

美洲大蠊提取物调控 JAK1/PI3K/AKT 信号通路 干预磨玻璃结节型患者源性早期肺腺癌类器官的 机制研究

何佳玮^{1,3}, 黄春霞^{1,3}, 钟杨¹, 马琼^{1,2,3}, 李佳¹, 赖恒周¹, 肖平⁴, 任益锋^{1,2},
耿福能⁵, 吴桃清⁵, 蒋义芳^{1,3}, 李雪珂^{1,2}, 由凤鸣^{1,2,3*}, 付西^{1,2*}

(1. 成都中医药大学附属医院, 四川 成都 610075; 2. 成都中医药大学 肿瘤研究所, 四川 成都 610075;
3. 代谢与慢病中医药防治四川省重点实验室, 四川 成都 610075; 4. 四川省肿瘤临床医学研究中心,
四川省肿瘤医院·研究所, 四川省癌症防治中心, 电子科技大学附属肿瘤医院 胸外科,
四川 成都 610041; 5. 药用美洲大蠊四川省重点实验室, 四川 成都 611730)

[摘要] 该研究旨在利用患者源性类器官(PDO)模型,阐明传统中药美洲大蠊提取物(PAE)对磨玻璃结节(GGN)型早期肺腺癌的干预作用及分子机制,成功构建了 GGN 型患者源性早期肺腺癌类器官(GGN-PDO)模型。药品质控及成分鉴定层面,利用高效液相色谱(HPLC)对 PAE 游离氨基酸与肽类含量进行测定,进一步采用液相色谱-质谱联用(LC-MS)对 PAE 主要成分进行解析,并应用方差分析评估同一批次药品间的相似性(皮尔逊相关系数范围 0.87~0.99)并实现质量控制。组织病理学层面,苏木素-伊红(HE)染色及关键分子标志物细胞角蛋白 7(CK7)、甲状腺转录因子-1(TTF-1)、增殖细胞核抗原(Ki-67)的免疫组化(IHC)染色均表征了类器官的肿瘤组织特征。药效学评价显示,PAE 能以剂量依赖方式显著抑制 GGN-PDO 的增殖及细胞活力,同时免疫荧光(IF)染色表明 PAE 处理可显著降低细胞增殖核心指标 Ki-67 的表达水平。流式细胞术定量分析证实 PAE 可显著诱导 GGN-PDO 细胞凋亡,且 Western blot 分析进一步确证了 PAE 处理可下调抗凋亡蛋白 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因(Bcl-2)的表达,上调促凋亡蛋白 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)的表达,从而激活凋亡通路。尤为关键的是,首次发现 PAE 促进细胞凋亡的作用机制与抑制 Janus 激酶 1(JAK1)/磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(AKT)信号通路有关,表现为 PAE 干预后显著降低 JAK1、PI3K、p-PI3K、AKT 及 p-AKT 蛋白水平。综上,该研究首次利用与临床高度相关的 GGN-PDO 模型揭示 PAE 通过抑制 JAK1/PI3K/AKT 信号通路诱导早期肺腺癌细胞凋亡,为开发针对 GGN 的创新药物及非手术干预策略奠定了重要的理论与实验基础。

[关键词] 美洲大蠊提取物; JAK1/PI3K/AKT 信号通路; 磨玻璃结节; 早期肺腺癌; 患者源性类器官; 细胞凋亡

Mechanisms of *Periplaneta americana* extract in regulating JAK1/PI3K/AKT signaling pathway to intervene in patient-derived early-stage lung adenocarcinoma organoids with ground-glass nodule features

HE Jia-wei^{1,3}, HUANG Chun-xia^{1,3}, ZHONG Yang¹, MA Qiong^{1,2,3}, LI Jia¹, LAI Heng-zhou¹, XIAO Ping⁴,
REN Yi-feng^{1,2}, GENG Fu-neng⁵, WU Tao-qing⁵, JIANG Yi-fang^{1,3}, LI Xue-ke^{1,2}, YOU Feng-ming^{1,2,3*}, FU Xi^{1,2*}

[收稿日期] 2025-09-04

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82405359);中国博士后科学基金第 76 批面上资助“地区专项支持计划”项目(2024MD763921);国家资助博士后研究人员计划和中国博士后科学基金项目(BX20250214);四川省自然科学基金项目(2024NSFSC1868);成都市卫生健康委员会成都中医药大学委托联合创新基金项目(WXLH202403110)

[通信作者] * 由凤鸣,教授,博士生导师,主要从事中医药防治肿瘤病证的基础与临床研究,E-mail: yfmdoc@163.com; * 付西,主治医师,硕士生导师,主要从事中医药防治肿瘤病证的基础与临床研究,E-mail: fuxi884853@163.com

[作者简介] 何佳玮,博士研究生,E-mail: damonvincent@foxmail.com

(1. Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China; 2. Cancer Institute, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China; 3. TCM Prevention and Treatment of Metabolic and Chronic Diseases Key Laboratory of Sichuan Province, Chengdu 610075, China; 4. Sichuan Clinical Research Center for Cancer, Sichuan Cancer Hospital & Institute, Sichuan Cancer Center, Department of Thoracic Surgery, Affiliated Cancer Hospital of University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610041, China; 5. Medicinal *Periplaneta americana* Key Laboratory of Sichuan Province, Chengdu 611730, China)

[Abstract] This study aimed to elucidate the therapeutic effects and molecular mechanisms of *Periplaneta americana* extract (PAE) on ground-glass nodule (GGN)-type early-stage lung adenocarcinoma (LUAD) using patient-derived organoid (PDO) models. GGN-type patient-derived early-stage LUAD organoid (GGN-PDO) were successfully established. At the level of drug quality control and component analysis, the content of free amino acids and peptides in PAE were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC), and the main components were further analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). Analysis of variance was used to evaluate the similarity between drugs of the same batch (Pearson correlation coefficient 0.87-0.99) and ensure quality control. At the histopathological level, hematoxylin-eosin (HE) staining and immunohistochemical (IHC) analysis of key molecular markers, including cytokeratin 7 (CK7), thyroid transcription factor-1 (TTF-1), and Ki-67, confirmed that the organoids recapitulated the tumor characteristics of parental tissues. Pharmacodynamic evaluation demonstrated that PAE significantly inhibited the proliferation and viability of GGN-PDOs in a dose-dependent manner, while immunofluorescence (IF) staining showed a marked reduction in the proliferation marker Ki-67. Flow cytometry further confirmed that PAE induced apoptosis in GGN-PDO, and Western blot analysis demonstrated that PAE downregulated the anti-apoptotic protein Bcl-2 and upregulated the pro-apoptotic protein Bax, thereby activating the apoptotic pathway. Notably, for the first time, the pro-apoptotic mechanism of PAE was shown to involve inhibition of the Janus kinase 1 (JAK1)/phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT) signaling pathway, as evidenced by markedly decreased protein levels of JAK1, PI3K, p-PI3K, AKT, and p-AKT following PAE treatment. In summary, this study is the first to use a clinically relevant GGN-PDO models to demonstrate that PAE induces apoptosis in early-stage LUAD via JAK1/PI3K/AKT pathway inhibition, providing a solid theoretical and experimental basis for developing innovative pharmacotherapies and non-surgical interventions against GGNs.

