

# 槐耳颗粒抑制肺腺癌细胞增殖和迁移的机制研究

吴迪<sup>1</sup> 吴雨琼<sup>2a</sup> 乔轶才<sup>2b</sup> 孙一航<sup>2a</sup> 王潞<sup>1</sup> 吴志浩<sup>2c</sup>

( 1.皖南医学院第一附属医院 弋矶山医院 肿瘤内科 安徽 芜湖 241001; 2.皖南医学院 a.临床医学院; b.影像学院; c.医学生物学教研室 安徽 芜湖 241002)

**【摘要】**目的: 研究槐耳颗粒对肺腺癌细胞系 A549 和 H1299 增殖和迁移的作用及机制。方法: 通过 MTT 和细胞划痕实验探究不同浓度槐耳对 A549、H1299 细胞生长和迁移的抑制作用, 并计算抑制率; 运用流式细胞术检测细胞凋亡状态; 运用 Western blot 检测不同浓度槐耳对两种细胞系中 EMT 相关蛋白表达水平的影响。结果: MTT 表明随着槐耳浓度升高, A549 和 H1299 的增殖抑制率均上升 ( $P < 0.05$ ); 流式细胞术结果显示槐耳能诱导两种细胞发生凋亡; 细胞划痕实验结果表明, 肿瘤细胞的迁移随槐耳浓度的升高而抑制 ( $P < 0.05$ ); Western blot 表明, 上皮细胞标记蛋白 E-cadherin 表达增高, 间充质细胞标记蛋白 N-cadherin、Vimentin 及 Snail 表达减少。结论: 槐耳能有效抑制肺癌细胞的增殖, 促进细胞凋亡, 并通过 Snail 通路抑制 EMT 的发生, 从而阻碍肿瘤细胞的迁移。

**【关键词】**槐耳颗粒; 肺腺癌; 上皮-间质转化

**【中图分类号】**R 734.2; R 285 **【文献标志码】**A

**【DOI】**10.3969/j.issn.1002-0217.2020.01.004

## Inhibitory effect of Huaier granules on proliferation and migration of lung adenocarcinoma cells

WU Di, WU Yuqiong, QIAO Yicai, SUN Yihang, WANG Lu, WU Zhihao

Department of Oncology, The First Affiliated Hospital of Wannan Medical college, Wuhu 241001, China

**【Abstract】Objective:** To investigate the effects and mechanisms of Huaier granules on proliferation and migration of lung adenocarcinoma cell lines A549 and H1299. **Methods:** MTT assay and cell scratch assay were performed to observe the inhibitory effects of different concentration of Huaier granules on the growth and migration of A549 and H1299 cells through calculation of the inhibition rate. Flow cytometry was used to detect the cellular apoptosis, and Western blot was carried out to detect epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related protein expression levels in the two cell lines following different dose of Huaier granules treatment. **Results:** MTT assay indicated that the growth of A549 and H1299 cells was inhibited with Huaier dose ( $P < 0.05$ ), and flow cytometry demonstrated that Huaier granules could promote the apoptosis of lung cancer cells. Scratch assay revealed that migration ability of the tumor cells was significantly checked after Huaier granules treatment ( $P < 0.05$ ), and Western blotting indicated increased epithelial marker protein E-cadherin expression, yet down-regulated mesenchymal cell marker protein N-cadherin, Vimentin and Snail levels. **Conclusion:** Huaier granules can effectively inhibit the proliferation of lung cancer cells, and promote the cellular apoptosis. The mechanism is associated with migration potential of tumor cells inhibited by Huaier granules through Snail pathway.

**【Key words】**Huaier granules; lung adenocarcinoma; epithelial-mesenchymal transition

基金项目: 国家自然科学基金项目( 81872371); 安徽省自然科学基金项目( 1708085MH203)

收稿日期: 2019-06-30

作者简介: 吴迪( 1992-), 女, 2017 级硕士研究生, ( 电话) 15551272269, ( 电子信箱) wdkitty68@163.com;

王潞, 女, 主任医师, 硕士生导师, ( 电子信箱) lucyyjs@163.com, 通信作者;

吴志浩, 男, 研究员, 硕士生导师, ( 电子信箱) zwu2ster@163.com, 通信作者。

[6] LI DX, DENG TZ, LV J, *et al.* Advanced glycation end products ( AGEs) and their receptor ( RAGE) induce apoptosis of periodontal ligament fibroblasts [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2014, 47 ( 12): 1036-1043.

