

肺癌平膏含药血清对巨噬细胞共培养条件下 A549 细胞 EMT 相关 mRNA 及蛋白表达的影响

陈赐慧¹ 李卫东² 刘 瑞² 花宝金²

摘要 **目的** 观察肺癌平膏含药血清对 A549 细胞与巨噬细胞共培养条件下上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT) 相关 mRNA 及蛋白表达的影响。**方法** 制备肺癌平膏含药血清, 建立 A549 细胞与巨噬细胞的共培养体系, 将细胞分为 A549 加空白血清组(A549 + NRS 组)、共培养加空白血清组(共培养 + NRS 组)及共培养加肺癌平膏含药血清组(共培养 + FLP 组)。采用荧光定量 PCR、免疫荧光法比较各组 A549 细胞 EMT 相关基因(SNAIL1、SNAIL2、ZEB1、CDH1、CDH2、VIM、TJP1、CLDN1、CTNNB1、FLRT1)及 E-cadherin、N-cadherin、ZO-1、Vimentin 蛋白表达水平的影响。**结果** 共培养条件下, A549 细胞变为间充质细胞样。加入肺癌平膏含药血清后, 部分 A549 细胞形态恢复为上皮细胞样。与 A549 + NRS 组比较, 共培养 + NRS 组 A549 细胞 SNAIL1、ZEB1、CTNNB1、FLRT1、CDH2、VIM mRNA 表达上调, TJP1 mRNA 表达下调(均 $P < 0.05$); 与共培养 + NRS 组比较, 共培养 + FLP 组 SNAIL2、TJP1、CLDN1、CDH1、VIM mRNA 表达上调, CTNNB1、FLRT1 及 CDH2 mRNA 表达下调(均 $P < 0.05$)。免疫荧光结果显示, E-cadherin 表达于细胞膜和胞浆内, 以细胞膜为主; N-cadherin 表达于细胞膜和胞浆内, 以细胞浆为主; Vimentin 表达于胞浆内; ZO-1 表达于细胞连接处为主, 部分细胞膜染色亦呈阳性。与 A549 + NRS 组比较, 共培养 + NRS 组 A549 细胞 E-cadherin 蛋白表达下调, N-cadherin 及 Vimentin 蛋白表达上调($P < 0.05$); 肺癌平膏含药血清可上调 E-cadherin 表达, 下调 N-cadherin 及 Vimentin 蛋白表达(均 $P < 0.05$)。**结论** 肺癌平膏可抑制共培养条件下 A549 细胞 EMT 的形成。

关键词 肺癌平膏含药血清; A549 细胞; 共培养; 上皮间质转化

Effects of Feiliuping Ointment Containing Serum on EMT Related mRNA and Protein Expressions under Co-culture Conditions of A549 Cells and Macrophage CHEN Ci-hui¹, LI Wei-dong², LIU Rui², and HUA Bao-jin² 1 Department of Oncology, Zhejiang Provincial Hospital of TCM, Hangzhou (310006); 2 Department of Oncology, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100053)

ABSTRACT **Objective** To observe the effects of Feiliuping Ointment (FLP) containing serum on A549 cell epithelial-mesenchymal transition (EMT) related mRNA and protein expressions under macrophage co-culture conditions. **Methods** FLP containing serum was prepared. A co-culture system of A549 cells and macrophages was established. A549 cells were divided into 3 groups, i.e., the blank serum group (A549 + NRS), the co-culture cells + blank serum group (co-culture + NRS), the co-culture cells with FLP containing serum group (co-culture + FLP). The effects of FLP on A549 cell EMT related gene (SNAIL1, SNAIL2, ZEB1, CDH1, CDH2, VIM, TJP1, CLDN1, CTNNB1, FLRT1) and proteins (E-cadherin, N-cadherin, ZO-1, Vimentin) expressions were observed under co-culture conditions by fluorescent quantitative PCR. **Results** A549 cells developed into mesenchymal-like cells in co-culture conditions, which could be blocked by FLP containing serum in part. Compared with the A549 + NRS group, mRNA expressions of SNAIL1, ZEB1, CTNNB1, FLRT1, CDH2, and VIM were up-regulated ($P < 0.05$), but the expression of TJP1

基金项目: 国家科技部重大新药创制专项课题资助项目(No. 2010ZX09102-216); 国家自然科学基金面上项目(No. 81273718); 国家自然科学基金青年基金资助项目(No. 81102587)

