

本文引用:熊雨,刘洁,邹攀,苏芮,钟文良,江志超,王贤文,何迎春. 益气解毒方中苯丙素类化合物对鼻咽癌细胞增殖效应的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(5): 701-706.

益气解毒方中苯丙素类化合物对鼻咽癌 细胞增殖效应的影响

熊雨¹,刘洁¹,邹攀¹,苏芮¹,钟文良¹,江志超²,王贤文^{3,4,5},何迎春^{1,4,5*}

(1.湖南中医药大学,湖南长沙410208;2.湖南省脑科医院,湖南长沙410005;3.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙410007;4.湖南省中医药防治眼耳鼻咽喉疾病与视功能保护工程技术研究中心,湖南长沙410208;5.中医药防治眼耳鼻咽喉疾病湖南省重点实验室,湖南长沙410208)

[摘要] **目的** 探讨益气解毒方中苯丙素类化合物异欧前胡素、阿魏酸、绿原酸对人鼻咽癌 CNE2 细胞增殖效应的抑制作用及机制研究。**方法** 使用实时无标记细胞功能分析技术(RTCA)动态监测不同浓度的 3 种苯丙素类化合物对离体人鼻咽癌 CNE2 细胞生长曲线的影响;Cytation™ 5 高通量活细胞成像分析检测系统分别监测 3 种不同浓度苯丙素类化合物对人鼻咽癌 CNE2 细胞形态改变;Western blot 法检测 3 种苯丙素类化合物对人鼻咽癌 CNE2 细胞增殖相关蛋白增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、X 连锁的凋亡蛋白抑制剂(X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP)、Survivin 表达的影响。**结果** RTCA 实时监测结果显示异欧前胡素、阿魏酸、绿原酸均能不同程度地抑制 CNE2 细胞增殖,存在药物浓度越高抑制效应越明显的趋势。Cytation™ 5 检测结果显示,与对照组相比,3 种苯丙素类化合物作用 36 h 后,大量 CNE2 细胞出现细胞漂浮死亡,细胞膜破溃、细胞结构模糊等形态变化。Western blot 检测结果显示,与对照组相比,异欧前胡素、阿魏酸、绿原酸能明显抑制 CNE2 细胞中增殖相关蛋白 PCNA、XIAP、Survivin 的表达($P<0.05$)。**结论** 益气解毒方中主要苯丙素类化合物异欧前胡素、阿魏酸、绿原酸均可以不同程度抑制人鼻咽癌 CNE2 细胞增殖,其机制可能与下调增殖相关蛋白 PCNA、XIAP、Survivin 的表达有关。

[关键词] 鼻咽癌;益气解毒方;苯丙素类化合物;细胞增殖;异欧前胡素;阿魏酸;绿原酸

[中图分类号]R285.5

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2021.05.009

Effects of the Phenylpropanoids in Yiqi Jiedu Formula on the Proliferation of Nasopharyngeal Carcinoma Cells

XIONG Yu¹, LIU Jie¹, ZOU Pan¹, SU Rui¹, ZHONG Wenliang¹, JIANG Zhichao², WANG Xianwen^{3,4,5}, HE Yingchun^{1,4,5*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Brain Hospital of Hunan Province, Changsha, Hunan 410005, China; 3. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 4. Hunan Provincial Engineering and Technological Research Center for Prevention and Treatment of Ophthalmology and Otolaryngology Diseases with Chinese Medicine and Protecting Visual Function, Changsha, Hunan 410208, China; 5. Hunan Provincial Key Laboratory for the Prevention and Treatment of Ophthalmology and Otolaryngology Diseases with Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the inhibitory effect and mechanism of the phenylpropanoid compounds isoimperatorin, ferulic acid and chlorogenic acid in Yiqi Jiedu Formula on the proliferation of human nasopharyngeal carcinoma CNE2 cells.

