

益肺解毒汤对人肺腺癌 A549 细胞侵袭迁移的影响及相关机制

王珊珊¹, 赵新鲜², 郭立中^{1*}

(1. 南京中医药大学, 南京 210029; 2. 南京市江宁医院, 南京 210029)

[摘要] **目的:**观察益肺解毒汤对肺癌 A549 细胞侵袭转移的影响,并探讨该方对细胞上皮-间充质转化(EMT)的影响及其作用机制。**方法:**常规培养肺癌 A549 细胞,CoCl₂ 化学模拟肺癌 A549 细胞缺氧微环境,设空白组,以 150 μmol·L⁻¹ CoCl₂, 150 μmol·L⁻¹ CoCl₂ + 15 g·L⁻¹ 益肺解毒汤,15 g·L⁻¹ 益肺解毒汤处理细胞,镜下观察细胞形态学改变,transwell 实验观察细胞侵袭能力;细胞划痕实验测细胞迁移能力;蛋白免疫印迹法(Western blot)测定 A549 细胞上皮细胞-间充质转化(EMT)过程中上皮细胞、间质细胞标志物 E-钙黏蛋白(E-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)表达,转录因子 Snail 蛋白表达,信号分子 β-链蛋白(β-catenin)、磷酸化糖原合成酶激酶-3(p-gsk-3β)表达。**结果:**缺氧可诱导 A549 细胞发生形态改变,益肺解毒汤可抑制缺氧诱导的形态改变。与空白组比较,CoCl₂ 组细胞侵袭和迁移能力增强(P < 0.05);与 CoCl₂ 组比较,CoCl₂ + 益肺解毒汤组的细胞侵袭能力明显减弱(P < 0.01),迁移能力亦减弱(P < 0.05)。与空白组比较,CoCl₂ 组细胞 EMT 相关蛋白,E-cadherin 表达下调,Vimentin,Snail 表达上调(P < 0.05),说明缺氧使细胞发生了 EMT;与 CoCl₂ 组比较,CoCl₂ + 益肺解毒汤组可上调 E-cadherin,p-gsk-3β,下调 Vimentin,Snail,β-catenin 蛋白表达(P < 0.05)。**结论:**益肺解毒汤能抑制缺氧诱导的 A549 细胞的形态变化、侵袭及迁移能力,还能抑制缺氧诱导的 EMT 的发生,其机制可能与 Wnt/β-catenin 通路有关。

[关键词] 中药复方; 益肺解毒汤; 上皮-间充质转化; Wnt/β-链蛋白信号通路

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)22-0108-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017220108

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170809.1125.030.html>

[网络出版时间] 2017-08-09 11:25

Intervention Effect and Mechanism of Yifei Jiedu Decoction in Invasion and Metastasis of Lung Cancer Cell A549

WANG Shan-shan¹, ZHAO Xin-xian², GUO Li-zhong^{1*}

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China; 2. The Affiliated Jiangning Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the intervention effect and mechanism of Yifei Jiedu decoction on the invasion and metastasis of lung cancer adenocarcinoma A549 cells. **Method:** A549 cells were cultured and treated with 150 μmol·L⁻¹ CoCl₂, 150 μmol·L⁻¹ CoCl₂ + 15 g·L⁻¹ Yifei Jiedu decoction, and 15 g·L⁻¹ Yifei Jiedu decoction, respectively. Untreated cells were used for normal control. Morphological changes were observed under inverted microscope. Wound scratch assay were performed to further identify if Yifei Jiedu decoction could reduce the migration ability of A549 cells. Transwell was used to explore the intervention effect of Yifei Jiedu decoction on the invasion and movement of A549 cells. Expressions of E-cadherin, Vimentin, Snail, β-catenin and p-gsk-3β were examined by Western blot. **Result:** CoCl₂ can induce morphological changes in A549 cells, which were accompanied by up-regulation of E-cadherin expression and down-regulation of Vimentin. Wound scratch assay

[收稿日期] 20170305(010)

[基金项目] 江苏省普通高校科研创新计划项目(KYZZ16_0408)

