DOI:10.16016/j.1000-5404.202012232

川楝素通过下调 c-kit 表达抑制 GIST-T1 细胞增殖并促进其凋亡

胡笑宇[1,2],杨文生[2,3],康政宇[2,3],彭正伟[2,3],李 玲[1,2],刘 希[2],陈诣佳[2],张 林[1,2] 610031 成都,西南交通大学医学院[1];610083 成都,中国人民解放军西部战区总医院全军普外中心胃肠病区[2];646000 四川 泸州,西南医科大学临床医学院[3]

[摘要] **目的** 研究川楝素(toosendanin,TSN)对胃肠间质瘤细胞增殖及凋亡的影响,并对其相关机制进行初步探索。**方法** 不同浓度 TSN 体外干预 GIST-T1 细胞,采用 CCK-8 检测 TSN 对 GIST-T1 细胞增殖的影响;根据结果进一步选择实验浓度,分为 0、15、30 nmol/L TSN 组,50 nmol/L 伊马替尼(imatinib,IM)作为阳性对照;流式细胞仪及 Hoechst 33342/PI 荧光双染检测细胞凋亡及细胞周期;qRT-PCR 及 Western blot 检测 c-KIT/PI3K/AKT/mTOR mRNA 及相关蛋白表达。**结果** TSN 可抑制 GIST-T1 细胞增殖($P<0.01$),其 48 h IC_{50} 为 18.75 nmol/L,72 h IC_{50} 为 17.93 nmol/L。与对照组相比,15、30 nmol/L TSN 组,50 nmol/L IM 均可引起不同程度细胞凋亡($P<0.01$),但各药物组间凋亡率差异无统计学意义。30 nmol/L TSN 可使细胞周期发生 S 期阻滞($P<0.01$)。qRT-PCR 检测结果显示:15 nmol/L TSN 即可下调 GIST-T1 细胞 c-KIT、PI3K、AKT、mTOR mRNA 表达($P<0.05$,$P<0.01$)。Western blot 结果也证实:15 nmol/L TSN 同样抑制了 c-KIT、PI3K、AKT、mTOR 及其磷酸化蛋白的表达($P<0.05$,$P<0.01$)。**结论** TSN 通过下调 c-KIT 表达,抑制 GIST-T1 细胞增殖并促进凋亡,可能是通过 PI3K/AKT/mTOR 通路发挥作用。

[关键词] 胃肠间质瘤;川楝素;伊马替尼;细胞增殖;细胞凋亡
[中图法分类号] R285.5; R73-361; R730.262 [文献标志码] A

Toosendanin inhibits proliferation and promotes apoptosis of gastrointestinal stromal tumor-T1 cells by down-regulating c-kit expression

HU Xiaoyu[1,2], YANG Wensheng[2,3], KANG Zhengyu[2,3], PENG Zhengwei[2,3], LI Ling[1,2], LIU Xi[2], CHEN Yijia[2], ZHANG Lin[1,2] [1]School of Medicine, Southwest Jiaotong University, Chengdu, Sichuan Province, 610031; [2]Section of Gastrointestinal Diseases, Center for General Surgery, General Hospital of Western Theater Command, Chengdu, Sichuan Province, 610083; [3]School of Clinical Medicine, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan Province, 646000, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of toosendanin (TSN) on the proliferation and apoptosis of gastrointestinal stromal tumor (GIST) cells, and to explore the underlying mechanisms. **Methods** GIST-T1 cells were treated with TSN at different concentrations, and then CCK-8 assay was used to detect the effects of TSN on the proliferation of GIST-T1 cells. Subsequently, the experimental concentrations were further divided into 0, 15, 30 nmol/L TSN groups, with 50 nmol/L imatinib (IM) as the positive control. Flow cytometry and Hoechst 33342/PI fluorescence double staining were performed to detect cell apoptosis and cell cycle. Finally, the expression of c-KIT, PI3K, AKT and mTOR at mRNA and protein levels were determined by qRT-PCR and Western blotting. **Results** TSN inhibited the proliferation of GIST-T1 cells ($P<0.01$), and its IC_{50} was 18.75 nmol/L at 48 h and 17.93 nmol/L at 72 h. As compared with the control group, the 15 and 30 nmol/L TSN groups as well as IM group induced cell apoptosis ($P<0.01$), though the

