

文章编号:1001-6880(2018)8-1319-07

# 除痰解毒方联合吉非替尼对肺腺癌 H1975 荷瘤小鼠 Twist、Fibronectin 表达的影响

罗 杨<sup>1,2</sup>, 王淑美<sup>1,2\*</sup>, 童冰杰<sup>1,2</sup>, 赵 宾<sup>1,2</sup>, 刘启欧<sup>1,2</sup>, 魏玉林<sup>1,2</sup><sup>1</sup>重庆医科大学中医药学院; <sup>2</sup>中医药防治代谢性疾病重庆市重点实验室 重庆 400016

**摘要:**本文研究除痰解毒方(Chutan Jiedu Decoction, CJD)联合吉非替尼对肺腺癌 H1975 荷瘤小鼠移植瘤 twist、fibronectin 表达的影响,从上皮间质转化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)角度探讨其抗肿瘤作用机制。建立人肺腺癌 H1975 耐药细胞荷瘤裸鼠模型,随机分为模型组,吉非替尼组,除痰解毒方低、中、高剂量组,除痰解毒方中剂量联合吉非替尼组,每组 10 只,各组予以相应的药物灌胃 2 周。检测瘤体积和瘤质量,计算抑瘤率,采用免疫组织化学法、Western blot 法、荧光定量 PCR 法检测各组肿瘤组织 twist、fibronectin 蛋白及基因的表达。结果显示,联合用药组抑瘤率为 61.92%,明显高于模型组、吉非替尼组,除痰解毒方低、中、高剂量组( $P < 0.01$ )。免疫组织化学法、Western blot 法及荧光定量 PCR 法结果均显示除痰解毒方中剂量、高剂量及联合用药组均能下调 twist 和 fibronectin 的表达,且联合用药组下调作用高于单独用药组( $P < 0.01$ )。研究结果表明除痰解毒方联合吉非替尼对肺腺癌 H1975 荷瘤小鼠移植瘤生长及 twist、fibronectin 表达的抑制作用优于除痰解毒方单药及吉非替尼组,其协同增效作用可能与逆转 EMT 增强吉非替尼的敏感性有关。

**关键词:**除痰解毒方;肺癌;H1975;twist;fibronectin

中图分类号:R271.19

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.8.006

## Effects of Chutan Jiedu Decoction Combined with Gefitinib on the Expressions of Twist and Fibronectin in Nude Mouse Xenografts Models of H1975 Human Lung Adenocarcinoma

LUO Yang<sup>1,2</sup>, WANG Shu-mei<sup>1,2\*</sup>, TONG Bing-jie<sup>1,2</sup>, ZHAO Bin<sup>1,2</sup>, LIU Qi-ou<sup>1,2</sup>, WEI Yu-lin<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Department of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University; <sup>2</sup>Chongqing Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine for Prevention and Cure of Metabolic Diseases Chongqing 400016, China

**Abstract:** The objective of this study was to investigate the effects of CJD combined with Gefitinib on the protein expressions of twist, fibronectin and their mRNA in nude mouse xenografts models of H1975 human lung and to study its anti-tumor mechanisms from EMT. 60 BALB/c mice were selected to establish lung cancer xenograft models with lung adenocarcinoma H1975 drug-resistant cells, which were randomly divided into six groups ( $n = 10$ ): control group, Gefitinib-treated group, CJD low-dose group, CJD middle-dose group, CJD high-dose group, and the combined medication group (CJD + Gefitinib-treated). Mice in each group were given intragastric administration with corresponding drugs for 2 weeks. The tumor size and tumor weight were detected. And the tumor inhibitory rates were calculated. The protein expressions of twist, fibronectin and their mRNA were detected by methods of immunohistochemistry, Western blotting and real-time PCR. Result: The tumor inhibitory rates of the combined medication group was 61.92%, which was higher than that of the control group, Gefitinib-treated group, CJD low-dose group, CJD middle-dose group and CJD high-dose group ( $P < 0.01$ ). The results of immunohistochemistry, Western blotting and Real-time PCR showed that the expressions of twist and fibronectin proteins and mRNA in CJD middle-dose group, CJD high-dose group and the combined medication group decreased significantly. And the combined medication group decreased than that of CJD or gefitinib alone ( $P < 0.01$ ). The inhibitory effect of CJD combined with gefitinib on the growth of the lung adenocarcinoma H1975 xenograft

收稿日期:2017-11-20 接受日期:2018-02-26

基金项目:国家中医药管理局课题 JDZX2015073;重庆市卫生局课题(2017-38, ZY201702131)

\*通信作者 Tel:86-018716369329; E-mail: Winna968@sina.com

in nude mice and the protein and mRNA expression levels of twist and fibronectin is superior to that of CJD or gefitinib alone. The combination of the two can play a synergistic effect, and its possible mechanism maybe related to reverse EMT to enhance the sensitivity of gefitinib.

