

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.03.018

长链非编码 RNA DLX6-AS1 在非小细胞肺癌中的表达及其作用研究

朱多杰,王 成[△],李 斌,蒋 鹏,杨建宝,宋铁牛,魏小平,孟于琪

(兰州大学第二医院胸外科,兰州 730000)

[摘要] **目的** 探讨长链非编码生长停滞特异性蛋白 6-反义 RNA1(lncRNA DLX6-AS1)在非小细胞肺癌(NSCLC)癌组织中的表达及对 NSCLC 癌细胞增殖和凋亡的调节作用。**方法** 收集 2011—2016 年于该院胸外科行手术治疗 23 例 NSCLC 患者的癌组织和癌旁组织,培养人支气管上皮细胞(16HBE)、NSCLC 细胞系(腺癌:A549、SPC-A1;鳞癌:SK-MES-1),运用实时定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)检测 DLX6-AS1 的表达。运用 LipofectamineTM 2000 转染 DLX6-AS1 siRNA 至 A549 细胞内干扰 DLX6-AS1 表达后,四甲基偶氮唑蓝比色(MTT)法检测细胞活力,重组人半胱天冬酶-3(caspase-3)活力试剂盒检测细胞 caspase-3 活力,Western blot 检测凋亡相关蛋白 B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)和 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)的表达。**结果** lncRNA DLX6-AS1 在 NSCLC 癌组织中表达上调,且与淋巴结转移和临床分期呈明显正相关($P<0.01$)。相比 16HBE,NSCLC 腺癌细胞系 A549、SPC-A1 和鳞癌细胞系 SK-MES-1 中 lncRNA DLX6-AS1 表达均上调($P<0.05$)。干扰 DLX6-AS1 表达可抑制 A549 的增殖($P<0.05$)。lncRNA DLX6-AS1 siRNA 可增强 caspase-3 活力,并上调 Bax 表达和下调 Bcl-2 表达($P<0.05$)。**结论** lncRNA DLX6-AS1 在非小细胞肺癌中的表达上调,促进 NSCLC 细胞的增殖、抑制凋亡。

[关键词] 肺肿瘤;长链非编码 RNA DLX6-AS1;非小细胞肺癌;细胞增殖;细胞凋亡

[中图分类号] R734.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2019)03-0428-04

Expression and role of lncRNA DLX6-AS1 in non-small cell lung cancer

ZHU Duo jie, WANG Cheng[△], LI Bin, JIANG Peng, YANG Jianbao,

SONG Tieniu, WEI Xiaoping, MENG Yuqi

(Department of Thoracic Surgery, Second Hospital of Lanzhou University,

Lanzhou, Gansu 730000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of long chain noncoding growth stasis specific protein 6 antisense RNA1 (lncRNA DLX6-AS1) in non-small cell lung cancer (NSCLC) and its role on proliferation and apoptosis of NSCLC cells. **Methods** The cancer tissue and paracancerous tissue in 23 patients with NSCLC treated by thoracic operation in our hospital during 2011—2016 were collected and their human normal bronchial epithelial cells 16HBE, NSCLC cell lines (adenocarcinoma: A549, SPC-A1, squamous cell carcinoma: SK-MES-1) were cultured. The real-time quantitative PCR was used to the expression of lncRNA DLX6-AS1. lncRNA DLX6-AS1 siRNA was transfected into cell by LipofectamineTM 2000. The cell viability was measured by MTT kit, caspase-3 activity kit was used to evaluated the caspase-3 activity. The expression level of apoptosis related protein B lymphoma 2 (Bcl-2) and Bcl-2 related X protein (Bax) were measured by western blot. **Results** The expression of lncRNA DLX6-AS1 was up-regulated in NSCLC carcinoma tissue, moreover was positively correlated with NSCLC clinical classification and lymph node metastasis ($P<0.01$). The expression of lncRNA DLX6-AS1 was also up-regulated in NSCLC carcinoma cell lines A549, SPC A1 and squamous carcinoma cell line lncRNA AS1 ($P<0.05$). Interfering DLX6-AS1 expression inhibited the cell proliferation of A549 ($P<0.05$). lncRNA DLX6 AS1 siRNA enhanced caspase-3 activity, upregulated the Bax expression and downregulated Bcl-2 expression ($P<0.05$). **Conclusion** The expression of lncRNA DLX6-AS1 is up-regulated in NSCLC, promotes the proliferation and inhibits the apoptosis of NSCLC cells.

