

针灸对环磷酰胺化疗小鼠骨髓造血细胞中 Notch 信号 传导通路相关差异基因 Numb1、Numb2 的影响

路玫¹, 杜雪源¹, 滕迎春², 李建伟², 赵喜新³, 曹大明¹

(1. 河南中医药大学, 河南 郑州 450046; 2. 河南中医药大学第一附属医院, 河南 郑州 450003;

3. 河南中医药大学第三附属医院, 河南 郑州 450008)

摘 要: 目的: 通过观察针刺、艾灸对环磷酰胺(CTX)化疗后,健康小鼠骨髓造血细胞中 Notch 信号通路相关差异基因 numb1、numb2 表达的影响,从分子生物学方面探讨针灸改善化疗后骨髓抑制、提升外周血白细胞的机制。方法: 取雄性昆明种 SPF 级小鼠 40 只,运用随机分层分组的方法分为空白组(A 组)、模型组(B 组)、针刺组(C 组)、艾灸组(D 组)。B 组、C 组、D 组的小鼠注射 CTX 建立骨髓抑制模型,A 组给予同等剂量生理盐水。针刺和艾灸治疗后,运用免疫组化法、RT-PCR 法、Western-Bolt 法检测 Notch 信号通路上相关差异基因 numb1、numb2 的蛋白表达水平及 mRNA 表达,进行数据统计分析。结果: numb1、numb2 属于小鼠骨髓造血细胞 Notch 信号通路相关性基因,且具有显著差异性,针刺、艾灸可以上调 numb1、numb2 mRNA 的表达,促进 numb1、numb2 蛋白含量的增加。结论: 上调 Notch 信号通路相关差异基因 numb1、numb2 的表达,抑制过度激活的 Notch 信号通路,增强骨髓造血功能,可能是针灸减轻 CTX 化疗引起的骨髓抑制、改善造血功能的微观机制之一。

关键词: 针灸; 环磷酰胺; 骨髓抑制; Notch 信号通路; numb-Notch 信号途径

中图分类号: R245

文献标志码: A

文章编号: 1673-7717(2018)09-2055-04

Effects of Acupuncture and Moxibustion on Differentially Expressed Genes Numb1, Numb2 of Notch Signaling Pathway – related in Bone Marrow Hematopoietic Cells in Cyclophosphamide – induced Mice

LU Mei¹, DU Xueyuan¹, TENG Yingchun², LI Jianwei², ZHAO Xixin³, CAO Daming¹

(1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, Henan, China;

2. The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, Henan, China;

3. The Third Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, Henan, China)

Abstract: *Objective:* To explore the molecular biology mechanism underlying acupuncture and moxibustion in improving bone marrow suppression and periphery leucocyte by observing the effects of acupuncture and moxibustion on differentially expressed genes numb1, numb2 of Notch signaling pathway – related in bone marrow hematopoietic cells in cyclophosphamide – induced mice. *Methods:* Forty male Kunming mice (SPF) were randomly divided into control group (group A), model group (group B), acupuncture group (group C) and moxibustion group (group D). The models of myelosuppression in group B, C and D were induced by cyclophosphamide. The group A was given the same dose of saline. The protein and mRNA expression levels of differentially expressed genes numb1, numb2 of Notch signaling pathway – related were detected by immunohistochemical method, RT-PCR and Western-bolt Test after being treated by acupuncture and moxibustion. *Results:* Genes numb1 and numb2 which belong to the Notch signaling pathway – related genes in mice bone marrow hematopoietic cells have a significant difference. Acupuncture and moxibustion can increase numb1 and numb2 mRNA expressions, thereby promoting numb1 and numb2 protein contents. *Conclusion:* Acupuncture and moxibustion can reduce bone marrow suppression caused by chemotherapy of CTX and improve hemopoietic function. One of its micro-mechanism could be acupuncture and moxibustion can increase the expressions of Notch signaling pathway – related genes numb1, numb2, and thus inhibiting the excessive activation of Notch signaling pathway. Therefore, the bone marrow hematopoietic function was enhanced.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81072884)