[Key words] *Periplaneta americana* extract; JAK1/PI3K/AKT signaling pathway; ground-glass nodule; early-stage lung adenocarcinoma; patient-derived organoid; apoptosis

DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20250915.701

国际癌症研究机构(IARC)数据显示,肺癌是全球发病率和病死率最高的恶性肿瘤^[1]。随着低剂量螺旋CT(LDCT)筛查的普及,越来越多的早期肺癌以肺结节形式被检出,其中磨玻璃结节(GGN)检出率显著上升^[2-3]。研究表明,超过60%的GGN具有恶性潜能,持续存在的GGN已被证实为早期肺腺癌或癌前病变的主要影像学表现,常提示存在潜在的恶性进展风险^[4-5]。然而,目前GGN的临床管理以随访观察和手术切除为主,存在两大核心问题:随访期间缺乏有效干预手段遏制结节进展,而早期手术虽可根治却可能导致肺功能不可逆损伤,加剧患者身心负担^[6]。因此,探索非侵入性治疗策略以平衡“过度治疗”与“延误治疗”风险,成为GGN相关研究的关键方向。

中医药在肿瘤治疗方面具有显著疗效和独特优势,其中美洲大蠊(PA)的抗肿瘤效应备受关注。

PA属蜚蠊目蜚蠊科大蠊属昆虫,在中国药用历史悠久,其药用价值最早见于《神农本草经》“主血瘀癥坚寒热,破积聚,喉咽闭,内寒无子”。大量研究表明,PA针对多种癌症(如肺癌、前列腺癌、卵巢癌、肝癌等)确有良效^[7-12]。有研究证实美洲大蠊提取物(PAE)可通过促进肺腺癌细胞、卵巢癌细胞凋亡并靶向调控磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(AKT)信号通路发挥抗肿瘤作用^[7,10,13],该通路也作为连接肺癌进展与细胞凋亡调控的关键枢纽,在肿瘤发生发展中具有重要价值^[14-17]。但传统研究多困囿于二维细胞、动物等模型,难以真实反映GGN型早期肺腺癌的异质性和遗传特征等问题,严重制约了中医药作用机制的系统解析。

患者源性类器官(PDO)是利用患者肿瘤特异性干细胞在体外培养形成的三维组织类似物,能够高度保留亲本肿瘤的组织学特征、细胞多样性、基因

表达和突变谱。其标本来源丰富,构建周期短,成功率高,遗传保真度高,能够模拟患者的组织细胞结构和生物学特征,避免了传统二维细胞系难以模拟原发肿瘤异质性和人源肿瘤异种移植模型建模耗时长、费用昂贵、成功率低、存在种属差异等缺陷,被认为是体外个性化药物筛选的最优选择^[18-21]。故本研究旨在构建 GGN 型患者源性早期肺腺癌类器官(GGN-PDO)模型,并探讨 PAE 对 GGN-PDO 凋亡的干预效应及对 Janus 激酶 1(JAK1)/PI3K/AKT 信号通路的影响,为美洲大蠊药用价值的进一步开发应用提供实验依据。

1 材料

1.1 GGN 型早期肺腺癌组织样本获取

本研究中所使用的 GGN 型早期肺腺癌组织样本均来源于四川省肿瘤医院,收集时间为 2022 年 6 月—2024 年 2 月。患者纳入标准如下:①胸部 CT 影像学检查提示 GGN,且结节直径 ≥ 8 mm;②年龄 ≥ 18 岁,性别不限;③行楔形切除或肺段切除术;④经病理证实为早期肺腺癌(肿瘤最大径 ≤ 2 cm,无区域淋巴结转移及无远处转移);⑤自愿参与本研究并签署知情同意书;⑥无临床诊断的其他恶性肿瘤,无不稳定的合并症或未控制的感染病灶。本研究已通过四川省肿瘤医院及成都中医药大学附属医院伦理委员会审查批准,样本的获取过程严格遵循伦理委员会的指导原则(伦理编号 SCCHEC-02-2022-109、2022KL-051),并获得了患者的知情同意。

1.2 药物

PAE(总固体质量分数 9.2%,其中肽类纯度 22.6%,批号 2024042601)由药用美洲大蠊四川省重点实验室提供。取美洲大蠊药材适量,加入乙醇回流提取 3 次,减压回收乙醇并浓缩至无醇味,加水至生药质量浓度 $1.0\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,离心,取上清液灌装成每支 10 mL,115℃ 灭菌 30 min,即得。利用高效液相色谱(HPLC)对 PAE 游离氨基酸与肽类含量进行测定,进一步采用液相色谱-质谱联用对 PAE 主要成分进行检测,并应用方差分析评估同一批次药品间的相似性,同时进行质量控制。

1.3 试剂

胶原酶 I、胶原酶 IV、TrypLE 消化液、F12 培养基(美国 ThermoFisher Scientific 公司,货号分别为 17100017、17104019、12605028、12634028);红细胞裂解液(上海西格玛奥德里奇贸易有限公司,货号

11814389001);基质胶、肺腺癌类器官培养基(厦门模基生物科技有限公司,货号分别为 082721、MA-0807T002LP);cell counting kit-8(CCK-8)试剂盒、抗荧光淬灭封片剂(美国 MedChemExpress 公司,货号分别为 HY-K0301、HY-K1042);4%多聚甲醛固定液(上海碧云天生物技术有限公司,货号 P0099);苏木素-伊红(HE)染液(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号 G1005);通用二步法检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,货号 PV-9000);DAPI 染液(上海西格玛奥德里奇贸易有限公司,货号 D9542);RIPA 裂解液(德国默克集团,货号 20-188);BCA 蛋白定量试剂盒(北京兰杰柯科技有限公司,货号 BL521A);细胞角蛋白 7(CK7,上海亲合力生物医药科技股份有限公司,货号 DF7027);甲状腺转录因子-1(TTF-1)、增殖细胞核抗原(Ki-67)(上海圣克鲁斯生物技术有限公司,货号分别为 sc-53136、sc-23900);JAK1(武汉爱博泰克生物技术有限公司,货号 A18323);PI3K、p-AKT(武汉三鹰生物技术有限公司,货号分别为 27921-1-AP、28739);p-PI3K(北京博奥森生物技术有限公司,货号 bs-5570R);AKT、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、 β -actin(上海碧云天生物技术有限公司,货号分别为 AA326、AB112、AB026、AF0003);HRP 标记山羊抗小鼠二抗、HRP 标记山羊抗兔二抗、山羊抗小鼠 IgG 交叉吸附二抗(美国 ThermoFisher Scientific 公司,货号分别为 31430、31460、A-11001);Annexin V-APC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司,货号 KGA1030)。

