

- Ophiorrhiza [J]. J Nat Med, 2007(61): 759-765.
- [4] XU Y, QIU H Q, LIU H, et al. Effects of koumine, an alkaloid of *Gelsemium elegans* Benth., on inflammatory and neuropathic pain models and possible mechanism with allopregnanolone [J]. Pharmacol Biochem Behav, 2012, 101(3): 504-514.
- [5] YE L X, SU Y P, CAO D X, et al. Content determination and stability of koumine by UPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2015, 32(4): 471-474.
- [6] 余淑琳,蒋超,黄璐琦,等. 基于环介导等温扩增技术快速鉴别钩吻[J]. 中药材, 2014, 37(4): 594-596.
- [7] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 112-118.
- [8] 杨樱,邱丽莉,许文,等. 闽产钩吻根总生物碱半数致死量的实验研究[J]. 海峡药理学, 2011, 23(12): 40-42.
- [9] DUAN X Y, GAO W F, ZHANG H, et al. Optimal extraction technology of indigo naturalis by uniform design [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2012, 29(4): 326-329.
- [10] XU Y K, LIAO S G, NA Z, et al. Gelsemium alkaloids, immunosuppressive agents from *Gelsemium elegans* [J]. Fitoterapia, 2012, 83(6): 1120-1124.
- 收稿日期: 2015-10-08

白花蛇舌草乙醇提取物联合吉非替尼对 TGF- β_1 诱导的肺腺癌细胞 H358 上皮间质化的干预作用

吕昕¹, 朱渊红¹, 周林水¹, 王真¹, 刘正中²(1.浙江中医药大学附属第一医院, 杭州 310006; 2.浙江中医药大学, 杭州 310053)

摘要: 目的 研究白花蛇舌草乙醇提取物(ethanol extract of *Hedyotis diffusa*, EEHD)联合吉非替尼对 TGF- β_1 诱导的肺腺癌细胞 H358 上皮间质化的干预作用。方法 以上皮表型人肺腺癌细胞 H358 为研究对象, TGF- β_1 诱导构建细胞上皮间质化模型, 按 EEHD、吉非替尼及两药 3 种不同顺序联合作用分为 6 组: A 组, EEHD 作用 48 h; B 组, 吉非替尼作用 48 h; A24B24 组, 先 EEHD 作用 24 h, 后吉非替尼作用 24 h; B24A24 组, 先吉非替尼作用 24 h, 后 EEHD 作用 24 h; AB48 组, 同时加入吉非替尼和 EEHD 作用 48 h; 对照组。CCK-8 法测定各组细胞死亡率, Western-blot 检测各组细胞中 E-cadherin、Vimentin、EGFR 蛋白表达情况, 流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况, 比较组间差异。结果 各组药物作用均能不同程度抑制上皮间质化肺腺癌细胞 H358 增殖, E-cadherin 表达呈上升趋势, Vimentin 表达下降。其中 EEHD 联合吉非替尼组的细胞生长抑制率和细胞凋亡率显著高于吉非替尼单用组, E-cadherin 蛋白表达率则显著高于吉非替尼单用组, 而 EGFR、Vimentin 蛋白表达率显著低于吉非替尼单用组($P<0.05$), EEHD 与吉非替尼先后顺序作用组间差异无统计学意义。结论 EEHD 与吉非替尼对上皮间质化的 H358 细胞具有联合抑制作用, 白花蛇舌草可部分逆转 H358 细胞上皮间质化状态。

关键词: 白花蛇舌草; 吉非替尼; 上皮间质化; H358 细胞

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2016)02-0154-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.02.005

Intervention Effect of Ethanol Extract of *Hedyotis Diffusa* and Gefitinib on the Epithelial Mesenchymal Transition Process of Human Lung Adenocarcinoma Cell H358 Induced By TGF- β_1