作者简介: 路玫(1958-),女,河南新乡人,教授,博士研究生导师,博士,研究方向: 针灸对抗放化疗不良反应的研究。

通讯作者: 曹大明(1957-),男,河南郑州人,教授,学士,研究方向: 中医针灸基础理论研究及针灸对抗放化疗不良反应的研究。

E-mail: cdm3311@yahoo.com。

Key words: acupuncture and moxibustion; cyclophosphamide; bone marrow suppression; Notch signaling pathway;
numb - Notch signaling pathway

据中国国家癌症中心 2017 年数据显示,2013 年全国恶性肿瘤新发病例约 368.2 万,死亡约 222.9 万^[1],总体而言,在全球 184 个国家和地区中,我国的恶性肿瘤发病位居中等偏上水平^[2]。目前,化疗是临床治疗恶性肿瘤的主要方法之一^[3],环磷酰胺(cyclophosphamide,CTX)作为双功能烷化剂及细胞周期非特异性药物,对白血病和实体瘤均有疗效,是为广谱抗肿瘤药^[4],但其具有非常明显的免疫抑制及细胞毒化作用^[5]。

Notch 信号传导通路在肿瘤疾病的发生、发展中的有重要作用,近些年的研究发现,在多种肿瘤细胞中,均存在 Notch 信号传导通路的异常表达^[6-8],且该信号通路对免疫系统、造血系统等的细胞命运起着决定性作用,并在造血细胞以及胚胎和成人器官祖细胞的增殖、分化、自我更新过程中发挥极为重要的调控作用^[9-10]。目前针灸改善化疗后机体免疫和造血功能的疗效及安全性已得到公认^[11-13],其作用机理研究也在进行积极地探索^[13-14],但针灸是通过调节何种信号通路来实现化疗后骨髓抑制减轻、造血功能改善的微观机制仍未明确。

本研究以 CTX 建立骨髓抑制模型,从 Notch 信号传导通路上差异表达基因 numb1、numb2 方面,探索针灸减轻 CTX 小鼠骨髓抑制的重要信号分子,阐明其作用机理,为临床应用针灸减轻化疗后骨髓抑制、提高患者生存质量、延长患者生存期提供实验基础。

1 材料

实验动物及分组:由河南省实验动物中心购得无特定病原体(SPF)级、雄性昆明种(KM)小鼠 批号:scxk(豫)2010-0002 40 只,体质量(18±2)g。自由饮食饮水饲养 3 d 后,按体质量随机分层分组分为空白组(A组)、模型组(B组)、针刺组(C组)、艾灸组(D组),10 只/组,以苦味酸溶液染色编号。经基础白细胞计数,剔除两极小鼠,每组保留 8 只。

2 方法

2.1 模型制作方法

依据我国《新药(西药)临床前研究指导原则汇编》^[15]收录的造模方法,制备 CTX 化疗小鼠骨髓抑制模型。B、C、D 组小鼠均给予腹腔注射 CTX 100 mg/(kg·d),连续 3 d,4 h 后模型即成^[16]。A 组腹腔注射等量生理盐水。

2.2 取穴及治疗方法

参考《中国兽医针灸学》^[17]行小鼠穴位定位,“大椎”位于背脊中线上,第 7 颈椎与第 1 胸椎棘突间“膈俞”(双)位于第 7 胸椎棘突下左右两旁“肾俞”(双)位于第 2 腰椎棘突下左右两旁“足三里”位于后膝关节后外侧,腓骨小头下约 5mm 处^[18]。

各组小鼠在造模完成后依次进行治疗:C 组:选佳健牌美容毫针,采取直刺法,进针 3 mm,留针 6 min,每日治疗 1 次,连续 5 d。D 组:选河南南阳卧龙艾绒厂特制美容艾条,点燃后将艾条高度固定在距离穴位皮肤 2 cm 处,艾灸 3 min,每日治疗 1 次,连续 5 d。A 组、B 组:每天陪同抓取、

