

· 药理 ·

## 扶正抗癌方诱导 H1650 细胞凋亡的分子机制

李龙妹<sup>1</sup>, 吴万垠<sup>2\*</sup>, 王苏美<sup>2</sup>, 龙顺钦<sup>2</sup>, 杨小兵<sup>2</sup>, 周宇妹<sup>2</sup>

(1. 广州中医药大学第二临床医学院, 广州 510006; 2. 广东省中医院芳村分院, 广州 510370)

**[摘要]** **目的:**观察扶正抗癌方对 H1650 细胞凋亡的影响,并探讨其诱导 H1650 细胞凋亡的分子机制。**方法:**以人肺腺癌细胞株 H1650 细胞为研究对象,用 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0 g·L<sup>-1</sup>扶正抗癌方处理 H1650 细胞 24,48,72 h,另设空白组,四氮唑蓝盐化合物(MTS)法检测细胞增殖;用 0.5,1.0,1.5 g·L<sup>-1</sup>扶正抗癌方处理 H1650 细胞 24 h,另设空白组,Annexin V-FITC/碘化丙啶(PI)流式细胞术检测细胞凋亡;用 0.5,1.0,2.0 g·L<sup>-1</sup>扶正抗癌方处理 H1650 细胞 24 h,另设空白组,半胱氨酸蛋白酶-3/7(Caspase-3/7)活力检测试剂盒检测 Caspase-3/7 活力;蛋白免疫印迹法检测扶正抗癌方对 proCaspase-3,聚腺苷二磷酸-核糖聚合酶(PARP),Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)表达。**结果:**与空白组比较,扶正抗癌方能明显抑制 H1650 细胞的增殖( $P < 0.05$ ),且呈浓度和时间依赖性。与空白组比较,扶正抗癌方明显诱导 H1650 细胞的早期凋亡,增强 Caspase-3/7 的活力( $P < 0.05$ ),且呈浓度依赖性。与空白组比较,扶正抗癌方明显下调 proCaspase-3 和 PARP 的表达( $P < 0.05$ ),呈浓度依赖性,明显上调 Bax 的表达( $P < 0.05$ ),且呈时间依赖性。**结论:**扶正抗癌方可通过激活 Caspase-3 和 Bax 诱导 H1650 细胞的凋亡。

**[关键词]** 扶正抗癌方;细胞凋亡;半胱氨酸蛋白酶-3/7;Bcl-2 相关 X 蛋白

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)14-0106-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016140106

### Molecular Mechanism of Fuzheng Kang'ai Decoction in Inducing Apoptosis of H1650 Cells

LI Long-mei<sup>1</sup>, WU Wan-yin<sup>2\*</sup>, WANG Su-mei<sup>2</sup>, LONG Shun-qin<sup>2</sup>, YANG Xiao-bing<sup>2</sup>, ZHOU Yu-shu<sup>2</sup>

(1. The Second Clinical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;  
2. Fangcun Branch, Guangdong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510370, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effects of Fuzheng Kang'ai (FZKA) decoction on apoptosis of H1650 cells and discuss its molecular mechanism in apoptosis of H1650 cells. **Method:** Human lung adenocarcinoma cells (H1650 cells) were used as the research objects and treated for 24, 48, 72 h with 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 g·L<sup>-1</sup> FZKA decoction, and a blank group was set up, then cell proliferation was detected by 3-(4, 5-diethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-etrazolium, inner salt (MTS) assay. H1650 cells were treated for 24 h with 0.5, 1.0, 1.5 g·L<sup>-1</sup> FZKA decoction and a blank group was set up, then cell apoptosis was detected by Annexin V-FITC/PI flow cytometry analysis. H1650 cells were treated for 24 h with 0.5, 1.0, 2.0 g·L<sup>-1</sup> FZKA decoction and a blank group was set up, then vitality of Caspase-3/7 was detected by Caspase-3/7 vitality test kit. Simultaneously, effects of FZKA decoction on the expression levels of proCaspase-3, PARP and Bax were detected by Western blot assay. **Result:** As compared with the blank group, proliferation of H1650 cells was significantly inhibited by FZKA decoction in concentration-dependent and time-dependent manners

