

筋骨草总环烯醚萜对乳腺癌干细胞特性的干预作用及其机制分析

彭博, 贺蓉, 韩靖雅, 杨依霏, 徐启华*, 李建荣*

(中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] **目的:**研究筋骨草总环烯醚萜(iridoids in *Ajuga decumbens*, ADI)对乳腺癌干细胞特性的干预作用及分子机制。**方法:**采用无血清悬浮微球体形成实验, transwell 迁移和侵袭实验检测乳腺癌干细胞自我更新能力、运动和侵袭能力。流式细胞法分析 CD44⁺ CD24^{-/low} 细胞亚群比例。蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肿瘤干细胞干性相关蛋白, 细胞外信号调节激酶(ERK)和磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(PKB或Akt)信号通路相关蛋白的表达。**结果:**5~80 mg·L⁻¹ ADI能浓度依赖性降低乳腺癌 MCF-7 细胞微球体形成的数量和体积, 减少 CD44⁺ CD24^{-/low} 细胞亚群比例($P < 0.05$, $P < 0.01$)。10~40 mg·L⁻¹ ADI对乳腺癌 MCF-7 干细胞的迁移和侵袭能力有明显抑制作用($P < 0.05$, $P < 0.01$)。进一步研究发现, ADI能明显降低 p-ERK, p-Akt, 干性标志物八聚体结合转录因子-3/4(Oct-3/4), SRY 相关的 HMG 盒转录因子-2(Sox-2)和胚胎干细胞转录因子(Ecat4 或 Nanog)蛋白表达($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论:**筋骨草总环烯醚萜能有效地抑制乳腺癌干细胞的自我更新和转移潜能等“干性”特性, 作用机制可能与其调控 ERK1/2 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和 PI3K/Akt 信号通路, 下调相关干性标志物表达有关。

[关键词] 乳腺癌干细胞; 筋骨草总环烯醚萜; 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路; 磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(PKB或Akt)信号通路

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)18-0094-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017180094

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170629.0902.006.html>

[网络出版时间] 2017-06-29 9:02

Intervention Effect of *Ajuga decumbens* Iridoids on Characteristics of Breast Cancer Stem Cells via ERK MAPK and PI3K/Akt Signaling Pathways

PENG Bo, HE Rong, HAN Jing-ya, YANG Yi-fei, XU Qi-hua*, LI Jian-rong*

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of iridoids in *Ajuga decumbens* (ADI) on the characteristics of breast cancer stem cells (BCSCs) and its relevant mechanism. **Method:** We conducted several assays, including mammosphere formation assay, transwell migration, transwell invasion assay and flow cytometry to evaluated the cancer stem cell load and metastasis. Western blot was employed to detect the expression of associated proteins of BCSC markers, extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2), mitogen-activated protein kinase (MAPK) and phosphatidylinositol kinase 3-kinase (PI3K) /protein kinase B (Akt) signaling pathways. **Result:** The 5-80 mg·L⁻¹ ADI could significantly inhibit the mammosphere formation, percentage of CD44⁺ CD24^{-/low} subpopulation, migration and invasion in a dose-dependent manner ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Further studies found that ADI could markedly suppress p-ERK, p-Akt, octamer transcription factor-3/4 (Oct-3/4), SRY-related HMG box-2 (Sox-2) and ES cell-associated transcripts 4 (Ecat4 or Nanog) of BCSCs ($P <$

[收稿日期] 20170105(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81302981);中国中医科学院中药研究所基本科研业务费自主选题项目(ZZ2014004, ZXKT15021)

[第一作者] 彭博, 博士, 副研究员, 从事中药肿瘤药理研究, Tel:010-84252805-2231, E-mail:pumcpb@sina.com

[通讯作者] * 徐启华, 博士, 副研究员, 从事中药药理学研究, Tel:010-84252805-2231, E-mail:xuqihua19721027@163.com;

* 李建荣, 博士, 研究员, 从事中药药理学研究, Tel:010-64056575, E-mail:jrongliem@sina.com

0.05, $P < 0.01$). **Conclusion:** These results indicated that ADI could inhibit the characteristics of BCSCs by suppressing the ERK1/2 MAPK and PI3K/Akt pathways.