[收稿日期]2021-01-21

[基金项目]国家自然科学基金项目(81973914,81874408);湖南省自然科学基金项目(2019JJ40216,2018JJ2219)。

[作者简介]熊雨,女,在读硕士研究生,研究方向:肿瘤防治。

[通讯作者]*何迎春,女,教授,博士研究生导师;E-mail:yingchunhe@aliyun.com。

Methods Real-time unlabeled cell function analysis technique (RTCA) was used to dynamically monitor the effects of three phenylpropanoids at different concentrations on the proliferation of human nasopharyngeal carcinoma CNE2 cells. Cytation™ 5 high-throughput live cell imaging analysis system was used to monitor the effects of three phenylpropanoids at different concentrations on the morphological changes of human nasopharyngeal carcinoma CNE2 cells. Western blot method was used to detect the effects of three phenylpropanoids on human nasopharyngeal carcinoma CNE2 cells proliferating cell nuclear antigen (PCNA), X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP), and Survivin expression. **Results** RTCA results showed that isoperatorin, ferulic acid, and chlorogenic acid can inhibit the proliferation of CNE2 cells to varying degrees, and there was a trend that the higher the drug concentration, the more obvious the inhibitory effect. The Cytation™ 5 results showed that compared with the control group, a large number of CNE2 cells had cell floating death, cell membrane rupture, cell structure fuzzy and other morphological changes after the three phenylpropanoids were treated for 36 hours. Western blot detection results showed that compared with the control group, isoperatorin, ferulic acid, and chlorogenic acid can significantly inhibit the expression of proliferation-related proteins PCNA, XIAP, and Survivin in CNE2 cells ($P < 0.05$). **Conclusion** The main phenylpropanoid compounds, isoimperatorin, ferulic acid and chlorogenic acid in Yiqi Jiedu Formula, which can inhibit the proliferation of human nasopharyngeal carcinoma CNE2 cells to varying degrees. The mechanism may be related to the down-regulation of proliferation-related proteins PCNA, XIAP, and Survivin expression level.

[**Keywords**] nasopharyngeal carcinoma; Yiqi Jiedu Formula; phenylpropanoid compounds; cell proliferation; isoimperatorin; ferulic acid; chlorogenic acid

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)为发生在鼻咽上皮内壁的头颈部高发恶性肿瘤,发病率具有明显的地域倾向和种族差异,在中国南方、北非和东南亚发病率较高^[1]。我国传统中医药在治疗 NPC 患者方面有独特优势,和单纯放疗相比,中西医结合疗法能有效改善 NPC 患者口腔黏膜不良反应、胃肠道不良反应及唾液腺损伤情况等,并能有效提高患者生活质量^[2]。益气解毒方是本课题组研究和应用了二十几年的经验方,为田道法教授等针对 NPC 的“气虚染毒”的中医病机,根据“益气解毒,生津润燥”立法研制,课题组前期研究^[3-4]已验证益气解毒方可以有效抑制 NPC 细胞增殖。益气解毒方中苯丙素类化合物来自党参异欧前胡素(isoimperatorin)及君药黄连中阿魏酸(ferulic acid)、绿原酸(chlorogenic acid),已有研究发现这几类中药单体具有镇痛抗炎、抗肿瘤等多种生物学活性,对多种肿瘤细胞株具有抑增殖促凋亡效应^[5-8]。

为了进一步佐证益气解毒方中苯丙素类化合物异欧前胡素、阿魏酸、绿原酸对人离体 NPC 细胞株增殖效应的影响及机制,本研究通过实时无标记细胞功能分析技术(real-time unlabeled cell function analysis technique, RTCA)、Cytation™ 5 细胞成像实时监测、Western blot 等分别从整体效应、形态变化及蛋白质表达水平探讨这些中药单体对 NPC CNE2 细胞增殖效应作用,进一步阐明益气解毒方的药效发挥机制。

1 材料

1.1 细胞株

人 NPC 细胞株 CNE2(BNCC341794),购于北京北纳创联生物技术研究院,由本实验室传代培养。

1.2 药物与试剂

异欧前胡素(质量分数 $\geq 98\%$, 20180522)、阿魏酸(质量分数 $\geq 98\%$, 20160519)、绿原酸(质量分数 $\geq 98\%$, 20180311)均购自上海金穗生物科技有限公司;抗体 β -actin (3700S)、XIAP (14334P)、Survivin (2808S)均购自美国 CST 公司;PCNA 抗体(bs-0754R, 北京博奥森生物技术有限公司);IRDye 680RD 羊抗鼠二抗(C70417-02)、IRDye 800CW 羊抗兔二抗(C70420-01)均购自美国 LI-COR 公司;RPMI-1640 培养基(AE29163437)、PBS 缓冲液(SH30256.01B)均购自美国 HyClone 公司;青霉素-链霉素溶液(WH01112004XP)、含 0.25% EDTA 胰蛋白酶溶液(WH01122008XP)均购自武汉普诺赛生命科技有限公司;胎牛血清(42A0378K)购自美国 Gibco 公司。