1.4 仪器

CKX53 型倒置相差显微镜(日本奥林巴斯株式会社)、Sorvall X4R Pro 型高速台式离心机(美国 ThermoFisher Scientific 公司)、FV4000 型激光共聚焦显微镜(日本奥林巴斯株式会社)、MCV-131BNS 型超净工作台(日本 SANYO 株式会社)、51036538 型二氧化碳培养箱(美国 ThermoFisher Scientific 公司)、HistoStar 型石蜡包埋机(美国 ThermoFisher Scientific 公司)、HN340E 型石蜡切片机(美国 ThermoFisher Scientific 公司)、Varioskan ALF 酶标仪(美国 ThermoFisher Scientific 公司)、HT-ZY04 型电泳仪(北京鸿涛基业科技发展有限公司)、HT-ZY04 型转膜槽(北京鸿涛基业科技发展有限公司)、

HTS-W330 型脱色摇床(美国 SciloEGX 公司)、GenoSens 2000 型化学发光成像仪(上海勤翔科学仪器有限公司)、SCI120-S 型高通量多功能金属浴(美国 SciloEGX 公司)、CytoFLEX S 型流式分析仪(美国 Beckman 公司)。

2 方法

2.1 GGN 型早期肺腺癌组织的消化及 GGN-PDO 培养

将手术获取的新鲜 GGN 型早期肺腺癌组织及癌旁正常组织样本,置于 10 cm 细胞培养皿中,用 20~30 mL PBS 液反复冲洗 3 遍,剔除包膜及坏死组织。在新的培养皿中将组织快速剪成直径为 1~2 mm³ 的小块,并转移至 50 mL 离心管中。视组织块大小加入 5~6 倍体积的胶原酶 I 和胶原酶 IV 混合液。37 ℃ 恒温摇床中振荡消化 60 min,每 10 min 取出吹打。消化完成后使用 100 μm 细胞滤膜过滤 2 次,去除未消化的组织,获得无明显细胞团块的单细胞悬液。400×g 离心 5~6 min,弃上清液收获细胞沉淀。加入 3 mL 红细胞裂解液,于冰上裂解红细胞处理,400×g 离心 5~6 min,弃上清液。对最终得到的细胞沉淀再次使用 5 mL 培养基重悬,取出 10 μL 细胞悬液计数。用冰上解冻好的基质胶重悬细胞沉淀,按每孔约 30 μL、10 000 个细胞种入 48 孔板中,37 ℃ 培养箱中放置 15~20 min。待基质胶完全凝固,加入肺腺癌类器官培养基。每日镜下观察,3~5 d 换 1 次培养基。定期按照 1:3~1:4 的比例传代。

2.2 分组及干预

2.2.1 PAE 最佳干预浓度筛选 消化、传代后的类器官在 48 孔板中培养 10~15 d 后进行铺板。将 48 孔板中原有培养基弃除后,每孔加入 1.5~2 mL TrypLE 后搅拌吹打,吸出收集到 15 mL 离心管中,放入 37 ℃ 水浴锅 15 min,每 5 min 适度吹打,并于显微镜下观察消化是否完全。待消化完全后,400×g 离心 5 min,弃上清液。用 1 mL TrypLE 重悬混匀离心管底部细胞后,取 10 μL 显微镜下计数,按 96 孔板每孔 3 500 个细胞的标准,分装出所需细胞,并按每孔 5 μL 的量提前在碎冰上化冻基质胶。400×g 离心 5 min 后,用基质胶重悬分装好的细胞,种至 96 孔板,在 37 ℃ 培养箱中放置 15~20 min。待基质胶完全凝固,加入肺腺癌类器官培养基。培养 8~12 d 后,配制梯度浓度的含药培养基(0、5、

10、20、40、80 mg·mL⁻¹),弃原培养基后加入配制好的含药培养基,于 37 ℃ 培养箱中干预,并于加药后 72 h 进行 CCK-8 实验^[22-23]。弃掉原有含药培养基后,每孔加入无菌 PBS 清洗 1~2 次。使用 F12 培养基将 CCK-8 保存液稀释 10 倍,配制 CCK-8 工作液。按每孔 70 μL 加入 96 孔板中,于 37 ℃ 培养箱中孵育 3 h 后,使用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度,计算类器官存活率,筛选最佳干预浓度。类器官存活率=(药物处理组样品吸光度-空白孔吸光度)/(空白组吸光度-空白孔吸光度)。

2.2.2 药物干预 取 48 孔板中培养成熟的 GGN-PDO,将其分为模型(model)组、美洲大蠊低剂量(MZDL-L)组、美洲大蠊高剂量(MZDL-H)组,弃原培养基。MZDL-L 组、MZDL-H 组分别加入含 PAE 10、20 mg·mL⁻¹ 的肺腺癌类器官培养基 200 μL,model 组给予等体积溶剂,于 37 ℃ 培养箱中孵育 72 h 用于进行后续实验。

2.3 HE 染色观察各组类器官及亲本肿瘤组织病理形态学特征

将类器官取出放入 EP 管中,加入 1 mL 的 4% PFA 溶液,置于 4 ℃ 冰箱,固定 24 h(肿瘤组织固定 48 h)。将固定好的类器官(组织)依次进行脱水、透明、包埋、切片,使用苏木素染核 1 min,冲洗去除多余染料。用 1% 苏木素分化液浸泡切片 20 s,水洗,并用苏木素返蓝液浸泡,去除浮色使细胞核呈现清晰的蓝色。最后,将切片置于伊红溶液中上下提染 1 min。乙醇梯度脱水,二甲苯浸泡,封片镜检。

2.4 免疫组化(IHC)染色评估类器官与原始亲本肿瘤组织的遗传稳定性及 PAE 干预前后细胞增殖水平

摊片完成后的切片置于环保脱蜡液中脱蜡。经过梯度乙醇水化后,配制抗原修复液热修复。后用 0.3% Triton X-100 溶液打孔,并加入过氧化氢灭活内源性过氧化氢酶。滴加 2% 的山羊血清进行封闭。加入预先以 2% 山羊血清配制的一抗溶液(CK7、TTF-1、Ki-67)于 4 ℃ 过夜。次日,清洗一抗,并加入相应的反应增强液,静置 20 min。PBS 清洗 3 次后孵育二抗 60 min,DAB 显色至样本呈现棕色时终止,苏木素染核后水洗、风干,封片镜检。

2.5 免疫荧光(IF)染色检测 PAE 对 CK7、TTF-1 及 Ki-67 等标志物的影响

将培养成熟的类器官经 4% 多聚甲醛固定 24 h

后,进行石蜡包埋并制备 5 μm 厚度切片。切片置于环保脱蜡液中脱蜡后,随后乙醇梯度复水,超纯水浸泡 5 min。采用柠檬酸盐缓冲液进行抗原修复。经 0.3% Triton X-100 溶液室温处理 20 min 后,加入 3% 牛血清白蛋白(BSA)封闭液室温孵育 60 min 以阻断非特异性结合。移除封闭液后,分别滴加稀释于 2% BSA 的一抗工作液,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日,PBS 充分洗涤切片,加入对应种属的荧光标记二抗,避光室温孵育 60 min。PBS 洗涤后,使用 DAPI 染液(1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)复染细胞核,PBS 冲洗 3 次以去除多余染料。切片经抗荧光淬灭封片剂封固后,于激光共聚焦荧光显微镜下观察并采集图像。分别通过 488、594 nm 激发波长检测,DAPI 用于标记细胞核。

