

化痰消瘤方对荷 Lewis 肺癌小鼠 nm-23, VEGF 表达的影响

蒋艳玲¹, 郑锡军², 孙宏新^{1*}

(1. 河南中医药大学第二附属医院, 郑州 450002; 2. 上海中医药大学, 上海 201210)

[摘要] **目的:**观察化痰消瘤方对 Lewis 肺癌小鼠瘤质量及肺转移灶的影响,检测瘤组织中血管内皮生长因子(VEGF), nm-23 mRNA 表达的情况,探究其作用机制。**方法:**取雄性 C57BL/6J 小鼠 30 只,随机分为空白组,化痰消瘤方组(50 g·kg⁻¹·d⁻¹),环磷酰胺(CTX)组[0.06 g·kg⁻¹·(3,7 d)⁻¹],共 3 组,每组 10 只。右腋下注射细胞悬液建立荷 Lewis 肺癌小鼠模型,造模后观察 21 d,处死,剥离瘤组织,计算抑瘤率,摘取肺组织,固定后显微镜下观察肺转移灶个数,计算抗肺转移率,通过实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测瘤组织中 nm-23, VEGF mRNA 表达情况,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测瘤组织中 nm-23, VEGF 蛋白的表达情况。**结果:**与空白组比较,化痰消瘤方组及环磷酰胺组瘤质量、肺转移灶个数均显著降低($P < 0.01$)。与空白组比较,化痰消瘤方及环磷酰胺能显著下调 VEGF 蛋白和 VEGF mRNA 的表达水平($P < 0.01$),能显著上调 nm-23 蛋白和 mRNA 的表达水平($P < 0.01$)。**结论:**化痰消瘤方具有抑制 Lewis 肺癌瘤体生长及转移的作用,其作用机制可能是通过降低 VEGF 的表达水平,减弱了肿瘤新生血管的生成,同时上调 nm23 mRNA 表达水平,抑制肿瘤生成与转移来实现的。

[关键词] Lewis 肺癌; 化痰消瘤方; 转移; nm-23 mRNA; 血管内皮生长因子

[中图分类号] R22; R242; R273; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)17-0157-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181523

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180516.0946.019.html>

[网络出版时间] 2018-05-17 11:17

Effect of Huatan Xiaoliu Decoction on Expressions of nm-23 and VEGF in Lewis Tumor-bearing Mice

JIANG Yan-ling¹, ZHENG Xi-jun², SUN Hong-xin^{1*}

(1. Second Affiliated Hospital, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China;

2. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201210, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Huatan Xiaoliu decoction (HXD) on tumor weight, lung metastases foci, nm-23 and vascular endothelial growth factors (VEGF) in tumor tissues of Lewis tumor-bearing mice, and to explore its mechanism in restraining tumor growth and metastasis. **Method:** Totally 30 C57BL/6J male mice were randomly divided into the blank group, HXD group (50 g·kg⁻¹·d⁻¹), and Cyclophosphamide (CTX) group [0.06 g·kg⁻¹·(3, 7 d)⁻¹], 10 mice in each group. Lewis lung cancer cells were inoculated subcutaneously into right axillary of C57BL/6 mice to establish Lewis tumor-bearing mice models. After 21 days, the mice were killed, and the tumors were stripped to calculate the rates of inhibition; their lung tissues were taken and after fixing, the number of lung metastases foci was observed under the microscope to calculate the rate of anti-lung metastasis. The mRNA expressions of VEGF and nm-23 were detected by Real-time PCR, and the protein expressions of VEGF and nm-23 were detected by Western blot. **Result:** In comparison with blank group, the tumor weight and the number of lung metastasis foci were significantly decreased in HXD group and CTX group

[收稿日期] 20171228(011)

[基金项目] 河南省省属高校科研专项(2014KYYWF-ZZCX3-07);河南省中医重点学科(专科)学术带头人培养项目(2011029)