**Key words:** Chutan Jiedu Decoction; lung cancer; H1975; twist; fibronectin

肺癌已成为世界上发病率和死亡率最高的恶性肿瘤,其中以非小细胞肺癌(non-small-cell lung cancer, NSCLC)尤为显著,约占所有肺癌的75%~85%<sup>[1,2]</sup>,近年来,以吉非替尼为代表的肺癌分子靶向药物表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, EGFR-TKI)为EGFR突变的非小细胞肺癌患者带来了希望,但几乎所有患者在9~13个月都发生了不同程度的耐药<sup>[3,4]</sup>。研究表明,上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)与TKI耐药密切相关,逆转EMT可增强EGFR-TKI的敏感性<sup>[5,6]</sup>。twist、fibronectin为EMT的关键因子,twist、fibronectin过高表达标志着EMT过程的发生,随即导致了肿瘤的转移、耐药<sup>[7-9]</sup>。本研究采用肺腺癌H1975耐药细胞荷瘤小鼠模型,观察在移植瘤组织中twist、fibronectin的表达,从EMT角度探讨其可能的作用机制。

## 1 材料与仪器

### 1.1 实验动物与细胞株

SPF级4~5周龄BALB/C-nu裸鼠,均为雄性,体质量16~18g,共66只(6只裸鼠肿瘤专用于传代),购自重庆医科大学实验动物中心,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2014-0004。肺腺癌H1975耐药细胞株由重庆威斯腾生物医药科技有限责任公司惠赠。

### 1.2 药物与试剂

除痰解毒方的组成有广木香7g、砂仁7g、党参15g、白术9g、陈皮5g、薏苡仁50g、红豆杉3g、茯苓15g、姜半夏5g、厚朴10g、三棱5g、莪术5g、威灵仙7g、仙鹤草15g、鱼腥草15g、金荞麦15g、浙贝母15g。购自重庆医科大学附属第一院中药房,经重庆医科大学中医药学院何先元教授鉴定为正品。将中药水煎制成终浓度为2.0g/mL,4℃保存;吉非替尼由阿斯利康公司惠赠(批号:MW954V)。胎牛血清购自GEMINI公司(批号:A46F82H),RPMI1640培养基购自HyClone公司(批号:ABA211779),twist、fibronectin等抗体购自美国Affinity Biosciences. OH. USA(批号:7238t54、

1888t61),兔SP检测试剂盒、DAB显色试剂盒均够自北京中杉金桥生物技术有限公司(批号分别为:17149A06,K172720B)。

### 1.3 主要仪器

低温离心机(Sigma公司),Gel Doc 2000N凝胶成像系统、POW-ER/PAC1000电泳仪、荧光定量PCR仪(美国ABI公司)、核酸蛋白分析仪(美国Beckan)、IX73光学显微镜(日本Olympus公司)。

## 2 方法

### 2.1 动物造模

将处于对数生长期的肺腺癌耐药细胞株H1975细胞悬液( $1 \times 10^7$ /mL)接种至6只裸鼠背部皮下以供传代(0.2mL/只)。用游标卡尺测量瘤块直径约7mm时,麻醉处死裸鼠,无菌剥取肿瘤组织,以无血清培养基制备细胞悬液,调节浓度为 $1 \times 10^7$ /mL,按0.2mL/只接种至60只BALB/C小鼠背侧皮下,以建立模型。

### 2.2 分组与给药

用游标卡尺测量瘤块直径约5mm时将60只荷瘤小鼠随机分为6组,模型组(生理盐水),吉非替尼组(0.004g/mL),除痰解毒方低、中、高剂量组(1.35、2.7、5.4g/mL),除痰解毒方中剂量联合吉非替尼组(2.7g/mL+0.004g/mL),每组10只,0.2mL/只灌胃,每天1次,连续14天。

