

文章编号:1001-6880(2014)9-1664-05

加味苇茎汤及其成分芹菜素对肺腺癌 A549 细胞增殖、周期与凋亡的影响

辛丽丽,姜淼,许冬青,张旭,陈惠,龚婕宁*

南京中医药大学,南京 210046

摘要:探讨加味苇茎汤含药血清及成分芹菜素对肺腺癌 A549 细胞增殖、细胞周期及凋亡的影响,选用肺癌 A549 细胞体外培养,在不同浓度含药血清及芹菜素作用下,用 MTT 法检测细胞生长抑制率、流式细胞术检测细胞周期及凋亡率、hoechst33342 染色检测细胞凋亡形态。结果显示,加味苇茎汤含药血清及芹菜素对 A549 的生长抑制率:24 h 分别为 31%、34%,48 h 分别为 45%、53%;流式细胞术检测细胞周期发现 A549 细胞经加味苇茎汤含药血清处理后主要阻滞在 G2 期,而芹菜素能明显引起细胞凋亡。荧光显微镜下观察到较典型的细胞凋亡形态甚至细胞脱落,视野内细胞核数明显减少。该研究结果显示,加味苇茎汤含药血清及芹菜素能明显抑制 A549 细胞的增殖,引起细胞周期阻滞、诱导其凋亡。

关键词:加味苇茎汤;含药血清;芹菜素;A549;周期阻滞;细胞凋亡

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

Inhibitory Effect of Self-made Jiawei Weijing Decoction and Apigenin on Proliferation, Cell-cycle and Apoptosis of Lung Adenocarcinoma A549 Cell

XIN Li-li,JIANG Miao,XU Dong-qing,ZHANG Xu,CHEN Hui,GONG Jie-ning*

Nanjing University of Chinese Medicine Basic Medical College, Department of Febrile Disease, Nanjing 210046, China

Abstract: The objectives of this study were to investigate the inhibitory effect of self-made Jiawei Weijing Decoction and apigenin on the proliferation, cell cycle and apoptosis of lung adenocarcinoma A549 cell line and to explore its mechanism in the treatment of lung cancer. The experimental study used an inverted microscope observation of cell morphology. MTT assay was performed to reveal the inhibitory effect on cell proliferation and flow cytometry was used to determine the apoptosis and cell cycle of lung adenocarcinoma A549 cell line after the treatment of self-made Jiawei Weijing Decoction and apigenin. Morphological changes of the apoptosis of cancer cells were observed by hoechst 33342 staining. The results showed that compared with controls, the inhibition rates of self-made Jiawei Weijing decoction and apigenin on lung adenocarcinoma A549 cells were: in 24 hours group, 31% and 34%, respectively; in 48 hours group, 45% and 53%, respectively. Self-made Jiawei Weijing decoction increased the rate of G2 of A549 cell cycle obviously and apigenin significantly induced the apoptosis of A549 cell. Hence, it was concluded that Self-made Jiawei Weijing decoction and apigenin inhibited the growth of human lung adenocarcinoma A549 cells and cause cell cycle arrest and induce apoptosis.

Key words: self-made Jiawei Weijing decoction; serum pharmacology; apigenin; A549; cell cycle arrest; apoptosis

原发性支气管肺癌为最常见的恶性肿瘤,具有高发病率、高致死率的特点。非小细胞肺癌约占肺癌总数的 80%,其中约 1/2 为肺腺癌。肺腺癌易侵袭、易转移、易耐药,严重威胁着患者的健康。中医药通过多途径、多环节和多靶点治疗方式在肺癌综

合治疗模式中的作用引起越来越广泛的关注,抗癌中药复方的开发及中药有效抗癌成分的提取已成为中医药治疗肺癌的重要途径。加味苇茎汤是南京中医药大学附属医院多年临床治疗肺癌的验方,尤其在肺癌早期,以清热活血为原则,合理应用该方可以有效改善患者的临床症状,提高生存质量^[1]。本研究选择加味苇茎汤及相关成分芹菜素为研究药物,观察其对肺腺癌 A549 细胞增殖、细胞周期及凋亡的影响,从而探讨该方药治疗肺癌的主要作用机制。

收稿日期:2013-08-05 接受日期:2013-11-21

基金项目:江苏高校中西医结合优势学科建设工程资助项目(zxy2
01100)

