

中药复方制剂抑制 CD133⁺ 肝癌干细胞增殖及干性转录因子的表达

<https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.3523>

覃艳春¹, 荣震², 蒋锐沅¹, 付彬¹, 洪晓华¹, 莫春梅²

2095-4344.3523

投稿日期: 2020-05-11

送审日期: 2020-05-15

采用日期: 2020-06-29

在线日期: 2020-10-22

中图分类号:

R459.9; R394.2; R285.5

文章编号:

2095-4344(2021)19-03016-08

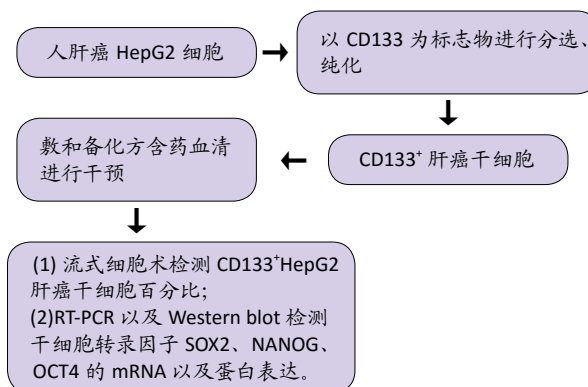
文献标识码: B

文章快速阅读:

文章特点一

△ 数和备化方含药血清能有效降低 CD133⁺HepG2 肝癌干细胞表面标记物 CD133 的表达水平, 降低肝癌干细胞恶性程度; 同时数和备化方能降低干细胞转录因子 SOX2、NANOG 和 OCT4 的表达水平;

△ 该研究肯定了数和备化方对肝癌的有效防治作用, 为数和备化方治疗肝癌提供更多思路。



文题释义:

肿瘤干细胞: 是存在于肿瘤组织中, 具有无限自我更新能力并能产生异质性肿瘤细胞群的极少数细胞。肿瘤干细胞在肿瘤的形成和生长过程中发挥决定性作用, 是肿瘤复发和转移的根源。

CD133: CD133在许多肿瘤中相继被报道, 目前已经是一个非常有价值的分选肿瘤干细胞的标志物, 研究发现CD133⁺肿瘤细胞与肿瘤发生、侵袭、转移、耐药及复发有着密切的关系, 因此深入了解CD133⁺肿瘤细胞的分子生物学特性对寻求有效的抗癌治疗, 特别是靶向肿瘤干细胞的治疗是相当必要的。

摘要

背景: 癌症起源于干细胞的恶性转化越来越得到普遍认同。肝癌干细胞具有不断自我更新与多向分化潜能, 可促进肝癌的发生发展、术后复发和耐药性的产生。

目的: 探讨中药复方制剂数和备化方对CD133⁺肝癌干细胞增殖及干性转录因子表达的影响。

方法: 采用免疫磁珠法分选出CD133⁺HepG2肝癌干细胞, 分别用2%, 4%, 8%, 10%, 12%, 16% 6个不同体积分数中药复方制剂数和备化方含药血清干预CD133⁺HepG2肝癌干细胞, 通过CCK-8法检测细胞增殖抑制作用, 筛选出最佳体积分数含药血清。然后将CD133⁺HepG2肝癌干细胞分为二甲亚砷组、数和备化方组、血清对照组、空白对照组, 其中二甲亚砷组用0.05%二甲亚砷干预, 数和备化方组用体积分数为16%数和备化方含药血清干预, 血清对照组用体积分数为16%正常大鼠血清干预, 干预6 d后采用流式细胞术检测CD133⁺HepG2肝癌干细胞百分比, RT-PCR以及Western blot检测干细胞转录因子SOX2、NANOG和OCT4的mRNA以及蛋白表达。

结果与结论: ①中药复方制剂数和备化方含药血清对CD133⁺HepG2细胞增殖有抑制作用, 且与时间、体积分数相关, 其中体积分数为16%数和备化方含药血清干预72 h抑制作用最明显($P < 0.05$); ②与血清对照组和空白对照组相比, 数和备化方组和二甲亚砷组都可降低CD133⁺HepG2细胞百分比($P < 0.05$), 且数和备化方组作用更明显; ③与空白对照组和血清对照组相比, 数和备化方组和二甲亚砷组都可下调干细胞转录因子 SOX2、NANOG、OCT4 mRNA和蛋白表达($P < 0.05$), 且数和备化方组作用更明显; ④结果表明, 中药复方制剂数和备化方含药血清能有效降低肝癌干细胞表面标记物 CD133和干细胞转录因子SOX2、NANOG、OCT4的表达水平, 降低肝癌干细胞恶性程度。

关键词: 干细胞; 肝癌干细胞; 数和备化方; 含药血清; CD133; 干细胞转录因子

Chinese medicine compound preparation inhibits proliferation of CD133⁺ liver cancer stem cells and the expression of stemness transcription factors

Qin Yanchun¹, Rong Zhen², Jiang Ruiyuan¹, Fu Bin¹, Hong Xiaohua¹, Mo Chunmei²

¹Department of Graduate, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China; ²First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
Qin Yanchun, Master candidate, Department of Graduate, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

¹广西中医药大学研究生学院, 广西壮族自治区南宁市 530000; ²广西中医药大学第一附属医院, 广西壮族自治区南宁市 530000

第一作者: 覃艳春, 女, 1994年生, 广西壮族自治区百色市人, 壮族, 在读硕士, 主要从事中医药防治恶性肿瘤方面的研究。

通讯作者: 莫春梅, 主任医师, 广西中医药大学第一附属医院, 广西壮族自治区南宁市 530000

<https://orcid.org/0000-0003-3229-5838> (覃艳春)

基金资助: 国家自然科学基金(81760850), 项目负责人: 莫春梅; 广西高校中青年教师基础能力提升项目(2018KY0282), 项目负责人: 莫春梅; 广西医疗卫生适宜技术开发与推广应用项目(S2018046), 项目负责人: 莫春梅; 广西中医药大学第一附属医院院内制剂研究与开发(2018ZJ004), 项目负责人: 莫春梅

引用本文: 覃艳春, 荣震, 蒋锐沅, 付彬, 洪晓华, 莫春梅. 中药复方制剂抑制 CD133⁺ 肝癌干细胞增殖及干性转录因子的表达 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(19):3016-3023.



Abstract

BACKGROUND: The malignant transformation of cancer originating from stem cells is increasingly recognized. Liver cancer stem cells have the potential of continuous self-renewal and multi-directional differentiation, which can promote the occurrence and development of liver cancer, postoperative recurrence and the production of drug resistance.

OBJECTIVE: To explore the effect of *Fuhe* preparation formula on proliferation of CD133⁺ liver cancer stem cells and stemness transcription factor expression.