### 2.3 抑瘤实验

第15天麻醉后处死裸鼠,称取瘤质量,测量各组瘤体的最长径a(cm)、最短径b(cm),分别计算肿瘤体积及抑瘤率。肿瘤体积(V)= $0.52ab^2$ (cm<sup>3</sup>)。抑瘤率(%)=(模型组平均瘤质量-治疗组平均瘤质量)/模型组平均瘤质量×100%。

### 2.4 免疫组织化学法检测Twist、Fibronectin的表达

10%多聚甲醛固定肿瘤组织,脱水,包埋,切片,Twist、Fibronectin抗体为一抗,根据SP试剂盒说明书操作。采用Image-Pro Plus 6.0软件测量染色区域的光密度值(IOD),有效统计区域的面积,计算区域内的平均光密度值IOD/Area。

### 2.5 Western blot法检测twist、fibronectin蛋白的表达

采用液氮研磨法和Bradford法对组织总蛋白进

行提取和定量,取样本 50  $\mu\text{g}$  蛋白质进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,移至硝酸纤维素膜(PVDF)上。常规孵育一抗和二抗,显影,检测蛋白表达,采用 Quantity one 图像分析软件对蛋白条带进行定量分析。

## 2.6 荧光定量 PCR 法检测 Twist、Fibronectin mRNA 的表达

按照 Trizol 试剂说明书提取 RNA。以紫外分光光度计及琼脂糖凝胶电泳的方法进行 RNA 浓度测定。按逆转录试剂盒(Thermo Fisher Scientific 公

司)说明书操作。根据 Gen Bank 上所查 mRNA 序列,采用软件设计引物,以  $\beta$ -actin 作为内参对照,见表 1。PCR 条件:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 57  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 共 40 个循环, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。反应结束后,用 ABI Step One Plus PCR System 软件分析,计算目的基因的 CT 值。各目的基因表达水平的差异比较:变化倍率 =  $2^{-\Delta\Delta CT}$ 。 $\Delta\Delta CT = (CT_{\text{处理组目的基因}} - CT_{\text{处理组内参基因}}) - (CT_{\text{对照组目的基因}} - CT_{\text{对照组内参基因}})$ 。

表 1 Twist、Fibronectin 和  $\beta$ -actin 引物序列

Table 1 The primer sequences of Twist、Fibronectin and  $\beta$ -actin

因子 Name	上游引物 Forward	下游引物 Reverse
Twist	5'-CCCACCCACTTTTGACGA-3'	5'-CAGTGGCTGATTGGCAAGAC-3'
Fibronectin	5'-ACACGGTTCCCATTACGCC-3'	5'-GCTCTTCCCATCGTCATAGCAC-3'
$\beta$ -actin	5'-GTGACGTTGACATCCGTAAAGA-3'	5'-GTAACAGTCCGCCTAGAACAC-3'

## 2.7 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行数据处理,实验数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,均采用单因素方差分析(One-way ANOVA),两两比较采用 LSD 检验进行显著性分析。 $P < 0.05$  表明差异有统计学意义。

## 3 实验结果

### 3.1 各组抑瘤实验结果比较

与模型组及吉非替尼组比较,除痰解毒方中、高剂量组及联合用药组的肿瘤体积和瘤质量显著下降,差异有显著性( $P < 0.01$ )。除痰解毒方中、高剂量组及联合用药组的抑瘤率分别为 48.56%、37.73%、61.92%,见表 2。

### 3.2 免疫组织化学法检测各组移植瘤组织中 Twist、Fibronectin 蛋白的表达

Twist 主要表达于细胞浆、细胞核中,fibronectin 主要表达于细胞膜、细胞质中,阳性表达呈黄色或棕黄色。与模型组及吉非替尼组比较,除痰解毒方中剂量组、联合用药组的 twist 和 fibronectin 光密度平均值显著下调,与模型组及吉非替尼组比较差异有显著性( $P < 0.01$ ),见图 1,图 2,表 3。

### 3.3 Western blot 检测各组移植瘤组织中 Twist、Fibronectin 蛋白表达的情况

与模型组及吉非替尼组比较,除痰解毒方中剂量组、高剂量组及联合用药组 Twist 和 Fibronectin 蛋白表达水平均显著下调( $P < 0.01$ ),且联合用药组 twist、fibronectin 蛋白表达水平低于单独用药组,差异有显著性( $P < 0.01$ ),见图 3,表 4。

