

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.17.019

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200629.1041.016.html\(2020-06-29\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200629.1041.016.html(2020-06-29))

人副流感病毒 2 型感染恒河猴肾细胞后内参基因的筛选*

袁明铭,周静,夏介英,董涵,洪杨,张磊[△]

(四川省中医药科学院,成都 610041)

[摘要] **目的** 评价阳性药物利巴韦林治疗人副流感 2 型病毒(HPIV-2)感染恒河猴肾细胞(LLC-MK2)后甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、次黄嘌呤磷酸核糖转移酶 1(Hprt1)、 β -肌动蛋白(β -actin)、肽基脯氨酰异构酶 A(Ppia)、 β 2 微球蛋白(B2M)5 种内参基因的表达稳定性。**方法** HPIV-2 感染 LLC-MK2 48 h 和 72 h,采用 real-time PCR 法测定病毒组、利巴韦林治疗组和正常细胞对照组中上述 5 种内参基因的表达水平,利用 geNorm 程序对它们的稳定性进行评价。**结果** 5 种内参基因均能稳定表达,其中 GAPDH 和 Hprt1 在感染后 48 h 稳定度相同,且最稳定;Ppia 和 Hprt1 在感染后 72 h 稳定度相同,且最稳定。**结论** Hprt1、GAPDH 和 Ppia 是抗 HPIV-2 药物体外筛选和研究 HPIV-2 与 LLC-MK2 相互作用最理想的内参基因。

[关键词] 副流感病毒 2 型,人;内参基因;稳定表达;实时聚合酶链反应;恒河猴肾细胞

[中图分类号] R186

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2020)17-2861-06

Screening of internal reference genes after rhesus monkey kidney cells are infected with human parainfluenza virus 2*

YUAN Mingming, ZHOU Jing, XIA Jieying, DONG Han, HONG Yang, ZHANG Lei[△]

(Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu, Sichuan 610041, China)

[Abstract] **Objective** The purpose of this study is to analysis the expression stability of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), Hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1 (Hprt1), β -actin, peptidyl-prolyl isomerase A (Ppia), β 2 microglobulin (B2M) genes in Rhesus kidney cells (LLC-MK2) infected by Human parainfluenza virus 2 (HPIV-2) and treated by ribavirin. **Methods** LLC-MK2 were infected with HPIV-2 for 48 and 72 hours, then the expression levels of the above five internal reference genes in LLC-MK2 cells of the viral group, the ribavirin treatment group and the normal cell control group were determined by real-time PCR method, geNorm program was used to evaluate their stability. **Results** Five kinds of internal reference genes could be stably expressed after infection. Among them, GAPDH and Hprt1 had the same stability at 48 h after infection and were the most stable; Ppia and Hprt1 had the same stability at 72 h after infection and were the most stable. **Conclusion** Hprt1, GAPDH and Ppia are the most ideal reference genes for the screening of anti-HPIV-2 drugs and studying the interaction between HPIV-2 and LLC-MK2 in vitro.

[Key words] parainfluenza virus 2, human; reference gene; steady expression; real-time polymerase chain reaction; Rhesus kidney cells

人副流感病毒 2 型(HPIV-2)属于副粘病毒科,腮腺炎病毒属,能够引起人类,特别是婴幼儿细支气管炎、肺炎,是导致咳嗽等呼吸道症状的常见病原体。HPIV-2 含有单股非节段负链 RNA,大约含有 15 000 个核苷酸,其中 6 个开放式阅读框编码 7 种结构蛋白,排列顺序为 3'-非翻译区-NP-V/P-M-F-HN-L-非翻译区-5'^[1]。HPIV-2 体外感染恒河猴肾细胞(LLC-

MK2)一定时间内引起细胞融合,而非致死细胞^[2]。所以在体外抗病毒药物筛选时难以使用活细胞染色法对药效进行测定。因此找出宿主细胞稳定的内参基因而利用荧光定量 PCR 法来反映病毒水平非常必要;同时,也可以为研究 HPIV-2 与 LLC-MK2 相互作用提供参考。

