

## 实验研究

DOI: 10.16306/j.1008-861x.2023.04.003

# 氯化两面针碱对类泛素化修饰抑制剂 MLN4924 介导肺癌耐药的作用与机制研究

李蒙, 张荔, 赵伟丽, 李立辉

上海中医药大学附属龙华医院肿瘤研究所(上海 200032)

**【摘要】** 目的:探索中药药效物质氯化两面针碱对 A549 MLN4924 耐药肺癌细胞株的影响及作用机制。方法:利用 MLN4924 低剂量处理 A549 细胞 6 个月,并进行细胞半数抑制率( $IC_{50}$ )分析和 Western blot 检测以确保顺利诱导出 MLN4924 耐药细胞株(A549-MR);氯化两面针碱浓度梯度和时间梯度处理 A549-MR,并进行 ATPLite 细胞增殖分析、细胞计数检测其对 A549-MR 生长的影响;同时收集 A549-MR 细胞总蛋白进行 Western blot 检测氯化两面针碱抑制 A549-MR 生长的分子机制。结果: $IC_{50}$  分析和 Western blot 实验显示,经低剂量长时间处理 A549 细胞后,MLN4924 对 A549 细胞的  $IC_{50}$  从 0.355  $\mu\text{mol/L}$  提高至 10.643  $\mu\text{mol/L}$ ,且其不能显著抑制 Cullins 家族蛋白的类泛素化修饰(neddylation);细胞增殖分析显示,氯化两面针碱显著抑制 MLN4924 耐药肺癌细胞生长;Western blot 结果显示,氯化两面针碱能下调 A549-MR 细胞内的 Cullins 蛋白表达并引起其抑癌底物蛋白 p21、p27 等积聚。结论:氯化两面针碱通过抑制泛素连接酶(CRLs)复合体的活性,导致其下游抑癌蛋白底物积聚,从而抑制 neddylation 抑制剂 MLN4924 引起的肺癌耐药细胞增殖。

**【关键词】** 氯化两面针碱;MLN4924;耐药;泛素连接酶复合体

## Study on effect and mechanism of nitidine chloride on drug resistance of neddylation inhibitor MLN4924 in lung cancer

LI Meng, ZHANG Li, ZHAO Weili, LI Lihui

Cancer Institute, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China

**ABSTRACT Objective:** To explore the influence and mechanism of the effective traditional Chinese medicine nitidine chloride on A549 MLN4924 drug-resistant lung cancer cell lines. **Methods:** A549 cells were treated with low dose of MLN4924 for 6 months, and half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) analysis and Western blot analysis were performed to ensure the successful induction of MLN4924 drug-resistant cell lines (A549-MR). A549-MR was treated with the concentration gradient and time gradient of nitidine chloride, and the effect of nitidine chloride on A549-MR growth was detected by ATPLite cell proliferation analysis and cell counting. Meanwhile, the total protein of A549 cells was collected for Western blot analysis to detect the molecular mechanism of inhibition of A549-MR growth by nitidine chloride. **Results:**  $IC_{50}$  analysis and Western blot analysis showed that after low-dose and long-time treatment of A549 cells, the  $IC_{50}$  of MLN4924 on A549 cells was increased from 0.355  $\mu\text{mol/L}$  to 10.643  $\mu\text{mol/L}$ , and the neddylation modification of Cullins family proteins wasn't significantly inhibited. Cell proliferation analysis showed that the proliferation of MLN4924 drug-resistant lung cancer cells was significantly inhibited by nitidine chloride, Western blot results showed that the expression of Cullins protein in A549-MR cells was down-regulated by nitidine chloride and its tumor suppressor substrate protein p21 and p27 were induced to accumulate. **Conclusion:** By inhibiting the activity of the CRLs (cullin-RING ligases) complex, nitidine chloride can induce the accumulation of downstream tumor suppressor protein substrates, which can inhibit the proliferation of the drug-resistant lung cancer cells induced by the neddylation

[基金项目] 上海市“科技创新行动计划”自然科学基金原创探索项目(21ZR1482200);上海市“科技创新行动计划”启明星项目(21QA1408900)

[作者简介] 李蒙,女,在读硕士生,主要从事抗肿瘤靶点筛选与中西医防治研究

[通信作者] 李立辉,副研究员,硕士生导师;E-mail:dm-li@163.com

收稿日期:2023-03-22;修回日期:2023-05-10

inhibitor MLN4924.