**[收稿日期]** 20151230(013)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81273965,81503507);广东省自然科学基金项目(2015A030310245);广东省建设中医药强省科研项目(20141104)

**[第一作者]** 李龙妹,博士,从事中医药对分子靶向药物治疗肺癌的增敏研究,Tel:15622245342,E-mail:lilongmei086@163.com

**[通讯作者]** \* 吴万垠,博士,主任医师,从事中医药对分子靶向药物治疗肺癌的增敏研究,Tel:020-81499399,E-mail:wwanyin@126.com

( $P < 0.05$ ). As compared with the blank group, early apoptosis of H1650 cells was significantly induced and vitality of Caspase-3/7 was increased by FZKA decoction in a concentration-dependent manner ( $P < 0.05$ ). As compared with the blank group, the expression levels of proCaspase-3 and PARP were significantly reduced by FZKA decoction in a concentration-dependent manner ( $P < 0.05$ ), and the expression of Bax was increased by FZKA decoction in a time-dependent manner ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Apoptosis is induced by FZKA decoction in way of activating Caspase-3 and Bax in H1650 cells.

[**Key words**] Fuzheng Kang'ai; decoction; apoptosis; Caspase-3/7; Bax

广东省中医院肿瘤科吴万垠主任根据肺癌证型分布,采用辨证与辨病相结合的中医治疗肿瘤原则,以健脾益气、扶正抑瘤为法,拟定了扶正抗癌方。目前,扶正抗癌方在治疗晚期非小细胞肺癌(NSCLC)中取得了显著疗效。相关研究吉非替尼单药和吉非替尼联合扶正抗癌方治疗晚期 NSCLC 的效果,发现前者中位疾病无进展生存时间为 11.43 个月,后者为 13.1 个月;前者中位生存时间为 18.7 个月,后者为 22.83 个月;前者皮疹发生率为 41.38%,后者为 24.14%<sup>[14]</sup>。基础研究发现,扶正抗癌方联合吉非替尼对 H1650 裸鼠移植瘤具有抑制作用<sup>[5-6]</sup>,同时能显著抑制 A549 细胞的增殖并诱导其凋亡<sup>[7]</sup>;Zheng 等<sup>[8]</sup>研究发现扶正抗癌方可通过腺苷酸活化蛋白激酶  $\alpha$ /胰岛素样生长因子结合蛋白 1/Forkhead 转录因子 3a (AMPK $\alpha$ /IGFBP1/FOXO3a) 通路抑制 NSCLC 细胞的增殖。细胞凋亡在肿瘤发生和发展中有重要意义,而且化疗、放疗和生物治疗等都主要通过诱导细胞凋亡来治疗肿瘤<sup>[9]</sup>。扶正抗癌方对肿瘤细胞凋亡的作用未见文献报道,因此本文以人肺腺癌细胞株 H1650 为研究对象,探讨了扶正抗癌方对细胞凋亡的诱导作用,并探讨其诱导细胞凋亡的分子机制。

## 1 材料

**1.1 细胞株** 肺腺癌细胞株 H1650 购自上海生命科学院细胞库,其有表皮生长因子受体(EGFR)突变合并 c-MET 扩增,对吉非替尼耐药,为贴壁依赖性细胞。

**1.2 药物** 扶正抗癌方组成为太子参 15 g,白术 15 g,黄芪 30 g,炒薏苡仁 30 g,甘草 10 g,山慈菇 30 g,白花蛇舌草 30 g,龙葵 30 g,石见穿 30 g,八月札 30 g,蛇泡筋 30 g,莪术 15 g。取全量处方药材,12 倍水浸泡 30 min。加热至沸煎煮 2 h 后,分离煎液,药渣继续加水煎煮 2 次,每次加 8 倍量水煎煮 1 h,合并煎液。煎液低温减压浓缩,收集浓缩液。浓缩液喷雾干燥,收集干粉并干压制粒后分装至成品<sup>[10]</sup>。颗粒制备由广东一方制药有限公司完成,每