[基金项目] 西部战区总医院(原成都军区总医院)创新型人才培养基金资助项目(417325E)
[通信作者] 张 林, E-mail: flysky8026@aliyun.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

apoptotic rate showed no significance among different drug groups; and 30 nmol/L TSN induced S-phase arrest ($P<0.01$). In addition, qRT-PCR results suggested that 15 nmol/L TSN down-regulated the mRNA expression of c-KIT, PI3K, AKT and mTOR ($P<0.05$, $P<0.01$), and Western blotting confirmed the inhibitory effect of 15 nmol/L TSN on the expression of these proteins and their phosphorylated proteins ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** TSN inhibits the proliferation of GIST-T1 cells and promotes apoptosis by down-regulating c-KIT expression, which may function through PI3K/AKT/mTOR pathway.

[**Key words**] gastrointestinal stromal tumor; toosendanin; imatinib; cell proliferation; apoptosis

Supported by the Project of Innovative Personnel Training Foundation of General Hospital of Western Theater Command (417325E). Corresponding author: ZHANG Lin, E-mail: flysky8026@aliyun.com

胃肠间质瘤(gastrointestinal stromal tumor, GIST)是胃肠道最常见的间叶源性肿瘤,年发病率为14.5‰,外科手术切除是治疗GIST的"金标准"。GIST起源于Cajal间质细胞或胃肠道间充质干细胞,其发生、发展与c-KIT和PDGFRA基因突变密切相关[1-3]。酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI)伊马替尼(imatinib,IM)作为GIST治疗的一线药物,可靶向结合c-KIT及血小板源性生长因子受体A(platelet-derived growth factor receptor A, PDGFRA),通过抑制酪氨酸激酶从而阻止其下游致癌基因启动,已被证实对GIST治疗有效。但半数以上患者2年内可观察到继发性伊马替尼耐药并伴随疾病进展[4-5]。因此,加大药物剂量或改用舒尼替尼等其他昂贵的二、三线TKI成为必然选择。然而,尽管对这些靶向药物有初步的反应,GIST耐药的发生仍不可避免[6]。

近年来,随着药物萃取工艺的发展以及中药药理研究的深入,寻求廉价易得、疗效好且不易耐药的中药抗癌制剂成为研究热点。研究表明从具抗肿瘤作用的各种天然产物中提取的化合物可以诱导多种肿瘤细胞凋亡[7-8]。

川楝素(toosendanin,TSN)是从川楝树皮、树根中提取的四环三萜类化合物,最早用于寄生虫病的治疗,现已被证明是一种选择性突触前阻滞剂和有效的抗肉毒毒素剂[9-10]。研究证实:TSN对白血病、胶质母细胞瘤、肝癌、胰腺癌、尤文氏肉瘤、骨肉瘤、大肠癌等多种人类癌细胞具有抑制增殖和诱导凋亡的作用,其潜在机制包括抑制CDC42/MEKK1/JNK、Akt/mTOR、AKT/GSK-3β/β-catenin信号通路等[11-18],表明TSN具有良好的抑制肿瘤细胞增殖及促进细胞凋亡的能力,是一个极具潜力的候选、天然、高效的抗癌药物。然而,经查阅相关文献,发现TSN对胃肠间质瘤细胞生存的影响尚未阐明。本研究以GIST-T1细胞系作为研究对象,旨在探讨TSN对胃肠间质瘤细胞生长、凋亡的影响,并对其机制进行初步探索。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人胃肠间质瘤细胞系GIST-T1(编号:337740)购于北京北纳创联生物技术研究院。用90% Mc Coy's 5a培养液+10%FBS的完全培养基置于37 ℃、5%CO_2的孵箱中培养。平均每2天换液,3~5 d传代1次。

1.2 实验用药

TSN(分子式$C_{30}H_{38}O_{11}$,纯度≥95%,中国食品药品检定研究院)用DMSO溶解至100 mmol/L,避光,-4 ℃保存。IM购自北京索莱宝公司,避光,-4 ℃保存。

