

扶正抑瘤汤对胶质瘤裸鼠肿瘤生长抑制的影响

吴建军^{1,2,3}, 许瑞^{1,2}, 张艳霞^{1,3}, 臧凯宏^{1,3}, 岳嘉^{1,3}, 刘凯^{1,3}, 刘永琦^{1,2}, 李应东^{1,3}, 郑贵森^{1,3*}

(1. 甘肃中医药大学, 甘肃兰州 730000; 2. 敦煌医学与转化省部共建教育部重点实验室, 甘肃兰州 730000; 3. 甘肃省中医药防治慢性疾病重点实验室, 甘肃兰州 730000)

摘要: 目的 探讨扶正抑瘤汤联合 INF-γ 基因修饰的 BMSCs 在体内抗肿瘤作用。方法 构建 INF-γ 基因慢病毒表达载体并在体外转染 BMSCs, BALB/C 裸鼠腋下接种胶质瘤细胞造模, 裸鼠随机分为正常组、模型组、BMSCs 组、INF-γ+BMSCs 组、扶正抑瘤汤组、扶正抑瘤汤+ INF-γ+BMSCs 组, 连续灌胃给药 14 d。qRT-PCR 验证 BMSCs 转染 INF-γ mRNA 表达, 激光共聚焦观察 INF-γ 转染的 BMSCs 在裸鼠瘤体中荧光分布, 测量荷瘤裸鼠肿瘤长径和短径, ELISA 检测血清中 INF-γ 水平; 免疫组化检测裸鼠瘤体组织凋亡蛋白 Bax/Bcl-2 表达。结果 激光共聚焦显微镜发现 BMSCs 在裸鼠瘤体组织中呈明显集聚分布。给药 14 d 后, 与模型组比较, 扶正抑瘤汤组和扶正抑瘤汤+ INF-γ+BMSCs 组肿瘤体积增值较少 ($P<0.05$), 血清 INF-γ 水平增加 ($P<0.05$), Bax 蛋白表达升高 ($P<0.05$), Bcl-2 蛋白表达降低 ($P<0.05$)。结论 扶正抑瘤汤能够协同 INF-γ 基因转染的 BMSCs 发挥抗肿瘤作用, 其作用可能与血清 INF-γ、Bax/Bcl-2 途径诱导细胞凋亡有关。

关键词: 扶正抑瘤汤; BMSCs; INF-γ; 细胞凋亡

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2020)03-0620-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.03.014

Effects of Fuzheng Yiliu Decoction on glioma growth inhibition of nude mice

WU Jian-jun^{1,2,3}, XU Rui^{1,2}, ZHANG Yan-xia^{1,3}, ZANG Kai-hong^{1,3}, YUE Jia^{1,3}, LIU Kai^{1,3}, LIU Yong-qi^{1,2}, LI Ying-dong^{1,3}, ZHENG Gui-sen^{1,3*}

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. Gansu Province & Ministry of Education co-founded Key Laboratory for Dunhuang Medicine and Transformation, Lanzhou 730000, China; 3. Gansu Provincial Key Laboratory of Chinese Medicine for Prevention and Control of Chronic Diseases, Lanzhou 730000, China)

KEY WORDS: Fuzheng Yiliu Decoction; BMSCs; INF-γ; Cell apoptosis

肿瘤靶向治疗的研究倍受关注, 但在治疗胶质细胞瘤、肺癌等侵袭性和浸润性强的肿瘤时, 由于肿瘤细胞高度迁移和侵袭, 往往很难对肿瘤细胞进行有效的药物靶向治疗。骨髓间充质干细胞 (Bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 是一种多能祖细胞, 存在于骨髓、脂肪组织、胎盘和脐带等组织中^[1]。BMSCs 具有易复制^[1-4]、归巢^[5]、基因易修饰^[6]和免疫调节作用^[7]等生物学特性, BMSCs 的临床治疗在伦理上不受限制, 以上显示 BMSCs 在肿瘤靶向治疗中可充当传递载体

而应用并潜力巨大^[8]。然而, 需要关注的是有些研究表明 BMSCs 在肿瘤微环境下可通过促进肿瘤相关成纤维细胞生长, 刺激血管生成, 抑制免疫细胞等方式刺激肿瘤的生长和转移^[7, 9-10]。那么寻找到既能遏制 BMSCs 成瘤性又能协同发挥其抗肿瘤及靶向载体的作用是目前人们亟待解决的问题。