作者单位: 1. 浙江省中医院肿瘤科(杭州 310006); 2. 中国中医科学院广安门医院肿瘤科(北京 100053)

通讯作者: 花宝金, Tel: 010-88001221, E-mail: huabaojin@sohu.com

DOI: 10.7661/CJIM.2017.03.0338

was down-regulated in the co-culture + NRS group (all $P < 0.05$). Compared with the co-culture + NRS group, mRNA expressions of SNAIL2, TJP1, CLDN1, CDH1, and VIM were up-regulated, but mRNA expressions of CTNNB1, FLRT1, and CDH2 were down-regulated in the co-culture + FLP group (all $P < 0.05$). Immunofluorescent results showed that E-cadherin expressed on cell membrane and inside cytoplasm, and most expressed on cell membrane. N-cadherin expressed on cell membrane and inside cytoplasm, and most expressed inside cytoplasm. Vimentin expressed within the cytoplasm. ZO-1 expressed mainly in cell junction. Parts of the cell membrane were positively stained. Compared with the A549 + NRS group, mRNA expression of E-cadherin was down-regulated in A549 cells, and mRNA expressions of N-cadherin and Vimentin were up-regulated in the co-culture + NRP group. However, E-cadherin was up-regulated and protein expressions of N-cadherin and Vimentin were down-regulated after intervention of FLP containing serum. (all $P < 0.05$). Conclusion FLP could inhibit the EMT of A549 cells under co-culture conditions.

KEYWORDS Feiliuping Ointment containing serum; A549 cell; co-culture; epithelial-mesenchymal transition

肺癌目前仍为恶性肿瘤的头号杀手,近年来治疗恶性肿瘤的策略从肿瘤细胞本身向肿瘤微环境发展,炎性微环境在肺癌中的作用受到越来越多的重视,肺癌的发生、发展在一定程度上与局部持续的炎症状态有关^[1]。肺癌平膏是由中国中医科学院广安门医院朴炳奎教授研制的防治肺癌复发转移的成药,具有益气养阴、清热解毒、化痰活血的功效^[2]。本课题组前期研究表明,肺癌平膏可抑制荷瘤小鼠肿瘤及 A549 细胞增殖,抑制炎性条件下 A549 细胞的迁移和侵袭能力,并发现其可明显降低炎性环境 TNF- α 水平,抑制核转录因子 kappa B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) p65 核转位^[3]。本实验通过观察肺癌平膏含药血清对与巨噬细胞共培养条件下 A549 细胞上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 相关 mRNA 及蛋白表达的影响,探讨肺癌平膏对肿瘤的干预机制。

材料与方法

1 动物及细胞株 20 只 SPF 级雄性 Wistar 大鼠,8 周龄,体重 (200 $\pm$ 20) g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物生产许可证号: SCXK (京) 2012-0001。人肺腺癌细胞 (A549 细胞) 及人急性单核细胞白血病细胞 (THP-1 细胞) 购自北京协和医学院基础医学细胞中心细胞库。

2 药物 肺癌平膏为中国中医科学院广安门医院制剂室提供的院内制剂 (250 g/瓶,批号: 20110908,药物组成: 黄芪、西洋参、沙参、麦冬、拳参、败酱草、白花蛇舌草、仙鹤草、桔梗、川贝、杏仁、桃仁、冬虫夏草),常温储存。

3 试剂及仪器 主要试剂: RPMI1640 培养基和

胎牛血清购自美国 Hyclone 公司; 佛波酯 (PMA) 购自美国 Sigma 公司 (批号: P1585); DEPC 水 (批号: R0022)、DNA Ladder (BeyoRed, 批号: D0109)、BeyoRed DNA 上样缓冲液 (6 $\times$, 批号: D0072)、免疫染色固定液、洗涤液、封闭液、DAPI 染色液均购自碧云天生物技术研究所以; UltraPure Agarose (批号: 16500100)、Trizol (批号: 15596-026)、High Capacity RNA-to-cDNA Kit (批号: 4387406)、TaqMan Gene Expression Master Mix (批号: 4369016)、TaqMan Gene Expression Assay (批号: 4369016)、Mouse anti-N-Cadherin monoclonal antibody (批号: 33-3900)、Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgG (H+L) conjugate (批号: A21202)、Alexa Fluor 594 donkey anti-rabbit IgG (H+L) conjugate (批号: A21207) 均购自 Life Technologies 公司; Anti-E-Cadherin antibody (货号: ab53033) 购自英国 Abcam 公司; Vimentin (批号: D21H3)、XP Rabbit mAb (批号: 5741P)、ZO-1 (批号: D7D12) Rabbit mAb (8193S) 购自美国 CST 公司; Triton X-100 (批号: ST795) 购自碧云天生物技术研究所以。主要仪器: Transwell 小室购自美国 Corning 公司; MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate、MicroAmp Optical Adhesive Film kit 购自美国 Life Technologies 公司; NanoDrop 2000 超微量分光光度计由美国 Thermo Scientific 公司生产; PROGENE PCR 扩增仪由英国 Techne 公司生产; Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Systems, ABI 公司; ImageXpress Micro Widefield High Content Screening System, 美国 Molecular Devices 公司。