1.3 细胞增殖抑制率测定

取对数生长期细胞按2 000/孔接种于96孔板,待细胞贴壁后,分别加入终浓度为0、15、17、20、22、25、30 nmol/L TSN[对照组(CON)加入等量DMSO],每组设3~6复孔,37 ℃、5%CO_2条件下继续培养48 h。各孔加入10 μL CCK-8试剂与90 μL新鲜培养基,避光孵育1 h。用酶标仪测定450 nm波长处的光密度值$D(450)$,并计算细胞增殖抑制率。用SPSS 20.0软件计算其半抑制浓度IC_{50}。用同样的方法检测72 h时细胞增殖抑制率,浓度设定为0、5、7、10、14、16、18、20 nmol/L。细胞增殖抑制率=(对照组-实验组)/(对照组-调零组)×100%。

1.4 Hoechst 33342/PI荧光双染检测细胞凋亡

Hoechst 33342/PI双染试剂盒购自索莱宝公司。将细胞接种于预置细胞爬片的24孔板上,待细胞贴壁后,分别加入终浓度为0、15、30 nmol/L TSN,50 nmol/L IM作阳性对照。继续培养48 h后,弃上清,PBS洗2~3遍后,每孔添加1 mL细胞染色缓冲液及Hoechst、PI各5 μL,避光冰育20 min后,于荧光显微镜下观察,拍照。

1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡与细胞周期

凋亡及细胞周期检测试剂盒购自凯基公司。取对数生长期细胞接种于6孔板,细胞贴壁后加入0、15、30 nmol/L TSN,50 nmol/L IM作阳性对照,继续培养

48 h。①细胞凋亡:用不含 EDTA 胰酶消化细胞、离心,PBS 重悬洗涤 1 次后,离心。Binding Buffer 重悬细胞,依次加入 5 μL Annexin V- APC、PI 染料,混匀,室温避光孵育 15 min,上机检测。②细胞周期:胰酶消化细胞后,加 75%预冷乙醇 1 mL 重悬细胞,4 ℃固定过夜。350×*g* 离心 5 min,PBS 洗涤 2 次,收集沉淀。将 RNase A:PI 按1:9体积配制成染色工作液,500 μL PI/RNase A 染色工作液重悬细胞,避光孵育 30 min 后,上机检测。

1.6 qRT-PCR 检测 c-KIT/PI3K/AKT/mTOR mRNA 表达

TRIzol、PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司,引物由四川生工科技有限公司设计完成。一步法 qRT-PCR 反应条件为:反转录反应 42 ℃ 5 min,95 ℃ 10 s;PCR 反应 95 ℃ 5 s, 60 ℃ 30 s,共 40 个循环。每孔为总体系 25 μL 含 RNA 的反应液,每组 2~3 复孔。引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因名称	引物序列(5′→3′)	产物长度/bp
c-KIT	上游:CTGCTTCTGTACTGCCAGTGGATG 下游:GCCTTACATTCAACCGTGCCATTG	125
PI3K	上游:CAGCCTTCAACAAAGATGCCCTTC 下游:CACAGTAGCCAGCACAGGACAG	108
AKT	上游:TGAGCGACGTGGCTATTG 下游:CAGTCTGGATGGCGGTT	315
mTOR	上游:CTTGCTGAACTGGAGGCTGATGG 下游:CCGTTTTCTTATGGGCTGGCTCTC	140
β-actin	上游:AGCGAGCATCCCCCAAAGTT 下游:GGGCACGAAGGCTCATCATT	205

1.7 Western blot 检测 c-KIT/PI3K/AKT/mTOR 相关蛋白表达

BCA 蛋白定量试剂盒购自上海碧云天公司,全蛋白提取试剂盒及相关试剂购自北京索莱宝公司;PVDF 膜购自美国 Milipore 公司;c-KIT 抗体购自武汉赛维尔公司,PI3K、p-PI3K、AKT 购自北京博奥森公司,p-KIT^{Tyr719}、p-AKT^{Thr308}、mTOR、p-mTOR 购自美国 CST 公司,GAPDH 购自武汉三鹰生物科技有限公司。提取各组蛋白进行凝胶电泳,上样量为 20~30 μg;进行转膜、封闭,一抗孵育过夜;TBST 洗去一抗,二抗孵育 1 h,TBST 清洗 3 次;ECL 显色法显色,测定灰度值。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析,实验均重复 3 次。$P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