[第一作者] 王珊珊,在读博士,从事名老中医经验传承及疑难疾病规律研究,Tel:13813017819,E-mail:shanney820@163.com

[通讯作者] *郭立中,博士,教授,主任医师,从事名老中医经验传承及疑难疾病规律研究,Tel:025-86798189,E-mail:lzg1073@sina.com

indicated that Yifei Jiedu decoction could reduce the migration ability of A549 cells. Transwell assay showed that Yifei Jiedu decoction could inhibit the invasion of A549 cells ($P < 0.05$). Western blot showed that Yifei Jiedu decoction could up-regulate the expressions of E-cadherin, p-gsk-3 β protein and down-regulate the expressions of Vimentin, Snail and β -catenin protein respectively ($P < 0.05$). **Conclusion:** Yifei Jiedu decoction could inhibit the migration and invasion of human adenocarcinoma A549 cells *via* regulation of β -catenin expression.

[**Key words**] traditional Chinese medicine compound; Yifei Jiedu decoction; epithelial-mesenchymal transition (EMT); Wnt/ β -catenin

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一。近年来肺癌的发病率及死亡率逐年上升,其死亡率居全部恶性肿瘤的首位^[1],是当今威胁人类健康与生命最大的恶性肿瘤。随着现代医疗水平的迅速发展,肺癌的综合治疗手段也取得了显著进步,治疗有效率得以提高,生存期也有所延长,但 5 年生存率仍不超过 17%^[2]。肺癌早期缺乏特异性症状、体征,容易被忽视,大多数患者就诊时分期较晚,失去外科手术机会;不少患者在接受手术、放化疗等治疗后,体质下降,免疫功能减弱,容易出现肺癌的复发、转移,预后较差。大量实践证明,在西医综合治疗的基础上,配合中医中药,有助于患者体质恢复、减轻治疗的毒副作用、增强疗效,减少肺癌的复发和转移,改善患者的生活质量,并延长生存期。

浸润性生长和远处转移,是癌细胞重要的生物学特性^[3]。大多数非小细胞型肺癌(NSCLC)患者的死亡原因并非由原发病变引起,而是由于随之出现的晚期转移^[4]。恶性肿瘤的转移与其侵袭和迁移能力密切相关,能否减弱 NSCLC 细胞的侵袭和迁移能力,是衡量药物抗肿瘤转移作用的重要指标。上皮源性肿瘤细胞在侵袭和转移的过程中往往伴随着上皮细胞形态特征的消失和向间叶细胞表型特征的转化,上皮-间充质转化(EMT)的发生使癌细胞侵袭和迁移能力增强^[5]。

国医大师周仲瑛教授从事中医临床、教学和科研 60 载,长期致力于内科疑难疾病的研究,经过多年的探索总结,周教授先后明确提出“癌毒”^[6]学术思想及从“痰瘀郁毒”治疗恶性肿瘤的基本思路^[7],对肺癌的治疗已形成较为完善的理法方药体系,经治肺癌患者众多,疗效肯定,益肺解毒汤是周教授治疗肺癌的核心方。本研究旨在探讨该方抗肺癌转移的作用及其相关机制,以人肺腺癌 A549 细胞为研究对象,以 CoCl_2 化学模拟缺氧,体外研究该方对缺氧诱导的细胞侵袭、迁移能力及 EMT 的影响。

1 材料

1.1 药物 益肺解毒汤由北沙参 12 g,麦冬 10 g,

太子参 12 g,泽漆 15 g,山慈菇 12 g,猫爪草 20 g,白僵蚕 10 g,肿节风 20 g,白花蛇舌草 20 g,仙鹤草 15 g 组成,药物购于南京中医药大学国医堂门诊部,经南京中医药大学杨连云教授鉴定为正品。

