胞周期阻滞到 G₂/M 期从而抑制 A549 细胞。见表 2。

3.3 对 A549 细胞凋亡率的影响 与正常组比较, 细胞培养 72 h 后, 各给药组明显升高细胞凋亡率 (*P* < 0.05, *P* < 0.01), 并以晚期凋亡为主, 其中高剂量联合顺铂组凋亡率最高。见图 1。

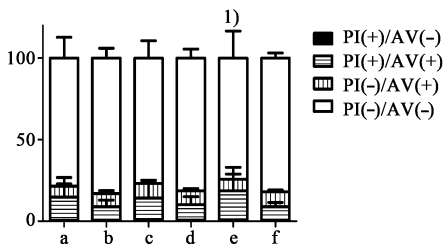
3.4 对 A549 细胞 CD133, SOX-2, OCT-4 mRNA 表达的影响 与正常组比较, 补肾疏肝方联合顺铂低、

表 2 补肾疏肝方作用于 A549 细胞 72 h 细胞周期时相分布 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effects of Bushen Shugan formula on cell cycle of A549 cells after 72 h ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
正常	-	68.47 ± 0.74	26.19 ± 0.90	5.34 ± 0.37
补肾疏肝方	15	69.23 ± 0.91	23.33 ± 0.85	7.44 ± 0.74
	30	68.39 ± 2.15	23.89 ± 0.64	7.72 ± 0.68 ¹⁾
联合	8 + 15	67.43 ± 0.67	23.56 ± 0.17	9.01 ± 0.77 ¹⁾
	8 + 30	63.32 ± 0.02	21.09 ± 0.69	15.59 ± 1.21 ²⁾
顺铂	8	65.79 ± 1.04	25.87 ± 0.70	8.34 ± 0.34 ²⁾

高剂量组均明显下调 CD133, SOX-2, OCT-4 mRNA 的表达 (*P* < 0.05), 不同剂量的补肾疏肝方含药血



a. 正常组; b. 补肾疏肝方 15 g·kg⁻¹组; c. 补肾疏肝方 30 g·kg⁻¹组; d. 联合低剂量组; e. 联合高剂量组; f. 顺铂组 (图 2~3 同)

图 1 补肾疏肝方对 A549 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Fig. 1 Effects of Bushen Shugan formula on apoptosis of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

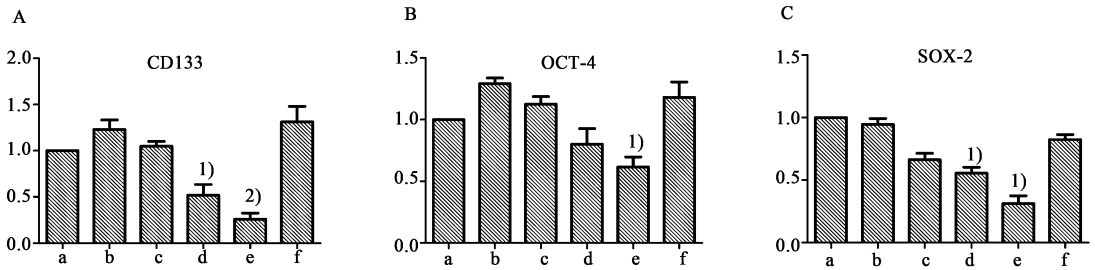


图 2 补肾疏肝方对 A549 细胞 CD133, SOX-2, OCT-4 mRNA 的表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Fig. 2 Effects of Bushen Shugan formula on gene expression of CD133, SOX-2, OCT-4 of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

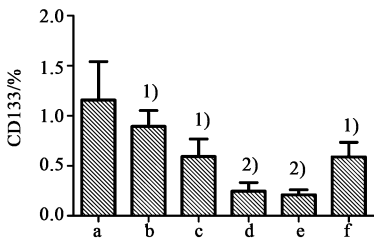


图 3 补肾疏肝方对 CD133 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Fig. 3 Effects of Bushen Shugan formula on expression of protein CD133 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