中医药在提高肿瘤患者放化疗敏感性, 减少肿瘤患者放化疗的不良反应和并发症, 提高其生活质量、生存时间等方面具有显著优势^[11-12]。研究显示中医药对肿瘤微环境下的 BMSCs 进行干预能够

收稿日期: 2019-02-27

基金项目: 甘肃省自然科学基金项目 (1606RJZA062); 甘肃省财政厅科研业务费项目 (BH-2013-23); 甘肃省教育厅项目 (A-079); 甘肃省中医药防治慢性疾病重点实验室开放基金项目 (GSMBKY2015-10, GSMBKY2015-11)

作者简介: 吴建军 (1972—), 男, 博士, 教授, 从事中医药防治慢性病的研究。E-mail: wjj@gszy.edu.cn

* 通信作者: 郑贵森 (1961—), 男, 教授, 从事西部常见肿瘤防治研究。E-mail: zgs@gszy.edu.cn

很好维持其遗传稳定性而不发生改变^[13]，扶正抑瘤复方在前期的抗肿瘤应用方面效果显著^[14-16]。另外前期研究也发现在体外胶质瘤微环境下，扶正抑瘤汤（Fuzheng Yiliu Decoction）能够有效逆转BMSCs成瘤性而发挥其自身的抗瘤作用但自身生物学特性并不改变^[17-18]。所以本研究拟体内观察扶正抑瘤能否协同 INF-γ 基因修饰的 BMSCs 发挥靶向抗肿瘤及其可能存在的机制。

1 材料

1.1 BMSCs 原代及细胞株 U251 人胶质瘤细胞购于上海中科院细胞库。BMSCs 原代培养、分离和鉴定，8周龄 Balb/c 小鼠（购于第三军医大学 SPF 级实验动物中心）颈椎脱臼法处死后在无菌条件下分离大鼠股骨和胫骨，去除骨髓端，用 DMEM 溶液冲洗骨髓直至骨髓腔变白，吸入离心管内，离心、弃上清后加入 DMEM 培养 24 h，弃去培养基并冲洗去除未贴壁细胞继续培养。一般 10 d 细胞生长融合达到 70% 以上用流式细胞仪检测细胞表面分子标记 CD44、CD105、CD34、CD45、CD11b 鉴定^[2-4]。

1.2 药物与试剂 红芪（批号 160627）、当归（批号 160713）、莪术（批号 160525）、墓头回（批号 160503）中药饮片购自甘肃复兴厚中药饮片药业有限公司，由甘肃中医药大学药学院相关教研室鉴定。DMEM 培养基（美国 Gibco 公司，HLM150312）；胎牛血清（美国 Gibco 公司，HLC0101）；TRIzol（上海碧云天生物技术有限公司，R0016）、荧光定量 PCR 试剂、SYBR Green I（重庆威斯腾生物医药科技有限责任公司自制）；免疫组化 Bax/Bcl-2 蛋白一抗、生物素标记的二抗（美国，abcam，ab134047）；IgG-PE（美国 eBioscience 公司，12-4714-71），Rat CD45-PE-Cyanine5.5（美国 eBioscience 公司，35-0459-42）；IgG1-PE-Cyanine5.5（美国 eBioscience 公司，35-0567-41）；其余试剂用国产分析纯。

1.3 仪器 CK-40 倒置显微镜（日本 OLYMPUS 公司）；MCO-15AC-SC 二氧化碳培养箱（日本三洋株式会社）；TCS SP5 激光扫描共聚焦显微镜（德国 Leica 公司）。ECLIPSE Ti 荧光显微镜（日本 Nikon 公司）。T100 型 PCR 仪（美国 Bio-Rad 公司）。酶联免疫检测仪（美国 Bio-Tek 公司）。

2 方法

2.1 BMSCs 的分离、培养和鉴定 Balb/c 小鼠处死后 75% 乙醇浸泡，无菌条件下分离出大鼠股骨

和胫骨，剔除骨头表面肌肉，PBS 溶液冲洗后去除骨髓端，DMEM-F12 溶液冲洗骨髓直至骨髓腔变白，1 000 r/min 离心 5 min，进行系列处理后用含 15% 胎牛血清及青链霉素的 DMEM-F12 以 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 细胞浓度接种于 25 cm^2 培养瓶中，置 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养。24 h 后弃去培养基（看细胞贴壁情况），以后每 3 天半量换液 1 次。经 0.25% 胰酶消化，12 传代，其后一般 3~5 d 传代 1 次，选取生长良好的第 3 代细胞进行后续实验胰酶消化 P4 代 BMSCs，用 PBS 清洗 3 遍，计数细胞，重悬细胞后送至流式实验室检测。

