

基于HGF/C-Met信号通路探讨乌梅丸对寒热错杂证 Lewis肺癌小鼠的抑癌作用及机制

俞贇丰¹, 上官雪丽¹, 李新^{2*}

(1. 湖南中医药大学, 长沙 410208;

2. 湖南中医药大学第二附属医院, 长沙 410005)

[摘要] 目的: 基于肝细胞生长因子及其受体(HGF/C-Met)信号通路探讨乌梅丸对寒热错杂证Lewis肺癌小鼠的抑癌效果及作用机制。方法: 将20只健康雄性小鼠分为正常组、模型组、顺铂组和乌梅丸组, 每组5只。通过丙硫氧嘧啶+知母石膏水煎液+番泻叶灌胃、冰水游泳与干酵母混悬液皮下注射, 联合Lewis细胞悬液右侧腋窝皮下注射的方式制备寒热错杂证Lewis肺癌小鼠模型。模型制备完成后, 顺铂组予以4.0 mg·kg⁻¹顺铂腹腔注射, 乌梅丸组予以12.5 mL·kg⁻¹乌梅丸灌胃, 模型组予以等体积蒸馏水灌胃, 连续6周。取材检验, 测量和计算瘤质量、瘤体积、抑癌率和抑制肺癌转移率, 采用苏木素-伊红(HE)染色观察肺癌组织病理学形态, 采用免疫组化法分析肿瘤组织生长状态, 采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测HGF、C-Met mRNA表达, 采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测HGF、C-Met、存活素(Survivin)和X连锁凋亡抑制蛋白(XIAP)的蛋白表达。结果: 与正常组比较, 模型组HGF、C-Met mRNA表达显著升高($P<0.01$), HGF、C-Met、Survivin和XIAP的蛋白表达显著升高($P<0.01$)。与模型组比较, 乌梅丸组的阳性细胞比率、阳性细胞密度、阳性评分降低($P<0.05$), 组织化学评分、瘤质量、瘤体积显著降低($P<0.01$), HGF、C-Met mRNA表达显著降低($P<0.01$), HGF、C-Met、Survivin和XIAP的蛋白表达显著降低($P<0.01$)。与模型组比较, 顺铂组的阳性细胞率、阳性细胞密度明显降低($P<0.05$), 阳性评分、瘤质量、瘤体积显著降低($P<0.01$), HGF、C-Met mRNA表达显著降低($P<0.01$), HGF、C-Met、Survivin、XIAP蛋白表达显著降低($P<0.01$); 组织化学评分相当, 差异无统计学意义。与顺铂组比较, 乌梅丸组HGF mRNA表达升高($P<0.01$); 阳性细胞率、阳性细胞密度、组织化学评分、阳性评分、瘤质量、瘤体积相当, C-Met mRNA表达及HGF、C-Met、Survivin、XIAP蛋白表达相当, 差异均无统计学意义。结论: 乌梅丸能够通过抑制HGF/C-Met信号通路减缓寒热错杂证Lewis肺癌小鼠的肺癌进展。

[关键词] 乌梅丸; 寒热错杂; 肺癌; 肝细胞生长因子及其受体(HGF/C-Met)

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R259; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)21-0032-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.202201722

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220719.1659.004.html>

[网络出版日期] 2022-07-20 10:29

Effect and Mechanism of Wumeiwan Against Lewis Lung Cancer in Mice with Syndrome of Cold and Heat in Complexity Based on HGF/C-Met Signaling Pathway

YU Yunfeng¹, SHANGGUAN Xueli¹, LI Xin^{2*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

2. The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410005, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and mechanism of Wumeiwan against Lewis lung cancer in mice with syndrome of cold and heat in complexity based on hepatocyte growth factor/mesenchymal-epithelial transition factor (HGF/C-Met) signaling pathway. **Method:** Twenty healthy male mice were classified into blank group, model group (equivalent volume of distilled water, *ig*), cisplatin group (4.0 mg·kg⁻¹

[收稿日期] 2021-11-30

[基金项目] 湖南省教育厅科学研究项目(16A161)

[第一作者] 俞贇丰, 硕士, 医师, 从事中医药防治脾胃病研究, E-mail: 1091047331@qq.com

[通信作者] * 李新, 硕士, 副教授, 从事中医药防治呼吸系统疾病研究, E-mail: lixin2007@163.com

cisplatin, *ip*), and Wumeiwan group (12.5 mL·kg⁻¹ Wumeiwan, *ig*), with 5 in each group. Lewis lung cancer with the syndrome of cold and heat in complexity was induced in mice except the blank group by gavage of propylthiouracil, Zhimu Shigaotang, and Fanxieye, ice-water swimming, and subcutaneous injection of dry yeast suspension and Lewis cell suspension under the right armpit. After modeling, administration began and lasted 6 weeks. After the experiment, the tumor weight, tumor volume, tumor inhibition rate, and lung cancer metastasis-inhibiting proportion were measured and calculated. The pathological morphology of lung tissue was observed based on hematoxylin and eosin (HE) staining. The growth state of tumor tissue was analyzed by immunohistochemistry. The mRNA expression of HGF and C-Met was detected by Real-time polymerase chain reaction (PCR), and the protein expressions of HGF, C-Met, survivin, and X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) by Western blot. **Result:** Compared with the blank group, the model group showed high mRNA expression of HGF and C-Met and protein expression of HGF, C-Met, survivin, and XIAP ($P<0.01$). Compared with the model group, Wumeiwan group displayed low proportion of positive cells, positive cell density, positive score ($P<0.05$), histochemical score, tumor weight, tumor volume ($P<0.01$), mRNA expression of HGF and C-Met ($P<0.01$), and protein expression of HGF, C-Met, survivin, and XIAP ($P<0.01$). Compared with the model group, the cisplatin group displayed decrease in the proportion of positive cells, density of positive cells ($P<0.05$), positive score, tumor weight, tumor volume ($P<0.01$), mRNA expression of HGF and C-Met ($P<0.01$), and protein expression of HGF, C-Met, survivin, and XIAP ($P<0.01$), and insignificant variation in the histochemical score. Wumeiwan group had high mRNA expression of HGF ($P<0.01$), and insignificant variation in the proportion of positive cells, positive cell density, histochemical score, positive score, tumor weight, tumor volume, mRNA expression of C-Met, and protein expression of HGF, C-Met, survivin, and XIAP. **Conclusion:** Wumeiwan can slow down the progression of Lewis lung cancer in mice with syndrome of cold and heat I complexity by inhibiting HGF/C-Met signaling pathway.