**KEYWORDS** nitidine chloride; MLN4924; drug resistance; cullin-RING ligases complex

据美国癌症学会的学术期刊 *CA-Cancer J Clin* 最新统计,全球每年肺癌约有 220 万新发病例和 179 万死亡病例<sup>[1]</sup>,是目前全球发病率排名第 2 位、病死率排名居首的恶性肿瘤<sup>[2]</sup>。近年来,尽管在早期筛查、手术、放化疗等标准化治疗方面取得了许多新进展<sup>[3]</sup>,但是肺癌患者的 5 年总体生存率仍较低,仅为 10%~20%,鉴于肺癌治疗的严峻现状,亟待阐明肺癌发生发展机制,并开发其靶向药物。化疗耐药是导致肺癌预后较差的重要因素<sup>[4]</sup>。常见的临床化疗药物吉非替尼长期使用可导致靶点 T790M 突变<sup>[5]</sup>,需改用 3 代药物奥希替尼继续治疗,但是奥希替尼也会在 10 个月后因耐药而治疗无效<sup>[6]</sup>。因此,克服化疗耐药是目前提高肺癌治疗效果、改善患者预后的非常有前景的治疗策略。

类泛素化修饰(neddylation)是指经 E1(NEDD8 激活酶)、E2(NEDD8 结合酶)、E3(NEDD8 结合酶)3 级酶促催化,将类泛素小分子 NEDD8 连接到底物上,进而调控底物生物学功能的过程<sup>[7]</sup>。目前鉴定最为透彻的 neddylation 底物是泛素连接酶(CRLs)的关键亚基 Cullins 蛋白。多项研究发现 neddylation 通路在多种肿瘤(如肺癌、肝癌、食管癌)中过度活化,且提示患者预后不良<sup>[8]</sup>。王诗雯等<sup>[9-10]</sup>发现利用遗传学手段靶向下调 neddylation 通路的关键催化酶通过灭活其下游 CRLs 泛素连接酶,导致其抑癌蛋白底物积聚,发挥重要的肿瘤杀伤作用。基于 neddylation 通路的重要促癌功能,美国 Millennium 制药公司通过高通筛选研发出针对 neddylation E1 的特异性小分子抑制剂 MLN4924。研究表明,MLN4924 通过诱导细胞凋亡<sup>[11]</sup>、细胞衰老<sup>[12]</sup>等发挥重要的肿瘤杀伤效应,目前已进入 III 期临床试验阶段。但是研究表明,MLN4924 存在耐药效应<sup>[13]</sup>,因此亟待寻找可靶向灭活 neddylation-CRLs 通路的其他小分子药物。

历代中医典籍中并无“肺癌”这一病名,但考虑其刺激性干咳、胸痛、呼吸困难的临床表现与古籍中“息贲”“咳嗽”等相似,故可归于此范畴<sup>[14]</sup>。正如《难经·论五脏积病》中记载:“肺之积,名曰息贲,在右肋下,覆大如杯,久不已,令人洒淅寒热,喘咳,发肺壅。”<sup>[15]</sup>正气与邪气的相互斗争存在于肺癌的发生发

展之中,故治疗肺癌可予扶正祛邪。

两面针为芸香科植物两面针 *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. 的干燥根,其味苦辛、性平,有小毒,归肝、胃经。两面针有行气止痛、活血散瘀等作用,现代研究表明两面针还具有抗菌、抗癌等药理活性<sup>[16]</sup>。氯化两面针碱(nitidine chloride)作为一种苯并菲啶生物碱,是植物两面针根部的重要成分<sup>[17]</sup>。氯化两面针碱具有多种生物学功能,包括抗炎、抗病毒、镇痛和抗肿瘤等<sup>[18]</sup>。氯化两面针碱通过诱导细胞凋亡<sup>[19]</sup>、细胞周期阻滞<sup>[20]</sup>、上皮-间充质转化<sup>[21]</sup>等显示出重要的肿瘤杀伤效果,但是其抗肿瘤机制尚未充分阐明;同时,氯化两面针碱对 neddylation 通路(下游的 CRLs 复合体以及其抑癌蛋白底物)的调控作用未见文献报道。本研究以常见的肺腺癌细胞 A549 为实验研究对象,通过 MLN4924 低浓度长时间处理诱导其产生耐药效应,并进一步探索中药单体氯化两面针碱对此耐药细胞的杀伤作用及分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 细胞 A549 肺腺癌细胞株,购自美国模式培养物研究所(ATCC)。