[第一作者] 蒋艳玲,主管药师,从事中药的制剂及药理研究, E-mail: jyl-722@163.com

[通信作者] *孙宏新, 博士, 主任医师, 从事中西医结合防治恶性肿瘤的研究, E-mail: 447334004@qq.com

($P < 0.01$); the mRNA and protein expressions of VEGF were decreased, and the mRNA and protein expressions of nm-23 were increased in HXD group and CTX group. **Conclusion:** Huatan Xiaoliu decoction could inhibit Lewis lung cancer growth and metastasis, and the underlying mechanism may be related to reducing the expression of VEGF, reducing the generation of tumor new vasculature, up-regulating the expression of nm-23, and inhibiting tumor generation and metastasis.

[Key words] Lewis tumor-bearing; Huatan Xiaoliu decoction; metastasis; nm-23 mRNA; vascular endothelial growth factor

近年来,原发性支气管肺癌的发病呈上升的趋势,其死亡率已占有恶性肿瘤死亡率的第1位,肺癌患者的多发转移是导致其治疗效果欠佳的主要因素之一^[1-2]。因此,研究中医药防治肺癌及转移具有重要的临床意义。中医所谓的“痰毒”与肿瘤生长转移的微环境状态具有很强的相关性,包括新生血管的生成、细胞外基质的降解等状态,痰毒产生的病理过程及病理特点加剧了肿瘤的转移过程^[3-4]。因此相关学者提出运用“化痰”法辨证治疗肿瘤,临床中化痰散结类中药在肿瘤治疗中的广泛应用也取得了很好的疗效^[5-6]。本研究所涉及的化痰消瘤方是在此理论的指导下组方而成。本课题组前期细胞实验及临床观察已经证实,化痰消瘤方具有抑制肺癌生长、转移,及一定程度的化疗药物耐药的作用^[7-10]。然而,其抑制肿瘤生长转移的机制尚未完全清楚。血管内皮生长因子(VEGF)参与肿瘤新生血管的生成,提供肿瘤生长的微环境,加速了肿瘤的转移^[11-13]。nm-23是第一个被分离且被证明具有抑制肿瘤转移的基因,可以调节细胞的分化与凋亡,具有抑制肿瘤生长转移的作用^[14-15]。有研究指出中药复方肺金方(以祛痰散结为主要功效)可以通过影响VEGF,nm-23的表达而发挥抑制肿瘤生长的作用^[16]。化痰消瘤方也是以化痰散结类中药为主,故本研究通过建立Lewis肺癌小鼠模型,检测肺癌组织中nm-23,VEGF的表达水平,探究化痰消瘤方调控肺癌生长、转移的机制是否与nm-23及VEGF mRNA表达相关。

1 材料

1.1 动物及瘤株 SPF级,C57BL/6J小鼠30只,体质量16~18g,购买于山西医科大学动物实验中心,合格证号SCXK(晋)2015-0001。本实验已通过河南省中医院(河南中医药大学第二附属医院)伦理委员会审批。Lewis肺癌瘤株由河南省中医院中心实验室细胞库提供,编号LC2617。

1.2 药物 化痰消瘤方由天南星12g,生半夏12g,桔梗6g,浙贝母12g,白芥子9g,蜂房9g等

药物组成,由河南省中医院中药房提供上述药品,由河南省中医院黄小敏副主任中药师鉴定为正品。注射用环磷酰胺(江苏盛迪医药有限公司,批号16021625,0.2g/支)。

1.3 仪器 TG-16G型台式高速冷冻离心机(常州市万丰仪器制造有限公司);BPX-82型恒温培养箱(上海博迅有限公司);Luna II型全自动细胞计数仪计数板(上海达平仪器有限公司);DYCZ-20FDNA型电泳仪(浙江赛德仪器设备有限公司);ZL-3400型转膜仪(北京六一仪器厂);Bio-TEK 800型酶标仪(美国宝特公司);TY-80A型脱色摇床(金坛市国旺实验仪器厂);EPS-300型电泳槽,实时荧光定量PCR(Real-time PCR) Detecting System(美国Bio-Rad公司);Fluor Chem M型凝胶成像系统(美国PS公司)。