1.2 细胞系及细胞培养 人肺腺癌 A549 细胞由江苏省中医院中心实验室馈赠。

1.3 试剂 RPMI 1640 培养基,胰蛋白酶(南京凯基生物技术公司,批号分别为 20160824,20160624);氯化钴六水合物($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,美国 Sigma 公司,批号 SLBP9948Z);胎牛血清(美国 Biotech 公司,批号 P150407);ECL 发光试剂盒(南京康为世纪有限公司,批号 2514K);matrigel 胶(美国 BD 公司,批号 BD 354008);transwell 小室(美国 Corning 公司,批号 15416032);波形蛋白(Vimentin), β -链蛋白(β -catenin),磷酸化-Smad2/3(p-Smad2/3),转录因子 Snail,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)兔单克隆抗体(沈阳万类生物公司,批号分别为 WL01960,WL0962a,WL02305,WL01863,WL01547);E-钙黏蛋白(E-cadherin),磷酸化糖原合成酶激酶-3(p-gsk-3 β)兔单克隆抗体(美国 CST 公司,批号分别为 3195,5558);HRP 偶联二抗(上海碧云天公司,批号 A0208)。

1.4 仪器 SC06AD-2 型恒温 CO_2 培养箱, Micro21R 型低温超速离心机(德国 Thermo Scientific 公司);CX31 型荧光倒置显微镜(日本 Olympus 公司);GIS 型全自动凝胶成像及分析系统(上海 Tannon 公司);Power Poc 型 Western blot 电泳仪及转膜仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 药物提取 所有药物煎煮前用双蒸水浸泡 30 min,武火煮沸后,文火煎煮 30 min,煎煮 2 次,将 2 次药汁混合,进一步浓缩,微波真空干燥,高温高压灭菌,以 $12\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min,小心收集上清液,0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,配制成相当于生药 0.5 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 水提液,置于 $-20\ ^\circ\text{C}$ 保存备用。

2.2 细胞培养 细胞用含 10% 胎牛血清,1% 青-链

霉素的 RPMI 1640 培养基,于 37 °C 5% CO₂ 饱和湿度下培养箱中培养,细胞呈单层贴壁生长。实验均取对数生长期的细胞。

2.3 分组及给药 取对数生长期 A549 细胞,胰酶消化液消化,用无血清 RPMI 1640 培养液稀释至细胞约 5 × 10⁶ 个/mL,细胞接种于 6 孔板中,每孔 2 mL,无血清培养基饥饿培养 12 h,再分别以 150 μmol·L⁻¹ CoCl₂, 150 μmol·L⁻¹ CoCl₂ + 15 g·L⁻¹ 益肺解毒汤, 15 g·L⁻¹ 益肺解毒汤处理细胞并设空白组,培养 48 h 后镜下观察 4 组细胞形态学变化。益肺解毒汤质量浓度由预实验确定,即益肺解毒汤单独处理细胞 48 h 时半数抑制浓度 (IC₅₀) 对应的中药浓度。

2.4 transwell 法检测细胞侵袭能力 将 matrigel 基质胶放在 4 °C 过夜,所有枪头和管子均于 -20 °C 过夜预冷。用无血清的 RPMI 1640 培养液以 1:3 稀释基质胶,取 40 μL 平铺 transwell 小室中,放在细胞培养箱孵育 40 min 后,吸净小室中残余的培养基。取对数生长期的细胞,调整细胞密度 5 × 10⁵ 个/mL,上室按 2.3 项分 4 组制备无血清细胞悬液,每组设 3 个复孔,每孔加 200 μL,下室加入含 10% FBS 的完全培养基 500 μL,37 °C 培养 24 h。用棉签擦去小室内底部未穿膜的细胞,95% 乙醇固定小室外底部细胞,室温下风干,用 0.1% 结晶紫染色,显微镜下观察各组细胞穿过小室基质胶的情况,统计穿过的细胞数目,并拍照。

2.5 细胞划痕实验检测细胞迁移能力 分组同 2.3 项,调整细胞密度为 5 × 10⁵ 个/mL,接种于 6 孔板,第 2 天用 100 μL 枪头对细胞进行“一”字形划痕,洗去划下细胞,显微镜下拍照纪录划痕初始宽度。加药同 2.3 项,置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养 12 h,在倒置显微镜下拍照,每组设 3 个复孔。迁移率 = [(干预组迁移的距离/空白组迁移的距离) - 1] × 100%。