LYU Xin¹, ZHU Yuanhong¹, ZHOU Linshui¹, WANG Zhen¹, LIU Zhengzhong²(1.The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, China; 2.Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the ethanol extract of *Hedyotis diffusa*(EEHD) and gefitinib(Gef) used on the human lung adenocarcinoma H358 cell, which has been induced to epithelial mesenchymal transition by transforming growth factor beta 1(TGF- β_1) *in vitro*. **METHODS** The H358 cells were successfully induced to the epithelial mesenchymal transformation model by 5 ng·mL⁻¹ TGF- β_1 for 24 h. After preparation of the EEHD, respectively added EEHD for 48 h(Group A), Gef for 48 h(Group B), EEHD for 24 h and then Gef for 24 h(Group A24B24), Gef for 24 h and then EEHD for 24 h(Group B24A24), EEHD combined with Gef for 48 h(Group AB) and the control group to the model cells. Then the rates of cell growth were detected by CCK-8 test, the protein expression of epithelial marker (E-cadherin) and mesenchymal cell marker (Vimentin) were detected by Western-blot. And the rates of apoptosis were tested by flow cytometry. **RESULTS** In all other groups, the

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划项目(2013KYB187); 浙江省中医药科技计划项目(2013ZQ014)

作者简介: 吕昕, 女, 硕士, 主治医师

Tel: (0571)86620305

E-mail: LX1206@163.com

expression of E-cadherin increased while the expression of Vimentin decreased than the control group. The rates of cell growth inhibition and apoptosis of EEHD combined with gefitinib group were significantly higher than gefitinib monotherapy group's, and the expressions of EGFR, Vimentin were significantly lower than gefitinib monotherapy group's, while the expressions of E-cadherin was higher than gefitinib monotherapy group's, $P < 0.05$. There was no statistically significant difference between the groups of different orders(A24B24 and B24A24). **CONCLUSION** Hedyotis diffusa and gefitinib have a combined effect for the epithelial mesenchymal transition(EMT) and tumor cell growth process. Hedyotis diffusa have partially reversal effect on H358 which has been induced by TGF- β_1 to epithelial mesenchymal transformation model. Hedyotis diffusa can partially reverse the EGFR-TKI resistance problems caused by EMT.

KEY WORDS: ethanol extract of *Hedyotis diffusa*; gefitinib; epithelial mesenchymal transition; H358 cell

肺癌细胞的上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)已被多项研究证实与肿瘤的发生、转移、耐药等相关,上皮间质转化的特征表现为上皮细胞的连接蛋白(如E-钙黏蛋白和 γ -连环蛋白)的丧失,以及间质标记物(如波形蛋白和纤连蛋白)的增加^[1]。有研究表明,多种因素参与了EMT,其中转化生长因子TGF- β_1 起着关键作用,在TGF- β_1 的刺激下,大多数上皮型细胞会向间质样细胞转分化^[2]。吉非替尼是一种选择性表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKI),在EGFR基因突变的非小细胞肺癌中的作用效果显著^[3],已研究证实EMT是EGFR-TKI耐药产生过程中具有重要作用^[4]。白花蛇舌草(*Hedyotis diffusa* Willd.)为茜草类植物,具有清热解毒、收敛利湿、消痈散结等功效,是中医常用来治疗肿瘤的药物之一。大量基础研究证实,其在体内外对肿瘤生长都有较强的抑制作用^[5-6],但目前其作用机制仍不明确。本实验室前期的研究表明白花蛇舌草乙醇提取物(ethanol extract of *Hedyotis diffusa*, EEHD)能部分干预甚至逆转H358细胞上皮间质转化过程,本研究观察了EEHD是否能通过改变EMT状态而对EGFR-TKI疗效产生影响。