1.4 试剂 trizol试剂(Invitrogen公司,批号15596-026);RT试剂盒(Fermentas MBI公司,批号K1622),PCR试剂盒(Transgene公司,批号AQ131-02);无水乙醇、三氯甲烷、异丙醇(国药集团化学试剂有限公司,批号分别为SF12401,AS34527,C20827);苯甲基磺酰氟,亮抑酶肽,抑肽酶(Sigma公司,批号分别为AR03231,D450236,G542781);TBS缓冲液、过硫酸铵、四甲基乙二胺(北京博奥森生物技术公司,批号分别为V900838,V900883,V900853);nm23,VEGF,内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体(Santa Cruz公司,批号分别为AD-6309,SQ-3462,BD-3432);二抗(谷歌生物科技有限公司,批号20150325)。

2 方法

2.1 模型小鼠的建立 将Lewis肺癌瘤源小鼠,脱颈处死,操作部位皮肤用75%乙醇消毒,低温冰浴条件下剥离瘤组织,用剪刀剪取生成较好的瘤块,组织研磨器研磨成瘤细胞悬液,上述操作在超净工作台上进行。调整细胞密度为 1×10^7 个/mL。用注射器取0.2 mL溶液注射于小鼠右腋下,模型小鼠接种成功后,于1周内可触及小鼠右腋下肿块^[17]。

2.2 分组及用药方法 造模后,30 只 C57 小鼠根据随机数字表法,分为化痰消瘤方组、空白组、环磷酰胺组,共 3 组,每组 10 只。化痰消瘤方用药剂量根据前期实验结果,灌胃给药的剂量为 $50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ [8]。环磷酰胺用药剂量按 $0.06 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,于小鼠造模后第 3,7 天腹腔注射。空白组给予等容积生理盐水灌胃。共灌胃 21 d,第 22 天处死所有小鼠。

2.3 指标检测

2.3.1 肺转移灶抑制率及抑瘤率 灌胃给药 21 d 后,各组 C57 荷瘤小鼠脱颈处死,剥离瘤组织,称质量。迅速剥离肺脏,于 10% 甲醛溶液中固定 24 h 后,冲洗,用铁苏木素染色,倒置显微镜下观察,计算肺转移灶抑制率。转移抑制率 = (空白组平均转移个数 - 治疗组平均转移数) / (空白组平均转移数) $\times 100\%$ 。肿瘤抑制率 = (空白组平均瘤质量 - 治疗组平均瘤质量) / 空白组平均瘤质量 $\times 100\%$ 。

2.3.2 Real-time PCR 检测 nm-23, VEGF mRNA 的表达 通过引物设计软件 Oligo 6 对所用引物进行自行设计, GAPDH (132 bp): 上游 5'-CCTTCCGTGTTCCCTACCC-3'; 下游 5'-AGCCCAAGATGCCCTTCAGT-3'; VEGF (101 bp): 上游 5'-AGGAAA GGGAAAGGCTCAA-3', 下游 5'-GGAAGGCTCCAAGGAATTA-3'; nm23 (111 bp): 上游 5'-GCGAGATCATCAAGCGGTT-3', 下游 5'-GGCGGTCCTTCAGTCACT-3'。从 -80 °C 中取出瘤组织样品(约 100 mg),放入有液氮的研磨器中,研磨组织,加入 trizol 试剂 1 mL,研磨震荡;加入三氯甲烷 0.2 mL,混匀,静置 3 min;4 °C,12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min;取上清液,加入等体积异丙醇,混匀,静置 10 min;4 °C,12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min;加入 75% 乙醇 1 mL,混匀,沉淀,4 °C,9 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,弃上清,室温晾干;取 RNA 样品 5 μL ,加入 DEPC 水 1.5 mL,于紫外分光光度计上测定 260 nm 和 280 nm 波长处的吸光度 A,计算纯度及浓度。逆转录合成 cDNA,进行 PCR 反应,条件如下:94 °C 预变性,1 个循环;94 °C 5 s,55 °C 15 s,72 °C 10 s,共 40 个循环;采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各组瘤组织 nm-23 及 VEGF mRNA 的相对表达量。