[Keywords] Wumeiwan; cold and heat in complexity; lung cancer; hepatocyte growth factor/mesenchymal-epithelial transition factor (HGF/C-Met)

肺癌是人类最常见的恶性肿瘤之一,肺癌死亡约占所有癌症死亡的四分之一^[1],是全世界最常见的癌症相关死亡原因^[2]。流行病学研究显示,在男性人群中,肺癌的发病率和死亡率高居全身恶性肿瘤首位,在女性人群中亦高居第2位^[3-4],严重危害着人类的生命健康,也带来了巨大的社会经济负担^[5]。肺癌可分为小细胞肺癌和非小细胞肺癌^[6],临床约85%为非小细胞肺癌,15%为小细胞肺癌^[7]。肺腺癌是常见的非小细胞肺癌类型,临床预后不良^[8]。迄今为止,手术切除仍然是治疗早期肺癌的主要方法^[9]。即使进行早期手术切除,非小细胞肺癌的复发风险依然很高^[10],且60%以上的肺癌患者在诊断时即为局部晚期或转移性疾病^[9],限制了手术切除的可行性。尽管以含铂抗癌药为基础的多模式化疗、放疗和手术在晚期非小细胞肺癌治疗中取得了一定的疗效,但生存率依然不容乐观^[11],亟待新型治疗策略的干预。

近年来,越来越多的研究聚焦于肝细胞生长因

子及其受体(HGF/C-Met)信号通路,HGF/C-Met的激活与肿瘤细胞的增殖、存活、侵袭和转移密切相关^[12],先前的研究表明HGF水平升高和(或)C-Met过表达与肺癌预后不良有关^[13],HGF/C-Met信号通路有望成为肺癌治疗的突破点。中医学理论认为肺癌等慢性肺病可导致肺脏功能失调,阴阳不相顺接,表里不相贯通,逐渐形成寒热错杂、虚实相兼之候,故熊绍权教授主张用平调寒热、补虚泻实之乌梅丸辨治本病^[14],乌梅丸出自《伤寒论》,集酸苦辛甘于一身,有望成为治疗肺癌的新型药物。现阶段尚无乌梅丸治疗肺癌的基础研究和临床试验,亦无乌梅丸与HGF/C-Met通路相关性的研究,因此本研究首次以HGF/C-Met信号通路为突破点,探究乌梅丸治疗寒热错杂证Lewis肺癌小鼠的抗癌作用和调节机制,以冀为后续研究提供参考。

1 材料

1.1 动物 SPF级C57BL/6雄性小鼠20只,体质量18~22 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,

合格证号 SCXK(湘)2016-0002,经湖南省药物安全评价研究中心动物福利与伦理委员会批准,批准号为 2021032。Lewis 细胞购自赛百慷(上海)生物技术股份有限公司,编号 iCell-m027,传至 3 代以内的细胞待用。

1.2 药物 乌梅丸汤剂由乌梅 16 g、细辛 6 g、干姜 10 g、黄连 16 g、当归 4 g、附子 6 g、花椒 4 g、桂枝 6 g、人参 6 g、黄柏 6 g 组成(药物购自老百姓大药房,批号依次为 21030308、21030301、21012209、D2104089、20210301、D2007069、21012804、210301、20061513、2103030);顺铂注射液(江苏豪森药业集团有限公司,批号 201104);丙硫氧嘧啶(北京索莱宝科技有限公司,批号 P7161);干酵母粉(美国 Thermo Scientific 公司,批号 LP0021T);石膏、知母购自老百姓大药房,批号分别为 2002005、200301,100% 知母石膏水煎液由石膏-知母 3:4 煎煮而成,含生药 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,番泻叶(老百姓大药房,批号 200730)。

1.3 试剂 C-Met、微管相关蛋白 1 轻链 3B(LC3B)、HGF、存活素(Survivin)、X 连锁凋亡抑制蛋白(XIAP)、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(湖南艾方生物科技有限公司,批号分别为 20210305、20210306、20210214、20210524、20210225、20210125),二抗山羊抗兔、二抗山羊抗小鼠[天德悦(北京)生物科技有限责任公司,批号分别为 879321、862321],苏木素、伊红染液、BSA(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为 ZH192809、ZH203008、FZ202501),白细胞分化抗原 105(CD105)[创开生物科技(云南)有限公司,批号 2021034],TRNzol 总 RNA 提取试剂[天根生化科技(北京)有限公司,批号 W9830];PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser、SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)ROX plus、DL2000 DNA Marker(日本 TaKaRa 公司,批号分别为 AL21113A、AL51020A、A2501B)。

1.4 仪器 MultiSkan3 型酶标仪(美国 Thermo Scientific 公司);Mini P-4 型电泳槽、MP3035 型湿转电泳槽(北京凯元信瑞仪器有限公司);1645052 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);NANODROP2000 型分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司);Tanon1600 型凝胶成像系统(上海天能科技有限公司);ABI7500 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国 Applied Biosystems 公司);XSP-C204 型生物显微镜(华侠健康医疗科技有限公司);PANNORAMICDESK/MIDI/250/1000 型全景切片

扫描仪(匈牙利 3DHIESTECH 公司);Caseviewer2.4 型扫描浏览软件(匈牙利 3Dhiestech 公司);Halo v3.0.311.314 分析软件(美国 Indica Labs 公司)。

2 方法

2.1 药物配置 将中药饮片置于煎药罐中用水浸泡 30 min,首煎用蒸馏水 800 mL,二煎用蒸馏水 640 mL,均待煎煮开锅后以文火再煎 30 min,将 2 次煎出液混合^[14-15],浓缩至含生药 $2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,置于 4°C 冰箱低温贮存。