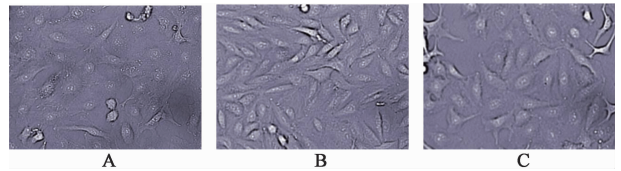
2.6 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测相关蛋白表达 分组及给药同 2.3 项,培养 48 h 后分别提取 4 组细胞总蛋白,测定蛋白浓度,上样,电泳,湿转法转膜,用 1% BSA 封闭 1 h 后加入相应一抗(目的蛋白抗体 1:500 ~ 1:1 000, GAPDH 1:2 000),4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜;加入二抗(1:2 000)室温孵育 1 h, TBST 洗膜;ECL 化学发光,经凝胶成像仪显影,测定灰度值。以目的蛋白条带/GAPDH 条带表示蛋白含量相对表达。

2.7 统计学方法 统计学方法采用 SPSS 19.0

统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 A549 细胞形态变化的影响 空白组中 A549 细胞形态呈铺路石样改变,与空白组比较, CoCl₂ 组 A549 细胞由铺路石样转变成梭形,表现为间质细胞特征,与 CoCl₂ 组比较, CoCl₂ + 益肺解毒汤组 A549 细胞的间质化程度较低。见图 1。



A. 空白组; B. CoCl₂ 组; C. CoCl₂ + 益肺解毒汤组

图 1 益肺解毒汤对细胞形态影响(倒置显微镜, ×400)

Fig.1 Effect of Yifei Jiedu decoction on morphological changes of A549 cells (inverted microscope, ×400)

3.2 对缺氧诱导的 A549 细胞侵袭能力的影响 缺氧条件下培养 24 h,与空白组比较, CoCl₂ 组穿膜的细胞数增多 ($P < 0.05$),提示缺氧条件下, A549 细胞侵袭能力增强;与 CoCl₂ 组比较, CoCl₂ + 益肺解毒汤组, 益肺解毒汤两组穿过基膜的细胞数减少 ($P < 0.05$)。见表 1,图 2。

表 1 益肺解毒汤对 A549 细胞侵袭能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of Yifei Jiedu decoction on cell invasion of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度	穿膜细胞/个
空白	-	169.00 ± 31.33
CoCl ₂	150 μmol·L ⁻¹	264.00 ± 21.33 ¹⁾
CoCl ₂ + 益肺解毒汤	150 μmol·L ⁻¹ + 15 g·L ⁻¹	146.33 ± 19.56 ²⁾
益肺解毒汤	15 g·L ⁻¹	150.67 ± 30.22 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$;与 CoCl₂ 组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2,3 同)。

3.3 对缺氧诱导的 A549 细胞迁移能力的影响 缺氧条件下培养 12 h,与 CoCl₂ 组比较, CoCl₂ + 益肺解毒汤组的细胞划痕愈合程度降低 ($P < 0.05$)。见表 2,图 3。

3.4 对缺氧诱导的 A549 细胞 EMT 相关蛋白的影响 与空白组比较, CoCl₂ 组上皮标志蛋白 E-cadherin 出现下调,间质标志物 Vimentin,转录因子 Snail 蛋白上调 ($P < 0.05$),说明缺氧条件下 A549 细胞发生 EMT;与 CoCl₂ 组比较, CoCl₂ + 益肺解毒汤组 E-cadherin 蛋白表达上调, Vimentin, Snail 的蛋白表达下调 ($P < 0.05$)。与 CoCl₂ 组比较, CoCl₂ +