本研究选择甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceralde-

* 基金项目:四川省公益性科研院所基本科研业务专项项目(2016ysky0086);四川省科技基础条件平台项目(2018TJPT0044)。作者简介:袁明铭(1987-),助理研究员,硕士,主要从事抗病毒药物筛选与评价工作。 [△] 通信作者, E-mail: 937696094@qq.com。

hyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、次黄嘌呤磷酸核糖转移酶 1 (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase 1, Hprt1)、 β -肌动蛋白(β -actin, β -actin)、肽基脯氨酰异构酶 A (peptidyl prolyl isomerase A, Ppia)、 β 2 微球蛋白(β 2-microglobulin, B2M)作为候选基因,观察它们在抗 HPIV-2 药物体外筛选时稳定性,为抗 HPIV-2 药物筛选和研究 HPIV-2 与 LLC-MK2 相互作用提供方法依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株和毒株

LLC-MK2 购于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库;HPIV-2 购于中国典型培养物保藏中心,使用前测定其组织半数感染量(TCID₅₀)为 10^{-4.5}。

1.2 主要试剂及仪器

RNAprep Pure 培养细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒(货号 DP430,批号 P5215)、SuperReal PreMix Plus (SYBR Green,货号 FP205-02,批号 R6620)、FastKing cDNA 第一链合成试剂盒(货号 KR116-02,批号 R6308)、2×Taq PCR 预混试剂 II (货号 KT211-02,批号 R4639)购自北京天根生化科技(北京)有限公司;DNA Size Marker(货号 C109200,批号 490430 V1)购自中国台湾光鼎生物科技有限公司;MEM 细胞培养液(货号 KGM41500N,批号 20181109)购自江苏凯基生物技术股份有限公司;小牛血清(货号 SH30401.01,批号 DXJ0440)、改良磷酸盐缓冲液(DPBS)(货号 SH30028.02,批号 AD15805028)购自美国 HyClone 公司;Tryple Select 1×非动物源性细胞解离酶(货号 12563-011,批号 2034512)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。普通 PCR 仪(型号 Veriti)、荧光定量 PCR 仪(型号 Stepone)购自美国 ABI 公司;全自动核酸分析系统(型号 Qsep 100)购自中国台湾光鼎生物科技股份有限公司;超微量分光光度计(型号 NanoDrop 2000)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.3 引物合成

GAPDH、Hprt1 和 B2M 的引物序列采用文献[3]所报道的序列, β -actin 和 Ppia 的引物序列采用文献[4]所报道的序列,HPIV-2 的引物序列采用文献[5]所报道的序列,所有引物均由成都擎科生物技术有限公司合成。引物序列列表 1。

1.4 HPIV-2 感染 LLC-MK2

生长状态良好的 LLC-MK2 用 Tryple Select 1×非动物源性细胞解离酶消化成单细胞悬液,细胞计数后,将细胞悬液分别接种于 6 孔板,使细胞数量达 8×10⁴/孔,在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养过夜后细胞铺满孔底,接种 HPIV-2 毒液,每孔 800 μ L,病毒感染细胞的感染复数(MOI)值为 0.22,在 37℃、5% CO₂

培养箱中孵育 1 h,吸弃接种液,加入含 2% 小牛血清的 MEM 作为细胞维持液,每孔 3 mL,作为病毒组;利巴韦林治疗组接种操作同病毒组,吸弃接种液后,加入含 20 μ g/mL 利巴韦林的细胞维持液,每孔 3 mL;正常细胞对照组在接种过程中用 DPBS 代替接种液,相同条件下孵育,吸弃孵育液后,加入含 2% 小牛血清的 MEM 作为细胞维持液,每孔 3 mL。每组设置 3 个复孔。

表 1 引物序列

| 基因 | 方向 | 引物序列(5'-3') | 产物大小(bp) |
|----------------|----|----------------------------|----------|
| GAPDH | 正向 | TGCACCACCAACTGCTTAGC | 87 |
| | 反向 | GGCATGGACTGTGGTCATGAG | |
| Hprt1 | 正向 | TGACACTGGCAAAACAATGCA | 94 |
| | 反向 | GGTCTTTTACCAGCAAGCT | |
| β -actin | 正向 | CCAGGTCATCACCATCGG | 131 |
| | 反向 | TGTCCACGTCGCACTTCA | |
| Ppia | 正向 | AGCACTGGGGAGAAAGGATT | 220 |
| | 反向 | AAAACCTGGGAACCGTTTGTG | |
| B2M | 正向 | TGCTGTCTCCATGTTTGATG-TATCT | 74 |
| | 反向 | TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT | |
| HPIV-2 | 正向 | GCAGCATTTCGAATCTTCAGG | 266 |
| | 反向 | TAGATCCCGCTTCCAACCTGC | |

