

## 阻断 Wnt-1 信号通路对云南肺癌细胞株的影响

李定彪, 王长勇, 王艳飞, 石剑林, 张峰懿

(昆明医科大学附属延安医院胸外科, 云南 昆明 650051)

**[摘要]** **目的** 初步探讨个旧肺癌细胞株中是否存在功能性的 Wnt-1 信号通路的激活, 以及阻断该信号通路后, 观察个旧肺癌细胞株的增殖和生长情况. 为云南肺癌研究提供新的切入点. 为临床对肺癌的早期诊断、预后判断提供依据, 为肺癌的分子病理分期和靶向治疗提供理论基础. **方法** 应用免疫组织化学的方法检测个旧肺癌细胞株中 Wnt-1 蛋白的表达. 以及按计划加入 Wnt-1 抗体, 抑制 Wnt-1 蛋白和胞膜受体结合, 引起 Wnt 通路下游蛋白的改变, 从而阻断该信号通路的传导, 应用 MTT 法检测肺癌细胞增殖和生长情况. **结果** (1) Wnt-1 蛋白阳性染色主要定位于细胞浆和细胞膜, 为粗细不一的棕黄色颗粒. 在肺癌组中的阳性表达率为 75.40%, 与对照组相比差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ ); (2) Wnt-1 抗体浓度为 0.01 mg/mL 时能极显著抑制细胞增殖和生长 ( $P < 0.01$ ); 0.005 mg/mL 时能显著抑制细胞增殖和生长 ( $P < 0.05$ ). 而过于稀释抗体浓度组则不能抑制细胞增殖和生长. IC50 计算结果显示抑制率 50% 的时候抗体浓度为 0.003 mg/mL. **结论** (1) 个旧肺癌细胞株中存在功能性的 Wnt-1 信号通路; (2) Wnt-1 抗体能极显著抑制个旧肺癌细胞增殖和生长, 且与抗体浓度成正比; (3) 抑制率 50% 的时候抗体的浓度 0.003 mg/mL.

**[关键词]** 个旧肺癌细胞株; Wnt-1 抗体; 免疫组织化学; Wnt-1 信号通路

**[中图分类号]** R734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2015) 02-0012-06

## The Effect of Blocking Wnt-1 Signal Pathway on Lung Cancer Cell Lines of Yunnan

LI Ding-biao, WANG Chang-yong, WANG Yan-fei, SHI Jian-lin, ZHANG Feng-yi

(Dept. of Thoracic Surgery, The Affiliated Yan'an Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650051, China)

**[Abstract]** **Objective** To preliminarily discuss whether there exist activation of functional Wnt-1 signal pathway in Gejiu lung cancer cell lines, and observe the proliferation and growth condition of Gejiu lung cancer cell lines after blocking this signal pathway, so as to provide the new entry point for the Yunnan lung cancer research, and provide a new basis for clinical lung cancer prevention, diagnosis and target therapy. **Methods** Immunohistochemical method was used to detect the expression of Wnt-1 protein in Gejiu lung cancer cell lines. And after application of Wnt-1 antibody to block the signaling pathway conduction, MTT method was used to detect the proliferation and growth condition of lung cancer cell lines. **Results** (1) Wnt-1 protein-positive staining was mainly localized in the cytoplasm and cell membrane, and showed as brown particles of varying thickness. Positive expression in the lung cancer group was 75.40%, compared with the control group with significant difference ( $P < 0.001$ ). (2) The results showed that 0.01mg/mL of Wnt-1 antibody could significantly inhibit cell proliferation and growth ( $P < 0.01$ ); 0.005 mg/mL could significantly inhibit cell proliferation and growth ( $P < 0.05$ ). And more diluted antibody could not inhibit cell proliferation and growth. (3) The IC50 of Wnt-1 antibody was 0.003mg/mL. **Conclusions** (1) There exists activation of functional Wnt-1 signal pathway in Gejiu lung cancer cell lines. (2) Wnt-1 antibody can significantly inhibit the proliferation and growth of Gejiu lung cancer cell, and is proportional to

**[基金项目]** 云南省科技厅-昆明医科大学联合专项基金资助项目 (2012FB103)

**[作者简介]** 李定彪 (1970~), 男, 云南景洪市人, 医学博士, 主任医师, 主要从事胸部肿瘤的基础与临床工作.

concentration of antibody. (3) The  $IC_{50}$  of Wnt-1 antibody was 0.003mg/mL.