METHODS: CD133⁺ HepG2 liver cancer stem cells were selected by immunomagnetic bead method. CD133⁺ HepG2 cells were treated with serum containing 2%, 4%, 8%, 10%, 12% and 16% *Fuhe* preparation formula respectively. The inhibitory rate of CD133⁺ HepG2 cells was determined by CCK-8 method, and the optimal volume fraction of serum containing drugs was selected. The CD133⁺ HepG2 liver cancer stem cells were divided into dimethyl sulfoxide group, application and preparation group, serum control group and blank control group. Cells in the dimethyl sulfoxide group were intervened with 0.05% dimethyl sulfoxide. Cells in the application and preparation group were intervened with 16% application and preparation containing serum. Cells in the serum control group were intervened with 16% normal rat serum. After 6 days of intervention, the percentage of CD133⁺ HepG2 liver cancer stem cells was detected by flow cytometry. The mRNA and protein levels of transcription factors SOX2, NANOG, and OCT4 were detected by RT-PCR and western blot assay.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The serum containing application and preparation formula inhibited the proliferation of CD133⁺ HepG2 cells, which was related to the time and concentration. The inhibitory effect of 16% application and preparation formula was the most obvious in 72 hours ($P < 0.05$). (2) Compared with the serum control and blank control groups, the percentage of CD133⁺ HepG2 liver cancer stem cells was decreased in the application and preparation and dimethyl sulfoxide groups ($P < 0.05$), and the effect was more obvious in the application and preparation group. (3) Compared with the serum control and blank control groups, SOX2, NANOG, OCT4 mRNA and protein expression levels were downregulated in the application and preparation and dimethyl sulfoxide groups ($P < 0.05$), and the effect was more obvious in the application and preparation group. (4) These findings conclude that the serum containing application and preparation formula can effectively reduce the expression levels of CD133, a marker on the surface of liver cancer stem cells, and transcription factors SOX2, NANOG and OCT4, and can reduce the malignant degree of liver cancer stem cells.

Key words: stem cells; liver cancer stem cells; application and preparation formula; drug serum; stem cell transcription factors

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81760850 (to MCM); the Basic Ability Improvement Project of Young and Middle-Aged Teachers in Guangxi Universities, No. 2018KY0282 (to MCM); the Guangxi Medical and Health Appropriate Technology Development and Application Project, No. S2018046 (to MCM); the Research and Development of Hospital Preparations in the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, No. 2018ZJ004 (to MCM)

How to cite this article: QIN YC, RONG Z, JIANG RY, FU B, HONG XH, MO CM. Chinese medicine compound preparation inhibits proliferation of CD133⁺ liver cancer stem cells and the expression of stemness transcription factors. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(19):3016-3023.

0 引言 Introduction

肝癌是常见的消化系统恶性肿瘤，高发于非洲东南部和亚洲地区，多数患者年龄在40-50岁。根据世界卫生组织(WHO)发布的《全球癌症报告2018》指出，中国每年新增原发性肝癌患者人数和因肝癌死亡人数都位居世界首位^[1]。

《2018年中国肿瘤登记年报》显示，肝癌是中国第三常见的肿瘤死亡原因和发病率第四高的恶性肿瘤^[2]。例如中国的广西扶绥、江苏启东等地区，由于人民生活习惯等原因导致当地肝癌的发病率远远高于其他地区，因此肝癌的防治问题一直是研究的热点。近年来，肿瘤干细胞是研究的热点之一，因其特殊的生物学特性在肿瘤防治中起重要作用。肿瘤干细胞的研究将为肿瘤诊断、治疗提供新的、更有针对性的、能更充分展示癌症特性的靶点^[3]。

肿瘤干细胞是存在于肿瘤组织中具有无限自我更新能力并能产生异质性肿瘤细胞群的极少数细胞^[4]。1983年MACKILLOP等最先提出肿瘤干细胞假说，其认为肿瘤组织中存在一小部分细胞，具有起始肿瘤发生、维持肿瘤生长和异质性的能力^[5]。肝癌干细胞是肝癌组织中具有不断自我更新与多向分化潜能的一个微群体，对于肝癌的发生发展起着极大的促进作用。目前，关于肝癌干细胞的来源主要有3种观点^[6]：①成熟的肝细胞去分化后可以变成具有分化潜能的干细胞；②肝干细胞直接突变或者肝干细胞分化的卵圆细胞突变所致；③由正常组织中的干细胞突变而来。HO等^[6]研究发现肝癌干细胞有可能来源于骨髓内皮祖细胞和循环内皮祖细胞形成的克隆集落。研究肝癌干细胞的来源和特性有助于了解肝癌发病机制和生物学特征以及耐药性，并对肝癌治疗有指导作用。

目前中医药防治肿瘤疾病具有公认的良好疗效和提高生活质量的优点，已成为肝癌治疗的重要手段之一，且已经被写入最新的《原发性肝癌诊疗规范(2019版)》。验方敷和备化方是全国名老中医荣远明教授治疗肝癌的基本方，根据长期临床实践经验对其进行优化，该方具有健脾调肝、利湿化痰的功效，通过调整肝脾功能而达到抗肿瘤的目的，目前被运用于肝癌以及相关肝脏疾病的临床治疗中，并取得了良好的效果。前期研究发现，敷和备化方在原发性肝癌肝动脉化疗栓塞术后治疗中能明显改善患者临床症状，降低因肿瘤原因升高的甲胎蛋白、丙氨酸转氨酶、血清总胆红素以及天冬氨酸氨基转移酶表达水平，提高术后T淋巴细胞亚群及自然杀伤细胞水平^[7-9]。与单纯肝动脉化疗栓塞术治疗中晚期肝郁脾虚型原发性肝癌相比，敷和备化方联合肝动脉化疗栓塞术治疗能有效改善中医证候及提高患者的生活质量，且能下调术后3个月血浆血管内皮生长因子及血小板源性生长因子表达水平^[10]。此外，敷和备化方防治原发性肝癌介入术后肝纤维化有一定疗效，其机制可能与调控转化生长因子β1、肿瘤坏死因子α水平有关^[11]，但目前具体机制尚未明确。

西洋参和三七中提取出的有效成分人参皂苷Rb1及其代谢产物化合物K能有效抑制肿瘤细胞的自我更新，对化疗药物顺铂和紫杉醇增敏^[12]，因此作者推测敷和备化方可能对肝癌干细胞的分化产生作用。在前期研究基础上，本研究探讨敷和备化方对肝癌干细胞表面标志物CD133及干性转录因子SOX2、NANOG、OCT4表达的影响，以此阐明敷和备化方对肝癌干细胞的作用，从而为中医药防治肝癌提供理论和实验依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞观察性实验。

1.2 时间及地点 实验于2018年10月至2019年12月在广西中医药大学第一附属医院分子生物学实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 SPF级Wistar雌性大鼠32只,6-8周龄,体质量160-200g,购于北京维通利华实验动物有限公司,合格证号:SCXK(京)2017-0006,于SPF条件下饲养于广西中医药大学科学实验中心,许可证号:SYXK(桂)2019-0001。该实验经过广西中医药大学动物伦理委员会批准(动物伦理审查号:2019010)。