1.1.2 药物与试剂 氯化两面针碱(批号:HY-N0498,纯度为 99.61%),美国 Med Chem Express 公司; MLN4924(CAS 号:905579-51-3),由美国 Millennium 公司合成。

$\beta$ -actin(批号:EM21002),杭州华安生物技术有限公司;Cul1、Cul2、Cul5(货号:ab75817、ab166917、ab184177),美国 Abcam 公司;Cul3、Cul4A、p21、p27、p-H2AX 抗体(货号:2759S、2699S、2947S、3686S、9718S),美国 Cell Signaling Technology 公司;Cul4B(货号:12916-1-AP),美国 Proteintech 公司;ATPlite 1 Step 检测试剂盒(批号:107-22022),美国 PerkinElmer 公司。

1.1.3 主要仪器 SYNERGY HTX 型多功能酶标仪,美国 BioTek 公司;Cellometer Auto 1000 型细胞计数仪,美国 Nexcelom Bioscience 公司;LE-4631 微量震荡型器,美国 Thermo Fisher 公司;5430R 型台

式微量冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司。

1.2 构建 MLN4924 耐药肺癌细胞株 利用低浓度 MLN4924 处理肺癌细胞 A549,3 d 传 1 代,共培养 6 个月左右。MLN4924 诱导终浓度为 1.0  $\mu\text{mol/L}$ 。

1.3 ATPLite 细胞增殖/毒性检测 将对数期生长的野生型 A549 细胞(A549-wt)和 A549-MR 细胞消化处理后,以 1 500 个/孔接种于 96 孔黑板底透酶标板中,过夜贴壁。使用完全培养基将药物 (MLN4924 和氯化两面针碱)分别稀释到 0、0.01、0.033、0.1、0.33、1.0、3.3、10  $\mu\text{mol/L}$ ,并加入肺癌细胞 A549-wt 和 A549-MR 中。处理 72 h 之后,将培养基拍干,每孔加入 50  $\mu\text{L}$  ATPLite 试剂,微量震荡器 600 r/min 避光震荡 10 min,使用酶标仪的发光模块检测细胞增殖与细胞毒性,并使用 Graphpad Prism 9 软件计算其半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ )。

细胞接种并贴壁后,使用完全培养基将氯化两面针碱分别稀释到 0、0.05、0.1、0.2、0.4  $\mu\text{mol/L}$ ,并加入肺癌细胞 A549-wt 和 A549-MR 中。处理 72 h 后,检测其细胞活力变化,并使用 Graphpad Prism 9 软件做柱状统计图。

1.4 细胞计数 将 A549-wt 和 A549-MR 细胞以  $7 \times 10^4$  个/孔接种于 6 孔板中,过夜贴壁后,使用完全培养基将 MLN4924 分别稀释到 0、0.1、0.2、0.4  $\mu\text{mol/L}$ ,并加入肺癌细胞 A549-wt 和 A549-MR 中。分别在 24 h、48 h、72 h 时对细胞进行计数,Graphpad Prism 9 软件统计并做折线图。

1.5 蛋白免疫印迹 将 A549-wt 和 A549-MR 细胞以  $3 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板中过夜贴壁后,将 MLN4924 以 0、1.0  $\mu\text{mol/L}$  的浓度加入到两种细胞中,处理 24 h 之后,收集细胞制备蛋白样品。Western blot 实验验证 neddylation 通路相关蛋白变化。同时,加入 0、0.1、0.2、0.4  $\mu\text{mol/L}$  浓度梯度的氯化两面针碱处理。

1.6 统计学方法 采用 Graphpad Prism 9 软件分析数据,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。在统计细胞活力和细胞计数组间有无差异时,各药物浓度组分别与对照组比较采用双尾非配对  $t$  检验。以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 获得 MLN4924 耐药的 A549 细胞株 低浓度 MLN4924 处理 A549 细胞 6 个月后,再用不同浓度