2.2 BALB/C 裸鼠造模^[19-20] 及分组 6~7 周龄裸鼠，15~20 g，雄雌不限，36 只，由北京华阜康生物科技股份有限责任公司提供。裸鼠随机分为正常组、模型组、空载慢病毒转染 BMSCs 组（BMSCs 组）、负载 INF-γ 慢病毒转染 BMSCs 组（INF-γ+BMSCs 组）、扶正抑瘤组、扶正抑瘤+INF-γ 转染 BMSCs 注射处理组（扶正抑瘤 + INF-γ + BMSCs 组）。取对数生长期 U251 人胶质瘤细胞，细胞悬液浓度为 $1 \times 10^7/\text{mL}$ ，每只在裸鼠腋下皮下接种 U251 细胞 150 L。接种后观察荷瘤裸鼠体质量及其他生长情况，待皮下肿瘤直径约 1 cm 后筛选造模成功裸鼠。在给药前 1 天尾静脉注射悬于 PBS 中空载慢病毒转染 BMSCs 细胞 $1 \times 10^7/\text{mL}$ ，IFN-γ+BMSCs 组、扶正抑瘤+IFN-γ+BMSCs 组在给药前 1 天尾静脉注射悬于 PBS 中转染 IFN-γ 基因的 BMSCs 细胞 $1 \times 10^7/\text{mL}$ ，每只裸鼠注射 0.2 mL 细胞悬液。扶正抑瘤组、扶正抑瘤 + INF-γ + BMSCs 组用扶正抑瘤汤浸提液灌胃给药，给药剂量生药 0.6 g/20 g，1 次/d，连续 14 d。干预结束后将荷瘤肿瘤组织切片 -20 °C 冰冻备用。激光共聚焦检测时取出冰冻切片室温复温 30 min 后 PBS 清洗 3 次，5 min/次；DAPI 染核 15 min；PBS 清洗 3 次，5 min/次。抗荧光淬灭剂，封片后激光共聚焦显微镜检测瘤体组织荧光分布情况。

2.3 扶正抑瘤汤制备 本研究所用扶正抑瘤汤为甘肃省名老中医赵健雄教授研制配方^[21]，扶正抑瘤汤由红芪、当归、莪术、墓头回按 3 : 1 : 1 : 3 比例混合，纯净水浸泡以上药物 40 min，每次加水 3 L 煎煮，共煎煮 3 次，将 3 次煎煮液合并后浓缩，最终制成含生药 1 g/mL 的浸提液，-20 °C 保存备用。扶正抑瘤汤浸提液剂按照前期试验的有效剂量折算为 0.6 g（生药）/20 g 灌胃干预。

2.4 表达 INF- γ 慢病毒载体构建 从 Gene Bank 钓取目的基因, 由上海吉玛制药技术有限公司合成引物并行 PCR 反应扩增。将扩增目的基因进行酶切纯化。纯化后目的基因与线性化的载体连接, 将连接产物转化细菌感受态细胞, 对长出的阳性克隆先进行酶切并鉴定。比对目的基因序列, 比对正确的即为构建成功的目的基因表达质粒载体。制备慢病毒穿梭质粒及其辅助质粒(重庆威斯腾生物医药科技公司), 共转染 293T 细胞, 转染后 8 h 更换为完全培养基, 继续培养 48 h 后, 收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液, 按照体内和体外实验对慢病毒滴度的要求, 按照密度梯度离心法浓缩其后得到高滴度的慢病毒颗粒, 分装后置 -80 ℃ 保存备用。通过荧光显微镜或 FACS 计数荧光细胞, 结合稀释倍数计算病毒滴度。按照 1×10^4 数量接种 BMSC 细胞, 用移液器吸取准确体积的病毒液加入准备好的 BMSC 培养基, 混匀后孵育过夜(37°C , 5% CO_2)。10 h 后使用重庆威斯腾生物医药科技有限责任公司自制荧光染料试剂盒, 利用荧光定量 PCR 方法验证 IFN- γ 转染效果。