肿瘤干细胞研究的不断深入,基于中药复方或单味中药可以抑制肿瘤细胞增殖或防止肿瘤复发和转移等事实,中医药干预肿瘤干细胞的科学假设也随之涌现^[8]。

肺癌干细胞具有自我更新和无限增殖能力,是肺癌发生的“根源”,与肺癌侵袭、转移性进展、抵抗治疗和复发密切相关^[9]。肺癌传统的放化疗等治疗方法能够清除肿瘤或抑制肿瘤生长,但易使肺癌干细胞耐药,甚至上调肺癌干性因子的表达,残存的肺癌干细胞易使肿瘤复发^[10-11]。肺癌干细胞的表面标记虽然较多,但是 CD133^[12], SOX-2^[13], OCT-4^[13-14]等,尤其是 CD133 则为国内外较为公认的肺癌干细胞的表面标记。

清作用于 A549 细胞 72 h 后,低剂量组与高剂量组对 CD133, SOX-2, OCT-4 无明显抑制作用。见图 2。

3.5 对 CD133 蛋白表达的影响 与正常组比较,各给药剂量组均能明显下调 CD133 蛋白的表达 ($P < 0.05, P < 0.01$),药物浓度越高下调幅度越大,与顺铂联合具有协同作用。见图 3。

4 讨论

随着发病率和死亡率迅速上升,肺癌已成为我国首位恶性肿瘤死亡原因,严重威胁人们的健康。肿瘤干细胞在肿瘤的生长与复发中起着重要作用,这些细胞具有自我更新和增殖的特性^[7]。伴随着

目前研究认为,肺癌组织中存在的 CD133⁺肺癌细胞具有更强的致癌能力,更强的增殖及自我更新能力,且与肿瘤耐药相关^[15]。SOX-2 和 OCT-4 被认为是维持胚胎干细胞自我更新和全能性的关键转录因子,是全能性或多能性干细胞标志物。SOX-2 和 OCT-4 不仅在胚胎干细胞、胚胎生殖细胞和生殖肿瘤细胞中表达,在一些原发性肿瘤中也表达,且与肿瘤发生、发展、侵袭和转移关系密切,对肿瘤干细胞维持其干细胞特性具有重要作用^[16]。

根据中医学理论认为,干细胞归于正气范畴,具先天之精属性,是先天之精在细胞层次的存在形式^[17]。肾藏精,主生长发育与生殖。肾精的构成,是以先天之精为基础,加之部分后天之精的充养而化成。先天之精是肾精的主体成分,肾中精气是人体生长发育和生殖能力的主宰,而干细胞是个体生长发育的基础^[18]。肾亦为主水之脏,肺为水之上源,共同完成正常的水液代谢;肺主呼吸,肾主纳气,共司呼吸运动;肺属金,肾属水,金水相生。肺肾相互合作,阴阳互资。肾中精气亏虚与肿瘤干细胞的产生很有可能有密切的关系,扶助肾中精气解毒散结抗癌可能是通过抑制肿瘤干细胞的增殖、分化从而达到抗肿瘤的目的^[19]。

补肾疏肝方由五子衍宗丸合逍遥散加减化裁而

来,由枸杞子、菟丝子、五味子、柴胡、覆盆子、薏苡仁、夏枯草、瓜蒌等18味中药组成,具有补肾养精、疏肝理气、化痰散结等功效。本课题组前期研究显示补肾疏肝方可提高机体免疫力,通过抑制凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,活化 p53 的表达诱导细胞凋亡从而抑制肿瘤细胞的生长增殖^[20-21]。

本研究结果表明,补肾疏肝方含药血清能够抑制 A549 的增殖,促进其细胞凋亡,使 CD133 蛋白的表达降低,与顺铂联合可下调 CD133, SOX-2, OCT-4 mRNA 的表达,提示补肾疏肝方可通过下调 CD133, SOX-2, OCT-4 的表达以抑制肺癌细胞的生长;而顺铂则使 CD133, OCT-4 等干性因子表达上调,这可能是顺铂在临床上易出现耐药的原因之一。但补肾疏肝方是通过哪些信号通路影响了 A549 细胞干性因子的表达仍有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Adhikari A S, Agarwal N, Iwakuma T. Metastatic potential of tumor-initiating cells in solid tumors [J]. *Front In Biosci*, 2011, 16:1927-1938.

