

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.02.005

槐耳清膏抑制非小细胞肺癌细胞增殖和血管新生的作用机制研究*

隗玉川 程万宏 应朝辉 于 林 王艳俊[△]

(大连大学附属新华医院胸外科 辽宁 大连 116023)

摘要 目的:探讨槐耳清膏抑制非小细胞肺癌(NSCLC)细胞增殖和血管新生的作用机制。**方法:**选择对数生长期的 NSCLC 细胞,经过传代培养成细胞株后采用随机法分成低剂量组、高剂量组以及空白对照组。其中低剂量组和高剂量组分别加入 5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 的槐耳清膏进行处理,而空白对照组未加入槐耳清膏处理。利用细胞增殖毒性试验法(MTT)检测 NSCLC 细胞的存活率,并采用蛋白免疫印迹实验(WB)法检测表皮生长因子受体(EGFR)和血管内皮生长因子受体 2(VEGFR2)、磷酸化 EGFR(pEGFR)、磷酸化 VEGFR2(pVEGFR2)、磷脂酰肌醇 3- 激酶(PI3K)、磷酸化丝氨酸 / 苏氨酸特异性蛋白激酶(pAKT)(pAKT)、磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2(pERK1/2)、磷酸化应激活蛋白激酶 1/2(pJNK1/2)、磷酸化 -p38(pp38)、细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)及增殖细胞核抗原(PCNA)蛋白表达水平。**结果:**低剂量组、高剂量组 NSCLC 细胞的存活率均显著低于空白对照组($P<0.05$)。与空白对照组相比,槐耳清膏处理 NSCLC 细胞后,低剂量组、高剂量组中 pEGFR、pVEGFR2 蛋白的相对表达水平均显著降低($P<0.05$)。与空白对照组比较,槐耳清膏处理 NSCLC 细胞后,低剂量组、高剂量组中 PI3K 蛋白、pAKT、pERK1/2、pJNK1/2、pp38、Cyclin D1 及 PCNA 的相对表达水平均显著降低($P<0.05$)。**结论:**基于 EGFR/VEGFR2 信号通路,槐耳清膏对 NSCLC 细胞增殖和血管新生有一定的抑制作用,可能成为一种针对 NSCLC 的有用靶向药物。

关键词:槐耳清膏;非小细胞肺癌;EGFR;VEGFR2;细胞增殖;血管新生

中图分类号:R-33;R734.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)02-226-04

Mechanism of Huaier on Inhibiting Proliferation and Angiogenesis of Non-Small Cell Lung Cancer Cells*

KUI Yu-chuan, CHENG Wan-hong, YING Chao-hui, YU Lin, WANG Yan-jun[△]

(Department of Thoracic Surgery, Xinhua Hospital Affiliated to Dalian University, Dalian, Liaoning, 116023, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the mechanism of huaier on inhibiting proliferation and angiogenesis of non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods:** The NSCLC cells in the logarithmic growth phase were selected, subcultured into cell lines and then randomly divided into low-dose group, high-dose group and blank control group. Among them, the low-dose group and the high-dose group were treated with 5 $\mu\text{mol/L}$ and 10 $\mu\text{mol/L}$ huaier, respectively, while the blank control group was not treated with huaier. The cell proliferation toxicity test (MTT) was used to detect the survival rate of NSCLC cells, and the Western blotting (WB) method was used to detect epidermal growth factor receptor (EGFR), vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2), and phosphorylated EGFR (pEGFR), phosphorylated VEGFR2 (pVEGFR2), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), phosphorylated A (pAKT), phosphorylated ERK1/2(pERK1/2), phosphorylated JNK1/2(pJNK1/2), phosphorylated p38 (pp38), cyclin D1 (Cyclin D1) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) protein expression levels. **Results:** The survival rate of NSCLC cells in the low-dose and high-dose groups was significantly lower than that of the blank control group ($P<0.05$). Compared with the blank control group, after Huaier treated NSCLC cells, the relative expression levels of pEGFR and pVEGFR2 protein in the low-dose and high-dose groups were significantly reduced ($P<0.05$). Compared with the blank control group, the relative expression levels of PI3K protein, pAKT, pERK1/2, pJNK1/2, pp38, Cyclin D1 and PCNA in the low-dose group and high-dose group were significantly reduced after treating NSCLC cells with Huaier($P<0.05$). **Conclusion:** Based on the EGFR/VEGFR2 signaling pathway, Huaier has a certain inhibitory effect on NSCLC cell proliferation and angiogenesis, and may become a useful targeted drug for NSCLC.