2.5 ELISA 检测裸鼠血清 INF- γ 水平 在酶标板孔加入标准品和待测样品, 经过孵育, 样本中存在的 IFN- γ 与固相抗体结合。洗涤去除未结合的物质后, 加入生物素化的检测抗体孵育。洗涤去除未结合的生物素化的抗体, 加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素。洗涤后, 加入显色底物 TMB, 避光显色。加入终止液终止反应, 颜色反应的深浅与样本中的 IFN- γ 水平呈正比, 在 450 nm 波长(参考波长 570 nm) 测定吸光度值。

2.6 观察荷瘤裸鼠肿瘤生长状况 裸鼠每隔两天用游标卡尺测量肿瘤长径和短径, 肿瘤体积 = [长径 \times (短径 \times 短径) / 2], 裸鼠肿瘤体积增值 = $V_{14\text{d}} - V_{1\text{d}}$, 并记录裸鼠体质量变化。

2.7 免疫组化检测凋亡相关蛋白表达 取材瘤体组织用 PBS 清洗后用 4% 多聚甲醛固定。制作石蜡切片后经脱蜡、复水、清洗等步骤, 具体按照免疫组化相关步骤进行操作。双染后各组每个指标选肿瘤组织 10 个组织切片, 每片选 5 个视野, 用 BI-2000 图像分析软件系统作图像分析, 测定光密度(IOD) 值, 取平均值。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 21 软件进行统计分析, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 服从正态分布两组之间用 *t* 检验; 多组间用单因素方差分析, 两两之间比较 SNK 检验; 以 $\alpha=0.05$ 作为检验水准。

3 结果

3.1 BMSCs 原代培养、分离和鉴定 BMSCs 原代培养约 24 h 后即可出现贴壁生长, 细胞呈圆形、梭形、三角形为主的多种形态(图 1)。经流式细胞仪检测, 细胞表型高表达 CD44(98.01%) 和 CD105(96.17%), 不表达 CD34(1.46%)、CD45(1.32%)、CD11b(1.48%)。细胞形态及细胞表面免疫标志物表达与前期我们研究和文献报道相符, 可以判定为 BMSCs^[24, 22]。

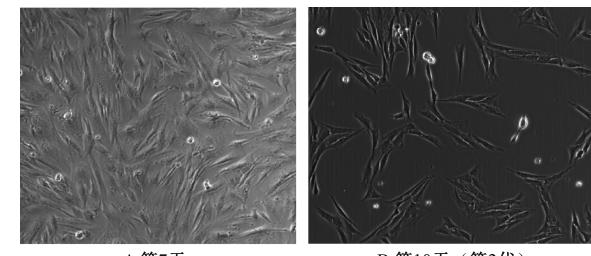


图 1 原代培养第 7 天和传代以后的 BMSCs

Fig. 1 BMSCs on day 7 and after passage

3.2 BMSCs 细胞 INF- γ 转染的验证 INF- γ 基因转染后, BMSCs 组 INF- γ mRNA 表达低于 INF- γ +BMSCs 组($P<0.05$), 见表 1。

表 1 转染后 BMSCs 细胞中 INF- γ mRNA 表达($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 1 Expression of INF- γ mRNA in BMSCs cells after transfection ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

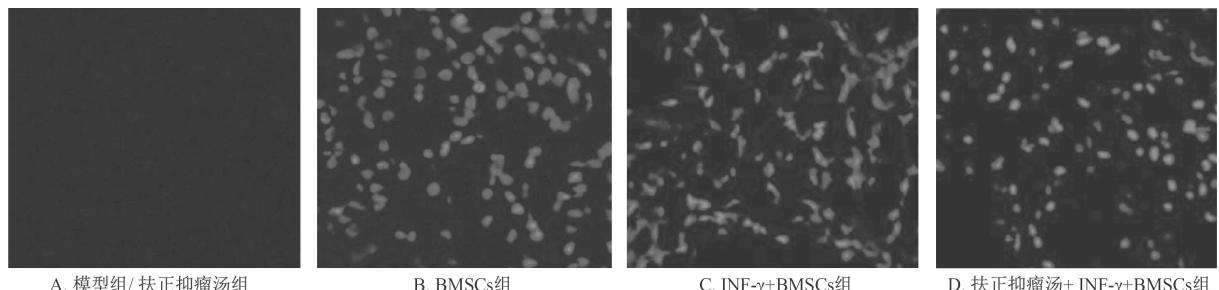
组别	INF- γ /%
INF- γ +BMSCs 组	96.34±13.17*
BMSCs 组	1.96±0.22