[7] SERBAN AI, STANCA L, GEICU OI, *et al.* AGEs-induced IL-6 synthesis precedes RAGE up-regulation in HEK 293 cells: An alternative inflammatory mechanism [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16 ( 9): 20100-20117.

[8] SU CM, HOU GG, WANG CH, *et al.* Potential multifunctional agents with anti-hepatoma and anti-inflammation properties by inhibiting NF- $\kappa$ B activation [J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2019, 34 ( 1): 1287-1297.

[9] WANG Y, LIU J, CHEN X, *et al.* Dysfunctional endothelial-derived microparticles promote inflammatory macrophage formation via NF- $\kappa$ B and IL-1 $\beta$  signal pathways [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23 ( 1): 476-486.

[10] ZHANG A, ZHANG X, TAN X, *et al.* Resveratrol rescued the TNF- $\alpha$ -induced impairments of osteogenesis of bone-marrow derived mesenchymal stem cells and inhibited the TNF- $\alpha$ -activated NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 26 ( 2): 409-415.

肺癌是世界上最常诊断的癌症( 占总病例数 11.6%) 且居癌症死亡首位( 占癌症总死亡人数的 18.4%)<sup>[1]</sup>。肺癌的常规治疗包括手术、放疗和化疗。大多数患者对化疗毒性和高昂的价格难以承受, 需寻找成本相对低廉或无毒的药物<sup>[2]</sup>。槐耳( Huaier, HE) 作为传统中药, 其抗癌作用近年来引起了全世界的兴趣<sup>[3]</sup>。临床应用已证实其抗癌效果, 对肝癌、乳腺癌、卵巢癌等肿瘤具有一定的疗效。上皮-间充质转换( epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是癌症转移的关键步骤, 它是一个动态过程, 可以降低组织的黏附能力, 驱使细胞运动的发生<sup>[4]</sup>。E-cadherin 表达降低是 EMT 的发生标志, Snail 是第一个被发现和最重要的 E-cadherin 转录抑制因子<sup>[5]</sup>。本研究对槐耳颗粒抑制肺癌细胞的增殖和迁移作用进行了探讨, 为以后的临床治疗提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞系 人非小细胞肺癌细胞系 A549、H1299, 获赠于中国科学院细胞库。

1.1.2 主要试剂及仪器 金克槐耳颗粒( 启东盖天力药业有限公司, 批号: Z20000109, 规格: 20 g×6 袋/盒), DMEM 培养基( Hyclone), 小牛血清( GIBCO), 1.5 mol/L Tris-HCl ( pH = 8.8)、1 mol/L Tris-HCl ( pH = 6.8)、APS、TEMED ( Beyotime), NC 膜( PALL), 四甲基偶氮唑蓝( MTT)、DMSO、丽春红( Sigma), 细胞培养箱( Eppendorf), 低温水平摇床( New Brunswick), 电泳仪、小型垂直电泳槽( Bio Rad), 金属浴 D1100-230V( Labnet AccuBlock), 化学发光显影成像系统( GE), BioTek 酶标仪( 伯腾公司), 流式细胞术试剂盒、流式细胞仪( BD), 抗体  $\beta$ -actin( Sigma), 抗体 Snail、Vimentin、N-cadherin、E-cadherin、兔抗、鼠抗( CST)。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 细胞 H1299 和 A549 在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。用 10% 小牛血清的培养基每 1~2 d 换液。在细胞对数生长期时用 0.25% 的胰酶消化, 用于目的实验。细胞经槐耳处理前, 行过夜饥饿。