固定,不治疗。

2.3 观察指标

2.3.1 镜检外周血白细胞数 自小鼠经 CTX 处理前的当天,直至造模后、针灸治疗期间,于每日上午 7:30 固定专人行小鼠尾静脉采血。取静脉血 10 μL/只,依次分别滴入事先配好、置有 390 μL 3% 冰乙酸稀释液的试管中,吹打混匀,取 10 μL 悬液,镜检外周血白细胞计数。

2.3.2 免疫组化法检测各组小鼠骨髓造血细胞 Notch 信号传导通路相关差异基因 numb1、numb2 蛋白表达水平 治疗 5 d 后,从各组中随机选取 8 只小鼠脱颈,取肋骨、股骨骨髓,制成石蜡切片,用免疫组化染色法(Elivison 二步法),测定骨髓细胞中 numb1、numb2 蛋白的表达量。分析方法:En Vision 法,显微镜下 400×高倍视野每例切片随机采集 5 个视野,使用 Image J2x 软件计算阳性面积,5 个视野中阳性面积的平均值代表该指标的表达量。OD 值同时使用软件计算。

2.3.3 Realtime-PCR 法检测各组小鼠骨髓造血细胞 Notch 信号传导通路显著性差异基因 mRNA 表达水平 治疗 5 d 后,从各组中随机选取 8 只小鼠脱颈处死,取肋骨和股骨骨髓,采用 Realtime-PCR 法检测 Notch 信号传导通路显著性差异基因 numb1、numb2 mRNA 的表达情况。①使用 Trizol 对组织 RNA、对数生长期细胞 RNA 进行抽提,分别用 DEPC 处理水溶解 RNA,−80℃保存待用;②取上述 RNA 4 μL 进行逆转录反应,20 μL 体系,得到的 cDNA −20℃保存;③取上述 cDNA 模板 5 μL 进行 FQ-PCR 反应,50 μL 体系。

扩增条件:①50℃,2 min;②95℃,5 min;③95℃,15 s;④60℃,45 s;40Cycle。所得数据采用仪器自带的软件分析:ABI Prism 7300 SDS Software。mRNA 相对表达量 = $2^{-\Delta CT} \times 100\%$, ΔCT = 目标基因 CT 值 - 内参(GAPDH)CT 值。

表 1 引物及探针序列

Name	Primer sense	Sequence (5'→3')	Amplification product(bp)
Numb1	Forward	5' GCCTCTAATGTGCCTGTAGT 3'	103bps
	Reverse	5' TTGGCGACTGATGTGGATG 3'	
Numb2	Forward	5' GCCTCTAATGTGCCTGTAGT 3'	103bps
	Reverse	5' TTGGCGACTGATGTGGATG 3'	

2.3.4 Western-Blot 法检测各组小鼠 Notch 信号传导通路中显著性差异基因蛋白量 治疗 5 d 后,从各组中随机选取 6 只小鼠脱颈处死,取其骨髓,采用 Western Blot 法(免疫印迹方法)进行骨髓细胞 numb 蛋白量的检测,包括蛋白质的抽取及定量。

2.4 统计方法

采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析。计量资料以均数($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 针灸对 CTX 健康小鼠外周血白细胞数的影响