2.2 模型制备 取 C57BL/6 雄性小鼠,依据宋捷民等^[16]方法制备寒热错杂证模型,每天上午灌胃丙硫氧嘧啶 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,灌胃 0.5 h 后放入 4°C 左右带冰块的冰水游泳 8 min(隔天 1 次)。下午灌胃 100% 知母石膏水煎液 0.4 mL,第 26 天起加番泻叶,共灌胃 4 周,期间各组正常饮水;再于第 29 天时皮下注射 20% 干酵母混悬液($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)。若造模后小鼠出现发热、粪便稀软、蜷缩扎推、少动嗜卧、毛发枯槁、形体消瘦则提示寒热错杂证模型制备成功。依据潘俊杰等^[17]方法制备 Lewis 肺癌模型:取对数生长期 1×10^7 个/mL 的 Lewis 细胞悬液,于无菌条件下在每只小鼠右侧腋窝皮下接种 0.2 mL(含细胞数目 2×10^6 个/mL)。若接种后第 7 天左右可扪及肿块,则提示 Lewis 肺癌模型制备成功。

2.3 动物分组与给药方案 模型制备及验证完成后,采用 SPSS 25.0 以简单随机抽样法^[17]将 15 只模型小鼠均分为模型组、顺铂组和乌梅丸组,另 5 只正常小鼠作为空白组。顺铂组予以 $4.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 顺铂腹腔注射^[18],3 d/次;乌梅丸组予以 $12.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 乌梅丸药液灌胃^[19],每天 1 次;模型组予以等体积蒸馏水灌胃,每次 1 次,持续 6 周。

2.4 观察指标

2.4.1 免疫组化(IHC)观察寒热错杂证 Lewis 肺癌小鼠肺癌组织肿瘤细胞分布 在无坏死区取约 1 mm^3 肺癌组织标本块,用生理盐水冲洗干净,放入 4% 多聚甲醛中 4°C 固定 24 h,进行石蜡切片。依次将石蜡切片放入二甲苯-梯度乙醇中,最后用蒸馏水洗使其脱蜡;蒸馏水洗涤后置于盛满柠檬酸抗原修复缓冲液(pH 6.0)的修复盒中进行抗原修复,然后用免疫组化笔绕切片上的组织周围画圈;随后将组织切片放入 3% H_2O_2 溶液中,避光孵育 25 min;在切片上分别滴加一抗(1:2 000)和二抗(1:1 万)并孵育;DAB 显色,苏木素复染色细胞核 3 min;脱水、透明、封片,运用组织切片数字扫描仪采集图像并计算平均光密度值。

2.4.2 寒热错杂证 Lewis 肺癌小鼠的瘤质量、瘤体积、抑癌率和抑制肺癌转移率测算 在麻醉下脱颈处死小鼠后,完整剥离出瘤体,用电子秤称取瘤质量。然后用精度为 0.1 mm 游标卡尺测量瘤体最长径、最短径并计算瘤体体积,瘤体体积= $\pi \times \text{长径} \times \text{短径}^2/6$,依据瘤质量计算抑癌率,抑癌率=(1-药物组平均瘤质量/模型组平均瘤质量) $\times 100\%$,根据转移情况计算抑制肺癌转移率,转移率=(1-药物组平均转移数/模型组平均转移数) $\times 100\%$ 。

2.4.3 Real-time PCR 检测寒热错杂证 Lewis 肺癌小鼠肺癌组织 HGF、C-Met mRNA 表达 把肺癌组织放入已预冷的研钵中进行研磨,应用 TRNzol 总 RNA 提取试剂提取样本 RNA,使用 NanoDrop[®] ND-2000 测定 RNA 浓度和纯度,运用 PrimeScript[™] RT reagent Kit with gDNA Eraser 进行 cDNA 反转录,42 °C 孵育 2 min,去除基因组 DNA 反应,37 °C 孵育 15 min、85 °C,5 s,进行反转录反应。最后将各样品的目的基因和内参分别进行 PCR 反应,PCR 反应条件:95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 15 s,退火/延伸温度 60 °C 退火/延伸 30 s,40 个循环,每个样本检测 5 个复孔。数据采用 2^{-ΔΔCt} 法进行分析。引物序列由北京 Invitrogen 公司合成,见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer information

引物	序列(5'-3')	长度/bp
HGF	上游 CGGTAAAGACCTACAGGAAAA	104
	下游 TGTCACAGACTTCGTAGCGTA	
C-Met	上游 ATTTTGCAGGATTGATCATTGGT	84
	下游 TCTTCTCATCCACAGGAAGAGC	
β-actin	上游 CCATCTACGAGGGCTATGCT	150
	下游 CTTTGATGTCACGCACGATT	

2.4.4 蛋白免疫印迹法检测寒热错杂证 Lewis 肺癌小鼠肺癌组织 HGF、C-Met、Survivin、XIAP 蛋白表达 称取肺癌组织质量,按一定的比例加入放射免疫沉淀法(RIPA)裂解液和蛋白酶抑制剂,采用蛋白

浓度测定试剂盒(BCA)法进行蛋白定量,调整蛋白浓度并计算上样体积,配置蛋白样品。根据目的蛋白的分子量配置相应比例的分离胶和浓缩胶。电泳结束后,运用湿转法转膜,室温封闭 30 min。加入一抗 HGF、Survivin、XIAP (1:1 000),C-Met (1:1 万),4 °C 孵育过夜。洗涤缓冲液(TBST)洗膜 5 次,加入相应的二抗(1:1 万)室温轻摇 40 min。TBST 洗膜 6 次后将增强型化学发光试剂(ECL)加到膜上反应 3~5 min,胶片曝光 10 s~5 min,显影 2 min,定影。

2.4.5 苏木素-伊红(HE)染色观察寒热错杂证 Lewis 肺癌小鼠肺癌组织病理形态 实验结束后,在麻醉下脱颈处死小鼠,取肺癌组织置于甲醛溶液内固定,运用梯度乙醇脱水后采用石蜡包埋切片,苏木精染料核染,伊红染液着色,封片后用光学显微镜观察肺癌组织形态结构并拍照。

2.5 统计学分析 采用 SPSS 25.0 软件处理数据,全部计量资料均用 $\bar{x} \pm s$ 描述,符合正态性和方差齐性者,采用单因素方差分析,组间比较采用最小显著性差异法(LSD);不符合正态性或方差齐性者,采用 Kruskal-Wallis 秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对寒热错杂证 Lewis 肺癌小鼠肺癌组织肿瘤细胞分布情况的影响 与模型组比较,顺铂组的阳性细胞率、阳性细胞密度明显降低($P < 0.05$),阳性评分显著降低($P < 0.01$);乌梅丸组阳性细胞率、阳性细胞密度、阳性评分、组织化学评分明显降低($P < 0.05$)。与顺铂组比较,乌梅丸组阳性细胞率、阳性细胞密度、组织化学评分、阳性评分相当,差异均无统计学意义。见表 2、图 1。