1 g 颗粒含生药 10.33 g。

**1.3 试剂** GOAT X Rabbit-HRP(美国 Bio-Rad 公司,批号 1706515),Annexin V-FITC/碘化丙啶(PI)凋亡试剂盒(杭州联科生物有限公司,批号 1528),RPMI-1640 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号分别为 C11875500CP,1600044),BCA 蛋白检测试剂盒(美国 Thermo 公司,批号 23225);半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) antibody, Cleaved Caspase-3 Rabbit mAb,聚腺苷二磷酸-核糖聚合酶(PARP) Antibody, Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax) Rabbit mAb(美国 CST 公司,批号分别为 9662,9664,9542,5284);CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Caspase-3/7 活力检测试剂盒(美国 Promega 公司,批号分别为 G3582,G8091)。

**1.4 仪器** Eon.C 型多功能酶标仪(美国 BioTek 公司),5430R 型冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司),TS-1000 型脱色摇床(江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** 肺腺癌细胞株 H1650 采用 RPMI-1640 培养基,37 °C 5% CO<sub>2</sub> 条件下传代培养。

**2.2 药物配制** 取扶正抗癌方颗粒 0.5 g 加入无血清 1640 培养基 25 mL 中,溶解完全,6 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,取上清 0.22  $\mu$ m 滤器过滤,作为 20 g·L<sup>-1</sup>母液,4 °C 保存。预实验设置扶正抗癌方最大质量浓度为 3.0 g·L<sup>-1</sup>,pH 7.2~7.4,显微镜下观察加入 3.0 g·L<sup>-1</sup>药液后细胞的形态未发生变化,考虑加入扶正抗癌方药液不影响培养基的 pH 和细胞渗透压。体外实验药物浓度计算参照文献[11-12]。

**2.3 四氮唑蓝盐化合物(MTS)法检测细胞增殖** 取对数生长的 H1650 细胞,以 5 × 10<sup>3</sup> 个/孔接种于 96 孔板,37 °C 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 24 h。分别加入质量浓度为 0,0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0 g·L<sup>-1</sup>的扶正抗癌方药液 100  $\mu$ L,每个质量浓度设 5 个复孔。加药 24,48,72 h 后分别加入 CellTiter 96®

Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay 溶液 20  $\mu\text{L}$ , 作用 4 h 后震荡 10 min, 于多标记微孔板检测仪 570 nm 处测定各组吸光度  $A$ , 并设空白组细胞存活率为 100%, 细胞存活率 =  $(A_{\text{药物组}}/A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ , 计算各组细胞存活率。

**2.4 Annexin V-FITC/PI 双染检测细胞凋亡** 取对数生长的 H1650 细胞, 以  $3 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板中, 24 h 后分别加入质量浓度为 0, 0.5, 1.0, 1.5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的扶正抗癌方药液 2 mL, 培养 24 h, 收集细胞, 洗涤后, 每管加入 Annexin V-FITC 5  $\mu\text{L}$  和 PI 10  $\mu\text{L}$ , 避光孵育 5 min 后采用流式细胞仪检测样品的凋亡情况。

**2.5 Caspase-3/7 活力检测** 取对数生长的 H1650 细胞, 以  $5 \times 10^3$  个/孔接种于 96 孔板, 24 h 后加入质量浓度为 0, 0.5, 1.0, 2.0  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  扶正抗癌方培养基 100  $\mu\text{L}$ , 24 h 后, 加入 Apo-ONE Caspase-3/7 混合液 100  $\mu\text{L}$ , 常温避光孵育 1 h, 采用多功能酶标仪检测, 取给药组/空白组表示 Caspase-3/7 活力。