1.3.2 实验细胞 人肝癌HepG2细胞购自赛百慷(上海)生物技术股份有限公司,货号:iCell-h092。

1.3.3 实验试剂及药物 PBS、青链霉素混合液(100×)、胰蛋白酶-EDTA消化液、BCA蛋白浓度测定试剂盒、RIPA裂解液(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为sv300160.03、P1400、T1300、PH0326、P0013B); B27、N2、乳铁蛋白、DMEM(美国Gibco公司,批号分别为17504-004、17502048、yb-E12455、MD202); 成纤维细胞生长因子、表皮生长因子(美国PEPROTECH公司,批号分别为Rs-6706R、HZ-4567R); DMEM/F12(中国武汉BOSTER公司,批号:11330032); MACS Buffer、CD133microbead kit(德国美天旎生物技术公司,批号分别为130-091-221、130-097-049); PE MOUSE ANTI-HUMAN CD133(北京BD Biosciences公司,批号:12-1331-82); 山羊抗兔IgG、山羊抗鼠IgG、二甲基亚砷(美国Sigma-Aldrich公司,批号分别为ab97051、1010-04、D8371); 脱脂奶粉(中国光明牌,批号:080922 DN7); SDS-PAGE上样缓冲液、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒、ECL发光液、干细胞消化液(碧云天上海生物技术有限公司,批号分别为YT050-CWN、P1200、PH0353、MX2001); SOX2、OCT4、NANOG、 β -catenin(CST中国公司,批号分别为14-9811、ab18976、ab21624、AC106); 引物(中国武汉金开瑞公司,批号:D3118); CCK-8试剂盒(中国上海东仁化学科技有限公司,批号:ab228554); Scientific TRIZOL™ Reagent(Thermo中国公司,批号:15596026); NSuperReal PreMix Plus、FastKing RT Kit(TIANGE,批号分别为FP205、KR116-02); Nuclease-Free Water(莫纳生物科技有限公司,批号:AM9932)。

1.3.4 实验药物 敷和备化方经过广西中医药大学第一附属医院药剂科主任杨政滕鉴定符合2015年版《中国药典》的规定和标准,为正品药物。敷和备化方由西洋参10g,柴胡12g,制香附12g,茵陈蒿30g,制半夏12g,白花蛇舌草30g,杭白芍12g,鳖甲24g,生姜10g,白术15g,茯苓15g,枳实10g,莪术12g,当归12g,三七10g,牛膝30g,甘草6g组成,所用药物均为江阴天江药业有限公司生产的免煎颗粒。由广西中医药大学第一附属医院制剂室统一用120目网筛过滤药液,浓缩至1g/mL的含药液,封装,灭菌,4℃保存待用。

1.3.5 实验仪器 BBS-H1500型超净工作台(中国山东博科生物产业有限公司); DMI1型倒置生物显微镜(德国Leica公司); MCO175M型CO₂细胞培养箱(日本Sanyo公司); 高压蒸汽灭菌锅(中国上海三申医疗器械厂); 全波长酶标仪、磁力搅拌器、电泳仪、CL10型离心机、Multiskan FC型酶标仪(美国Thermo公司); GE多功能成像仪、PCR循环仪(美国通用); 制冰机(美国Bio-Rad公司); 170-4158型转膜仪(美国Bio-rad公司); 水平摇床(北京市六一仪器厂); CytoFLEX流式细胞仪(美国贝克曼公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 HepG2细胞培养 将人HepG2肝癌细胞株从-80℃冰箱迅速取出,梯度升温溶解,生物安全柜内将细胞从冻存管移至培养瓶,置于37℃、体积分数为5%CO₂培养箱中,用含体积分数为10%胎牛血清的DMEM完全培养液培养,隔天换液。显微镜下观察细胞贴壁80%-90%时,用0.25%胰酶-0.02%EDTA消化,计数,以1:3的比例传代,每两三天传代1次,取对数生长期的细胞用于后续实验。该细胞实验经过广西中医药大学第一附属医院伦理委员会批准。

1.4.2 CD133⁺HepG2肝癌干细胞的分离、纯化

(1) 干细胞诱导: 预先配置干细胞培养液: DMEM/F12+表皮生长因子(20 μg/L)+成纤维细胞生长因子(20 μg/L)+人白血病抑制因子(10 μg/L)+B27(1×)+N2(1×)。取对数生长期HepG2细胞,弃旧培养液,PBS洗涤,加入1 mL干细胞消化液消化细胞,待细胞变圆盾、立体,加入适量DMEM终止消化,4℃、1 000 r/min低温离心5 min,弃上清,加入1 mL干细胞培养液,充分抽吸混匀,使用细胞计数板测定细胞总数,将细胞悬液接种于低粘连6孔板中(2×10⁴个/孔),加入2 mL干细胞培养液继续培养,至细胞数达到10⁸个,进行磁珠分选。

(2) 磁珠分选: 用干细胞消化液消化细胞,300×g离心10 min,弃上清,收集细胞沉淀,加入300 μL buffer缓冲液充分混匀,重悬细胞,计数,将细胞悬液调整到100个细胞/组。每100个细胞加入100 μL FCR Blocking Reagent,再加入100 μL CD133 Micro Beads,混匀后4℃避光孵育30 min; 将LS柱置于MACS磁选机,buffer冲洗LS柱3次,将细胞悬液置于柱中,使其缓慢滴落,再用1.0-2.0 mL buffer冲洗LS柱,将滴落的细胞悬液收集至离心管中,离心,PBS清洗1次后计数铺板,继续培养于装有不含酚红的DMEM/F12培养基的悬浮细胞孔培养皿中,5 d后离心收集干细胞球,加入1 mL胰酶进行重悬,静置5 min; 用移液器反复吹打直至细胞球变成单个细胞,PBS清洗后再次离心; 去除上清,将细胞重悬于干细胞培养基中,按1:2比例传代于新的6孔悬浮细胞培养板中; 每日观察细胞状态,防止污染; CD133阳性细胞培养3代后(每代5-7 d)用流式细胞术鉴定细胞纯度。

(3) 鉴定: 从培养箱取出低粘板,4℃、1 000 r/min离心5 min,加入1 mL PBS重悬细胞。准备计数板,往计数板A孔中加入10 μL细胞悬液,插入计数器中,细胞总数超过10⁶可进行下一步实验。将获得细胞分为实验组、空白对照

组、同型对照组。EP管分别加入100 μL细胞悬液，实验组加入10 μL PE CD133抗体，空白对照组为染色对照，同型对照组加入10 μL CD133同型对照抗体，充分抽吸混匀，4℃避光反应30 min，离心后弃上清，PBS清洗2次，重复离心，加入500 μL PBS重悬细胞，上机测定CD133比例。

1.4.3 敷和备化方含药血清制备 严格按照中药复方血清药理学研究方法制备敷和备化方含药血清^[13]。将32只Wistar大鼠随机分为空白组(16只)和中药组(16只)，分笼饲养，喂食，连续灌胃7 d(1次/d)，以成人(60 kg)临床计量，大鼠按体质量100 g灌胃1 mL的药量，空白组灌胃等量生理盐水，末次给药后2 h进行腹主动脉取血，收集血液，避免污染，室温静置4 h，300 r/min离心15 min，收集上层亮黄色血清，56℃水浴锅灭活30 min，在生物安全柜内用注射器(0.22 μm微孔滤膜)过滤除菌，得到正常大鼠血清和敷和备化方含药血清，用15 mL离心管分装，保存于-20℃冰箱以备后续实验用。