[Key words] breast cancer stem cells; iridoids in *Ajuga decumbens*; mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway; phosphatidylinositol kinase 3-kinase (PI3K) /protein kinase B (Akt) pathway

乳腺癌的发病率和死亡率位居女性恶性肿瘤之首^[1], 尽管通过早期筛查、手术切除、放化疗和生物治疗等治疗手段明显提高乳腺癌患者的生存率, 目前临床上有 30% ~ 40% 的乳腺癌复发并导致肺、骨、肝等远处转移^[2]。肿瘤干细胞理论认为肿瘤组织中只有肿瘤干细胞才具有真正意义的无限增殖、自我更新和对放化疗不敏感等特性, 乳腺癌干细胞是乳腺癌转移复发和耐药的根源^[3]。因此, 以乳腺癌干细胞为靶点的抗肿瘤药物发现对预防和治疗乳腺癌转移和复发具有重要的临床意义。

筋骨草始载于《本草拾遗》, 具有清热解毒、凉血消肿、祛咳止痰等功效^[4]; 《中医肿瘤学》^[5] 中记载其常用于治疗乳腺癌和肺癌。文献报道筋骨草对不同时期的胃肠、肝、肺的恶性肿瘤均有不同程度的抗肿瘤和延长生存期的疗效^[6-9]。本课题组前期体内、外实验均证实, 筋骨草提取物对乳腺癌及其转移有明显的抑制作用^[10]。但是目前针对筋骨草对乳腺癌干细胞影响尚未见报道。因此, 本文通过无血清培养基悬浮微球法富集乳腺癌干细胞, 研究筋骨草有效组分——总环烯醚萜 (iridoids in *Ajuga decumbens*, ADI) 对乳腺癌干细胞自我更新能力和转移潜能的影响, 同时探讨其对胞外信号调节激酶 (ERK) 1/2 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 和磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K) /蛋白激酶 B (PKB 或 Akt) 信号通路及其下游干性标志物的影响, 为其作为分化肿瘤细胞和肿瘤干细胞为靶点的乳腺癌治疗药物提供实验依据。

1 材料

1.1 药品 筋骨草总环烯醚萜 (ADI) 由本所制剂室提供, 取筋骨草全草加入 10 倍体积水煎煮 30 min 得水提取物, 经大孔树脂精制, 减压干燥后得 ADI, 质量分数为 63%, 其中含乙酰哈巴苷 35%, 哈巴苷 11%。

1.2 细胞株 人乳腺癌 MCF-7 细胞购自北京协和细胞资源中心, 使用含 10% FBS, 0.1 U·L⁻¹ 青霉素和 100 mg·L⁻¹ 链霉素的 DMEM 培养基, 置于 37 °C 5% CO₂ 细胞培养箱中培养, 0.25% 胰酶消化传代。

1.3 试剂 DMEM 培养基, 胎牛血清 (FBS), B27

(Gibco 公司, 批号分别为 1802644, 988558, 1251396); DMEM/F12 培养基 (HyClone 公司, 批号 AAJ207793); 人表皮生长因子 (EGF), 人碱性成纤维细胞生长因子 (FGF-basic) (Peprotech 公司, 批号分别为 0212AFC05, 1211AFC08); 细胞全蛋白提取试剂盒 (南京凯基生物公司, 批号 20150513); BCA 蛋白浓度试剂盒, ECL 高灵敏度化学发光试剂盒 (Thermo 公司, 批号分别为 QG219579, NL181598); transwell 小室 (Corning 公司, 批号 03712002); p-ERK, p-Akt, Akt, 干性标志物八聚体结合转录因子-3/4 (Oct-3/4), 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 一抗 (Santa Cruz 公司, 批号分别为 C1113, A1613, E2912, F2311, Z0129); ERK, SRY 相关的 HMG 盒转录因子-2 (Sox-2), 胚胎干细胞转录因子 (Ecat4 或 Nanog) (CST 公司, 批号分别为 26, 1, 6); 山羊抗小鼠免疫球蛋白 (Ig) G/辣根酶标记, 山羊抗兔 IgG/辣根酶标记二抗 (中杉金桥公司, 批号分别为 101966, 125946); FITC 标记的鼠抗人 CD24 单克隆抗体 (FITC-CD24), APC 标记的鼠抗人 CD44 单克隆抗体 (APC-CD44) (BD 公司, 批号分别为 2150632, 2202681)。

1.4 仪器 IX71 型荧光倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); Mini-PROTEAN Tetra cell 型电泳仪, Mini Trans-blot Electrophoretic Transfer cell 型转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司); FACSCanto II 流式细胞仪, FACSDiva Version 6.1.3 型流式分析软件 (美国 BD 公司)。