1.3 实验仪器

双人单面洁净工作台(SJ-CJ-2FD,苏州苏洁净化设备有限公司);二氧化碳细胞培养箱(CCL-170B-8,新加坡 ESCO 公司);医用离心机(L535R,湖南湘仪实验室仪器开发公司);倒置相差生物显微镜(AE31,麦克奥迪实业集团有限公司);实时无

标记细胞分析仪(RTCA DP,美国 ACEA 公司);多功能微孔板检测系统(Cytation™ 5,美国 BioTek 公司);红外荧光扫描成像系统(ODYSSEY CLx,美国 LICOR 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

使用含有 10% 的胎牛血清、100 kU/L 青霉素、0.1 g/L 链霉素的 RPMI-1640 培养基培养 CNE2 细胞,置于 37 ℃、5% CO₂ 及湿度饱和的培养箱中培养,适时换液,每 2~3 d 传代 1 次。

2.2 实时无标记细胞功能分析仪(RTCA)监测细胞增殖

取 3 块 RTCA 检测专用 E-plate 板,每孔各加入 50 μL 培养基,置于仪器中测量基线、平衡仪器。取对数生长期的 CNE2 细胞,37 ℃胰酶消化 2 min,制成单细胞悬液,将细胞混匀后接种于 E-plate 板中,每孔 100 μL 细胞悬液,控制细胞密度为 5 000 个/孔,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养,每组设 5 个复孔。实验分组:每个药物分别设对照组和 1.25、2.5、5、10、20、40 μmol/L 共 7 组。接种后培养约 12 h,细胞贴壁生长,弃去原培养液,每孔加入 200 μL 含药培养液,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养,RTCA 持续监测 72 h 以上^[7-8]。RTCA 监测系统可通过自动计算细胞指数(cell index, CI)反映细胞增殖情况,CI=(Rn-Rb)/15,其中,Rn 表示孔接种细胞后的电极阻抗值,Rb 为背景阻抗基线值,进而绘制出细胞生长曲线。根据加药后 24、36、48、60、72 h 的均一化细胞指数,计算药物相对增殖率,增殖率=(实验组均一化细胞指数/对照组均一化细胞指数)×100%。

2.3 Cytation™ 5 多功能细胞成像微孔板检测系统监测细胞形态

取对数生长期的 CNE2 细胞,37 ℃胰酶消化 2 min,制成单细胞悬液,每孔 100 μL 细胞悬液接种于 96 孔培养板中,控制细胞密度为 5 000 个/孔,细胞贴壁生长,弃去原培养液,每孔加入 200 μL 含药培养基或含溶剂培养基,实验分组:对照组、异欧前胡素组、阿魏酸组、绿原酸组,药物组浓度均为 20 μmol/L。将 96 孔板放置于 Cytation™ 5 检测系统中 37 ℃、5% CO₂ 继续培养 48 h,设定每 6 h 进行一次全板自动图像捕获及分析细胞形态图像,监测细

胞生长形态。

2.4 Western blot 检测蛋白表达

取对数生长期的 CNE2 细胞,传代至细胞培养皿中,细胞贴壁生长后弃去原培养液,加入含药培养基或含溶剂培养基,实验分组同“2.3”,置于 37 ℃、5% CO₂ 继续培养 36 h 后提取总蛋白并进行 BCA 定量,取 50 μg 蛋白配置上样体系。根据检测蛋白分子量配置合适浓度的分离胶和浓缩胶,上样,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜,封闭。按照一定稀释比例稀释 β-actin、PCNA、XIAP 和 Survivin,4 ℃过夜孵育,TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,再加入相对应的鼠二抗或兔二抗,室温孵育 2 h,TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,于 ODYSSEY CLx 红外荧光扫描成像系统上扫描显影,检测不同处理组间目的条带的信号值,计算相对表达量。

2.5 统计学分析

所有实验数据均采用 SPSS 23.0 统计软件进行统计学分析,使用 GraphPad Prism 8 软件进行统计图的绘制,实验数据均采用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。两组间数据比较使用独立样本 *T* 检验方法。各组间计量资料数据比较使用单因素方差分析方法分析,方差齐使用 *LSD* 检验进行多重比较,方差不齐使用 *Dunnnett' T3* 多重检验。