1.5 cDNA 合成及实时荧光定量 PCR

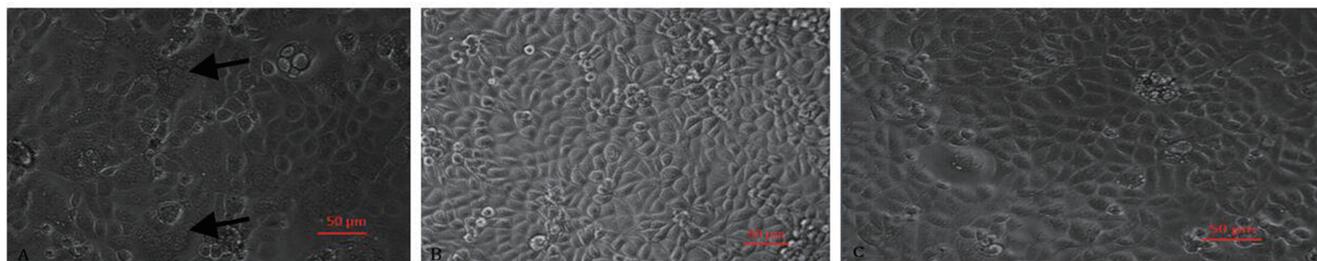
按照 RNA 提取试剂盒说明书提取各组细胞总 RNA,检测总 RNA 的浓度和纯度后,按照 Fasking cDNA 第一链合成试剂盒说明书合成 cDNA。以各标本的 cDNA 为模版,分别用上述引物进行实时荧光定量 PCR(qPCR)反应。qPCR 反应体系 20 μ L:Super-Real PreMix Plus (SYBR Green)10.0 μ L、上下游引物各 1.0 μ L (5 μ mol/L),cDNA 0.5 μ L,ddH₂O 7.5 μ L,设置无模板阴性对照。反应程序:95℃ 15 min;95℃ 10 s,60℃ 32 s,40 个循环。分别得到各标本的不同内参基因的 Ct 值。反应产物经熔解曲线分析检查特异性。

1.6 HPIV-2 感染 LLC-MK2 的检测

随机抽取感染后 48 h 病毒组 cDNA 为模板进行普通 RT-PCR,PCR 产物利用 Qsep 100 全自动核酸分析系统进行分析,以验证 HPIV-2 是否成功感染 LLC-MK2。

1.7 标准曲线的构建

将 1.4 中正常细胞对照组细胞的 cDNA 按 1:10 稀释 5 个梯度后,分别以它们为模板,进行 GAPDH、Hprt1、 β -actin、Ppia、B2M 内参基因的 qPCR,构建每



A: 病毒组; B: 正常细胞对照; C: 利巴韦林治疗组。

图 1 接种 HPIV-2 72 h 后病毒组、正常细胞对照组和利巴韦林治疗组 LLC-MK2 细胞形态学观察

个基因的扩增标准曲线, 观察每对引物的扩增效率。针对每对引物, 每个浓度的 cDNA 模板设置 3 孔重复, 同时设置 1 孔无模板阴性对照。

1.8 数据分析

使用 geNorm 程序检测内参基因的稳定性^[3]。设定不同标本中某一内参基因 Ct 值最小者的相对表达量为 1, 其他标本该内参基因的相对表达水平则为 $2^{-\Delta Ct}$ ($\Delta Ct = \text{各标本 Ct 值} - \text{最小 Ct 值}$), 通过这些数据 geNorm 程序计算内参基因平均表达稳定度 M, 对内参基因的表达稳定度进行排序 (M 值越小, 表达越稳定), 程序默认设定当 $M > 1.5$ 时, 该基因不适合作为内参。geNorm 程序还能通过看家基因标准化因子配对变异值 $[V_{n/(n+1)}]$ 来评估该实验条件下基因表达研究所需的最适内参基因数量, 程序以 0.15 为默认取舍值, 即当 $V_{n/(n+1)} < 0.15$ 时, 则最适内参基因的数量是 n 个; 而如果 $V_{n/(n+1)} > 0.15$, 则最适内参基因的数量是 n+1 个, 其中 n 表示内参基因的数量。