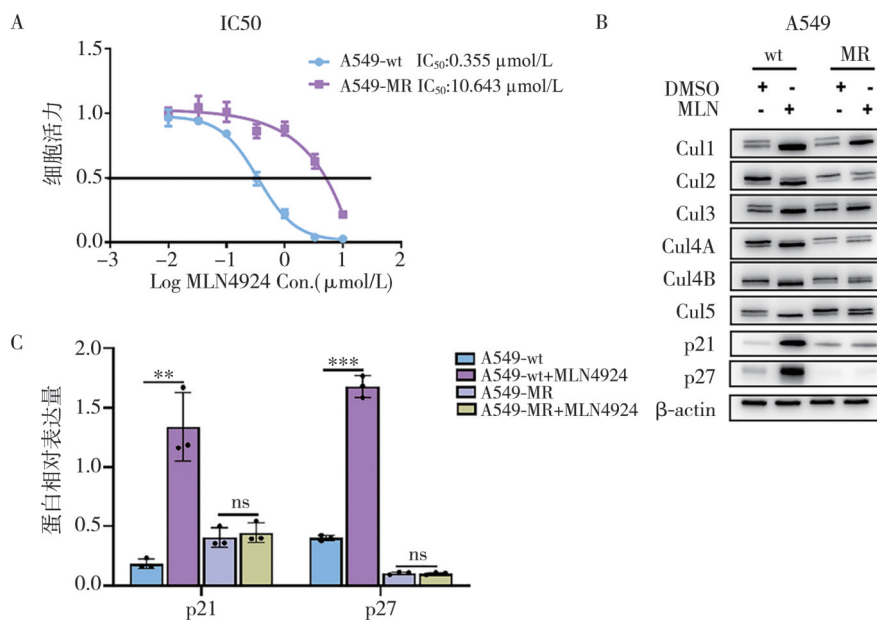
MLN4924 处理 A549-wt 和 A549-MR 细胞 72 h, A549-wt  $\text{IC}_{50}$  为 0.355  $\mu\text{mol/L}$ , A549-MR  $\text{IC}_{50}$  为 10.643  $\mu\text{mol/L}$ , A549-MR 对 MLN4924 的耐药指数 (RI) = A549-MR  $\text{IC}_{50}$  / A549-wt  $\text{IC}_{50}$  = 29.98。同时 Western blot 实验结果显示,MLN4924 处理后, A549-MR 细胞中 CRLs 泛素连接酶的关键亚基 Cullins 蛋白的 Neddylation 修饰未被抑制,见图 1A 和图 1B。结果表明, A549 细胞在低浓度 MLN4924 处理 6 个月后出现了显著的耐药性。

2.2 氯化两面针碱显著抑制 A549-MR 细胞生长

为了寻找克服 MLN4924 耐药的肿瘤杀伤策略,检测了氯化两面针碱对 A549-MR 生长的影响,其中氯化两面针碱的化学结构见图 2A。首先进行  $\text{IC}_{50}$  测定,结果显示氯化两面针碱处理 A549-wt 和 A549-MR 细胞 72 h 后, A549-wt  $\text{IC}_{50}$  为 0.079  $\mu\text{mol/L}$ , A549-MR  $\text{IC}_{50}$  为 0.175  $\mu\text{mol/L}$ ,提示氯化两面针碱对两类细胞均具有良好的抑制生长作用。见图 2B。为了进一步确认氯化两面针碱对 A549 细胞的杀伤作用,选取氯化两面针碱 0、0.05、0.1、0.2、0.4  $\mu\text{mol/L}$  5 个浓度,分别处理 A549-wt 和 A549-MR 细胞 72 h 后,ATPLite 细胞增殖实验检测可以看到氯化两面针碱能够抑制 A549-MR 的细胞活力。见图 2C。

同时,使用氯化两面针碱 0、0.1、0.2、0.4  $\mu\text{mol/L}$  4 个浓度处理细胞,分别处理 A549-wt 和 A549-MR 细胞,在 24 h、48 h、72 h 时收集细胞并计数,观察氯化两面针碱对肿瘤生长的抑制趋势,结果也显示氯化两面针碱可以明显抑制细胞增殖 ( $P < 0.01$ )。见图 2D。以上结果表明,氯化两面针碱对 A549-MR 细胞有显著的杀伤作用。