Key words: Huaier; Non-small cell lung cancer; EGFR; VEGFR2; Cell proliferation; Angiogenesis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R734.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)02-226-04

* 基金项目:辽宁省自然科学基金指导计划项目(20170318)

作者简介:隗玉川(1968-),男,本科,副主任医师,研究方向:肺癌诊治,E-mail: kych9561@163.com

[△] 通讯作者:王艳俊(1965-),男,本科,主任医师,研究方向:肺癌诊治,E-mail: kych9561@163.com

(收稿日期:2021-05-24 接受日期:2021-06-21)

前言

肺癌是全世界最常见的癌症死亡原因,其中大约 85%肺癌患者的组织学亚型为非小细胞肺癌(NSCLC)^[1-3]。目前,传统的肺癌治疗手段包括手术切除和放化疗,但是整体治疗的有效率比较有限。由于 NSCLC 的侵袭性较高,且大部分肺癌患者确诊时已经处于晚期阶段。而对于晚期 NSCLC 患者的传统标准治疗方案的 5 年生存率依然很低,不足 5%^[4]。因此,对于晚期的 NSCLC 患者,更多的指南开始推荐使用靶向药物或免疫药物,从而使患者的治疗预后以及生存质量达到最大化。据文献报道^[5,6],表皮生长因子受体(EGFR)和血管内皮生长因子受体 2(VEGFR2)可在肺癌的肿瘤组织中过表达。EGFR 和 VEGFR2 的异常激活会触发多种蛋白质的磷酸化,包括 PI3K/AKT 和 MAPK 通路,这些通路参与细胞存活、凋亡和血管生成^[7,8]。因此抑制 EGFR/VEGFR2 信号传导通路可将可能改善晚期 NSCLC 患者的临床结局。近年来,中药的抗癌作用已在世界范围内逐渐被认可^[9,10]。越来越多的研究证实,槐耳作为一种来自槐、洋槐和青檀树干上真菌,可以诱导癌细胞的分化和凋亡,提高免疫细胞的杀伤能力,逆转与肿瘤相关的耐药性,并抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭等^[11]。多项研究也发现,槐耳在肺癌中具有独特的抗肿瘤作用,但具体机制尚未阐明^[12]。因此,本研究主要基于 EGFR/VEGFR2 信号通路,探究槐耳对 NSCLC 细胞增殖和血管新生的影响以及作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

槐耳清膏来自于启东盖天力药业公司。利用电子天平量取 1 g 槐耳清膏,使其充分溶解于 10 mL 的 RPMI(RPMI)1640 培养基中,再利用震荡仪使其充分震荡后,用 0.22 μm 的滤器过滤除菌,制成 100 mg/mL 的槐耳原液,储存于 -20℃ 备用。人 NSCLC(NCI-H441 系)细胞购于中国典型培养物保藏中心(中国,武汉)。主要试剂均购于赛信通(上海)生物试剂有限公司,单克隆和多克隆抗体主要包括:EGFR 和磷酸化 EGFR(pEGFR)、VEGFR2 和磷酸化 VEGFR2(pVEGFR2)、细胞外信号调节激酶(ERK)1/2、应激活化蛋白激酶(JNK)1/2、p38 蛋白(p38)、磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)、磷酸化丝氨酸/苏氨酸特异性蛋白激酶(pAKT)、细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)、增殖细胞核抗原(PCNA)。其他试剂均购于上海信裕生物科技有限公司(中国),包括:RPMI 1640 培养基、磷酸盐缓冲液(PBS)、二甲基亚砜(DMSO)溶液、MTT 细胞增殖毒性检测试剂盒、ECL 发光试剂盒和凝胶试剂盒等。主要仪器购于南京贝登医疗股份有限公司,包括光学显微镜(型号: CX23LED RFS1C)、电泳仪(型号: DYY-10C)、电泳槽(型号: DYCZ-28D)、离心机(型号: H1650R)。ChemiDoc XRS+ 化学发光成像系统购于伯乐生命医学产品(上海)有限公司。