[**Key words**] Gejiu lung cancer cell lines; Wnt-1 antibody; Immunohistochemistry; Wnt-1 signal pathway

肺癌的发病率和死亡率均居恶性肿瘤之首, 已严重威胁着人类的生命和健康. 其发病机制也被认为是一个多因素导致、多基因参与、多阶段发展的复杂过程. 其中一些关键基因和细胞传导通路的异常对其发生、发展起着至关重要的作用. 目前备受关注的是 Wnt/ $\beta$ -catenin 经典信号传导通路, 研究发现 Wnt 基因家族编码蛋白的异常表达可引起经典信号通路的激活, 进而导致核心因子  $\beta$ -catenin 稳态并定位于核内, 激活下游靶基因的转录, 与肿瘤发生密切相关<sup>[1]</sup>. 其在结直肠癌中的作用已经明确, 在其他恶性肿瘤中的改变也显示出重要意义. 有研究发现此信号途径的异常与肺癌的发生发展关系密切<sup>[2]</sup>. 因此本实验旨在初步探讨个旧肺癌细胞中是否存在功能性的 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路, 以及用 Wnt-1 抗体阻断该信号通路能否抑制肿瘤细胞增殖, 诱导肿瘤细胞凋亡.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验细胞系** 云南个旧肺癌细胞株 (GLC-82) 由昆明医科大学第一附属医院实验室提供, 此细胞株是对肺癌高发区个旧市女工的肺癌组织进行体外培养, 建立的肺腺癌细胞系 (GLC-82), 至 1984 年 1 月 9 日, 已存活 17 个月, 传至 123 代, 群体倍增时间 48 h, 细胞增殖周期 20 h, 集落形成率 40%, 染色体众数为亚三倍体. 细胞异型性明显, 呈不规则腺样排列. 胞浆内有不含硫的酸性粘多糖及似肺泡 II 型细胞的板层小体. 动物移植形成浸润性生长的肿瘤, 并与患者肺癌组织保持着形态学及组织化学的一致性. 这株细胞的建立有利于研究个旧肺癌的病因及免疫特性, 并可用于抗癌药及癌细胞生物学的研究.

**1.1.2 主要试剂** Wnt-1 抗体购置美国 Santa Cruz, 1640 培养基、胎牛血清、0.25% P/S、谷氨酰胺、双抗和胰酶均购置美国 GIBCO 公司, 中性树胶和苏木素购置上海 Solarbio 公司, SP 免疫组化试剂盒 (MVS-0066) 和 DAB 显色剂 (DAB-2031/2032) 均购置福建迈新.

**1.1.3 主要仪器** 倒置显微镜 (CKX41SF-5) 购置日本奥林巴,  $CO_2$  培养箱 (HERA cell 150i) 购置美国 Thermo fisher 公司, 低温高速离心机 (5415R) 购置德国 Eppendorf 公司, 荧光显微镜

(DM2500) 购置德国 Leica 公司.

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养与处理** 云南个旧肺癌细胞系 (GLC-82) 呈单层贴壁生长, 培养基为含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养基, 其中含青霉素和链霉素各 0.1 g/L, 于 37 °C、5%  $CO_2$  孵箱中培养, 传代后于对数生长期收集细胞, PBS 洗涤, 传代 2 份. 其中免疫组化 1 份, 加入抗体后 MTT 检测 1 份.

