

本文引用:李小娜,李开瑞,何迎春,徐朝军,宋 岚.血根碱抑制肺腺癌 A549 细胞生长及机制初探[J].湖南中医药大学学报,2021,41(1):61-66.

血根碱抑制肺腺癌 A549 细胞生长及机制初探

李小娜¹,李开瑞¹,何迎春^{1,2,3},徐朝军^{4,5},宋 岚^{1,2,3*}

(1.湖南中医药大学医学院,湖南长沙 410208;2.中医药防治眼耳鼻喉疾病湖南省重点实验室,湖南长沙 410208;
3.湖南省中医药防治眼耳鼻喉疾病与视功能保护工程技术研究中心,湖南长沙 410208;4.湖南中医药大学第一附属医院
心胸外科,湖南长沙 410007;5.湖南中医药大学中医学国内一流建设学科,湖南长沙 410208)

[摘要] **目的** 研究血根碱(sanguinarine, SAN)对肺腺癌 A549 细胞增殖、凋亡和细胞周期的影响,并探讨其可能的作用机制。**方法** 将肺腺癌 A549 细胞随机分为空白组、SAN 不同浓度(1.25、2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$)组、阳性组。采用噻唑蓝[3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT]法和实时无标记动态细胞分析技术(real time cellular analysis, RTCA)检测细胞增殖;采用流式细胞术检测细胞周期分布;采用 Annexin V-FITC/PI 双荧光染色法检测细胞凋亡;采用蛋白免疫印迹(Western blot)法检测增殖相关蛋白(PCNA)、周期相关蛋白(Cyclin D1、Cyclin D3、CDK4)、凋亡相关蛋白(Bax、XIAP、Survivin)表达水平。**结果** MTT法和RTCA检测结果均显示,不同浓度SAN均能够抑制肺腺癌A549细胞增殖($P<0.01$)。流式细胞术检测结果显示,不同浓度SAN(2.5、5 $\mu\text{mol/L}$)处理肺腺癌A549细胞24h后,其G1期比例显著增加($P<0.01$)。AnnexinV-FITC/PI双荧光染色法结果,经SAN(2.5、5 $\mu\text{mol/L}$)处理24h后的肺腺癌A549细胞凋亡率明显增加($P<0.01$)。Western blot结果显示,经SAN干预后的肺腺癌A549细胞的增殖相关蛋白PCNA($P<0.01$)、周期相关蛋白Cyclin D1、Cyclin D3、CDK4($P<0.01$)、抗凋亡蛋白Survivin、XIAP($P<0.05$ 或 $P<0.01$)表达水平均显著降低,促凋亡蛋白Bax($P<0.01$)表达水平明显提高。**结论** SAN能抑制肺腺癌A549细胞增殖,将其细胞周期阻滞于G1期,并可诱导其细胞凋亡。

[关键词] 血根碱;肺腺癌 A549 细胞;增殖;凋亡;细胞周期

[中图分类号]R285.5 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2021.01.011

Inhibitory Effect of Sanguinarine on the Growth of Lung Adenocarcinoma A549 Cells and its Mechanism

LI Xiaona¹, LI Kairui¹, HE Yingchun^{1,2,3}, XU Zhaojun^{4,5}, SONG Lan^{1,2,3*}

(1. School of Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Hunan Provincial Key Laboratory for the Prevention and Treatment of Ophthalmology and Otolaryngology Diseases with Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Hunan Provincial Ophthalmology and Otolaryngology Diseases Prevention and Treatment with Traditional Chinese Medicine and Visual Function Protection Engineering and Technological Research Center, Changsha, Hunan 410208, China; 4. Department of Cardiothoracic Surgery, The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 5. The Domestic First-class Discipline Construction Project of Chinese Medicine of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of sanguinarine (SAN) on proliferation, apoptosis and cell cycle of lung adenocarcinoma A549 cells and to explore its mechanism. **Methods** Lung adenocarcinoma A549 cells were randomly divided into