1.2.2 槐耳溶液配制 电子天平称槐耳颗粒 1g, 溶于 50 mL DMEM 培养基中, 配成 20 mg/mL 浓度药液。37℃ 磁力搅拌器上搅拌 2~3 h, 充分溶解后, 用 0.22  $\mu$ m 滤过滤器过滤, 4℃ 备用, 使用时用培养基稀释。

1.2.3 MTT 实验 细胞接种于 96 孔板中, 长至 80%~90% 密度, 加入 0、2、4、6、8、10 mg/mL 的槐耳处理 24 或 48 h, 各样本设 4 组复孔, 另设空白对照和细胞对照。加入新配制的 0.5 mg/mL MTT 溶液 200  $\mu$ L/孔, 处理 3~4 d 后吸去上清, 加入二甲基亚砷( DMSO) 150  $\mu$ L/孔, 摇床避光震荡 10 min。酶标仪测定 490 nm 处吸光度。根据公式: 细胞抑制率( inhibitor rate, IR) ( % ) = ( 对照组吸光度值 - 实验组吸光度值 ) / 对照组吸光度值 × 100% 计算每组抑制率。

1.2.4 Annexin V-FITC/PI 双染细胞流式术 细胞均匀铺在 6 孔板中, 长至 80%~90%, 饥饿过夜, 给予槐耳( 0、10 mg/mL) 孵育 24 h。收集旧的培养液, PBS 洗 3 次, 0.25% 胰酶( 不含 EDTA) 消化 3 min, 加培养基, 吹打成悬液, 2000 r/min×5 min 离心, 弃上清, 预冷的 PBS 洗 2 次, 离心后弃上清, 调整每管细胞密度为 ( 1~5 ) × 10<sup>5</sup> 个。加入 100  $\mu$ L Binding Buffer/管后, 加 5  $\mu$ L FITC/管, 混匀, 再加入 5  $\mu$ L PI/管, 混匀, 最后再加 400  $\mu$ L Binding Buffer/管。室温下避光反应 5~15 min。1 h 内用流式细胞仪检测。并用 Flowjo7.6 软件分析。

1.2.5 细胞划痕实验 6 孔板中细胞密度达 80%~90% 时, 用灭菌的 200  $\mu$ L 无核酸酶枪头划一条均匀的直线, PBS 洗去漂浮细胞。分别加入 0、5、10 mg/mL 的槐耳, 倒置显微镜 100 倍放大率下观察细胞的迁移情况并拍照( 时间 0 h)。将细胞进一步与 DMEM 一起孵育 24 或 48 h 并再次拍照。计数迁移至 0 h 伤口区域的细胞数。划痕伤口宽度 = 各时间段伤口面积 / 0 h 伤口面积 × 100%。

1.2.6 Western blot 实验 六孔板中细胞密度达 80%~90% 时, 饥饿过夜。加入 0、2、4、6、8、10 mg/mL 的槐耳处理 24 h 后, 蛋白收样。取 1×Laemmli sample buffer, 放入 100℃ 金属浴中, 煮 2~5 min。取 6 孔板, 1×PBS 洗细胞, 每孔加 80  $\mu$ L 1×Laemmli sample buffer, 将收集的蛋白产物于 100℃ 金属浴中加热 8 min 后, 80V 电泳分离蛋白, 转膜。丽春红染色后, 封闭 1 h, 4℃ 孵一抗过夜。次日, 洗一抗 3 次, 5 min/次, 室温孵二抗 2 h, 洗二抗 3 次, 5 min/次, 曝光, Image J 分析灰度值。按上述方法提取蛋白样品进行三次独立实验。

1.2.7 乳酸实验 六孔板中细胞长至 80%~90% 时, 饥饿过夜。用 0、2、4、6、8、10 mg/mL 的槐耳处理 24 h, 加入终浓度为 0、10、20 mmol/L 的乳酸, 处理 3 h 后收样。

1.2.8 统计学分析 采用 SPSS 18.0 软件分析。所

有数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。两组间比较用  $t$  检验,多组间比较用单因素方差分析,多组间两两比较采用  $q$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 槐耳颗粒能抑制肺腺癌细胞增殖 MTT 结果显示 A549 中,24 h  $IC_{50} = 7.6 \text{ mg/mL}$ ,48 h  $IC_{50} = 6.$