**1.2.2 免疫组化实验** 配制新鲜的 DAB 溶液 (迈新 DAB-2031/2032) 于 1.5 mL EP 管中加入 1 mL 的试剂 A, 再按试剂 B、C 的顺序加入试剂各 50  $\mu$ L, 混合均匀, 即成 1 mL 的 DAB 显色液. 细胞爬片: (1) 将多聚赖氨酸处理过的盖玻片用培养基冲洗 1~3 遍, 放入 6 孔板内, 使爬片与板底贴合紧密; (2) 胰酶消化细胞, 将细胞悬于 RPMI1640 培养基中计数, 以密度  $4 \times 10^4$ /mL 种于 6 孔板中; (3) 待细胞爬片生长至对数生长期时取出玻片, 置 0.01 mol/L PBS 液中浸洗 2 次, 4% 多聚甲醛室温固定 30 min, 0.01 mol/L PBS 液中浸洗两次. SP 法染色 (迈新 KIT-9709/9719): (1) 细胞内源过氧化物酶阻断: 每片加 50  $\mu$ L 过氧化物酶阻断试剂 (试剂 A), 室温下孵育 10 min, 阻断内源性过氧化物酶的活性. PBS 浸洗 3 次, 每次 3 min; (2) 封闭: 除去 PBS 液, 每张片加 50  $\mu$ L 正常非免疫动物血清 (试剂 B), 室温下孵育 10 min; (3) 除去血清, 每张片加 50  $\mu$ L 一抗 (200 倍稀释), 室温下孵育 60 min 或 4 °C 过夜; (4) 次日从冰箱中取出湿盒, 室温中放置 20 min (以使切片适应室温), PBS 冲洗 10 min  $\times$  3 次; (5) 除去 PBS 液, 每张片加 50  $\mu$ L 生物素标记的二抗 (试剂 C), 室温下孵育 10 min. PBS 冲洗 5 min  $\times$  3 次; (6) 除去 PBS 液, 每张片加 50  $\mu$ L 链霉菌抗生物素-过氧化物酶溶液 (试剂 D), 室温下孵育 10 min. PBS 冲洗 5 min  $\times$  3 次; (7) 除去 PBS 液, 每张片加 100  $\mu$ L 新鲜配制的 DAB 溶液, 显微镜下观察掌握染色程度; (8) 切片放入蒸馏水中终止显色, 自来水流水冲洗 10 min; (9) 苏木素轻度复染; (10) 0.5% 盐酸酒精分化 30 s; (11) 梯度乙醇脱水; (12) 二甲苯透明; (13) 中性树胶封固.

**1.2.3 MTT 法检测细胞增殖和生长** 称取 250 mg MTT, 在 50 mL 0.01 mol/L PBS (pH7.4) 中溶解,

并用 0.22 μm 微孔滤器除菌, 铝箔纸包住, 4 °C 保存, 有效期 2 周: (1) 收集对数期细胞, 调整细胞悬液浓度, 每孔加入 100 μL, 铺板使待测细胞调密度至 1 000 ~ 10 000 孔, 5%CO<sub>2</sub>, 37 °C 孵育, 至细胞单层铺满孔底 (96 孔平底板), 加入浓度梯度的抗体, 加入抗体过夜, 根据 Wnt-1 抗体说明书, 分别按 1:20、1:40、1:200、1:400、1:800、1:1 600、1:2 000、1:4 000 稀释, 则抗体浓度分别为 0.01 mg/mL、0.005 mg/mL、0.001 mg/mL、0.000 5 mg/mL、0.000 25 mg/mL、0.000 125 mg/mL、0.000 1 mg/mL、0.000 05 mg/mL, 每孔最终体积 100 μL, 设 4 个复孔分别稀释, 每孔最终体积 100 μL, 设 4 个复孔. 每孔加入 20 μL MTT 溶液 (5 mg/mL, 即 0.5%MTT), 继续培养 4 h. 先离心后弃去培养液, 小心用 PBS 冲 2 ~ 3 遍后, 再加入含 MTT 的培养液. 终止培养, 小心吸去孔内培养液. 每孔加入 150 μL 二甲基亚砷, 置摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解. 在酶联免疫检测仪 OD490 nm 处测量各孔的吸光值, 同时设置调零孔.

**1.2.4 Wnt-1 蛋白的判定标准** Wnt-1 正常表达定位于细胞膜, 异常表达定位于细胞质. 细胞膜和细胞质同时表达也属于异常表达. 将出现 Wnt-1 异常表达的细胞定为阳性细胞. 每张切片选取 5 个表达好的高倍视野共计数 1 000 个瘤细胞中阳性细胞并计算其阳性细胞表达密度. 每张切片中无阳性表达或阳性表达密度 < 15/100 时判定为阴性, 阳性表达密度 > 15/100 时判定为阳性.