注:与 BMSCs 组比较, * $P<0.05$ 。

3.3 激光共聚焦显微镜检测 BMSCs 在裸鼠瘤体组织中分布 在激光共聚焦显微镜下, 模型组、扶正抑瘤汤组瘤体组织未见荧光, 而 BMSCs 组、INF- γ +BMSCs 组和扶正抑瘤汤+INF- γ +BMSCs 组裸鼠瘤体组织中可见荧光, 显示 BMSCs 归巢作用特性, 在瘤体组织集聚分布, 见图 2。

3.4 血清中 INF- γ 水平 与模型组比较, INF- γ +BMSCs 组、扶正抑瘤汤组、扶正抑瘤汤+INF- γ +BMSCs 组 INF- γ 水平增加($P<0.05$); 与 BMSCs 组比较, INF- γ +BMSCs 组、扶正抑瘤汤组、扶正抑瘤汤+INF- γ +BMSCs 组 INF- γ 水平也增加($P<0.05$), 见表 2。

3.5 荷瘤裸鼠肿瘤生长状况 灌胃给药 14 d 后, 与模型组比较, 扶正抑瘤汤组和扶正抑瘤汤+INF- γ +BMSCs 组裸鼠肿瘤体积增值减少($P<0.05$), 见表 3。

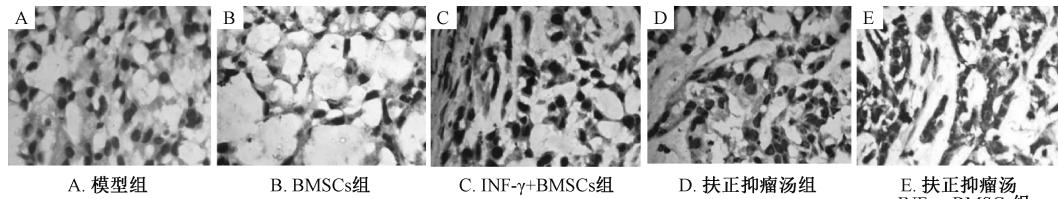
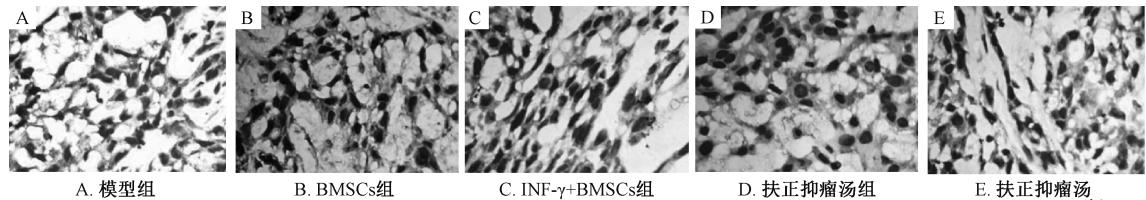
图2 激光共聚焦检测各组BMSCs在裸鼠瘤体组织中荧光分布($\times 400$)Fig. 2 Fluorescence distribution of BMSCs in nude mice by Laser confocal observation ($\times 400$)表2 各组血清中INF-γ的水平($\bar{x} \pm s$, n=8)Tab. 2 Levels of INF- γ in serum of each group($\bar{x} \pm s$, n=8)

组别	INF- γ /(pg·mL $^{-1}$)
模型组	31.71±0.57
BMSCs组	32.67±0.44
INF- γ +BMSCs组	70.67±0.16 *#
扶正抑瘤汤组	66.57±0.13 *#
扶正抑瘤汤+INF- γ +BMSCs组	82.86±1.14 *#

注:与模型组比较, *P<0.05;与BMSCs组比较, #P<0.05。

3.6 各组裸鼠瘤体组织凋亡蛋白Bax/Bcl-2表达

Bax/Bcl-2阳性染色主要位于细胞浆,呈清晰弥漫性分布,部分阳性细胞也可在胞质或核膜上(图3~4)。干预后,与模型组和BMSCs组比较,

图3 各组裸鼠瘤体组织凋亡蛋白Bax表达($\times 400$)Fig. 3 Bax expression of apoptotic protein in tumor tissue of nude mice in each group ($\times 400$)图4 各组裸鼠瘤体组织凋亡蛋白Bcl-2表达($\times 400$)Fig. 4 Bcl-2 expression of apoptotic protein in tumor tissue of nude mice in each group ($\times 400$)表4 各组裸鼠瘤体组织凋亡蛋白Bax/Bcl-2表达(%, $\bar{x} \pm s$, n=8)Tab. 4 Bax/Bcl-2 expression in tumor tissue of nude mice in each group (%, $\bar{x} \pm s$, n=8)