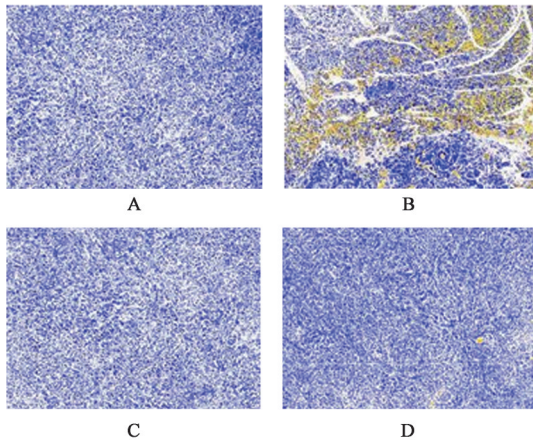
3.2 对寒热错杂证 Lewis 肺癌小鼠瘤质量、瘤体积、抑癌率和抑制肺癌转移率的影响 与模型组比较,顺铂组、乌梅丸组瘤质量、瘤体积均显著降低($P < 0.01$)。与顺铂组比较,乌梅丸组的瘤质量、瘤体积相当,差异无统计学意义。见表 3。顺铂组抑癌率

表 2 乌梅丸对寒热错杂证 Lewis 肺癌小鼠肺癌组织肿瘤细胞分布情况的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 2 Effect of Wumeiwan on distribution of tumor cells in lung cancer tissues of Lewis lung cancer mice with mixed cold and heat syndrome ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	阳性细胞率/%	阳性细胞密度/个/mm ²	组织化学评分/分	阳性评分/分
模型组		17.72±12.26	1 163.00±707.77	30.43±21.71	3.00±1.00
顺铂组	0.004	2.16±1.32 ¹⁾	147.80±87.66 ¹⁾	3.66±2.24	0.00±0.00 ²⁾
乌梅丸组	25.00	1.75±1.99 ¹⁾	117.80±128.78 ¹⁾	2.98±3.61 ²⁾	0.40±0.89 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$



注:A正常组;B模型组;C顺铂组;D乌梅丸组(图2、图3同)

图1 乌梅丸对寒热错杂证Lewis肺癌小鼠肺癌组织的影响(IHC, ×200)

Fig. 1 Lung cancer tissue in Lewis lung cancer mice with mixed cold and heat syndrome by Wumeiwan (IHC, ×200)

为75.19%,乌梅丸组抑癌率为59.93%;顺铂组抑制肺癌转移率为66.67%,乌梅丸组的抑制肺癌转移率为33.33%。见表3。

表3 乌梅丸对寒热错杂证Lewis肺癌小鼠肿瘤状态的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 3 Effect of Wumeiwan on tumor state of Lewis lung cancer mice with mixed cold and heat syndrome ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	瘤质量/g	瘤体积/mm ³
模型组		5.19±0.87	596.97±186.75
顺铂组	0.004	1.31±0.26 ¹⁾	160.61±137.55 ¹⁾
乌梅丸组	25.00	2.04±0.30 ¹⁾	223.46±80.11 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾P<0.01

表5 乌梅丸对寒热错杂证Lewis肺癌小鼠肺癌组织HGF、C-Met、Survivin、XIAP蛋白表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 5 Effect of Wumeiwan on expression levels of HGF, C-Met, survivin and XIAP proteins in lung cancer tissue of Lewis lung cancer mice with mixed cold and heat syndrome ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	HGF/ β -actin	C-Met/ β -actin	Survivin/ β -actin	XIAP/ β -actin
正常组		0.40±0.14	0.23±0.07	0.27±0.06	0.22±0.09
模型组		1.20±0.10 ²⁾	1.00±0.12 ²⁾	1.33±0.29 ²⁾	0.91±0.11 ²⁾
顺铂组	0.004	0.62±0.13 ^{1,3)}	0.39±0.06 ^{2,3)}	0.63±0.14 ^{2,3)}	0.42±0.08 ^{2,3)}
乌梅丸组	25.00	0.60±0.12 ^{1,3)}	0.40±0.05 ^{2,3)}	0.64±0.09 ^{2,3)}	0.46±0.08 ^{2,3)}

注:与正常组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与模型组比较³⁾P<0.01

3.5 对小鼠肺癌组织病理形态的影响 模型组肿瘤细胞胞核较大、异型,核质比高,胞浆略嗜碱性,少见核分裂相,间质结缔组织将肿瘤细胞分割成团索状及腺管状,被膜及间质结缔组织内可见多量的炎性细胞浸润。顺铂组呈现肿瘤细胞核较大、异型,核质比高,胞浆略嗜碱性,间质结缔组织将肿瘤细胞分割成团索状,被膜及间质结缔组织内可见

3.3 对寒热错杂证Lewis肺癌小鼠肺癌组织HGF、C-Met mRNA表达的影响 与正常组比较,模型组HGF、C-Met mRNA表达显著升高(P<0.01)。与模型组比较,顺铂组、乌梅丸组HGF、C-Met mRNA表达均显著降低(P<0.01)。与顺铂组比较,乌梅丸组HGF mRNA表达显著升高(P<0.01);C-Met的mRNA表达相当,差异无统计学意义。见表4。

表4 乌梅丸对寒热错杂证Lewis肺癌小鼠肺癌组织HGF、C-Met mRNA表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 4 Effect of Wumeiwan on HGF and C-Met mRNA expression in lung cancer tissue of Lewis lung cancer mice with mixed cold and heat syndrome ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	HGF	C-Met
正常组		1.18±0.12	1.25±0.20
模型组		4.36±0.15 ¹⁾	4.02±0.44 ¹⁾
顺铂组	4.00	1.58±0.10 ^{1,2)}	1.59±0.06 ²⁾
乌梅丸组	25.00	2.14±0.12 ^{1,2,3)}	1.85±0.18 ^{1,2)}

注:与正常组比较¹⁾P<0.01;与模型组比较²⁾P<0.01;与顺铂组比较³⁾P<0.01

3.4 对寒热错杂证Lewis肺癌小鼠肺癌组织HGF、C-Met、Survivin、XIAP蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组HGF、C-Met、Survivin和XIAP蛋白表达显著升高(P<0.01)。与模型组比较,顺铂组、乌梅丸组HGF、C-Met、Survivin和XIAP蛋白表达均显著降低(P<0.01)。与顺铂组比较,乌梅丸组的HGF、C-Met、Survivin和XIAP蛋白表达相当,差异无统计学意义。见表5、图2。