1.2 细胞培养

在 37℃ 和 5% CO₂ 的标准细胞培养条件下进行细胞培养, NSCLC 细胞在 RPMI 1640 培养基中培养。选择对数生长期的 NSCLC 细胞采用随机法分成低剂量组、高剂量组以及空白对照组。利用 DMSO 溶解槐耳原液,并在 RPMI 1640 培养基中稀

释成不同浓度的槐耳清膏,包括 5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 。然后在低剂量组和高剂量组分别加入 5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 的槐耳清膏进行处理,而空白对照组未加入槐耳清膏处理。经过 3 小时后在表皮生长因子(EGF)(50 ng/mL)和血管内皮生长因子(VEGF)(20 ng/mL)中继续孵育 30 分钟。

1.3 细胞增殖毒性试验法(MTT)

通过 MTT[3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基溴化四唑]测定法确定槐耳清膏对 NSCLC 细胞存活率的影响。按照 1.2 中的分组将 NSCLC 细胞铺在 96 孔微量滴定板中,并采用不同浓度的槐耳清膏处理,经过 48 小时后,向每个孔中加入 1/10 体积的 10× MTT 溶液(在 PBS 中为 5 mg/mL),孵育 2 小时,并用 DMSO 溶解还原的 MTT 后,在酶标仪上于 540 nm 处记录吸光度,将槐耳清膏对 NSCLC 细胞生长抑制的影响评估为细胞存活率。

1.4 蛋白免疫印迹实验(Western blotting, WB)

选择对数生长期的 NSCLC 细胞,将其常规接种于 6 孔板(每孔约 10⁶ 个细胞),按照 1.2 中的分组进行干预;每组分别设置 3 个复孔,经过 24 小时培养过后,采用 PBS (10 mmol/L, pH7.45)反复洗涤 3 次,而后在 200 μL 的冰冷组织裂解缓冲液[10 mM 的 HEPES(pH 7.9)、100 mM 的 KCl、10 mM 的 EDTA、20 mM 的 EGTA、100 mM 的 DTT、20 mM 的 PMSF、0.5% NP-40 和新添加的蛋白酶抑制剂亮氨酸氨肽酶和苯甲脒]中培养 20 分钟。将裂解液收集在微管中,并通过 21.5 g 的针头将细胞聚集体打破。在 4℃ 条件下以 14000 r/min 进行离心 10 min,并收集上清液,等分后在制备当天使用,或立即保存在 -80℃ 下以备后用。对蛋白质浓度进行调节后进行加热变形,利用含 10% SDS-聚丙烯酰胺的凝胶对总量相等的蛋白质进行电泳,完成之后将蛋白转移到硝酸纤维素膜上,使用 5%脱脂奶粉进行阻断 2 小时后,再加入 5%脱脂奶粉稀释的初级抗体(稀释比 1:1000),在 4℃ 的环境条件下进行培养 1 晚,用 TBST 重复洗涤(3 次,15 分钟/次),然后加入 HRP 标记的次级抗体(稀释比 1:1000)并在室温下培养 2 h,然后用 TBST 反复洗涤(3 次,15 分钟/次)。用 ECL 发光液在暗室中均匀发光,按下胶片后,将其暴露在曝光箱中。利用 quantity one 软件进行灰度值分析,以 β -actin 为内参照,比较靶蛋白和内参照蛋白的灰度值,两者的比值为靶蛋白的相对表达水平。

1.5 测量指标

比较各组之间 EGFR、pEGFR、VEGFR2、pVEGFR2、PI3K、磷酸化 -AKT(pAKT)、磷酸化 -ERK1/2(pERK1/2)、磷酸化 -JNK1/2(pJNK1/2)、磷酸化 -p38(pp38)、Cyclin D1 及 PCNA 蛋白表达水平。

1.6 统计学分析

使用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 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和 LSD 检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 槐耳清膏对 NSCLC 细胞存活率的影响

本研究结果显示,经过不同浓度槐耳清膏处理后,低剂量组、高剂量组 NSCLC 细胞的存活率分别为 (88.67 $\pm$ 3.42)%、

(69.35±3.67)%, 空白对照组 NSCLC 细胞的存活率为 (98.73±2.58)%。低剂量组、高剂量组 NSCLC 细胞的存活率均显著低于空白对照组 ($t=8.759, 9.327; P=0.000, 0.000$), 而低剂量组与高剂量之间差异无统计学意义 ($t=12.715, P=0.155$)。