* 通讯作者 Tel:86-013901580022;E-mail:13901580022@163.com

1 材料与仪器

1.1 动物与细胞株

健康新西兰兔 10 只, 雌雄不限, 体重 2.5~3.0 kg, 由南京中医药大学实验动物中心提供, 合格证号 SCXK(苏)2007-0008; 肺癌细胞 A549, 购自中国科学院上海研究院。

1.2 药物

加味苇茎汤: 芦根、冬瓜子、苡仁、桃仁、虎杖、半枝莲, 各药量比例为: 10:8:10:3:10:10, 药材购自南京中医药大学国医堂门诊部, 经中药专家鉴定属正品。常规煎煮浓缩为 100% 中药合剂, 4 ℃ 冰箱保存备用。芹菜素(购自中检所)。

1.3 试剂与仪器

1640 培养液(Gibco, 1171219); 胎牛血清(Gibco, 10099-141); 胰蛋白酶(solarbio, T8150); MTT(solarbio, 705B059); 二甲亚砜(DMSO)(aladdin, B1328005); 多聚甲醛(永华, 040829); hoechst33342 染料(solarbio, B8040)。

光学显微镜(OLYMPUS, 8A12661); 自动酶标分析仪(ETL, 182473); 流式细胞仪(ETL, E2901); 荧光显微镜(OLYMPUS, 3H06225)。

2 实验方法

2.1 含药血清制备

健康新西兰兔随机分为含药血清组和对照血清组。含药血清组以人等效剂量的 8 倍量中药灌胃, 给药剂量为 57.12 g/kg · d, 每天分 2 次给药, 连续给药 3 d, 第 3 d 灌胃 1 次, 给足 1 天剂量。末次灌胃前禁食 12 h, 给药后 1 h 在家兔清醒状态下(局麻)从颈动脉采血, 常规分离血清, 56 ℃ 水浴 30 min 灭活补体, 用 0.22 μm 醋酸纤维素膜过滤除菌, -20 ℃ 保存备用。对照血清组以生理盐水灌胃, 同法采血制备血清。

2.2 细胞培养

肺腺癌细胞 A549 用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液, 置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 取对数生长期的细胞, 调整浓度为 1×10^5 个/mL, 分别用各种浓度的含药血清及芹菜素处理细胞, 未加药组(只加单培)为空白对照组。RPMI1640 培养液稀释含药血清, 含药血清浓度梯度为 10%、5%、2.5%、0% (空白血清组), 空白血清补齐, 使终末血清浓度均为 10%。芹菜素溶解于 DMSO 5%, 初浓

度为 10 mmol/L, 用 RPMI1640 培养液稀释成 50 μmol/L, 倍比稀释法稀释, 并保证每组 DMSO 浓度为 5%。

2.3 分组方法

加味苇茎汤含药血清分组设置: 10% 含药血清组、5% 含药血清组、2.5% 含药血清组、空白血清组、空白对照组(单培组)。

芹菜素实验分组设置: 50、25、12.5、6.25 μmol/L 芹菜素样品组、空白对照组(单培组)、DMSO 5% 组。

2.4 指标检测

2.4.1 细胞形态学变化

每孔 100 μL 单细胞悬液接种于 96 孔板上, 培养过夜, 于倒置显微镜下观察不同浓度含药血清及芹菜素作用后 24、48 h 时细胞形态变化。

2.4.2 细胞生长抑制率

每孔 100 μL 单细胞悬液接种于 96 孔板上, 细胞贴壁后分组给药, 每组 8 个复孔, 按上述培养方法分别培养 24、48 h。并于 24、48 h 提前 4 h 每孔加入 MTT 20 μL(10 mg/mL), 继续培养至 4 h 后弃培养液终止培养, 每孔加入 150 μL DMSO 溶解液, 低速振荡 15 min, 空白孔调零, 使用酶标仪在 490 nm 波长处检测 OD 值, 计算细胞生长抑制率。

$$\text{细胞生长抑制率} = (1 - \frac{\text{实验组 OD 值}}{\text{空白对照组 OD 值}}) \times 100\%$$

2.4.3 细胞周期

每孔 1500 μL 单细胞悬液接种于 6 孔培养板中, 细胞贴壁后分组给药, 每组 3 个复孔, 按上述培养方法分别培养 24、48 h。消化收集细胞, 调整浓度为 5×10^5 个, 加入 BindingBuffer 悬浮细胞 500 μL 后, 加入 PI 2 μL 混匀, 避光、室温反应 20 min, 流式细胞仪检测。