2.3.3 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 nm-23, VEGF 蛋白表达 取出瘤组织称质量后放入玻璃匀浆器中,然后加入蛋白裂解液,按瘤组织 10 mg 加入蛋白裂解液 100 μL 操作。取 50 mL 离心管中,依次加入双蒸水 4 mL,30% 聚丙烯酰胺溶液 4 mL,

$1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH8.8) 2.5 mL,10% SDS 100 μL ,10% APS 100 μL ,TEMED 4 μL ,混匀,灌胶,封闭,室温聚合。等待约 20 ~ 30 min,用滤纸小心吸干水分。将样品稀释到相同的浓度,体积为 20 μL ,加入 4 μL 上样缓冲液,混匀后在沸水浴中煮沸 5 min。在一泳道中加入蛋白质 Marker 8 μL ,余泳道中全部加入样品。加入电泳缓冲液,连接导线,稳压 80 V,指示剂迁移到浓缩胶与分离胶的界面时,调整电压到 100 V,稳压电泳,直至指示剂迁移到分离胶下缘时,停止电泳;转膜,封闭;一抗(1:1 000)孵育,4 °C 摇床低速摇动过夜孵育,洗涤 3 次。二抗孵育,将二抗(1:2 000)置于 37 °C 恒温摇床上,45 min,洗涤 3 次;ECL 显色,先用显影液进行显影,在用定影液进行定影,然后将胶片扫描后用 Bandscan5.0 软件进行灰度分析。

2.4 统计处理 应用 SPSS 20.0 统计软件进行分析,计数资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据符合正态分布及方差齐性后,应用单因素方差分析进行数据处理, $P < 0.01$ 表明差异有统计学意义。

3 结果

3.1 化痰消瘤方对 Lewis 肺癌小鼠瘤体的抑制作用 与空白组比较,化痰消瘤方组及环磷酰胺组瘤重均显著降低($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 化痰消瘤方对 Lewis 肺癌小鼠瘤体的抑制作用
Table 1 Effect of Huatan Xiaoliu decoction on tumor weight of Lewis lung cancer mice

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	瘤重 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$) / g	抑瘤率 / %
空白	-	3.69 \pm 0.73	-
化痰消瘤方	50	2.29 \pm 0.74 ¹⁾	37.9
环磷酰胺	0.06	2.11 \pm 0.53 ¹⁾	42.8

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$ (表 2 ~ 4 同)。

3.2 化痰消瘤方对 Lewis 肺癌小鼠肺转移灶的影响 与空白组比较,化痰消瘤方组及环磷酰胺组肺转移灶个数均显著降低($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 化痰消瘤方对 Lewis 肺癌小鼠肺转移灶的影响
Table 2 Effect of Huatan Xiaoliu decoction on pulmonary metastasis focuses of Lewis lung cancer mice

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	转移灶 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$) / 个	肺转移灶抑制率 / %
空白	-	2.70 \pm 1.34	-
化痰消瘤方	50	1.40 \pm 1.26 ¹⁾	48.1
环磷酰胺	0.06	1.30 \pm 0.82 ¹⁾	51.8