1.4.4 CCK-8法测定最佳体积分数含药血清 预先配置2%，4%，8%，10%，12%，16% 6个不同体积分数实验组以及对对照组含药血清备用，取对数生长期CD133⁺HepG2细胞测定细胞总数，按10⁵/孔稀释浓度，在96孔板中均匀加入1 mL细胞悬液，每组6个复孔，放入培养箱培养，镜下观察细胞生长情况，细胞结构正常，基本铺满孔底，且无大量堆积现象，即可加入2%，4%，8%，10%，12%，16%不同体积分数大鼠含药血清，1 mL/孔。对照组加入体积分数10%大鼠正常血清，1 mL/孔。阳性对照组加入1 mL 0.05%二甲基亚砷溶液，放入培养箱培养24，48，72，96 h，测定吸光度值。从培养箱取出96孔板，观察各组培养液颜色异同，镜下观察各组细胞状态，于生物安全柜中操作，吸去旧培养液，PBS充分洗涤2次后，每孔加入10 μL CCK-8溶液，放入培养箱培养1-4 h后用酶标仪在450 nm处测定吸光度值，筛选出最佳体积分数含药血清。

1.4.5 流式细胞术检测敷和备化方含药血清干预后CD133⁺HepG2细胞百分比 将CD133⁺HepG2细胞分为空白对照组、血清对照组、二甲基亚砷组和敷和备化方组。敷和备化方组加入2 mL含体积分数16%敷和备化方含药血清的培养基，血清对照组加入2 mL含体积分数16%正常大鼠血清的培养基，二甲基亚砷组加入含2 mL 0.05%二甲基亚砷的培养基，空白对照组加入无血清培养基，继续培养6 d，第6天进行流式鉴定。从培养箱取出低粘板，镜下观察细胞生长情况，计数，记细胞总数超过10⁶可进行下一步实验。从每组细胞中吸取100 μL细胞悬液至无菌EP管中，加入10 μL PE MOUSE ANTI-HUMAN CD133，4℃避光反应30 min，4℃，1 200 r/min离心5 min，弃上清，500 μL PBS重悬，上机测定结果。

1.4.6 RT-PCR检测干性转录因子SOX2、NANOG和OCT4的mRNA水平 将CD133⁺HepG2细胞分为空白对照组、血清对照组、二甲基亚砷组和敷和备化方组。敷和备化方组加入2 mL

含体积分数16%敷和备化方含药血清的培养基，血清对照组加入2 mL含体积分数16%正常大鼠血清的培养基，二甲基亚砷组加入含2 mL 0.05%二甲基亚砷的培养基，空白对照组加入无血清培养基，继续培养6 d，第6天进行RT-PCR检测。

(1)Triol法提取RNA: 从培养箱取出待用细胞，弃旧培养液，PBS充分清洗后，加入1 mL Triol/孔(标本量不超过Triol体积的10%)，充分混匀，转移至1.5 mL EP管中，室温放置5 min，彻底分离核蛋白复合体；加入0.2 mL氯仿，剧烈摇晃EP管15 s，室温放置3 min，4℃12 000×g离心15 min，可见EP管中呈现3层，RNA存在于水相层，移液枪转移上层水相至新的EP管，加入0.5 mL异丙醇，室温静置10 min，4℃12 000×g离心10 min，EP管底部或侧壁可见白色絮状RNA沉淀，弃上清，加入1 mL体积分数为75%乙醇洗涤，振荡器混匀，4℃7 500×g离心5 min，弃上清，置于空气中干燥，用无酶水重悬，静置10 min，于-20℃长期保存。测定浓度：取2 μL储存液加入新EP管，再加入98 μL无酶水，短暂离心，混匀，以无酶水作为空白对照，测定A₂₆₀/A₂₈₀值。

(2)反转录: 使用miRcute Puls miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒，严格按照说明书进行反转录操作，将提取的RNA反转录为cDNA，冰上配制反应体系，将配置好的反应体系混匀，适当离心，放置于PCR循环仪，42℃反应2 min；反转录反应：将配置好的反应体系混匀，适当离心，放置于PCR循环仪，37℃反应15 min，85℃反应5 s，4℃停止反转录反应，得到反转录产物备用。

(3)RT-PCR: 将FastKing RT Kit(with gDNase)试剂盒从20℃取出，置于冰上，待融为液体之后振荡，适当离心，配制反应体系于PCR仪器上进行扩增反应，将八联管适当离心，确保反应液全部沉到八联管底部，95℃反应15 s预变性，94℃反应30 s变性，55℃反应30 s退火，72℃反应1 min(扩增1 kb片段)，使引物在模板上延伸，合成DNA，完成1个循环。重复循环25-35次，使扩增的DNA片段大量累积。引物序列见表1。

表1 | 引物序列
Table 1 | Primer sequences

引物	引物序列 (5'-3')	参考 NCBI 登录号	引物位置 (bp)	扩增长度 (bp)
SOX2-F	5'-GAC CTG CAG TAC AAC TCC AT-3'	NM-003106-2	1 307-1 327	265
SOX2-R	5'-GAC TTG ACC ACC GAA CCC AT-3'		1 550-1 572	
NANOG-F	5'-CTA CCT ACC CCA GCC TTT ACT-3'	NM-024865-2	1 278-1 297	460
NANOG-R	5'-GGA CTG GAT GTT CTG GGT CT-3'		1 459-1 478	
OCT4-F	5'-CGG GAC GTA AAG CCA ATC AC-3'	NM-002701-4	9-28	205
OCT4-R	5'-CCC ATC ATA CTG GTA CGA GC-3'		445-464	
β-actin-F	5'-CAG GAG GCA TTG CTG ATG AT-3'	NM-007393	305-324	247
β-actin-R	5'-GAA GGC TGG GGC TCA TTT-3'		849-868	

1.4.7 Western blot 检测干性转录因子 SOX2、NANOG 和 OCT4 蛋白表达水平 将处于对数生长期 CD133⁺HepG2 细胞分为空白对照组、血清对照组、二甲基亚砷组和敷和备化方组。敷和备化方组加入 2 mL 含体积分数 16% 敷和备化方含药血清的培养基，血清对照组加入 2 mL 含体积分数 16% 正常大鼠血清的培养基，二甲基亚砷组加入含 2 mL 0.05% 二甲基亚砷的培养基，空白对照组加入无血清培养基，37 °C，体积分数为 5%CO₂ 条件下继续培养 6 d，第 6 天进行 Western blot 检测。收集细胞，用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液裂解细胞，待细胞充分裂解后，4 °C 10 000 r/min 离心 5 min，移液枪吸取适量上清液至新的 EP 管，即为细胞全蛋白提取物，测定蛋白标准曲线，剩余上清液放于 -80 °C 冰箱冻存。BCA 法测定蛋白浓度，酶标仪测定波长为 562 nm 的吸光度值，根据相应的标准曲线，计算待测样品的浓度及所需稀释的对应量。加入相应量的 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (Buffer)，Buffer : 蛋白体积 = 1 : 4，混匀后于 99 °C 水浴中加热 8 min，取出后分装备用。制胶后进行蛋白电泳、转膜、染色显影，检测干性转录因子 SOX、NANOG 和 OCT4 的蛋白表达。