41 mg/mL; H1299 中,24 h  $IC_{50} = 7.54 \text{ mg/mL}$ ,48 h  $IC_{50} = 7.01 \text{ mg/mL}$ 。A549 的增殖抑制率随槐耳浓度的升高而升高,除 2 mg/mL 组外,48 h 的抑制率均高于 24 h。H1299 中,24 h 时除浓度 8 mg/mL 与 6 mg/mL 组比无意义外,其余抑制率随浓度的升高而升高;当浓度为 6 mg/mL 至更高时,48 h 抑制率均高于 24 h(见表 1)。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

表 1 A549 和 H1299 中槐耳处理 24 h 和 48 h 时对细胞增殖的影响( $n = 3$ )

HE/ (mg/mL)	A549		$t$	$P$	H1299		$t$	$P$
	24 h	48 h			24 h	48 h		
0	0.00±0.00	0.00±0.00	-	-	0.00±0.00	0.00±0.00	-	-
2	25.86±2.07 <sup>a</sup>	27.30±1.07 <sup>a</sup>	1.069	0.345	20.37±1.54 <sup>a</sup>	15.97±1.92 <sup>a</sup>	3.096	0.036
4	34.31±1.16 <sup>b</sup>	41.81±2.15 <sup>b</sup>	5.371	0.006	28.50±0.81 <sup>b</sup>	25.15±2.69 <sup>b</sup>	2.065	0.108
6	38.67±1.25 <sup>c</sup>	48.61±0.29 <sup>c</sup>	13.420	0.000	38.33±0.62 <sup>c</sup>	46.82±1.28 <sup>c</sup>	10.340	0.001
8	48.24±1.16 <sup>d</sup>	58.00±1.58 <sup>d</sup>	8.624	0.001	41.30±1.71	54.28±1.83 <sup>d</sup>	8.976	0.001
10	62.84±2.79 <sup>e</sup>	73.40±1.45 <sup>e</sup>	5.817	0.004	54.33±1.91 <sup>e</sup>	66.09±1.56 <sup>e</sup>	8.260	0.001
$F$	500.800	1125.000			642.800	620.500		
$P$	0.000	0.000			0.000	0.000		

注:2 与 0 比较 <sup>a</sup> $P < 0.05$ ;4 与 2 比较 <sup>b</sup> $P < 0.05$ ;6 与 4 比较 <sup>c</sup> $P < 0.05$ ;8 与 6 比较 <sup>d</sup> $P < 0.05$ ;10 与 8 比较 <sup>e</sup> $P < 0.05$ 。

2.2 槐耳可促进肺腺癌细胞凋亡 与对照组相比,槐耳组早调、晚调及总凋亡细胞数增加(见图 1 和表 2),差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

2.3 槐耳对肿瘤细胞的迁移有抑制作用 划痕结果显示,迁移细胞数随着时间的延长而增加。与对照组相比,同时间段槐耳组的细胞迁移被显著抑制,且 10 mg/mL 组比 5 mg/mL 组效果更明显(见图 2、表

3)  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2.4 槐耳能抑制肿瘤细胞 EMT 蛋白的表达 Western blot 结果显示,与对照组相比,槐耳组上皮标记蛋白 E-cadherin 表达增高,间充质标记蛋白 N-cadherin、Vimentin 及 EMT 核心蛋白 Snail 表达量均降低(见图 3 和表 4、5)。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

表 2 A549 和 H1299 细胞中槐耳组与对照组相比凋亡细胞数变化( $n = 3$ )

	A549		$t$	$P$	H1299		$t$	$P$
	对照	HE/(10 mg/mL)			对照	HE/(10 mg/mL)		
早凋	4.38±0.24	6.75±0.50	7.401	0.002	7.70±0.95	16.70±0.61	13.810	0.000
晚凋	5.26±0.79	33.00±1.28	31.940	0.000	6.64±0.83	41.80±1.65	32.970	0.000
凋亡总数	9.64±1.03	39.75±1.77	25.470	0.000	14.34±1.77	58.50±2.26	26.640	0.000