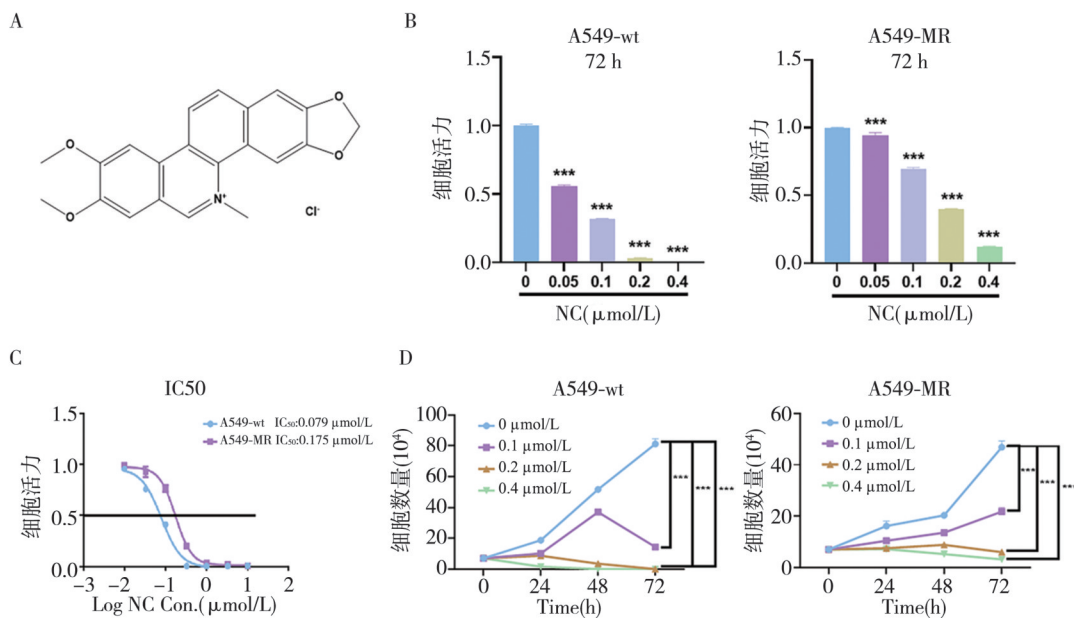
2.3 氯化两面针碱显著抑制 Cullins 表达并引起其底物积聚 为了检测氯化两面针碱对 Neddylation 通路的下游 CRLs 复合体及其底物的影响,进行了 Western blot 实验,使用氯化两面针碱的浓度为 0、0.2、0.4、0.8  $\mu\text{mol/L}$ ,结果显示,氯化两面针碱处理 A549-MR 细胞后,其中 Cul1、Cul2、Cul3、Cul4A 和 Cul5 都呈现出药物浓度依赖性的蛋白水平下降。说明氯化两面针碱可以抑制 Cullins 的活性,同时, p-H2AX、p21、p27 都呈现出浓度依赖性的蛋白积聚,而 p-H2AX、p21 和 p27 都是 CRLs 复合体的抑癌蛋白底物。见图 3A、3B。结果表明,氯化两面针碱可以抑制 Cullins 的生物活性,并引起 CRLs 复合体的抑癌蛋白底物积聚。



A 为 ATPLite 检测 MLN4924 对 A549-wt 和 A549-MR 细胞  $\text{IC}_{50}$ ; B 为 Western blot 检测 A549-MR 细胞中 neddylation 通路相关蛋白变化; C 为统计分析 neddylation 通路抑癌蛋白底物表达变化。

图 1 构建 A549-MR 耐药细胞株

Fig. 1 Construction of A549-MR resistant cell line



A 为氯化两面针碱的化学结构; B 为 ATPLite 检测氯化两面针碱对 A549-wt 和 A549-MR 细胞  $\text{IC}_{50}$ ; C 为细胞增殖分析检测氯化两面针碱对 A549-MR 的细胞杀伤作用; D 为不同浓度和处理时间氯化两面针碱对 A549-MR 细胞增殖的影响。