1.5 主要观察指标 CD133⁺HepG2 细胞百分比；干性转录因子 SOX2、NANOG、OCT4 的 mRNA 及蛋白表达水平。

1.6 统计学分析 实验数据通过 SPSS 20.0 软件作统计学数据分析，用 Excel 软件统计作图。实验数据以均数 ± 标准差表示，采用单因素方差分析 (one-way analysis of variance, ANOVA) 进行多组间比较。检验水准设定为 α=0.05，P < 0.05 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 CD133⁺HepG2 肝癌干细胞的分离与鉴定结果 通过免疫磁珠法分选出 CD133⁺HepG2 肝癌干细胞进行培养，采用流式细胞术鉴定 CD133⁺ 肝癌干细胞阳性率。结果显示：CD133⁺ 肝癌干细胞阳性率为 99.5%，细胞生长情况良好，镜下细胞结构完整，可用于后续实验，见图 1, 2。

2.2 CCK-8 法检测敷和备化方含药血清对 CD133⁺HepG2 细胞的影响以及最佳体积分数含药血清筛选 敷和备化方含药血清对 CD133⁺HepG2 肝癌干细胞的增殖有抑制作用，并与时间和体积分数相关。各个体积分数敷和备化方含药血清干预 CD133⁺HepG2 肝癌干细胞后对细胞均有抑制作用，差异有显著性意义 (P < 0.05)，其中体积分数 16% 敷和备化方含药血清作用 72 h 对 CD133⁺HepG2 细胞有明显抑制作用，差异有显著性意义 (P < 0.05)。后续实验中应用体积分数 16% 敷和备化方含药血清进行干预，见表 2。

2.3 流式细胞术检测 CD133⁺HepG2 肝癌干细胞百分比 由图 3 可见：空白对照组、血清对照组、二甲基亚砷组、敷和备化方组 CD133⁺HepG2 肝癌干细胞百分比分别为 98.6%，94.1%，90.8%，84.2%。与空白对照组和血清对照组相比，敷和备化方组和二甲基亚砷组可明显降低 CD133⁺HepG2 肝癌干细胞百分比，差异有显著性意义 (P < 0.05)；与二甲基亚砷

组相比，敷和备化方组可明显降低 CD133⁺HepG2 肝癌干细胞百分比，差异有显著性意义 (P < 0.05)，说明体积分数为 16% 敷和备化方含药血清能够有效降低 CD133⁺HepG2 肝癌干细胞表面标志物 CD133 的表达，见表 3。

2.4 RT-PCR 检测干性转录因子 SOX2、NANOG 和 OCT4 的 mRNA 水平 由表 4 可知，空白对照组 OCT4、SOX2、NANOG mRNA 水平与血清对照组相比，差异无显著性意义 (P > 0.05)；二甲基亚砷组和敷和备化方组的 OCT4、SOX2、NANOG mRNA 表达均低于血清对照组，差异有显著性意义 (P < 0.05)，敷和备化方组对 OCT4、SOX2、NANOG 的抑制作用最佳。

2.5 Western blot 检测干性转录因子 SOX2、NANOG 和 OCT4 蛋白表达水平 由图 4 和表 5 可知，空白对照组 OCT4、SOX2、NANOG 蛋白水平与血清对照组相比，差异无显著性意义 (P > 0.05)；二甲基亚砷组和敷和备化方组的 OCT4、

表 2 | 各组 CD133⁺HepG2 肝癌干细胞不同时间的吸光度值比较

组别	24 h	48 h	72 h	96 h
空白对照组	0.15±0.01	0.15±0.01	0.15±0.01	0.15±0.01
血清对照组	0.65±0.01	0.67±0.16	0.67±0.31	0.68±0.01
体积分数 2% 含药血清组	0.65±0.11 ^a	0.64±0.0 ^a	0.61±0.12 ^a	0.62±0.02 ^a
体积分数 4% 含药血清组	0.63±0.01 ^b	0.60±0.04 ^b	0.60±0.01 ^b	0.63±0.01 ^b
体积分数 8% 含药血清组	0.56±0.00 ^c	0.55±0.01 ^c	0.51±0.02 ^c	0.55±0.00 ^c
体积分数 10% 含药血清组	0.50±0.01 ^d	0.48±0.00 ^d	0.42±0.01 ^d	0.43±0.01 ^d
体积分数 12% 含药血清组	0.38±0.02 ^e	0.34±0.01 ^e	0.29±0.02 ^e	0.32±0.02 ^e
体积分数 16% 含药血清组	0.27±0.02 ^f	0.25±0.00 ^f	0.21±0.01 ^f	0.22±0.02 ^f
阳性对照组	0.26±0.01	0.32±0.01	0.26±0.02	0.28±0.01

表注：与血清对照组比较，^aP < 0.05；与体积分数 2% 含药血清组比较，^bP < 0.05；与体积分数 4% 含药血清组比较，^cP < 0.05；与体积分数 8% 含药血清组比较，^dP < 0.05；与体积分数 10% 含药血清组比较，^eP < 0.05；与体积分数 12% 含药血清组比较，^fP < 0.05

表 3 | 流式细胞术检测各组 CD133⁺HepG2 肝癌干细胞百分比

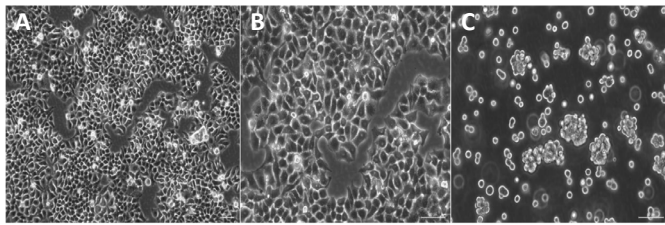
组别	干预剂量	CD133 ⁺ 细胞百分比
空白对照组	-	95.12±5.32
血清对照组	体积分数为 16% 正常大鼠血清	93.37±3.17
二甲基亚砷组	0.05% 二甲基亚砷	90.89±4.97 ^{ab}
敷和备化方组	体积分数为 16% 敷和备化方含药血清	85.13±2.71 ^{abc}

表注：与空白对照组比较，^aP < 0.05；与血清对照组比较，^bP < 0.05；与二甲基亚砷组比较，^cP < 0.05

表 4 | SOX2, NANOG 和 OCT4 mRNA 的 2^{-ΔΔct} 法相对扩增计算结果

组别	干预剂量	OCT4	SOX2	NANOG
空白对照组	-	1.18±0.04	1.01±0.16	1.04±0.12
血清对照组	体积分数为 16% 正常大鼠血清	0.93±0.14 ^a	0.87±0.18 ^a	0.92±0.28 ^a
二甲基亚砷组	0.05% 二甲基亚砷	0.48±0.04 ^{ab}	0.51±0.06 ^{ab}	0.61±0.17 ^{ab}
敷和备化方组	体积分数为 16% 敷和备化方含药血清	0.20±0.04 ^{abc}	0.20±0.05 ^{abc}	0.48±0.21 ^{abc}