表 3 A549 和 H1299 细胞中槐耳对迁移的影响( $n = 3$ )

	A549			$F$	$P$	H1299			$F$	$P$
	mg/mL					mg/mL				
	0	5	10			0	5	10		
0 h	100±0.00	100±0.00	100±0.00	-	-	100±0.00	100±0.00	100±0.00	-	-
24 h	80.07±1.52 <sup>a</sup>	91.77±1.11 <sup>ac</sup>	96.73±0.64 <sup>ad</sup>	166.600	0.000	58.83±3.05 <sup>a</sup>	76.70±1.44 <sup>ac</sup>	90.70±1.05 <sup>ad</sup>	184.000	0.000
48 h	62.27±1.54 <sup>b</sup>	87.00±0.67 <sup>bc</sup>	93.13±0.92 <sup>bd</sup>	655.100	0.000	41.20±3.75 <sup>b</sup>	65.90±2.06 <sup>bc</sup>	82.17±1.35 <sup>bd</sup>	190.300	0.000
$F$	684.800	231.500	84.610			350.700	432.700	244.700		
$P$	0.000	0.000	0.000			0.000	0.000	0.000		

注:24 h 与 0 h 比 <sup>a</sup> $P < 0.05$ ,48 h 与 24 h 比 <sup>b</sup> $P < 0.05$ ;浓度(mg/mL)5 与 0 组比 <sup>c</sup> $P < 0.05$ ,10 与 5 组比 <sup>d</sup> $P < 0.05$ 。