1 材料与方法

1.1 试剂及设备

1.1.1 药品及细胞培养相关试剂 浙江省中医院中药房郑敏霞主任医师鉴定为白花蛇舌草(*Hedyotis diffusa* Willd.);吉非替尼(上海源叶生物科技有限公司,批号:YY14627-1g,纯度 $\geq 99\%$);TGF- β_1 (美国Peprotech公司,批号:1012209-1);H358细胞株(上海中科院细胞研究所);1640培养基(杭州诺扬生物技术有限公司);无支原体胎牛血清(杭州诺扬生物技术有限公司,批号:131226);胰蛋白酶(杭州诺扬生物技术有限公司,20131015);二甲基亚砜(DMSO,美国Sigma公司,

批号:D3892);盐酸(上海化学试剂有限公司,批号:100103);无水乙醇(上海化学试剂有限公司,分析纯,批号:120721);甲醇(上海化学试剂有限公司,分析纯,批号:130604);E-cadherin 兔抗人一抗(美国ImmunoWay公司,批号:YT1415);Vimentin 兔抗人一抗(美国Immuno Way公司,批号:YT4880);EGFR 兔抗人一抗(Santa Cruz公司);羊抗兔HRP标记二抗(碧云天生物科技);AnnexinV 凋亡检测试剂盒(BD公司);0.45 μm 孔径PVDF膜(美国GE healthcare公司,批号:10001252)。

1.1.2 设备 240i型细胞培养箱(德国Heraeus公司);XW-80A型漩涡混匀器(上海精科实业有限公司);CHB-100型恒温金属浴(杭州博日科技有限公司);SW-CJ-IF型层流超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);MR-4100型酶标仪(美国Dynatech公司);PB203-N型精密电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司);JY92-II型超声波细胞粉碎机(宁波新芝科器研究所);Mini Blotter型转膜电泳槽(美国GE healthcare公司);DYY-6C型电泳仪(北京市六一仪器厂);E-4500型数码相机(日本尼康仪器有限公司)。

1.2 EEHD的提取、配制

1.2.1 提取方法 精确称取白花蛇舌草干燥全草50 g,用剪刀剪碎,置入1 000 mL圆底烧瓶中,加入500 mL95%乙醇,软木塞封闭圆底烧瓶口,浸泡24 h,接回流提取设备,在恒温电热套里加热,直至沸腾开始计时,沸腾持续1 h后,用3层纱布封住瓶口,滤出提取液。再加入95%乙醇,加入量以没过药草为准,再煎取1次,时间为1 h。合并2次的粗提液,用中速定性滤纸、循环水式多用真空泵进行抽滤,滤除粗提取液中的杂质颗粒,用旋转蒸发仪对抽滤液进行浓缩,制成干浸膏,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷藏备用。

1.2.2 配制 用时精确称取白花蛇舌草浸膏

0.4 g, 用 500 μL DMSO 充分溶解后, 加 9.5 mL 三蒸水稀释, 配成浓度为 40 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ EEHD, 用 0.22 μm 的微孔滤膜滤过除菌, 分装到 EP 管中作为母液, 置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

1.3 吉非替尼液的制备

吉非替尼粉末 89.3 mg 溶于 1 mL DMSO 配制成 200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的药物原液, 置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 实验前用无血清培养液稀释成所需浓度, 每次实验中 DMSO 的最高终浓度 $<1:2\ 000$ 。

1.4 细胞培养和处理

1.4.1 TGF- β_1 诱导构建细胞 EMT 模型 取对数生长期肺泡上皮细胞 H358, 用胰蛋白酶进行消化后加入含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 以 $9\times 10^5\text{ mL}^{-1}$ 细胞种于 75T 培养瓶中, 置于培养箱。当细胞生长融合至 70%~80%, 用无血清培养基饥饿 24 h, 使细胞静止于同步期, 加入浓度为 5 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 TGF- β_1 , 作用 24 h, 期间倒置显微镜下间断性观察, 根据细胞形态判断是否发生 EMT(细胞形态由椭圆形演变成纺锤状, 细胞间隙增大, 一些细胞从细胞团中分离), 并拍照记录 TGF- β_1 作用前后细胞形态的变化。