2 方法

2.1 乳腺癌干细胞无血清悬浮微球培养与传代 乳腺癌干细胞微球富集, 收集对数生长期 MCF-7 细胞, 无血清 DMEM/F12 培养基冲洗 2 次, 加入乳腺癌干细胞培养液 (无血清 DMEM/F12 培养基, 并添加 20 μg·L⁻¹ EGF, 20 μg·L⁻¹ FGF-basic 和 2% B27), 以 2 × 10⁴ 个/孔接种于低吸附 6 孔板中, 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养, 每 2 ~ 3 d 更换培养基, 连续培养 7 d 后收集第 1 代微球, 以 0.25% 胰酶消化传代, 继续按上述方法富集干细胞微球。

药物抑制乳腺癌干细胞微球形成, 收集 MCF-7 细胞, 按 2 × 10⁴ 个/孔接种于低吸附 6 孔板中, 同时

加入 ADI(终质量浓度分别为 5, 10, 20, 40, 80 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 培养 7 ~ 10 d, 计数直径 $> 50 \mu\text{m}$ 的微球个数, 按公式 $V = 4\pi R^3/3$ 计算微球体积, 并计算微球体形成效率(微球体数目/接种细胞数 $\times 100\%$)。

2.2 流式细胞术检测 MCF-7 细胞中 CD44^+ $\text{CD24}^{-/\text{low}}$ 细胞 将对数生长期 MCF-7 细胞按 1×10^6 个/孔接种于 6 孔板, 细胞贴壁后, 加入 ADI(终质量浓度分别为 5, 10, 20, 40, 80 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 培养 48 h。收集细胞, 加入抗 CD24-FITC 和抗 CD44-APC 进行标记, 避光冰上孵育 30 min, 磷酸盐缓冲液(PBS)离心冲洗 1 ~ 2 次, PBS 重悬后, 上机检测 CD44^+ $\text{CD24}^{-/\text{low}}$ 细胞。

2.3 细胞侵袭 Matrigel 胶 1:8 稀释后包被 $8 \mu\text{m}$ transwell 小室, 37°C 孵育 2 h 成胶。将用无血清悬浮微球形成法富集的第 3 代乳腺癌干细胞制备成单细胞悬液, 按每孔 5×10^4 个细胞/ $100 \mu\text{L}$ 接种于 transwell 上室, 同时加入不同浓度的 ADI, 下室加含 10% FBS 的培养基 $600 \mu\text{L}$, 培养 36 h。用棉签擦去上室细胞, 穿膜细胞以 5% 戊二醛固定后 0.1% 结晶紫染色 10 min, 显微镜拍照。在 100 倍放大视野范围内任选不重复的 5 个视野, 计算每个视野的细胞数。

2.4 transwell 小室检测细胞迁移 将第二代乳腺癌干细胞制成单细胞悬液, 按 5×10^4 个/孔接种于 6 孔板, 同时加入不同浓度的 ADI, 连续培养 7 d。收集 ADI 预处理的 MCF-7 细胞微球, 按 1×10^5 个/孔接种于 $8 \mu\text{m}$ transwell 上室, 其他步骤同 2.3 项, 穿膜 12 h。在 100 倍放大视野范围内任选不重复的