[收稿日期]2020-09-25

[基金项目]国家自然科学基金项目(81874408);中国博士后科学基金项目(2015M580690);湖南省自然科学基金项目(2019JJ40216);湖南省中医药科研计划项目(201696);中医内科学省部共建教育部重点实验室开放基金项目(ZYNK201506);湖南省干细胞中药调控实验室开放基金项目(2013GXB02);湖南省研究生创新项目(CX2018B482);湖南中医药大学研究生创新项目(2018CX62);湖南省研究生科研创新项目(CX20190552)。

[作者简介]李小娜,女,在读硕士研究生,研究方向:中西医结合防治肺损伤。

[通讯作者]*宋 岚,女,博士,硕士研究生导师,E-mail:33230025@qq.com。

the blank group, different concentrations of SAN (1.25, 2.5, 5, 10 $\mu\text{mol/L}$) groups and the positive group. 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) and real-time cellular label free dynamic analysis (RTCA) were used to detect the cell proliferation. Flow cytometry was performed to evaluate the cell cycle distribution. Annexin V-FITC/PI double fluorescent staining was used to detect the cell apoptosis. Western blot was used to detect the expression levels of proliferation-related protein (PCNA), cell cycle-related proteins (Cyclin D1, Cyclin D3, CDK4), and apoptosis-related proteins (Bax, XIAP, Survivin) **Results** The results of MTT and RTCA showed that SAN at different concentrations could inhibit the proliferation of lung adenocarcinoma A549 cells ($P<0.01$). Flow cytometry showed that the G1 phase proportion of lung adenocarcinoma A549 cells was significantly increased ($P<0.01$) after treated with different concentrations of SAN (2.5, 5 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h. Annexin V-FITC/PI double fluorescent staining showed that the apoptosis rate was significantly increased ($P<0.01$) after treated with SAN (2.5, 5 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h. Western blot showed that, the expression of proliferation-related protein PCNA ($P<0.01$), cell cycle-related protein Cyclin D1, Cyclin D3 and CDK4 ($P<0.01$), and anti apoptotic protein Survivin and XIAP ($P<0.05$ or $P<0.01$) were decreased, while the expression of pro-apoptotic protein Bax was significantly increased ($P<0.01$). **Conclusion** SAN can inhibit the proliferation and arrest the cell cycle in G1 phase, and induce apoptosis of lung adenocarcinoma A549 cells.

[**Keywords**] sanguinarine; lung adenocarcinoma A549 cells; proliferation; apoptosis; cell cycle

肺癌是指原发于各级支气管黏膜或腺体的恶性肿瘤,在中国以及全球范围内其发病率和死亡率居于首位^[1]。肺腺癌属于非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC),约占肺癌的 85%,是肺癌常见的组织学类型,易发生血行转移和局部浸润,患病率极高,临床治疗多以手术、放疗、化疗为主,但存在不可忽视的不良反应,如术后转移、放疗及化疗不敏感、耐药等^[2],因此,探求较安全有效的治疗方法和减弱治疗中的不良反应是目前研究的热点。中药单体血根碱(sanguinarine, SAN)是从中药博落回、白屈菜和紫堇等植物提取的苯并菲啶类生物碱^[3],已有研究证实 SAN 具有抗肿瘤和抗病毒等作用^[4],其抗肿瘤作用机制与调节信号通路、阻遏细胞周期、诱导细胞凋亡、抑制肿瘤新生血管形成等有关^[5-7],本实验以肺腺癌 A549 细胞为对象,研究 SAN 对其增殖及凋亡的影响,并探讨相关的作用机制。为 SAN 进入肺癌临床治疗提供理论依据。

1 材料

1.1 细胞株

人非小细胞肺癌细胞株 A549(337696,北纳创联生物技术有限公司),由中医药防治眼耳鼻喉疾病实验室培养传代进行后续实验。

1.2 实验药物与试剂

Ham's F-12 K Medium 完全培养基(WH112004 XP, 武汉普诺赛生命科技有限公司);SAN(B21412, 上海金穗生物科技有限公司);顺铂(P4394-25MG, 美国西格玛生物科技有限公司);二甲基亚砜(D8371, 美国百赛生物技术股份有限公司);Annexin