1.4.2 分组及给药方案 已成功诱导 EMT 的细胞随机分为 6 组: A 组, 吉非替尼作用 48 h; B 组, EEHD 作用 48 h; A24B24 组, 先吉非替尼作用 24 h, 后 EEHD 作用 24 h; B24A24 组, 先 EEHD 作用 24 h, 后吉非替尼作用 24 h; AB48 组, 同时加入吉非替尼和 EEHD 作用 48 h; 对照组。各组加入吉非替尼和 EEHD 后, 药物的终浓度分别为 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

1.5 CCK8 试验测细胞抑制率

H358 经胰酶消化后计数, 以 $1\times 10^5\cdot\text{mL}^{-1}$ 细胞密度接种于 96 孔板, 每孔 100 μL 。待细胞长至 80%~90% 时, 加入各组预设药物, 每孔设 6 复孔, 外周孔空置设对照组, 药物分别作用 24, 48 h 后每孔加入 10 μL CCK8, 孵育 2 h, 酶标仪测 450 nm 吸光度值。以对照组细胞活力为 100%, 按公式计算各组药物对 H358 细胞增殖的抑制率, 重复 3 次。细胞活性 $= [(A_{\text{加药}}) - (A_{\text{空白}})] / [(A_{0\text{加药}}) - (A_{\text{空白}})] \times 100\%$, 细胞抑制率 $= 1 - \text{细胞活性}$ 。

1.6 Western-blot 检测细胞中 E-cadherin, Vimentin 蛋白的表达

细胞总蛋白的提取: PBS 冲洗培养瓶, 按比例加入蛋白酶抑制剂, 用细胞刮刀收集细胞,

16 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 高速离心 30 min, 弃上清, 加入 RIPA 裂解液 200 μL , 充分裂解后, 冰上超声 5 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 30 min 除去细胞碎片, 用核蛋白分析仪对所提蛋白进行定量。

将蛋白裂解液溶解在等量的 $2\times$ 样品缓冲液中, $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min, 蛋白上样进行 SDS-PAGE 电泳, PVDF 膜进行转膜, 将膜放入封闭液(5% 脱脂奶粉)中封闭 2 h, 加入一抗 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜, TBST 漂洗 5 min $\times 5$, 加入二抗-山羊兔 IgG, 室温孵育 2 h, TBST 漂洗 5 min $\times 5$ 。采用化学发光法进行显色反应, 用光密度扫描仪记录, 图像分析软件进行分析, 以 β -actine 为内参, 进行统计分析。

1.7 流式细胞仪检测各组细胞凋亡率

取按“1.2”项下培养的细胞, 1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃上清加入 195 μL Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞, 再加入 5 μL Annexin V-FITC, 轻轻混匀。室温避光孵育 10 min 后, 1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃上清加入 190 μL Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞, 再加入 10 μL 碘化丙啶染色液, 轻轻混匀, 冰浴避光放置。随即进行流式细胞仪检测。

1.8 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组比较, 满足正态分布时, 若方差齐性用方差分析-LSD 法, 若方差不齐时用校正方差分析(两两比较用 Tamhane 法), 不满足正态分布时用非参数检验, 统计分析用 SPSS 11.0 软件完成, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TGF- β_1 诱导 H358 细胞 EMT

倒置显微镜观察正常的 H358 细胞呈椭圆形, 抱团生长为主, 当细胞暴露于浓度为 5 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 TGF- β_1 24 h 后, 显微镜下观察到细胞形态呈纺锤状, 细胞间隙增大, 一些细胞从细胞团中分离, 结果见图 1。结合 Western blot 印迹检测标志物结果, 表明 TGF- β_1 成功诱导 H358 细胞向 EMT 转化。

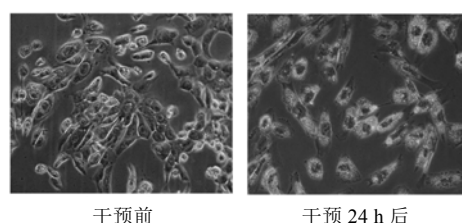


图 1 TGF- β_1 干预前后细胞形态变化

Fig. 1 The cell morphological changes before and after 24 h of intervention by TGF- β_1