**1.2.5 IC<sub>50</sub> 的计算公式:**

$$\lg IC_{50} = X_m - I \frac{P - (3 - P_m - P_n)}{4}$$

其中 X<sub>m</sub>:lg 最大剂量 I:lg (最大剂量 / 相临剂量) P:阳性反应率之和 P<sub>m</sub>:最大阳性反应率 P<sub>n</sub>:最小阳性反应率抑制率 = 1 - 加药组 OD 值 / 对照组 OD 值公式中的最大最小阳性反应率就是最大最小抑制率.

**1.3 统计学处理**

采用 SPSS 软件, 独立样本 T 检验分析进行统计学处理, P < 0.05 为差异有统计学意义.

**2 结果**

本实验采用代替一抗作为阴性对照. Wnt-1 蛋白阳性染色主要定位于细胞浆和细胞膜, 为粗细不一的棕黄色颗粒. 在肺癌组中的阳性表达率为 75.40%, 与对照组比较差异有统计学意义 (P < 0.01), 见表 1. 阴性对照: GLC-82 细胞, 以 PBS

液代替一抗作阴性对照, 结果为阴性. 结果显示 Wnt-1 抗体浓度为 0.01 mg/mL 时能极显著抑制细胞增殖和生长 (P < 0.01); 0.005 mg/mL 时能显著抑制细胞增殖和生长 (P < 0.05). 而过于稀释抗体浓度组 0.001 mg/mL、0.000 5 mg/mL、0.000 25 mg/mL、0.000 125 mg/mL、0.000 1 mg/mL、0.000 05 mg/mL 则不能抑制细胞增殖和生长, 见图 1 ~ 4.

本实验中: P<sub>m</sub> = 0.747 P<sub>n</sub> = 0.006 P = 0.747 + 0.667 + 0.119 + 0.136 + 0.170 + 0.148 + 0.006 + 0.190 = 2.182. lg I = lg 0.01/0.005 = 0.3 根据公式:

$$\lg IC_{50} = -2 - 0.3 \frac{2.182 - (3 - 0.747 - 0.006)}{4} = -2.486$$

IC<sub>50</sub> = 0.00327 = 0.003 所以抑制率 50% 的时候抗体的浓度 0.003 (mg/mL).

**3 讨论**

Wnt-1 信号通路是一条进化上高度保守的非直线型信号传导通路, 其在细胞的分化、增殖和凋亡等生理过程中, 以及在细胞癌变、肿瘤侵袭等病理过程中均发挥了至关重要的调控作用. 研究发现 Wnt 基因家族编码的 Wnt-1 蛋白是一种分泌糖蛋白, 通过自分泌和 (或) 旁分泌释放到基质, 分泌

表 1 对照组和肺癌组 Wnt-1 蛋白的表达 [n (%)]

Tab. 1 Comparison of the protein expression of Wnt-1 between two groups [n (%)]

组别	n	阳性	阴性
对照组	500	0(0.0)	500(100.00)
肺癌组	500	377(75.40)	123(24.60)*

与对照组比较, \*\*P < 0.01.

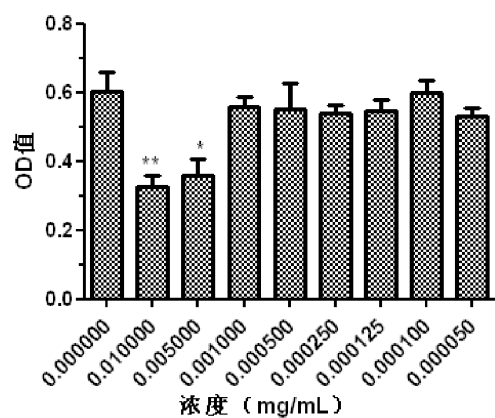


图 1 阴性对照组与各 Wnt-1 抗体组 MTT OD 值比较  
Fig. 1 The OD value comparison between the negative control group and the each Wnt-1 antibody group