VFITC/PI 凋亡检测试剂盒(70-AP101, 上海碧迪医疗器械有限公司);BCA 蛋白定量试剂盒(A00755)、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(50426)及 RIPA 裂解液(R0020)均购自北京康为世纪生物科技有限公司;PCNA(13110)、Bax(5023)、XIAP(14334)、Survivin(2808)、Cyclin D1(55506)、Cyclin D3(2936)、CDK4(12790)、 β -Actin(3700)均购自美国 CST 公司。

1.3 主要仪器

倒置显微镜(AE2000, 日本奥林巴斯有限公司);全自动酶标分析仪(SN19092724, 美国伯腾仪器有限公司);多功能荧光成像仪(Odyssey CLX, 美国 Licor 公司);双荧光细胞分析仪(Cellometer K2, 北京诺来生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

将冻存的肺腺癌 A549 细胞放置 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴箱迅速解冻,再移至 2.5 mL 的 EP 管中进行离心(1 000 r/min, 5 min, 离心半径 15 cm),弃掉冻存液,收集细胞沉淀,加入含有 1%青霉素-链霉素和 10%胎牛血清的 Ham's F-12 K Medium 完全培养基,制成单细胞悬液,移至培养瓶中进行培养,将培养瓶放置在培养箱(37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2),1~2 d 更换一次培养液,待细胞贴壁后,取对数生长期的细胞进行后续实验。

2.2 噻唑蓝[3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT]法检测细胞增殖

待肺腺癌 A549 细胞贴壁后,取处于对数生长

期的细胞,根据细胞计数结果,制成4 000个细胞/100 μL 的单细胞悬液,种于96孔板,细胞培育12 h后,弃废液,随机分为空白组、SAN不同浓度组(1.25、2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$)和阳性组,各孔加入200 μL 不同浓度的药物,每组设置4~5个复孔,在SAN处理24 h后,PBS清洗2~3遍,加入100 μL MTT(0.5 g/L)溶液,培养箱中避光孵育3~4 h,弃MTT溶液,PBS再次清洗,加入100 μL 二甲基亚砜,避光摇晃10 min,酶标仪490 nm波长测定每孔的OD值,按照增殖公式^[8]计算细胞相对增殖率,实验重复3次。

增殖率=(实验组OD值-空白组OD值)/(对照组OD值-空白组OD值) $\times 100\%$

2.3 实时无标记动态细胞分析术(real time cellular analysis, RTCA)监测细胞增殖情况

RTCA孔板需先加入50 μL 培养液,再启动分析仪测量孔板的基线。细胞数量及实验分组同“2.2”。肺腺癌A549细胞培育12 h后,取出RTCA孔板,用吸引器将废液吸出,PBS清洗,在增殖曲线处于上升趋势时,按照实验分组每孔加入200~250 μL 不同浓度药物,不同浓度组均设置3~4个复孔,监测时间设置为100 h左右。

2.4 流式细胞术分析细胞周期

依据MTT和RTCA实验结果,选取抑制肺腺癌A549细胞较好的低浓度SAN(2.5、5 $\mu\text{mol/L}$)处理24 h进行后续实验,实验分组:空白组、SAN 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 组、SAN 5 $\mu\text{mol/L}$ 组、阳性组。将A549细胞悬液均匀种于6孔板(1×10^5 个细胞/孔),培育12 h后,按照实验分组加2 mL SAN干预处理24 h后,消化并收集细胞悬液,离心收集细胞沉淀,加1 mL 75%冰乙醇,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱固定8 h以上。弃上清,离心收集细胞沉淀,每管加入100 μL PI染色液,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴箱避光孵育30 min,于荧光双染流式细胞仪检测,实验重复3次。

2.5 Annexin V-FITC/PI双荧光染色法检测细胞凋亡率

分组同“2.4”,药物处理24 h后,消化、离心、收集沉淀移至EP管,各组加入100 μL 1 \times binding buffer重悬细胞,再分别加入5 μL FITC和10 μL PI,避光染色15 min后再加入100 μL 1 \times binding buffer终止染色,轻轻混匀,防止因混匀力度较大而出现细胞碎片,于荧光双染流式细胞仪检测细胞凋亡率,实验重复3次。