2 结果

2.1 HPIV-2 成功感染 LLC-MK2

HPIV-2 感染 LLC-MK2 48 h 开始出现细胞融合病变。72 h 后, 病毒组 LLC-MK2 病变程度达 70% (图 1A, 箭头所示为细胞融合病变), 利巴韦林治疗组病变不显著 (图 1C), 正常细胞形态图见图 1B。随机抽取感染后 48 h 病毒组 cDNA 为模板进行普通 RT-PCR, 产物经 Qsep 100 全自动核酸分析系统分析, 在 266 bp 处有目的条带 (图 2), 说明 HPIV-2 成功感染 LLC-MK2。

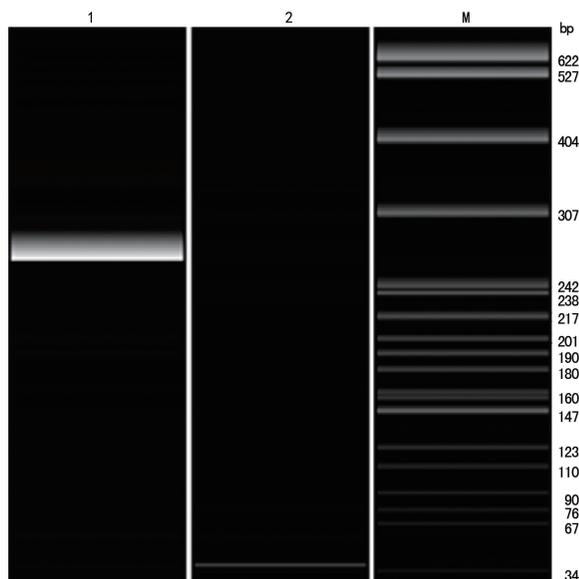
2.2 内参基因引物的特异性

通过 qPCR 对 GAPDH、Hprt1、 β -actin、Ppia、B2M 5 个内参基因进行熔解曲线分析, 如图 3 所示, 所有熔解曲线均出现单一信号峰, 表明均无引物二聚体和非特异性扩增, 说明各内参基因引物特异性较强, 结果可靠性高。

2.3 标准曲线的构建

以 Ct 值为纵坐标, 相对拷贝数为横坐标构建 GAPDH、Hprt1、 β -actin、Ppia、B2M 5 个基因的标准曲线, 结果各内参基因的扩增效率在 89.4%~

