

臭牡丹总黄酮通过调控 Wnt/ β -catenin 通路影响 A549 细胞上皮间质转化研究

余娜¹, 朱克俭^{2*}, 马思静², 谭小宁², 唐皓^{2*}

1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208

2. 湖南省中医药研究院, 湖南 长沙 410006

摘要: 目的 探讨臭牡丹总黄酮对人肺癌 A549 细胞增殖、迁移和侵袭的作用及其机制。方法 将 pcDNA3.1+空载体与 S45 位点突变的 β -链蛋白 (S45A- β -catenin) 真核过表达载体转染 A549 细胞, 给予臭牡丹总黄酮干预。MTT 法检测细胞的相对存活率, 划痕实验检测细胞迁移能力, Transwell 小室侵袭实验检测细胞的侵袭能力, Western blotting 法检测各组细胞 β -catenin、上皮细胞钙黏蛋白 (E-cadherin)、波形蛋白 (vimentin)、转录因子 Snail 2 (Slug)、糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)、p-GSK-3 β 的表达水平。结果 转染 S45A- β -catenin 质粒后, A549 细胞增殖、迁移、侵袭能力均明显增强, β -catenin、vimentin 蛋白表达水平显著上调, E-cadherin、GSK-3 β 、P-GSK-3 β 蛋白的表达水平显著下调。臭牡丹总黄酮可抑制 A549 细胞的增殖、迁移与侵袭能力, 对转染 S45A- β -catenin 质粒组的细胞作用尤为明显。对转染空载质粒的 A549 细胞, 可上调 E-cadherin、GSK-3 β 、P-GSK-3 β 表达, 下调 β -catenin、vimentin 表达; 对转染 S45A- β -catenin 质粒的 A549 细胞, 可下调 β -catenin、vimentin 表达。结论 抑制细胞中 β -catenin 的高表达并调控下游的一系列因子, 从而影响 Wnt/ β -catenin 通路诱导的上皮间质转化 (EMT) 现象可能是臭牡丹总黄酮抑制肺癌侵袭、转移的重要作用机制之一。

关键词: 臭牡丹总黄酮; 上皮间质转化; Wnt/ β -catenin 信号通路; S45 位点突变 β -catenin 质粒; 增殖; 迁移; 侵袭

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)03-0663-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.03.023

Effects of total flavonoids of *Clerodendrum bungei* on epithelial-mesenchymal transition (EMT) of A549 cells by regulating Wnt/ β -catenin signal pathway

YU Na¹, ZHU Ke-jian², MA Si-jing², TAN Xiao-ning², TANG Hao²

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

2. Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410006, China

Abstract: Objective To observe the effect of the total flavonoids of *Clerodendrum Bungei* (TFCB) on proliferation, invasion and migration of A549 cell lines by Wnt/ β -catenin signal pathway. **Methods** Transfecting A549 cell lines with empty vector pcDNA3.1 and β -catenin plasmid which has the mutation at S45 (S45A- β -catenin), which were intervened with TFCB. MTT assay detected cell proliferation, scratch test observed cell migration, Transwell experiment detected the cell invasion. The expression of β -catenin, E-Cadherin, vimentin, Slug, GSK-3 β , and p-GSK-3 β protein in each group was detected by Western blotting. **Results** The proliferation, invasion and migration of A549 cells were enhanced significantly after transfected with S45A- β -catenin plasmid ($P < 0.05$ or 0.01), along with the increasing expression of β -catenin, vimentin, and the reducing expression of E-cadherin, GSK-3 β , P-GSK-3 β ($P < 0.01$). TFCB can inhibit the proliferation, migration and invasion of A549 cells ($P < 0.05$), especially in S45A- β -catenin group ($P < 0.001$). A549 cells transfected with empty vector had the ability of up-regulating the expression of E-cadherin, GSK-3 β and P-GSK-3 β , down-regulating the expression of β -catenin and vimentin with TFCB. A549 cells transfected with S45A- β -catenin plasmid had the ability of down-regulating the expression of β -catenin and vimentin with TFCB. **Conclusion** The mechanism of inhibiting lung cancer of TFCB maybe associate with the inhibitory expression of β -catenin and regulate the downstream factors, with view to inducing EMT by activating Wnt/ β -catenin pathway.

Key words: total flavonoids of *Clerodendrum bungei* Steud.; EMT; Wnt/ β -catenin signal pathway; β -catenin plasmid mutated at S45; proliferation; invasion; migration

收稿日期: 2017-07-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81503452); 湖南省自然科学基金 (14JJ4066); 湖南省教育厅项目 (13C674)

*通信作者 朱克俭 (1955—), 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中医疑难病证辨治方法。