多量的炎性细胞浸润,肿瘤细胞小灶性坏死,胞核固缩深染或碎裂。乌梅丸组呈现肿瘤细胞胞核较大、异型,核质比高,胞浆略嗜碱性,少见核分裂相,间质结缔组织将肿瘤细胞分割成团索状,被膜及间质结缔组织内可见多量的炎性细胞浸润。见图3。

4 讨论

肺癌是人类癌症死亡的主要原因^[2],是威胁

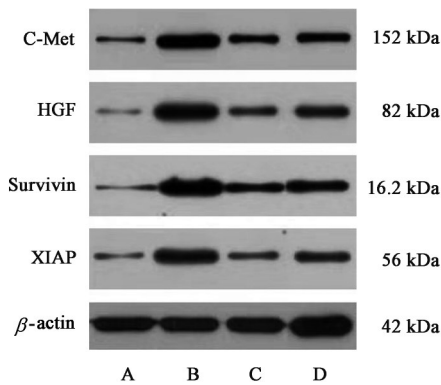


图2 寒热错杂证Lewis肺癌小鼠肺癌组织HGF、C-Met、Survivin、XIAP蛋白的表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of HGF, C-Met, survivin and XIAP proteins in lung cancer tissue of Lewis lung cancer mice with mixed cold and heat syndrome

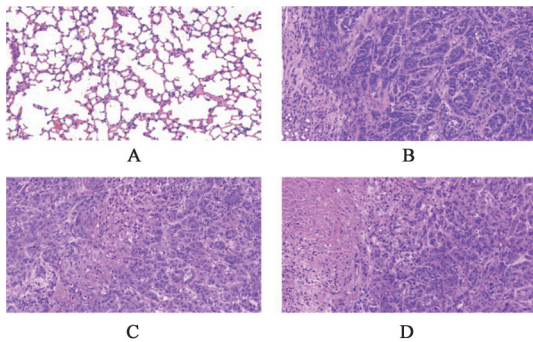


图3 乌梅丸对寒热错杂证Lewis肺癌小鼠肺癌组织的影响(HE, ×200)

Fig. 3 Effect of Wumeiwan on lung cancer tissue in Lewis lung cancer mice with mixed cold and heat syndrome (HE, ×200)

人类健康的严重疾病^[5]。尽管手术和含铂抗癌药在一定程度上抑制了肺癌的进展,但其复发风险和不良反应依然显著^[10]。有研究指出,HGF水平升高和(或)C-Met过表达与肺癌预后不良有关^[13],HGF/C-Met信号通路有望成为肺癌治疗的突破点。肺癌是一种不断进展的疾病,随着癌症的病程进展,病证会趋于复杂化,在临床上可以观察到癌症患者既有寒象又有热象、既恶寒又畏热、欲食冷饮却饮之不舒、欲食热食又食之不舒、舌红干而苔白或舌质黯淡而苔黄的寒热错杂之象,寒热久积易致气机升降失调和气血津液运行异常而形成一系列复杂的临床表现,体内的寒热之邪还易与有形之邪相结合形成坚硬的肿块,导致经脉的阻塞而致患者疼痛难忍。而肺为娇脏,开窍于鼻,外合皮毛,寒热之邪更易侵袭入里,故肺系疾病更易见寒热错杂之证,这也是肺脏容易罹患癌症的主要原因。因此寒热错杂是肺癌的重要病机,构建寒热错杂证Lewis肺癌对肺癌的基础研究具有重要意义。本研究应用

病证结合的方式构建寒热错杂证Lewis肺癌小鼠模型,先采用丙硫氧嘧啶、寒凉中药灌胃和冰水游泳耗损小鼠阳气,制备虚寒证模型,在此基础上运用干酵母混悬液体内注射模拟邪热入里制备里热证模型,其后将Lewis细胞接种至小鼠腋窝皮下模拟原发性肺癌的形成,同时Lewis细胞作为外来因素进一步加重了上焦里热的病机,两种造模方法相合共同构建上热下寒、寒热错杂的Lewis肺癌小鼠模型,具有良好的科学性和参考价值。

乌梅丸最早出现于《伤寒论》,是治疗厥阴病的总方。病至厥阴,正气衰弱,邪正斗争剧烈,阴阳相兼,往往呈现出寒热错杂之象。厥阴病的寒热错杂之象与肺癌的寒热错杂证存在一定的相似性,均具有上热下寒、虚实错杂的病机特点和临床表现,因此本研究将乌梅丸作为治疗寒热错杂证肺癌的主方,亦是契合李家庚教授和熊绍权教授的学术思想。李家庚教授将乌梅丸作为治疗寒热错杂证肺癌的关键药物^[20-21],熊绍权教授主张运用乌梅丸治疗晚期肺癌^[14],意味着乌梅丸具有治疗肺癌的潜力。乌梅丸由乌梅、细辛、干姜、黄连、当归、附子、花椒、桂枝、人参、黄柏10味药物组成,集酸苦辛甘、大寒大热之药,以杂治杂。乌梅丸方中的药物可大致分为3组:乌梅、人参、当归为一组,共奏补血生津,益气养阴之用;附子、干姜、桂枝、花椒、细辛为一组,共奏温中散寒,升发阳气之用;黄连、黄柏为一组,共奏清热燥湿、泻火解毒之用,使火去而不复伤阴,起到以泻为补之效,共奏平调寒热、补虚泻实之功。乌梅丸在胰腺癌^[22]和结肠癌^[23]等癌症中的作用已被证实,本研究发现乌梅丸能够显著减小瘤质量和瘤体积,降低阳性细胞率、阳性细胞密度、组织化学评分和阳性评分,能有效发挥抑制癌细胞增殖和转移的作用,提示乌梅丸具有治疗寒热错杂证肺癌的潜力和价值。

C-Met是编码酪氨酸激酶受体的癌基因^[13],主要存在于上皮细胞中,在胚胎发生、肿瘤生长和转移中起重要作用^[24]。HGF是酪氨酸激酶受体C-Met的配体,在细胞微环境中由自分泌、旁分泌或内分泌产生^[25],通过靶C-Met受体激活小G蛋白(Ras)/细胞外信号调节激酶(ERK)/促分裂素原活化蛋白激酶(MAPK)和磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)等一系列信号通路^[26]。异常的HGF/C-Met信号激活与肿瘤细胞的增殖、存活、侵袭和转移有关^[12],并增加了肿瘤的放射抗性^[27],是肿瘤预后的不利因素^[28]。HGF/C-Met通路的促癌作用