2.2 槐耳清膏对 NSCLC 细胞中 EGFR/VEGFR2 的影响

表 1 槐耳清膏处理 NSCLC 细胞后 EGFR、pEGFR、VEGFR2、pVEGFR2 蛋白相对表达水平

Table 1 Relative expression levels of EGFR, pEGFR, VEGFR2 and pVEGFR2 proteins in NSCLC cells treated with huaier

Groups	EGFR	pEGFR	VEGFR2	pVEGFR2
Blank control group	122.47± 6.31	92.57± 6.72	127.52± 5.83	121.53± 6.57
Low-dose group	113.24± 5.34	73.42± 4.25 ^a	112.37± 5.63	57.26± 5.91 ^a
High-dose group	107.35± 6.52	56.33± 5.37 ^a	101.23± 4.82	42.38± 5.46 ^a
F	43.251	32.014	39.648	40.367
P	0.108	0.000	0.358	0.000

Note: Compared with the blank control group, ^a $P<0.05$.

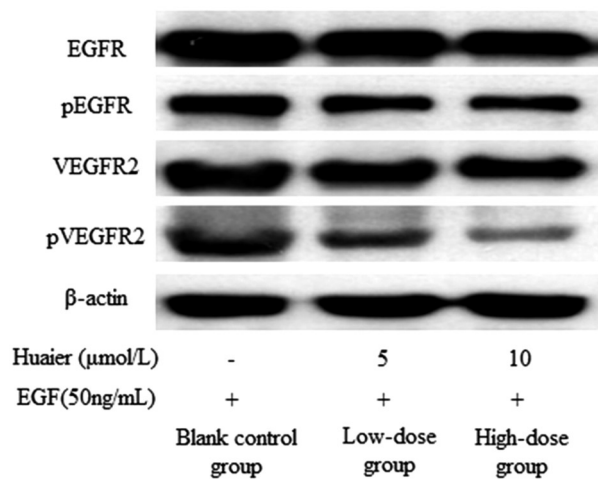


图 1 槐耳清膏处理对 NSCLC 细胞中 EGFR、pEGFR、VEGFR2、pVEGFR2 表达的影响

Fig.1 Effect of Huaier on the expression of EGFR, pEGFR, VEGFR2 and pVEGFR2 in NSCLC cells

本研究结果显示, 与空白对照组相比, 槐耳清膏处理 NSCLC 细胞后, 低剂量组、高剂量组中 pEGFR、pVEGFR2 蛋白的相对表达水平均显著降低 ($P<0.05$), 而 EGFR、VEGFR2 的差异无统计学意义 ($P>0.05$), 如表 1、图 1 所示。

2.3 槐耳清膏对 NSCLC 细胞中 EGFR/VEGFR2 通路相关蛋白的影响

本研究发现, 与空白对照组比较, 槐耳清膏处理 NSCLC 细胞后, 低剂量组、高剂量组中 PI3K 蛋白、pAKT、pERK1/2、pJNK1/2、pp38、Cyclin D1 及 PCNA 的相对表达水平均显著降低 ($P<0.05$), 如表 2、图 2 所示。

3 讨论

目前癌症治疗的主要方式是靶向疗法, 其中针对 EGFR/VEGFR2 的靶向疗法已广泛用于 NSCLC 患者的治疗^[13]。近年来, 中医在癌症治疗中的作用越来越受到世界各国的关注^[14,15]。已有研究表明槐耳具有明显的抗肿瘤作用, 能有效抑制癌细胞的增殖和侵袭^[16-18]。因此, 本研究基于 EGFR/VEGFR2 信号通路, 研究了槐耳对 NSCLC 细胞的影响。本研究结果显示, 经过槐耳清膏处理后, NSCLC 细胞的存活率将显著降低 ($P<0.05$), 说明槐耳清膏抑制了 NSCLC 细胞增殖。由于 EGFR

表 3 不同浓度槐耳清膏处理 NSCLC 细胞后 EGFR/VEGFR2 通路相关蛋白的相对表达水平

Table 3 Relative expression levels of EGFR / VEGFR2 pathway related proteins in NSCLC cells treated with different concentrations of huaier