2.2 EEHD 联合吉非替尼对上皮间质化 H358 细胞增殖的影响

CCK 试验结果显示 A 组、B 组、A24B24 组、B24A24 组和 AB48 组均能显著抑制肺腺癌细胞 H358 增殖, 其中 AB48 组细胞生长的抑制率显著高于 A 组, 差异均具有统计学意义($P<0.05$)。结果见图 2。

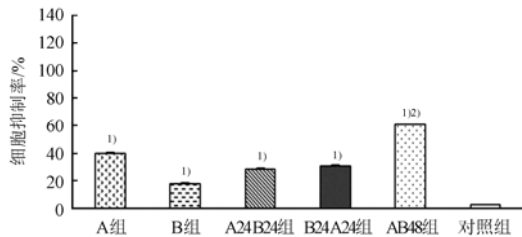


图2 EEHD联合吉非替尼对上皮间质化 H358 细胞增殖的影响

与对照组相比, $^1P<0.05$; 与 A 组相比, $^2P<0.05$ 。

Fig. 2 The effects of EEHD and gefitinib on H358 cell which has been induced to epithelial mesenchymal transition by TGF- β_1

Compared with control group, $^1P<0.05$; compared with group A, $^2P<0.05$.

2.3 EEHD 联合吉非替尼对上皮间质化 H358 细胞 EGFR、Vimentin、E-cadherin 表达的影响

Western-blot 检测结果显示 A 组、B 组、A24B24 组、B24A24 组和 AB48 组 EGFR、Vimentin 表达率显著低于对照组, E-cadherin 表达率则显著高于对照组($P<0.05$); 其中 AB48 组细胞 EGFR、Vimentin 表达率显著低于 A 组, 而 E-cadherin 表达率则显著高于 A 组($P<0.05$)。结果见图 3~4。

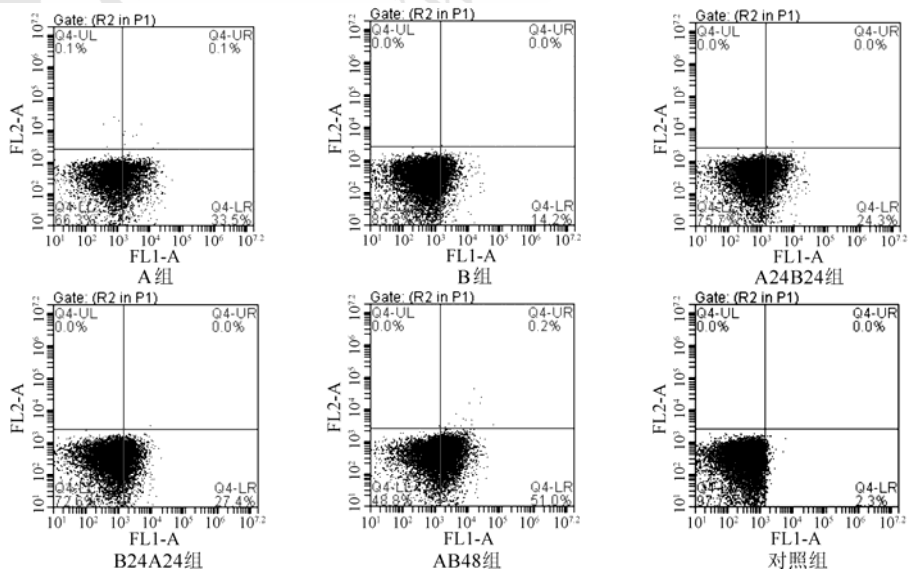


图5 EEHD联合吉非替尼对上皮间质化 H358 细胞凋亡的影响

Fig. 5 The effects of EEHD and gefitinib on the cell apoptosis of H358 cell which has been induced to epithelial mesenchymal transition by TGF- β_1