2.6 Western blot检测相关蛋白表达水平

将处于对数生长期的肺腺癌A549细胞悬液均匀平铺于10 cm的培养皿中,分组同“2.4”。SAN处理24 h后,每皿加入100 μL 裂解液,放置冰上裂解,用细胞刮将细胞及混合液刮至皿边缘,再用移液枪移至1.5 mL EP管中,放置4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱裂解30 min,进行离心(12 000 r/min,10 min,离心半径15 cm),收集细胞上清,用BCA蛋白试剂盒测蛋白浓度,配置样品并放置金属浴(100 $^{\circ}\text{C}/10$ min)进行蛋白变性,进行SDS-PAGE电泳,按照顺序为滤纸+胶+PVDF膜+滤纸进行湿转。加入25%脱脂牛奶,放置摇床封闭1 h,用TBST洗净残余的封闭牛奶液,根据目的条带位点孵育一抗过夜(β -Actin、PCNA、Bax、XIAP、Survivin、Cyclin D1、Cyclin D3、CDK4均按照1:1 000稀释),洗膜3次,避光孵育各自荧光二抗2 h,于摇床上避光洗3次,于Odyssey-CLX进行显影,实验重复3次。

2.7 统计学处理方法

采用SPSS 17.0统计学软件对数据进行分析,计量资料数据用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,若符合正态性及方差齐性,选择单因素方差分析,若不足时,选择秩和检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 SAN对肺腺癌A549细胞增殖的影响

MTT和RTCA实验结果显示,与空白组相比,经不同浓度SAN干预后的肺腺癌A549细胞的生存活力明显降低($P<0.01$)。结合上述实验结果,选择抑制增殖较好的低浓度SAN(2.5、5 $\mu\text{mol/L}$)处理肺腺癌A549细胞24 h后进行后续实验。与空白组相比,SAN 5 $\mu\text{mol/L}$ 组及阳性组细胞增殖相关蛋白PCNA表达显著下降($P<0.01$)。见表1、图1、图2。

表1 不同浓度SAN对肺腺癌A549细胞活性的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	OD值
空白组	99.3 \pm 3.21
1.25 $\mu\text{mol/L}$ 组	88.34 \pm 2.08**
2.5 $\mu\text{mol/L}$ 组	78.67 \pm 1.53** $\&\&$
5 $\mu\text{mol/L}$ 组	67.22 \pm 1.09** $\&\&\#$
10 $\mu\text{mol/L}$ 组	59.52 \pm 1.97** $\&\&\#\Delta\Delta$
阳性组	78.93 \pm 1.20** $\&\&\Delta\Delta\Diamond$

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与SAN 1.25 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, $\&\&$ $P<0.01$;与SAN 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, $\#$ $P<0.01$;与SAN 5 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, $\Delta\Delta$ $P<0.01$;与SAN 10 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, \Diamond $P<0.01$

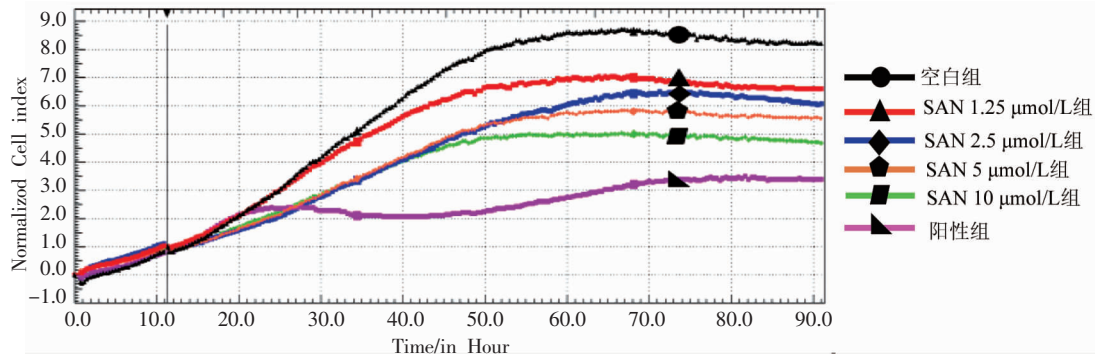
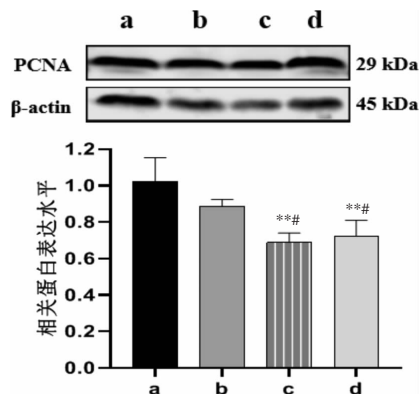