表注：与空白对照组比较，^aP < 0.05；与血清对照组比较，^bP < 0.05；与二甲基亚砷组比较，^cP < 0.05



图注：图中 A, B 为分选前 (A: $\times 10$; B: $\times 20$); C 为分选后 ($\times 20$)
图 1 | HepG2 细胞分选前后细胞生长情况

Figure 1 | Growth of HepG2 cells before and after sorting

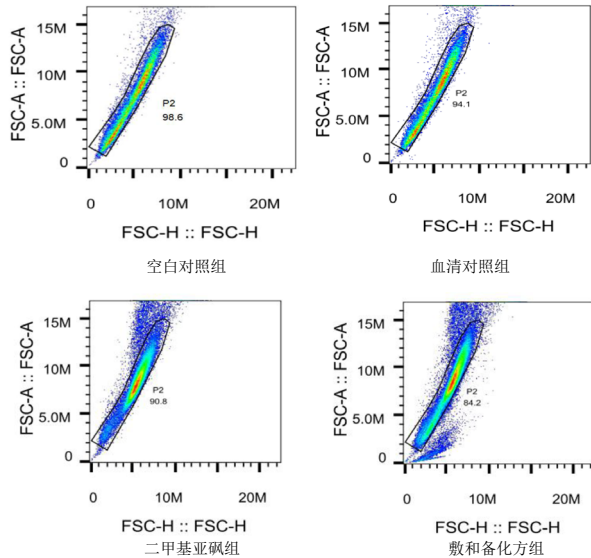


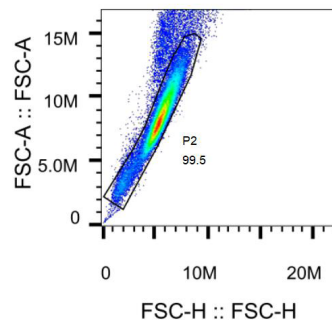
图 3 | 流式细胞术检测 CD133⁺HepG2 肝癌干细胞百分比

Figure 3 | Flow cytometry of the percentage of CD133⁺ HepG2 liver cancer stem cells

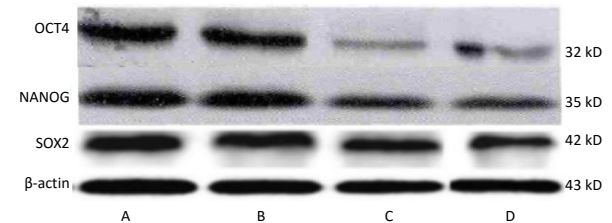
SOX2、NANOG 蛋白表达均低于血清对照组，差异有显著性意义 ($P < 0.05$)，二甲基亚砷组对 SOX2 的抑制作用最佳，敷和备化方组对 OCT4、NANOG 的抑制作用最佳。

3 讨论 Discussion

肿瘤干细胞理论认为癌发生、复发和转移以及肿瘤对放射治疗、化疗抵抗的根源是肿瘤内部一小部分具有自我更新、多向分化潜能的细胞。随着过去几年肿瘤中存在肿瘤干细胞的证据逐渐增加，认为大多数恶性肿瘤的发生可能均与肿瘤干细胞有关。肝癌干细胞的多分化潜能和自我更新能力，使其在肝癌转移和复发中起到至关重要的作用。就肝癌而言，免疫表型多达数种，包括 CD133^[14]、CD44 等，但从肝癌细胞中分离出的 CD133⁺ 细胞在体内形成肿瘤组织的能力更大，具有类似于干细胞的特征，并能分化成非肝细胞样细胞^[15]。CD133⁺ 肝癌细胞仅占肿瘤细胞极少部分，在人类肝细胞癌标本中 CD133 水平与肿瘤级别、疾病进展和复发率呈正相关，与生存期呈负相关^[16]。CD133 是一种广泛表达于正常干细胞和肿瘤干细胞的干细胞相关特征标志，在肝癌诊断中既可作为肝癌干细胞的标志，又与肝癌患者预后相关^[17]。研究发现 CD133 不仅仅是一个表面标志，其在肝癌细胞中也发挥着生物学作用，影响细胞



图注：CD133⁺ 肝癌干细胞阳性率为 99.5%
图 2 | 流式细胞术鉴定 CD133⁺HepG2 肝癌干细胞
Figure 2 | Flow cytometry of CD133⁺ HepG2 liver cancer stem cells



图注：A 为空白对照组；B 为血清对照组；C 为二甲基亚砷组；D 为敷和备化方组

图 4 | 各组 CD133⁺HepG2 肝癌干细胞 SOX2、OCT4、NANOG 蛋白表达条带图

Figure 4 | expression bands of sox2, Oct4 and Nanog in each experimental group

表 5 | 各组 CD133⁺HepG2 肝癌干细胞 SOX2、OCT4、NANOG 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 5 | Expression of SOX2, OCT4 and NANOG protein in CD133⁺ HepG2 liver cancer stem cells of each group

组别	干预剂量	OCT4/ β -actin	SOX2/ β -actin	NANOG/ β -actin
空白对照组	-	0.84 \pm 0.05	0.75 \pm 0.01	0.52 \pm 0.07
血清对照组	体积分数为 16% 正常大鼠血清	0.80 \pm 0.03	0.73 \pm 0.07	0.48 \pm 0.02
二甲基亚砷组	0.05% 二甲基亚砷	0.46 \pm 0.02 ^{ab}	0.17 \pm 0.02 ^{abc}	0.19 \pm 0.03 ^{ab}
敷和备化方组	体积分数为 16% 敷和备化方含药血清	0.41 \pm 0.05 ^{ab}	0.28 \pm 0.10 ^{ab}	0.13 \pm 0.02 ^{ab}

表注：与空白对照组比较，^a $P < 0.05$ ；与血清对照组比较，^b $P < 0.05$ ；与敷和备化方组比较，^c $P < 0.05$

的恶性性^[4, 14]。CD133 的表达水平与肝硬化、肝癌病理分级、门静脉浸润、淋巴结和肝内转移、TNM 分期以及患者的无进展生存期和总生存期息息相关。朱新锋^[18]通过培养 3 株不同的肝癌细胞株，采用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测肿瘤干细胞标记物的表达，最终得到了 CD133⁺ 高表达的肝癌干细胞，细胞状态良好，干细胞特性得到有效维持。因此，目前 CD133 被普遍公认为肝癌干细胞的特异性表面标记物。

转录因子网络、组蛋白修饰以及信号通路传导是建立和维持细胞类型、分子特性、基因结构的基础。OCT4、SOX2、NANOG 的异位表达可以将分化的体细胞重新编程为诱导性多能干细胞，是促进和维持肝癌干细胞功能的关键转录因子。