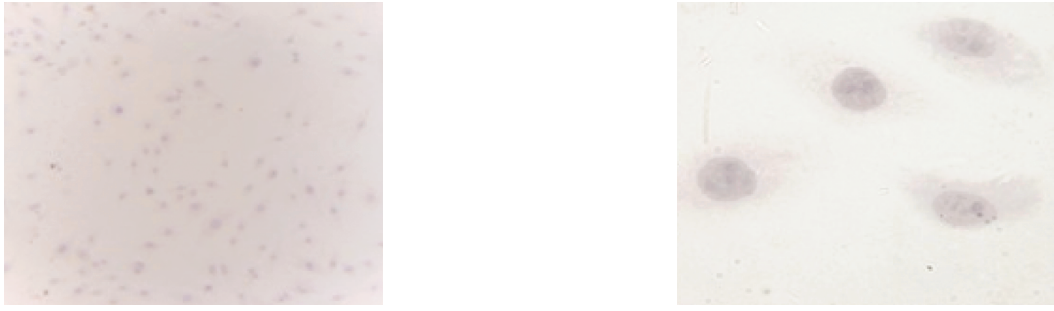


图 2 Wnt-1 蛋白在阴性对照组织中的表达 (免疫组化 SP 法, 左图  $\times 40$ , 右图  $\times 400$ )

Fig. 2 Wnt-1 protein expression in negative control tissue (immunohistochemistry SP method, left  $\times 40$  right  $\times 400$ )

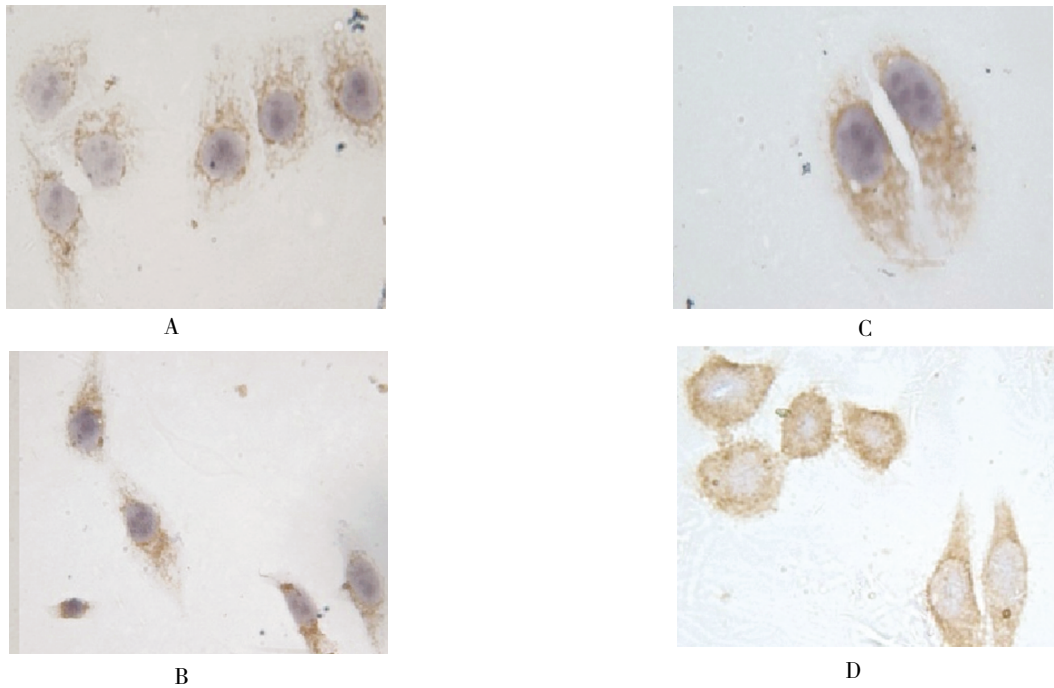


图 3 Wnt-1 蛋白在对照组织中的表达 (免疫组化 SP 法, A、B  $\times 200$ , C、D  $\times 400$ )

Fig. 3 Wnt-1 protein expression in control tissue (immunohistochemistry SP method, left  $\times 200$ , right  $\times 400$ )