2.4.4 细胞凋亡

每孔 1500 μL 单细胞悬液接种于铺有处理过的盖玻片的 6 孔培养板中, 细胞贴壁后分组给药, 每组 3 个复孔, 按上述培养方法分别培养 24、48 h。PBS 洗涤细胞, 多聚甲醛 4 ℃ 固定 20 min, hoechst33342 37 ℃ 染色 10 min, PBS 洗片后, 荧光显微镜下观察和拍摄细胞凋亡状况。

2.5 统计学方法

实验数据以统计学软件 SPSS15.0 计算, 所有实验数据均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 各组数据均进行正态检验及 F 方差齐性检验。方差齐用单因

素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

3 实验结果

3.1 加味苇茎汤及芹菜素对 A549 细胞形态的影响

结果显示,空白对照组、空白血清组、DMSO 5% 组的细胞贴壁生长,几乎无脱落,胞浆饱满,舒展生长,贴壁牢固,相邻细胞生长融合成片;含药血清组及芹菜素组 24、48 h 后出现不同程度细胞间连接不牢固,细胞逐渐脱落。脱落细胞悬浮于培养液中,细胞形态变圆,胞膜完整,颗粒感、体积缩小,核固缩出现,核颜色加深,折光性增强。以 50 $\mu\text{mol/L}$ 的芹菜素组作用 48 h 最为明显。

3.2 加味苇茎汤及芹菜素对 A549 细胞生长抑制率的影响

结果显示,10%、5%、2.5% 含药血清作用于肺

表 1 加味苇茎汤含药血清对 A549 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10, \%$)

Table 1 Effect of Jiawei Weijing decoction (in blood serum) on the proliferation of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 10, \%$)

组别 Group	24 h OD 值 24 h OD value	生长抑制率 Inhibition rate	48 h OD 值 48 h OD value	生长抑制率 Inhibition rate
10% 含药血清 10% Jiawei Weijing Decoction	0.6130 \pm 0.0155	31 * *	0.4731 \pm 0.0061	45 * *
5% 含药血清 5% Jiawei Weijing Decoction	0.7728 \pm 0.0128	13 * *	0.6563 \pm 0.0083	24 * *
2.5% 含药血清 2.5% Jiawei Weijing Decoction	0.7924 \pm 0.0182	10 * *	0.7997 \pm 0.0113	8 * *
空白血清 Blank serum	0.8556 \pm 0.0159	3	0.9354 \pm 0.0206	-7
空白对照 Blank control	0.8864 \pm 0.0115	0	0.8687 \pm 0.0132	0

注:与空白对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared to blank control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 2 芹菜素对 A549 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10, \%$)

Table 2 Effect of apigenin on the proliferation of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 10, \%$)

组别 Group	24 h OD 值 24 h OD value	生长抑制率 Inhibition rate	48 h OD 值 48 h OD value	生长抑制率 Inhibition rate
50 $\mu\text{mol/L}$	0.6868 \pm 0.0224	34 * *	0.4975 \pm 0.0320	53 * *
25 $\mu\text{mol/L}$	0.7423 \pm 0.0154	29 * *	0.5928 \pm 0.0119	44 * *
12.5 $\mu\text{mol/L}$	0.7506 \pm 0.0594	28 * *	0.7418 \pm 0.0143	30 * *
6.25 $\mu\text{mol/L}$	0.8623 \pm 0.0256	17 * *	0.9735 \pm 0.0329	9 * *
5% DMSO	0.9646 \pm 0.0354	7	0.9886 \pm 0.0243	7
空白对照 Blank control	1.0391 \pm 0.0387	0	1.0685 \pm 0.0695	0

注:与空白对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared to blank control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3.3 加味苇茎汤及芹菜素对 A549 细胞周期及凋亡率的影响

空白对照组 DNA 组方图为典型肿瘤细胞的 G0/1 峰型。不同浓度含药血清作用于肺癌 A549 细胞后, G1 期细胞减少, G2 期细胞明显增多,且时间越长、浓度越高,G2 期阻滞越明显,并见细胞有凋亡。10% 含药血清作用细胞 48 h 后,G2 期细胞比