**2.6 蛋白免疫印迹法检测 proCaspase-3, PARP, Bax 蛋白表达** 取对数生长的 H1650 细胞, 以  $2.5 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板, 细胞培养及加药同 2.4。收集细胞, 蛋白裂解液裂解, BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度。将蛋白样品上样、电泳、转膜、封闭, 加入一抗(1:1 000)孵育 2 h, 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 加入二抗(1:3 000)孵育 1 h。免疫发光, 使用 Image Lab 显影成像。所有实验均至少重复 3 次。

**2.7 统计学方法** 采用 Stata 11.0 统计软件, 计量数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 数据进行正态性及方差齐性检验, 当满足正态性及方差齐性时, 采用单因素方差分析; 若不满足正态性或方差齐性时, 采用非参数检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 扶正抗癌方对 H1650 细胞增殖的影响** 与空白组比较, 随给药浓度的增加和给药时间的延长, 扶正抗癌方组 H1650 细胞存活率逐渐降低, 给药质量浓度从 1.0  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  开始, 细胞存活率明显减低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。扶正抗癌方以浓度和时间依赖性抑制 H1650 细胞的增殖。见表 1。

**3.2 扶正抗癌方对 H1650 细胞凋亡的影响** 与空白组比较, 随给药浓度的增加, 扶正抗癌方组细胞早期凋亡率逐渐增加, 给药质量浓度从 1.0  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  开始, 细胞早期凋亡率明显增加 ( $P < 0.05$ )。扶正抗癌方以浓度依赖性诱导 H1650 细胞凋亡。见表 2。

**3.3 扶正抗癌方对 Caspase-3/7 表达的影响** 与空

表 1 扶正抗癌方对 H1650 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 1 Effect of FZKA decoction on cell survival rate in H1650 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	24 h	48 h	72 h
空白	-	1	1	1
扶正抗癌方	0.5	0.93 $\pm$ 0.02	0.93 $\pm$ 0.05	0.91 $\pm$ 0.06
	1.0	0.82 $\pm$ 0.10 <sup>1)</sup>	0.78 $\pm$ 0.09 <sup>1)</sup>	0.75 $\pm$ 0.05 <sup>1)</sup>
	1.5	0.67 $\pm$ 0.02 <sup>2)</sup>	0.52 $\pm$ 0.08 <sup>2)</sup>	0.50 $\pm$ 0.10 <sup>2)</sup>
	2.0	0.65 $\pm$ 0.04 <sup>2)</sup>	0.45 $\pm$ 0.03 <sup>2)</sup>	0.37 $\pm$ 0.10 <sup>2)</sup>
	2.5	0.59 $\pm$ 0.02 <sup>2)</sup>	0.29 $\pm$ 0.04 <sup>2)</sup>	0.31 $\pm$ 0.07 <sup>2)</sup>
	3.0	0.57 $\pm$ 0.03 <sup>2)</sup>	0.27 $\pm$ 0.05 <sup>2)</sup>	0.22 $\pm$ 0.04 <sup>2)</sup>

注: 与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ , <sup>2)</sup> $P < 0.01$ (表 2, 3, 图 1~3 同)。

表 2 扶正抗癌方对 H1650 细胞早期凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 2 Effect of FZKA decoction on early apoptosis in H1650 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	早期凋亡率/%
空白	-	2.87 $\pm$ 0.32
扶正抗癌方	0.5	4.50 $\pm$ 0.40
	1.0	7.70 $\pm$ 0.80 <sup>2)</sup>
	1.5	13.60 $\pm$ 0.85 <sup>2)</sup>

白组比较, 随给药浓度的增加, 扶正抗癌方组 Caspase-3/7 的活力逐渐增强, 给药质量浓度从 1.0  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  开始, Caspase-3/7 活力明显增强 ( $P < 0.05$ )。扶正抗癌方以浓度依赖性增强 Caspase-3/7 的活力。见表 3。