94.3%, 各内参基因的标准曲线决定系数 (R^2) 均大于 98%, 具有良好的线性关系, 满足 qPCR 条件, 见表 2。



1: HPIV-2 目的条带; 2: 阴性对照; M: DNA 分子标记物。

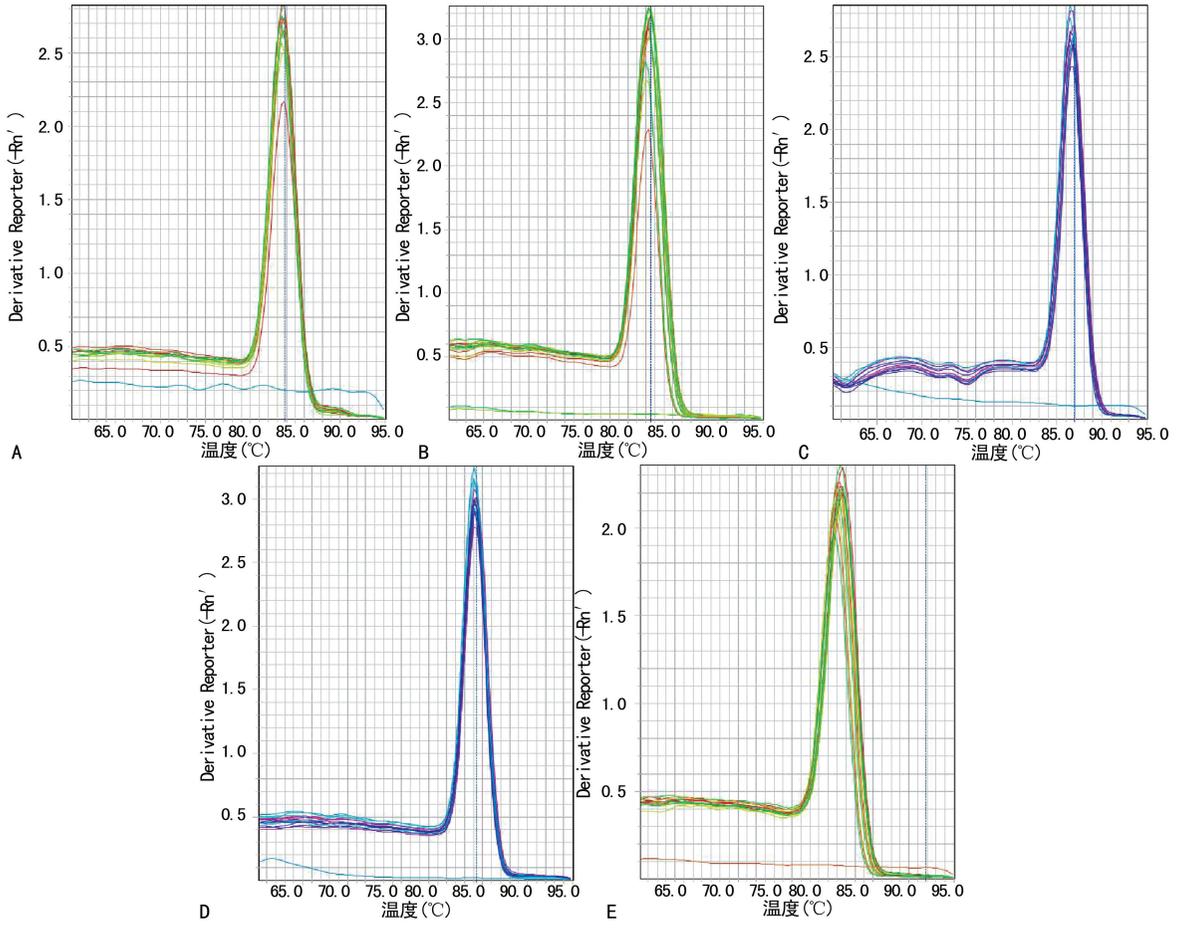
图 2 HPIV-2 感染后 LLC-MK2 后 HPIV-2 基因扩增产物分析结果

表 2 5 个内参基因的 qPCR 标准曲线参数

| 基因 | 扩增效率 (%) | 决定系数 R^2 |
|----------------|----------|------------|
| GAPDH | 89.4 | 0.990 |
| Hprt1 | 94.3 | 0.984 |
| β -actin | 90.2 | 0.992 |
| Ppia | 92.6 | 0.995 |
| B2M | 92.2 | 0.994 |

2.4 内参基因的表达稳定性

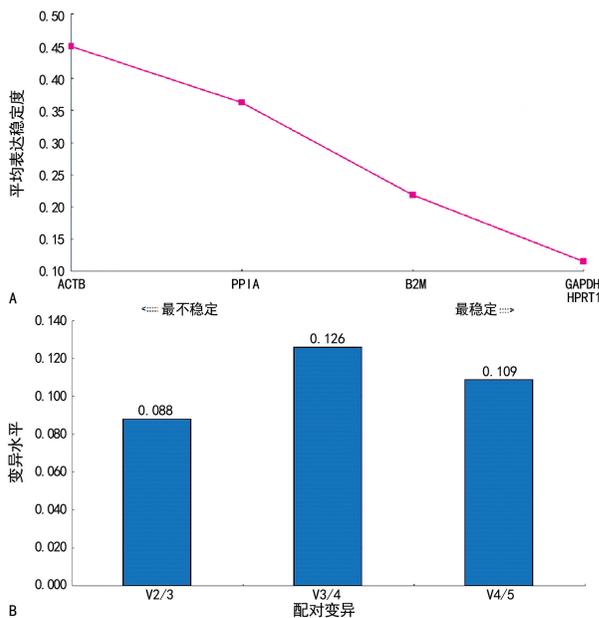
通过 geNorm 程序分析 5 个内参基因在 HPIV-2 感染 LLC-MK2 48 h 后的病毒组、利巴韦林治疗组和正常细胞对照组平均表达稳定度, 得到内参基因的平均表达稳定度排列顺序为 $GAPDH = Hprt1 (M = 0.115) > B2M (M = 0.218) > Ppia (M = 0.362) > \beta$ -actin ($M = 0.450$), 它们的 M 值均小于 1.5, 说明这 5 个内参基因均能在 LLC-MK2 感染 HPIV-2 及利巴韦林治疗 48 h 后稳定表达, 其中 GAPDH 和 Hprt1 是表达最稳定的内参基因, 见图 4A。geNorm 程序内参基因标准化因子配对变异分析 $V_{n/(n+1)}$ 显示, $V_{n/(n+1)}$ 值均



A: GAPDH; B: Hprt1; C: β -actin; D: Ppia; E: B2M.