2.6 流式细胞术检测 PAE 对 GGN-PDO 细胞凋亡的影响

收集处理后的 GGN-PDO,消化解离成单细胞后,将细胞悬液样本 250 $\times g$ 离心 5 min,吸弃上清液,用 PBS 洗涤 2 次,250 $\times g$ 离心 5 min,吸弃上清液,获得细胞沉淀。用 500 μL binding buffer 重悬细胞后,加入 5 μL Annexin-V 轻轻吹匀,再加入 5 μL 的 PI 混匀;室温避光孵育 10 min,上机检测分析,用软件 CytExpert 分析流式数据。

2.7 Western blot 检测 PAE 干预 GGN-PDO 前后 JAK1、PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT 蛋白及凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 表达水平的变化

收集处理后的类器官样本,加入预冷的 RIPA 裂解液(含蛋白酶/磷酸酶抑制剂)冰上裂解 30 min,4 $^{\circ}\text{C}$,12 000 $\times g$ 离心 15 min,收集上清液。采用 BCA 法测定蛋白浓度,调整等量蛋白与 5 $\times$ SDS 上样缓冲液混合,高温金属浴变性 5 min。采用 8%~12% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,随后湿转法转移至 PVDF 膜。5%脱脂牛奶室温封闭 1 h 后,分别加入一抗(JAK1、PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、Bcl-2、Bax 及内参 β -actin),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。TBST 洗涤 3 次每次 10 min,加入 HRP 标记二抗室温孵育 1 h,再次洗涤。ECL 化学发光试剂显影,凝胶成像系统采集信号。ImageJ 软件分析条带灰度值,以目标蛋白与内参比值标准化,计算相对表达量。

2.8 统计分析

采用 SPSS 26.0 软件对各实验结果进行统计分析,正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)描述,比较采用方差分析;计数资料以频数表示,比较

采用卡方检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 PAE 的质量控制与成分鉴定

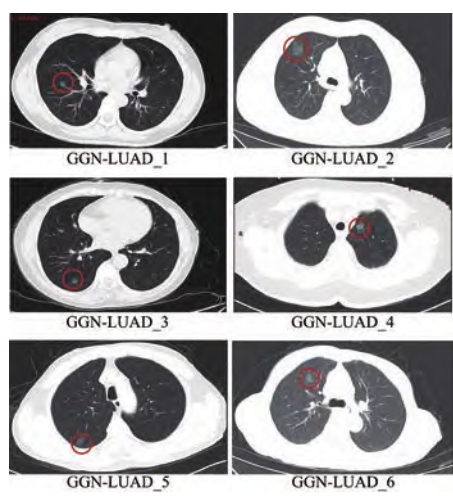
采用 HPLC 对批号 2024042601 的 PAE 样品进行检测,结果显示其总固体质量分数为 9.2%,其中肽类纯度为 22.6%。为进一步解析其化学组成,应用 LC-MS/MS 技术对样品进行分离与检测,共鉴定出 4 680 种物质。这些成分主要归属于苯甲酸及其衍生物、碳水化合物及其偶联物、羧基化合物、脂肪酸及其酯类、嘧啶及其衍生物、倍半萜类、氨基酸/肽及其类似物等类别。代表性化合物包括 4-氧代己酸、蛋氨酸、油酰胺、四氢吡咯、4-吡哆酸、L-组氨酸、3,4-二羟基苯甲酸乙酯、L-精氨酸、羟丙酰肉碱、L-脯氨酸、N-乙酰多巴胺、蛋氨酸亚砷、大豆昔元及 D-赤藓糖等。为评价同一批次内 PAE 样品的成分相似性并实现质量控制,基于检测到的代谢物相对丰度计算样本两两之间的皮尔逊相关系数。分析结果显示,相关系数范围 0.87~0.99,表明该批次 PAE 在成分构成上具有高度一致性,相关图表见中国知网本文增强出版附加材料。

3.2 GGN-PDO 模型构建

本研究从接受根治性手术的肺癌患者组织样本中,筛选出符合纳入标准的 10 例 GGN 型早期肺癌组织样本,相关信息见图 1、表 1 及中国知网本文增强出版附加材料。通过对类器官培养体系的筛选与优化,成功构建了 6 例 GGN-PDO 模型,构建成功率为 60%,可满足药物测试的要求,传代后用于后续实验。倒置相差显微镜观察发现,各例类器官在培养初期,3 d 后即可观察到明显的 3D 细胞球形成。随着培养时间的延长,在 5~7 d 类器官体积显著增大。在 9~11 d,形成成熟的 PDOs, PDOs 呈现稳定的增殖能力。传代周期为 9~12 d,连续传代超过 5 代仍保持>90%活性,见图 2。

3.3 GGN-PDO 模型的组织学鉴定及验证

为检验 GGN-PDO 模型是否保留了相应患者病灶组织样本的组织形态学特征,对 GGN-PDO 与其来源亲本肿瘤组织进行 HE 和 IHC 染色分析。HE 染色结果显示,GGN-PDO 中细胞自我组织的排列形态与亲本肺癌组织高度相似,两者均显示出肿瘤细胞的异质性,且肿瘤细胞排列不规则,存在多核现象,细胞核体积较大且染色较深,这表明类器官在组织病理学层面较好地保留了原始肿瘤的形态特征。



GGN-LUAD. 磨玻璃结节型肺腺癌(图 4 同);红色圆环指示对应患者 CT 影像中 GGN-LUAD 病灶的具体位置和形态范围。

图 1 6 例 GGN 型早期肺腺癌患者影像学表现

Fig. 1 Imaging manifestations of 6 patients with GGN-type early-stage lung adenocarcinoma

表 1 患者信息

Table 1 Patient informations

分类		样本量/例(%)
性别	男	3(50)
	女	3(50)
年龄/岁	≤65	1(16.7)
	65~80	5(83.3)
	≥80	0
TNM 分期	I	6(100)
	II	0
	III	0
肿瘤大小/cm	0.9~1.5	4(66.7)
	1.6~3	2(33.3)

IHC 结果显示,CK7 在肺腺癌组织和类器官的细胞质中都呈现出强阳性表达,证实了类器官的上皮分化特性。Ki-67 在 GGN 肺腺癌的组织中和类器官中 Ki-67 部分呈阳性,其局灶性低表达与 GGN 型肺腺