唐皓 (1983—), 男, 研究方向为中医疑难病证辨治方法。E-mail: tanghaoyin@sina.com

原发性支气管肺癌（简称肺癌）是一种发生于支气管黏膜及腺体的恶性肿瘤，属于中医“肺积、肺岩、息贲、虚劳”等范畴。2014年全球癌症报告显示，肺癌仍是全球最普遍和最致命的癌症，2012年新增约180万患者，并导致159万人死亡，其中中国此类病例约占1/3。据中国卫生和计划生育统计年鉴2014年数据显示，肺癌死亡率逐年攀升，排名已由20世纪70年代的第4位上升到现在的第1位^[1]。肺癌的复发与转移是导致患者死亡的主要原因^[2-3]。研究显示，中医药能改善肺癌患者症状、延长生存期，达到防治肺癌的复发与转移、长期稳定肿块的目的^[4-8]。臭牡丹 *Clerodendrum bungei* Steud. 是湖南民间治疗恶性肿瘤的经验单方，前期研究显示，以臭牡丹为主药的复方制剂及臭牡丹提取物具有较好的抗肿瘤作用，对肺癌的作用尤为突出^[9-11]。本实验采用S45位点突变的 β -catenin质粒（S45A- β -catenin）瞬时转染人肺腺癌A549细胞，研究臭牡丹总黄酮（TFCB）对A549细胞增殖、迁移、侵袭能力的影响，并探究其作用机制。

1 材料与方法

1.1 TFCB制备

臭牡丹生药由湖南中医药研究院附属医院中药房提供，由湖南省中医药研究院药剂科鉴定为马鞭草科大青属植物臭牡丹 *Clerodendrum bungei* Steud. 的地上部分。经湖南省中医药研究院中药研究所提取TFCB（批号20110720），总黄酮量为51%，1g相当于生药30g。制备方法如下：取臭牡丹药材，加7倍量95%乙醇，回流提取2h，再加6倍量95%乙醇，回流提取1.5h。滤过，回收乙醇，浓缩至相对密度约1.30，真空干燥。以芦丁为对照品，采用分光光度法测得干浸膏中TFCB量约为40%。将初提干浸膏用95%乙醇溶解，溶液上大孔吸附树脂柱，先用水洗脱，水洗液弃去，再用50%乙醇洗脱，收集洗脱液，回收乙醇，浓缩，蒸干后得纯化干浸膏^[12]。采用分光光度法检测纯化后干浸膏中TFCB的量约为51%。

1.2 试剂与仪器

A549细胞（第8代）购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库；S45A- β -catenin（V5-pcDNA3.1/GS载体，Zocin抗性）、空载体（pcDNA3.1+，AMP抗性）均由上海交通大学金卫林教授馈赠；Transwell小室（Corning公司）； β -链蛋白（ β -catenin）、上皮细胞钙黏蛋白（E-cadherin）、波形蛋白（vimentin）、转录因子Snail

2（Slug）、糖原合成酶激酶-3 β （GSK-3 β ）抗体（CST公司）； β -actin抗体（Sigma公司）；Lip2000试剂盒（美国Life公司）；Endo-Free Plasmid Mini Kit I D6948（广州飞扬生物工程有限公司）；细胞培养箱（Thermo Scientific公司）；酶标仪（深圳市汇松科技发展有限公司）；Nanodrop 2000超微量分光光度计（Thermo Fisher公司）；倒置显微镜（北京中显恒业仪器仪表有限公司）。

1.3 细胞培养、质粒转染与分组

A549细胞用含10%胎牛血清的DMEM培养基于37℃、5% CO₂恒温培养箱中培养。待细胞长满约80%时，用0.25%含EDTA的胰酶消化后直接分瓶传代。

CaCl₂法制备DH5 α 大肠杆菌感受态细胞^[13]，将制备好的感受态细胞分别加入准备好的S45A- β -catenin质粒和空载质粒溶液50 μ L，摇匀后置于冰上孵育30 min。42℃水中热击90 s，迅速冰浴冷却。EP管中加入不含抗生素的液体LB培养基1 mL，37℃下恒温振荡1 h。取200 μ L菌液涂抹在有Amp与Zocin的培养板上筛选，继续培养24 h。质粒的抽提按试剂盒说明书操作，得到的质粒采用Nanodrop 2000超微量分光光度计检测浓度。将A549细胞接种于6孔板中，待细胞生长至80%~90%时，每孔加入800 μ L不含抗生素、含10%胎牛血清的DMEM完全培养基，待转染。取空载质粒、S45A- β -catenin过表达质粒各4 μ g，按Lip2000试剂盒说明书步骤转染细胞。

实验分为6组，分别为对照组（未转染细胞）、TFCB组（未转染细胞+TFCB）、pCDNA组（转染pCDNA3.1空载质粒）、pCDNA+TFCB组（转染pCDNA3.1空载质粒+TFCB）、S45组（转染S45A- β -catenin过表达质粒）、S45+TFCB组（转染S45A- β -catenin过表达质粒+TFCB）。

1.4 MTT法检测细胞增殖活性

取未转染质粒的A549细胞，按5 000个/孔铺于96孔板，待细胞充分贴壁后待用。将TFCB配成质量浓度为10 mg/mL的母液，用含4% FBS的DMEM培养液稀释成质量浓度为0、0.2、0.6、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mg/mL。用不同质量浓度的含药培养液置换原培养液，每孔终体积200 μ L，作用48 h。每组6个复孔，另设无细胞的培养基为空白对照孔。测定各孔吸光度（A）值，计算细胞存活率和抑制率。以上实验重复3次。计算半数抑制浓度（IC₅₀）值，并将IC₅₀值作为后续实验的给药