组别	Bax	Bcl-2
模型组	32,752.2±7 686.3	55,631.4±3 873.5
BMSCs组	43,861.3±3 921.6	78,328.5±8 924.6
INF- γ +BMSCs组	63,413.5±4 443.5 *#	38,933.7±5 635.3 *#
扶正抑瘤汤组	65,392.3±8 657.5 *#	29,866.5±4 982.4 *#
扶正抑瘤汤+INF- γ +BMSCs组	72,657.8±5855.7 *#	31,577.1±6 156.8 *#

注:与模型组比较, *P<0.05;与BMSCs组比较, #P<0.05。

4 讨论

胶质瘤侵袭性和浸润性较强，药物靶向治疗效果有限，研究还发现胶质瘤肿瘤干细胞可诱导产生肿瘤的免疫耐受微环境从而进一步增加其治疗难度^[23]，所以新的靶向治疗方法越来越受到期待^[24]。BMSCs 被越来越多用于治疗胶质瘤的基础和临床应用研究^[17-18, 24-26]，虽然 BMSCs 相关研究在胶质瘤治疗领域取得了很大进展，由于各种原因目前还没有基于 BMSCs 的恶性胶质瘤治疗的临床试验。

以细胞为基础的靶向抗肿瘤疗法必须依赖 BMSCs 主动定位到肿瘤组织的能力，以及它们影响靶点细胞的内在能力，但 BMSCs 作为生物治疗的首选载体其安全性仍然不清楚^[8]。研究显示 BMSCs 具有类似于癌细胞的自我更新能力，以及在体外自发转化的能力，曾经有人提出肿瘤可能是由侵袭性极强的间充质干细胞转化而来^[27]。但随后日本科学家证实 BMSCs 和癌细胞在增殖基因表达实际上仍存在显著差异^[28]。BMSCs 由于其本身不确定性及可能存在的成瘤性导致其在临床应用研究中被限制，但 BMSCs 作为携带外源性基因载体被广泛应用在治疗肿瘤的基础研究中^[7, 27, 30]。本研究通过 PCR 检测到 BMSCs 能够稳定转染 INF-γ 基因，且通过激光共聚焦显微镜发现 BMSCs 在肿瘤组织具有较好的归巢作用，进一步验证了 BMSCs 作为肿瘤生物治疗载体可靠性。

传统手术、放化疗联合中医药临床治疗肿瘤正显示其巨大优势^[13]，“扶正”和“驱邪”治法是中医治疗肿瘤的主要方法^[31-34]。“扶正”治法能升高 T 细胞免疫缺陷裸鼠体内 NK 细胞水平，增强 NK 细胞 FasL 表达而抑制肿瘤发展^[32]。前期研究发现扶正抑瘤汤含药血清可在体外通过抑制 BMSCs 的端粒酶活性、增加 p53 的表达和诱导细胞凋亡方式而很好逆转胶质瘤微环境下的 BMSCs 成瘤性^[17-18]。本研究发现扶正抑瘤汤能够与 INF-γ 基因转染的 BMSCs 发挥较好的协同靶向治疗作用，进一步提示中医药可以在 BMSCs 靶向载体治疗中发挥很好的“减毒增效”作用。

由于裸鼠 T 细胞免疫缺陷，裸鼠在肿瘤移植后与临床病患环境非常接近^[35]。6~8 周龄裸鼠比较普通鼠有较高水平的非特异性免疫功能，其自然杀伤细胞（NK 细胞）及巨噬细胞免疫活性也较强^[36]。本研究应用裸鼠作为实验模型，观察血清过表达 INF-γ 能否促使诱导 NK 细胞和巨噬细胞被

募集到肿瘤部位发挥巨大的抗肿瘤作用^[30, 37-38]。本研究结果表明扶正抑瘤汤+INF-γ+BMSCs 组血清 INF-γ 比其它各组明显升高 ($P < 0.05$)，而且比单纯扶正抑瘤汤组要高，结合抑制肿瘤生长的结果，可能存在扶正抑瘤汤+INF-γ+BMSCs 组通过表达 INF-γ 诱发非特异性免疫功能并且与扶正抑瘤汤协同而发挥抗肿瘤作用。