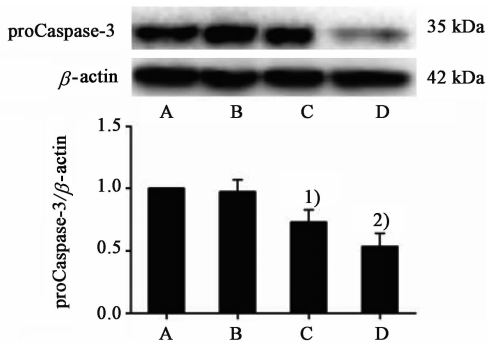
表 3 扶正抗癌方对 Caspase-3/7 活力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 3 Effect of FZKA decoction on activity of Caspase-3/7 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

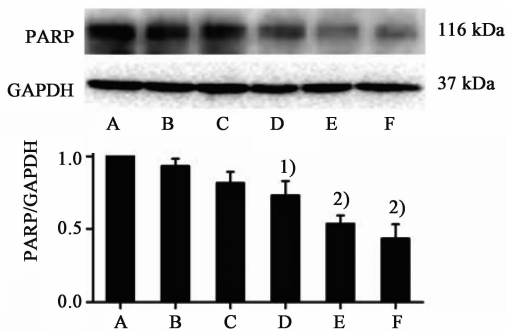
组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	Caspase-3/7 活力
空白	-	1
扶正抗癌方	0.5	1.14 $\pm$ 0.11
	1.0	1.70 $\pm$ 0.21 <sup>1)</sup>
	2.0	2.49 $\pm$ 0.22 <sup>2)</sup>

**3.4 扶正抗癌方对 proCaspase-3, PARP 蛋白表达的影响** 与空白组比较, 扶正抗癌方作用于细胞 24 h 后, 随给药浓度的增加, proCaspase-3, PARP 表达逐渐降低, 给药质量浓度从 1.0  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  开始, proCaspase-3 表达明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 给药质量浓度从 1.5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  开始, PARP 表达明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。扶正抗癌方以浓度依赖性下调 proCaspase-3 和 PARP 的表达。见图 1, 2。

**3.5 扶正抗癌方对 Bax 蛋白表达的影响** 扶正抗癌方作用于 H1650 细胞 1 h 后即上调 Bax 蛋白的表

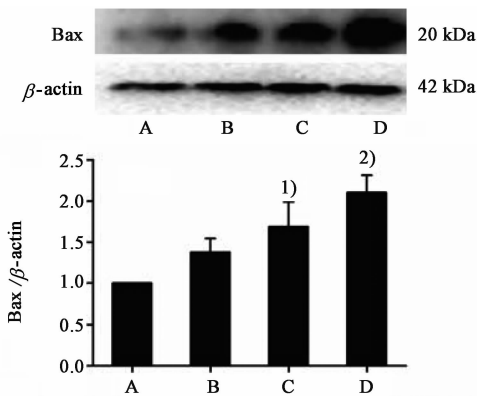


A. 空白组; B~D. 扶正抗癌方(0.5, 1.0, 2.0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )组  
图 1 扶正抗癌方对 proCaspase-3 蛋白表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )  
Fig. 1 Effect of FZKA decoction on protein expression of proCaspase-3( $\bar{x}\pm s, n=3$ )



A. 空白组; B~F. 扶正抗癌方(0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )组  
图 2 扶正抗癌方对 PARP 蛋白表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )  
Fig. 2 Effect of FZKA decoction on protein expression of PARP( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

达,且随着时间的推移,Bax 表达逐渐增加,2 h 后与空白组比较,Bax 表达明显上调( $P < 0.05, P < 0.01$ )。扶正抗癌方以时间依赖性上调 Bax 的表达,其能够通过激活 Bax 诱导 H1650 细胞的凋亡。见图 3。



A. 空白组; B~D. 扶正抗癌方(1.0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )给药 1, 2, 4 h 组  
图 3 扶正抗癌方对 Bax 蛋白表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )  
Fig. 3 Effect of FZKA decoction on protein expression of Bax( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