Groups	PI3K/p110	PI3K/p85	pAKT	pERK1/2	pJNK1/2	pp38	Cyclin D1	PCNA
Blank control group	56.34± 3.29	57.42± 3.64	43.58± 5.71	67.42± 5.43	88.57± 5.33	21.47± 5.13	89.37± 2.29	96.45± 3.14
Low-dose group	50.29± 3.15 ^a	51.28± 4.23 ^a	40.29± 5.39 ^a	59.34± 4.61 ^a	79.43± 3.10 ^a	17.28± 5.32 ^a	81.43± 3.10 ^a	88.12± 3.03 ^a
High-dose group	49.33± 4.13 ^a	47.26± 5.31 ^a	36.18± 5.27 ^a	50.41± 4.97 ^a	73.24± 3.17 ^a	5.96± 4.34 ^a	74.29± 2.21 ^a	79.36± 2.12 ^a
F	35.478	38.762	41.359	39.125	39.231	36.143	36.478	39.512
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Note: Compared with the blank control group, ^a $P<0.05$.

的异常激活导致其下游信号通路失调, 从而影响细胞增殖和血管生成。因此, 进一步研究发现用槐耳清膏处理 NSCLC 细胞后, 可显著降低 pEGFR 表达 ($P<0.05$)。与 EGFR 相似, VEGFR2 的异常激活, 也会导致下游信号传导失调, 从而引起有丝分裂、趋化作用的增加, 进一步刺激肿瘤血管形成。此外, EGFR 可以调节血管生成素 VEGF 的产生, VEGF 信号通路对内皮细胞增

殖、迁移和诱导血管生成具有重要意义^[19,20]。本研究中, 经槐耳清膏处理后也显著降低了 NSCLC 细胞中 pVEGFR2 的表达 ($P<0.05$)。因此, 槐耳清膏能同时抑制 EGFR/VEGFR2 信号通路。

由于 EGFR 抑制剂的耐药性与 PI3K/AKT 和 MAPKs 信号通路的激活有关^[21,22]。EGFR/PI3K/AKT/MAPKs 信号传导在 NSCLC 的细胞增殖、血管生成和抑制细胞凋亡的过程中起着