图 1 各组细胞增殖情况



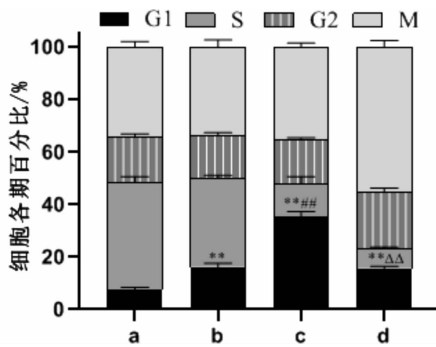
注:a. 空白组;b. SAN 2.5 μmol/L 组;c. SAN 5 μmol/L 组;d.阳性组。与空白组比较,** $P<0.01$;

与 SAN 2.5 μmol/L 组比较,# $P<0.05$

图 2 各组细胞 PCNA 蛋白表达水平

3.2 SAN 对肺腺癌 A549 细胞周期的影响

与空白组比较,SAN(2.5、5 μmol/L)组细胞周期 G1 期所占比例提高($P<0.01$),且随着 SAN 浓度的升高,G1 期所占比例也呈增加趋势。与空白组比较,SAN 5 μmol/L 组 A549 细胞的周期相关蛋白 Cyclin D1、Cyclin D3、CDK4 的表达量显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$);SAN 2.5 μmol/L 组 A549 细胞的周期相关蛋白 Cyclin D1、Cyclin D3 的表达量显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 3、图 4。

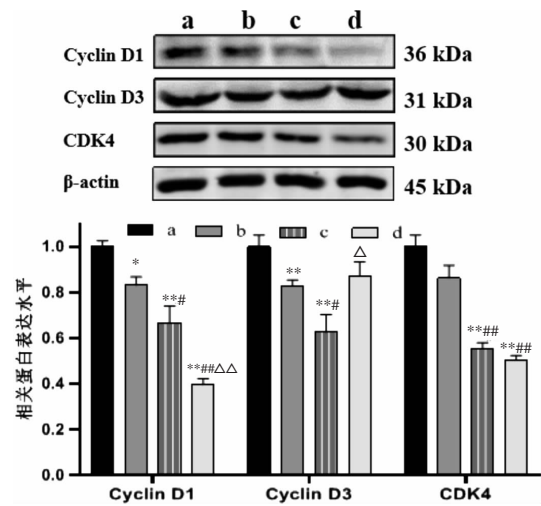


注:a. 空白组;b. SAN 2.5 μmol/L 组;c. SAN 5 μmol/L 组;d. 阳性组。与空白组比较,** $P<0.01$;

与 SAN 2.5 μmol/L 组比较,# $P<0.05$;

与 SAN 5 μmol/L 组比较,Δ $P<0.05$,ΔΔ $P<0.01$

图 3 各组细胞周期分布比例



注:a. 空白组;b. SAN 2.5 μmol/L 组;c. SAN 5 μmol/L 组;d.阳性组。与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;

与 SAN 2.5 μmol/L 组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$;