[Key words] lung neoplasms; long non-coding RNA DLX6-AS1; non-small cell lung cancer; cell proliferation; cell apoptosis

近年来,肺癌发病率和病死率持续增长,已成为 全世界范围内发病率和病死率最高的癌症之一。在

作者简介:朱多杰(1983—),主治医师,硕士,主要从事非小细胞肺癌的临床和基础方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail: chengwangteam@

所有的肺癌中,非小细胞肺癌(NSCLC)占75%~80%。由于缺乏典型临床表现,NSCLC的早期筛查较为困难,大部分患者在首次就诊时已为晚期。此外,预后差也是目前治疗面临的严峻问题^[1]。因此,寻找NSCLC有效的早期诊断及预后标志物具有重要的科学意义和临床价值。目前,肿瘤的基因治疗逐渐成为研究的热点,探寻与NSCLC相关的原癌基因和抑癌基因也为诊断和治疗乳腺癌提供了新的研究方向^[2]。长链非编码RNA(lncRNA)是长度大于200 nt的非编码RNA,lncRNA通过调节癌细胞的增殖和凋亡发挥抑癌或促癌作用^[3]。新近研究发现,NSCLC中多种lncRNA表达异常,且参与其病理发生、发展过程,如lncRNA肺腺癌相关转录本1(MALAT1)^[4]、生长停滞特异性RNA5(GAS5)^[5]、HOX转录反义RNA(HOTAIR)^[6]、BRAF激活的长链非编码RNA(BANCR)^[7]等。随着研究的深入,新的NSCLC相关lncRNA不断被发现。已有文献报道,lncRNA生长停滞特异性蛋白6-反义RNA1(GAS6-AS1)在NSCLC患者的癌组织中表达上调,与肺癌组织分化程度和TNM分期呈明显正相关^[8],提示DLX6-AS1可能参与NSCLC的发生、发展。为了验证这一推测,本研究开展了以下两个方面的研究:(1)确证DLX6-AS1在NSCLC患者癌组织与癌旁正常组织的差异表达,并分析DLX6-AS1与NSCLC患者临床病理参数相关性;(2)通过体外细胞实验,运用分子生物学手段揭示DLX6-AS1对NSCLC细胞增殖和凋亡的调控。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2011—2016年于本院胸外科行手术治疗的23例NSCLC患者,取其癌组织及距肿瘤2 cm外的癌旁组织,术后均经病理检查明确。患者年龄21~68岁,其中男13例,女10例。所有患者术前均未行放疗,未服用过靶向治疗药物,并签署知情同意书。将收集的癌组织和癌旁正常组织冻于-80℃保存。患者临床病理参数如下:淋巴结转移15例,无淋巴结转移8例;I~II期12例,III~IV期11例。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人支气管上皮细胞(16HBE)、NSCLC细胞系(腺癌:A549、SPC-A1,鳞癌:SK-MES-1)均购自美国ATCC公司,运用10%胎牛血清DMEM培养基在37℃、5%CO₂的恒温培养箱中培养。

1.2.2 实时定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)法检测lncRNA DLX6-AS1表达 16HBE细胞、NSCLC细胞、癌组织或癌旁组织加入适量Trizol裂解,并加入氯仿萃取并涡旋,高速离心(12 000 r/min,15 min),吸取上清液,加入异丙醇加速RNA沉淀,高速离心(12 000 r/min,10 min),倾倒入上清液,加入无水乙醇洗涤沉淀,离心收集沉淀,加入焦碳酸二乙酯(DEPC)水溶解沉淀,测定RNA浓度。取1 μg总RNA逆转录得到cDNA。将扩增体系(8 μL)和cDNA(2 μL)加

入八联管中。设置程序:95℃预变性30 s,95℃变性5 s,60℃退火延伸31 s,共40个循环,运行程序;7300 System SDS Software分析数据,根据Ct值计算RQ值(计算公式: $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$),RQ值反映被检测基因相对表达量。引物序列:DLX6-AS1 Forward 5'-AGTTTCTCTCTAGATTGCCTT-3',DLX6-AS1 Reverse 5'-ATTGACATGTTAGTGCCCTT-3';GAPDH Forward 5'-AGAGGCAGGGATGATGTTCTG-3',GAPDH Reverse 5'-GACTCATGACCACAGTCCATGC-3'。