#### 4 讨论

细胞凋亡是在一系列信号刺激后发生的级联性

主动死亡过程,对维持组织、器官的正常形态与功能有重要意义<sup>[13]</sup>。肿瘤不仅细胞增殖与分化发生异常,同时细胞凋亡也存在异常。在恶性肿瘤发生和发展过程中,相比细胞过度增殖,对细胞凋亡的抑制才是肿瘤恶化的关键因素<sup>[14]</sup>。本研究发现扶正抗癌方以浓度依赖性诱导 H1650 细胞凋亡,为进一步探明其诱导细胞凋亡的分子机制,分别检测了扶正抗癌方对重要凋亡因子 Caspase-3 和 Bax 表达的影响。

Caspase 家族是一类直接导致细胞解体的蛋白酶,在细胞凋亡过程中起着执行者的作用,其以级联方式诱导细胞凋亡,可分为凋亡启动因子、凋亡执行因子和炎症介导因子。Caspase-3 是一类重要的凋亡执行因子,其活化后能够灭活凋亡抑制蛋白、酶解细胞外基质及骨架蛋白、裂解 DNA 修复相关分子,使细胞固缩、染色质聚集、细胞核破碎,从而使细胞凋亡<sup>[15]</sup>。正常情况下,proCaspase-3 以无活性的酶原形式存在,凋亡信号导致其发生裂解而活化<sup>[16]</sup>。本研究发现扶正抗癌方以浓度依赖性激活 Caspase-3/7,扶正抗癌方作用于 H1650 细胞 24 h 后即以浓度依赖性下调 proCaspase-3 的表达,表明扶正抗癌方能够激活 Caspase-3,触发凋亡进程。活化的 Caspase-3 可切割不同底物,导致蛋白酶级联切割放大,最终使细胞走向凋亡。DNA 修复因子 PARP 是 Caspase-3 的主要切割底物,对于细胞稳定非常重要,其被切割后失去酶活力,使细胞结构功能紊乱<sup>[17]</sup>。蛋白免疫印迹法检测 PARP 的表达发现,扶正抗癌方以浓度依赖性下调 PARP 的表达,表明 PARP 因被活化的 Caspase-3 切割而减少,进一步佐证了扶正抗癌方能够激活 Caspase-3 加速细胞凋亡进程。

B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)家族是重要的细胞凋亡调节因子,主要调控线粒体结构与功能稳定<sup>[18]</sup>。Bcl-2 家族可分为抑凋亡蛋白和促凋亡蛋白两类功能相反的蛋白质,其中 Bax 是研究最为广泛的促凋亡蛋白。Bax 定位于细胞质,当细胞接收死亡信号后,Bax 在蛋白酶作用下发生构象变化,由细胞质移位到线粒体膜上,形成同源二聚体,并与膜内抗凋亡蛋白相互作用,使抗凋亡蛋白丧失对凋亡的抑制作用,破坏线粒体结构与功能,释放线粒体内促凋亡因子 Apaf-1,Apaf-1 与细胞色素 C 相互作用激活 Caspase 凋亡信号通路,最终导致细胞凋亡<sup>[19]</sup>。研究发现 Bax 在大量肿瘤细胞中表达下降,且上调 Bax 能促进多种肿瘤细胞的凋亡<sup>[20]</sup>。本研究发现

扶正抗癌方给药 1 h 后即能上调 Bax 的表达,且随时间的推移,Bax 表达逐渐增加,表明扶正抗癌方能够激活 Bax 诱导细胞凋亡。

综上所述,扶正抗癌方能够通过激活 Caspase-3 和 Bax 诱导 H1650 细胞的凋亡。

[参考文献]

[1] 杨小兵. 扶正抗癌方对吉非替尼治疗晚期非小细胞肺癌的增效研究[D]. 广州:广州中医药大学,2014.