表 2 除痰解毒方对模型小鼠肿瘤生长的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Effect of Chutan Jiedu Decoction on tumor growth in model mice( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	移植瘤体积 Tumor volume ( $\text{cm}^3$ )	瘤质量 Tumor weight (g)	抑瘤率 Tumor inhibition rate (%)
模型组 Model	$0.411 \pm 0.059$	$0.591 \pm 0.092$	-
吉非替尼组 Gefitinib	$0.399 \pm 0.085$	$0.525 \pm 0.088$	11.17%
CJD 低剂量组 Low-dose	$0.378 \pm 0.045$	$0.478 \pm 0.073^{**\triangle}$	19.12%
CJD 中剂量组 Middle-dose	$0.249 \pm 0.072^{**\triangle\triangle}$	$0.304 \pm 0.077^{**\triangle\triangle}$	48.56%
CJD 高剂量组 High-dose	$0.316 \pm 0.056^{**\triangle\triangle}$	$0.368 \pm 0.087^{**\triangle\triangle}$	37.73%
联合用药组 Combined medication group	$0.184 \pm 0.077^{**\triangle\triangle}$	$0.225 \pm 0.061^{**\triangle\triangle}$	61.92%

注:与模型组比较, $^{**} P < 0.01$ ;与吉非替尼组比较, $^{\triangle\triangle} P < 0.01$ 。

Note: Compared with model group,  $^{**} P < 0.01$ ; Compared with Gefitinib group,  $^{\triangle\triangle} P < 0.01$ .

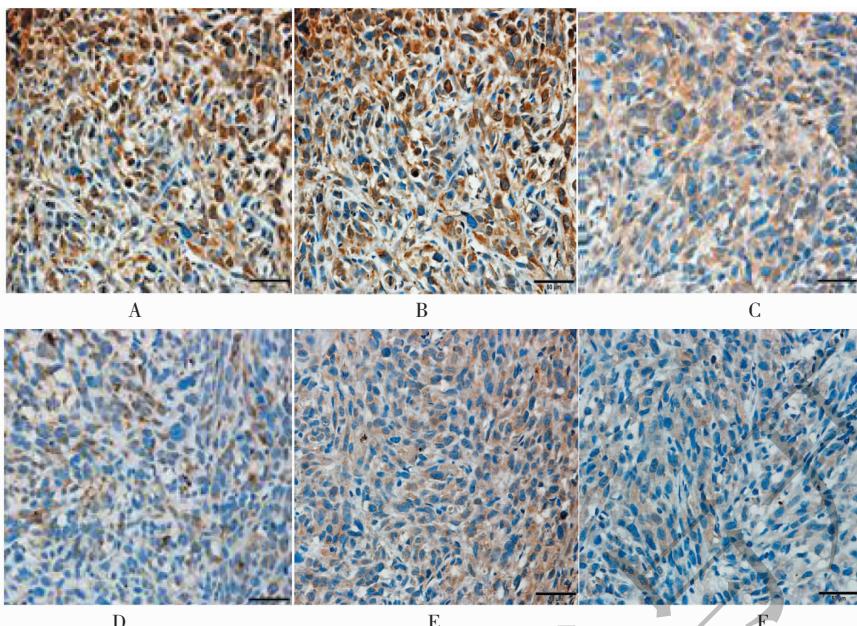


图1 除痰解毒方对裸鼠移植瘤组织 twist 蛋白表达的影响 (SP  $\times$  400)

Fig. 1 Effect of Chutan Jiedu Decoction on the expressions of twist in Nude Mouse Xenografts (SP  $\times$  400)

注:A:模型组;B:吉非替尼组;C:除痰解毒方低剂量组;D:除痰解毒方中剂量组;E:除痰解毒方高剂量组;F:联合用药组。

Note: A: Model Group; B: Gefitinib Group; C: CJD Low-dose Group; D: CFD Middle-dose Group; E: CJD High-dose Group; F: combined medication group.