1.2.3 细胞实验分组 筛选siRNA活性片段分为:空白组、DLX6-AS1干扰片段组(干扰片段1、2、3组)和无关序列组(NC组)。检测DLX6-AS1 siRNA对细胞增殖凋亡影响的实验分组:空白组、DLX6-AS1 siRNA组和无关序列组。

1.2.4 细胞转染 由广州锐博生物科技有限公司设计合成3个DLX6-AS1 siRNA片段(片段1、2、3)和无关序列片段。A549细胞经消化后接种于12孔培养板,待细胞汇合密度至70%左右时,将转染试剂Lipofectamine™ 2000与DLX6-AS1 siRNA片段37℃共孵20 min(包装siRNA),将包装好的siRNA加入细胞培养基中继续培养细胞24 h(转染siRNA至细胞内干扰DLX6-AS1表达)。qRT-PCR检测lncRNA DLX6-AS1 siRNA的表达,考察siRNA是否干扰成功。

1.2.5 Western blot检测蛋白表达检测 收集A549细胞,加入蛋白裂解液[WIP裂解液:苯甲基磺酰氟(PMSF)=100:1],裂解1 h后离心,吸取上清液,加入上样缓冲液变性(99℃,7 min),运用二喹啉甲酸(BCA)蛋白测定试剂盒检测蛋白浓度。具体操作参照试剂说明书进行。制备10%的分离胶和浓缩胶,根据上述测定的蛋白浓度计算上样体积(20 μg上样量),控制电压和时间(80 V,30 min;120 V,1 h)跑胶,湿转法转膜,聚偏二氟乙烯(PVDF)膜孵育一抗[B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)和Bcl-2相关X蛋白(Bax),均用一抗稀释液稀释1 000倍]4℃过夜,Tris缓冲生理盐水吐温(TBST)洗刷,二抗室温孵育1 h,TBST洗刷,置于自动显影仪(ChemiDoc XRS成像系统)显影,计算灰度值。

1.2.6 细胞增殖检测 采用四甲基偶氮唑蓝比色(MTT)法检测细胞活力。具体步骤如下:A549细胞接种于96孔板中,加入siRNA干扰DLX6-AS1表达后,每孔加入10 μL MTT溶液,在细胞培养箱内继续孵育1 h。每孔加入100 μL Formazan溶解液,在细胞培养箱内再继续孵育4 h。放置紫外分光光度计于570 nm处测定光密度(OD)值,空白组0 h数值标化为1,所得数值计算出相对值进行比较。

1.2.7 细胞凋亡检测 细胞凋亡情况通过检测重组人半胱天冬酶-3(caspase-3)活力和凋亡相关蛋白(Bcl-2和Bax)反映。Bcl-2和Bax蛋白表达检测方法参照方法1.2.4进行。运用caspase-3活性检测试剂盒