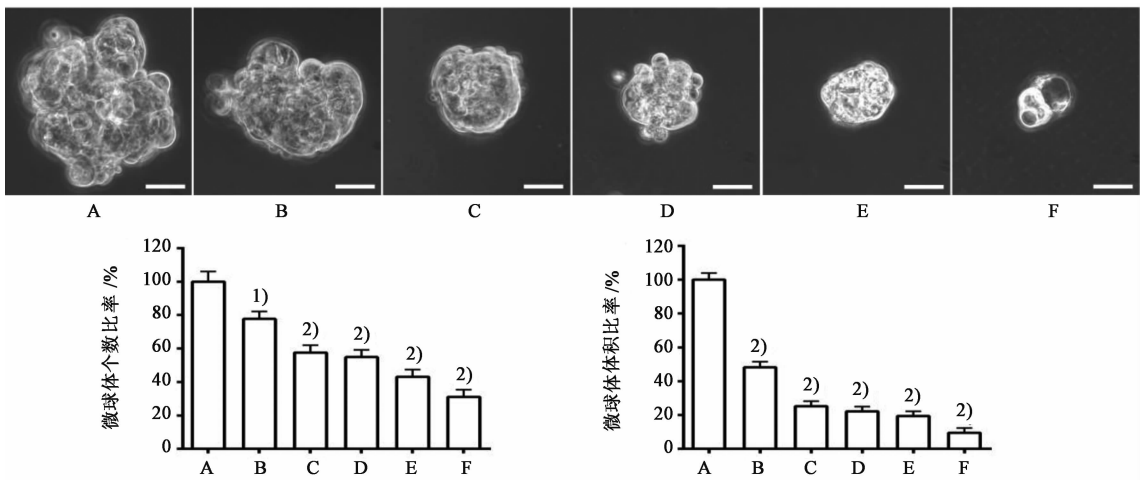
5 个视野, 计算每个视野的细胞数。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)分析蛋白表达 收集 ADI 处理的细胞微球, 加入细胞裂解液 $400 \mu\text{L}$ 冰上裂解 15 min。 4°C , $14\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 收集上清液, 采用 BCA 法测定蛋白浓度。取蛋白样品 $20 \mu\text{g}$ 进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 4°C , 350 mA 湿转 15 min, 5% BSA 室温封闭 1 h。分别用一抗(1:1 000) 4°C 孵育过夜; 洗膜后, HRP 标记二抗(1:2 000)室温孵育 1 h, ECL 化学发光试剂盒显色检测, Tanon 5200 型全自动化学发光图像分析系统采集图像, 以 GAPDH 为内参, 以目的蛋白灰度值/内参灰度值表示蛋白相对表达量。

2.6 统计学方法 所有数据采用 Graphpad prism 6.0 软件分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用 One-way ANOVA Dunnet's 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 ADI 对人乳腺癌 MCF-7 干细胞自我更新能力的影响 MCF-7 细胞悬浮培养 48 h 后形成较小的细胞团, 细胞团由几个到十几个细胞组成。第 5 天出现典型的悬浮细胞球, 直径 $> 50 \mu\text{m}$ 的细胞球形成效率约为 0.5%。第 7 天悬浮细胞球进一步增大增多, 形成由几十个到上百个细胞组成的细胞球, 细胞间连接紧密, 呈类圆形, 折光性增强, 直径 $> 50 \mu\text{m}$ 的细胞球形成效率约为 2%。同空白组比较, 连续给予 ADI 7 d 后, 乳腺癌 MCF-7 细胞微球体分散、数量和体积均明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$), 作用呈现剂量依赖性关系。见图 1。



A. 空白组; B ~ F. ADI(5, 10, 20, 40, 80 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)组; 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (图 2 同)

图 1 ADI 对乳腺癌 MCF-7 细胞微球体形成的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of ADI in forming mammosphere of MCF-7 breast cancer cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 ADI 对 MCF-7 细胞中 CD44⁺CD24^{-/low} 细胞比例的影响 CD44⁺CD24^{-/low} 是乳腺癌干细胞公认的标志物,空白组 MCF-7 细胞中 CD44⁺CD24^{-/low} 细胞约为 15.5%,与空白组比较,给予不同质量浓度的 ADI 孵育 48 h 后 CD44⁺CD24^{-/low} 细胞比例明显下降 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 2。

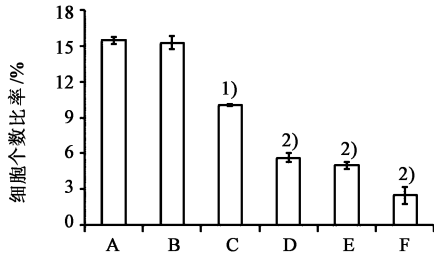
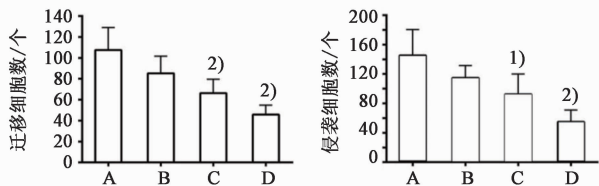
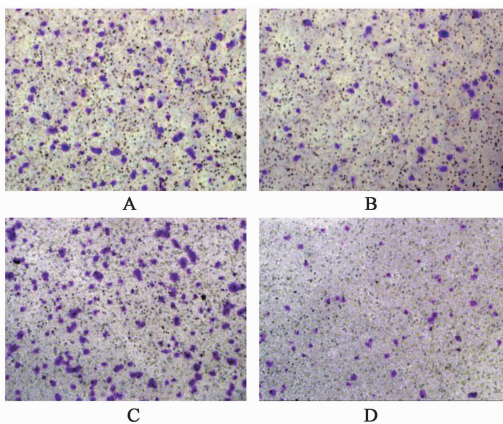