图3 内参基因的溶解曲线

低于 0.15, 其中, V2/3 为 0.088, 提示使用 2 个内参基因即可, 没有必要再选第 3 个或 3 个以上数目内参基因进行校正, 见图 4B。



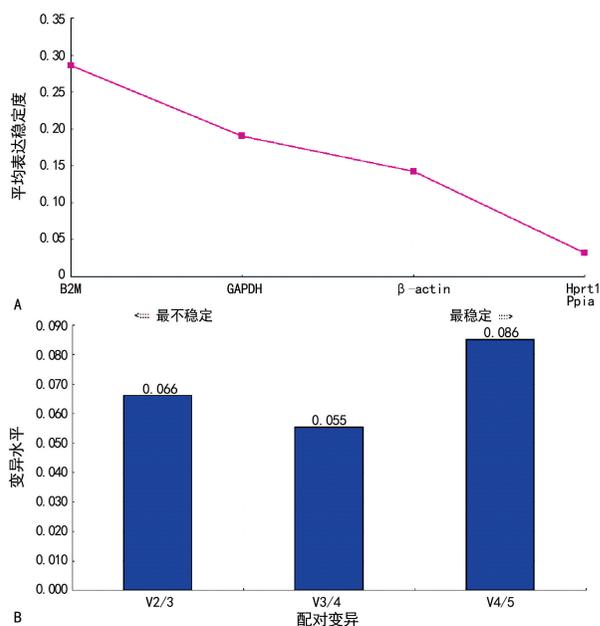
A: 5 个内参基因的平均表达稳定度 M; B: 内参基因标准化因子配对变异分析。

图4 geNorm 程序分析 HPIV-2 感染 LLC-MK2 48 h 时的理想内参基因

表 2 5 个候选内参基因的 qPCR 标准曲线参数

| 基因 | 扩增效率 (%) | 决定系数 R ² |
|----------------|----------|---------------------|
| GAPDH | 89.4 | 0.990 |
| Hprt1 | 94.3 | 0.984 |
| β -actin | 90.2 | 0.992 |
| Ppia | 92.6 | 0.995 |
| B2M | 92.2 | 0.994 |

通过 geNorm 程序分析 5 个内参基因在 HPIV-2 感染 LLC-MK2 72 h 后病毒组、利巴韦林治疗组和正常细胞对照组平均表达稳定度, 得到内参基因的平均表达稳定度排列顺序为 Ppia = Hprt1 (M = 0.032) > β -actin (M = 0.143) > GAPDH (M = 0.190) > B2M (M = 0.286), 它们的 M 值均小于 1.5, 说明这 5 个内参基因均能在 LLC-MK2 感染 HPIV-2 及利巴韦林治疗 72 h 后稳定表达, 其中 Ppia 和 Hprt1 是表达最稳定的内参基因, 见图 5A。geNorm 程序内参基因标准化因子配对变异分析 $V_{n/(n+1)}$ 显示, $V_{n/(n+1)}$ 值均低于 0.15, 其中, V2/3 为 0.066, 提示使用 2 个内参基因即可, 没有必要再选第 3 个或以上数目内参基因进行校正, 见图 5B。



A: 5 个内参基因的平均表达稳定度 M; B: 内参基因标准化因子配对变异分析。

图 5 geNorm 程序分析 HPIV-2 感染 LLC-MK2 72 h 的理想内参基因

3 讨 论

现如今,基因表达分析在各生物医学领域成为了重要的技术手段。人们试图通过对基因表达情况的掌握,以期获得不同调控网络的内在信息,以及最大程度上鉴定某些基因在新的信号通路或疾病中的相关性。在病毒感染和免疫方面,qPCR 技术被广泛应用^[6]。qPCR 是观察转录本丰度的常用方法之一,通过该法能够同时观察多种基因在不同标本中的表达丰度,尤其适用于标本只能少量得到的情况。