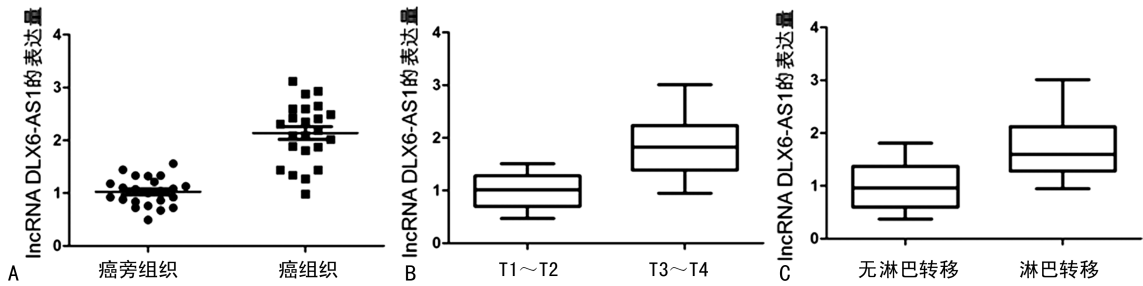


图 1 lncRNA DLX6-AS1 在 NSCLC 癌组织中的表达

检测 caspase-3 活力,大致方法如下:裂解液裂解细胞,释放出 caspase-3,加入已配置好的检测 caspase-3 活力的反应体系,caspase-3 催化反应体系中产生 pNA,置于紫外分光光度计于 405 nm 处测定 OD 值,通过 pNA 标准曲线计算出样本 OD 值。具体实验操作参照试剂盒说明书完成。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 对数据进行分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,采用单因素方差分析进行组间比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 lncRNA DLX6-AS1 在 NSCLC 癌组织中的表达 23 例 NSCLC 患者的癌组织和癌旁组织经 qRT-PCR 检测 lncRNA DLX6-AS1 发现,相对癌旁正常组织、肝癌组织中 lncRNA DLX6-AS1 表达明显上调 ($P < 0.01$),见图 1A。分析 DLX6-AS1 与患者临床病理参数相关性,发现相比低分期患者(T1~T2)和无淋巴转移患者,DLX6-AS1 在高分期患者(T3~T4)和淋巴转移患者癌组织中的表达更高 ($P < 0.01$),见图 1B、C。

2.2 lncRNA DLX6-AS1 在 NSCLC 细胞中表达水平 相比 16HBE,NSCLC 腺癌细胞系 A549、SPC-A1

和鳞癌细胞系 SK-MES-1 中 lncRNA DLX6-AS1 表达均上调 ($P < 0.05$),且 A549 增加最明显 ($P < 0.01$),故选用 A549 用于后续实验,见图 2。

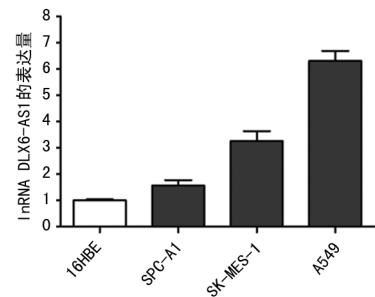


图 2 lncRNA DLX6-AS1 在肝癌细胞中的表达水平

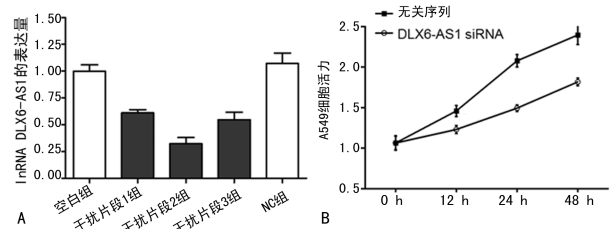


图 3 siRNA 干扰 lncRNA DLX6-AS1 表达对 A549 细胞增殖的影响

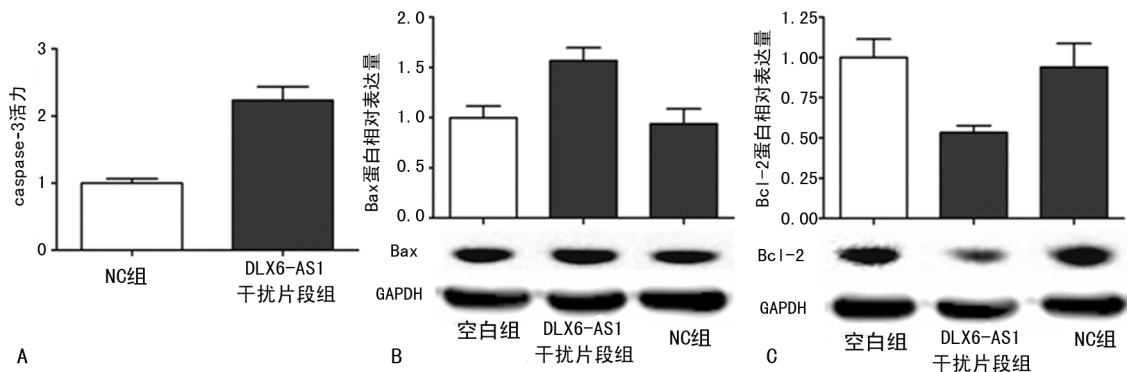


图 4 lncRNA DLX6-AS1 siRNA 对 A549 细胞凋亡的影响

2.3 siRNA 干扰 lncRNA DLX6-AS1 表达对 A549 细胞增殖的影响 A549 细胞转染 DLX6-AS1 siRNA 片段 24 h 后,qRT-PCR 检测 lncRNA DLX6-AS1 表达量。结果显示:相比无关序列片段(NC 组),3 个片

段均能有效干扰 DLX6-AS1 的表达,其中片段 2 的干扰效率最高(图 3A),用于后续细胞功能实验。A549 细胞经 siRNA 干扰 DLX6-AS1 表达后,分别于 0、12、24、48 h 运用 MTT 法检测细胞活力发现,干扰