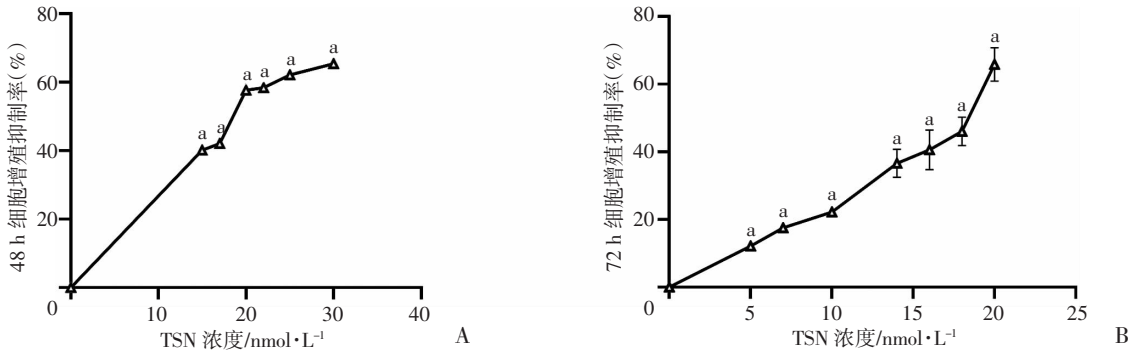
2 结果

2.1 TSN 可显著抑制 GIST-T1 细胞增殖

TSN 作用 GIST-T1 细胞 48 h 后,CCK-8 检测结果显示:与 CON 组比较,TSN 显著抑制了 GIST-T1 细胞系的增殖,且在一定浓度范围内,TSN 抑制增殖的能力与剂量呈正相关($P<0.01$,图 1)。48 h 时 IC_{50} 为 18.75 nmol/L。72 h 呈现类似效果,经计算,72 h 时 IC_{50} 为 17.93 nmol/L。选取 48 h 时相、TSN 浓度 15、30 nmol/L 进行后续实验。