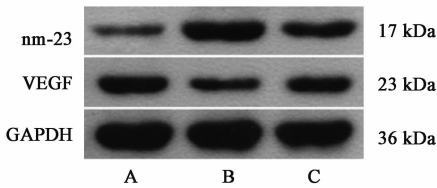
3.3 化痰消瘤方对 Lewis 小鼠肺癌组织 nm-23, VEGF mRNA 表达的影响 与空白组比较,化痰消瘤方组及环磷酰胺组能显著下调 VEGF mRNA 的表达 ($P < 0.01$),能显著上调 nm-23 mRNA 的表达 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 化痰消瘤方对 Lewis 小鼠肺癌组织 nm-23, VEGF mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of Huatan Xiaoliu decoction on VEGF, nm-23 mRNA expressions of Lewis lung cancer mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	VEGF	nm-23
空白	-	0.99 ± 0.12	1.03 ± 0.85
化痰消瘤方	50	0.69 ± 0.10 ¹⁾	2.04 ± 0.99 ¹⁾
环磷酰胺	0.06	0.56 ± 0.10 ¹⁾	2.83 ± 1.08 ¹⁾

3.4 化痰消瘤方对 Lewis 小鼠肺癌组织 nm-23, VEGF 蛋白表达的影响 与空白组比较,化痰消瘤方组及环磷酰胺组能显著下调 VEGF 蛋白的表达 ($P < 0.01$),能显著上调 nm-23 蛋白的表达 ($P < 0.01$)。见图 1,表 4。



A. 空白组; B. 环磷酰胺组; C. 化痰消瘤方组

图 1 化痰消瘤方作用 Lewis 小鼠后肺癌组织 nm-23, VEGF 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of Huatan Xiaoliu decoction on VEGF, nm-23 protein expressions of Lewis lung cancer mice

表 4 化痰消瘤方对 Lewis 小鼠肺癌组织 nm-23, VEGF 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of Huatan Xiaoliu decoction on VEGF, nm-23 protein expressions of Lewis lung cancer mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	VEGF/ GAPDH	nm-23/ GAPDH
空白	-	0.45 ± 0.07	0.10 ± 0.05
化痰消瘤方	50	0.26 ± 0.06 ¹⁾	0.20 ± 0.10 ¹⁾
环磷酰胺	0.06	0.17 ± 0.04 ¹⁾	0.31 ± 0.08 ¹⁾

4 讨论

目前,虽然关于肺癌的研究成果不断更新,但是临床中肺癌患者确诊后多属于中晚期,使得很多治疗方法难以实施,仍以化疗为基础的联合治疗为主,严重影响了患者生存期及生活质量^[18]。近年来,中

医药在肺癌的防治中取得了一定的成果,能够协同其他的一些治疗手段,抑制肿瘤的生成,提高患者的生存期^[19-21]。因此,进一步探究中药复方抑制肺癌生长、转移及其作用机制具有重要的现实意义。

肿瘤临床治疗效果欠佳的一个重要因素是其转移的特性。转移是一个多阶段的过程,包括早期原发癌的生长、新生血管的生成、肿瘤细胞脱落浸润性生长等^[22]。目前认为新生毛细血管可以提供肿瘤生长所需的重要养分,是肿瘤出现侵袭与转移的必要条件之一,而 VEGF 能使内皮细胞的生长加速,同时也能够穿透血管,加速肿瘤转移,是目前已知的最强血管生长因子之一,其包括多个亚型 VEGF-A, B, C, D, E, F 等。经相关实验研究发现,VEGF 蛋白的过度表达与肿瘤细胞的生长、转移、侵袭密切相关,其中 VEGF-B 能与 VEGF-A 相结合促进肿瘤生长转移,VEGF-C, VEGF-D 则与恶性肿瘤发生淋巴道转移密切相关^[23-26]。nm-23 是目前研究发现的重要的抑癌基因,广泛存在于动植物的基因家族中,由 nm-23H-1 ~ nm-23H-10 成员组成^[27]。nm-23 参与二磷酸鸟苷转化,抑制肿瘤细胞微管蛋白的聚合与解聚,影响肿瘤细胞的运动与转移,通过 G 蛋白调控细胞的生长信号,抑制肿瘤细胞的分化与转移^[28]。相关临床研究也发现 nm23 的表达状态与肿瘤的治疗及预后具有相关性^[29]。