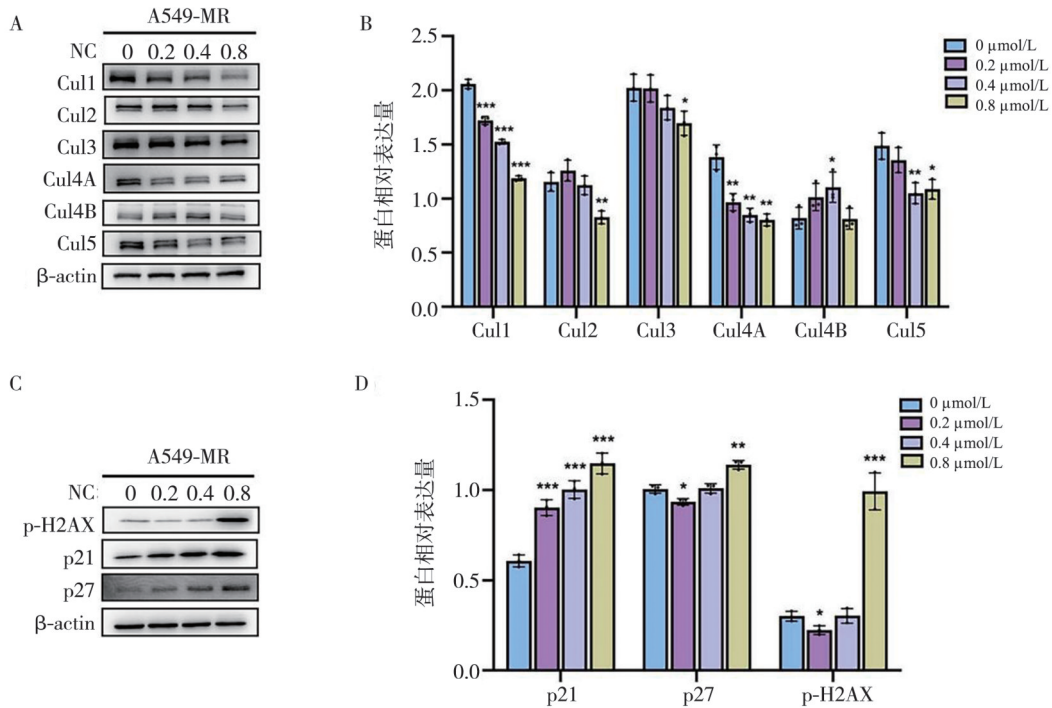
图 2 氯化两面针碱对 A549-wt 和 A549-MR 细胞增殖的影响

Fig. 2 Effect of nitidine chloride on proliferation of A549-wt and A549-MR cells

### 3 讨论

neddylation 修饰是一种蛋白翻译后修饰, 由 NEDD8 激活酶 E1、NEDD8 结合酶 E2 和 NEDD8 E3 连接酶经级联反应催化, 将泛素样小分子 NEDD8

共价结合到相应底物上的修饰过程<sup>[22]</sup>。这一过程与泛素化相似, 因此被称为类泛素化修饰。E3 连接酶发挥底物特异性, 依据它们的核心蛋白结构域分为 HECT (homologous to E6-AP carboxy terminus)、RING (really interesting new gene) 和 U-box E3



A 为 Western blotting 检测氯化两面针碱对 Neddylation 通路的重要组分 Cullins 的影响;B 为统计分析氯化两面针碱处理后 Cullins 相对蛋白表达变化; C 为 Western blotting 检测氯化两面针碱对 CRLs 复合体下游抑癌底物蛋白的影响;D 为统计分析氯化两面针碱处理后 CRLs 下游抑癌底物蛋白表达变化。

图 3 氯化两面针碱对 A549-MR 中 neddylation 通路的影响

Fig. 3 Effect of nitidine chloride on the neddylation pathway in A549-MR

ligases 三类<sup>[23]</sup>。其中 Cullin-RING 连接酶(CRL)是 E3 泛素连接酶的最大家族,由 4 个亚单位组成: Cullin 骨架蛋白、RING 蛋白、衔接蛋白和底物识别亚基<sup>[24]</sup>。目前发现 Cullin 骨架蛋白分为 Cul1、Cul2、Cul3、Cul4A、Cul4B、Cul5、Cul7、Cul9,通过介导相关底物的降解,从而调控多种生物学过程如细胞凋亡、增殖、分化等。当 Cullins 活性失调,引起抑癌底物过度降解或促癌底物积累,都会促进肿瘤的发展进程<sup>[25]</sup>。