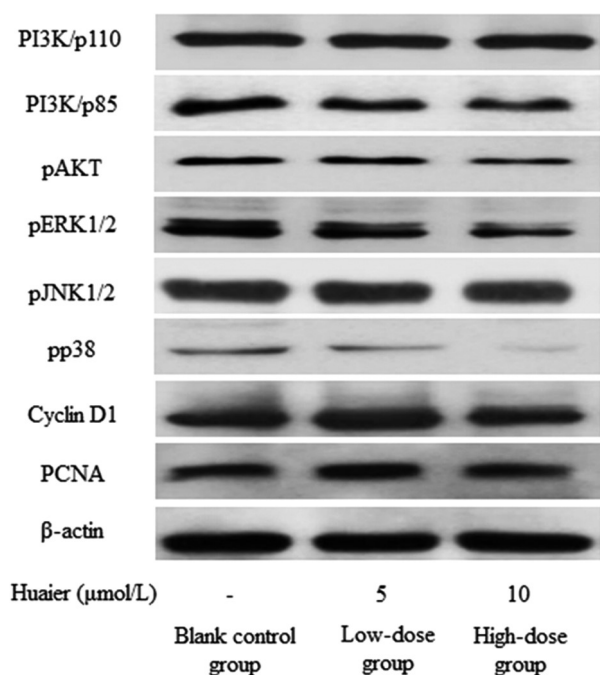


图2 槐耳清膏处理对 NSCLC 细胞中 EGFR/VEGFR2 通路相关蛋白的影响

Fig.2 Effect of huaier on EGFR/VEGFR2 pathway related proteins in NSCLC cells

关键作用^[23]。EGFR 激活 PI3K/AKT 信号传导后,它将激活参与细胞增殖和凋亡的多个下游靶标。本研究结果显示,经槐耳清膏处理后,NSCLC 细胞的 PI3K 蛋白、pAKT 均显著降低($P<0.05$)。由于槐耳清膏抑制了 PI3K,而 PI3K 调节 AKT 的激活,因此,阻断了 AKT 促进肿瘤细胞存活和促凋亡蛋白的功能。此外,MAPKs 途径是另一种由 EGFR 激活的级联信号,在细胞增殖和凋亡调节中也起着重要作用^[24,25]。MAPKs 家族由三个主要亚组组成:ERK、JNK 和 p38 MAPK。ERKs 主要参与调节有丝分裂原激活的增殖/分化^[26],而 JNK 和 p38 MAPK 则执行与细胞凋亡相关的功能^[27,28]。因此,我们还评估了槐耳对 NSCLC 细胞中 MAPKs 信号传导的影响。本研究发现,在 NSCLC 细胞中,槐耳清膏处理均显著降低了 ERK1/2、JNK1/2 和 p38 的磷酸化($P<0.05$)。同时,参与 MAPK 激活的信号通路也参与激活 Cyclin D1、PCNA 蛋白,且在细胞周期从 G₁ 到 S 期的过程中起着至关重要的作用^[29,30]。NSCLC 细胞的 Cyclin D1 的表达更高,而且 Cyclin D1 为耐药 NSCLC 细胞中 EGFR 信号传导的关键下游效应子^[31]。本研究用槐耳清膏处理 NSCLC 细胞导致 Cyclin D1 表达的显著降低($P<0.05$)。PCNA 作为细胞周期的 S 和 G₂ 期活跃的细胞增殖标记,在细胞增殖的启动过程中也具有重要的作用^[32]。此外,EGFR 还起转录因子的作用,通过激活和稳定 PCNA 来增强细胞增殖。因此,本研究发现,经槐耳清膏处理后,NSCLC 细胞中 PCNA 蛋白的表达显著降低($P<0.05$),更进一步说明槐耳清膏对 NSCLC 细胞增殖具有抑制作用。

综上所述,基于 EGFR/VEGFR2 信号通路,槐耳清膏对 NSCLC 细胞增殖和血管新生有一定的抑制作用,可能成为一种针对 NSCLC 的有用靶向药物。

参考文献(References)

[1] Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management

- of non-small cell lung cancer[J]. *Nature*, 2018, 553(7689): 446-454
- [2] Suster DI, Mino-Kenudson M. Molecular Pathology of Primary Non-small Cell Lung Cancer[J]. *Arch Med Res*, 2020, 51(8): 784-798
- [3] 耿德临,胡鹏程,翁艳.非小细胞肺癌新靶向癌基因的研究进展[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2021, 37(6): 706-708, 712
- [4] 中国临床肿瘤学会血管靶向治疗专家委员会,中国临床肿瘤学会非小细胞肺癌专家委员会,中国临床肿瘤学会非小细胞肺癌抗血管生成药物治疗专家组.晚期非小细胞肺癌抗血管生成药物治疗中国专家共识(2020 版)[J]. *中华医学杂志*, 2020, 100(46): 3659-3673
- [5] Harrison PT, Vyse S, Huang PH. Rare epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Bio*, 2020, 61: 167-179
- [6] 刘辉,刘志兰.非小细胞肺癌 VEGFR-2 与 XAGE-1b 基因表达关系研究[J]. *中西医结合心血管病电子杂志*, 2020, 8(15): 92
- [7] Chiu HY, Chiang CM, Yeh SP, et al. Effects of hyperinsulinemia on acquired resistance to epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor via the PI3K/AKT pathway in non-small cell lung cancer cells in vitro[J]. *Oncol Lett*, 2020, 20(5): 206
- [8] Lu Y, Liu Y, Oeck S, et al. Hypoxia Induces Resistance to EGFR Inhibitors in Lung Cancer Cells via Upregulation of FGFR1 and the MAPK Pathway[J]. *Cancer Res*, 2020, 80(21): 4655-4667
- [9] 程伟,陈新梅.中药抗非小细胞肺癌作用机制研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(24): 227-234
- [10] 李小娜,李开瑞,宋岚. lncRNA 调控肺癌及以 lncRNA 为靶点的中药抗肺癌治疗的研究进展[J]. *激光生物学报*, 2020, 29(6): 489-495
- [11] Yang A, Zhao Y, Wang Y, et al. Huaier suppresses proliferative and metastatic potential of prostate cancer PC3 cells via downregulation of Lamin B1 and induction of autophagy [J]. *Oncol Rep*, 2018, 39(6): 3055-3063
- [12] Xie J, Zhuan B, Wang H, et al. Huaier extract suppresses non-small cell lung cancer progression through activating NLRP3-dependent pyroptosis[J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2021, 304(2): 291-301
- [13] 陈珊.靶向 EGFR 及 VEGFR2 的 siRNA 治疗增强顺铂对非小细胞肺癌移植植物的抗肿瘤作用[D]. 广东:南方医科大学,2011
- [14] Yang J, Zhu X, Yuan P, et al. Efficacy of traditional Chinese Medicine combined with chemotherapy in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC): a meta-analysis of randomized clinical trials[J]. *Support Care Cancer*, 2020, 28(8): 3571-3579
- [15] Huang XG, Zhu LH, Zhou L, et al. Multidisciplinary and Comprehensive Chinese Medicine for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Patients: A Retrospective Study of 855 Cases [J]. *Chin J Integr Med*, 2021, 27(7): 490-495
- [16] 邹一丰,刘华山,戎煜明,等.槐耳清膏对结直肠癌细胞增殖和侵袭能力的影响[J]. *消化肿瘤杂志(电子版)*, 2019, 11(4): 336-340
- [17] 杨爱琳,胡仲冬,屠鹏飞.槐耳清膏抑制人前列腺癌 PC3 细胞增殖和侵袭作用及其机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(14): 2701-2705
- [18] Niu Y, Shan L, Gao H, et al. Huaier Suppresses the Hepatocellular Carcinoma Cell Cycle by Regulating Minichromosome Maintenance Proteins[J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 20(13): 12015-12025
- [19] 杨婧如,毕明宏.非小细胞肺癌抗血管生成治疗研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2019, 27(01): 165-171
- [20] 沈波,张浩,毛爽,等.柴胡皂苷 D 调控 VEGF/VEGFR2 信号通路抑制非小细胞肺癌细胞增殖、迁移及侵袭 [J]. *中国医学创新*, 2021, 18(8): 22-27