化痰消瘤方是在中医“痰证”理论的指导下,以古方半夏泻心汤为基础方化裁而来,也是“痰邪致癌”学术思想的重要体现。本方以半夏辛温入脾胃而兼入肺,行水湿而降逆气,水湿去则脾健而痰涎自消,入肺而调理贮痰之器,燥湿化痰,消痞散结之功为君药,以天南星燥湿化痰散结,白芥子理气化痰,散结消肿,浙贝母止咳化痰散结,共助君药化痰散结之力,共为臣药,佐桔梗宣通肺气,调畅三焦,以祛除壅滞之痰,佐蜂房攻毒散结止痛,以加强君臣药散结之力,生姜,大枣调脾胃,合诸药兼能祛湿化痰为使药,诸药合用,共奏化痰散结消肿之功。

本实验以前期总结的化痰消瘤方在抑制肺癌生长、转移方面的剂量为依据,进一步验证化痰消瘤方的抑瘤、抗肺转移的作用,探究对肺癌组织中 VEGF, nm-23 的影响,探索其作用机制。本研究结果显示,与空白组比较,化痰消瘤方组及环磷酰胺组瘤质量及肺转移灶个数均显著降低,化痰消瘤方能有效的抑制 Lewis 肺癌的生长、转移。采用 Western blot 与 PCR 检测瘤组织中 nm-23, VEGF 的表达,均显示,与空白组比较,化痰消瘤方组及环磷酰胺组能

显著下调 VEGF 蛋白及 mRNA 的表达,能显著上调 nm-23 蛋白及 mRNA 的表达。由此可推论,化痰消瘤方能有效的抑制 Lewis 肺癌的生长与转移,其机制可能与下调 VEGF 的表达,上调 nm-23 的水平有关。

然而,恶性肿瘤的发生发展是一个复杂的生物学过程,化痰消瘤方为中药复方制剂,更确切的作用机制,有待于进一步的深入研究。

[参考文献]

[1] SUN J, MENG D, LI L, et al. N-terminal truncated carboxypeptidase E expression is associated with poor prognosis of lung adenocarcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(6): 4659-4664.

[2] Hanahan D, Weinberg R A. The hallmarks of cancer [J]. *Cell*, 2000, 100(1): 57-70.

[3] 陈滨海, 张雅丽, 姚成, 等. 基于肿瘤微环境学说探讨肺癌转移与痰毒的关系[J]. *中华中医药学刊*, 2015, 33(9): 2079-2081.

[4] 蒋树龙, 花宝金. 肿瘤发生发展痰瘀本质及其与肿瘤微环境关系探析[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2015, 21(11): 1417-1419.

[5] 华彩红, 尹山兰, 郝尚辉, 等. 祛瘀化痰汤对多囊卵巢综合征患者卵巢多囊样改变、内分泌及代谢的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(9): 179-183.

[6] 王国娟, 孙珏, 余文燕, 等. 化痰散结法治疗肿瘤的研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(1): 333-338.

[7] 蒋艳玲, 郑锡军, 孙宏新. 化痰消瘤方含药血清对肺腺癌 A549 细胞增殖的影响[J]. *中医学报*, 2017, 32(2): 171-173.

[8] 蒋艳玲, 郑锡军, 孙宏新. 化痰消瘤方抗 Lewis 荷瘤小鼠肺癌转移及对 CD44、CD44v6、E-cad 表达的影响[J]. *中医学报*, 2017, 32(6): 909-913.

[9] 蒋艳玲, 索丹凤, 孙宏新. 化痰消瘤方对 lewis 肺癌荷瘤小鼠瘤组织中 P-gp、GSH 表达的影响[J]. *中医学报*, 2017, 32(7): 1134-1136.

[10] 段晓芳. 化痰消瘤方联合化疗治疗晚期非小细胞肺癌的临床疗效观察[D]. 郑州: 河南中医学院, 2015.