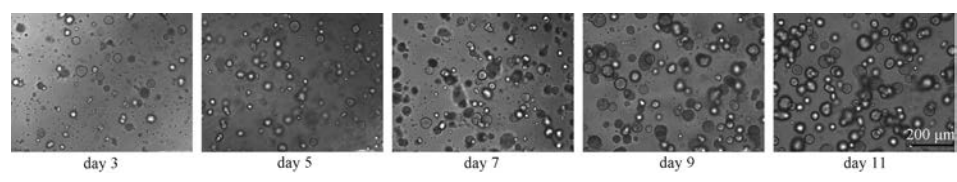


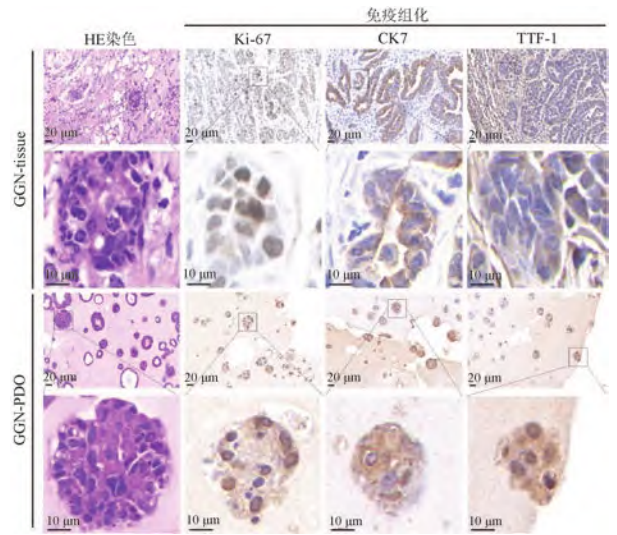
图 2 GGN-PDO 不同时间生长情况明场图

Fig. 2 Bright-field images showing the growth of GGN-PDO at different time points

癌早期低增殖活性特征相符。此外,在亲本肺癌组织中,TTF-1 蛋白几乎在所有细胞中均有广泛表达;而在类器官中,超过半数的细胞对 TTF-1 呈阳性反应。这些结果表明本研究构建的类器官模型在维持肿瘤组织特性方面的可靠性,见图 3。

3.4 PAE 对 GGN-PDO 增殖活性影响

使用 0、5、10、20、40、80 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 PAE 对处于对数生长期的 6 例 GGN-PDO 进行干预处理,利用 CCK-8 法检测其对 GGN-PDO 增殖活性的影响。6 例 GGN-PDO 的 IC_{50} (72 h) 分别为 20.27、16.22、18.81、21.55、22.02、24.11 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,因此将 GGN-PDO 对 PAE 的 IC_{50} 定义为 20 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,其中 10、20 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 PAE 可显著抑制 GGN-PDO 增殖活性,且对 GGN-PDO 增殖的抑制作用低于 IC_{50} ,故将 10、20 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 分别作为 PAE 低、高剂量用于后续相关实验研究。结果显示,与 model 组相比,经 PAE 处理后的 MZDL-L 组、MZDL-H 组均呈现出碎裂逐渐



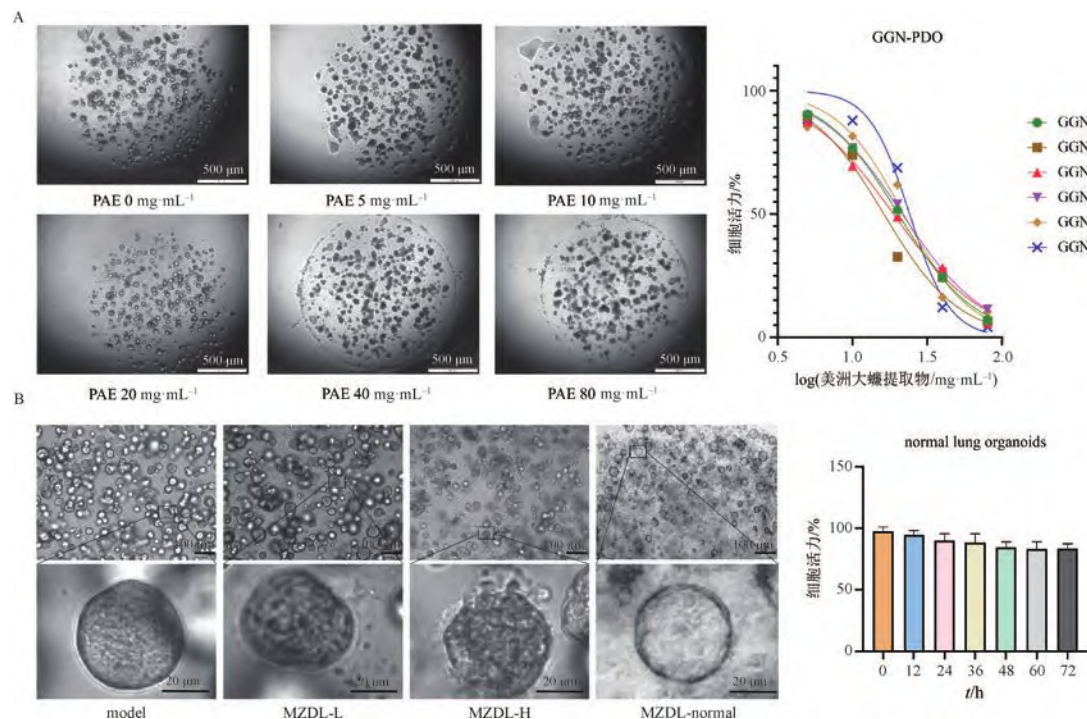
GGN-tissue. 磨玻璃结节型早期肺腺癌组织。GGN-PDO. 磨玻璃结节型患者源性早期肺腺癌类器官模型(图 4 同)。

图 3 GGN-PDO 与来源肿瘤组织的病理结构

Fig. 3 Pathological structures of GGN-PDO and their corresponding tumor tissue

增多,细胞存活率降低的现象,且具有明显的浓度依赖性效应。此外,为评估 PAE 对正常组织的安全性及对肿瘤细胞的选择性作用,研究采用 20

$\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ PAE 干预正常肺类器官,结果显示 PAE 对正常肺类器官的增殖及形态学均无显著影响,见图 4。



A. 不同浓度 PAE 对 GGN-PDO 生长的影响;B. 不同浓度 PAE 干预对 GGN-PDO 及正常肺类器官生长的对比。PAE. 美洲大蠊提取物。model. 模型组;MZDL-L. 美洲大蠊低剂量组;MZDL-H. 美洲大蠊高剂量组;MZDL-normal. 正常肺类器官组(图 5~7,表 2~4 同)。

图 4 美洲大蠊提取物对 GGN-PDO 增殖活性的影响及对正常肺类器官的安全性($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 4 Effect of *Periplaneta americana* extract on the proliferative activity of GGN-PDO and its safety in normal lung organoids($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.5 PAE 干预对肿瘤组织形态及增殖活性的干预作用

HE 染色结果显示,相较于 model 组的肿瘤细胞排列紧密,核大质少及核分裂等典型恶性特征,低、高剂量 PAE 干预后,细胞排列逐渐稀疏且间质变宽,核固缩现象显著增加,部分区域可见坏死性改变。IF 染色结果显示,CK7 在各组中均呈阳性表达,表明 PAE 干预未影响类器官的肺腺癌谱系特性;TTF-1 的阳性率随 PAE 剂量升高而有所下降,提示药物干预可能诱导了肿瘤细胞分化状态的转变;Ki-67 阳性细胞占比在 MZDL-L 组、MZDL-H 组中显著降低,表明 PAE 可通过抑制肿瘤细胞周期进程有效降低其增殖活性,见图 5。