在用 qPCR 进行基因表达分析的过程中,不同标本间的一些变量需要控制得一致,如起始的标本量,反转录效率等。为达到前述目的,可以采取的措施有明确高质量 RNA 提取所用的细胞数量,在相同的条件下进行反转录等。然而,在实际采样中,特别是在处理组织标本时,精确的细胞计数往往不可行。

目前,在实时荧光定量 PCR 中引入内参基因来标准化样品 mRNA 的量是基因表达分析中的普遍做法,因此,理想的内参基因应在各种细胞中、各种实验条件下均稳定表达。不少的研究结果显示,通常被认为稳定表达以维持细胞基本功能的内参基因,也可能因为细胞类型、健康状态、药物处理等因素,出现表达差异^[7-8]。特别是病毒在感染宿主细胞的同时,会干扰宿主细胞包括细胞周期、代谢、DNA 复制转录等内参基因也参与的信号通路,所以考察内参基因的稳定性尤其重要^[9]。RADONIC 等^[10]和 WATSON 等^[11]的研究一致得出,在 SARS 冠状病毒、人疱疹病毒 1 型和 6 型、带状疱疹病毒、人免疫缺陷病毒 1 型、巨细

胞病毒、黄病毒和骆驼痘病毒感染宿主细胞的情况下,Ppia 基因表达最稳定, β -actin 基因最不稳定。ELIN 等^[12]的研究显示,人疱疹病毒 6B 型感染宿主细胞,Ppia 基因表达最稳定,TBP 基因最不稳定。SURESH 等^[13]利用 5 种不同的流感病毒株分别感染人、猪、禽等不同物种的敏感细胞,发现 18S rRNA 在上述情况下是最稳定的内参基因,而 β -actin 和 GAPDH 都不稳定。目前,还没有研究报道 HPIV2 感染 LLC-MK2 后常用内参基因的稳定性情况,而这对于体外抗病毒药物筛选和研究 HPIV-2 与 LLC-MK2 相互作用非常重要。

使用单一的内参基因进行基因表达标准化分析可能导致结果发生偏差,本研究使用的 geNorm 程序,可以用于筛选任何试验的任意数目的内参基因并最终挑选出 2 个或 2 个以上的内参基因组合来校正数据,可使相对定量的结果更为精确^[3]。本研究表明,HPIV-2 感染 LLC-MK2 48 h 后,5 种候选基因表达均具有稳定性,其中 GAPDH 和 Hprt1 稳定度相同,且最稳定;HPIV-2 感染 LLC-MK2 72 h 后,5 种候选基因表达均具有稳定性,其中 Ppia 和 Hprt1 稳定度相同,且最稳定。终上,Hprt1、GAPDH 和 Ppia 是抗 HPIV-2 药物体外筛选和研究 HPIV-2 与 LLC-MK2 相互作用最理想的内参基因。

参考文献

- [1] HENRICKSON K J. Parainfluenza viruses[J]. Clin Microbiol Rev, 2003, 16(2): 242-264.
- [2] KIHIRA S, UEMATSU J, KAWANO M, et al. Ribavirin inhibits human parainfluenza virus type 2 replication in vitro[J]. Microbiol Immunol, 2014, 58(11): 628-635.
- [3] VANDESOMPELE J, DE PRETER K, PATTYN F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes[J]. Genome Biology, 2002, 3(7): research0034.
- [4] 朱鑫, 吴巧, 冯晓辉, 等. H1N1 猪流感病毒感染猪血管内皮细胞后内参基因的筛选[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2014, 40(4): 489-494.
- [5] TERLIZZI M E, BERGALLO M, SIDOTI F, et al. Quantitative RT real time PCR and indirect immunofluorescence for the detection of human parainfluenza virus 1, 2, 3[J]. J Virol Methods, 2009, 160(1/2): 172-177.