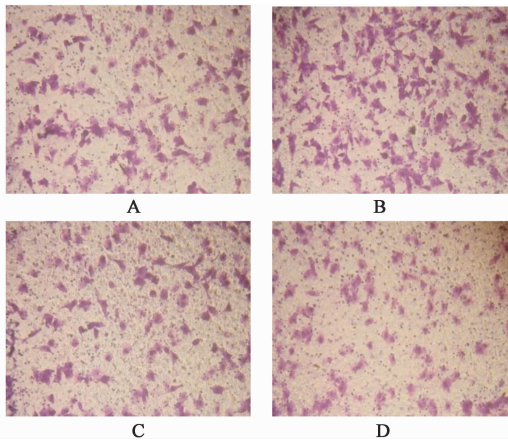


图 2 益肺解毒汤对 A549 细胞侵袭能力的影响 (transwell, ×200)

Fig. 2 Effect of Yifei Jiedu decoction on cell invasion of A549 cells (transwell, ×200)

表 2 益肺解毒汤对 A549 细胞迁移能力的影响 (n = 3)

Table 2 Effect of Yifei Jiedu decoction on cell migration of A549 cells (n = 3)

组别	浓度	迁移距离 ($\bar{x} \pm s$)/mm	迁移率 /%
空白	-	6.23 ± 2.16	-
CoCl ₂	150 μmol·L ⁻¹	11.01 ± 2.67 ¹⁾	76.63
CoCl ₂ + 益肺解毒汤	150 μmol·L ⁻¹ + 15 g·L ⁻¹	4.95 ± 1.03 ²⁾	-20.59 ²⁾
益肺解毒汤	15 g·L ⁻¹	4.33 ± 1.16	-30.48

益肺解毒汤组 β-catenin 蛋白表达下调 ($P < 0.05$), p-gsk-3β 蛋白表达上调 ($P < 0.05$)。见图 4, 表 3。

4 讨论

由于空气污染、人口老龄化等因素,我国的肺癌发病率逐年上升。2009 年肺癌男女年龄标化死亡率分别为 29.15/10 万,12.58/10 万,男女肺癌年龄标化发病率和死亡率均居各类癌症之首,严重影响了我国居民健康^[8]。如何有效的防止肺癌转移是临床上面临的重大难题之一。

EMT 是指上皮细胞通过特定程序转化为具有间质表型细胞的生物学过程,其主要的特征有 E-cadherin 表达下调,细胞角蛋白细胞骨架转变成以 Vimentin 为主的细胞骨架,及形态上转变成具有间充质细胞的特点等。EMT 后,上皮细胞失去了其原有的细胞极性以及与基底膜连接等上皮表型,获得了高侵袭与迁移能力^[9-10]。因此,EMT 是上皮来源的癌细胞其侵袭和迁移能力增强的重要原因。而恶性肿瘤的转移与肿瘤细胞的侵袭和迁移能力密切相关。