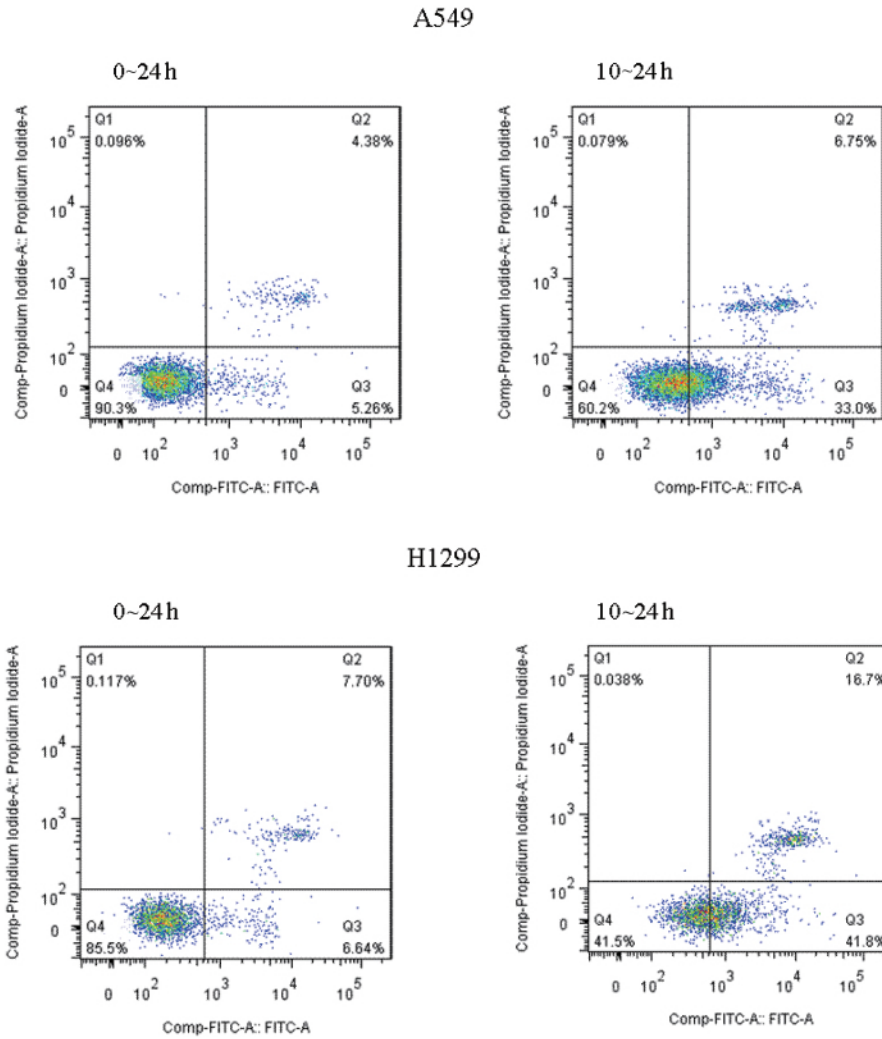


图 1 流式细胞术检测槐耳处理后对肺癌细胞 A549 和 H1299 凋亡的影响

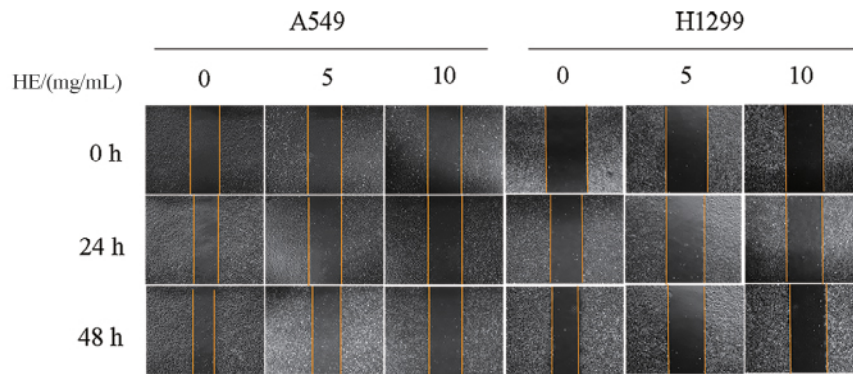


图 2 在 10×10 倍倒置显微镜下划痕结果

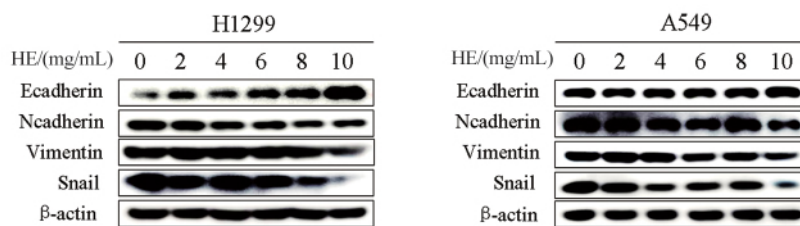


图 3 不同浓度槐耳处理细胞 24 h 的 Western blot 结果

表 4 A549 细胞中不同浓度槐耳处理后各蛋白表达量变化( n=3)

HE	0	2	4	6	8	10	F	P
E-Cadherin	0.79±0.01	0.81±0.01	0.86±0.01	0.94±0.03	0.96±0.04	1.04±0.01	17.350	0.000
N-Cadherin	1.85±0.06	1.66±0.03	1.56±0.02	1.33±0.10	1.25±0.09	0.85±0.02	31.280	0.000
Vimentin	1.10±0.08	1.07±0.05	0.99±0.03	0.74±0.02	0.72±0.05	0.62±0.01	19.260	0.000
Snail	1.19±0.04	1.09±0.01	0.72±0.04	0.65±0.02	0.61±0.07	0.34±0.02	68.810	0.000

表 5 H1299 细胞中不同浓度槐耳处理后各蛋白表达量变化( n=3)

HE	0	2	4	6	8	10	F	P
E-Cadherin	0.33±0.03	0.45±0.06	0.55±0.03	0.71±0.02	0.90±0.03	1.29±0.03	89.260	0.000
N-Cadherin	1.12±0.03	1.04±0.04	0.77±0.03	0.71±0.02	0.58±0.02	0.55±0.09	27.670	0.000
Vimentin	1.29±0.02	1.28±0.02	1.14±0.03	1.10±0.03	1.03±0.05	0.92±0.01	28.30	0.000
Snail	1.22±0.06	1.18±0.06	1.14±0.06	0.99±0.08	0.78±0.06	0.33±0.05	31.710	0.000