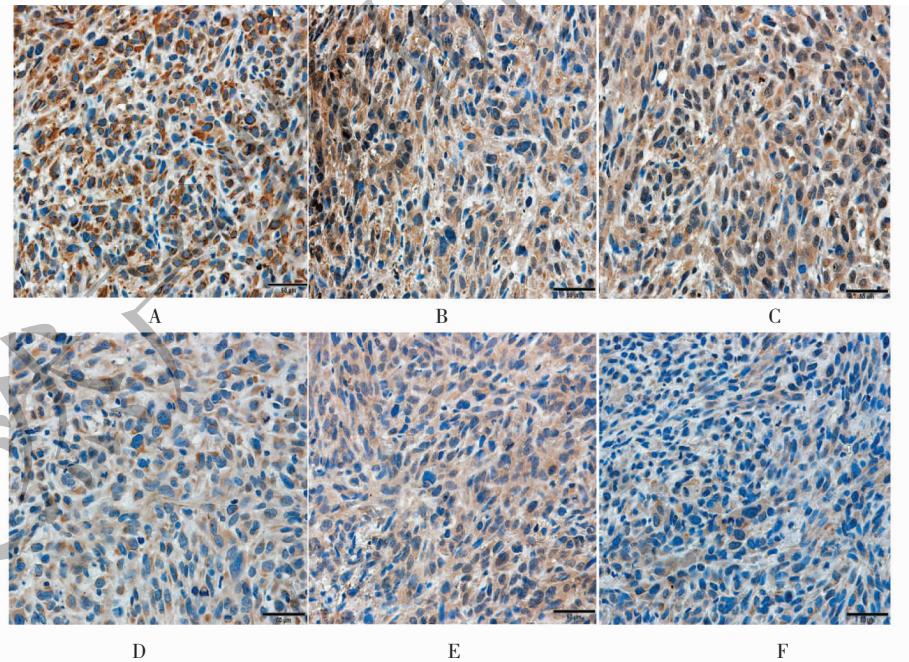


图2 除痰解毒方对裸鼠移植瘤组织 fibronectin 蛋白表达的影响 (SP  $\times$  400)

Fig. 2 Effect of Chutan Jiedu Decoction on the expressions of fibronectin in Nude Mouse Xenografts (SP  $\times$  400)

### 3.4 除痰解毒方对各组移植瘤组织中 Twist、Fibronectin mRNA 表达的影响

与模型组及吉非替尼组比较,除痰解毒方低剂

Fibronectin mRNA 表达水平显著降低( $P < 0.01$ ),且

联合用药组 Twist、Fibronectin mRNA 表达水平低于量组、中剂量组、高剂量组及联合用药组 Twist 独用药组,差异有显著性( $P < 0.01$ ,见表 5)。

表 3 除痰解毒方对移植瘤组织 twist、fibronectin 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )Table 3 Effect of Chutan Jiedu Decoction on expression of twist and fibronectin ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	剂量 Dose (g/mL)	Twist	Fibronectin
模型组 Model	-	0.283 ± 0.038	0.255 ± 0.054
吉非替尼组 Gefitinib	0.004	0.279 ± 0.055	0.240 ± 0.029
CJD 低剂量组 Low-dose	1.35	0.266 ± 0.057	0.224 ± 0.035
CJD 中剂量组 Middle-dose	2.7	0.176 ± 0.034 * * △△	0.157 ± 0.034 * * △△
CJD 高剂量组 High-dose	5.4	0.221 ± 0.049 * * △△	0.190 ± 0.023 * * △△
联合用药组 Combined medication group	0.004/2.7	0.135 ± 0.031 * * △△	0.124 ± 0.021 * * △△

注:与模型组比较, \* \*  $P < 0.01$ ;与吉非替尼组比较, △△  $P < 0.01$ 。

Note: Compared with model group, \* \*  $P < 0.01$ ; compared with Gefitinib group, △△  $P < 0.01$ .

表 4 各组移植瘤组织中 twist、fibronectin 蛋白表达的比较( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )Table 4 Comparison of twist and fibronectin protein expression in transplanted tumor tissues ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	剂量 Dose (g/mL)	Twist	Fibronectin
模型组 Model	-	0.795 ± 0.049	0.821 ± 0.071
吉非替尼组 Gefitinib	0.004	0.758 ± 0.056	0.769 ± 0.063
CJD 低剂量组 Low-dose	1.35	0.700 ± 0.059 * *	0.491 ± 0.070 * * △△
CJD 中剂量组 Middle-dose	2.7	0.364 ± 0.056 * * △△	0.300 ± 0.066 * * △△
CJD 高剂量组 High-dose	5.4	0.410 ± 0.041 * * △△	0.361 ± 0.049 * * △△
联合用药组 Combined medication group	0.004/2.7	0.223 ± 0.049 * * △△	0.214 ± 0.056 * * △△

注:与模型组比较, \* \*  $P < 0.01$ ;与吉非替尼组比较, △△  $P < 0.01$ 。

Note: Compared with model group, \* \*  $P < 0.01$ ; Compared with Gefitinib group, △△  $P < 0.01$ .