[2] Tomuleasa C, Kacso G, Soritau O, et al. The fundamental mechanisms of metastatic spread and chemotherapy resistance in lung cancer [J]. *Pneumologia*, 2011, 60(2):99-103.

[3] Socinski M A. Cytotoxic chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer: a review of standard treatment paradigms [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(12):4210s-4214s.

[4] Cortes-Dericks L, Galetta D, Spaggiari L, et al. High expression of octamer-binding transcription factor 4A, prominin-1 and aldehyde dehydrogenase strongly indicates involvement in the initiation of lung adenocarcinoma resulting in shorter disease-free intervals [J]. *Eur J Cardiothoracic Surg*, 2012, 41(6):e173-e181.

[5] Soltanian S, Matin M M. Cancer stem cells and cancer therapy [J]. *Tumour Biol*, 2011, 32:425-440.

[6] 张英林,洪生. 肿瘤干细胞是中医药防治恶性肿瘤复发转移的可能靶点 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2009, 29(5):461-463.

[7] Liu Juntao, Mao Zhangfan, Huang Jie, et al. Blocking the NOTCH pathway can inhibit the growth of CD133-positive A549 cells and sensitize to chemotherapy [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 444(4):670-675.

[8] 陈惠,渠骨连,龚婕宁. 现代医学对恶性肿瘤转移相关机制的研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(15):2823-2828.

[9] 刘哲亮,肖高明,陈跃军,等. 肺癌干细胞与肺癌的发生 [J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(28):4568-4572.

[10] 常建辉,孟爱民. 肺干细胞和肺癌干细胞研究进展 [J]. *生命科学*, 2011, 23(4):348-352.

[11] 石磊芝,苏鹏,王天一,等. 顺铂干预对 A549 中干性因子 Nanog 表达及侵袭力的影响 [J]. *广东医学*, 2012, 33(6):733-735.

[12] Giulia B, Luca R, Paola P, et al. Highly tumorigenic lung cancer CD133⁺ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment [J]. *PNAS*, 2009, 16(38):16281-16286.

[13] Sholl L M, Long K B, Hornick J L. Sox2 expression in pulmonary non-small cell and neuroendocrine carcinomas [J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2010, 18(1):55-61.

[14] Levina V, Marrangoni A M, DeMarco R, et al. Drug selected human lung cancer stem cells: cytokine network, tumorigenic and metastatic properties [J]. *PLoS One*, 2008, 3(8):e3077.

[15] Bertolini G, Roz L, Perego P, et al. Highly tumorigenic lung cancer CD133⁺ cells display stem like features and are spared by cisplatin treatment [J]. *PNAS*, 2009, 16(38):16281-16286.

[16] Chiou S H, Wang M L, Chou Y T, et al. Coexpression of Oct4 and Nanog enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer stem cell-like properties and epithelial-mesenchymal transdifferentiation [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(24):10433-10444.

[17] 徐志伟,张进,张明. 从心肾相关探讨干细胞移植治疗冠心病心衰的中医理论内涵 [J]. *云南中医学院学报*, 2009, 32(5):1-4.

[18] 黄晓芹,罗再琼. 中医“肾精”与现代干细胞研究的同一性探讨 [J]. *成都中医药大学学报*, 2012, 35(2):5-9.

[19] 王爽,徐振晔. 肺癌干细胞研究进展及与中医药关系的思考 [J]. *辽宁中医杂志*, 2012, 39(10):2102-2104.

[20] 古兆森,王淑玲,刘源. 补肾疏肝方对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠免疫及内分泌的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 18(6):188-191.

[21] 苗学红,王淑玲,古兆森,等. 补肾疏肝方对肺腺癌 A549 细胞的抑制及凋亡相关因子研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29(8):2661-2664.

[责任编辑 周冰冰]