MLN4924 是一种已经进入临床 III 期试验研究的小分子抑制剂,表现出良好的抗肿瘤活性,有望真正地投入临床使用,但长期使用会导致耐药的产生。氯化两面针碱是提取自中草药两面针的天然产物,现有诸多文献报道,氯化两面针碱对多种肿瘤细胞有显著的杀伤效果,可以发挥“祛邪”的作用,并且参与了多个生物学过程,如细胞凋亡、细胞周期阻滞、上皮-间充质转化等。那么中药两面针的有效成分氯化两面针碱是否能够克服 MLN4924 诱导的肺癌细胞耐药呢?

本研究首先利用低浓度长时间 MLN4924 处理

肺癌细胞 A549,诱导其产生 MLN4924 耐药特性,进一步通过细胞 IC<sub>50</sub> 和 Western blot 分析检测其耐药性。耐药细胞株构建成功后,使用提取自两面针的中药药效物质氯化两面针碱处理 A549-wt 和 A549-MR 细胞,通过细胞增殖分析和细胞计数检测氯化两面针碱对其细胞杀伤作用。进一步,通过 Western blot 分析检测氯化两面针碱处理对 CRLs 复合体中 Cullins 骨架蛋白 Cul1-Cul5 以及相关底物的影响。

结果显示,氯化两面针碱可以显著抑制 A549-MR 细胞的生长,同时也发现,在 A549-MR 细胞中 neddylation 通路的下游蛋白 Cul1、Cul2、Cul3、Cul4A、Cul5 的蛋白水平基本呈现出浓度依赖性的下调,相关底物 p-H2AX、p21、p27 也都有明显的积聚,提示氯化两面针碱能够克服 MLN4924 引起的耐药,这与抑制 CRLs 复合体的活性有关。综上,氯化两面针碱通过抑制 CRLs 复合体的活性从而克服了 MLN4924 在肺癌细胞中的耐药(具体的工作示意图见图 4)。因此,本项研究为靶向 neddylation-CRLs 通路的临床治疗提供了新的思路和策略。

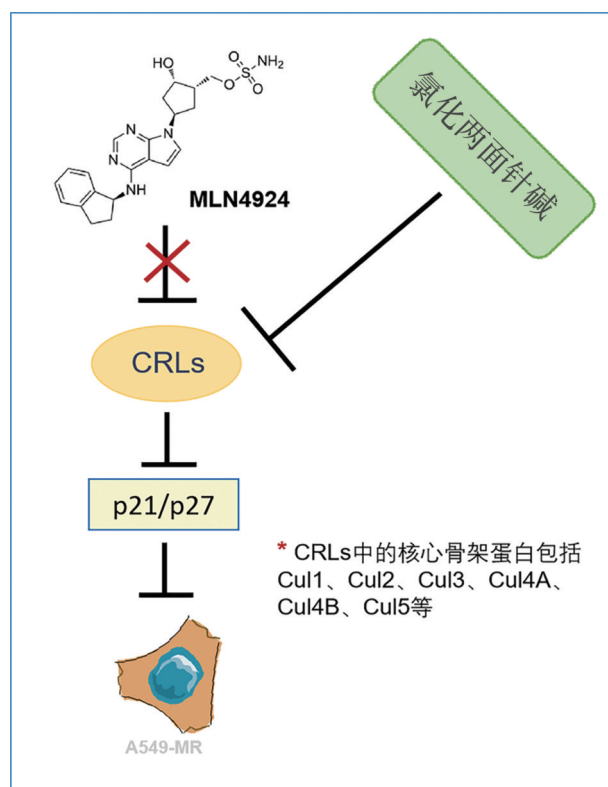


图 4 氯化两面针碱抑制 MLN4924 引起的肺癌细胞耐药

Fig. 4 Nitidine chloride inhibits drug resistance in lung cancer cells caused by MLN4924

参考文献:

[1] THAI A A, SOLOMON B J, SEQUIST L V, et al. Lung cancer [J]. Lancet, 2021, 398(10299): 535-554.