浓度。另取对数生长期的正常 A549 细胞、转染空载质粒细胞、转染 S45A- β -catenin 过表达质粒细胞,按“1.3”项下分组,5 000 个/孔铺于 96 孔板。各给药组分别加入含 2.0 mg/mL TFCB 的培养液,其他各组加入不含药物的完全培养液,每孔终体积 200 μ L,48 h 后酶联免疫检测仪选择 490 nm 波长测定各孔 A 值,计算存活率。

$$\text{存活率} = A_{\text{给药}} / A_{\text{空白}}$$

1.5 划痕实验检测细胞迁移能力

将细胞铺于 6 孔板中,分组同“1.3”项下,TFCB 作用 48 h。待细胞长满后用 100 μ L Tip 头沿培养板中轴均匀划一直线,用 PBS 洗细胞 3 次,加入 1% 低血清培养基继续培养。分别于 0、24、48 h 观察划痕内的细胞,拍照。结果以各组划痕培养后的划痕区域闭合宽度占初始(0 h)划痕区域宽度的百分比来表示。重复 3 次实验,取平均值。

1.6 Transwell 法检测细胞侵袭能力

制备 Transwell 小室,分组同“1.3”项下,TFCB 作用 48 h。将各组细胞常规消化,调整细胞密度至 1×10^5 /mL。吸取 200 μ L 细胞悬液到小室上室内,下室加入含 10% FBS 的 DMEM,培养 48 h。弃去小室内培养液,用 PBS 洗 2 遍,擦尽上室面的 Matrigel 胶和细胞,丙酮-甲醇(1:1)固定 20 min,PBS 洗 2 遍,用 0.5% 结晶紫染色 5 min。倒置显微镜下观察,随机取 5 个视野计数细胞数,计算平均值。实验重复 3 次。

1.7 Western blotting 检测相关蛋白表达

实验分为 4 组,分别为 pCDNA 组(转染 pCDNA3.1 空载质粒)、pCDNA+TFCB 组(转染 pCDNA3.1 空载质粒+TFCB)、S45 组(转染 S45A- β -catenin 过表达质粒)、S45+TFCB 组(转染 S45A- β -catenin 过表达质粒+TFCB)。待 A549 细胞生长密度达 70%~80%时,加入含 2.0 mg/mL TFCB 的培养液,培养 48 h 后进行 Western blotting 检测。用预冷的 PBS 洗涤细胞 1 次,加入 100 μ L 裂解液,裂解 30 min。将裂解完毕的细胞离心 15 min,将上清分装转移至 0.5 mL 的离心管中。按照 BCA 蛋白定量试剂盒绘制蛋白标准曲线,算出蛋白浓度。灌胶、上样,根据蛋白定量的结果,每孔上样 50 μ g 已变性蛋白,电泳后转膜。按 β -catenin (92 000)、E-cadherin (130 000)、Vimentin (57 000)、GSK-3 β (46 000)、p-GSK-3 β (46 000)、Slug (30 000)、 β -actin (42 000) 所在位置进行切胶。转移至 PVDF 膜。载有蛋白质

条带的膜在含有 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液中室温封闭 1 h,加入稀释一抗(β -actin 稀释比例 1:4 000,其余蛋白 1:1 000),4 $^{\circ}$ C 下振荡孵育过夜。用 $1 \times$ TBST 稀释 HRP 标记的二抗(1:3 000),稀释比例 1:3 000,将 PVDF 膜与稀释后的二抗共同孵育 45~60 min。洗涤后,采用 ECL 化学发光显示液曝光。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析。结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 TFCB 对 A549 细胞增殖的影响

TFCB 处理 A549 细胞 48 h 后,MTT 法检测细胞活力,结果见图 1、2。结果显示,A549 细胞活力受到明显抑制,随着给药质量浓度增加,细胞成

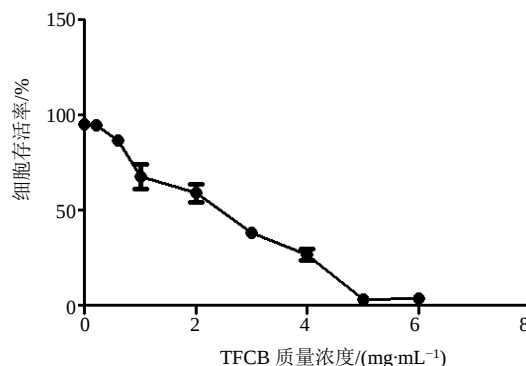
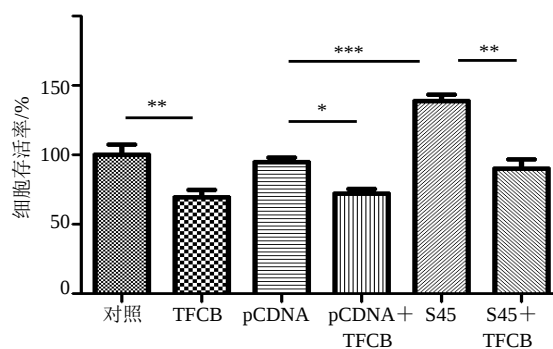