癌 A549 细胞 24 h 后,抑制率分别为 31%、13%、10%;作用 48 h 后,抑制率分别为 45%、24%、8%,与空白对照组比较,差异均有非常显著性意义 ($P < 0.01$)。空白血清对该细胞生长无抑制作用。见表 1。

芹菜素 50、25、12.5、6.25 $\mu\text{mol/L}$ 作用于肺癌 A549 细胞 24 h 后,抑制率分别为 34%、29%、28%、17%;作用 48 h 后,抑制率分别为 53%、44%、30%、9%,与空白对照组比较,差异均有非常显著性意义 ($P < 0.01$)。5% DMSO 对细胞有一定的毒害作用,但芹菜素组与 DMSO 组比较,差异仍具有显著性意义 ($P < 0.01$),见表 2。

结果显示:加味苇茎汤含药血清及芹菜素对肺癌细胞 A549 具有抑制作用,且呈一定的量效、时效关系。且作用相同时间后,芹菜素对细胞的抑制作用明显高于含药血清组。

细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10, \%$)

Table 1 Effect of Jiawei Weijing decoction (in blood serum) on the proliferation of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 10, \%$)

例由空白对照组的 (6.50 \pm 0.30) 增高至 (34.80 \pm 0.74) %,是空白对照组的 5.3 倍。空白血清组对细胞周期及凋亡无明显影响,见表 3 ($P < 0.01$)。

不同浓度芹菜素作用于细胞后,G1 期细胞减少,G2 期细胞比例增加,但无剂量依赖性;48 h 细胞周期无明显规律性改变,但凋亡率明显增高,可见凋亡细胞形成的亚 G1 峰,凋亡率随着质量浓度增加

而逐渐升高,并呈一定的时效关系,50 $\mu\text{mol/L}$ 作用48 h 后,凋亡率达 20.74%。溶剂组(5‰DMSO)对细胞周期及凋亡无明显影响,见表 4($P < 0.01$)。

结果显示:加味苇茎汤含药血清主要通过将

A549 细胞阻滞于 G2 期、阻止细胞进行有丝分裂来发挥抗肿瘤作用;而芹菜素主要通过诱导 A549 细胞凋亡发挥抗肿瘤作用,其诱导细胞凋亡的作用明显强于含药血清组。

表 3 加味苇茎汤含药血清对 A549 细胞周期及凋亡率的影响($\bar{x} \pm s, n = 3, \%$)

Table 3 Effect of Jiawei Weijing decoction (in blood serum) on the cell cycle and apoptotic rate of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3, \%$)

组别 Group	24 h			48 h		
	G1	G2	凋亡率 Apoptotic rate	G1	G2	凋亡率 Apoptotic rate
10% 含药血清 10% Jiawei Weijing Decoction	56.55 \pm 0.91 **	12.74 \pm 0.57 **	1.01 \pm 0.01	40.55 \pm 0.12	34.80 \pm 0.74 **	2.01 \pm 0.12 **
5% 含药血清 5% Jiawei Weijing Decoction	54.71 \pm 0.66 **	11.41 \pm 0.32 **	0.87 \pm 0.07	67.01 \pm 0.22	13.95 \pm 0.40 **	0.97 \pm 0.08
2.5% 含药血清 2.5% Jiawei Weijing decoction	71.16 \pm 1.16	6.48 \pm 0.40 **	0.67 \pm 0.08	69.81 \pm 0.18	7.69 \pm 0.19 **	0.71 \pm 0.04
空白血清 Blank serum	79.63 \pm 0.65	5.35 \pm 0.30	0.63 \pm 0.07	77.54 \pm 0.46	5.77 \pm 0.03	0.38 \pm 0.12
空白对照 Blank control	76.49 \pm 0.56	5.40 \pm 0.02	0.34 \pm 0.04	77.37 \pm 0.38	6.50 \pm 0.30	0.74 \pm 0.03

注:与空白对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared to blank control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 4 芹菜素对 A549 细胞周期及凋亡率的影响($\bar{x} \pm s, n = 3, \%$)

Table 4 Effect of apigenin on the cell cycle and apoptotic rate of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3, \%$)