与 SAN 5 μmol/L 组比较,Δ $P<0.05$,ΔΔ $P<0.01$

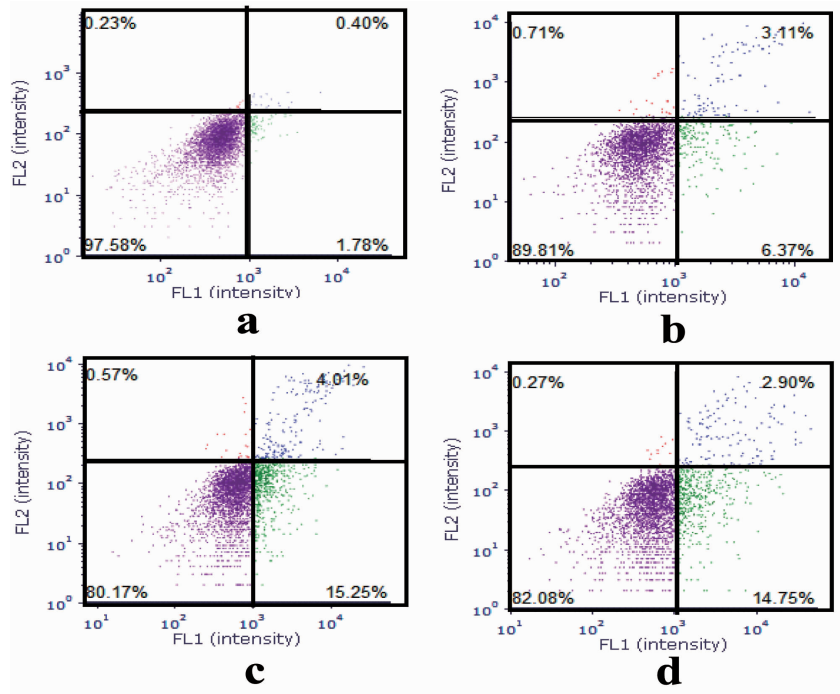
图 4 各组细胞 Cyclin D1、Cyclin D3、CDK4 蛋白表达水平

3.3 SAN 对肺腺癌 A549 细胞凋亡的影响

与空白组比较,SAN(2.5、5 μmol/L)组细胞凋亡率明显增加,且以早期凋亡为主,细胞的凋亡率随着药物浓度的提升而增加($P<0.01$)。与空白组比较,SAN 5 μmol/L 组及阳性组凋亡蛋白 Bax 的表达水平明显增强,抗凋亡相关蛋白 XIAP、Survivin 的表达水平显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。见图 5、图 6、图 7。

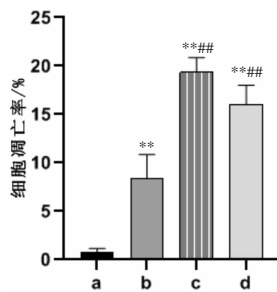
4 讨论

在我国,肺癌的发病率与死亡率均居于癌症首位,每年约有 80 万人被确诊为肺癌,近 5 年的生存率仅为 20%^[9]。某些抗癌治疗手段会使免疫系统遭到破坏而导致患者体质变差,且治愈率较低^[10]。当前研究^[11]证明,中医药不仅可以减轻放疗及化疗的不良反应,还可以有效控制肿瘤恶变程度,在肿瘤康复领域发挥重要作用。因此,从中药中筛选高效、低



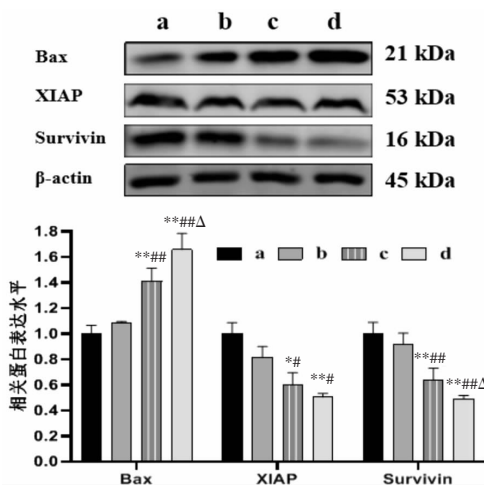
注:a.空白组;b.SAN 2.5 μmol/L 组;c.SAN 5 μmol/L 组;d.阳性组

图 5 各组细胞凋亡情况



注:a.空白组;b.SAN 2.5 μmol/L 组;c.SAN 5 μmol/L 组;d.阳性组。与空白组比较,** $P < 0.01$;与 SAN 2.5 μmol/L 组比较, # $P < 0.01$