图 2 ADI 对乳腺癌 MCF-7 细胞中 CD44⁺CD24^{-/low} 细胞的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of ADI on proportion of CD44⁺CD24^{-/low} breast cancer stem cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 ADI 对乳腺癌 MCF-7 干细胞转移潜能的影响 在 100 倍放大视野范围内任选不重复的 5 个视野,计算每个视野的细胞数。与空白组比较,10 ~ 40 mg·L⁻¹ ADI 作用后能明显抑制乳腺癌干细胞的运动和侵袭能力 ($P < 0.05, P < 0.01$),且作用呈现浓度依赖性关系。见图 3。



A. 空白组; B ~ D. ADI (10, 20, 40 mg·L⁻¹) 组 (图 4 同); 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

图 3 ADI 对人乳腺癌干细胞运动和侵袭能力的影响 (结晶紫染色, $\times 100$) ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 3 Effect of ADI on migration and invasion of breast cancer stem cell (crystal violet stained, $\times 100$) ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3.4 ADI 对乳腺癌干性标志物及 p-ERK 和 p-Akt

蛋白表达的影响 与空白组比较,10 ~ 40 mg·L⁻¹ ADI 能浓度依赖性明显降低 Oct-3/4, Sox-2 和 Nanog 的表达,这些蛋白是维持乳腺癌干细胞特性所必须的蛋白,提示 ADI 明显抑制乳腺癌干细胞的干性。同空白组比较,ADI 处理后的乳腺癌干细胞微球体中 p-ERK 和 p-Akt 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 4,表 1。

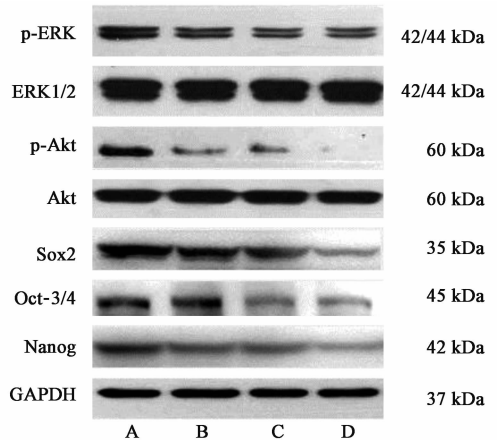


图 4 ADI 对人乳腺癌干细胞中干性标志物和相关信号通路关键蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of ADI on expressions of BCSC markers, p-ERK and p-Akt in breast cancer stem cells

4 讨论

近年来研究证明,肿瘤干细胞具有无限自我更新能力、多向分化能力、高转移潜能、高致瘤性和对放疗不敏感等特性,是乳腺癌进展、转移、复发和肿瘤耐药的根源^[3],有效抑制乳腺癌干细胞干性特性是预防和治疗乳腺癌转移和复发关键。同时发现以分化肿瘤细胞和肿瘤干细胞为靶点的治疗药物,具有广泛的临床应用价值^[11]。清热解毒类中药筋骨草对肝癌、肺癌、皮肤癌和乳腺癌均有抗肿瘤作用^[6-10]。以往研究证明其能抑制肺癌 A549 和肝癌 SMMC-7221 细胞增殖^[6];对小鼠 S180 移植瘤有明显的抑制作用^[7];筋骨草来源的环烯醚萜类化合物 8-乙酰哈巴昔对致癌剂诱导的皮肤癌和肝癌有明显的抑制作用^[8-9]。本课题组前期研究发现筋骨草提取物通过调节基质金属蛋白酶和组织金属蛋白酶抑制剂平衡 (MMPs-TIMPs),从而抑制乳腺癌转移^[10]。

根据肿瘤干细胞具有自我更新和克隆球形成的能力,Ponti 等^[12]在添加生长因子的 DMEM/F12 培养液中悬浮培养乳腺癌细胞株 MCF-7,成功获得了富集乳腺癌干细胞的微球体,并研究发现无血清培养微球形成率与乳腺癌干细胞之间具有直接相关,目前该方法已被广泛地应用于乳腺癌干细胞的