组别 Group	24 h			48 h		
	G1	G2	凋亡率 Apoptotic rate	G1	G2	凋亡率 Apoptotic rate
50 $\mu\text{mol/L}$	51.42 \pm 0.58 **	16.28 \pm 0.48	11.18 \pm 0.32 **	63.15 \pm 0.39	9.34 \pm 0.05	20.70 \pm 0.68 **
25 $\mu\text{mol/L}$	54.34 \pm 0.58 **	11.94 \pm 0.08	4.46 \pm 0.20 **	64.66 \pm 0.34	9.61 \pm 0.06	12.79 \pm 0.21 **
12.5 $\mu\text{mol/L}$	57.14 \pm 0.16 **	12.64 \pm 0.14	3.67 \pm 0.11 **	56.76 \pm 2.70	9.76 \pm 0.09	6.20 \pm 0.19 **
6.25 $\mu\text{mol/L}$	52.70 \pm 0.13 **	11.33 \pm 0.32	3.30 \pm 0.09 **	54.65 \pm 0.28	11.45 \pm 0.51	5.12 \pm 0.20 **
5‰DMSO	71.10 \pm 0.12	6.30 \pm 0.53	0.74 \pm 0.06	71.62 \pm 1.07	6.08 \pm 0.24	0.82 \pm 0.06
空白对照 Blank Control	70.55 \pm 0.10	6.52 \pm 0.49	0.63 \pm 0.04	70.43 \pm 0.45	7.92 \pm 0.03	0.71 \pm 0.02

注:与空白对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared to blank control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3.4 加味苇茎汤及芹菜素对 A549 细胞凋亡的影响

荧光显微镜下结果显示,不同浓度含药血清及芹菜素处理细胞,细胞核在 24、48 h 时间段中均有破裂,呈大小不等、形态不规则的碎片或呈梅花状,呈较典型的细胞凋亡形态。其中以芹菜素 50 $\mu\text{mol/L}$ 、含药血清 10% 48 h 的凋亡细胞最多,且细胞脱落,视野内细胞核数明显减少。单培组、空白血清组细胞核完整且均匀分布,细胞平展,边缘平滑,未见有凋亡形态的细胞核。DMSO5‰组有偶见有少量凋亡细胞存在。

4 讨论

临床实践证明,肺癌初期,正气尚未受损,体内

一派邪热炽盛之象,热灼津液,炼液为痰;热邪耗伤脉内阴血,血行涩滞,加之邪热伤络动血,导致瘀热互结,从而出现咳嗽、咳痰、痰中带血、发热、胸胁刺痛、舌质深绛等证候。此时中医治疗以攻为主,治以清热解毒、活血通络、化痰散结^[2]。清热活血化痰法不仅可单独用于肺癌实证初期,还可在顾护正气的基础上辨证使用,既能改善临床症状,又具有放化疗增效和减毒作用^[3]。因此,清热活血是临床治疗早期肺癌的主要方法,临证常以此为原则组方用药^[4]。加味苇茎汤是以《备急千金要方》之苇茎汤加虎杖、半枝莲而成,具有清肺化痰、逐瘀排脓的功效,芹菜素是其主要成分之一。

在肺癌发病机制中,痰瘀既是脏腑功能失调、邪毒蕴肺的病理产物,又是致使正气内虚、邪毒与之胶

结成块的致病因素,苇茎汤清肺化痰、逐瘀排脓,具攻邪之力^[5]。虎杖利胆退黄,清热解毒,活血化瘀,祛痰止咳;半枝莲清热解毒,化瘀利尿,两味药均是诸多医家临床治疗肺癌的常用药。本研究在苇茎汤基础上伍以虎杖、半枝莲,助苇茎汤清肺热、逐肺淤,加强其抗肺癌作用。且现代药理研究证实,该组方不仅可多种机制发挥抗肿瘤作用,而且富含芹菜素,加强了苇茎汤加味在本研究中的配伍意义。

芹菜素可通过抗氧化、调控肿瘤相关基因、影响肿瘤细胞信号传导、诱导肿瘤细胞周期阻滞、诱导细胞凋亡^[6]、抑制肿瘤血管形成及抑制肿瘤侵袭和转移相关蛋白酶的活性^[7],以及放化疗增敏、化学预防等多种途径发挥抗肿瘤作用,与其它黄酮类物质(槲皮素、山奈黄酮)相比,芹菜素具有低毒、无诱变性等特点。