OCT4 是维持胚胎干细胞自我增殖和多能性所必需的 POU 转录因子家族的成员，人的 OCT4 基因位于 6 号染色体上，长度 16.40 kb，与多种类型恶性肿瘤的发生和恶性转化相关，与术后复发以及化疗药物耐药性有着密不可分的联系，也是

唯一不能被其他 POU 成员取代的转录因子。OCT4 作为先锋转录因子被认为是重编程因素的核心,在胚胎干细胞自我更新和分化中起重要作用,其在体外和体内均可与多个基因的启动子结合,高水平 OCT4 可提高分化相关增强子的染色质可及性。在乳腺癌、肝癌、胰腺癌、肺癌等多种恶性肿瘤中均可检测到过表达的 OCT4 因子。例如:在胆囊癌中,恶性肿瘤组织的 OCT4 和 CD133 表达水平明显高于胆囊非肿瘤性病变组织。同样, OCT4 在肝癌肿瘤组织中的表达高于癌旁组织,过表达的 OCT4 mRNA 水平与恶性肿瘤患者的无进展生存期、总生存期、肿瘤体积大小、肿瘤数目、分化程度和 TNM 分期呈明显负相关,并且增加了肝移植术后肝癌的复发风险,提示了患者不良的预后。此外, OCT4 表达水平影响肿瘤微环境中血管的生成、信号通路的传导。因此,了解 OCT4 结构以及其调控机制,下调 OCT4 表达水平对肝癌的治疗颇有益处。

SOX2 是另一个在肿瘤干细胞中高表达的干性基因,在维持胚胎细胞和各种成体干细胞群体的干性中发挥不可替代的作用。SOX2 的表达水平同时影响正常细胞和恶性细胞的分化方向,其不仅会影响正常哺乳动物发育过程中细胞分化,也影响恶性肿瘤中的细胞分化。SOX2 表达失调与多种癌症类型相关,是导致肿瘤发病的重要因素。许多临床试验数据表明, SOX2 基因位点的扩增和 SOX2 表达的增加会加速恶性肿瘤的发展,导致细胞恶性增殖、转移以及上皮间质转化^[19]。研究表明,在细胞周期的 G₁ 阶段增加 SOX2 水平,会诱导胚胎干细胞向神经元细胞分化^[20]。基因检测结果也提示:在恶性肿瘤中存在外泌体相关的 SOX2 DNA,并且鉴定出序列中的某些单核苷酸的多态性以及核苷酸变异,与肿瘤干细胞的转归密切相关^[21]。荟萃分析结果显示: SOX2-OT 表达升高预示恶性肿瘤晚期的肿瘤阶段进展更快,淋巴结转移,远处转移更早出现,肿瘤体积更大,肿瘤浸润层次更深,且患者无进展生存期、总生存期缩短^[22]。在胃癌中,过表达 OCT4 和 SOX2 引起钙离子依赖的细胞黏附素家族(引起肿瘤转移的编码基因)的表达显著升高,从而增强肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭能力^[23]。此外, SOX2 可通过 Wnt/ β -catenin 信号通路诱导肝癌细胞系恶性增殖,而抑制其表达后肝癌细胞的活性明显降低,生长受限,并出现细胞凋亡^[24]。

NANOG 是一种内细胞团、原始生殖细胞及胚胎干细胞表达的新转录因子,属于 ANTP 类, NK 家族基因,定位于人 12 号染色体 12p13-31,其 cDNA 由 2 184 个核苷酸组成,包含一个开放阅读框,编码 305 个氨基酸。NANOG 在维持肿瘤干细胞干性中起着至关重要的作用。

实验研究表明: RACK1(一种与肝癌生长有关的衔接蛋白)与 NANOG 相互作用,可促进人肝癌干细胞的自我更新复制和化学抗性^[25]。在肝癌中, NANOG 阳性表达与乙肝病毒表面抗原、肝癌分化程度和 TNM 分期相关。荟萃分析显示: NANOG 阳性表达患者 3 年和 5 年总生存率、无病生存率低^[26]。

目前关于干细胞的相关研究也是国内外生命科学探索最

前沿和热门的领域之一,在医学各分支领域的相关临床应用也在不断地进行尝试,将肿瘤干细胞定向分化为普通细胞,靶向清除肿瘤干细胞可能就是治愈肿瘤的关键。诱导分化疗法,主要是靶向作用肿瘤干细胞,诱导其分化为肿瘤细胞甚至分化为普通细胞,来抑制肿瘤干细胞的自我更新,降低其对化疗药物的抗性,从而达到根除肿瘤干细胞的目的^[27]。目前,在血液肿瘤的临床治疗中,诱导分化疗法已经得到了广泛应用。在实体瘤的治疗方面,诱导分化疗法也在深入研究之中。诱导分化剂是能够介导肿瘤干细胞分化的生物调节剂,将肿瘤干细胞部分或者全部转变为肿瘤细胞甚至正常细胞,从源头上控制和靶向治疗肿瘤干细胞。常见的诱导分化剂有二甲基亚砷、苯丁酸钠、耐醇酯等。在中药诱导细胞分化方面,研究证实人参皂苷、苦参碱、白花蛇舌草等对细胞有诱导分化作用^[28-30]。因此,作者推测敷和备化方治疗肝癌是通过影响肝癌干细胞表面标志物及相关转录因子的表达水平而达到治疗目的。

中医学认为肝癌的形成多是由于正气虚损,邪气郁结肝脏日久,化生癌毒,尤其以肝郁脾虚最为多见。特别是中晚期肝癌患者,由于病情的发展、营养摄入不足、正气过度消耗,或化疗后脾胃受损而化源不足,或放疗后阴津被火毒所炼,日久极易耗气伤血,加重肝郁脾虚的证候表现。肖志伟等^[31]认为肝癌的实质性病机要素主要是瘀毒、痰毒、湿毒;虚则在肝癌中则表现十分明显,以脾虚和血虚最为多见。因此,肝癌的病机多以正气亏虚、脏腑气血阴阳功能失调、肝郁脾虚为主。肝郁脾虚既是肝癌发生发展的重要病机,也是肝癌不断进展的重要病因,肝郁脾虚的病机变化贯穿了整个肝癌发病发展的始终,肝气郁结,气、血、痰、湿等无法正常疏泄,蕴结日久,化生癌毒。目前,早期肝癌治疗的主要方法仍然是肝部分切除和肝移植,同时传统放疗和化疗对晚期患者的治疗效果并不明显,而中医药在肝癌的防治中亦发挥着重要的作用。敷和备化方中以香附、当归、白芍入肝经,疏肝理气,养血活血,柔肝止痛,共助柴胡而为臣药;白术、茯苓、枳实入脾经,益气健脾,祛湿化痰,消积除滞,共助人参而为臣药;生姜、半夏禀秋金收降之性,共入脾胃可调中焦气机升降且生姜可制约半夏之毒,两者常相须而用;三七、茵陈蒿、白花蛇舌草、莪术、鳖甲共奏清热解毒,化瘀散结之功,是为佐药。牛膝善引气血下注,引药下行;甘草其味至甘,得土气最全,与白芍同用又称“戊己汤”,入脾胃且调和诸药,共为使药,全方以健脾调肝,利湿化瘀为用。