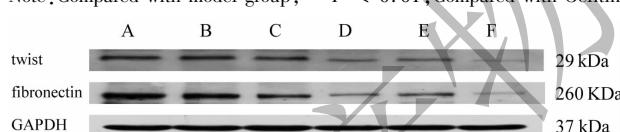


图 3 各组移植瘤组织中 twist、fibronectin 蛋白表达的比较

Fig. 3 Comparison of twist and fibronectin protein expression in transplanted tumor tissues

注:A:模型组,B:吉非替尼组,C:除痰解毒方低剂量组,D:除痰解毒方中剂量组,E:除痰解毒方高剂量组,F:联合用药组。

Note: A: model group, B: gefitinib group, C: CJD low-dose group, D: CJD middle-dose group, E: CJD high-dose group, F: combined medication group.

## 4 讨论与结论

EGFR-TKI 耐药已成为限制 EGFR-TKI 广泛应用的瓶颈。对于 EGFR-TKI 耐药机制的研究很多,主要包括 EGFR-T790M 突变、MET 基因扩增、旁路激活以及 EMT 等。研究表明,EMT 与 EGFR-TKI 耐药密切相关,EMT 有望成为治疗或预防 EGFR-TKI 耐药的重要靶点<sup>[2,3]</sup>。EMT 表现为上皮细胞失去极

性,转化为间质样形态,从而导致细胞间黏附能力下降,细胞侵袭能力增加,肿瘤患者不良预后及耐药等<sup>[3]</sup>。Twist 是一种碱性螺旋-环-螺旋转录因子,是上皮-间质转变过程中的重要调控因子,Twist 在肿瘤耐药、抗凋亡、EMT 和肿瘤侵袭方面均发挥重要作用,Twist 的过度表达与肺癌的发生、发展、转移、耐药密切相关,检测 Twist 有助于肺癌患者评估恶性程度及预后<sup>[4]</sup>, Fibronectin(FN)是细胞外基质中的一种非胶原糖蛋白,广泛存在于间叶细胞表面和细胞质,通过与细胞外基质相互作用,起到调节细胞粘附、迁移、生长、分化,维持组织形态等。在病理状态下, FN 与肿瘤的生长、浸润、侵袭转移及血管生成有关。Bae 等研究发现 FN 表达与淋巴结转移,肿瘤分级,Her-2 表达正相关<sup>[5,6]</sup>。

中医药治疗应贯穿于 NSCLC 各个阶段,研究证实中药可协同提高肺癌对分子靶向药物的敏感性,对晚期肺癌治疗具有重要的作用<sup>[7]</sup>。基于临床应用发现除痰解毒方联合吉非替尼可显著延缓吉非替尼产生耐药的时间,同时能提高患者的生存质量。

表 5 各组移植瘤组织 twist、fibronectin mRNA 表达的比较( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ,  $\bar{x} \pm s, n = 10$ )Table 5 Comparison of twist, fibronectin mRNA expression in transplanted tumor tissues ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ,  $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	剂量 Dose (g/mL)	Twist	Fibronectin
模型组 Model	-	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
吉非替尼组 Gefitinib	0.004	0.886 ± 0.061 **	0.891 ± 0.068 **
CJD 低剂量组 Low-dose	1.35	0.776 ± 0.064 **△△	0.732 ± 0.056 **△△
CJD 中剂量组 Middle-dose	2.7	0.552 ± 0.059 **△△	0.556 ± 0.063 **△△
CJD 高剂量组 High-dose	5.4	0.702 ± 0.067 **△△	0.624 ± 0.052 **△△
联合用药组 Combined medication group	0.004/2.7	0.436 ± 0.040 **△△	0.447 ± 0.038 **△△

注:与模型组比较, \*\*  $P < 0.01$ ;与吉非替尼组比较, △△  $P < 0.01$ 。

Note: Compared with model group, \*\*  $P < 0.01$ ; Compared with Gefitinib group, △△  $P < 0.01$ .