2.5 槐耳能抑制乳酸诱导的细胞内源性 Snail 表达增多 Western blot 结果表明,无槐耳作用时,除 H1299 中乳酸 20 mmol/L 与 10 mmol/L 比较无意义外,内源性 Snail 表达均随乳酸浓度升高而增加。而槐耳能有效抑制这种升高的内源性 Snail 表达(见图 4 和表 5)。P<0.05 为差异有统计学意义。

义外,内源性 Snail 表达均随乳酸浓度升高而增加。而槐耳能有效抑制这种升高的内源性 Snail 表达(见图 4 和表 5)。P<0.05 为差异有统计学意义。

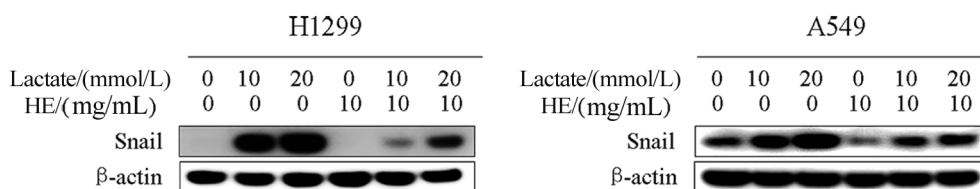


图 4 Western blot 结果显示槐耳颗粒能够抑制乳酸诱导的内源性 Snail 蛋白表达

表 6 H1299 和 A549 细胞中乳酸条件下槐耳对 Snail 蛋白的影响( n=3)

乳酸/ (mmol/L)	H1299				A549			
	HE (0 mg/mL)	HE (10 mg/mL)	t	P	HE (0 mg/mL)	HE (10 mg/mL)	t	P
0	0.71±0.04	0.59±0.02	4.648	0.010	0.58±0.04	0.45±0.02	5.106	0.007
10	1.62±0.03 <sup>a</sup>	0.76±0.04 <sup>a</sup>	29.790	0.000	0.85±0.02 <sup>a</sup>	0.63±0.01 <sup>a</sup>	19.070	0.000
20	1.69±0.03	1.12±0.08 <sup>b</sup>	11.560	0.003	1.10±0.02 <sup>b</sup>	0.68±0.02 <sup>b</sup>	30.190	0.000
F	791.200	78.460			320.000	133.200		
P	0.000	0.000			0.000	0.000		

注: 10 与 0 组比较 <sup>a</sup>P<0.05; 20 与 10 组比较 <sup>b</sup>P<0.05。

### 3 讨论

肺癌是我国癌症死亡的主要原因,且病死率随着年龄的增长而递增<sup>[6]</sup>。它分为两大类:小细胞肺癌(SCLC, 占有所有肺癌的 15%)和非小细胞肺癌(NSCLC, 占有所有肺癌的 85%)。NSCLC 可进一步分为鳞状细胞癌(SCC),大细胞癌(LCC)和腺癌(AC)<sup>[7-8]</sup>。由于其具有侵袭性生物学特性且缺乏有效筛查方案,NSCLC 患者在诊断时基本已达晚期。肿瘤的治疗方法诸多,但治疗效果差强人意,且副作用较大。因此,生物医学科学迫切需要开发副作用小、耐药性低的新型抗癌剂以满足癌症患者的

治疗需求<sup>[9]</sup>。槐耳是一种药用真菌,作为中药已应用了约 1600 年。大量临床应用表明,槐耳具有良好的抗肿瘤作用,其有效成分主要为多糖蛋白(PS-T)<sup>[10]</sup>。然而其抗肿瘤的机制尚不明确。EMT 与肿瘤的发生、发展、转移密切相关。有数据显示超过 90% 的癌症死亡与肿瘤转移的发生有密切联系<sup>[11]</sup>。转录因子 Snail 作为 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 型的一类锌指蛋白,主要通过 SNAG 结构域和共抑制子 C 端结合蛋白组成转录抑制区域,实现对基因表达的抑制,在 EMT 过程中发挥重要的调控作用。Snail 蛋白水平与病理性肿瘤分期和组织学分级呈正相关,在侵袭和转移中具有重要作用,并且沉默该基因可能是肿瘤中潜在