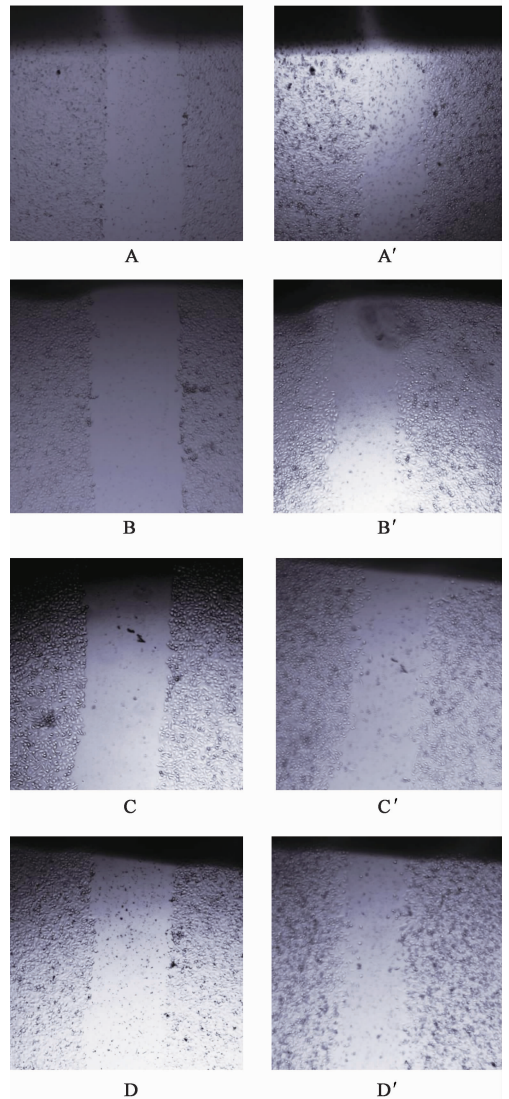


图 3 益肺解毒汤对 A549 细胞迁移能力的影响 (倒置显微镜, ×100)

Fig. 3 Effect of Yifei Jiedu decoction on cell migration of A549 cells (inverted microscope, ×100)

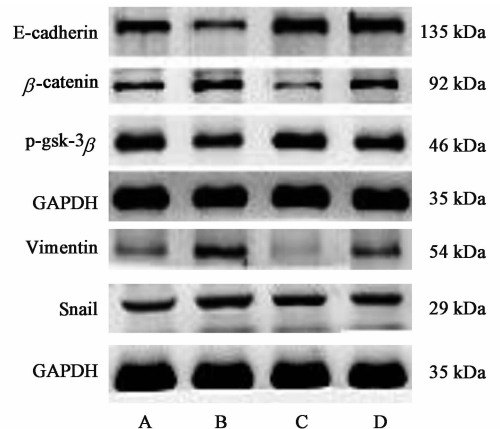


图 4 A549 细胞 EMT 过程中标志物及调节因子蛋白电泳

Fig. 4 Electrophoresis of proteins in A549 cells

表 3 益肺解毒汤对 A549 细胞 EMT 过程中标志物及调节因子的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of Yifei Jiedu decoction on protein expression of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度	E-cadherin/GAPDH	Vimentin/GAPDH	Snail/GAPDH	β -catenin/GAPDH	p-gsk-3 β /GAPDH
空白	-	0.461 \pm 0.048	0.264 \pm 0.031	0.279 \pm 0.012	0.061 \pm 0.004	0.496 \pm 0.038
CoCl ₂	150 μ mol·L ⁻¹	0.249 \pm 0.024 ¹⁾	0.396 \pm 0.038 ¹⁾	0.426 \pm 0.020 ¹⁾	0.141 \pm 0.026 ¹⁾	0.314 \pm 0.027 ¹⁾
CoCl ₂ + 益肺解毒汤	150 μ mol·L ⁻¹ + 15 g·L ⁻¹	0.535 \pm 0.039 ²⁾	0.191 \pm 0.094 ²⁾	0.314 \pm 0.069 ²⁾	0.072 \pm 0.007 ²⁾	0.558 \pm 0.033 ²⁾
益肺解毒汤	15 g·L ⁻¹	0.594 \pm 0.109	0.267 \pm 0.024	0.339 \pm 0.010	0.087 \pm 0.018	0.426 \pm 0.014

益肺解毒汤方中北沙参、麦冬养阴清肺,太子参益气养阴,泽漆、山慈菇、猫爪草化痰解毒散结,僵蚕祛风化痰,白花蛇舌草清热解毒,仙鹤草补虚解毒。方中北沙参、麦冬^[11]、猫爪草^[12]、山慈菇^[13-14]、仙鹤草^[15]、白僵蚕^[16]、泽漆^[17]等都有一定的抗肿瘤及抑制肿瘤转移的作用。