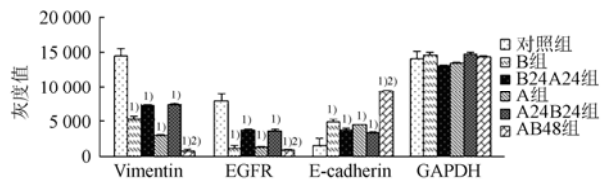


图3 EEHD 联合吉非替尼对上皮间质化 H358 细胞 EGFR、Vimentin、E-cadherin 表达的影响

与对照组相比, $^1P<0.05$; 与 A 组相比, $^2P<0.05$ 。

Fig. 3 The effects of EEHD and gefitinib on the expression of EGFR, E-cadherin and Vimentin proteins in H358 cell which has been induced to epithelial mesenchymal transition by TGF- β_1

Compared with control group, $^1P<0.05$; compared with group A, $^2P<0.05$.

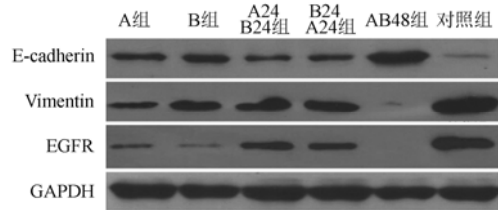


图4 EEHD 联合吉非替尼对上皮间质化 H358 细胞 EGFR、Vimentin、E-cadherin 表达的影响

Fig. 4 Effects of EEHD and gefitinib expression of EGFR, E-cadherin and Vimentin proteins in H358 cell which has been induced to epithelial mesenchymal transition by TGF- β_1

2.4 EEHD 联合吉非替尼对上皮间质化 H358 细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测结果显示 A 组、B 组、A24B24 组、B24A24 组和 AB48 组细胞凋亡率显著高于对照组($P<0.05$); 其中 AB48 组细胞细胞凋亡率显著高于 A 组($P<0.05$)。结果见图 5。

3 讨论

肺癌是全世界范围内最常见的癌症相关死亡病因,其中肺腺癌是肺癌中最常见的组织亚型^[7]。近年来随着分子生物学技术的不断发展,分子靶向药物在恶性肿瘤的治疗中得到了广泛的应用。EGFR-TKI 是临床常用的治疗非小细胞肺癌的分子靶向药,但是有研究表明非小细胞肺癌的不良预后、肿瘤的原位侵袭和远处转移均与 EGFR-TKI 耐药的出现有关^[8]。最新研究发现 EGFR-TKI 耐药的产生除了与原癌基因 MET 扩增、K-RAS 突变、EGFR 基因的继发性 T790M 突变有关外,EMT 在其产生过程中也发挥了重要作用^[9]。EMT 的主要病理表现为 E-cadherin、连环蛋白等上皮型蛋白的丧失和 Vimentin、纤维黏连蛋白等间质型指标蛋白的异常表达。最新临床研究结果显示,E-cadherin 阳性表达的非小细胞肺癌患者疾病进展时间较 E-cadherin 阴性患者显著延长^[10]。可见逆转 EMT 过程有利于改善肺腺癌患者的预后。

白花蛇舌草为一年生披散草本,成药味苦、淡,性寒,主要功效为清热解毒、消痛散结、利尿除湿,在临床实践中常用于各种类型炎症和肿瘤的治疗。基础研究结果表明,白花蛇舌草中的齐墩果酸、山奈酚、槲皮素等成分具有抗肿瘤作用,这些成分通过抗血管生成、抗炎、逆转肿瘤细胞耐药等多种途径发挥抑制肿瘤生长的功效^[11-12]。本实验室前期的研究结果表明 EEHD 能干预 TGF- β 1 诱导的人肺腺癌细胞 H358 上皮间质化,并浓度依赖性抑制 H358 细胞的增殖。本研究继续选择了对 EGFR-TKI 敏感的人肺腺癌细胞株 H358 为研究对象,构建 TGF- β 1 诱导的人肺腺癌细胞 H358 上皮间质化模型,通过 CCK 试验和流式细胞仪技术发现,EEHD($250\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)与吉非替尼($20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)联合应用时表现出了良好的抑制细胞增殖和促进细胞凋亡的功效,即白花舌草和吉非替尼对肺腺癌细胞 H358 生长抑制具有联合效应;吉非替尼与 EEHD 不同先后顺序加药组的抑制作用较两单药与两药同时联合组低,提示两药可能在 EMT 信号通路的不同阶段中发挥作用而致对细胞的抑制作用相互干扰,这有待进一步研究。本实验中,对 EMT 相关蛋白 Vimentin、E-cadherin