表 1 ADI 对乳腺癌 MCF-7 干细胞微球中 p-ERK, p-Akt 和干细胞标志物蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of ADI on expression of p-ERK, p-Akt and BCSC markers in MCF-7 mammospheres ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	p-ERK/ERK	p-Akt/Akt	Sox-2/GAPDH	Oct-3/4/GAPDH	Nanog/GAPDH
空白	-	0.646 ± 0.002	0.851 ± 0.003	1.802 ± 0.003	1.204 ± 0.006	1.576 ± 0.001
ADI	10	0.485 ± 0.055	0.330 ± 0.035 ²⁾	1.497 ± 0.188	1.392 ± 0.091	1.114 ± 0.061 ¹⁾
	20	0.256 ± 0.010 ²⁾	0.187 ± 0.052 ²⁾	1.404 ± 0.076 ¹⁾	0.901 ± 0.189	1.029 ± 0.060 ²⁾
	40	0.260 ± 0.001 ²⁾	0.029 ± 0.001 ²⁾	0.422 ± 0.002 ²⁾	0.481 ± 0.002 ²⁾	0.519 ± 0.200 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

富集,但是此方法不能长期维持乳腺癌干细胞的体外扩增,仅能传至第 5 代^[13]。因此,考虑以上因素,本实验采用无血清微球体培养法富集乳腺癌干细胞,选择第 1,3 代微球体分别研究 ADI 对乳腺癌干细胞自我更新能力和转移潜能的影响。乳腺癌干细胞表面标志物流式细胞分析结果也证明,第 1,3 代乳腺癌 MCF-7 细胞微球体中 CD44⁺ CD24^{-/low} 细胞比例分别达到 50.5% 和 76.3%,提示本实验中通过无血清悬浮培养获得的乳腺癌细胞微球体可用于后续干细胞的研究。微球形成实验结果显示,低细胞毒质量浓度的 ADI (5 ~ 80 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 能明显降低 MCF-7 细胞干细胞样微球体数量和体积;流式细胞分析显示,ADI 能明显降低 CD44⁺ CD24^{-/low} 细胞亚群所占比例;transwell 迁移和侵袭实验结果显示,ADI 呈浓度依赖性抑制乳腺癌干细胞的运动和侵袭能力。综合以上结果,在本实验体系中,ADI 在较低质量浓度 (10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 下即显示出明显的药效作用,以上结果均提示 ADI 对乳腺癌干细胞的特性有较强干预作用。

MAPK 通路和 PI3K/Akt 通路参与肿瘤细胞的增殖、凋亡、运动、黏附、细胞外基质降解和血管形成等过程,在肿瘤的发生、侵袭和转移中起重要作用^[14-15]。近年来研究证明这两条途径与肿瘤干细胞的自我更新和干性维持密切相关,通过影响 MAPK 通路下游的 ERK^[16] 及 PI3K 通路下游的 Akt 和 mTOR^[17],调控细胞干性标志物(包括转录因子 Sox2, Oct3/4 和 Nanog 等)^[18],从而发挥维持乳腺癌干细胞自我更新能力、高致瘤性、抵抗性和转移潜能等“干性”特性,此信号通路及其关键蛋白可作为针对肿瘤干细胞的抗肿瘤治疗的靶点。因此,本实验通过 ADI 对 MAPK/ERK 和 PI3K/Akt 信号通路及其下游相关干性标志物的影响进行分析,从而探讨药物干预乳腺癌干细胞特性的作用及其机制。结果发现,ADI 对乳腺癌干细胞微球中 p-ERK1/2, p-Akt, Sox-2, Oct-3/4 和 Nanog 的表达均有不同程度

的抑制作用,并且此作用呈现浓度依赖性关系。提示 ADI 能明显抑制乳腺癌干细胞 ERK1/2 MAPK 通路和 PI3K/Akt 通路的过度激活,进而下调干性转录因子表达。

综上,ADI 能明显的抑制乳腺癌干细胞的自我更新和转移潜能等“干性”特性,体外实验显示有效质量浓度为 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$;其作用机制与抑制 ERK1/2 MAPK 和 PI3K/Akt 信号通路的激活,下调干性转录因子的表达有关。本研究提示 ADI 在抑制肿瘤干细胞特性中的有效性,为将其进一步开发为以分化的肿瘤细胞和肿瘤干细胞为靶点的乳腺癌治疗药物提供一定的实验依据。

[参考文献]

[1] Torre L A, Bray F, Siegel R L, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65 (2): 87-108.