图 1 不同质量浓度 TFCB 对正常 A549 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effects of different concentrations of TFCB on survival rate of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



2 组间比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ comparison among groups, the same as below

图 2 给药 48 h 后各组细胞的存活率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Survival rate of each group after treatment with TFCB for 48 h ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

活率下降,对细胞抑制作用增强,计算其 IC_{50} 为 2.0 mg/mL。选取 2.0 mg/mL 作为后续实验的给药质量浓度。转染空载质粒的细胞与正常细胞相比,增殖活性无明显差异,但 S45 组细胞增殖活性明显提高 ($P<0.05$); TFCB 可使各组细胞的增殖活性均明显降低 ($P<0.05$),对 β -catenin 过表达细胞活性抑制尤为明显 ($P<0.01$)。

3.2 TFCB 对 A549 细胞迁移能力的影响

给药 48 h 后,与对照组比较, pCDNA 组细胞

的迁移率无明显差异(图 3、4)。与 pCDNA 组比较, S45 组细胞迁移率提高 ($P<0.05$)。采用 TFCB 干预后,正常 A549 细胞、转染空载质粒细胞、转染 S45A- β -catenin 过表达质粒细胞的迁移能力均明显降低 ($P<0.01$ 、0.001)。

3.3 TFCB 对 A549 细胞侵袭能力的影响

给药 48 h 后,与对照组比较, pCDNA 组细胞的侵袭能力无明显差异。而 S45 组细胞穿透人工基底膜的侵袭能力明显增强 ($P<0.01$)。TFCB 可使