可能与诱导肿瘤新生血管生成和细胞外基质降解有关:一方面,HGF与C-Met结合后能够直接诱导血管内皮细胞的增殖,从而来促进肿瘤内新生血管的生成^[29];另一方面,HGF可显著增加降解细胞外基质的蛋白酶表达,导致细胞外基质溶解,最终促进肿瘤转移^[30]。本研究显示,肺癌模型小鼠的HGF/C-Met的基因表达和蛋白表达显著升高,模型组的HGF和C-Met的蛋白水平分别约为正常组的4倍和3倍,提示HGF/C-Met通路可能是肺癌发生发展的重要机制。不同的是,先前的研究报道小细胞肺癌患者的HGF和C-Met在癌症组织中的表达较癌症旁边组织高10~100倍和2~10倍,HGF结果的差异可能源于物种和模型的差异^[31]。本研究还显示,连续6周的顺铂和乌梅丸干预均能显著抑制HGF/C-Met通路且作用强度相当。前期研究表明,抑制C-Met或HGF表达能够有效降低肺癌细胞增殖活性,同时抑制其侵袭和迁移^[32-33]。尽管顺铂和乌梅丸均不能使HGF和C-Met水平回到正常水平,但不可否认的是他们在一定程度上减少了HGF/C-Met通路激活带来的负面影响。值得注意的是,有研究显示沉默C-Met基因表达与提高肺癌瘤体的放射敏感性有关^[34],还有研究表明HGF/C-Met与肺癌细胞对血管内皮生长因子受体(VEGFR)抑制剂等抗癌药物的耐药性相关^[35],野黄芩苷^[36]、欧前胡素^[37]、紫草素^[38]、姜黄素^[39]等一系列中药提取物被报道能够通过抑制HGF/C-Met通路改善肺癌细胞对顺铂或吉非替尼的耐药性。因此,乌梅丸具有抑制肺癌进展的潜力,还有望成为顺铂和吉非替尼等抗癌药物及放射治疗的联合用药,为肺癌的临床治疗带来了新希望。未来的研究可将焦点集中于乌梅丸联合其他抗癌药物的疗效,充分发挥中西医结合的优势,助力于肺癌的临床攻克。Survivin和XIAP是两种凋亡蛋白抑制剂,研究表明Survivin和XIAP可能是HGF/C-Met的下游因子^[40]。Survivin是一种独特的哺乳动物凋亡蛋白抑制剂,在大多数人类癌症中选择性表达,其中肺癌和乳腺癌的表达水平最高^[41]。Survivin的蛋白质表达和mRNA水平与癌症患者的临床病理参数和生存率相关^[42],Survivin可能参与转移的发生,并可能被用作疾病进展的生物标志物^[43]。XIAP是凋亡抑制蛋白(IAPs)家族中最有效的凋亡抑制剂^[44],能同时抑制关键蛋白酶胱天蛋白酶(Caspases)-3、Caspases-7和线粒体依赖性凋亡途径中Caspases-9的表达^[45],在凋亡初期和凋亡效应期抑制凋亡拮抗因子^[46]。

XIAP在非小细胞肺癌组织中的表达率显著高于癌旁组织^[47],可能通过抗凋亡能力调节肿瘤细胞的存活和增殖^[48],在肿瘤发生发展中具有重要作用。本研究中模型组的Survivin和XIAP蛋白表达相对正常组显著升高,经顺铂或乌梅丸治疗后呈现下降趋势,证实Survivin和XIAP可能和肺癌发展密切相关。早期的研究表明,Survivin和XIAP在各种恶性肿瘤中呈现表达上调,他们的失活与化学增敏相关^[49]。近期的研究显示,抑制Survivin或XIAP表达是一种潜在的肺癌治疗策略^[50-51],鸦胆子油乳和雄黄纳米粒被报道能通过降低Survivin表达以诱导肺癌细胞A549凋亡^[52-53],miR-142被报道能通过减少XIAP活化发挥抑制肺癌细胞增殖的作用^[54]。在本研究中,乌梅丸和顺铂均表现出抑制Survivin和XIAP的作用且强度相当,这种作用可能是其抑制肺癌进展的机制之一。Survivin、XIAP可能是HGF/C-Met信号通路的下游因子,先前的研究发现HGF/C-Met介导的胰腺癌细胞的侵袭和迁移需要通过上调Survivin表达实现^[55],抑制HGF/C-Met通路可显著降低Survivin水平进而抑制前列腺癌细胞的存活、增殖和血管生成^[56];有研究表明HGF/C-Met通路能通过Akt途径上调XIAP水平进而发挥促进卵巢癌进展的作用^[57],还有研究称HGF/C-Met信号通路可呈浓度依赖性诱导Survivin和XIAP的表达,进而抑制子宫内膜癌细胞凋亡,促进细胞增殖,促进子宫内膜癌的发生发展^[58]。本研究中乌梅丸和顺铂都能同时实现HGF/C-Met、Survivin和XIAP水平的降低,表明HGF/C-Met和凋亡抑制蛋白Survivin与XIAP可能存在上下游关系,但具体的诱导途径尚不明确,未来的研究可聚焦于HGF/C-Met诱导Survivin与XIAP表达的具体途径,进一步阐释肺癌发展的作用机制。

本研究结果显示,乌梅丸治疗寒热错杂证Lewis肺癌小鼠能够显著减小瘤质量和瘤体积,降低阳性细胞率、阳性细胞密度、组织化学评分和阳性评分,能有效发挥抑制癌细胞增殖和转移的作用,提示乌梅丸具有治疗寒热错杂证肺癌的潜力和价值。研究结果还显示,乌梅丸能够显著抑制寒热错杂证Lewis肺癌小鼠的HGF/C-Met的mRNA表达和HGF/C-Met、Survivin、XIAP的蛋白表达,且抑制HGF/C-Met、Survivin、XIAP蛋白表达的效果与顺铂相当,意味着HGF/C-Met通路和Survivin、XIAP可能是乌梅丸抑制肺癌进展的重要靶点。