[2] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.

[3] 李慧, 李朝锋. 非小细胞肺癌靶向治疗现状及未来展望 [J]. 当代医学, 2020, 26(19): 191-194.

LI H, LI Z F. Current status and future prospects of targeted therapy for non-small cell lung cancer [J]. Contemporary Medicine, 2020, 26(19): 191-194.

[4] 李娜, 邓茜, 蒋建军. NF-κB 信号通路在恶性肿瘤化疗耐药中的作用 [J]. 实用肿瘤学杂志, 2021, 35(6): 580-584.

LI N, DENG Q, JIANG J J. The role of NF-κB signaling pathway in chemotherapy resistance of malignant tumors [J]. Practical Oncology Journal, 2021, 35(6): 580-584.

[5] 陈晨, 何志巍. 吉非替尼在非小细胞肺癌治疗中获得性耐药机制的研究进展 [J]. 广东医科大学学报, 2020, 38(4): 377-385.

CHEN C, HE Z W. Advances in mechanisms of acquired resistance to gefitinib in the treatment of non-small cell lung cancer [J]. Journal of Guangdong Medical University, 2020, 38(4): 377-385.

[6] SORIA J C, OHE Y, VANSTEENKISTE J, et al. Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer [J]. N Engl J Med, 2018, 378(2): 113-125.

[7] BARGHOUT S H, SCHIMMER A D. E1 Enzymes as Therapeutic Targets in Cancer [J]. Pharmacol Rev, 2021, 73(1): 1-58.

[8] GAI W B, PENG Z Q, LIU C H, et al. Advances in Cancer Treatment by Targeting the Neddylation Pathway [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 653882.

[9] LI L H, KANG J H, ZHANG W J, et al. Validation of NEDD8-conjugating enzyme UBC12 as a new therapeutic target in lung cancer [J]. EBioMedicine, 2019, 45: 81-91.

[10] WANG S W, XIAN J R, LI L H, et al. NEDD8-conjugating enzyme UBC12 as a novel therapeutic target in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1): 123.

[11] LIU X J, JIANG Y N, WU J F, et al. NEDD8-activating enzyme inhibitor, MLN4924 (Pevonedistat) induces NOXA-dependent apoptosis through up-regulation of ATF-4 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 488(1): 1-5.

[12] JIA L J, LI H, SUN Y. Induction of p21-Dependent Senescence by an NAE Inhibitor, MLN4924, as a Mechanism of Growth Suppression [J]. Neoplasia, 2011, 13(6): 561-569.

[13] CHEN X Y, CUI D R, BI Y L, et al. AKT inhibitor MK-2206 sensitizes breast cancer cells to MLN4924, a first-in-class NEDD8-activating enzyme (NAE) inhibitor [J]. Cell Cycle, 2018, 17(16): 2069-2079.

[14] 张珊珊, 马佳乐, 封继宏, 等. 中医药调控肺癌相关信号通路研究进展 [J]. 中医学报, 2021, 36(1): 83-88.

ZHANG S S, MA J L, FENG J H, et al. Research Progress of TCM Regulating Signal Pathways Related to Lung Cancer [J]. Acta Chinese Medicine, 2021, 36(1): 83-88.

[15] 陆颖, 倪伟, 赵晓霆, 等. 从阳虚论治肺积的文献整理及研究概况 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(1): 291-294.

LU Y, NI W, ZHAO X T, et al. Literature research and clinical application of yang deficiency theory in lung cancer [J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2019, 34(1): 291-294.

[16] 赫俊杰, 吴晓燕, 阎星旭, 等. 基于功效的两面针药理学作用研究进展及临床应用分析 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, 25(5): 93-97.

HE J J, WU X Y, YAN X X, et al. Research progress on pharmacological effects of Zanthoxyli Radix based on efficacy and clinical application analysis [J]. Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2023, 25(5): 93-97.

[17] LU Q, LUO S, SHI Z F, et al. Nitidine chloride, a benzophenanthridine alkaloid from Zanthoxylum nitidum (Roxb.) DC., exerts multiple beneficial properties, especially in tumors and inflammation-related diseases [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 1046402.

(下转第 101 页)