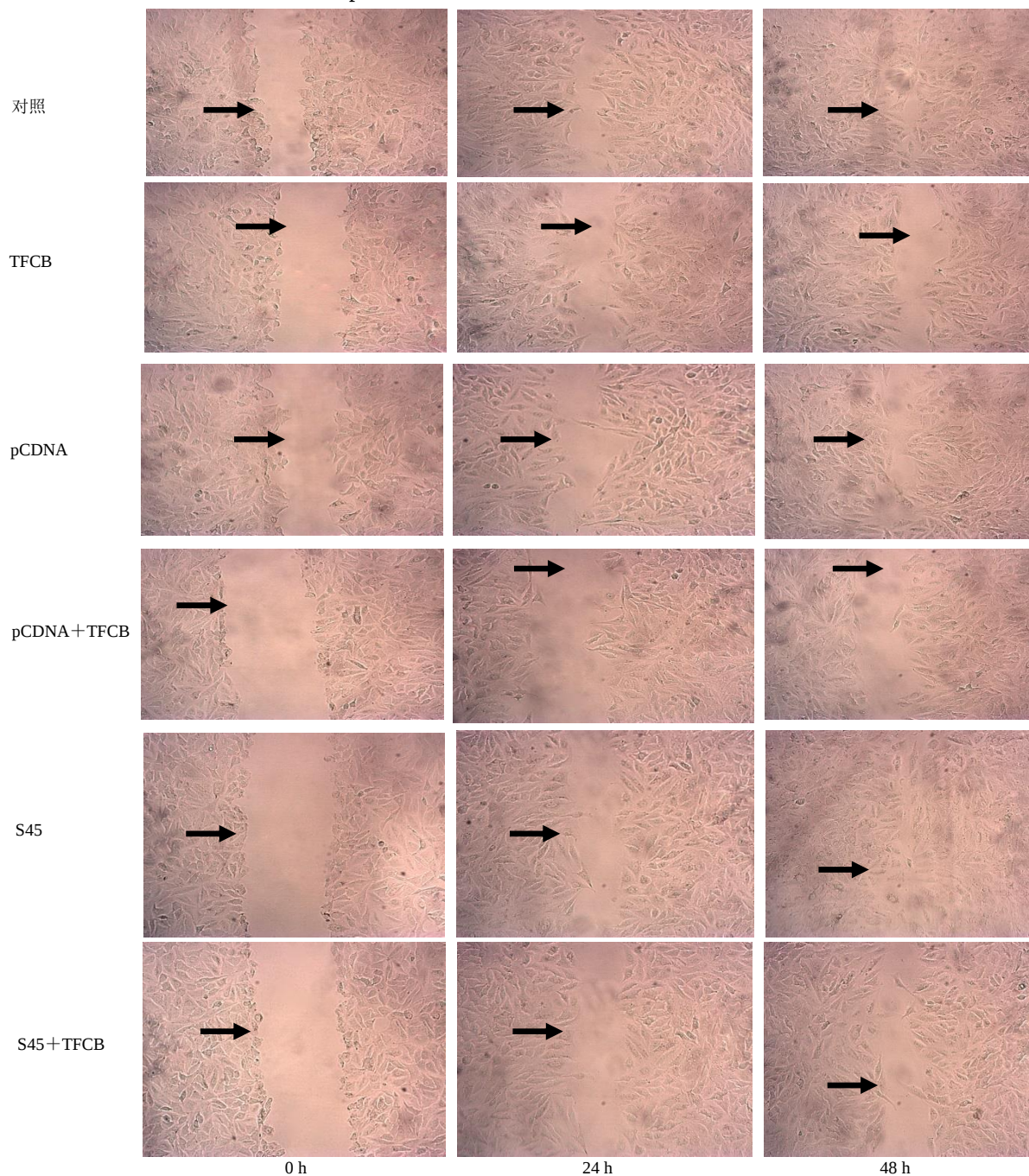


图 3 各组细胞的划痕迁移图像

Fig. 3 Migration image of cells in each group in scratch test

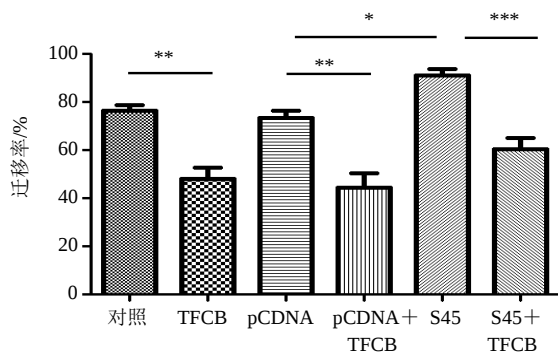


图 4 TFCB 对 A549 细胞迁移能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 4 Effects of TFCB on migration of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

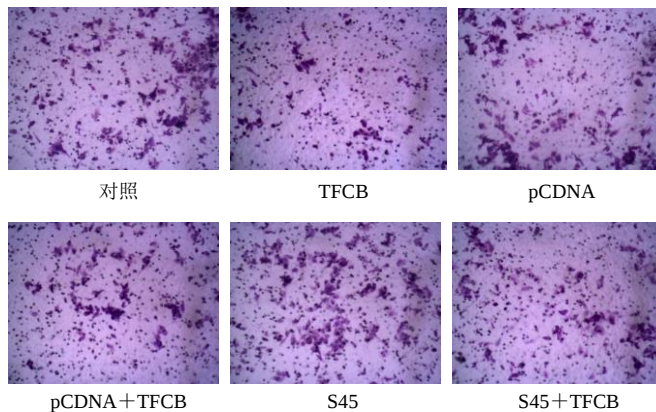


图 5 TFCB 对 A549 细胞侵袭能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effects of TFCB on invasion of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

染 S45A- β -catenin 过表达质粒细胞中 β -catenin、vimentin 蛋白表达水平下调 ($P < 0.05$), E-cadherin、GSK-3 β 、p-GSK-3 β 蛋白表达均无明显差异。各组细胞 Slug 蛋白表达水平均无显著差异。

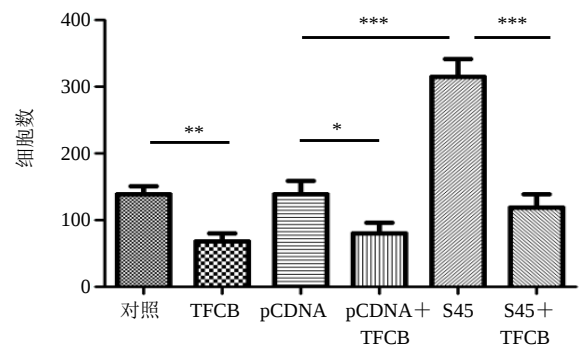
4 讨论

肺癌,属于中医“肺积、肺岩、息贲、虚劳”等范畴。古今医家认为肺癌的中医病因病机是由于邪毒侵袭,致邪毒留滞于肺,导致肺气抑郁,宣降失司,血行受阻,津液失于输布,津聚为痰,痰凝气滞,瘀阻脉络,瘀毒胶结,因实致虚,最终形成肺部积块,治疗原则可概括为“解毒化痰、行气化痰、益气养阴”^[13-15]。臭牡丹是著名中医药学家欧阳琦研究员挖掘湖南民间治疗恶性肿瘤的验方,并经几十年的反复临床、实验筛选而确定的一味中药。臭牡丹性寒,《湖南药物志》《陕西中草药》等记载其具有“祛风除湿、解毒散瘀、消肿止痛”之功,是符合肺癌“解毒、化痰、化痰”原则的用药。现代药理研究发现其具有镇静催眠、局麻、镇痛、抗

正常 A549 细胞、转染空载质粒细胞、转染 S45A- β -catenin 过表达质粒细胞的侵袭能力明显降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。见图 5。

3.4 TFCB 对 Wnt 通路相关蛋白表达的影响

Western blotting 结果显示 (图 6),与 pCDNA 组比较, S45 组细胞中 β -catenin、vimentin 蛋白表达水平上调 ($P < 0.001$), E-cadherin、GSK-3 β 、p-GSK-3 β 蛋白表达水平下调 ($P < 0.01$ 、0.001)。采用 TFCB 干预后,转染空载质粒细胞中 β -catenin、vimentin 蛋白表达下调 ($P < 0.05$ 、0.001), E-cadherin、GSK-3 β 、p-GSK-3 β 蛋白表达水平上调 ($P < 0.05$ 、0.01); 转