3 结果

3.1 益气解毒方中苯丙素类化合物对 CNE2 细胞增殖的影响

异欧前胡素、阿魏酸及绿原酸均能不同程度地抑制 CNE2 细胞增殖,呈现出药物浓度越高抑制效应越明显的趋势,同一药物作用时间点,3 种中药单体的半数抑制浓度(median inhibition concentration, IC₅₀)不同。药物作用 36 h 后异欧前胡素、阿魏酸及绿原酸的 IC₅₀ 分别为 33.05、87.07、33.88 μmol/L。且这 3 种苯丙素类化合物抑制率出现明显拐点均出现在加药后 36 h 左右。见表 1 和图 1-3。

表 1 不同化合物不同时间点的 IC₅₀ 值(μmol/L)

时间	异欧前胡素	阿魏酸	绿原酸
24 h	47.44	126.00	179.54
36 h	33.05	87.07	33.88
48 h	27.73	75.28	18.72
60 h	26.59	56.75	14.74
72 h	25.52	42.30	13.21

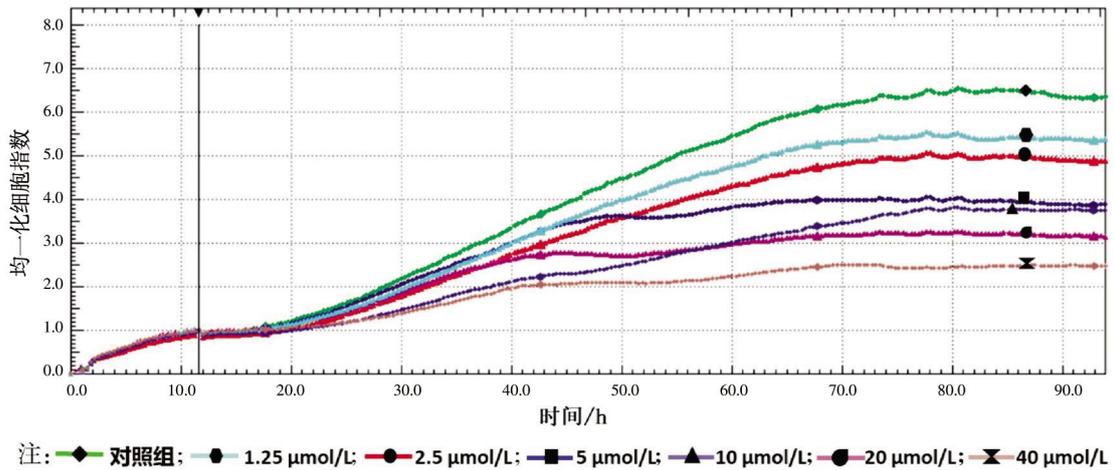


图 1 不同浓度异欧前胡素处理后 CNE2 细胞增殖曲线

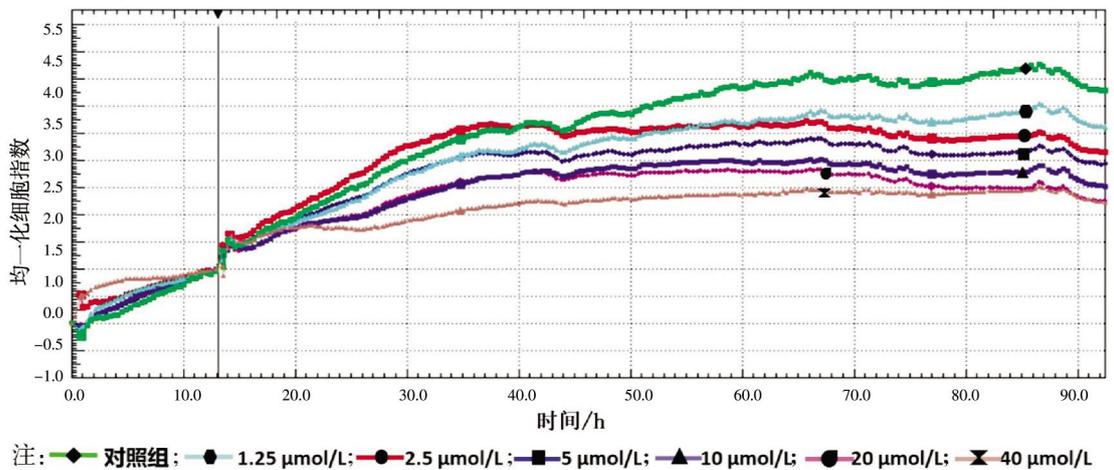


图 2 不同浓度阿魏酸处理下 CNE2 细胞增殖曲线

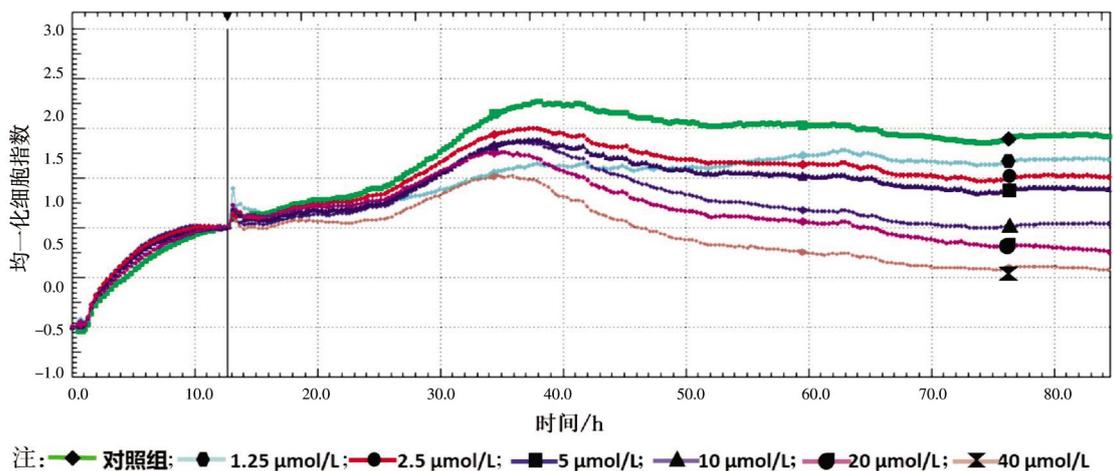


图 3 不同浓度绿原酸处理下 CNE2 细胞增殖曲线

3.2 益气解毒方中苯丙素类化合物对 CNE2 细胞形态的影响

与对照组饱满均匀,细胞结构完整的 CNE2 细胞形态相比,异欧前胡素、阿魏酸及绿原酸处理后的大量细胞出现细胞膜破溃,细胞结构模糊等形态变化。与对照组相比异欧前胡素、阿魏酸处理的 CNE2 细胞抑制增殖的效应更显著,加药处理 36 h 后细胞