增殖能力增强、周期调节失控、凋亡异常是肿瘤细胞的重要生物学特点。本实验首先采用MTT法计算生长抑制率检测肿瘤细胞分别经不同浓度加味苇茎汤含药血清及芹菜素处理后的增殖情况;为探究两种药物是否通过诱导凋亡抑制A549细胞增殖,进行了hoechst33342荧光染色实验;在此基础上,为明确两种药物作用细胞后的凋亡率,及探究是否会通过周期阻滞抑制A549细胞增殖,进行了流式细胞仪PI染色法。实验结果显示:加味苇茎汤含药血清组及芹菜素组均能抑制A549细胞增殖,并呈现一定的量效、时效关系;两组药均能诱导肺癌A549细胞的凋亡,提示加味苇茎汤含药血清、芹菜素抑制肺癌A549细胞的增殖都能通过诱导细胞凋亡这个途径发挥作用;两组药对A549细胞周期均产生了影响,与空白对照组比较,周期分布有了明显变化($P < 0.05$)。但两组药对A549细胞作用后,各指标数据差距明显:作用相同时间后,芹菜素50 μmol/L组(最高浓度)对细胞的抑制作用明显高于10%含药血清组(最高浓度)($P < 0.01$),说明在本实验浓度梯度设置范围内,芹菜素对A549细胞的增殖抑制作用优于加味苇茎汤含药血清;荧光显微镜下,芹菜素作用A549细胞后,脱落细胞数、凋亡小体明显多于含药血清组,且根据流式检测细胞凋亡率,芹菜素组诱导细胞凋亡作用明显优于含药血清组($P < 0.01$),进一步证明了芹菜素使肺癌A549细胞凋亡明显增加,与增殖抑制实验数据相符,提示芹菜素主要是通过诱导凋亡方式抑制A549细胞的

生长;周期阻滞方面,加味苇茎汤含药血清主要通过将A549细胞阻滞于G2期,阻止细胞进行有丝分裂来发挥抗肿瘤作用;芹菜素对细胞也有G2期阻滞作用,但未呈现量效时效关系。

综上所述,加味苇茎汤含药血清及芹菜素引起的肿瘤生物学变化包括生长抑制、细胞周期阻滞及细胞凋亡,且不同生物学变化与药物浓度与作用时间关系密切,加味苇茎汤含药血清主要是通过将A549细胞阻滞于G2期抑制肿瘤细胞增殖,而芹菜素主要指通过诱导细胞凋亡发挥抗肿瘤作用,其具体抗癌机制还有待进一步实验研究。中药单体的研究在明确其生化作用的基础上,丰富中药复方的现代药理研究,促进具有“稳中求胜”特性的中医药国际化。中药复方作为中医药临床最传统最主流的方法,对其研究更有临床指导意义。

参考文献

- Gu KB(顾恪波), Wang X(王逊), He LL(何立丽), et al. Brief analysis on Prof. SUN Gui-zhi's common formulas for lung cancer. *World J Int Tradit Western Med*(世界中西医结合杂志), 2013, 02: 187-189.
- Huang ZQ(黄志庆), Tian HQ(田华琴), Huang XQ(黄小青). On the principles of traditional Chinese medicine for the treatment of lung cancer. *J Chin Med*(中医学报), 2012, 06: 663-664.
- Li LN(李柳宁), Liu WS(刘伟胜). Modified Qianjin Weijing decoction on lung cancer radio therapy of perioperative clinical application. *Liaoning J Tradit Chin Med*(辽宁中医杂志), 2006, 12: 1599.
- Tang YY(唐引弓), Xu LR(徐立然). Analysis on syndrome types and formula application in primary bronchogenic carcinoma of lung in Chinese medicine. *J Chin Med*(中医学报), 2012, 3: 278-280.
- Li C(李超), Zhao JG(赵建国). Weijing decoction on the treatment of 1 case of lung cancer. *Shanxi J Tradit Chin Med*(山西中医), 2012, 28(5): 4.
- Zheng ZW(郑作文), Lun YY(伦玉宁), Zhao LL(赵丽丽). Effect of apigenin from *Mallotus apelta* on proliferation and apoptosis in nude mice bearing human gastric carcinoma. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2012, 13: 214-216.
- Lu HF, Chie YJ, Yang MS. Apigenin induces apoptosis in human lung cancer H460 cells through caspase- and mitochondria-dependent pathways. *Hum Exp Toxicol*, 2011, 30: 1053-1061.