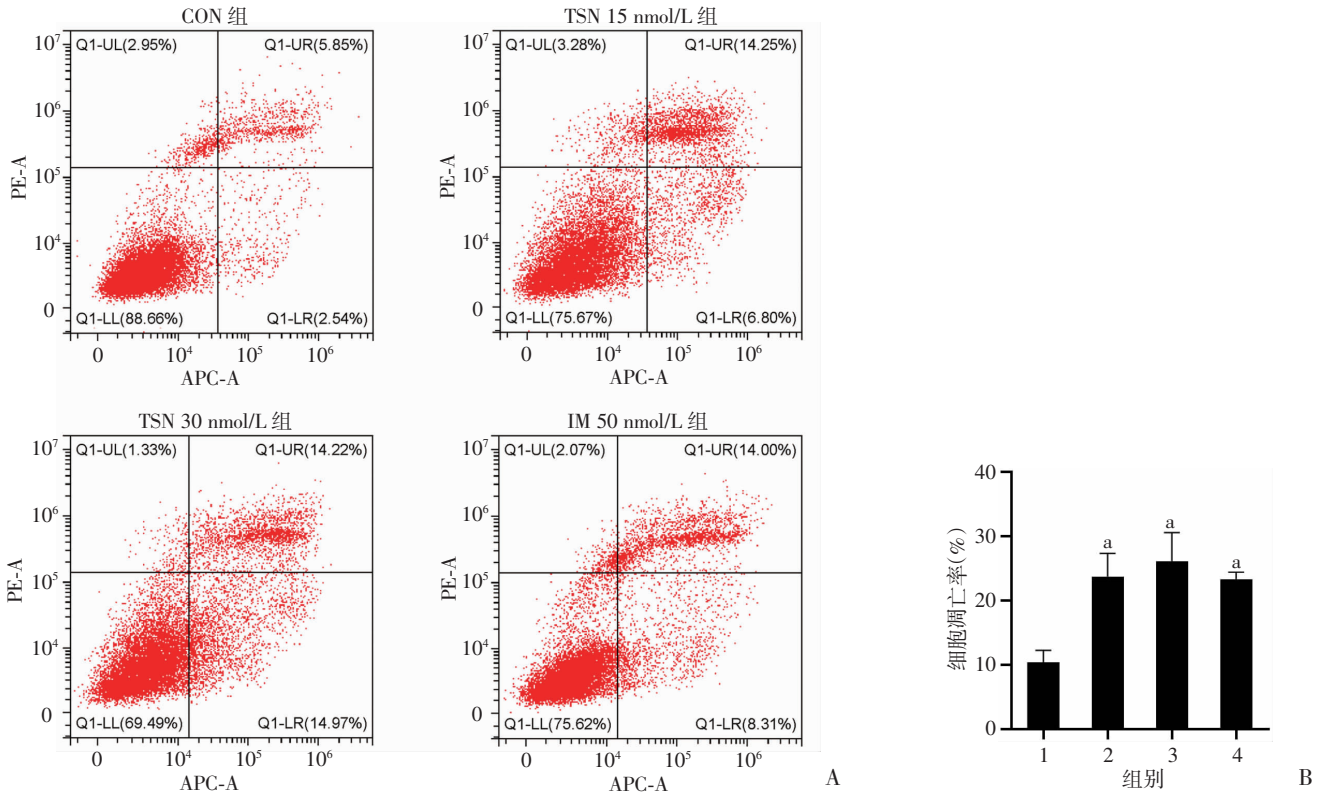
2.2 TSN 促进 GIST-T1 细胞凋亡

流式细胞仪检测结果显示:与 CON 组(0 nmol/L)比较,药物组均出现细胞凋亡水平增加($P<0.01$),但 15、30 nmol/L TSN,50 nmol/L IM 3 组间差异无统计学意义(图 2)。Hoechst 33342/PI 荧光双染佐证了这一结果,TSN 与 IM 组镜下可见染色质固缩、呈强蓝色荧光的早期凋亡细胞(图 3)。细胞周期检测结果显示:与 CON 组(0 nmol/L)比较,15 nmol/L TSN 组 S 期细胞增多,但差异无统计学意义;30 nmol/L TSN 可使细胞周期发生 S 期阻滞($P<0.01$),见图 4。



a:$P<0.01$,与 0 nmol/L 比较

图 1 不同浓度 TSN 作用 48 h(A)、72 h(B)后 GIST-T1 细胞增殖抑制曲线



A:流式细胞仪检测细胞凋亡;B:各组细胞凋亡率 1:CON 组;2:TSN 15 nmol/L 组;3:TSN 30 nmol/L 组;4:IM 50 nmol/L 组;a:$P<0.01$,与 CON 组(0 nmol/L)比较