炎、抑菌、抗肿瘤等作用^[16]。以臭牡丹为主药的复方及其提取物均有较好的抗肿瘤作用。国内外对臭牡丹黄酮类成分的研究尚不多。有学者从臭牡丹中鉴定了 4 个黄酮类化合物,且均具有一定的抗肿瘤作用^[17-20]。本课题组前期研究发现 TFCB 具有较好的抗肿瘤作用,故对其抗肿瘤机制进行进一步研究。

上皮间质转化 (EMT) 是指上皮细胞在特定的生理和病理情况下,向间质细胞表型转化,同时伴随有细胞形态与细胞功能的改变。EMT 现象具有共同的细胞学机制,上皮属性蛋白如 E-cadherin、 β -catenin 表达下调,间质属性蛋白如 vimentin、fibronectin 表达上升, β -catenin 入核,细胞骨架改变,从而使肿瘤细胞获得强大的迁移与运动能力^[21-22]。Wnt 信号通路是诱导肿瘤 EMT 现象的重要通路,而 β -catenin 在胞浆中的浓度直接影响着 Wnt 信号的激活,并参与 EMT 的调控。在胞浆中,无 Wnt 信号时,在轴蛋白 (Axin) 作用下,腺瘤样的结肠息肉蛋白 (APC)、GSK-3 β 、酪蛋白激酶 I α (CKI α)