3.6 PAE 对 GGN-PDO 细胞凋亡的影响

在不同浓度 PAE 干预 GGN-PDO 72 h 后,使用流式细胞术分析 GGN-PDO 细胞凋亡率。结果显

示,与 model 组相比,不同浓度 PAE 可促进 GGN-PDO 细胞凋亡,MZDL-L、MZDL-H 组凋亡率均升高,且差异具有统计学意义,见表 2 及中国知网本文增强出版附加材料。

3.7 PAE 干预对 GGN-PDO 凋亡相关蛋白表达的影响

与 model 组相比,MZDL-L 组与 MZDL-H 组的 Bax 蛋白表达水平显著升高,其中 MZDL-H 组表达升高最为明显;相反,Bcl-2 蛋白表达水平随 PAE 剂量增加而显著降低,MZDL-H 组表达量最低,见图 6、表 3。上述结果提示,PAE 可能通过上调促凋亡蛋白 Bax 并下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,诱导 GGN-PDO 细胞凋亡。

3.8 PAE 干预对 GGN-PDO JAK1/PI3K/AKT 信号通路相关蛋白表达的影响

与 model 组相比,MZDL-L 组和 MZDL-H 组

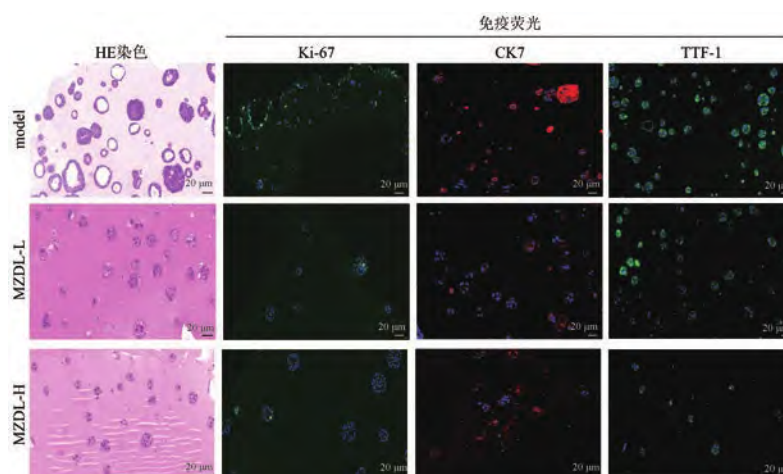


图5 美洲大蠊提取物干预前后 GGN-PDO 的 HE 和免疫荧光染色

Fig. 5 HE and immunofluorescence staining of GGN-PDO before and after *Periplaneta americana* extract intervention表2 美洲大蠊提取物对 GGN-PDO 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Table 2 Effect of *Periplaneta americana* extract on the apoptosis in GGN-PDO cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	细胞凋亡率/%
model	—	31.87 ± 0.76
MZDL-L	10	$45.99 \pm 1.41^{(1)}$
MZDL-H	20	$70.93 \pm 1.87^{(1)}$

注:与 model 相比¹⁾ $P < 0.05$ (表 3, 4 同)。

图6 美洲大蠊提取物对 GGN-PDO 中细胞凋亡相关蛋白表达的影响

Fig. 6 Effect of *Periplaneta americana* extract on the expression of apoptosis-related proteins in GGN-PDO表3 美洲大蠊提取物对 GGN-PDO 中 Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Table 3 Effect of *Periplaneta americana* extract on the expression of Bax and Bcl-2 proteins in GGN-PDO ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	Bax/ β -actin	Bcl-2/ β -actin
model	—	2.01 ± 0.78	9.47 ± 0.78
MZDL-L	10	$3.01 \pm 1.12^{(1)}$	$4.89 \pm 1.78^{(1)}$
MZDL-H	20	$5.75 \pm 1.24^{(1)}$	$3.62 \pm 0.87^{(1)}$

JAK1、PI3K、AKT 及 p-PI3K、p-AKT 的蛋白水平均显著降低。结果表明, PAE 能够有效抑制 GGN-PDO 中 JAK1/PI3K/AKT 信号通路的磷酸化激活, 见图 7、表 4。

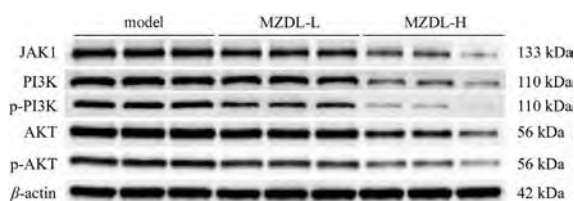


图7 美洲大蠊提取物对 GGN-PDO 中 JAK1/PI3K/AKT 信号通路相关蛋白表达的影响

Fig. 7 Effect of *Periplaneta americana* extract on the expression of JAK1/PI3K/AKT signaling pathway-related proteins in GGN-PDO

4 讨论

GGN 作为早期肺腺癌的重要影像学特征, 其个体化治疗策略及干预机制研究备受关注^[24]。近年来, 随着低剂量 CT 筛查的普及, GGN 检出率显著增加。但从过高的检出率, 到无干预手段的盲目随访带来的经济与身心压力, 再到早期手术切除造成的器官功能丢失, 均表明现有管理方案对患者获益与危害的考量是欠平衡的^[6,25], 缺乏有效早期诊疗手段的现状为中医药介入带来了窗口。

中医学并无肺磨玻璃结节这一病名, 但根据本病患者临床症状、影像学表现和病因病机可将其归

表 4 美洲大蠊提取物对 GGN-PDO 中 JAK1、PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)Table 4 Effect of *Periplaneta americana* extract on the protein expression of JAK1, PI3K, p-PI3K, AKT and p-AKT in GGN-PDO ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	JAK1/ β -actin	PI3K/ β -actin	p-PI3K/ β -actin	AKT/ β -actin	p-AKT/ β -actin
model	—	10.74 $\pm$ 1.78	11.74 $\pm$ 0.56	8.89 $\pm$ 1.00	13.56 $\pm$ 1.10	7.98 $\pm$ 0.58
MZDL-L	10	5.98 $\pm$ 1.23 ¹⁾	5.98 $\pm$ 0.78 ¹⁾	4.99 $\pm$ 0.56 ¹⁾	9.85 $\pm$ 0.89 ¹⁾	6.85 $\pm$ 0.32 ¹⁾
MZDL-H	20	4.62 $\pm$ 0.87 ¹⁾	4.62 $\pm$ 0.65 ¹⁾	3.62 $\pm$ 0.78 ¹⁾	6.78 $\pm$ 1.01 ¹⁾	5.89 $\pm$ 0.58 ¹⁾