图 2 TSN 加速 GIST-T1 细胞凋亡

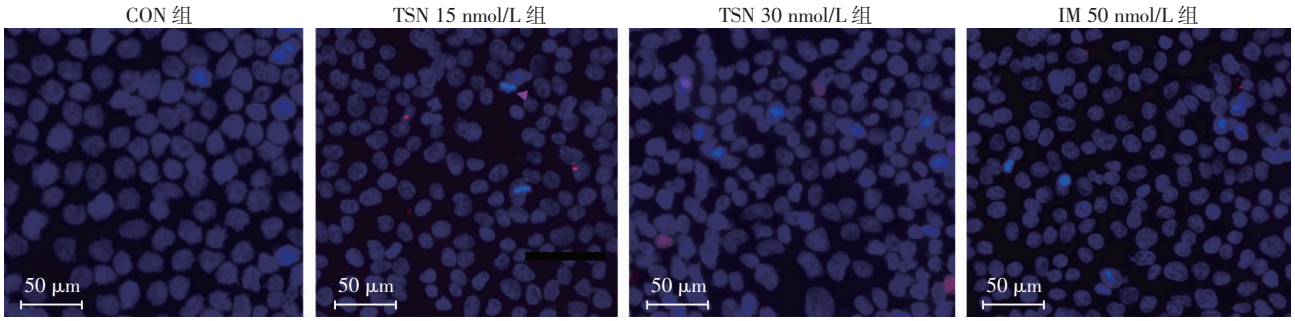
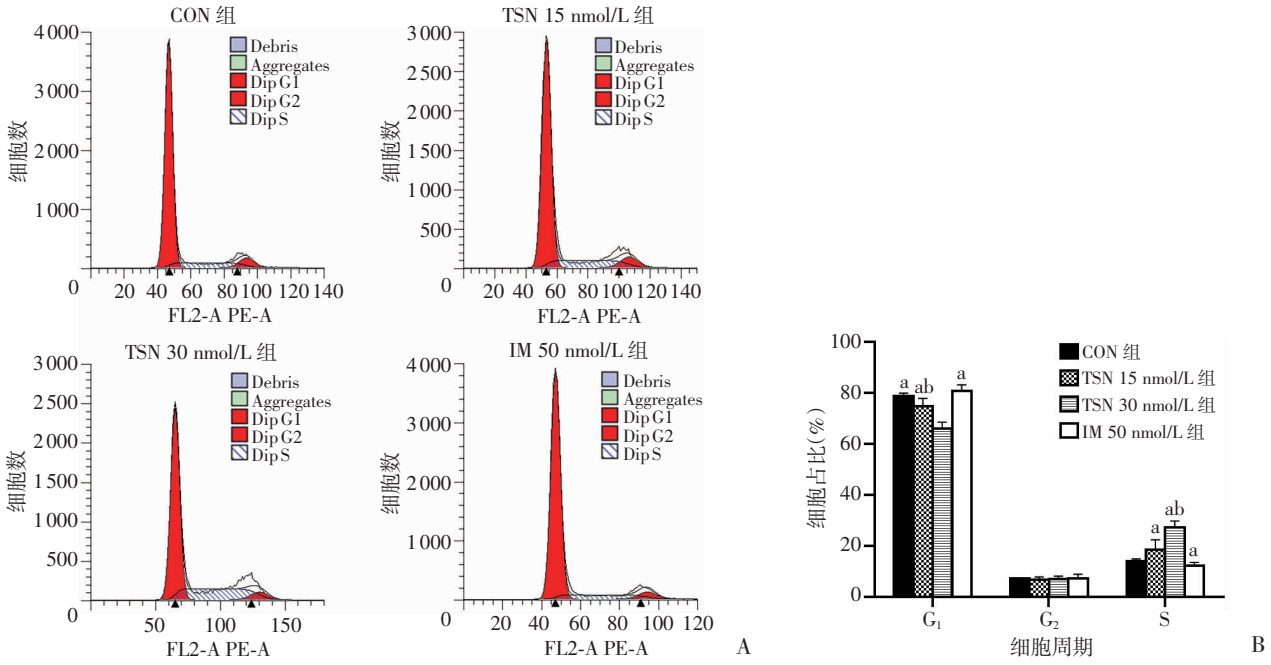


图 3 Hoechst 33342/PI 荧光双染检测 GIST-T1 细胞凋亡

2.3 TSN 可通过下调 c-KIT 表达,抑制 PI3K/AKT/mTOR 通路

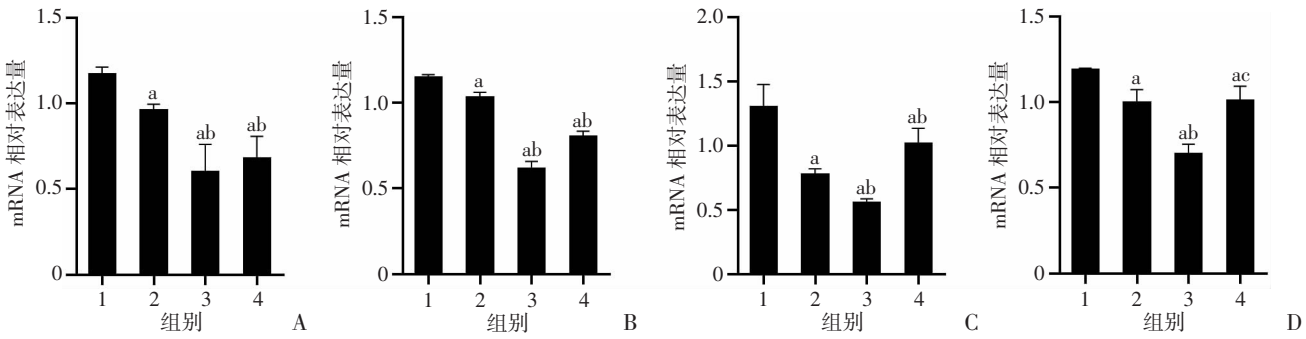
qRT-PCR 结果显示:TSN 可下调 c-KIT mRNA 表达,但 15 nmol/L TSN 抑制效果不及 30 nmol/L TSN 和 IM 组($P<0.05$),30 nmol/L TSN 与 IM 组差异无统计学意义(图 5A)。与 CON 组比较,15 nmol/L TSN 即可抑制 PI3K mRNA 的表达($P<0.05$,图 5B)。除此之外,15 nmol/L TSN 对 AKT 及 mTOR mRNA 表达具有同样抑制效果,且 15 nmol/L TSN 对 AKT mRNA 抑制效果优于 IM 组($P<0.05$,图 5C、D)。