[2] Yang X B, Wu W Y, Long S Q, et al. Effect of gefitinib plus Chinese herbal medicine (CHM) in patients with advanced non-small-cell lung cancer: a retrospective case-control study[J]. *Complement Ther Med*, 2014, 22(6): 1010-1018.

[3] 吴万垠, 杨小兵, 龙顺钦, 等. 扶正抗癌方联合吉非替尼治疗晚期非小细胞肺癌优势人群与非优势人群的比较[J]. *时珍国医国药*, 2013, 24(9): 2152-2154.

[4] 杨昌卫. 扶正抗癌方联合吉非替尼治疗晚期非小细胞肺癌的临床研究[D]. 广州:广州中医药大学, 2011.

[5] 杨小兵, 吴万垠, 龙顺钦, 等. 扶正抗癌方联合吉非替尼对 H1650 裸鼠移植瘤 EGFR、AKT 及 ERK 表达的影响[C]. 广州:第五届国际中医、中西医结合肿瘤学术交流大会暨第十四届全国中西医结合肿瘤学术大会, 2014.

[6] 杨小兵, 吴万垠, 龙顺钦, 等. 扶正抗癌方联合吉非替尼对肺癌 H1650 细胞株裸鼠移植瘤的抑制作用[C]. 广州:第五届国际中医、中西医结合肿瘤学术交流大会暨第十四届全国中西医结合肿瘤学术大会, 2014.

[7] 杨小兵, 陈晓, 吴万垠, 等. 扶正抗癌方联合吉非替尼对肺癌 A549 细胞的影响及机制研究[C]. 重庆:第一届青年中西医结合肿瘤学术论坛, 2015.

[8] Zheng F, Wu J J, Li X, et al. Chinese herbal medicine Fuzheng Kangai decoction inhibited lung cancer cell growth through AMPK  $\alpha$ -mediated induction and interplay of IGFBP1 and FOXO3a [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016; 5060757. doi: 10.1155/2016/5060757.

[9] Wong R S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2011, 30(1): 1096-1104.

[10] Tilton R, Paiva A A, Guan J Q, et al. A comprehensive platform for quality control of botanical drugs (Phytomics QC): a case study of Huangqin Tang (HQT) and PHY906 [J]. *Chin Med*, 2010, 5(1): 30-44.

[11] 司徒镇强. 细胞培养[M]. 西安:世界图书出版公司西安分公司, 1996:135.

[12] 林晓斐. 《中国居民营养与慢性病状况报告(2015年)》发布[J]. *中医药管理杂志*, 2015(13): 79.

[13] Flusberg D A, Sorger P K. Surviving apoptosis: life-death signaling in single cells [J]. *Trends Cell Biol*, 2015, 25(8): 446-458.

[14] Chaabane W, User S D, El-Gazzah M, et al. Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer [J]. *Arch Immunol Ther Exp*, 2013, 61(1): 43-58.

[15] Brentnall M, Rodriguez-Menocal L, De Guevara R L, et al. Caspase-9, Caspase-3 and Caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis [J]. *BMC Cell Biol*, 2013, 14(1): 32.

[16] 岳原亦, 张扬, 张一奇. Caspase 家族与细胞凋亡[J]. *中国医疗前沿*, 2011, 6(6): 25-26.

[17] 赵瑞杰, 李引乾, 王会, 等. Caspase 家族与细胞凋亡的关系[J]. *中国畜牧杂志*, 2010, 46(17): 73-78.

[18] Martinou J C, Youle R J. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mtochondrial dynamics [J]. *Dev Cell*, 2011, 21(1): 92-101.

[19] Moldoveanu T, Follis A V, Kriwacki R W, et al. Many players in Bcl-2 family affairs [J]. *Trends Biochem Sci*, 2014, 39(3): 101-111.

[20] Czabotar P E, Lessene G, Strasser A, et al. Control of apoptosis by the Bcl-2 protein family: implications for physiology and therapy [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(1): 49-63.

[责任编辑 张丰丰]