表达和肿瘤生长代表性蛋白 EGFR 水平进行检测,结果显示 EEHD($250\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)能有效抑制 EGFR、Vimentin 的表达,促进 E-cadherin 表达的上调;当 EEHD 与吉非替尼联用时,对 EGFR、Vimentin 表达率又显著低于吉非替尼单用组,E-cadherin 表达率则高于吉非替尼单用组,即白花蛇舌草可部分通过干预 EMT 过程来发挥增强吉非替尼抗肿瘤作用,甚至可能减少吉非替尼由于肿瘤细胞 EMT 所致的耐药发生,其具体机制有待明确。

综上所述,EEHD 与吉非替尼对肿瘤细胞 EMT 过程和肿瘤细胞生长具有联合效应,白花蛇舌草可部分逆转 H358 细胞上皮-间质化状态,但具体机制有待进一步研究。

REFERENCES

- [1] URAMOTO H, IWATA T, ONITSUKA T, et al. Epithelial-mesenchymal transition in EGFR-TKI acquired resistant lung adenocarcinoma [J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(7): 2513-2517.
- [2] WILLIS B C, BOROK Z. TGF- β -induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007, 293(3): L525-534.
- [3] WU S G, CHANG Y L, HSU Y C, et al. Good response to gefitinib in lung adenocarcinoma of complex epidermal growth factor receptor(EGFR) mutations with the classical mutation pattern [J]. *Oncologist*, 2008, 13(12): 1276-1284.
- [4] THIERY J P, ACLOQUE H, HUANG R Y, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease [J]. *Cell*, 2009, 139(5): 871-890.
- [5] 李洁, 李玉基, 李博. 白花蛇舌草抑制 Lewis 肺癌小鼠自发转移的实验研究[J]. *中医药导报*, 2012, 18(9): 78-79,82.
- [6] LIU Z, LIU M, LIU M, et al. Methylantraquinone from *Hedyotis diffusa* Willd induces Ca(2+)-mediated apoptosis in human breast cancer cells [J]. *Toxicol In Vitro*, 2010, 24(1): 142-147.
- [7] AHMEDIN J, FREDDIE B, MELISSA M, et al. Global cancer statistics [J]. *Ca Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.
- [8] BARR S, THOMSON S, BUCK E, et al. Bypassing cellular EGF receptor dependence through epithelial-to-mesenchymal-like transitions [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2008, 25(6): 685-693.
- [9] URAMOTO H, IWATA T, ONITSUKA T, et al. Epithelial-mesenchymal transition in EGFR-TKI acquired resistant lung adenocarcinoma [J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(7): 2513-2517.
- [10] HANNA N, SHEPHERD F A, FOSSELLS F V, et al. Randomized phase III cancer previously treated with chemotherapy [J]. *J Clin Oncol*, 2004, 22(9): 1589-1597.
- [11] 罗金强, 刘宏斌. 半枝莲、白花蛇舌草抗肿瘤的研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2014, 22(2): 481-483.
- [12] 朱大诚, 尹小明. 白花蛇舌草抗肿瘤作用及其机制研究进展[J]. *江西中医学院学报*, 2006, 18(1): 74-75.

收稿日期: 2015-09-02