4 含药血清制备及样本采集 将 20 只雄性

Wistar 大鼠分为空白血清组(NRS)及肺癌平膏组(FLP),每组 10 只。肺癌平膏正常成人剂量为 20 g,折算成大鼠等效剂量为 2.1 g/kg。FLP 组等效剂量换算后稀释成溶液,按 10 mL/kg 灌胃,NRS 组灌胃等量生理盐水,均每天 2 次,连续给药 3 天。第 4 天给药 1 次后 1 h 腹主动脉取血。末次给药前 12 h 禁食不禁水。所采动脉血室温静置 3 h,3 500 r/min,离心 10 min,收集血清,过滤除菌。分装保存于 -80 ℃。

5 细胞培养及共培养体系的建立 A549 细胞和 THP-1 细胞均在 5% CO₂,37 ℃ 条件下传代培养,取对数生长期细胞用于后续实验。参照参考文献[4],取 6 孔板,每孔加入 1 × 10⁶ 个 THP-1 细胞,并加入终浓度为 320 nmol/L 的 PMA 稀释液,培养 24 h 后诱导成巨噬细胞,以 PBS 洗 2 次,尽量除去 PMA,再次加入培养基培养 24 h。THP-1 诱导期间取 A549 细胞 1 × 10⁵/mL,每孔 3 mL 细胞悬液,稀释培养于 6 孔板。待 A549 细胞贴壁后,换用 2.6 mL 新培养基,并放入 0.4 μm 孔径的 Transwell 小室。收集 THP-1 细胞诱导成的巨噬细胞,调整浓度为 5 × 10⁵/mL,在 Transwell 上室加入 1.5 mL 细胞悬液。实验分为 3 组:A549 细胞组(A549 + NRS 组),即上室不加巨噬细胞,仅加含空白血清的培养基;A549 细胞 + 巨噬细胞共培养组(共培养 + NRS 组),加用空白血清;A549 细胞 + 巨噬细胞共培养 + FLP 组(共培养 + FLP 组),加用肺癌平膏含药血清。共培养 24 h。

6 观察指标及检测方法

6.1 EMT 相关基因 SNAIL1、SNAIL2、ZEB1、CDH1、CDH2、VIM、TJP1、CLDN1、CTNNB1 及 FLRT1 表达水平检测 采用荧光定量 PCR 法。共培养体系建立及实验分组同前。共培养 24 h 后按照 Trizol 说明书提取 RNA,应用 Nanodrop 测定 RNA 浓度与纯度,并进行 RNA 电泳验证 RNA 的完整性。按照 ABI 7500 相对定量荧光 PCR 操作手册进行 RNA 逆转录及荧光定量 PCR 扩增,检测基因采用 TaqMan Gene Expression Assay 的预混基因,包括待测基因 SNAIL1、SNAIL2、ZEB1、CDH1、CDH2、VIM、TJP1、CLDN1、CTNNB1、FLRT1 和内参基因 GAPDH(见表 1)。导出相对定量研究数据,统计分析数据结果。实验重复 3 次。

6.2 EMT 相关蛋白 E-cadherin、N-cadherin、ZO-1 及 Vimentin 蛋白表达水平检测 采用免疫荧光实验法。共培养体系建立及实验分组同前。培养 24 h 后,用 PBS 洗 1 次,4% 多聚甲醛固定 10 min,封闭液室温封闭 1 h,一抗 E-cadherin、N-cadherin、ZO-1、