Western blot 结果显示(图 6):TSN 明显抑制 c-KIT 蛋白表达,30 nmol/L TSN 比 15 nmol/L TSN 抑制作用更强($P<0.05$)。与 CON 组比较,TSN 明显抑制 p-c-KIT 蛋白表达,30 nmol/L TSN 抑制效果优于 IM 组($P<0.05$)。与 CON 组比较,15 nmol/L TSN 可抑制 PI3K、p-PI3K、p-AKT、mTOR 及 p-mTOR 蛋白表达,30 nmol/L TSN 可抑制 AKT 蛋白表达($P<0.05$)。



A:流式细胞仪检测细胞周期;B:各期细胞所占百分比 a:$P<0.05$,与 TSN 30 nmol/L 组比较;b:$P<0.05$,与 IM 50 nmol/L 组比较

图 4 TSN 引起 GIST-T1 细胞周期阻滞



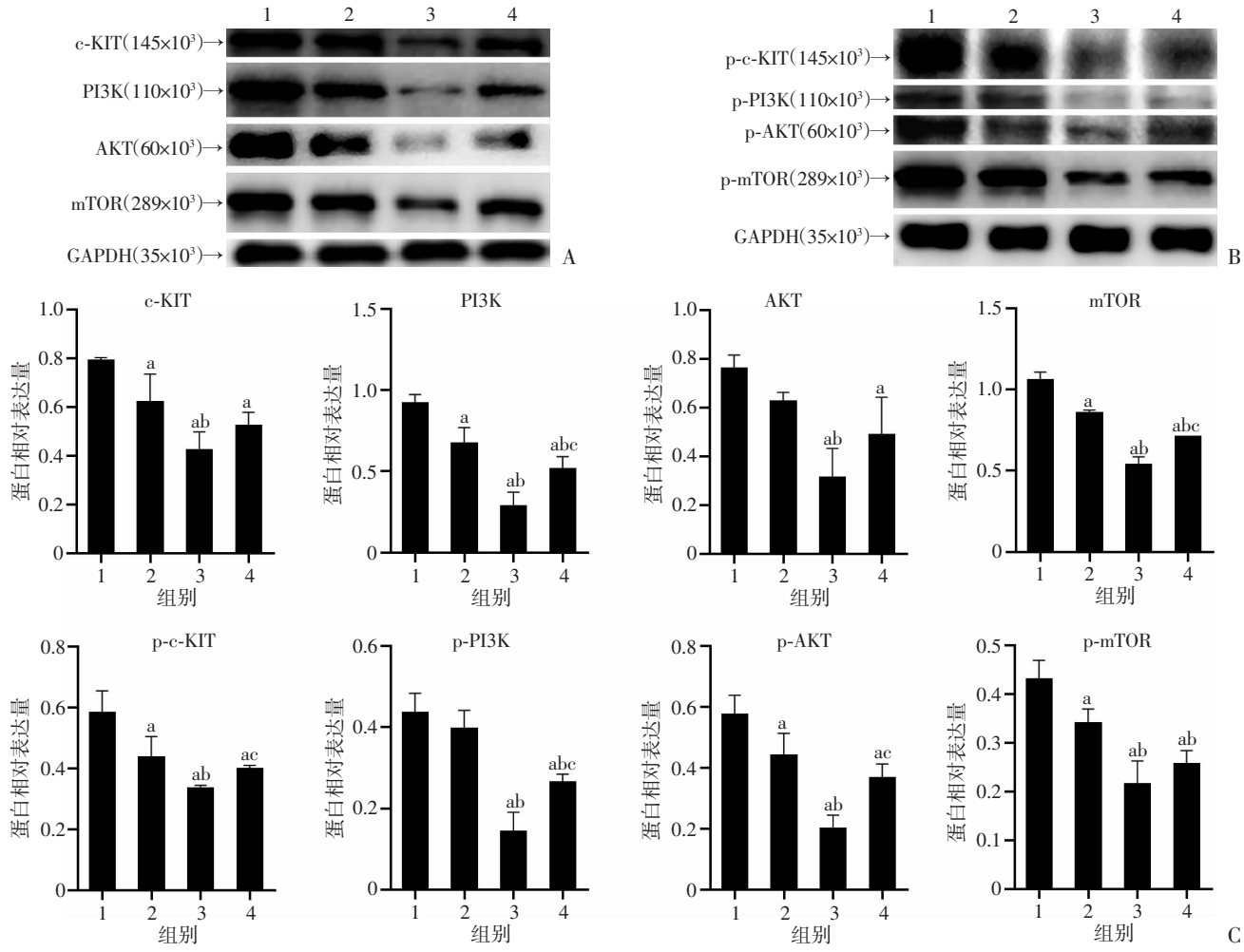
1:CON 组;2:TSN 15 nmol/L 组;3:TSN 30 nmol/L 组;4:IM 50 nmol/L 组;a:$P<0.05$,与 CON 组比较;b:$P<0.05$,与 TSN 15 nmol/L 组比较;c:$P<0.05$,与 TSN 30 nmol/L 组比较