现代药理研究证明除痰解毒方中的药物有一定的抗肿瘤作用,如茯苓抗肿瘤的主要有效成分为茯苓多糖与茯苓素,通过抑制肿瘤细胞DNA合成来抑制肿瘤细胞的生长<sup>[8]</sup>。白术的主要成分为挥发油,可通过提高巨噬细胞的活性,增强机体非特异性免疫功能,抑制癌细胞生长<sup>[9]</sup>。红豆杉中提取的紫杉醇通过抑制细胞核仁功能,导致细胞核仁降解,诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[10]</sup>。薏苡仁中薏苡仁酯、薏苡仁多糖具有促进肺癌细胞凋亡而达到抗肿瘤耐药的作用<sup>[11]</sup>。鱼腥草主要化学成分为挥发油和黄酮,通过诱导肿瘤细胞凋亡等方式治疗恶性肿瘤<sup>[12]</sup>。金荞麦其有效成份是原花色素缩合性单宁类物质,既能抑制肿瘤细胞的生长,又可增强机体的免疫功能<sup>[13]</sup>。浙贝母的有效成分浙贝母碱可通过提高化疗药物在耐药细胞的浓度来促进药物杀伤耐药细胞,从而减缓细胞耐药的发生<sup>[14]</sup>。仙鹤草醋酸乙酯可通过升高细胞内游离Ca<sup>2+</sup>和细胞内活性氧,从而诱导癌细胞的凋亡<sup>[15]</sup>。研究表明中药具有多靶点抗肿瘤作用,通过调节机体内环境,逆转EMT相关蛋白等来抑制肿瘤血管生成,促进肿瘤细胞凋亡,提高机体免疫功能。吉非替尼通过竞争性结合酪氨酸激酶结构域的ATP,抑制蛋白激酶的磷酸化和肿瘤血管的形成,从而阻断EGFR信号转导通路,促进肿瘤细胞的凋亡<sup>[2]</sup>。中药与吉非替尼相结合,发挥减毒增效的作用。

本课题通过检测各组移植瘤 twist、fibronectin 的表达,从EMT角度探讨其可能的作用机制。结果表明,除痰解毒方中剂量组、高剂量组及联合用药组均有不同程度的抑制移植瘤的生长,促进肿瘤凋亡,同时能下调 twist 和 fibronectin 蛋白及 mRNA 的表达,且联合用药组的作用效果优于单独用药组,差异有统计学意义,两药合用有协同增效的作用。这可能

与调节肿瘤细胞EMT相关蛋白twist和fibronectin的表达有关,从而使肺腺癌H1975移植瘤对吉非替尼再次敏感,延缓肺癌靶向耐药的发生。本研究为除痰解毒方用于临床治疗靶向耐药提供了一定的实验依据。

## 参考文献

- Chen WQ(陈万青), Zheng RS(郑荣寿), Zhang SW(张思维), et al. Report of cancer incidence and mortality in China, 2012 [J]. *China Cancer*(中国肿瘤), 2016, 25:1-8.
- Vakoc CR, Garcia-Manero G, Look AT. Cancer therapy resistance: chasing epigenetics [J]. *Nature Medicine*, 2014: 340-341.
- Pan YH(潘永红), Jiao L(焦琳), He Y(何勇), et al. Inhibitory effect and mechanism of gefitinib combined with metformin on EGFR-TKI intrinsic resistant NSCLC H1975 cells [J]. *Acta Acad Med Mil Tert*(第三军医大学学报), 2017, 39:668-674.
- Hu P, Yang JJ, Hou YX, et al. LncRNA expression signatures of twist-induced epithelial-to-mesenchymal transition in MCF10A cells [J]. *Cellular Signalling*, 2014, 26:83-93.
- Ma LJ, Lee SW, Lin LC, et al. Fibronectin overexpression is associated with latent membrane protein 1 expression and has independent prognostic value for nasopharyngeal carcinoma [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35:1703-1712.
- Bae YK, Kim A, Kim MK, et al. Fibronectin expression in carcinoma cells correlates with tumor aggressiveness and poor clinical outcome in patients with invasive breast cancer [J]. *Hum Pathol*, 2013, 44:2028-2037.
- Zhang M(张敏), Li P(李平), Zhu YD(朱耀东), et al. Clinical observation of traditional Chinese medicine Yiqi Yangxin Jiedu decoction combined with EGFR-TKI in treatment of non-small-cell lung cancer [J]. *LSZ Med Mat Med RES*(时珍国医国药), 2017, 28:1673-167.

(下转第 1366 页)