增殖速度减慢并伴有大量细胞脱壁漂浮,细胞核固缩碎裂变形,胞内容物外翻等形态变化,绿原酸则是加药处理 48 h 后出现明显形态变化。见图 4。

3.3 益气解毒方中苯丙素类化合物对 CNE2 细胞增殖相关蛋白的影响

与对照组相比,加药组的细胞增殖相关蛋白 PCNA 及细胞生存蛋白 Survivin、凋亡抑制蛋白 XIAP

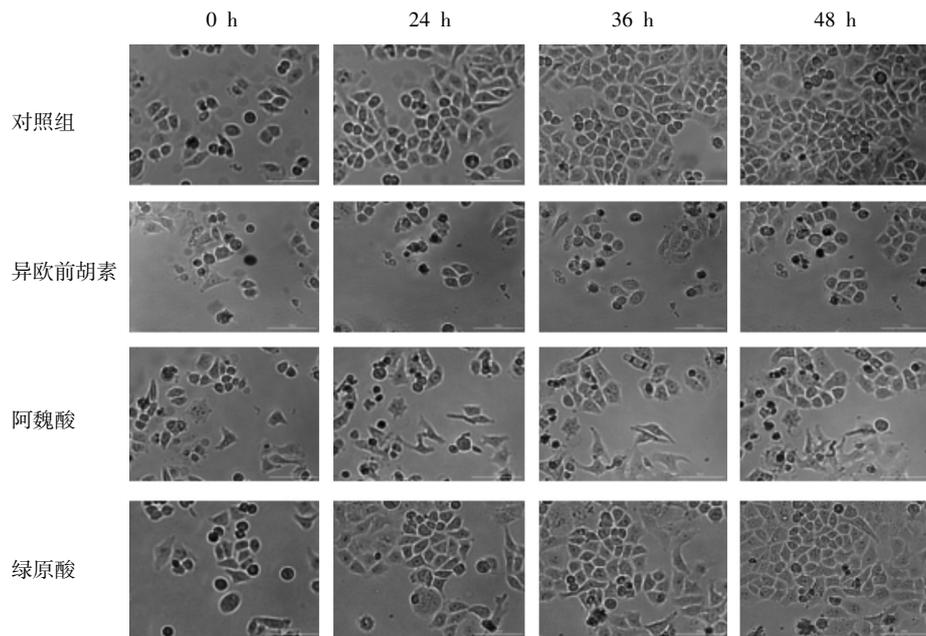
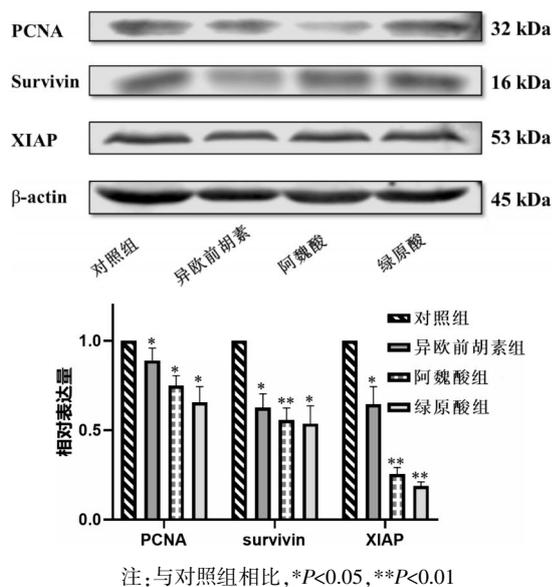


图4 益气解毒方主要苯丙素类化合物对 CNE2 细胞形态的影响(比例尺=100 μm , $\times 200$)

表达量均不同程度的降低,且差异具有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见图5。



注:与对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

图5 益气解毒方主要苯丙素类化合物对 NPC CNE2 细胞增殖相关蛋白的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

4 讨论

NPC 的发生发展是一个多步骤、多因素的过程,发病机制复杂,包括 EB 病毒(epstein-barr virus, EBV)感染^[9]、人乳头瘤病毒感染^[10-11]、遗传易感性^[12]等。NPC 患者的早诊断早治疗,提高晚期 NPC 患者的生存率及改善其生活质量仍是 NPC 研究学者们关注的主要问题。已有大量前期研究^[13-17]围绕益气解毒方对 NPC 细胞增殖、凋亡、自噬、迁移的作用和机制,益气解毒方由黄芪、党参、黄连、天花粉、白花蛇舌草、茯苓、甘草组成,体外能通过下调端粒酶

的活性抑制细胞生长和诱导细胞凋亡,还可能通过抑制细胞内重要的核转录因子、细胞分裂增殖、细胞周期、DNA 修复和诱导细胞凋亡、促进坏死等信号通路,从而抑制细胞增殖和诱导细胞死亡,体内可抑制裸鼠 NPC 移植瘤的形成等^[18-19]。

益气解毒方中主要含有三萜类化合物和苯丙素类化合物,如槲皮黄素、山柰酚、芒柄花黄素、黄连素、茯苓酸、黄芪甲苷、异欧前胡素、绿原酸、熊果酸、齐墩果酸、汉黄芩素、小檗碱、阿魏酸等成分^[20]。课题组前期研究^[21]发现益气解毒方中三萜类化合物齐墩果酸、熊果酸、黄芪甲苷及茯苓酸对 NPC CNE2 细胞增殖效应的作用,证实其可以抑制 CNE2 细胞增殖。本研究主要比较益气解毒方苯丙素类化合物。异欧前胡素对多种肿瘤细胞株具有抑增殖促凋亡效应^[3-4]。阿魏酸可通过抑制肿瘤细胞能量代谢、发挥直接细胞毒作用、诱导细胞凋亡等起到抗癌作用^[22]。同样有大量研究发现绿原酸可在多种肿瘤中发挥抑制作用^[5,23-24]。为了进一步探讨益气解毒方中苯丙素类化合物是否抑制了 NPC CNE2 细胞的增殖,三者之间效应有何不同,本研究通过监测细胞增殖曲线、形态改变及增殖相关蛋白质水平表达差异等方式进行研究。