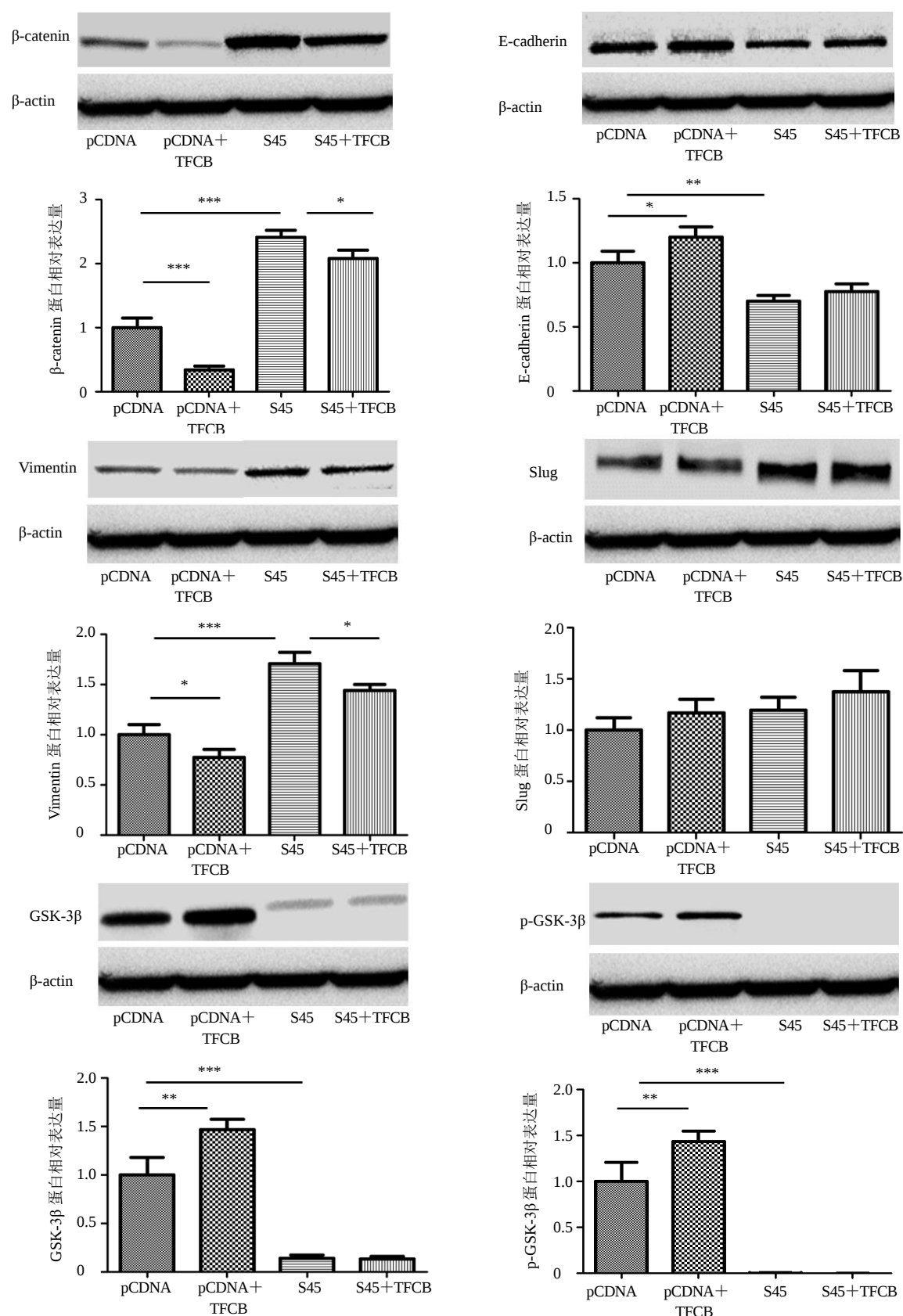


图 6 TFCB 对 Wnt 通路相关蛋白表达的影响

Fig. 6 Effects of TFCB on expression of related proteins in Wnt signal pathway

与 β -catenin 形成巨大的“降解复合体”，CKI α 首先将 β -catenin 氨基端的第 45 位丝氨酸 (S45) 磷酸化，紧接着 T41-S37-S33 的丝氨酸/苏氨酸残基依次发生磷酸化，最后被 β -转导素重复蛋白所识别，经泛素修饰后被蛋白酶降解^[23-24]。当 Wnt 信号激活时， β -catenin 进入细胞核与 T 细胞因子 (TCF/LEF) 形成转录复合物，直接控制着与 EMT 相关基因的表达。有学者认为细胞内稳定的高 β -catenin 为细胞发生 EMT 的关键因素，而 Wnt 通路的致癌关键是该途径任何一个信号分子异常致 β -catenin 在胞浆中累

积，继而进入胞核激活 Tcf/Lef 转录因子，启动靶基因转录。

本研究中采用 β -catenin 的 S45 磷酸化位点突变的质粒转染 A549 细胞，因 β -catenin 的 S45 位点是 CKI α 磷酸化 β -catenin 的关键起始步骤，S45 位点突变的 β -catenin 将不能被 CKI α 磷酸化，因此 T41-S37-S33 的丝氨酸/苏氨酸残基也无法完成磷酸化，导致 β -catenin 不能被降解而大量积聚在胞浆与细胞核，从而激活 Wnt 信号，并诱导 EMT 现象，见图 7。结果显示，转染 S45A- β -catenin 过表达质粒

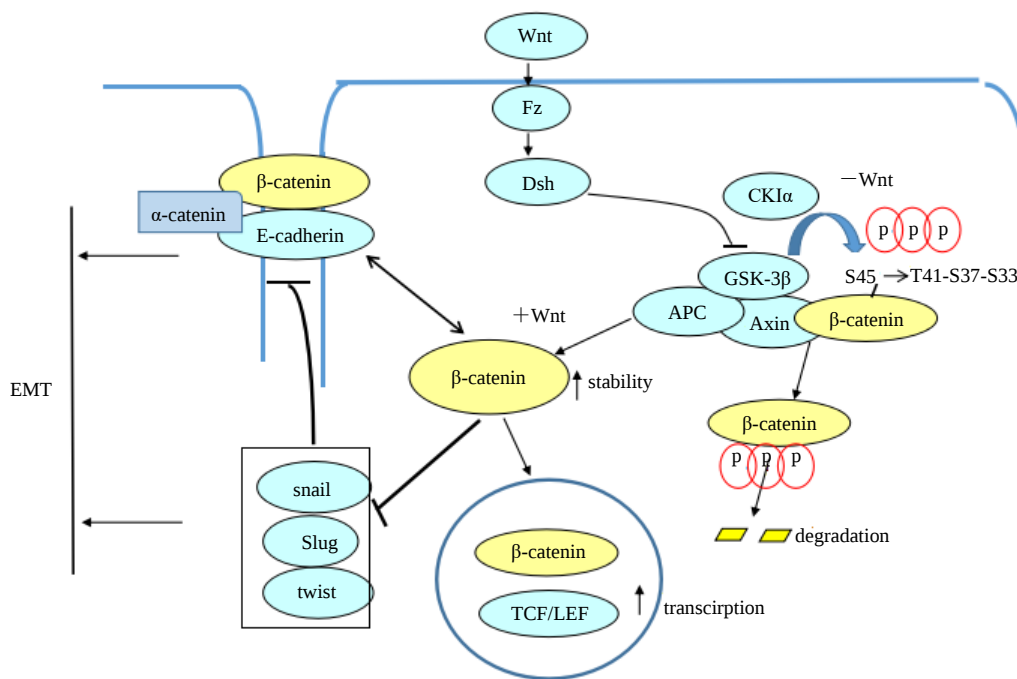


图 7 Wnt 信号通路与 EMT 关联示意图

Fig. 7 Association diagram of Wnt signal pathway and EMT

的 A549 细胞增殖、迁移、侵袭能力均明显增强，并显著上调 β -catenin、Vimentin 蛋白表达，下调 E-cadherin、GSK-3 β 、P-GSK-3 β 的蛋白表达，提示 A549 细胞内稳定的高表达 β -catenin 有激活 Wnt/ β -catenin 经典通路并诱导 EMT 现象。采用 TFCB 干预后，可抑制 A549 细胞的增殖、迁移、侵袭能力，在转染 S45A- β -catenin 质粒细胞中表现尤为明显，并通过调控相关蛋白的表达有逆转 EMT 现象的倾向。推测 TFCB 的抗肿瘤机制可能是通过抑制肿瘤细胞中 β -catenin 蛋白的表达，调控下游的一系列因子，从而影响 Wnt/ β -catenin 通路诱导的 EMT 现象。提示抑制细胞中 β -catenin 的高表达可能是 TFCB 抑制肺癌侵袭、转移的重要作用靶点之一。