图 6 各组细胞凋亡率



注:a.空白组;b.SAN 2.5 μmol/L 组;c.SAN 5 μmol/L 组;d.阳性组。与空白组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 SAN 2.5 μmol/L 组比较, # $P < 0.05$,## $P < 0.01$;与 SAN 5 μmol/L 组比较,Δ $P < 0.05$

图 7 各组细胞 Bax、XIAP、Survivin 蛋白表达水平

毒的新型抗癌药物,是目前治疗肺癌相关研究的重要组成部分。

中药单体 SAN 是从传统草药白屈菜及博落回等罂粟科植物中发现的苯并菲啶类生物碱^[3],已被证实具有较好的抗癌活性。已有研究^[12-15]证实,SAN 在胃癌、肝癌、宫颈癌等多种肿瘤中均有抗肿瘤作用,其机制可能与抑制细胞增殖、促进细胞凋亡及阻滞细胞周期有关。本实验采用 MTT 法和 RTCA 法检测 SAN 对 A549 细胞增殖的影响,实验结果显示不同浓度 SAN 处理肺腺癌 A549 细胞 24 h 后的增殖率均低于空白组。Western blot 结果表明,SAN 组肺腺癌 A549 细胞 PCNA 蛋白明显降低,PCNA 可反映 DNA 复制的状态,经常作为肿瘤细胞活性标志物。

肿瘤细胞失控性生长的原因之一是细胞周期调控机制发生紊乱,因此采用流式细胞术检测 SAN 对肺腺癌 A549 细胞周期的影响,发现 A549 细胞周期被 SAN 阻滞于 G1 期,且药物浓度越高、G1 期比重越高。SAN 组肺腺癌 A549 细胞周期相关蛋白 Cyclin D1、Cyclin D3、CDK4 的表达均降低。在细胞周期中,具有代表性的 Cyclin D1 和 Cyclin D3 可促使细胞增殖加快^[16]。蛋白激酶 CDK4 在细胞进入增殖周期时首先被激活,可与 Cyclin D1/Cyclin D3 紧密结合,形成 Cyclin/CDK 激酶复合物,加快细胞从

G1 期到 S 期进程^[17-18]。综上所述,SAN 可能通过改变细胞周期相关蛋白表达,使肺腺癌 A549 细胞周期阻滞于 G1 期,抑制其增殖。

Annexin V-FITC/PI 双荧光染色法是观察 SAN 对肺腺癌 A549 凋亡的影响比较直观的实验方法,其检测结果表明,SAN 可诱导肺腺癌 A549 细胞凋亡,且随着药物浓度的增加凋亡率也增加。Bax 是具有代表性的促凋亡基因,属于 Bcl-2 家族,当 Bax 表达量激增时,会使神经细胞凋亡蛋白酶(Caspases)激活,诱导细胞凋亡;而且编码的 Bax 蛋白可与 Bcl-2 结合形成异二聚体,加速肿瘤细胞的凋亡^[19-20]。凋亡抑制因子 XIAP 可通过抑制 Caspases 活性调节肿瘤细胞的凋亡^[21]。Survivin 具有肿瘤特异性,只表达于肿瘤和胚胎组织,其表达水平越高提示预后越差^[22]。

上述实验结果表明,SAN 能抑制肺腺癌 A549 细胞增殖、诱导其凋亡,但其具体机制需要更深入的研究。

参考文献

[1] HERBST R S, MORGENSZTERN D, BOSHOFF C. The biology and management of non-small cell lung cancer[J]. *Nature*, 2018, 553(7689):446-454.

[2] YADAV S, AGRAWAL S, DIVYA RAVALI S S, et al. Lung cancer: analysis of biomarkers and methods of diagnostic and prognostic value[J]. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France)*, 2017, 63(6):88-92.

[3] SEHAMUDDIN G, ANEES R, SIRAJ P, et al. Molecular targets and anticancer potential of sanguinarine—a benzophenanthridine alkaloid[J]. *Phytomedicine*, 2017,34:143-153.