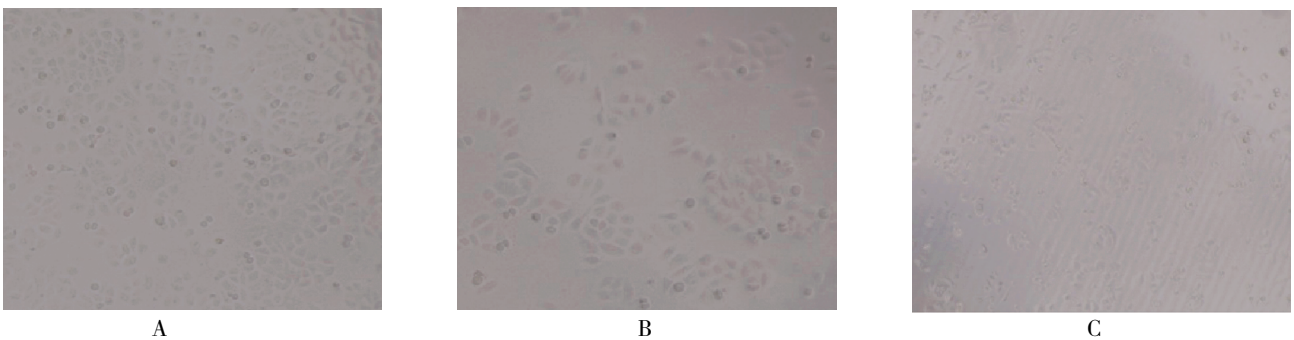


图 4 细胞株未加抗体 A 未加, B 加入 Wnt-1 抗体 0.005 (mg/mL), C 加入 Wnt-1 抗体 0.01 (mg/mL)

Fig. 4 Glc-82 cells cultured with addition of nothing (A) Wnt-1 antibody 0.005 (mg/mL) (B) and 0.01 (mg/mL) (C)

后与细胞表面基质及其特异性受体卷曲蛋白 (Fz) 相互作用, 通过其下游散乱蛋白 (Dvl)、GSK-3 $\beta$ 、 $\beta$ -catenin、APC 等磷酸化和去磷酸化过程来完成 Wnt 信号传递, 进而导致核心因子  $\beta$ -catenin 稳态并定位于核内, 激活下游靶基因的转录, 发挥生物学作用<sup>[3,4]</sup>。 $\beta$ -catenin 由胞浆向胞核的转位被认为是该信号通路被激活后行使功能的标志<sup>[5]</sup>。然而在肺癌中,  $\beta$ -catenin 基因的突变率很低, 常见的是  $\beta$ -catenin 蛋白的异常表达<sup>[6]</sup>, 若肺癌细胞胞质中存在启动子 Wnt-1 蛋白, 并认为细胞中存在功能性的 Wnt-1 信号通路的激活。

国内外目前有关 Wnt 信号途径研究主要集中在 Wnt 的下游信号的异常表现, 如  $\beta$ -catenin, APC, GSK-3 $\beta$ , CTNNB1 及 axin 基因突变等。而对于 Wnt 信号途径的上游信号 (Wnt 蛋白及其抑制物等) 的异常改变与肿瘤发生的关系的研究相对较少。如直接阻断 Wnt-1 蛋白与蛋白跨膜受体结合, 沉默 Wnt 抑制基因表达等<sup>[7-9]</sup>。本实验选择云南个旧锡矿工人的肺癌细胞株, 特殊病因导致的肺癌为切入点, 免疫组化发现 Wnt-1 蛋白阳性染色主要定位于细胞浆和细胞膜 (图 3), 为粗细不一的棕黄色颗粒, 在肺癌组中的阳性表达率为 75.40%, 与对照组 (图 2) 相比具有统计学意义 ( $P < 0.001$ )。表明个旧肺癌细胞胞质中存在 Wnt-1 蛋白的表达, 存在功能性的 Wnt-1 信号通路。包传恩等人<sup>[10]</sup>用山羊抗人 Wnt-1 多克隆抗体 (G-19, sc-6280) 对 60 例石蜡包埋的原发性 NSCLC 组织进行免疫组化染色, 并与 15 例良性病变比较, 结果 Wnt-1 在肺癌中的阳性率为 55.6%, 在肺良性病变中, 阳性率仅为 13.3%。