[11] 左涛, 黄杰, 谢颂平, 等. VEGF-C 和 E-cadherin 在非小细胞肺癌中的表达及意义[J]. *肿瘤防治研究*, 2013, 40(1): 72-75.

[12] 高晓来. 肺癌患者血清 Survivin 和 VEGF 的表达及其临床意义[J]. *临床肺科杂志*, 2012, 17(1): 109-110.

[13] 张祎捷, 李现东, 陈娜, 等. VEGF 在肺癌患者血清和病变组织中的表达及其与疾病预后的关系[J]. *第四军医大学学报*, 2008, 29(11): 1037-1040.

[14] Prabhu V V, Siddikuzzaman, Grace V M, et al. Targeting tumor metastasis by regulating nm23 gene expression [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(8): 3539-3548.

[15] 罗小梅, 周嘉黎, 杨春晓, 等. 健康汉族人群 nm23 基因多态性对其 mRNA 表达的影响[J]. *中国医院药学杂志*, 2015, 35(24): 2213-2218.

[16] 庞德湘, 周楠, 边至慰. 肺金生方对 Lewis 肺癌小鼠 VEGF-C 及 nm23 表达的实验研究[J]. *浙江中医杂志*, 2012, 47(1): 18-19.

[17] 陈华圣, 许爱华, 沈婷婷, 等. 六君祛痰解毒汤及其拆方对 C57BL/6J 小鼠 Lewis 肺癌转移的抑制作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(6): 249-253.

[18] Schiller J H, Harrington D, Belani C. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer[J]. *New England J Med*, 2002, 346(2): 92-96.

[19] 姜秋雯, 陈涛. 华蟾素抗恶性肿瘤的机制及不良反应的研究[J]. *时珍国医国药*, 2015, 26(11): 2737-2739.

[20] 李元滨, 林丽珠. 中药多靶点逆转肺癌多药耐药机制研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(8): 232-236.

[21] 谢利, 刁本恕, 刁灿阳, 等. 扶正减毒抗癌方防治非小细胞肺癌放疗治疗急性肺损伤的临床研究[J]. *河北中医药学报*, 2016, 31(3): 25-27.

[22] 曾益新. 肿瘤学[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 230-287.

[23] Sands M, Howell K, Costello C M, et al. Placenta growth factor and vascular endothelial growth factor B expression in the hypoxic lung[J]. *Respir Res*, 2011, 12(1): 1-17.

[24] 陶绍霖, 谭群友. VEGF-C/VEGF-D-VEGFR-3 信号通路在淋巴管生成及肺癌淋巴转移中作用机制的研究进展[J]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2011, 5(3): 796-799.

[25] Alitalo A, Detmar M. Interaction of tumor cells and lymphatic vessels in cancer progression[J]. *Oncogene*, 2012, 31(42): 4499-508.

[26] ZHANG L, Higashi K, Ishigaki Y, et al. Assessment of VEGF-D expression measured by immunohistochemical staining and F-18 FDG uptake on PET as biological prognostic factors for recurrence in patients with surgically resected lung adenocarcinoma[J]. *Ann Nucl Med*, 2010, 24(7): 533-540.

[27] Sadek C M, Jimenez A, Damdimopoulos A E, et al. Characterization of human thioredoxin-like 2. A novel microtubule-binding thioredoxin expressed predominantly in the cilia of lung airway epithelium and spermatid manchette and axoneme[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(15): 13133-13142.

[28] 唐泽飞, 李春鸣. nm23 重组质粒与肿瘤关系研究进展[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2016, 30(1): 12-14.

[29] 唐小军, 周清华, 张尚福, 等. nm23、上皮型钙粘素和 β -连环素在非小细胞肺癌中的表达及其与转移和预后的关系[J]. *癌症*, 2005, 24(5): 616-621.

[责任编辑 张丰丰]