缺氧是癌组织发展到一定阶段后的生存环境,能影响恶性肿瘤转移^[18]。研究表明,缺氧会影响瘤体的血管生成,促进其代谢和侵袭、转移^[19-21]。本研究以 CoCl₂ 化学模拟缺氧微环境,采用 transwell 侵袭实验检测益肺解毒汤对缺氧诱导的肺癌 A549 细胞侵袭能力的影响,结果提示 CoCl₂ + 益肺解毒汤组细胞侵袭能力低于 CoCl₂ 组。同样,细胞划痕实验结果也表明 CoCl₂ + 益肺解毒汤组细胞的迁移率明显低于 CoCl₂ 组。体外研究提示,益肺解毒汤有潜在的抑制肺癌转移的作用,但体内抑制肺癌转移的作用需行进一步研究证实。CoCl₂ 组细胞失去自身上皮细胞的特征,出现长梭形间质细胞改变,Western blot 结果显示,与 CoCl₂ 组比较,CoCl₂ + 益肺解毒汤组上皮细胞标志物 E-cadherin 蛋白表达上调,间质细胞标志物 Vimentin 蛋白表达下调,并且转录因子 Snail 蛋白表达下降,提示益肺解毒汤能抑制缺氧诱导的肺癌 A549 细胞 EMT 的发生。

近年来研究表明缺氧可通过调节多种信号通路如转化生长因子(TGF)- β , Notch, Wnt/ β -catenin 等促进肿瘤细胞发生 EMT^[22]。Wnt/ β -catenin 是经典的 Wnt 通路,其与细胞生长、分化、凋亡及胚胎发育等关系密切。Wnt/ β -catenin 通路激活可降低 E-cadherin 的表达,减少转录因子 Slug, Snail, Twist 等的表达,使上皮细胞极性和连接缺失,促使细胞发生 EMT,提高细胞的迁移和侵袭能力^[23],当 Wnt 信号被激活后,Wnt 蛋白与 Frizzled, LRP5/6 结合^[24],信号经 DVL 传至 gsk-3 β 使“降解复合物”失活,细胞质中游离的 β -catenin 不能被降解,进入细胞核,与核内转录因子 T 细胞因子/淋巴样增强因子(TCF/LEF)结合,激活 Wnt 信号相关靶基因的表达。本研

究发现,与空白组比较,CoCl₂ 组 β -catenin 蛋白表达增加,p-gsk-3 β 蛋白表达下降,说明缺氧对 Wnt/ β -catenin 通路有激活作用;与 CoCl₂ 组比较,CoCl₂ + 益肺解毒汤组 β -catenin 的蛋白表达下调,p-gsk-3 β 蛋白表达上调,因此本研究显示益肺解毒汤抑制缺氧诱导的 A549 细胞的侵袭、迁移及 EMT 机制可能与抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路有关,为临床应用该方防治肺癌转移提供依据。

综上所述,益肺解毒汤能抑制肺癌细胞的侵袭、迁移,还具有抑制肺癌细胞 EMT 的作用,其机制可能与调节 Wnt/ β -catenin 信号通路有关,尚需进一步体内实验验证,从蛋白水平和基因水平上深入研究,为肺癌的中医药治疗提供新的依据。

本实验采用中药复方水提物直接作用于细胞的方法,这种方法虽然存在不少的争议和不足,但在一定程度上亦能说明问题,国内外也有不少学者采用此方法干预细胞^[25-26],但需筛选中药不同部位有效成分单体同时验证,笔者现阶段由于经费不足等因素无法深入、细化研究,后期将寻找出主要的成分单体进行探索、验证。

[参考文献]

[1] Rebecca L, Siegel M P H, Kimberly D, et al. Cancer statistics, 2017 [J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(1): 7-30.

[2] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(1): 5-29.

[3] LIU D, FENG X, WU X, et al. Tumor suppressor in lung cancer (TSLC1), a novel tumor suppressor gene, is implicated in the regulation of proliferation, invasion, cell cycle, apoptosis, and tumorigenicity in cutaneous squamous cell carcinoma [J]. Tumor Biol, 2013, 34(6): 3773-3783.

[4] DENG X, MA Q, ZHANG B, et al. Migration-stimulating factor (MSF) is over-expressed in non-small cell lung cancer and promotes cell migration and invasion in A549 cells over-expressing MSI [J]. Exp Cell Res, 2013, 319(2013): 2545-2553.