Vimentin(浓度为 1:200)4 ℃ 过夜,荧光二抗 Alexa Fluor 594 驴抗兔/Alexa Fluor 488 驴抗鼠(浓度为 1:400)室温避光孵育 1 h,DAPI 室温染色 5 min,滴加适量抗荧光淬灭封片液,Molecular Devices 高内涵筛选成像系统拍照,应用 Molecular Devices MetaXpress Image Acquisition and Analysis Software 分析模块进行数据分析。实验重复 3 次。

表 1 TaqMan 基因

基因	ID
SNAIL1	Hs00195591_m1
SNAIL2	Hs00950344_m1
ZEB1	Hs00232783_m1
CDH1	Hs01023894_m1
CDH2	Hs00983056_m1
VIM	Hs00185584_m1
TJP1	Hs01551861_m1
CLDN1	Hs00221623_m1
CTNNB1	Hs00355049_m1
FLRT1	Hs00534771_s1
GAPDH	Hs02758991_g1

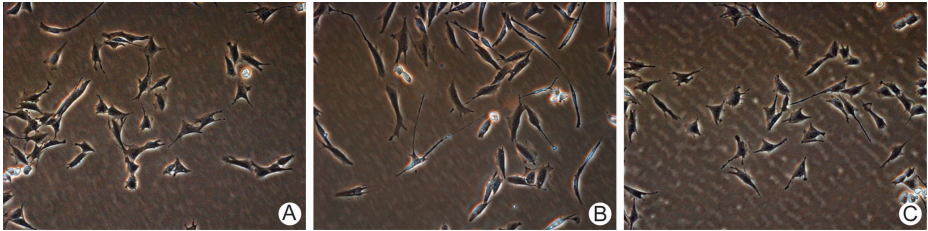
7 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,多组间两两比较采用 Turkey 检验。采用 GraphPad Prism 5 软件绘制统计数据图。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 共培养体系的建立(图 1) THP-1 细胞正常状态下为悬浮生长,形态呈圆形,经 PMA 诱导 4 h 后细胞逐渐黏附成团,贴壁生长,并出现伪足,诱导 24 h 后大部分悬浮细胞均贴壁生长,呈巨噬细胞形态。A549 + NRS 组 A549 细胞形态以多角形、梭形为主,呈鹅卵石状上皮细胞形态;共培养 + NRS 组 A549 细胞变成类纤维样细胞,呈长梭形,并出现拉丝、弯曲状;共培养 + FLP 组部分 A549 细胞形态恢复上皮细胞样。

2 各组 EMT 相关基因 mRNA 表达水平比较(表 2) 荧光定量 PCR 结果显示,与 A549 + NRS 组比较,共培养 + NRS 组 SNAIL1、ZEB1、CTNNB1、FLRT1、CDH2、VIM mRNA 表达水平上调, TJP1 mRNA 表达水平下调(均 $P < 0.05$);与共培养 + NRS 组比较,共培养 + FLP 组 CTNNB1、FLRT1、CDH2 mRNA 表达水平下调, SNAIL2、TJP1、CLDN1、CDH1、VIM mRNA 表达水平上调(均 $P < 0.05$)。

3 各组 EMT 相关蛋白表达水平比较(表 3, 图 2~5) 免疫荧光结果显示,E-cadherin 表达于细胞膜和胞浆内,绝大部分以细胞膜为主;N-cadherin 表



注:A 为 A549 + NRS 组;B 为共培养 + NRS 组;C 为共培养 + FLP 组
图 1 各组培养 24 h 后细胞形态观察 (倒置显微镜, ×200)