DLX6-AS1 可抑制 A549 细胞增殖 ($P < 0.05$), 见图 3B。

2.4 lncRNA DLX6-AS1 siRNA 对 A549 细胞凋亡的影响 lncRNA DLX6-AS1 siRNA 可增强 caspase-3 活力, 并上调 Bax 表达和下调 Bcl-2 表达 ($P < 0.05$), 见图 4。

3 讨 论

非编码 RNA(ncRNA) 根据长度又可分为短链 ncRNA(≤ 200 nt) 和长链 ncRNA(> 200 nt)。既往 lncRNA 一直被认为是转录过程中产生的“垃圾”, 是 RNA 聚合酶在转录过程中低保真性的表现^[9]。近年来, lncRNA 作为原癌基因或抑癌基因受到广泛关注, lncRNA 的功能失调与包括 NSCLC 在内的多种肿瘤的发生密切相关^[10]。MALAT1 是第 1 个在肺癌中被研究的 lncRNA。SHEN 等^[11] 对 78 例 NSCLC 患者进行 5 年随访, 发现 MALAT1 表达水平与患者生存期密切相关, MALAT1 高表达组和低表达组患者中位生存时间分别为 52 和 60 个月。提示 MALAT1 与 NSCLC 患者预后有关, 是反映预后的一个独立因素, MALAT1 高表达提示患者预后较差。GAS6-AS1 是由 HAN 等^[12] 发现的一种新型 lncRNA, 其位于 GAS6 基因的下游, 并以反义方向转录所得。相比 NSCLC 癌旁正常组织, GAS6-AS1 在癌组织中表达下调, 且与 TNM 分期呈负相关。GAS6-AS1 的宿主基因 GAS6 在 NSCLC 癌细胞增殖、迁移、黏附和浸润中起重要的促进作用。进一步研究发现, 在 NSCLC 癌组织和细胞中 GAS6-AS1 与 GAS6 呈负相关, 表明 GAS6-AS1 可能通过调控 GAS6 的表达参与 NSCLC 的发生、发展。

本研究发现, 与正常组织相比, 在 NSCLC 组织中 DLX6-AS1 的表达均显著上调, 提示 DLX6-AS1 基因可能发挥了促癌基因的作用。进一步观察 DLX6-AS1 与 NSCLC 患者临床病理参数(淋巴结转移和临床分期) 呈明显正相关, 提示 DLX6-AS1 可能参与 NSCLC 的恶性增殖过程。体外细胞实验发现, 相比正常肝细胞, DLX6-AS1 在肝癌细胞中表达增加, 且 A549 细胞增加最显著。为进一步证实 DLX6-AS1 是否参与调节 A549 的增殖和凋亡过程, 本研究运用 siRNA 干扰 DLX6-AS1 表达, 可抑制 A549 的细胞活力, 增加 caspase-3 的活力, 表明 DLX6-AS1 可促进 A549 的增殖并抑制其凋亡。

lncRNA DLX6-AS1 为 DLX6 基因反义方向转录产物, DLX6 基因的生物学功能尚未阐明^[8], 但与 DLX6 同家族的 DLX2 和 DLX5 在实体瘤和恶性血液病中异常表达^[13-14], 提示 DLX 家族基因可能与肿瘤发生、发展密切相关。因此, lncRNA DLX6-AS1 是否调节 DLX6 的表达, 进而参与 NSCLC 的发生、发展有待进一步确证。

综上所述, 本研究发现 lncRNA DLX6-AS1 在

NSCLC 癌细胞中表达上调, 并参与调节癌细胞的增殖和凋亡, 在 NSCLC 的发生、发展中起重要作用。本研究为 NSCLC 的防治提供新的思路和理论基础。但 lncRNA DLX6-AS1 调控 NSCLC 细胞增殖和凋亡的具体机制尚不清楚, 这将是本研究下一步工作的重点。