综上所述,乌梅丸能够通过抑制HGF/C-Met

通路减小寒热错杂型Lewis肺癌小鼠肿瘤组织的瘤质量和瘤体积,发挥抑癌和抑转移作用,具有治疗肺癌的潜力。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] ZHANG Y, SUN Y, JIA Y, et al. $\alpha 5$ -nAChR and survivin: Two potential biological targets in lung adenocarcinoma[J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(3): 1787-1797.
- [2] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [3] MAO Y, YANG D, HE J, et al. Epidemiology of lung cancer[J]. *Surg Oncol Clin N Am*, 2016, 25(3): 439-45.
- [4] SCHWARTZ A G, COTE M L. Epidemiology of lung cancer[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 893: 21-41.
- [5] DIDKOWSKA J, WOJCIECHOWSKA U, MAŃCZUK M, et al. Lung cancer epidemiology: Contemporary and future challenges worldwide [J]. *Ann Transl Med*, 2016, 4(8): 150-160.
- [6] GOLDSTRAW P, CHANSKY K, CROWLEY J, et al. The IASLC lung cancer staging project: Proposals for revision of the TNM Stage groupings in the forthcoming (Eighth) edition of the TNM classification for lung cancer [J]. *J Thorac Oncol*, 2016, 11(1): 39-51.
- [7] DUMA N, SANTANA-DAVILA R, MOLINA J R. Non-small cell lung cancer: Epidemiology, screening, diagnosis, and treatment [J]. *Mayo Clin Proc*, 2019, 94(8): 1623-1640.
- [8] BEZZECCHI E, RONZIO M, SEMEGHINI V, et al. NF-YA overexpression in lung cancer: LUAD [J]. *Genes (Basel)*, 2020, 11(2): 198-214.
- [9] OSMANI L, ASKIN F, GABRIELSON E, et al. Current WHO guidelines and the critical role of immunohistochemical markers in the subclassification of non-small cell lung carcinoma (NSCLC): Moving from targeted therapy to immunotherapy [J]. *Semin Cancer Biol*, 2018, 52(1): 103-109.
- [10] NAGASAKA M, GADGEEL S M. Role of chemotherapy and targeted therapy in early-stage non-small cell lung cancer [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2018, 18(1): 63-70.
- [11] GROOME P A, BOLEJACK V, CROWLEY J J, et al. The IASLC lung cancer staging project: Validation of the proposals for revision of the T, N, and M descriptors and consequent stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification of malignant tumours [J]. *J Thorac Oncol*, 2007, 2(8): 694-705.
- [12] MIRANDA O, FAROOQUI M, SIEGFRIED J M. Status of agents targeting the HGF/C-Met axis in lung cancer[J]. *Cancers (Basel)*, 2018, 10(9): 280-297.
- [13] LIANG H, WANG M. Metoncogene in non-small cell lung cancer: Mechanism of Met dysregulation and agents targeting the HGF/C-Met axis [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 25(13): 2491-2510.
- [14] 罗秋月,周莎,熊绍权,等. 从乌梅丸主厥阴探析晚期肺癌[J]. *辽宁中医杂志*, 2019, 46(5): 979-981.
- [15] 周曼丽,俞赟丰,罗晓欣,等. 基于LC-MS技术的养心通脉方干预冠心病血瘀证的代谢组学分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(22): 139-146.
- [16] 宋捷民,钱旭武,滕晔,等. “寒热并见”大鼠模型的建立及评价[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2014, 20(1): 39-41.
- [17] 潘俊杰,陈芳,杨宏宽,等. 清肺解毒汤对小鼠Lewis肺癌皮下移植瘤生长及肿瘤微环境免疫抑制的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(11): 5752-5755.
- [18] 项磊,苏明君,马志超,等. 扶正抑瘤汤对肺癌荷瘤小鼠肿瘤生长、免疫微环境的影响[J]. *世界中西医结合杂志*, 2021, 16(8): 1447-1452.
- [19] 闫曙光,惠毅,李京涛. 乌梅丸方对溃疡性结肠炎大鼠结肠上皮细胞凋亡的影响[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2016, 22(6): 771-773.
- [20] 周曼丽,俞赟丰,罗晓欣,等. 线粒体动力学介导冠心病血瘀证心肌能量代谢的研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(21): 80-90.
- [21] 汪珺,周慧敏,陈赛里,等. 李家庚辨治肺癌验案举隅 [J]. *湖北中医药大学学报*, 2019, 21(5): 111-113.
- [22] 王熙,张莹雯. 乌梅丸含药血清对胰腺癌细胞增殖及糖酵解的影响[J]. *中国药师*, 2021, 24(9): 1601-1605.
- [23] 张然,李素娟,陈正彦,等. 基于Wnt通路加味乌梅丸对结肠癌的抑制机制[J]. *世界中医药*, 2018, 13(8): 1972-1975.
- [24] BIRCHMEIER C, BIRCHMEIER W, GHERARDI E, et al. Met, metastasis, motility and more [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4(12): 915-925.
- [25] FIRTINA K Z, KOC D, ISCAN E, et al. Elevated hepatocyte growth factor expression as an autocrine C-Met activation mechanism in acquired resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Cancer*