[4] FU C X, GUAN G P, WANG H B. The anticancer effect of sanguinarine: A review[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2018, 24(24):2760-2764.

[5] ACHKAR I W, MRAICHE F, MOHAMMAD R M, et al. Anti-cancer potential of sanguinarine for various human malignancies [J]. *Future Medicinal Chemistry*, 2017, 9(9):933-950.

[6] 杨 佳,陈 旻,李明花,等.血根碱对人肺腺癌细胞迁移、侵袭和 Wnt β -catenin 信号通路的影响[J].*肿瘤防治研究*,2019,46(12):1057-1061.

[7] YU Y, LUO Y, FANG Z, et al. Mechanism of sanguinarine in inhibiting macrophages to promote metastasis and proliferation of lung cancer via modulating the exosomes in A549 cells[J]. *Oncotargets and Therapy*, 2020, 13:8989-9003.

[8] 李开瑞,刘 洁,李小娜,等.齐墩果酸对肺腺癌 A549 细胞增殖及

凋亡的影响及机制[J].*中国医药导报*,2019,16(31):4-9,181.

[9] WANG Z, LI S, WU L, et al. Effect of acupuncture on lung cancer-related fatigue: study protocol for a multi-center randomized controlled trial[J]. *Trials*, 2019, 20(1): 625-633.

[10] OBERNDORFER F, MüLLAUER L. Molecular pathology of lung cancer: Current status and perspectives [J]. *Current Opinion in Oncology*, 2018, 30(2):69-76.

[11] 李小江,郭明歆,孔凡铭,等.中药有效成分抗肿瘤活性及作用机制研究进展[J].*中草药*,2020,51(9):2587-2592.

[12] 胡 灿,金建伟,陆仲夏,等.血根碱抑制人胃癌 SGC-7901 细胞增殖、迁移和细胞周期的研究[J].*中国药理学通报*,2019,35(6):844-849.

[13] 张素仙,王妍妍,张 琴,等.血根碱对紫杉醇耐药卵巢癌 A2780/Taxol 细胞生长及 TGF- β 1/Smad 通路抑制的影响[J].*中国中西医结合杂志*,2018,38(6):717-720.

[14] 杨艺莹,郭文静,马承旭,等.血根碱通过诱导活性氧促进 HepG2 细胞凋亡的机制研究[J].*中国药理学通报*,2018,34(3):370-375.

[15] 李贞彩,姜 平,王秋宇,等.血根碱对宫颈癌细胞增殖、凋亡、侵袭、迁移能力影响机制研究[J].*重庆医学*,2017,46(22):3039-3042.

[16] CHEN J, LI X, CHENG Q, et al. Effects of cyclin D1 gene silencing on cell proliferation, cell cycle, and apoptosis of hepatocellular carcinoma cells[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2018, 119(2):2368-2380.

[17] LI Y, XIAO X, CHEN H X, et al. Transcription factor NFYA promotes G1/S cell cycle transition and cell proliferation by transactivating cyclin D1 and CDK4 in clear cell renal cell carcinoma[J]. *American Journal of Cancer Research*, 2020,10(8): 2446-2463.

[18] 谢华夏,徐志远,郑国淀,等.槐耳清膏联合顺铂改变胃癌SGC7901 细胞周期分布的实验研究[J].*浙江医学*,2017,39(14):1155-1157,1174.

[19] FENG S, ZHU J, XIA K, et al. Cantharidin inhibits anti-apoptotic Bcl-2 family proteins and induces apoptosis in human osteosarcoma cell lines MG-63 and MNNG/HOS via mitochondria-dependent pathway[J]. *Medical Science Monitor*, 2018,24:6742-6749.

[20] L OSUWANNARAK N, SRITULARAK B, CHANVORACHOTE P. Cycloartobioxanthone induces human lung cancer cell apoptosis via mitochondria-dependent apoptotic pathway[J]. *In Vivo*, 2018, 32(1):71-78.

[21] 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.

[22] LING X M, ZHU F H, ZHOU X M, et al. Survivin is critically involved in VEGFR2 signaling-mediated esophageal cancer cell survival[J]. *Biomedicine Pharmacotherapie*, 2018, 107: 139-145.