当然，本研究尚缺乏细胞因子 INF-γ 对抗原提呈细胞（NK 细胞、巨噬细胞）激活等影响的直接证据，而扶正抑瘤汤是否促进荷瘤裸鼠非特异性免疫功能而发挥“扶正”作用尚待进一步验证。

参考文献：

- [1] Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143-147.
- [2] 李娟, 吴建军, 刘凯, 等. 肉苁蓉含药血清对 BMSC 分化为神经细胞的诱导作用研究 [J]. 中国中医药科技, 2013, 20(5): 486-487; 570.
- [3] 黄勇, 吴建军, 刘凯, 等. 熟地含药血清对骨髓间质干细胞向神经细胞分化的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(20): 3979-3981.
- [4] 刘凯, 吴建军. 锁阳含药血清对骨髓间质干细胞向神经细胞分化的影响 [J]. 中医研究, 2010, 23(5): 24-27.
- [5] Bayo J, Marrodán M, Aquino J B, et al. The therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells on hepatocellular carcinoma [J]. *Liver Int*, 2014, 34(3): 330-342.
- [6] Du J, Zhou L, Chen X, et al. IFN-γ-primed human bone marrow mesenchymal stem cells induce tumor cell apoptosis *in vitro* via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44(8): 1305-1314.
- [7] Liu C, Feng X, Wang B, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells promote head and neck cancer progression through Periostin-mediated phosphoinositide 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin [J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(3): 688-698.
- [8] Motaln H, Schichor C, Lah T T. Human mesenchymal stem cells and their use in cell-based therapies [J]. *Cancer*, 2010, 116(11): 2519-2530.
- [9] Mi F, Gong L. Secretion of interleukin-6 by bone marrow mesenchymal stem cells promotes metastasis in hepatocellular carcinoma [J]. *Biosci Rep*, 2017, 37(4): BSR20170181.
- [10] Liu K J, Wang C J, Chang C J, et al. Surface expression of HLA-G is involved in mediating immunomodulatory effects of placenta-derived multipotent cells (PDMCs) towards natural killer lymphocytes [J]. *Cell Transplant*, 2011, 20(11-12): 1721-1730.
- [11] Qi F, Li A, Inagaki Y, Gao J, et al. Chinese herbal medicines as adjuvant treatment during chemo- or radio-therapy for cancer [J]. *Biosci Trends*, 2010, 4(6): 297-307.
- [12] 沈慧, 崔彦收, 杨旭杰. 黄芪桂枝五物汤联合运用化疗