为“肺积”“积聚”等病的范畴。中医认为,GGN“结瘤转化”的核心病机可归属于“郁-痰-瘀-结”范畴,其发生发展责之于玄府郁闭致气液失通,痰浊聚于肺部,日久化为瘀血,致痰瘀互结为患^[26-29]。PA作为虫类药的典型代表,至今被医家学者广泛用于治疗癥瘕积聚的研究。现代药理学研究进一步揭示,PAE可通过多靶点、多通路发挥抗肿瘤作用^[8,10,30-31]。其可抑制包括肺癌在内诸多癌细胞增殖及迁移、调控细胞周期诱导细胞凋亡、逆转多药耐药、调节肿瘤微环境。其作用机制涉及PI3K/AKT、NF- κ B及黏附分子调控等,对肝癌、胃癌、肺癌等具广谱抗肿瘤活性。PI3K/AKT信号通路作为非小细胞肺癌增殖与存活的核心调控轴,其异常激活与肿瘤细胞的增殖与侵袭密切相关^[32-33]。前沿研究发现,PI3K/AKT信号通路作为核心枢纽,可通过调控促凋亡因子Bax与抗凋亡因子Bcl-2的表达平衡决定细胞凋亡方向^[34]。新近研究报道JAK1可与PI3K/AKT通路互作^[35],进而促进肺腺癌发生发展。综上,推测PAE可能通过JAK1/PI3K/AKT诱导GGN型早期肺腺癌细胞凋亡阻断“结-瘤转化”进程。

患者源性肿瘤类器官拥有类似真实肿瘤组织的复杂结构,且可以维持体内肿瘤的遗传多样性和表型异质性,同时高度保留了原发肿瘤的病理特征及药物敏感性,近年来逐渐成为探索肿瘤干预机制的重要工具。同时,基于患者源性肿瘤类器官可在体外大规模培养、冷冻保存、复苏传代、易于扩增等特性,不仅支持高通量药物敏感性检测,更可为肿瘤干预机制解析、个体化治疗方案制定及精准药物研发提供高效可靠的研究体系^[36]。因此,聚焦PAE阻延肺结节“结-瘤转化”的潜力及患者源性肿瘤类器官的诸多优势,本研究通过患者源性类器官模型探究PAE对GGN型早期肺腺癌的干预效应及对JAK1/PI3K/AKT通路的影响。

本研究成功建立6例GGN-PDO模型,其形态学特征及组织学特性与亲本肿瘤组织高度一致,且关键标志物(CK7、TTF-1、Ki-67)的表达模式与原发肿瘤高度吻合。这一结果验证了患者源性类器官在模拟肿瘤异质性及分子特征方面的优势。CCK-8结果表明,随着PAE浓度的升高,GGN-PDO的细胞活力呈剂量依赖性降低,结合HE染色结果,药物处理后类器官呈现腺体结构破坏、核固缩及坏死性改变,说明PAE可以有效抑制GGN-PDO细胞的增殖。且Ki-67阳性率随药物浓度升高显著降低,表明PAE可有效抑制细胞增殖周期。细胞凋亡作为维持机体稳态的核心程序性死亡机制,在清除异常细胞和调控组织发育中发挥关键作用,流式细胞术结果显示PAE可有效促进GGN-PDO发生细胞凋亡,提示其可能通过诱导细胞凋亡或直接杀伤肿瘤细胞发挥抗肿瘤作用。此外,PAE表现出对肿瘤细胞选择性抑制作用,其干预正常肺类器官后未出现明显损伤。本研究也观察到PAE对6例GGN-PDO增殖抑制的IC₅₀个体间变异较小,分布相对集中,这种药效反应的一致性一定程度上表明严格筛选的早期,GGN型肺腺癌这一特定群体临床、分子病理特征的相对均一性及标准化模型构建的可行性,但仍需认识到肿瘤异质性的普遍存在,未来研究亟待纳入更广泛的患者样本,深入解析影响PAE药效敏感性的关键因素。

癌细胞可通过多种机制逃避凋亡,打破正常的细胞命运调控平衡,促进肿瘤的发生与发展。例如,癌细胞可以通过增加抗凋亡调节因子(Bcl-2、Bcl-xL等)或存活信号的表达,或通过下调促凋亡因子(Bax等),或通过阻断外源性配体诱导的死亡途径阻止正常凋亡^[37-38]。本研究Western blot结果显示,PAE可通过上调促凋亡蛋白Bax、抑制抗凋亡蛋白Bcl-2的表达,重塑凋亡调控平衡,从而诱导GGN型早期肺腺癌细胞凋亡。随后,进一步机制研究显

示,PAE 显著下调 JAK1、PI3K/p-PI3K、AKT/p-AKT 的蛋白表达水平。这些结果表明,PAE 可能通过特异性抑制 JAK1 激活,阻止 JAK1/PI3K/AKT 通路的活化从而增强细胞凋亡信号,诱导细胞凋亡发生,阻延肺腺癌由早期癌前病变进一步向恶性转化的过程。

尽管本研究揭示了 PAE 在 GGN-PDO 模型中对 JAK1/PI3K/AKT 通路的抑制作用,但仍存在一定的局限。首先,未设置已知抗肿瘤活性的阳性药物(如靶向 EGFR 的吉非替尼、靶向 PI3K 的 LY294002 或标准化疗药物紫杉醇等)作为对照,限制了 PAE 效应强度与临床现有或临床前标准治疗手段的直接比较评估。但由于模型构建周期及样本数量限制,本研究通过与 model 组进行严格对照,聚焦于 PAE 自身的作用机制探索,优先完成了 PAE 的剂量依赖性效应和通路调控的解析,未来研究将致力于系统性引入阳性对照药物,在相同模型体系下进行平行药效对比和协同/拮抗作用研究。此外,细胞程序性死亡是一个复杂的网络,本研究虽证实 PAE 激活经典线粒体凋亡途径,但尚未明确其是否同时触发其他死亡受体通路,甚至诱发了铁死亡等其他形式的程序性死亡,也未精准识别 PAE 中主导作用的活性单体及其与信号通路的直接互作模式。未来可进一步联合多组学分析与生物信息学手段确定其关键药效物质基础,解析 PAE 的作用网络,并通过特异性抑制剂、siRNA 干扰等手段开展体内外实验验证 JAK1/PI3K/AKT 通路的核心作用,进而从多维视角评估 PA 在 GGN 管理中的潜在治疗价值和临床转化前景,为 GGN 型早期肺腺癌的非手术干预提供创新性解决方案。

[参考文献]

[1] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229.

[2] BHAMANI A, CREAMER A, VERGHESE P, et al. Low-dose CT for lung cancer screening in a high-risk population (SUMMIT): a prospective, longitudinal cohort study[J]. Lancet Oncol, 2025, 26(5): 609.

[3] 王帅博,毛友生. 肺磨玻璃结节筛查及随访研究进展[J]. 中华肿瘤杂志, 2022, 44(2): 7.

[4] 徐国厚,黄海峡,陈斌,等. 单体检中心 23695 例体检者首次胸部低剂量 CT 筛查结果及肺结节相关易感因素的研究[J]. 复旦学报(医学版), 2020, 47(5): 654.

[5] FAN L, WANG Y, ZHOU Y, et al. Lung cancer screening with low-dose CT: baseline screening results in shanghai[J]. Acad Radiol, 2019, 26(10): 1283.

[6] 叶欣,范卫君,王忠敏,等. 热消融治疗肺部亚实性结节专家共识(2021 年版)[J]. 中国肺癌杂志, 2021, 24(5): 305.