RTCA 通过监测 E-plate 板孔内电阻抗变化,分析得出的 CI 可以揭示细胞增殖、死亡、迁移等行为,有利于精确指导和改进实验设计。Cytation™ 5 多功能细胞成像微孔板检测系统可实时监测细胞形态并拍照记录,对活细胞进行动态监测与多维分析。PCNA 是一个重要的细胞增殖相关蛋白,其可以在复制叉处协调大部分代谢反应,包括 DNA 复制和 DNA 修复等,还可以通过表皮生长因子受体(EGFR)

在酪氨酸 211(Y211)上的磷酸化修饰,PCNA 过度表达及活化与多种癌症发生发展有关^[25]。凋亡抑制因子 XIAP 和细胞生存蛋白 Survivin 均可介导细胞增殖。本实验通过 RTCA 监测发现异欧前胡素、阿魏酸、绿原酸均能不同程度地抑制 CNE2 细胞增殖,并且呈现出药物浓度越高抑制效应越明显的趋势,不同药物单体发挥最佳药效的时间不同,3 种苯丙素类化合物抑制率出现明显拐点均出现在加药后 36 h 左右。药物作用 36 h 后异欧前胡素、阿魏酸、绿原酸的 IC₅₀ 分别为 33.05、87.07、33.88 μmol/L。Cytation™ 5 实时监测结果显示,对照组 CNE2 细胞形态饱满均匀,细胞结构完整,异欧前胡素、阿魏酸及绿原酸处理后的大量细胞出现细胞膜破溃,细胞结构模糊,细胞脱壁漂浮等形态异常变化。与对照组相比,加药组的 PCNA、XIAP 及 Survivin 蛋白表达均下调,且差异具有统计学意义($P<0.05$)。

综上,本研究表明,益气解毒方中苯丙素类化合物异欧前胡素、阿魏酸及绿原酸可以抑制 NPC CNE2 细胞增殖。异欧前胡素抑制增殖效应出现较慢,但出现形态异常时间较早,且抑制增殖效应较明显;绿原酸虽出现抑制增殖效应较早,抑制增殖效应较弱一些;阿魏酸抑制增殖效应及出现形态异常较早,但抑制增殖效应为三者中最弱。3 种苯丙素类化合物均可损伤 NPC CNE2 细胞,使其细胞形态发生改变。异欧前胡素、阿魏酸及绿原酸抑制 NPC CNE2 细胞增殖作用可能通过下调 PCNA、XIAP 及 Survivin 表达来完成。本研究对益气解毒方中苯丙素类化合物异欧前胡素、阿魏酸及绿原酸抑制 NPC CNE2 细胞增殖效应情况进行比较,并且对其机制进行初步研究,揭示益气解毒方的药效物质基础,明确益气解毒方单体有效作用成分,丰富益气解毒方应用于临床的科学理论依据,更好的指导临床用药。今后的实验将探索益气解毒方内主要苯丙素类化合物异欧前胡素、阿魏酸及绿原酸抑制 NPC CNE2 细胞增殖的更多分子机制。

参考文献

[1] CHUA M, WEE J, HUI E P, CHAN A. Nasopharyngeal carcinoma[J]. *Lancet*, 2016, 387(10022): 1012-1024.
 [2] 柳吉玲,劳国平,王杰. 中医药治疗鼻咽癌放疗后不良反应临床研究[J]. *中医药临床杂志*, 2018,30(1):124-126.
 [3] 胡晶,戴娜,徐冰雁,等. 益气解毒方通过 MAPK/ERK 信号通路抑制鼻咽癌细胞增殖[J]. *中国中药杂志*, 2018,43(6):1221-1227.
 [4] 胡晶,刘洁,徐冰雁,等. 益气解毒方对鼻咽癌 CNE2 细胞增殖的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2019,39(8):943-947.
 [5] 王萌. 明党参根皮中异欧前胡素的体内抗肿瘤活性研究[J]. *价值工程*, 2016,35(36):213-215.
 [6] 王廷祥,娄国强,施军平. 异欧前胡素对人胃癌 BGC-823 细胞的凋亡诱导作用的研究[J]. *国际消化病杂志*, 2016,36(4):245-248.