- Sci, 2016, 107(4): 407-416.
- [26] DU M, WANG J, CHEN H, et al. MicroRNA-200a suppresses migration and invasion and enhances the radiosensitivity of NSCLC cells by inhibiting the HGF/C-Met signaling pathway [J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(3): 1497-1508.
- [27] BHARDWAJ V, CASCONI T, CORTEZ M A, et al. Modulation of C-Met signaling and cellular sensitivity to radiation: Potential implications for therapy [J]. *Cancer*, 2013, 119(10): 1768-1775.
- [28] RAGHAV K P, WANG W, LIU S, et al. cMET and phospho-cMET protein levels in breast cancers and survival outcomes [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(8): 2269-2277.
- [29] ABOUNADER R, LATERRA J. Scatter factor/hepatocyte growth factor in brain tumor growth and angiogenesis[J]. *Neuro Oncol*, 2005, 7(4): 436-451.
- [30] KERMORGANT S, APARICIO T, DESSIRIER V, et al. Hepatocyte growth factor induces colonic cancer cell invasiveness via enhanced motility and protease overproduction. Evidence for PI3 kinase and PKC involvement[J]. *Carcinogenesis*, 2001, 22(7): 1035-1042.
- [31] SIEGFRIED J M, WEISSFELD L A, SINGH-KAW P, et al. Association of immunoreactive hepatocyte growth factor with poor survival in resectable non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Res*, 1997, 57(3): 433-439.
- [32] 刘传苗,刘明珠,黄艳平,等. 靶向人C-Met蛋白单链抗体的制备及其对肺腺癌A549细胞的杀伤作用[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2018, 34(5): 401-407.
- [33] 沈东,王维. 紫草素对HGF诱导的人肺癌细胞上皮-间充质转化的逆转作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(9): 1622-1626.
- [34] 鄢丽敏,张志勇,闫继东,等. C-Met基因调控肺腺癌A549细胞放射敏感性[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2018, 34(8): 865-870.
- [35] CASCONI T, XU L, LIN H Y, et al. The HGF/c-Met pathway is a driver and biomarker of VEGFR-inhibitor resistance and vascular remodeling in non-small cell lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(18): 5489-5501.
- [36] 邵中一,罗敏,崔明超,等. 野黄芩苷通过下调c-met逆转肺腺癌A549/DDP细胞顺铂耐药[J]. *中国现代应用药学*, 2021, 38(4): 415-419.
- [37] 吴乾波,张敏,陶志华. 欧前胡素通过下调c-met的表达提高肺腺癌CD133⁺细胞亚群对吉非替尼的敏感性[J]. *中国病理生理杂志*, 2017, 33(1): 46-52.
- [38] 路京,陈子龙,闵朕,等. 紫草素逆转由肝细胞生长因子诱导的肺腺癌吉非替尼耐药[J]. *中国病理生理杂志*, 2019, 35(1): 62-67.
- [39] 詹建伟,王剑,王弋,等. 姜黄素逆转HGF诱导PC9细胞对吉非替尼的耐药[J]. *中国病理生理杂志*, 2017, 33(5): 805-810.
- [40] 雷磊,梁静,刘鹏,等. SU11274抑制人子宫内膜癌细胞增殖的分子机制[J]. *现代肿瘤医学*, 2020, 28(7): 1081-1085.
- [41] YAN X, LI P, ZHAN Y, et al. Dihydroartemisinin suppresses STAT3 signaling and Mcl-1 and Survivin expression to potentiate ABT-263-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells harboring EGFR or RAS mutation [J]. *Biochem Pharmacol*, 2018, 150: 72-85.
- [42] FUNG S, KNOEFEL W T, KRIEG A. Clinicopathological and prognostic significance of inhibitor of apoptosis protein (IAP) family members in lung cancer: A Meta-analysis [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(16): 4098-4121.
- [43] PUSKAS R, BIKOV A, HORVATH P, et al. Circulating survivin protein levels in lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy [J]. *Pathol Oncol Res*, 2021, 30(27): 631969.
- [44] WU X B, LI Q H, ZHANG N, et al. MiR-142 inhibits lung cancer cell proliferation and promotes apoptosis by targeting XIAP [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(17): 7430-7437.
- [45] YU Y, JIN H, XU J, et al. XIAP overexpression promotes bladder cancer invasion *in vitro* and lung metastasis *in vivo* via enhancing nucleolin-mediated Rho-GDI β mRNA stability [J]. *Int J Cancer*, 2018, 142(10): 2040-2055.
- [46] KIM S Y, PARK S, YOO S, et al. Downregulation of X-linked inhibitor of apoptosis protein by '7-benzylidenenaltrexone maleate' sensitizes pancreatic cancer cells to Trail-induced apoptosis [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(37): 61057-61071.
- [47] 朱志阳,陈真伟,陈甸甸,等. X连锁凋亡抑制蛋白和Krüppel样因子4在非小细胞肺癌组织的表达及其临床意义[J]. *中华实验外科杂志*, 2020, 37(3): 555-557.
- [48] YOO J K, LEE J M, KANG S H, et al. The novel microRNA hsa-miR-CHA1 regulates cell proliferation and apoptosis in human lung cancer by targeting XIAP [J]. *Lung Cancer*, 2019, 132: 99-106.
- [49] CAO C, MU Y, HALLAHAN D E, et al. XIAP and survivin as therapeutic targets for radiation

- sensitization in preclinical models of lung cancer [J]. *Oncogene*, 2004, 23(42): 7047-7052.
- [50] SHIMIZU T, NISHIO K, SAKAI K, et al. Phase I safety and pharmacokinetic study of YM155, a potent selective survivin inhibitor, in combination with erlotinib in patients with EGFR TKI refractory advanced non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2020, 86(2): 211-219.
- [51] WENTA T, RYCHLOWSKI M, JUREWICZ E, et al. The HtrA3 protease promotes drug-induced death of lung cancer cells by cleavage of the X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) [J]. *FEBS J*, 2019, 286(22): 4579-4596.
- [52] 戴月梅, 哈依努尔, 王晶. 鸦胆子油乳对肺癌细胞 A549 的抑制作用及其机制 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2018, 34(3): 288-290.
- [53] 王胜玫, 刘炫均, 邓桂明, 等. 雄黄纳米粒的制备及其靶向 Survivin 蛋白诱导 A549 细胞凋亡的研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2021, 56(7): 553-558.
- [54] WU X B, LI Q H, ZHANG N, et al. MiR-142 inhibits lung cancer cell proliferation and promotes apoptosis by targeting XIAP [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(17): 7430-7437.
- [55] YANG X P, LIU S L, XU J F, et al. Pancreatic stellate cells increase pancreatic cancer cells invasion through the hepatocyte growth factor /C-Met/survivin regulated by p53/p21 [J]. *Exp Cell Res*, 2017, 357(1): 79-87.
- [56] HWANG S T, UM J Y, CHINNATHAMBI A, et al. Evodiamine mitigates cellular growth and promotes apoptosis by targeting the C-Met pathway in prostate cancer cells [J]. *Molecules*, 2020, 25(6): 1320-1333.
- [57] BU R, UDDIN S, BAVI P, et al. HGF/C-Met pathway has a prominent role in mediating antiapoptotic signals through Akt in epithelial ovarian carcinoma [J]. *Lab Invest*, 2011, 91(1): 124-137.
- [58] 王江芬, 王月玲. HGF/Met 传导通路在子宫内膜癌发生发展中的作用及意义 [J]. *中国现代医生*, 2015, 53(32): 1-7.

[责任编辑 张丰丰]