[7] 田露,刘衡,张成桂,等. 基于 PI3K/AKT/FoxO4 信号通路探究美洲大蠊提取物 C II-3 诱导卵巢癌 SKOV3 细胞衰老的作用机制[J]. 现代药物与临床, 2024, 39(9): 2204.

[8] 张俊秋,杜华钰,吴定宇,等. 美洲大蠊多肽 PAP-2 对 Balb/c 裸鼠肝癌原位移植瘤缺氧微环境的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39(13): 1928.

[9] 段赛竹,许凤,陈海燕,等. 美洲大蠊提取物对前列腺癌细胞的抑制作用及相关机制研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2024, 29(11): 1260.

[10] 倪连丽,闫爽,肖怀,等. 美洲大蠊提取物 YS-F 对人非小细胞肺癌细胞 A549 增殖及凋亡的影响[J]. 中国药房, 2020, 31(4): 401.

[11] 吴雅静,李正亮,苏庆道,等. 美洲大蠊提取物 C II-3 对肝癌 TAE 术后细胞黏附分子水平的影响及其对肝脏的保护作用[J]. 介入放射学杂志, 2024, 33(7): 753.

[12] 何思悦,张成桂,刘衡,等. 美洲大蠊提取物 C II-3 调控 SIRT1/mTOR 信号通路诱导白血病 K562 细胞衰老[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(11): 3039.

[13] MA H, LI X, CHE J, et al. The inhibitory effect of *Periplaneta americana* L. on hepatocellular carcinoma: explore the anti-hepatocellular carcinoma active site and its mechanism of action[J]. J Ethnopharmacol, 2022, 291: 114884.

[14] SHI L, ZHU W, HUANG Y, et al. Cancer-associated fibroblast-derived exosomal microRNA-20a suppresses the PTEN/PI3K-AKT pathway to promote the progression and chemoresistance of non-small cell lung cancer[J]. Clin Transl Med, 2022, 12(7): e989.

[15] YU J, ZHANG L, PENG J, et al. Dictamnine, a novel c-Met inhibitor, suppresses the proliferation of lung cancer cells by downregulating the PI3K/AKT/mTOR and MAPK signaling pathways[J]. Biochem Pharmacol, 2022, 195: 114864.

[16] GAO Y, YANG J, CAI Y, et al. IFN- γ -mediated inhibition of lung cancer correlates with PD-L1 expression and is regulated by PI3K-AKT signaling[J]. Int J Cancer, 2018, 143(4): 931.

[17] 曹雪婷,吴博雅,陈静. 刺五加苷 B 介导 PI3K/AKT/mTOR 通路诱导肺癌细胞凋亡和自噬[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(24): 6693.

[18] KIM M, MUN H, SUNG C O, et al. Patient-derived lung cancer organoids as *in vitro* cancer models for therapeutic screening[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 3991.

[19] SHI R, RADULOVICH N, NG C, et al. Organoid cultures as preclinical models of non-small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2020, 26(5): 1162.

[20] ZENG X, MA Q, LI X K, et al. Patient-derived organoids of lung cancer based on organoids-on-a-chip: enhancing clinical

- and translational applications[J]. *Front Bioeng Biotech*, 2023, 11: 1205157.
- [21] 周叶婷, 赵璐, 王毅. 中药药效物质及其靶标发现技术研究进展与展望: 更精准、更高效、更智能[J]. *中国中药杂志*, 2025, 50(13): 3657.
- [22] ZENG L, ZOU Q, HUANG P, et al. Inhibition of autophagy with chloroquine enhanced apoptosis induced by 5-aminolevulinic acid-photodynamic therapy in secondary hyperparathyroidism primary cells and organoids[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 142: 111994.
- [23] XIAO X, CHEN W, WEI Z W, et al. The anti-tumor effect of NAB-paclitaxel proven by patient-derived organoids [J]. *Oncotargets Ther*, 2020, 13: 6017.
- [24] 杨延涛, 黄云超, 赵光强, 等. 早期肺腺癌影像学特点与病理侵袭程度相关性的研究进展[J]. *中国胸心血管外科临床杂志*, 2023, 30(9): 1337.
- [25] WANG C, SHAO J, HE Y, et al. Data-driven risk stratification and precision management of pulmonary nodules detected on chest computed tomography [J]. *Nat Med*, 2024, 30(11): 3184.
- [26] 黄文博, 付西, 黄娅, 等. 基于“玄府气液”学说探析肺结节的治疗[J]. *中医杂志*, 2022, 63(12): 1189.
- [27] 姚倚琦, 尹瑞阳, 张艳娇, 等. 从“诸气膈郁, 皆属于肺”探讨全小林教授治疗肺结节的临床经验[J]. *时珍国医国药*, 2025, 36(6): 1154.
- [28] 雷茂, 何佳玮, 马琼, 等. 肺结节“结癌转化”时空辨治体系的构建与应用[J]. *时珍国医国药*, 2025, 36(15): 2916.
- [29] 李玥, 张馨月, 何姝霖, 等. 肺结节临床症状及中医证候分布特征[J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(17): 4782.
- [30] NI L, LU Q, TANG M, et al. *Periplaneta americana* extract ameliorates dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis via immunoregulatory and PI3K/AKT/NF- κ B signaling pathways [J]. *Inflammopharmacology*, 2022, 30(3): 907.
- [31] LI X, LIU Y, SONG H, et al. Antioxidant, antibacterial, and anti-inflammatory periplaneta americana remnant chitosan/polysaccharide composite film; *in vivo* wound healing application evaluation[J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 237: 124068.
- [32] WANG Y, WANG Y, LIU W, et al. TIM-4 orchestrates mitochondrial homeostasis to promote lung cancer progression via ANXA2/PI3K/AKT/OPA1 axis[J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(2): 141.
- [33] YU X, LI Y, JIANG G, et al. FGF21 promotes non-small cell lung cancer progression by SIRT1/PI3K/AKT signaling[J]. *Life Sci*, 2021, 269: 118875.
- [34] XIAO X, JIAN Y, JIANG Y, et al. Condensed tannins from *Salix babylonica* L. leaves induce apoptosis of human ovarian cancer cells through mitochondrial and PI3K/AKT/ERK signaling pathways[J]. *Int J Biol Macromol*, 2025, 309(Pt 1): 142635.
- [35] LI M, CHEN L, YU F, et al. CTDSPL2 promotes the progression of non-small lung cancer through PI3K/AKT signaling via JAK1[J]. *Cell Death Dis*, 2024, 10(1): 389.
- [36] 张玉新, 王琳璇, 张颖, 等. 类器官在肺癌领域研究进展及应用探讨[J]. *世界科学技术(中医药现代化)*, 2025, 27(4): 909.
- [37] PENG F, LIAO M, QIN R, et al. Regulated cell death (RCD) in cancer: key pathways and targeted therapies [J]. *Signal Transd Targeted Ther*, 2022, 7(1): 286.
- [38] YUAN J, OFENGEM D. A guide to cell death pathways[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2024, 25(5): 379.

[责任编辑 陈玲]