除 A 组外,其余各组小鼠经 CTX 处理后第 2 天白细胞

计数明显下降,说明 CTX 对小鼠具有明显的细胞毒作用。见表 2。

表 2 CTX 造模前后健康小鼠外周血白细胞计数的变化($\times 10^9/L$, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	1/0	2/1	3/2	4/3
A 组	8	8.56 $\pm$ 2.362	10.05 $\pm$ 1.794	8.43 $\pm$ 0.570	7.33 $\pm$ 2.020
B 组	8	6.48 $\pm$ 1.969	5.14 $\pm$ 2.365 [#]	2.85 $\pm$ 1.111 [#]	1.41 $\pm$ 0.562 [#]
C 组	8	6.86 $\pm$ 3.567	4.35 $\pm$ 1.604 [#]	2.16 $\pm$ 0.717 [#]	1.28 $\pm$ 0.311 [#]
D 组	8	7.01 $\pm$ 1.599	4.51 $\pm$ 0.730 [#]	2.30 $\pm$ 0.334 [#]	1.14 $\pm$ 0.256 [#]

注:与 A 组比较,[#] $P < 0.05$

与 B 组相比,C 组、D 组小鼠白细胞回升提前且升幅较大,验证了前期导师组的研究结果^[9]:针灸均有较好的改善化疗药物所致骨髓抑制,升高外周血白细胞的作用。见表 3。

表 3 治疗前后健康小鼠外周血白细胞计数变化($\times 10^9/L$, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	1	2	3	4	5
A 组	8	7.33 $\pm$ 2.020	7.84 $\pm$ 2.107	8.29 $\pm$ 0.948	7.60 $\pm$ 0.854	9.80 $\pm$ 0.578
B 组	8	1.41 $\pm$ 0.562 [#]	1.49 $\pm$ 0.552 [#]	0.76 $\pm$ 0.288 [#]	3.60 $\pm$ 0.896 [#]	5.85 $\pm$ 1.242 [#]
C 组	8	1.28 $\pm$ 0.311 [#]	1.01 $\pm$ 0.253 [#]	2.48 $\pm$ 2.266 ^{#*}	5.95 $\pm$ 1.954 [*]	8.06 $\pm$ 0.713
D 组	8	1.14 $\pm$ 0.256 [#]	1.26 $\pm$ 0.267 [#]	2.01 $\pm$ 0.356 [#]	5.48 $\pm$ 0.623 ^{#*}	7.50 $\pm$ 0.961

注:与 A 组比较,[#] $P < 0.05$;与 B 组比较,^{*} $P < 0.05$

3.2 针灸对 CTX 健康小鼠 notch 信号传导通路中差异基因蛋白表达的影响

治疗 5 d 后,与 A 组比,B 组中 numb1 和 numb2 上调;与 B 组比,C 组、D 组中 numb1 和 numb2 上调,且具有显著性差异($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 针灸对 CTX 健康小鼠 Notch 信号传导通路中差异基因蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	numb1	numb2
A 组	8	831.38 $\pm$ 24.686	796.13 $\pm$ 52.283
B 组	8	748.25 $\pm$ 37.040 [#]	727.63 $\pm$ 47.764 [#]
C 组	8	792.88 $\pm$ 56.992 [*]	790.25 $\pm$ 36.503 [*]
D 组	8	819.25 $\pm$ 32.740 [*]	791.25 $\pm$ 22.257 [*]

注:与 A 组比较,[#] $P < 0.05$;与 B 组比较,^{*} $P < 0.05$

3.3 针灸对 CTX 健康小鼠 Notch 信号传导通路中显著性差异基因 mRNA(%) 的影响

CTX 化疗后,在小鼠骨髓细胞 notch 信号传导通路显著性差异基因 numb1、numb2 中,与 A 组比,B 组 numb1、numb2 mRNA 表达降低;经过治疗后与 B 组比,C 组、D 组虽均无统计学意义,但针刺、艾灸后 numb1、numb2 mRNA 表达均上调,且 D 组优于 C 组,但无显著性差异($P > 0.05$)。见表 5。

表 5 针灸对 CTX 健康小鼠 Notch 信号传导通路中显著性差异基因 mRNA(%) 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	numb1	numb2
A 组	8	0.326 1 $\pm$ 0.147 9	5.403 3 $\pm$ 2.241 0
B 组	8	0.173 2 $\pm$ 0.058 9 [#]	3.103 2 $\pm$ 0.599 1 [#]
C 组	8	0.215 4 $\pm$ 0.125 2	4.252 8 $\pm$ 2.222 8
D 组	8	0.282 6 $\pm$ 0.173 9	4.437 6 $\pm$ 1.526 4