[7] 那裘雪,张文涛,谈远锋,等. 绿原酸及其异构体药理作用及不良反应研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2018,20(3):140-144.
 [8] 吴竞,王廷祥,魏楠,等. 阿魏酸抑制 A549 肺癌移植瘤生长及其机制研究[J]. *浙江医学*, 2018,40(12):1303-1306,1311,1414.
 [9] PATHMANATHAN R, PRASAD U, SADLER R, et al. Clonal proliferations of cells infected with Epstein-Barr virus in preinvasive lesions related to nasopharyngeal carcinoma[J]. *The New England Journal of Medicine*, 1995, 333(11): 693-698.
 [10] MAXWELL J H, KUMAR B, FENG F Y, et al. HPV-positive/p16-positive/EBV-negative nasopharyngeal carcinoma in white North Americans[J]. *Head & Neck*, 2010, 32(5): 562-567.
 [11] CHAN Y H, LO C M, LAU H Y, et al. Vertically transmitted nasopharyngeal infection of the human papillomavirus: Does it play an aetiological role in nasopharyngeal cancer?[J]. *Oral Oncology*, 2014, 50(5): 326-329.
 [12] HILDESHEIM A, WANG C P. Genetic predisposition factors and nasopharyngeal carcinoma risk: A review of epidemiological association studies, 2000-2011: Rosetta Stone for NPC: Genetics, viral infection, and other environmental factors[J]. *Seminars in Cancer Biology*, 2012, 22(2): 107-116.
 [13] 廖雪,蔺婷,罗晶婧,等. 益气解毒方水提物对 RAW264.7 细胞免疫功能的影响[J]. *肿瘤基础与临床*, 2015,28(6):473-476.
 [14] ZHOU F L, HE L, HE D, et al. Yi Qi Jie Du Decoction Inhibits proliferation and induces apoptosis of nasopharyngeal carcinoma stem cells through mitochondrial apoptosis pathway [J]. *Digital Chinese Medicine*, 2019, 2(4): 219-226.
 [15] 何丹. 益气解毒方诱导鼻咽癌 CNE2 侧群细胞凋亡的研究[D]. 长沙:湖南中医药大学, 2015.
 [16] 蔺婷. 自噬在益气解毒方诱导鼻咽癌细胞凋亡中的作用研究[D]. 长沙:湖南中医药大学, 2017.
 [17] 罗晶婧. 益气解毒方水提物联合盐霉素抑制鼻咽癌细胞增殖、迁移和诱导凋亡的效应[D]. 长沙:湖南中医药大学, 2016.
 [18] 王化修,田道法,吴新正. 益气解毒方对 TgN(p53mt-LMP1)/HT 小鼠鼻咽癌前病变的逆转作用及其机制探讨[J]. *山东医药*, 2014, 54(48):9-12.
 [19] 范婧莹,刘洁,刘晓丹,等. 益气解毒方通过 Wnt/β-catenin 信号通路对鼻咽癌 CNE2 细胞增殖的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2020,40(5):535-539.
 [20] 邹攀,刘洁,许红森,等. 基于网络药理学探讨黄连和黄芪治疗鼻咽癌的作用机制[J]. *中国新药与临床杂志*, 2021,40(4):276-281.
 [21] 刘洁,胡晶,戴娜,等. 益气解毒方主要三萜类化合物抑制鼻咽癌 CNE2 细胞增殖效应的比较[J]. *湖南中医药大学学报*, 2019,39(11):1315-1320.
 [22] 殷华芳,钱晓萍,刘宝瑞. 阿魏酸抗肿瘤作用机制研究进展[J]. *现代中西医结合杂志*, 2010,19(32):4238-4240.
 [23] 田伟,豆亚伟,王宏涛,等. 绿原酸诱导肺癌细胞凋亡及其机制研究[J]. *解放军预防医学杂志*, 2016,34(6):854-857.
 [24] 白建伟,王峰,潘鸿,等. 绿原酸对胃癌 SGC-7901 细胞增殖及诱导因子 AIF 表达的影响[J]. *遵义医学院学报*, 2018,41(2):150-155.
 [25] PENG B, ORTEGA J, GU L Y, et al. Phosphorylation of proliferating cell nuclear antigen promotes cancer progression by activating the ATM/Akt/GSK3β/Snail signaling pathway[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294(17): 7037-7045.