[5] XIAO D, HE J. Epithelial mesenchymal transition and

- lung cancer[J]. *J Thorac Dis*, 2010, 2(3):154-159.
- [6] 程海波, 吴勉华. 周仲瑛教授“癌毒”学术思想探析[J]. *中华中医药杂志*, 2010, 25(6):866-869.
- [7] 周仲瑛, 程海波, 周学平, 等. 中医药辨治肿瘤若干理念问题的探讨[J]. *南京中医药大学学报*, 2014, 30(2):101-104.
- [8] 陈万青, 张思维, 邹小农. 中国肺癌发病死亡的估计和流行趋势研究[J]. *中国肺癌杂志*, 2010, 13(5):488-493.
- [9] Tam W L, Weinberg R A. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer[J]. *Nat Med*, 2013, 19(11):1438-1449.
- [10] Todosi A M, Gavrilescu M M, Anitei G M, et al. Colon cancer at the molecular level-usefulness of epithelial-mesenchymal transition analysis[J]. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*, 2012, 116(4):1106-1111.
- [11] 舒琦瑾, 吴良村. 新加沙参麦冬汤抗肿瘤的实验研究[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2002, 8(4):34-36.
- [12] 童晔玲, 杨锋, 戴关海, 等. 猫爪草总皂苷对人非小细胞肺癌 A549 细胞裸鼠移植瘤生长及 EGFR、MMP-9 表达的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2015, 31(1):179-181.
- [13] 阮小丽, 施大文. 山慈菇的抗肿瘤级抑菌作用[J]. *中药材*, 2009, 32(12):1886-1889.
- [14] 刘琦, 程旭锋, 张新峰, 等. 山慈菇-蜂房药对抑制人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞体外侵袭转移的机理研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2014, 2(4):389-392.
- [15] 武晓丹, 金哲雄, 宛春雷, 等. 仙鹤草诱导肝癌 BEL-7402 细胞凋亡的研究[J]. *航空航天医药*, 2010, 21(6):844-846.
- [16] Woyengo T A, Ramprasath V R, Jones P J. Anticancer effects of phytosterols [J]. *Eur J Clin Nutr*, 2009, 63(7):813-820.
- [17] 穆淑珍, 尚上, 晏晨, 等. 黔产药用植物泽漆中化学成分及其抗肿瘤活性研究[J]. *中药材*, 2013, 36(7):1092-1096.
- [18] 严雪冰. 结直肠癌中肿瘤微环境对上皮细胞间质转化的调控机制研究[J]. *医学综述*, 2014, 20(10):1781-1783.
- [19] Hockel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic and molecular aspects [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2001, 93(4):266-760.
- [20] WANG L Y, LIU Y P, CHEN L G, et al. Pyruvate kinase M2 plays a dual role on regulation of the EGF/EGFR signaling *via* E-cadherin-dependent manner in gastric cancer cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6):e67542.
- [21] 蒋树龙, 花宝金. JAK2/STAT3/SOCS3 信号通路与肿瘤转移[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2014, 21(6):698-702.
- [22] DU R, HUANG C, BI Q, et al. URG11 mediates hypoxia-induced epithelial-to-mesenchymal transition by modulation of E-cadherin and beta-catenin[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 391(1):135-141.
- [23] Stemmer V, de Craene B, Berx G, et al. Snail promotes Wnt target gene expression and interacts with beta-catenin[J]. *Oncogene*, 2008, 27(37):5075-5080.
- [24] Klaus A, Birchmeier W. Wnt signaling and its impact on development and cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(5):387-398.
- [25] YANG M D, Chiang Y M, Higashiyama R, et al. Rosmarinic acid and baicalin epigenetically derepress Ppar γ in hepatic stellate cells for their anti-fibrotic effect [J]. *Hepatology*, 2012, 55(4):1271-1281.
- [26] LIN X, XU W, SHAO M, et al. Shenling Baizhu San suppresses colitis associated colorectal cancer through inhibition of epithelial-mesenchymal transition and myeloid-derived suppressor infiltration [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2015, doi: 10.1186/s12906-015-0649-9.

[责任编辑 张丰丰]