注:与 A 组比较,[#] $P < 0.05$

3.4 针灸对 CTX 健康小鼠 Notch 信号传导通路中差异基因蛋白量的影响

经 CTX 处理后,numb1、numb2 蛋白含量下降,说明 CTX 可引起小鼠骨髓细胞中的 numb 蛋白(numb1、numb2)含量下降,可能导致 Notch 信号传导通路失去抑制,发生异常激活,致骨髓抑制。治疗 5 d 后,C 组、D 组与 B 组比,numb2 含量增加,且 D 组具有显著性差异($P < 0.05$),C 组、D 组与 B 组比,numb1 蛋白量变化虽无显著性差异($P > 0.05$),但有升高趋势,且 C 组较 D 组高。提示针灸可以通过增加 numb 蛋白的含量。见表 6。

表 6 针灸对 CTX 健康小鼠 Notch 信号传导通路中差异基因蛋白量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	numb1	numb2
A 组	6	2 911.8 $\pm$ 632.6	3 576.1 $\pm$ 383.26
B 组	6	2 323.6 $\pm$ 902.55	2 758.4 $\pm$ 644.68 [#]
C 组	6	3 065.4 $\pm$ 849.17	3 318.7 $\pm$ 364.72
D 组	6	2 953.0 $\pm$ 921.95	3 412.0 $\pm$ 580.86 [*]

注:与 A 组比较,[#] $P < 0.05$;与 B 组比较,^{*} $P < 0.05$

4 讨论

“骨髓抑制”虽未见载于祖国医学典籍中,但据其病因、病机和临床表现,多将之归于中医“虚劳”“虚损”的范畴^[20-22]。本病多以正气虚损为本,复受“外来毒邪”即化学药物所伤,导致生化乏源,气血具虚,脾肾不足。据《诸病源候论》所载“夫虚劳多伤于肾”,虚劳之人“精髓萎竭,血气虚弱”,“脏腑不和,脾胃气弱”,“阴阳伤损,血气凝涩”。以“虚则补之”(《灵枢·经脉》)、“劳则温之”(《素问·至真要大论》)为治疗原则,结合导师课题组近 30 年的临床和实验研究经验^[23],取“大椎”“膈俞”“肾俞”“足三里”等腧穴,施以针刺及艾灸,以达到健脾益肾、调补气血、益精填髓、固本培元之作用。

促进机体骨髓造血微环境的恢复与重建,使造血干细胞(Hematopoietic stem cell,HSC)快速有效地增殖是化疗后造血功能再生的关键与前提,而 HSCs 自我更新能力的获得、造血特性的保持则依赖于 Notch 信号传导通路^[24]。有研究发现,Notch 信号传导通路也许是主要的造血系统调节通路,维持 HSC 的增殖、分化潜能,改善骨髓造血功能^[25]。活化 Notch 信号,能够达到抑制 HSCs 分化,促进造血功能短期、长期恢复的目的^[26],抑制 Notch 信号能导致 HSCs 加速分化,降低其造血重建能力^[27]。

Numb 是一个与质膜相连的细胞质蛋白质,是细胞命运的关键调控器,其 6 种亚型均包含 4 个作用域:磷酸酪氨酸结合结构域(phosphotyrosine-binding,PTB)、富脯氨酸结构域(proline rich region,PRR)、表皮生长因子受体底物 15(EGFR pathway substrate clone no.15,Eps15)同源结构域 DPF(aspartate-proline-phenylalanine tripeptide)和 NPF(asparagine-proline-phenylalanine tripeptide)^[28]。Numb 通过其 N 端 PTB 与 Notch 结合,通过其 C 端 DPF 与 α -衔接蛋白结合,进而实现由 α -衔接蛋白介导的胞吞作用下调 Notch^[29]。Notch 是一种跨膜受体蛋白,Numb 是 Notch 的上游分子,二者相互拮抗,Numb 通过抑制 Notch 的活性发挥其抑癌作用,抑制肿瘤发展^[30-31]。有研究发现,Numb 的 2