- [1] 对大肠癌术后患者的肿瘤血管生长影响及疗效 [J]. 中成药, 2018, 40(11): 2603-2606.
- [2] 高卓越, 刘永琦, 何建新, 等. 温阳益气法对肿瘤微环境中骨髓间充质干细胞炎性平衡及遗传稳定性的调控 [J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(14): 2267-2272.
- [3] 王学习, 赵健雄, 陈茹, 等. 荷瘤小鼠扶正抑瘤颗粒含药血清对H(22)细胞的凋亡、自由基含量和线粒体膜电位的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2007, 27(4): 343-346.
- [4] 张武德, 程卫东, 鲍英存, 等. 扶正抑瘤汤诱导肝癌HepG2细胞凋亡及自噬作用研究 [J]. 中药药理与临床, 2013, 29(5): 102-106.
- [5] 王学习, 赵健雄, 陈茹, 等. 扶正抑瘤颗粒对小鼠移植性肿瘤细胞间通讯的影响 [J]. 中成药, 2008, 30(3): 343-346.
- [6] 吴建军, 曾龙, 刘永琦, 等. 扶正抑瘤方对胶质瘤微环境下BMSC端粒酶及P53表达的影响 [J]. 中国中医药科技, 2017, 24(1): 19-23.
- [7] 曾龙, 马占军, 吴建军, 等. 扶正抑瘤汤含药血清对胶质瘤环境下骨髓间充质干细胞增殖、周期和凋亡的影响 [J]. 兰州大学学报(医学版), 2016, 42(5): 7-13.
- [8] 褚芳, 余华, 方铅, 等. 三种癌裸鼠移植瘤肝脾转移的比较研究 [J]. 实验动物科学, 2012, 29(6): 17-21.
- [9] 苗金钰, 余君, 张玉磊, 等. 姜黄素联合雷公藤红素体内抗胃癌作用评价 [J]. 中成药, 2018, 40(3): 549-553.
- [10] 封士兰, 何禄仁, 甘雨良, 等. 扶正抑瘤颗粒的指纹图谱研究 [J]. 浙江师范大学学报(自然科学版), 2006, 29(4): 420-424.
- [11] Ma B, Ren J, Jiang H F, et al. Antitumor activities against hepatocellular carcinoma induced by bone marrow mesenchymal stem cells pulsed with tumor-derived exosomes [J]. *J Peking Univ (Med Sci)*, 2008, 40(5): 494-499.
- [12] 谢涛, 马加威, 刘兵, 等. 胶质瘤干细胞诱发肿瘤免疫耐受微环境的实验研究 [J]. 中华肿瘤杂志, 2017, 39(11): 808-813.
- [13] Zhang Q, Xiang W, Yi D Y, et al. Current status and potential challenges of mesenchymal stem cell-based therapy for malignant gliomas [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 228.
- [14] 程鹏, 胡宜, 刘云会. 骨髓间充质干细胞向脑胶质瘤定向迁移及其DAPI标记的研究 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2012, 19(12): 881-884.
- [15] [26] 于音, 邵佳甲, 田宇, 等. 内皮抑素基因联合骨髓间充质干细胞治疗大鼠脑胶质瘤 [J]. 中华实验外科杂志, 2014, 31(11): 2444-2446.
- [16] [27] Matushansky I, Hernando E, Soccia N D, et al. Derivation of sarcomas from mesenchymal stem cells via inactivation of the Wnt pathway [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(11): 3248-3257.
- [17] [28] Sawada R, Matsuoka A, Matsuda Y, et al. Change in characteristics of human mesenchymal stem cells during the *in vitro* culture-c-myc gene expression and chromosome aberrations at the c-myc locus [J]. *Yakugaku Zasshi*, 2008, 128(12): 1851-1856.
- [18] [29] Kim S W, Lee Y K, Hong J H, et al. Mutual destruction of deep lung tumor tissues by nanodrug-conjugated stealth mesenchymal stem cells [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2018, 5(5): 1700860.
- [19] [30] Wang H, Wang J, Shi X, et al. Genetically engineered bone marrow-derived mesenchymal stem cells co-expressing IFN- γ and IL-10 inhibit hepatocellular carcinoma by modulating MAPK pathway [J]. *J BUON*, 2017, 22(6): 1517-1524.
- [20] [31] 孙建立, 李春杰, 李和根, 等. 刘嘉湘扶正法治癌学术思想介绍 [J]. 中医杂志, 2006, 47(11): 814-816.
- [21] [32] 刘晓珑, 沈文律, 刘少杰, 等. 扶正抗癌汤对荷瘤裸鼠非特异性细胞免疫系统的作用 [J]. 山西医科大学学报, 2005, 36(4): 448-451.
- [22] [33] 陈东基, 李小军, 付国翠, 等. 同期放化疗联合扶正固本颗粒治疗中晚期食管癌临床观察 [J]. 中成药, 2012, 34(3): 406-409.
- [23] [34] 苏洁, 张益勋, 吕圭源, 等. 扶正消瘤方对H(22)荷瘤小鼠抑癌及其化疗减毒作用 [J]. 中成药, 2016, 38(11): 2337-2341.
- [24] [35] 佚名. 研究肿瘤转移的理想工具——高转移人肝癌裸鼠模型和细胞系 [J]. 癌症, 2002(3): 318.
- [25] [36] 屠珏, 陈方明, 周卫民, 等. 不同方法建立的人大细胞肺癌裸鼠移植瘤模型的生物学特点 [J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(4): 58-63; 67; 92.
- [26] [37] LÜ Q, He C, Quan F, et al. DOX/IL-2/IFN- γ co-loaded thermo-sensitive polypeptide hydrogel for efficient melanoma treatment [J]. *Bioact Mater*, 2018, 3(1): 118-128.
- [27] [38] Allen H, Shraga-Heled N, Blumenfeld M, et al. Human placental-derived adherent stromal cells co-induced with TNF- α and IFN- γ inhibit triple-negative breast cancer in nude mouse xenograft models [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 670.