在个旧肺癌细胞株中分别加入不同浓度的 Wnt-1 抗体, 结果显示 Wnt-1 抗体浓度为 0.01 mg/mL 时能极显著抑制细胞增殖和生长 ( $P < 0.01$ ); 抗体浓度为 0.005 mg/mL 时能显著抑制细胞增殖和生长 ( $P < 0.05$ )。而过于稀释抗体浓度则不能抑制细胞增殖和生长, 并且抑制率 50% 的时候抗体浓度为 0.003 mg/mL。这证明了在蛋白水平上, Wnt-1 抗体与 Wnt-1 蛋白的抗原抗体反应, 对 Wnt 信号通路中 Wnt-1 蛋白这一非常重要的启动因子进行抗原抗体反应, 从而抑制 Wnt-1 蛋白与胞膜受体结合, 引起 Wnt-1 通路下游蛋白的改变, 从而在上游水平成功阻断了这一信号通路的传导, 显著抑制了个旧肺癌细胞增殖和生长。Biao He<sup>[11]</sup>等利用单克隆抗体和 RNA 干扰方法阻断 Wnt 信号转导通路。发现在 Wnt-1 高表达癌细胞中利用单克隆抗体阻断 Wnt-1 信号转导通路诱导非小细

胞肺癌、乳腺癌、间皮瘤和肉瘤细胞的凋亡。引起 Wnt-1 下游蛋白的表达变化。RNA 干扰实验也得到相似的结果。有研究发现采用 Wnt-1 单克隆抗体或 siRNA 阻断 Wnt-1 信号可导致下游因子  $\beta$ -catenin 表达水平下调, 细胞凋亡明显增加<sup>[12]</sup>。程万宏等人<sup>[13]</sup>用 RT-PCR 技术对 48 例肺腺癌中 Wnt-1 基因表达的检测, 表达率为 39.6% 与 Wnt-1 在肺腺癌的表达率相近, Wnt-1 基因表达与生存时间呈负相关, 生存时间  $> 3$  a 组 Wnt-1 mRNA 表达率 (29.0%) 明显低于生存时间  $< 3$  a (58.8%)。大多实验显示 Wnt-1 过表达与非小细胞肺癌增生、进展和预后差有关, Wnt-1 过表达的肺癌患者生存时间会明显低于未表达的肺癌患者<sup>[14,15]</sup>。本实验证实了个旧肺癌细胞株中存在功能性的 Wnt-1 信号通路, Wnt-1 抗体能极显著抑制个旧肺癌细胞增殖和生长, 且与抗体浓度成正比, 抑制率 50% 的时候抗体的浓度 0.003 mg/mL。因此, Wnt-1 信号可作为个旧肺癌治疗的新的靶点<sup>[16]</sup>。

肿瘤中异常 Wnt 信号转导的研究在国际上还处于起步阶段, 还有许多问题尚不清楚, 在不同的细胞类型、不同时间、不同空间、不同病因和 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号传导途径的复杂性以及肺癌的发生发展是由多因素导致, 多基因参与, 多步骤形成的复杂病理生理过程的情况下, 通过控制变量, 结合相同致病因为切入点发病机制的研究意义重大, 对肺癌的分子病理分期和靶向治疗提供理论基础, 为临床对肺癌的早期诊断、预后判断提供依据。

#### [参考文献]

- [1] 王玉, 叶建明. 经典 Wnt 信号通路在原发性肝癌发生中的作用[J/CD]. 中华普通外科学, 2011, 5(1): 50 - 53.
- [2] MAZIERES J, HE B, YOU L, et al. Wnt signaling in lung cancer[J]. Cancer Lett, 2005, 222(1): 1 - 10.
- [3] PAUL POLAKIS. Wnt signaling and cancer[J]. Genes Dev, 2000, 14(15): 1 837 - 1 851.
- [4] ALEX, RAGLANS. Wnt signaling and its impact On development and cancer[J]. Nature Review, 2008, 5(8): 387.
- [5] KRIEGHOFF E, BEHRENS J, MAYR B. Nucleo-cytoplasmic distribution of beta-catenin is regulated by retention[J]. J Cell Sci, 2006, 119(7): 1 453 - 1 463.
- [6] HOMMURA F, FURUUCHI K, YAMAZAKI K, et al. Increased expression of catenin predicts better prognosis in non small cell lung carcinomas[J]. Cancer, 2002, 94(3):