种亚型, $h - \text{Numb} - 1, 3(\text{Numb} - \text{PRR}^L)$, 具有促进细胞增殖的作用, $h - \text{Numb} - 2, 4(\text{Numb} - \text{PRR}^S)$ 则具有促进细胞分化的作用^[3]。因此, Numb1 与 Numb2 可促进骨髓造血干细胞的增殖和分化。

本研究结果显示, 小鼠经 CTX 处理后, 骨髓细胞中 Notch 信号传导通路 numb 蛋白 (numb1、numb2) 表达下调, CTX 健康小鼠 Notch 信号过度激活, 致使骨髓造血干/祖细胞增殖作用减弱、分化作用增强, 从而持续减少造血干/祖细胞的数量, 进而骨髓造血功能减弱, 同时影响细胞周期^[3], 引起骨髓抑制、外周血白细胞减少等一系列不良反应。对 CTX 小鼠分别施以针刺和艾灸, 结果提示: 针刺、艾灸可上调 CTX 小鼠骨髓细胞中 Notch 信号传导通路 numb 蛋白 (numb1、numb2) 的表达, 抑制过度活化的 Notch 信号, 减轻 CTX 化疗引起的健康小鼠骨髓抑制, 改善其骨髓造血功能, 提升 CTX 化疗导致的外周血白细胞减少。本研究系统观察了针灸对 CTX 化疗后, 健康小鼠骨髓细胞中 Notch 信号传导通路上差异表达基因作用途径, 通过探索针灸对 Numb/Notch 信号网络上相关蛋白 numb1、numb2 表达的影响, 初步验证了“Notch 信号传导通路是针灸对抗骨髓抑制、改善造血等综合作用的关键机制”之假说。揭示了针灸保护骨髓造血功能, 减轻骨髓抑制新的分子生物学机制。

参考文献

- [1] 陈万青, 郑荣寿, 张思维, 等. 2013 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析 [J]. 中国肿瘤, 2017, 26(1): 3-5.
- [2] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global Cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [3] 田丽, 陈长英, 刘倩倩. 化疗药物致消化道黏膜炎的治疗及护理进展 [J]. 中华护理杂志, 2013, 48(7): 658.
- [4] 韦凤华. 环磷酰胺临床应用研究进展 [J]. 中国药事, 2013, 27(3): 324-326.
- [5] 张毅敏, 于斌, 陈佳, 等. 针刺治疗对卵巢早衰大鼠 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的影响 [J]. 中国针灸, 2015, 35(1): 53.
- [6] Leong KG, Gao WQ. The Notch pathway in prostate development and cancer [J]. Differentiation, 2008, 76(6): 699-716.
- [7] Wu F, Stutzman A, Mo YY. Notch signaling and its role in breast cancer [J]. Frontiers in Bioscience, 2007, 12: 4370-4383.
- [8] Maliekal TT, Bajaj J, Giri V, et al. The role of Notch signaling in human cervical cancer: implications for solid tumors [J]. Oncogene, 2008, 27(38): 5110-5114.
- [9] Chiba S. Notch signaling in stem cell systems [J]. Stem Cells, 2006, 24: 2437-2447.
- [10] Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development [J]. Science, 1999, 284: 770-776.
- [11] 赵喜新, 王和平, 田开宇, 等. 针灸抗化疗骨髓抑制所致白细胞减少机制研究综述 [J]. 针刺研究, 2003, 28(1): 70-78.
- [12] 吴焕淦, 严洁, 余曙光, 等. 灸法研究的现状与发展趋势 [J]. 上海针灸杂志, 2009, 28(1): 2-3.
- [13] 路玫, 肖婷婷, 曹大明, 等. 针灸对骨髓抑制模型小鼠血清造血生长因子等含量的影响 [J]. 中国针灸, 2015, 35(3): 264-268.
- [14] 路玫, 李昆珊, 曹大明, 等. 针灸对环磷酰胺化疗小鼠骨髓细

胞 DNA 含量动态变化的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(9): 3687-3690.