参考文献

- [1] 高茂苒, 王大勇, 李涛, 等. 长链非编码 RNA 与肿瘤关系研究进展[J]. 河南大学学报(医学版), 2016, 35(3): 221-224.
- [2] GAGAN J, VAN ALLEN E M. Next-generation sequencing to guide cancer therapy[J]. *Genome Med*, 2015, 7(1): 80.
- [3] WEI M M, ZHOU G B. Long non-coding RNAs and their roles in non-small-cell lung cancer [J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2016, 14(5): 280-288.
- [4] WU Y T, HUANG C, MENG X M, et al. Long noncoding RNA MALAT1: insights into its biogenesis and implications in human disease [J]. *Curr Pharm Des*, 2015, 21(34): 5017-5028.
- [5] SHI X F, SUN M, LIU H B, et al. A critical role for the long non-coding RNA GAS5 in proliferation and apoptosis in non-small-cell lung cancer [J]. *Mol Carcinog*, 2015, 54 Suppl 1: 1-12.
- [6] LIU M Y, LI X Q, GAO T H, et al. Elevated HOTAIR expression associated with cisplatin resistance in non-small cell lung cancer patients [J]. *J Thorac Dis*, 2016, 8(11): 3314-3322.
- [7] SHI Y G, LIU Y C, WANG J R, et al. Downregulated long noncoding RNA BANCR promotes the proliferation of colorectal cancer cells via downregulation of p21 expression [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0122679.
- [8] LI J, LI P, ZHAO W, et al. Expression of long non-coding RNA DLX6-AS1 in lung adenocarcinoma [J]. *Cancer Cell Int*, 2015, 137(15): 48.
- [9] RICCIUTI B, MENCARONI C, PAGLIALUNGA L, et al. Long noncoding RNAs: new insights into non-small cell lung cancer biology, diagnosis and therapy [J]. *Med Oncol*, 2016, 33(2): 18.
- [10] CHEN J, WANG R, ZHANG K, et al. Long non-coding RNAs in non-small cell lung cancer as biomarkers and therapeutic targets [J]. *J Cell Mol Med*, 2014, 18(12): 2425-2436.
- [11] SHEN L Q, CHEN L, WANG Y S, et al. Long noncoding RNA MALAT1 promotes brain metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition in lung cancer [J]. *J Neurooncol*, 2015, 121(1): 101-108.
- [12] HAN L, KONG R, YIN D D, et al. Low expression of long noncoding RNA GAS6-AS1 predicts a poor prognosis in patients with NSCLC [J]. *Med Oncol*, 2013, 30(4): 694.
- [13] MORINI M, ASTIGIANO S, GITTON (下转第 437 页)

3.3 结果的局限性和不足 Meta 分析结果的可靠性必须基于高质量的 RCT,但是由于本研究存在一定的不足,如文献检索的局限,未纳入未发表的文献等,均可影响纳入研究的质量和范围。本文纳入文献质量普遍偏低,影响上述结果的可靠性和真实性,总结原因如下:(1)未具体说明随机方法、随机分配方案隐藏;(2)样本量较少,未进行样本量估算;(3)盲法实施不严谨;(4)退出及失访数据未进行意向性分析等,影响了疗效的结局评价,降低了系统评价的推荐等级和证据强度,同时证候分型比较多,贴敷药物及取穴不同导致临床异质性较高。此外,鉴于大多数研究治疗时间偏短,可能造成疗效尚未体现,多数研究只局限于近期疗效的观察,缺乏对患者的远期随访,对中药穴位贴敷治疗原发性失眠的长期疗效和安全性缺乏相关评价。

综上所述,本系统评价显示中药穴位贴敷治疗原发性失眠能明显提高临床有效率,但鉴于本研究纳入的文献方法学和报道质量均较低,且样本量偏小,上述结论仍需高质量的多中心大样本随机双盲对照试验以明确中药穴位贴敷治疗原发性失眠的确切疗效和安全性。

参考文献

[1] 沈渔邨. 精神病学[M]. 5 版. 北京:人民卫生出版社, 2009:622-625.

[2] MORIN C M, LEBLANC M, BELANGER L, et al. Prevalence of insomnia and its treatment in Canada[J]. Can J Psychiatry, 2011, 56(9):540-548.

[3] OHAYON M M, REYNOLDS C F. Epidemiological and clinical relevance of insomnia diagnosis algorithms according to the DSM-IV and the International Classification of Sleep Disorders (ICSD)[J]. Sleep Med, 2009, 10(9):952-960.

[4] 杜绪华, 黄元和, 秦秀荣. 辨证论治穴位敷贴治疗失眠的临床疗效观察[J]. 中外健康文摘, 2013(49):12-13.