- 752 – 758.
- [7] BEHRENS J, LUSTY B. The Wnt connection to tumor genesis[J]. *Int J Dev Biol*, 2004, 48(5–6):477 – 487.
- [8] HE B, REGULAR N, YOU L, et al. Blockade of Wnt-1 signaling induces apoptosis in human colorectal cancer cells containing downstream mutations [J]. *Onogenesis*, 2005, 24(18):3 054 – 3 058.
- [9] KARIM R, TSE G, PUTTI T, et al. The sign finance of the Wnt pathway in the pathology of human cancers [J]. *Pathology*, 2004, 36(2):120 – 128.
- [10] 包传恩, 刘升. Wnt-1在非小细胞肺癌中表达的临床意义[J]. *江西医药*, 2009, 44(6):551 – 552.
- [11] BIAO H E. A monoclonal antibody against Wnt-1 induces apoptosis in human cancer cells [J]. *Neoplasia*, 2004, 6(1):7.
- [12] MIKAMI I, YOU L, HE B. Efficacy of Wnt-1 monoclonal antibody in sarcoma cells[J]. *BMC Cancer*, 2005, 5:53.
- [13] 程万宏, 王艳俊, 隗玉川, 等. 肺腺癌组织中Wnt-1基因表达及临床意义探讨[J]. *中外健康文摘*, 2010, 17(7):100 – 101.
- [14] NAKASHIMA T, LIU D, NAKANO J. Wnt-1 over expression associated with tumor proliferation and a poor prognosis in non-small cell lung cancer patients [J]. *Once Rep*, 2008, 19(1):203.
- [15] HUANG C L, LIU D, ISHIKAWA S, et al. Wnt-1 over expression promotes tumor progress in non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer*, 2008, 44(17):2 680.
- [16] YOU L, KIM J, HE B, et al. Wnt-1 signal as a potential cancer therapeutic target [J]. *Drug News Perspect*, 2006, 19(1):27 – 31.
- (2014 – 12 – 03 收稿)

(上接第 6 页)

- virology[M]. Washington: ASM Press, 2009:958.
- [2] GAO R, CAO B, HU Y, et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(20):1 888 – 1 897.
- [3] BOLTZ D A, ALDRIDGE J R, WEBSTER R G, et al. Drugs in Development for Influenza[J]. *Drugs*, 2010, 70(11):1 349 – 1 362.
- [4] DEYDE V M, XU X, BRIGHT R A, et al. Surveillance of resistance to adamantanes among influenza A (H3N2) and A (H1N1) viruses isolated worldwide [J]. *J Infect Dis*, 2007, 196(2):249 – 257.
- [5] YEN H L, MCKIMM-BRESCHKIN J L, CHOY K T, et al. Resistance to neuraminidase inhibitors conferred by an R292K mutation in a human influenza virus H7N9 isolate can be masked by a mixed R/K miral population [J]. *MBio*, 2013, 4(4):1 – 8.
- [6] 刘百联, 张婷, 张晓琦, 等. 臭灵丹化学成分的研究[J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(5):602 – 606.
- [7] 杨艳, 陈旭冰, 陈光勇, 等. 民族传统药灵丹草研究进展[J]. *亚太传统医药*, 2012, 8(3):173 – 175.
- [8] EHRHARDT C, HRINCIUS E R, KORTE V, et al. CYS-TUS052, exerts anti influenza virus activity in cell culture without toxic side effects or the tendency to induce viral resistance[J]. *Antiviral Research*, 2007, 76(1):38 – 47.
- [9] REED L J, MUENCH H. A simple method of estimating fifty percent endpoints[J]. *Am J Hyg*, 1938, 27(3):493 – 497.
- [10] HSIEDH C F, LO C W, LIU C H, et al. Mechanism by which ma-xing-shi-gan-tang inhibits the entry of influenza virus[J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 143(1):57 – 67.
- [11] 何红, 蔡瑞锦, 庞永成. 臭灵丹口服液治疗急性呼吸道感染高热95例[J]. *云南中医中药杂志*, 2000, 21(6):38 – 39.
- [12] 郑秀琴, 李洁, 陈昆昌, 等. 臭灵丹合剂治疗感冒临床疗效观察 [J]. *中国民族民间医药杂志*, 2000, 47(6):343 – 345.
- [13] 刘兴峰, 尚晓丽, 田云粉, 等. 感冒消炎片治疗儿童甲型H1N1流感临床试验评价 [J]. *昆明医学院学报*, 2011, 32(5):99 – 102.
- (2014 – 11 – 06 收稿)