- [15] 中华人民共和国卫生部药政司. 新药(西药)临床前研究指导原则汇编 [C]. 北京: 中华人民共和国卫生部药政司, 1993: 103.
- [16] 中山医学院等编著. 药理学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1979: 221.
- [17] 于船. 中国兽医针灸学 [M]. 北京: 农业出版社出版, 1984: 209.
- [18] 华兴邦, 周浩良. 大鼠穴位图谱的研制 [J]. 实验动物与动物实验, 1991(1): 13.
- [19] 刘海伟. 针灸对 CTX 化疗小鼠骨髓造血微环境中黏附分子及造血因子的影响 [J]. 武汉: 湖北中医药大学, 2016.
- [20] 李佩文. 中西医结合临床肿瘤学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 1996: 224.
- [21] 路玫, 宋晓琳, 曹大明, 等. 针灸对骨髓抑制小鼠 DNA 修复基因 XPD 蛋白表达的影响 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(4): 988.
- [22] 王蕾, 谢智慧, 郭晓敏, 等. 中医辨证治疗乳腺癌患者癌因性疲劳的临床观察 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(12): 5375.
- [23] 路玫, 曹大明, 赵喜新, 等. 针灸对环磷酰胺所致骨髓抑制小鼠骨髓细胞周期调节蛋白 Cyclin D1 表达及细胞周期的动态影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(2): 238.
- [24] Bigas A, D'Altri T, Espinosa L. The Notch pathway in hematopoietic stem cells [J]. Current Topics in Microbiology and Immunology, 2012, 360: 1-18.
- [25] Chiaramonte R, Basile A, Tassi E, et al. A wide role for Notch-1 signaling in acute leukemia [J]. Cancer Letters, 2005, 219(1): 113-120.
- [26] Varnum-Finney B, Halasz LM, Sun M, et al. Notch2 governs the rate of generation of mouse long- and short-term repopulating stem cells [J]. The Journal of clinical investigation, 2011, 121(3): 1207-1216.
- [27] Weber JM, Calvi LM. Notch signaling and the bone marrow hematopoietic stem cell niche [J]. Bone, 2010, 46(2): 281-285.
- [28] Flores AN, McDermott N, Meunier A, et al. NUMB inhibition of NOTCH signalling as a therapeutic target in prostate cancer [J]. Nature Reviews Urology, 2014 Sep, 11(9): 499-507.
- [29] Berdnik D, Török T, Gonzálezgaitán M, et al. The endocytic protein α -Adaptin is required for numb-mediated asymmetric cell division in Drosophila [J]. Developmental Cell, 2002, 3(2): 221-231.
- [30] 韩帮锋. Numb 蛋白抑制肿瘤发生的研究进展 [J]. 国际口腔医学杂志, 2011, 38(1): 67-70.
- [31] 王超, 张楚瑶, 冯炜炜. Numb 在肿瘤中的作用 [J]. 国际肿瘤学杂志, 2012, 39(7): 541-544.
- [32] Dho SE, French MB, Woods SA, et al. Characterization of four mammalian numb protein isoforms. Identification of cytoplasmic and membrane-associated variants of the phosphotyrosine binding domain [J]. Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(46): 33097-33104.
- [33] Carlesso N, Aster JC, Sklar J, et al. Notch1-induced delay of human hematopoietic progenitor cell differentiation is associated with altered cell cycle kinetics [J]. Blood, 1999, 93(3): 838.