(下转第 248 页)

- of Lrp5 on orthodontic tooth movement [J]. *Orthod Craniofac Res*, 2021, 24(3): 430-437
- [12] Wu D, Meng B, Cheng Y, et al. The effect of risedronate on orthodontic tooth movement in ovariectomized rats [J]. *Arch Oral Biol*, 2019, 105: 59-64
- [13] Holliday LS, Truzman E, Zuo J, et al. Extracellular vesicle identification in tooth movement models [J]. *Orthod Craniofac Res*, 2019, 22 (Suppl 1): 101-106
- [14] Zhang S, Zhang H, Jin Z, et al. Fucoidan inhibits tooth movement by promoting restorative macrophage polarization through the STAT3 pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(9): 5938-5950
- [15] Wang Y, Zhang H, Sun W, et al. Macrophages mediate corticotomy-accelerated orthodontic tooth movement [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 16788
- [16] Wu L, Su Y, Lin F, et al. MicroRNA-21 promotes orthodontic tooth movement by modulating the RANKL/OPG balance in T cells[J]. *Oral Dis*, 2020, 26(2): 370-380
- [17] Ge N, Peng J, Yu L, et al. Orthodontic treatment induces Th17/Treg cells to regulate tooth movement in rats with periodontitis [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2020, 23(10): 1315-1322
- [18] Anthamatten A, Parish A. Clinical Update on Osteoporosis[J]. *J Midwifery Womens Health*, 2019, 64(3): 265-275
- [19] 赵丹, 施丹, 史晓. 围绝经期女性预防骨质疏松症研究进展 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2019, 21(02): 118-121
- [20] 黄丹. 络病理论指导八子补肾胶囊干预绝经后动脉粥样硬化理论探讨与作用机制研究[D]. 南京中医药大学, 2020
- [21] Li D, Zhou W, Cao M. Periostin-modified bone marrow mesenchymal stem cells from osteoporotic rats promote alveolar bone regeneration[J]. *J Mol Histol*, 2019, (6): 493-502
- [22] Park SY, Kang MI, Park HM, et al. Efficacy of risedronate with cholecalciferol on bone mineral density in Korean patients with osteoporosis[J]. *Arch Osteoporos*, 2019, 15(1): 3
- [23] Decker MG, Nottmeier C, Luther J, et al. Role of c-Fos in orthodontic tooth movement: an in vivo study using transgenic mice[J]. *Clin Oral Investig*, 2021, 25(2): 593-601
- [24] de Lara RM, Dos Santos MC, Omori MA, et al. The role of postnatal estrogen deficiency on cranium dimensions [J]. *Clin Oral Investig*, 2021, 25(5): 3249-3255
- [25] Wu X, Hu J, Li G, et al. Biomechanical stress regulates mammalian tooth replacement via the integrin β 1-RUNX2-Wnt pathway [J]. *EMBO J*, 2020, 39(3): e102374
- [26] Yuh DY, Maekawa T, Li X, et al. The secreted protein DEL-1 activates a β 3 integrin-FAK-ERK1/2-RUNX2 pathway and promotes osteogenic differentiation and bone regeneration[J]. *J Biol Chem*, 2020, 295(21): 7261-7273
- [27] Deng Y, Li L, Li C, et al. Efficacy of combined medication of risedronate sodium and selective estrogen receptor modulator on the postmenopausal osteoporosis[J]. *Pak J Pharm Sci*, 2020, 33(1 (Special)): 495-498
- [28] 姜颖, 马欣. 骨保护素对大鼠正畸牙齿移动过程中破骨细胞分化和 p38-MAPK 信号通路的影响[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2020, 46(06): 118-123+247
- [29] 牛静, 孙金, 张迪, 等. 黄芩苷对慢性萎缩性胃炎模型鼠 OPG/RANKL 轴的影响 [J]. *现代生物医学进展*, 2021, 21 (8): 1434-1437
- [30] Uchibori S, Sekiya T, Sato T, et al. Suppression of tooth movement-induced sclerostin expression using β -adrenergic receptor blockers[J]. *Oral Dis*, 2020, 26(3): 621-629