表 2 各组 EMT 相关基因 mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

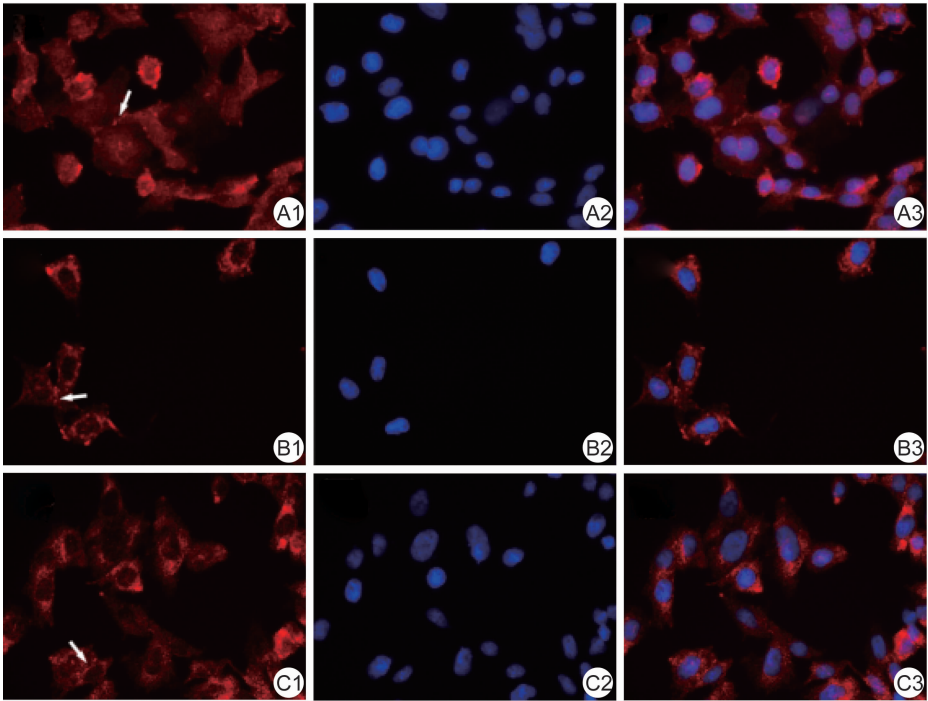
组别	n	SNAIL1	SNAIL2	ZEB1	TJP1	CLDN1
A549 + NRS	3	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
共培养 + NRS	3	1.922 ± 0.253 *	0.848 ± 0.037	2.721 ± 0.067 *	0.395 ± 0.145 *	1.290 ± 0.303
共培养 + FLP	3	1.626 ± 0.227	1.121 ± 0.110 [△]	2.857 ± 0.071	1.297 ± 0.262 [△]	4.288 ± 0.753 [△]

组别	n	CTNNB1	FLRT1	CDH1	CDH2	VIM
A549 + NRS	3	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
共培养 + NRS	3	4.031 ± 1.472 *	8.748 ± 1.492 *	0.782 ± 0.112	4.054 ± 0.057 *	1.643 ± 0.071 *
共培养 + FLP	3	0.948 ± 0.54 [△]	1.617 ± 0.851 [△]	2.448 ± 0.397 [△]	2.507 ± 0.187 [△]	1.904 ± 0.033 [△]

注:与 A549 + NRS 组比较, * $P < 0.05$; 与共培养 + NRS 组比较, [△] $P < 0.05$;下表同

达于细胞膜和胞浆内,绝大部分以细胞浆为主;Vim-
entin 表达于胞浆内;ZO-1 表达于细胞连接处为主,部
分细胞膜染色亦呈阳性。与 A549 + NRS 组比较,共
培养 + NRS 组 N-cadherin、Vimentin 蛋白表达水平

上调,E-cadherin 蛋白表达水平下调($P < 0.05$)。与
共培养 + NRS 组比较,共培养 + FLP 组 E-cadherin
蛋白表达水平上调, N-cadherin、Vimentin 蛋白表达
水平下调($P < 0.05$)。



注:A 为 A549 + NRS 组;B 为共培养 + NRS 组;C 为共培养 + FLP 组; 1 为目标蛋白荧光染
色,2 为细胞核荧光染色,3 为合并相;箭头所指为蛋白表达,下图同

图 2 各组 E-cadherin 蛋白表达 (荧光显微镜, ×400)

表 3 各组 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 及 ZO-1 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	E-cadherin	N-cadherin	Vimentin	ZO-1
A549 + NRS	3	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
共培养 + NRS	3	0.672 ± 0.166 *	1.445 ± 0.184 *	1.401 ± 0.150 *	0.825 ± 0.150
共培养 + FLP	3	0.965 ± 0.079 Δ	1.080 ± 0.110 Δ	1.233 ± 0.184 Δ	0.997 ± 0.177