[5] 胡静, 钟兰. 神阙贴药治疗失眠症心脾两虚证临床疗效及对褪黑素的影响[J]. 新中医, 2013, 41(1):105-107.

[6] 李颖哲. 电针配合穴位敷贴治疗心肾不交型失眠的临床疗效观察[D]. 广州:广州中医药大学, 2012.

[7] 刘洪艳. 镇静安神贴治疗心脾两虚型失眠症的临床研究[D]. 长春:长春中医药大学, 2014.

[8] 马文良, 陈朝俊. 三效安神贴配合中药内服治疗失眠症 66

例临床观察[J]. 新中医, 2008, 40(8):65-66.

[9] 乔飞. 景衣安神散穴位贴敷治疗失眠患者 61 例临床疗效观察[D]. 乌鲁木齐:新疆医科大学, 2010.

[10] 吴向东. 中药穴位贴敷治疗失眠的临床效果探究[J]. 中国当代医药, 2013, 20(10):106, 108.

[11] 于海波, 刘永锋, 李志峰, 等. 三针组穴和醋调吴茱萸敷贴涌泉穴治疗阴虚火旺型不寐临床观察[J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15(2):10-12.

[12] 张彬. 丹桅逍遥散穴位贴敷结合电针对肝郁化火型失眠临床观察[D]. 广州:广州中医药大学, 2015.

[13] 张茂, 王丽梅, 王燕, 等. 回医药穴位敷贴疗法治疗失眠症 180 例临床观察[C]//吴忠. 第 3 届全国回医药学术论坛暨中国民族医药学会回医药分会成立大会论文集, 宁夏, 2013:124-125.

[14] 赵仓焕, 胡静. 透皮控释纳米药物贴片穴位敷贴治疗失眠症的临床研究[C]//2006 中国针灸学会临床分会第 14 届全国针灸学术研讨会论文集, 桂林, 2006:382-386.

[15] 赵娜, 杨文佳, 谢晨, 等. 穴位敷贴治疗肝郁脾虚型慢性失眠症临床研究[J]. 国际中医中药杂志, 2017, 39(9):798-802.

[16] 赵欣纪. 穴位贴敷治疗失眠 78 例临床观察[J]. 光明中医, 2010, 25(8):1459-1460.

[17] 吴震西, 吴自強. 中医内病外治[M]. 北京:人民卫生出版社, 2015:39

[18] 陈旭青, 严道南, 吴继勇, 等. 穴位贴敷治疗过敏性鼻炎随机对照试验的系统评价[J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43(5):1043-1049.

[19] 张莘, 贾春生, 石晶, 等. 穴位贴敷治疗小儿泄泻有效性的 Meta 分析[J]. 针刺研究, 2013, 38(4):319-323.

[20] 赵璐. 糖痹通膏穴位贴敷治疗糖尿病性周围神经病的临床研究[J]. 辽宁中医杂志, 2007, 34(7):925-927.

[21] 张泽, 白瑞娜, 陈民, 等. 穴位贴敷联合西药治疗冠心病心绞痛有效性及安全性的系统评价[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(10):3531-3536.

[22] 周贤刚, 杨闯, 杨丽霞, 等. 中药穴位贴敷治疗面瘫的 Meta 分析[J]. 中国针灸, 2005, 25(11):797-802.

[23] 仵倚, 章新友, 周小玲, 等. 中药穴位贴敷法治疗慢性乙肝有效性的系统评价[J]. 江西中医药, 2017, 48(4):64-67.

[24] 董萍培. 安胎 I 号穴位贴敷改善肾虚型先兆流产患者症状的临床研究[D]. 杭州:浙江中医药大学, 2016.

[25] 史锁芳. 冬病夏治与调养[M]. 南京:江苏科学技术出版社, 2007:11-16

(收稿日期:2018-07-28 修回日期:2018-10-06)

(上接第 431 页)

current chromosomal inversion implicates the homeobox gene Dlx5 in T-cell lymphomas from Lck-Akt2 transgenic mice[J]. Cancer Res, 2008, 68(5):1296-1302.

Y, et al. Mutually exclusive expression of DLX2 and DLX5/6 is associated with the metastatic potential of the human breast cancer cell line MDA-MB-231[J]. BMC Cancer, 2010(10):649.

(收稿日期:2018-07-18 修回日期:2018-10-01)

[14] TAN Y F, TIMAKHOV R A, RAO M, et al. A novel re-