[2] Eroles P, Bosch A, Pérez-Fidalgo J A, et al. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways [J]. Cancer Treat Rev, 2012, 38 (6): 698-707.

[3] CHEN K, HUANG Y H, CHEN J L. Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges [J]. Acta Pharmacol Sin, 2013, 34 (6): 732-740.

[4] 谢宗万. 全国中草药汇编 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 882.

[5] 郁仁存. 中医肿瘤学 [M]. 北京: 科学出版社, 1983: 274-283.

[6] 李东, 姜森. 中药白毛夏枯草水提液体外抗肿瘤研究 [J]. 吉林中医药, 2009, 29 (5): 434-435.

[7] 曾茂贵, 贾钊, 吴符火. 筋骨草对小鼠 S180 肉瘤的抑瘤试验 [J]. 福建中医学院学报, 2003, 13 (2): 30-31.

[8] Takasaki M, Tokuda H, Nishino H, et al. Cancer chemopreventive agents (antitumor-promoters) from *Ajuga decumbens* [J]. J Nat Prod, 1999, 62 (7): 972-975

[9] Konoshima T, Takasaki M, Tokuda H, et al. Cancer chemopreventive activity of an iridoid glycoside, 8-acetylharpagide, from *Ajuga decumbens* [J]. Cancer

- Lett, 2000, 157(1):87-92.
- [10] 彭博, 贺蓉, 徐启华, 等. 筋骨草提取物抑制乳腺癌转移与 MMPs 和 TIMPs 表达的关系研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(24):3511-3514
- [11] Yoshida G J, Saya H. Therapeutic strategies targeting cancer stem cells[J]. Cancer Sci, 2016, 107(1):5-11.
- [12] Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, et al. Isolation and *in vitro* propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties[J]. Cancer Res, 2005, 65(13):5506-5511.
- [13] Dey D, Saxena M, Paranjape A N, et al. Phenotypic and functional characterization of human mammary stem/progenitor cells in long term culture [J]. PLoS One, 2009, 4(4):e5329.
- [14] XIA P. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in cancer stem cells: from basic research to clinical application [J]. Am J Cancer Res, 2015, 5(5):1602-1609.
- [15] Dhillon A S, Hagan S, Rath O, et al. MAP kinase signalling pathways in cancer[J]. Oncogene, 2007, 26(22):3279-3290.
- [16] Sunayama J, Matsuda K, Sato A, et al. Crosstalk between the PI3K/mTOR and MEK/ERK pathways involved in the maintenance of self-renewal and tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells [J]. Stem Cells, 2010, 28(11):1930-1939.
- [17] Corominas-Faja B, Cufi S, Oliveras-Ferreros C, et al. Nuclear reprogramming of luminal-like breast cancer cells generates Sox2-overexpressing cancer stem-like cellular states harboring transcriptional activation of the mTOR pathway [J]. Cell Cycle, 2013, 12(18):3109-3124.
- [18] Spillane J B, Henderson M A. Cancer stem cells: a review [J]. Anz J Surg, 2007, 77(6):464-468.
- [责任编辑 张丰丰]

《中国实验方剂学杂志》2014—2016 年度优秀审稿专家名单

田元祥教授(中国中医科学院中医临床基础医学研究所)
刘春生教授(北京中医药大学)
沈祥春教授(贵阳医学院药学院)
王长虹教授(上海中医药大学)
倪艳教授(山西省中医药研究院)
倪健教授(北京中医药大学)
赵艳玲研究员(解放军 302 医院)
李孝栋教授(福建中医药大学)
康文艺教授(河南大学)
张艳教授(辽宁中医药大学)
任钧国研究员(中国中医科学院西苑医院)
蔡宇教授(暨南大学药学院)
王冰副教授(上海中医药大学)
袁子民副教授(辽宁中医药大学)
张华副教授(山东中医药大学)

获奖的优秀审稿专家是在 2014—2016 年度一贯积极支持编辑部工作,能认真负责、按时完成审稿任务,且审稿数量较多的专家,由责任编辑推荐,编委会年会通过并颁发了获奖证书及奖金。