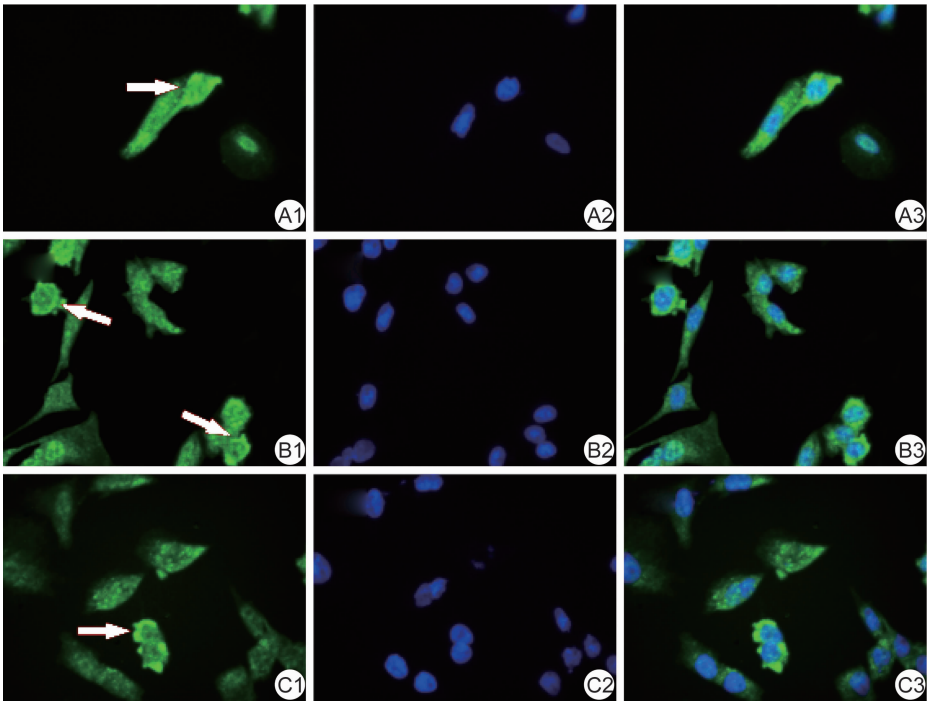


图 3 各组 N-cadherin 蛋白表达图 (荧光显微镜, $\times 400$)

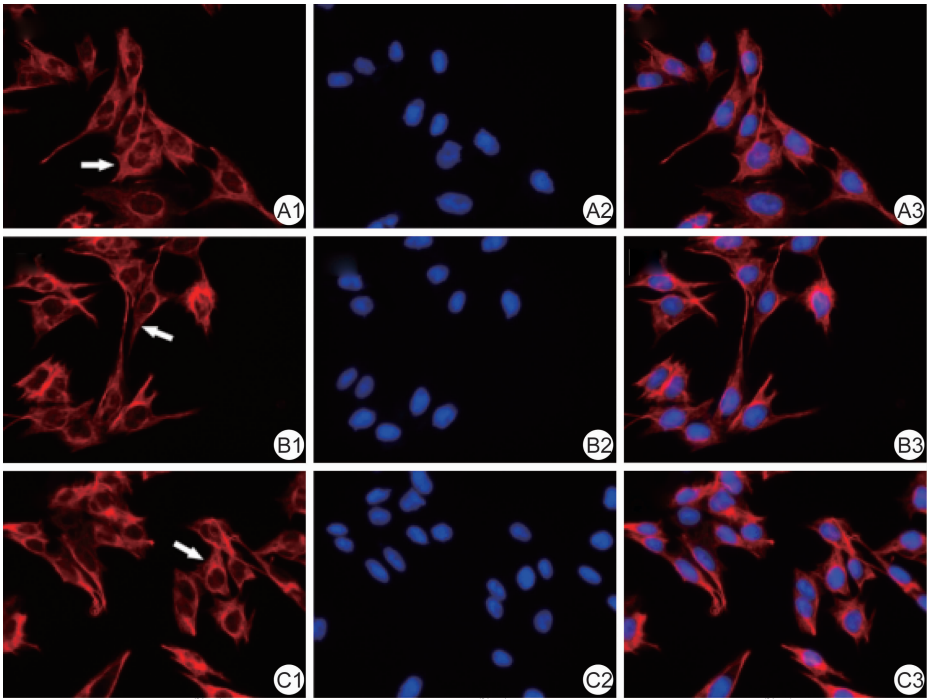


图 4 各组 Vimentin 蛋白表达图 (荧光显微镜, $\times 400$)