- [6] YUMINE N, MATSUMOTO Y, OHTA K, et al. Claudin-1 inhibits human parainfluenza virus type 2 dissemination[J]. *Virology*, 2019, 531: 93-99.
- [7] VEAZEY K J, GOLDING M C. Selection of stable reference genes for quantitative RT-PCR comparisons of mouse embryonic and extra-embryonic stem cells[J]. *PLoS One*, 2011, 6(11): e27592.
- [8] AGGARWAL A, JAMWAL M, GANESH K V, et al. Optimal reference gene selection for expression studies in human reticulocytes[J]. *J Mol Diagn*, 2018, 20(3): 326-333.
- [9] HAYWARD S D, LIU J, FUJIMURO M. Notch and Wnt signaling: mimicry and manipulation by gamma herpesviruses[J]. *Sci STKE*, 2006, 2006(335): re4.
- [10] RADONIC A, THULKE S, BAE H G, et al. Reference gene selection for quantitative real-time PCR analysis in virus infected cells: SARS corona virus, Yellow fever virus, Human Herpesvirus-6, Camelpox virus and Cytomegalovirus infections[J]. *Viol J*, 2005, 2: 7.
- [11] WATSON S, MERCIER S, BYE C, et al. Determination of suitable housekeeping genes for normalisation of quantitative real time PCR analysis of cells infected with human immunodeficiency virus and herpes viruses[J]. *Viol J*, 2007, 4: 130.
- [12] ELIN E, NICKY D, ANNA F, et al. Investigation of reference gene expression during human herpesvirus 6B infection indicates peptidylprolyl isomerase A as a stable reference gene and TATA box binding Protein as a gene up-regulated by this virus[J]. *J Virol Methods*, 2016, 227: 47-49.
- [13] SURESH V K, MEENU T, RAHUL K, et al. 18S rRNA is a reliable normalisation gene for realtime PCR based on influenza virus infected cells[J]. *Viol J*, 2012, 9: 230.

(收稿日期: 2020-02-26 修回日期: 2020-05-13)

(上接第 2860 页)

- 康方含药血清对肺癌 A549 细胞凋亡的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(10): 146-150.
- [9] 陈奇. *中药药理研究方法学*[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 1167.
- [10] 张志文, 戴永福, 马科, 等. 回药爱康方含药血清对人肺鳞癌 SK-MES-1 细胞 Bcl-2 和 p53 蛋白表达的影响[J]. *时珍国医国药*, 2015, 26(3): 556-559.
- [11] GUERRIERO I, D'ANGELO D, PALLANTE P, et al. Analysis of miRNA profiles identified miR-196a as a crucial mediator of aberrant PI3K/AKT signaling in lung cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(12): 19172-19191.
- [12] LIU Q, LI X, LI C, et al. Deoxynojirimycin alleviates insulin resistance via activation of insulin signaling PI3K/AKT pathway in skeletal muscle of db/db mice[J]. *Molecules*, 2015, 20(12): 21700-21714.
- [13] 张希, 谭国民, 廖巾琼, 等. 低表达 DJ-1 调控 PI3K/AKT 通路对肺癌细胞增殖, 凋亡的影响[J]. *现代肿瘤医学*, 2019, 27(12): 2060-2065.
- [14] 倪琛琛, 于敏, 张志红. EGFR 与 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白在非小细胞肺癌组织中的表达及其意义[J]. *安徽医科大学学报*, 2011, 46(12): 1264-1266.
- [15] 隋雨桐, 迟文成, 姜家康. 芪杉方联合顺铂对肺癌 A549 细胞 PI3K/AKT 信号通路的影响[J]. *北京中医药大学学报*, 2018, 41(7): 553-558.
- [16] 姬秀娥, 马科, 马治国, 等. 回药爱康方对 Lewis 肺癌 C57 小鼠瘤细胞 PCNA、SIL-2R 表达的影响[J]. *辽宁中医杂志*, 2016, 43(7): 1515-1518.
- [17] 马科, 孙媛, 周丽萍, 等. 臭壳虫含药血清诱导人肺腺癌 A549 细胞凋亡的研究[J]. *宁夏医科大学学报*, 2018, 40(7): 766-769.
- [18] 王祁民, 孙利民, 许剑峰. 通关藤及其制剂抗癌平抗肿瘤的相关性研究[J]. *临床误诊误治*, 2017, 30(12): 102-104.
- [19] 李天娇, 包永睿, 王帅, 等. 基于 PTEN/PI3K/AKT 信号通路花蕊石抗肝癌细胞增殖作用机制研究[J]. *时珍国医国药*, 2017, 28(1): 63-67.

(收稿日期: 2020-03-12 修回日期: 2020-05-19)