的治疗靶点<sup>[12]</sup>。我们知道细胞增殖是癌症发生、发展中不可或缺的过程,本研究中,我们通过 MTT 实验证实了槐耳能有效抑制 A549 及 H1299 细胞的增殖,与之前研究相符。流式细胞术结果也揭示槐耳能明显诱导肺腺癌细胞凋亡,我们可对此进一步深入研究,探讨其凋亡通路。同时,我们所进行的体外划痕测定实验,表明槐耳可能作为肺癌治疗的有效抗转移剂。接着,为探讨其作用机制,我们运用 Western blot 证明了槐耳可通过 Snail 抑制 EMT 发生过程进而影响肺癌细胞的迁移,同时乳酸实验也进一步证实了这一点。虽然本实验证明了槐耳具有抗癌潜力,为槐耳颗粒在肺部肿瘤治疗上提供一定的科学依据,开辟了更有效的抗癌治疗选择,但仍存在一些局限性,我们目前无法得到关于槐耳在人体中的吸收、分布、代谢和排泄的信息,后期应进一步开展相关临床研究,使得其作为一种前瞻性抗癌候选药物在治疗恶性肿瘤方面发挥益处。

#### 【参考文献】

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 2018, 68( 6) : 394-424.
- [2] PAN MH, HO CT. Chemopreventive effects of natural dietary compounds on cancer development [J]. *Chemical Society Reviews*, 2008, 37( 11) : 2558-2574.
- [3] SONG X, LI Y, ZHANG H, *et al.* The anticancer effect of Huaier (Review) [J]. *Oncology Reports*, 2015, 34( 1) : 12-21.
- [4] KUDO-SAITO C, SHIRAKO H, TAKEUCHI T, *et al.* Cancer metastasis is accelerated through immuno suppression during Snail-induced EMT of cancer cells [J]. *Cancer Cell*, 2009, 15( 3) : 195-206.
- [5] WU Y, ZHOU BP. Snail: More than EMT [J]. *Cell Adhesion & Migration*, 2010, 4( 2) : 199-203.
- [6] HONG QY, WU GM, QIAN GS, *et al.* Prevention and management of lung cancer in China [J]. *Cancer*, 2015, 121( 17) : 3080-3088.
- [7] INAMURA K. Update on immunohistochemistry for the diagnosis of lung cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2018, 10( 3) : 72.
- [8] YOUSEF M, TSIANI E. Metformin in lung cancer: review of in vitro and in vivo animal studies [J]. *Cancers (Basel)*, 2017, 9( 5) : 45.
- [9] KANNAIYAN R, SHANMUGAM MK, SETHI G. Molecular targets of celastrol derived from thunder of god vine: Potential role in the treatment of inflammatory disorders and cancer [J]. *Cancer letters*, 2011, 303( 1) : 9-20.
- [10] YANG A, FAN H, ZHAO Y, *et al.* Huaier aqueous extract inhibits proliferation and metastasis of tuberous sclerosis complex cell models through downregulation of JAK2/STAT3 and MAPK signaling pathways [J]. *Oncology Reports*, 2016, 36( 3) : 1491-1498.
- [11] GRINSHPUN A, BEN-PORATH I, PERETZ T, *et al.* Tumor metastasis and what's in between [J]. *Harefuah*, 2013, 152( 1) : 30-33, 58, 59.
- [12] MIKAMI S, KATSUBE K, OYA M, *et al.* Expression of Snail and Slug in renal cell carcinoma: E-cadherin repressor Snail is associated with cancer invasion and prognosis [J]. *Laboratory investigation*, 2011, 91( 10) : 1443-1458.