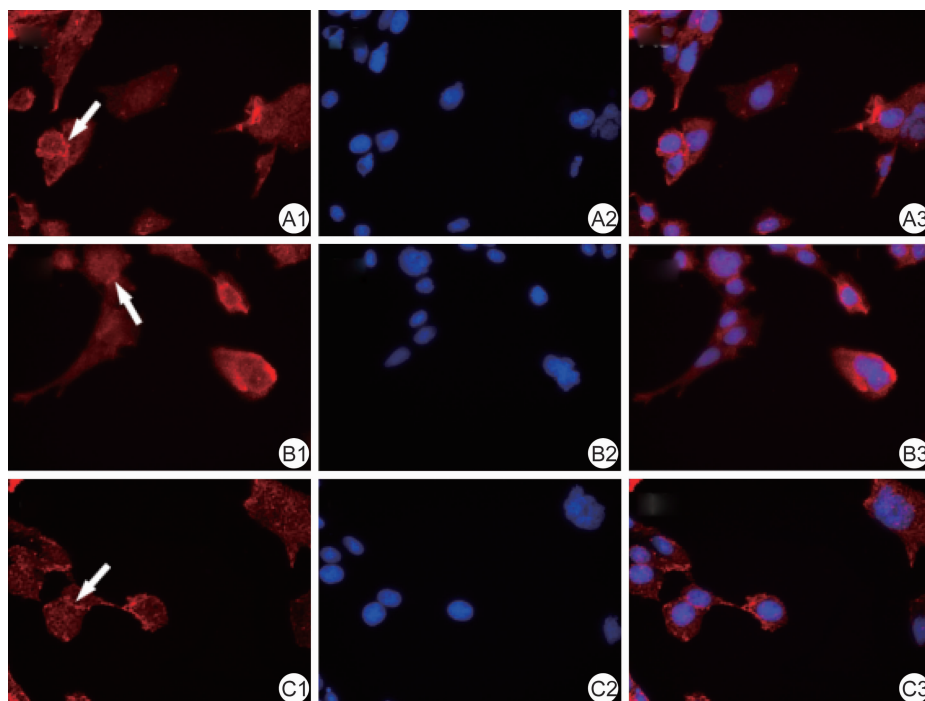


图5 各组 ZO-1 蛋白表达图 (荧光显微镜, $\times 400$)

讨 论

肺癌平膏由中国中医科学院广安门医院朴炳奎教授研制,选用黄芪、西洋参、沙参、麦冬、冬虫夏草等益气养阴;拳参、败酱草、白花蛇舌草、仙鹤草等清热解毒,辅以桔梗、川贝、杏仁等化痰止咳,并以桃仁等活血化瘀,共奏扶正解毒、标本兼治之功,防治肺癌复发转移。

EMT 是指上皮细胞在胚胎发生及病理状态下,转化为具有间充质特点的间质样细胞的现象,是肿瘤转移启动中最重要的机制^[5],NF- κ B 入核后可促进 EMT 相关基因的改变。本实验中笔者发现共培养条件下,EMT 相关基因的变化与文献报道基本一致^[6-8],而肺癌平膏可调节相关基因表达水平,使其从 EMT 向间质-上皮转化(mesenchymal-epithelial transition, MET)方向转变。EMT 过程可出现一系列的基因表达变化,涉及不同的信号通路。研究亦发现不同的细胞因子可通过不同的信号通路进行诱导,且这些通路之间均存在交互作用^[8,9]。而目前尚未见 A549 细胞与巨噬细胞共培养发生的基因表达谱变化的相关研究。

E-cadherin 高表达于上皮细胞的表面,主要介导同源细胞间的黏附作用。E-cadherin 在包括肺癌在内的上皮来源的肿瘤中表达恒定,但在 EMT 的过程中表达下降,因此 E-cadherin 被视为肿瘤侵袭性的特征

性标志^[10]。与 E-cadherin 相反,N-钙黏蛋白(N-cadherin)表达在 EMT 中则增加^[11]。波形蛋白(Vimentin)又称波形纤维蛋白,主要表达于间充质,如内皮细胞及成纤维细胞等。Soltermann A^[12]认为 Vimentin 与非小细胞肺癌肿瘤大小、分期、鳞癌及预后不良密切相关。ZO-1 亦称为紧密连接相关蛋白,主要表达于细胞膜与细胞间质,尤其位于细胞连接处,具有正常上皮细胞标志物的特性。Gorowiec MR 等^[13]应用转化生长因子 $\beta 1$ 诱导 A549 细胞发生 EMT,发现其 ZO-1 蛋白的表达明显降低。本实验中,笔者对 EMT 最主要的标志蛋白 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 的观察亦发现符合 EMT 的变化,而肺癌平膏可以调节其表达的变化,证实肺癌平膏可以通过调节炎症信号通路,从而影响肺癌的侵袭能力。