此次实验探讨敷和备化方含药血清对 CD133⁺HepG2 肝癌干细胞的调控作用及其作用机制。研究发现,敷和备化方含药血清能有效降低肝癌干细胞表面标志物 CD133 的表达水平,降低肝癌干细胞恶性程度;同时敷和备化方可能通过降低干细胞转录因子 SOX2、NANOG 和 OCT4 的表达水平,肯定了敷和备化方对肝癌的有效防治作用。课题组将展开下一步研究,进一步阐明敷和备化方对肝癌干细胞增殖分化的分子机制,明确敷和备化方防治肝癌的具体有效成分,从而为

敷和备化方治疗肝癌提供更多思路,也为中医药诱导肝癌干细胞分化进而治疗原发性肝癌提供理论及实验依据。

作者贡献: 实验设计为莫春梅,实验实施为覃艳春、付彬,实验评估为荣震、蒋锐沅,资料收集为洪晓华。

经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金(81760850)”“广西高校中青年教师基础能力提升项目(2018KY0282)”“广西医疗卫生适宜技术开发与推广应用项目(S2018046)”及“广西中医药大学第一附属医院院内制剂研究与开发(2018ZJ004)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经广西中医药大学动物实验伦理委员会批准,批准号为2019010。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经通过广西中医药大学生物统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

[1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424.

[2] 王宁,刘硕,杨雷,等.2018 全球癌症统计报告解读[J]. *肿瘤综合治疗电子杂志*,2019,5(1):87-97.

[3] MALATO Y, NAQVI S, SCHÜRMANN N, et al. Fate tracing of mature hepatocytes in mouse liver homeostasis and regeneration. *J Clin Invest.* 2011;121(12):4850-4860.

[4] YOVCHEV MI, GROZDANOV PN, JOSEPH B, et al. Novel hepatic progenitor cell surface markers in the adult rat liver. *Hepatology.* 2007;45(1):139-149.

[5] GOURNAY J, AUVIGNE I, PICHARD V, et al. In vivo cell lineage analysis during chemical hepatocarcinogenesis in rats using retroviral-mediated gene transfer: evidence for dedifferentiation of mature hepatocytes. *Lab Invest.* 2002;82(6):781-788.

[6] HO JW, PANG RW, LAU C, et al. Significance of circulating endothelial progenitor cells in hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2006;44(4):836-843.

[7] 莫春梅,荣震,胡振斌,等.敷和备化方治疗原发性肝癌介入术后综合征40例[J]. *南京中医药大学学报*,2013,29(1):16-18.

[8] 郭子健,荣震,莫春梅,等.敷和备化方治疗原发性肝癌介入术后综合征临床研究[J]. *实用中医药杂志*,2018,34(5):520-521.

[9] 陈小云.敷和备化方对原发性肝癌化疗栓塞术后T淋巴细胞亚群及NK细胞的影响[D].南宁:广西中医药大学,2016.

[10] 陈亚栋.敷和备化方联合TACE治疗肝郁脾虚型原发性肝癌的临床观察[D].南宁:广西中医药大学,2019.

[11] 莫春梅,荣震,余娜,等.敷和备化方防治原发性肝癌介入术后肝纤维化40例临床观察[J]. *湖南中医杂志*,2015,31(2):5-7,25.

[12] 胡礼仪,侯永彬,余莉华,等.白芍总苷对肝癌耐药细胞BEL-7402/ADM耐药性的逆转作用及机制探讨[J]. *山东医药*,2017,57(10):1-4.

[13] 国锦,高燕,赵渤海.中药复方血清药理学研究方法进展[J]. *中华中医药杂志*,2017,32(4):1656-1658.

[14] MACKILLOP WJ, CIAMPI A, TILL JE, et al. A stem cell model of human tumor growth: implications for tumor cell clonogenic assays. *J Natl Cancer Inst.* 1983;70(1):9-16.

[15] MA S, CHAN KW, HU L, et al. Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology.* 2007;132(7):2542-2556.

[16] 章健,来维洁,周秀梅,等.靶向肝癌干细胞的肿瘤治疗进展[J]. *中国细胞生物学学报*,2017,39(1):87-96.

[17] WANG P, CONG M, LIU TH, et al. Primary isolated hepatic oval cells maintain progenitor cell phenotypes after two-year prolonged cultivation. *J Hepatol.* 2010;53(5):863-871.

[18] 朱新锋.全反式维甲酸诱导分化肝癌干细胞作用研究[D].昆明:昆明医科大学,2016.

[19] NOVAK D, HÜSER L, ELTON JJ, et al. SOX2 in development and cancer biology. *Semin Cancer Biol.* 2019;11:30185-30188.

[20] STREBINGER D. SOX2 和 OCT4 浓度的波动或会影响胚胎干细胞的分化命运[J]. *生物医学工程与临床*,2019,23(6):705.

[21] VAIDYA M, SUGAYA K. Differential sequences and single nucleotide polymorphism of exosomal SOX2 DNA in cancer. *PLoS One.* 2020;15(2):e0229309.

[22] LI Y, DU M, WANG S, et al. Clinicopathological Implication of Long Non-Coding RNAs SOX2 Overlapping Transcript and Its Potential Target Gene Network in Various Cancers. *Front Genet.* 2020;10:1375.

[23] CHEN B, ZHU Z, LI L, et al. Effect of overexpression of Oct4 and Sox2 genes on the biological and oncological characteristics of gastric cancer cells. *Onco Targets Ther.* 2019;12:4667-4682.

[24] 叶伟康,张演,方冠,等.mir-638 和 Sox2 在原发性肝癌中的表达及临床意义[J]. *肝胆胰外科杂志*,2017,29(6):477-481.

[25] CAO J, ZHAO M, LIU J, et al. RACK1 Promotes Self-Renewal and Chemoresistance of Cancer Stem Cells in Human Hepatocellular Carcinoma through Stabilizing Nanog. *Theranostics.* 2019;9(3):811-828.

[26] LIANG C, ZHANG K, GE H, et al. Prognostic and clinicopathological value of Nanog in hepatocellular carcinoma: A meta-analysis. *Clin Chim Acta.* 2018;477:24-31.

[27] TANAKA M, MIYAJIMA A. Oncostatin M, a multifunctional cytokine. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2003;149:39-52.

[28] 曾小莉,涂植光.人参皂甙Rh2 对人肝癌细胞SMMC-7721 的诱导分化作用[J]. *癌症*,2004,23(8):879-884.

[29] 任志俭.苦参碱通过mTOR 信号通路诱导人肝癌HepG2 细胞发生自噬现象[D].兰州:兰州大学,2011.

[30] 吴洪斌.白花蛇舌草含药血清对SMMC-7721 人肝癌细胞的生长和分化的影响及机制研究[D].武汉:湖北中医学院,2008.

[31] 肖志伟,陈汉锐,林丽珠.林丽珠论肝癌的分阶段治疗策略[J]. *中华中医药杂志*,2019,34(6):2526-2528.

(责任编辑: MZH, ZN, JY)