(上接第 229 页)

- [21] Tan AC. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in non-small cell lung cancer (NSCLC)[J]. *Thorac Cancer*, 2020, 11(3): 511-518
- [22] Ali I, Damdimopoulou P, Stenius U, et al. Cadmium at nanomolar concentrations activates Raf-MEK-ERK1/2 MAPKs signaling via EGFR in human cancer cell lines [J]. *Chem Biol Interact*, 2015, 231: 44-52
- [23] Pan X, Li J, He X, et al. Gadolinium chloride promotes proliferation of HEK293 human embryonic kidney cells by activating EGFR/PI3K/Akt and MAPK pathways [J]. *Biomaterials*, 2019, 32(4): 683-693
- [24] Elkhadragey L, Alsaran H, Morel M, et al. Activation loop phosphorylation of ERK3 is important for its kinase activity and ability to promote lung cancer cell invasiveness [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(42): 16193-16205
- [25] 江兴菊, 潘年松, 田晓云, 等. 羽扇豆醇通过 MAPKs 信号通路对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的抑制作用研究[J]. *中国药房*, 2019, 30(14): 1925-1930
- [26] Pathania S, Rawal RK. An update on chemical classes targeting ERK1/2 for the management of cancer [J]. *Future Med Chem*, 2020, 12(7): 593-611
- [27] 万敏, 许美霞. 盐酸羟考酮通过 JNK/p38 MAPK 信号通路调控异丙肾上腺素诱导的心肌细胞凋亡的机制 [J]. *中国老年学杂志*, 2020, 40(5): 1055-1059
- [28] 孙炎, 邹玉安, 薛茜, 等. 丁苯酞通过抑制 JNK/p38MAPK 信号通路减少脑梗死大鼠神经细胞的凋亡[J]. *海南医学院学报*, 2020, 26(8): 566-570
- [29] Zhu L, Lin ZW, Wang G, et al. MicroRNA-495 downregulates AQP1 and facilitates proliferation and differentiation of osteoblasts in mice with tibial fracture through activation of p38 MAPK signaling pathway[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 16171
- [30] 罗瑞, 秦启忠, 刘敏, 等. rhPGRN 通过 MAPK/PI3K 通路调控自噬和内质网应激并促进细胞增殖 [J]. *中国病理生理杂志*, 2020, 36(6): 1071-1081
- [31] Singh D, Attri BK, Gill RK, et al. Review on EGFR Inhibitors: Critical Updates[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2016, 16(14): 1134-66
- [32] González-Magaña A, Blanco FJ. Human PCNA Structure, Function and Interactions[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(4): 570