参考文献

- [1] 刘永军, 杨婵娟. 我国肺癌流行趋势及疾病负担概况 [J]. 现代商贸工业, 2016, 37(2): 212-213.
- [2] 韩仁强, 郑荣寿, 张思维, 等. 1989—2008 年中国肺癌发病性别、城乡差异及平均年龄趋势分析 [J]. 中国肺癌杂志, 2013, 16(9): 445-512.
- [3] 王琦, 任秀宝, 蒋敬庭. 肺癌免疫细胞治疗临床转化的研究进展 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2015, 22(3): 375-380.
- [4] 王呈祥, 李庆伟, 高彦宇, 等. 中医药联合现代医学治疗非小细胞肺癌研究进展 [J]. 中医药信息, 2017, 34(1): 121-123.
- [5] 罗琴琴, 徐振晔, 王立芳, 等. 晚期非小细胞肺癌患者 (IV 期) 在中医药的维持治疗中获得较长的无病生存期: 一例病案和相关综述 [J]. 中华中医药杂志, 2017,

- 32(4): 1878-1882.
- [6] 陈 果, 王雄彪. 常用抗肿瘤中成药治疗肺癌临床研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 14(3): 63-67.
- [7] 蔡鹏涛, 吴志强, 郭 会, 等. 中药抑制非小细胞肺癌 PI3K/Akt/mTOR 信号通路克服 EGFR-TKIs 获得性耐药研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(12): 1849-1852.
- [8] 袁嘉瑞, 汪春飞, 宋 捷, 等. 麦冬醇提物抑制肺癌生长及自噬作用研究 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1541-1547.
- [9] 朱克俭, 欧阳剑虹, 卢铝沙. 保肺饮治疗肺癌前病变-支气管上皮细胞中、重度增生近期疗效观察 [J]. 中国中医药科技, 1995, 2(4): 42-43.
- [10] 朱克俭, 张亚利, 欧阳剑虹, 等. 保肺饮预防肺癌的临床流行病学研究 [J]. 中国中医药科技, 1997, 4(6): 332-333.
- [11] 潘 博, 潘敏求主任医师治疗肺癌经验 [J]. 湖南中医药, 2010, 26(3): 44-45.
- [12] 周文亮, 孙蕴哲, 唐 星. 用大孔树脂纯化柿叶总黄酮工艺考察 [J]. 中国药理学杂志, 2008, 6(5): 276-282.
- [13] 梁启军, 李瑞曼. 中医药治疗非小细胞肺癌的恒与变 [J]. 河南中医, 2013, 33(3): 324-325.
- [14] 张 翀. 邱幸凡教授治疗肺癌的经验 [J]. 世界中西医结合杂志, 2010, 5(10): 839-840.
- [15] 张午临, 刘 晖, 张云杰, 等. 解毒抗癌方维持治疗中晚期化疗后非小细胞肺癌患者的疗效 [J]. 现代中西医结合杂志, 2016, 25(3): 288-290.
- [16] 陈思勤, 朱克俭, 程晓燕, 等. 臭牡丹化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 湖南中医杂志, 2012, 28(2): 141-142.
- [17] 闫海燕. 镰形棘豆、臭牡丹化学成分的研究 [D]. 兰州: 西北师范大学, 2006.
- [18] Chen Y S, Shen S C, Lin H Y. Rutinoside at C7 attenuates the apoptosis-inducing activity of flavonoids [J]. *Biochem Pharmacol*, 2003, 66(7): 1139-1150.
- [19] Hung J Y, Hsu Y L, Ko Y C, *et al.* Didymine, a dietary flavonoid glycoside from citrus fruits, induces Fas-mediated apoptotic pathway in human non-small-cell lung cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Lung Cancer*, 2010, 68(3): 366-374.
- [20] Choi E J, Kim G H. Apigenin causes G(2)/M arrest associated with the modulation of p21 (Cipl) and Cdc2 and activates p53-dependent apoptosis pathway in human breast cancer SK-BR-3 cells [J]. *J Nutr Biochem*, 2009, 20(4): 285-290.
- [21] Wang Y, Lin Z, Sun L, *et al.* Akt/Ezrin Tyr353/NF- κ B pathway regulates EGF-induced EMT and metastasis in tongue squamous cell carcinoma [J]. *Brit J Cancer*, 2014, 110(3): 695-705.
- [22] Klymkowsky M W, Savagner P. Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe [J]. *Am J Pathol*, 2009, 174(5): 1588-1593.
- [23] Zha L, Zhang J, Tang W, *et al.* HMGA2 elicits EMT by activating the Wnt/ β -catenin pathway in gastric cancer [J]. *Digest Dis Sci*, 2013, 58(3): 724-733.
- [24] Han R, Xiong J, Xiao R, *et al.* Activation of β -catenin signaling is critical for doxorubicin-induced epithelial-mesenchymal transition in BGC-823 gastric cancer cell line [J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(1): 277-284.