本课题组既往对于肺癌平膏的研究主要集中在调节免疫方面,临床和基础研究均证实,肺癌平膏能促进树突细胞的迁移作用,促进自然杀伤细胞增殖,提高机体免疫功能^[14,15]。肺癌平膏组方以益气养阴扶正,以清热解毒祛邪,扶正体现在调节机体免疫上,而解毒除抑制肿瘤增殖,也包括防止侵袭转移、血管生成等方面^[2,16],肺癌患者多有阴虚毒热的症状,类似于炎症表现,而炎性微环境在肺癌的侵袭转移中具有重要作用^[17]。本研究从肿瘤的微环境入手,发现肺癌平膏对肿瘤微环境的部分信号通路具有一定的调节作用,可能是其发挥作用的部分机制。因此从调节免疫和微环

境的角度进行研究,可能是研究中医药在治疗肿瘤中的一个方向。对于肿瘤免疫微环境的研究,将是中医药防治肿瘤的重要靶点。

参 考 文 献

- [1] Engels EA. Inflammation in the development of lung cancer: epidemiological evidence[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2008, 8(4): 605–615.
- [2] 郑红刚,朴炳奎,花宝金,等. 肺癌平膏治疗晚期非小细胞肺癌(气阴两虚证)患者 38 例临床观察[J]. *中国中医药信息杂志*, 2007, 14(5): 64–65.
- [3] Li W, Chen C, Saud SM, et al. Fei-Liu-Ping Ointment inhibits lung cancer growth and invasion by suppressing tumor inflammatory microenvironment[J]. *BMC Complement Alternat Med*, 2014, 14: 153.
- [4] Tjiu JW, Chen JS, Shun CT, et al. Tumor-associated macrophage-induced invasion and angiogenesis of human basal cell carcinoma cells by cyclooxygenase-2 induction[J]. *J Invest Dermatol*, 2009, 129(4): 1016–1025.
- [5] Wu Y, Zhou BP. Inflammation: a driving force speeds cancer metastasis[J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(20): 3267–3273.
- [6] Shiozaki A, Bai XH, Shen-Tu G, et al. Claudin 1 mediates TNF α -induced gene expression and cell migration in human lung carcinoma cells[J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e38049.
- [7] Borthwick LA, McIlroy EI, Gorowiec MR, et al. Inflammation and epithelial to mesenchymal transition in lung transplant recipients: role in dysregulated epithelial wound repair [J]. *Am J Transplant*, 2010, 10(3): 498–509.
- [8] Kawata M, Koinuma D, Ogami T, et al. TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition of A549 lung adenocarcinoma cells is enhanced by pro-inflammatory cytokines derived from RAW 264.7 macrophage cells [J]. *J Biochem*, 2012, 151(2): 205–216.
- [9] Camara J, Jarai G. Epithelial-mesenchymal transition in primary human bronchial epithelial cells is Smad-dependent and enhanced by fibronectin and TNF- α [J]. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2010, 3(1): 2.
- [10] Guarino M, Rubino B, Ballabio G. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology[J]. *Pathology*, 2007, 39(3): 305–318.
- [11] Tomita K, van Bokhoven A, van Leenders GJ, et al. Cadherin switching in human prostate cancer progression [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(13): 3650–3654.
- [12] Soltermann A. Epithelial-mesenchymal transition in non-small-cell lung cancer [J]. *Pathology*, 2012, 33(Suppl 2): 311–317.
- [13] Gorowiec MR, Borthwick LA, Parker SM, et al. Free radical generation induces epithelial-to-mesenchymal transition in lung epithelium via a TGF- β_1 -dependent mechanism[J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 52(6): 1024–1032.
- [14] 郑红刚,朴炳奎,林洪生,等. 中药复方肺癌平膏对树突状细胞功能影响的拆方研究[J]. *北京中医药大学学报*, 2007, 30(8): 525–528, 549, 插 1.
- [15] 郑红刚,朴炳奎,林洪生,等. 中药肺癌平膏合并化疗对非小细胞肺癌患者树突状细胞亚型的影响[J]. *中国肿瘤*, 2008, 17(2): 113–115.
- [16] 郑红刚,周雍明,朴炳奎,等. 基于正交设计析因分析法评价肺癌平膏的组方配伍[J]. *中医学报*, 2014, (2): 163–165.
- [17] 陈赐慧,花宝金. 炎症和炎性微环境在肺癌发生、发展及转移中的作用[J]. *医学综述*, 2012, 18(23): 3953–3956.

(收稿:2015-06-23 修回:2016-06-05)