图 5 qRT-PCR 检测 GIST-T1 细胞中 c-KIT(A)、PI3K(B)、AKT(C)、mTOR(D) mRNA 表达

3 讨论

川楝素(TSN)作为新型抗肿瘤的候选药之一,已被证实可抑制多种肿瘤细胞增殖,促进其凋亡。在对人尤文氏肉瘤 SK-ES-1 细胞系研究中发现:TSN 可上调 Bax,下调 Bcl-2 的表达,从而改变 Bax/Bcl-2 比例。此外,TSN 还可促进 Cyt-c 的释放,导致线粒体凋亡通路的激活[16]。在胃癌的体外研究中发现:TSN 可引起 G_1/S 阻滞和诱导 caspase 依赖性凋亡,从而抑制胃癌 AGS 和 HGC-27 细胞系增殖,机制可能与 p38 MAPK 通路的激活有关[19]。另外,TSN 可通过 Fas/FasL 信号通路诱导人卵巢癌细胞凋亡[20]。综上所述,川楝素能抑制多种肿瘤细胞生长且效果明显,值得作为潜在抗肿瘤药物深入探索。然而,TSN 对胃肠间质瘤(GIST)细胞的影响,目前研究尚少。

本研究结果证实:TSN 对 GIST-T1 细胞系同样具备抑制增殖及促进其凋亡的作用。TSN 可抑制 GIST-T1 细胞增殖,且在一定浓度范围内,其抑制增殖的能力与 TSN 浓度呈正相关,作用 48 h IC_{50} 低至 18.75 nmol/L。流式细胞仪及凋亡染色结果表明:较低浓度的TSN



1:CON 组;2:TSN 15 nmol/L 组;3:TSN 30 nmol/L 组;4:IM 50 nmol/L 组;a:$P<0.05$,与 CON 组比较;b:$P<0.05$,与 TSN 15 nmol/L 组比较;c:$P<0.05$,与 TSN 30 nmol/L 组比较

A、B:Western blot 检测 TSN 作用 48 h 对 GIST-T1 细胞中蛋白表达的影响;C:半定量分析

图 6 Western blot 检测 GIST-T1 细胞 c-KIT/PI3K/AKT/mTOR 相关蛋白表达

(15 nmol/L)即可引起 GIST-T1 细胞凋亡,但当 TSN 浓度增加时,并未观察到统计学意义上的凋亡增加。细胞周期检测结果显示:TSN 抑制 GIST-T1 细胞系凋亡,可能与细胞周期 S 期阻滞相关。

PI3K/AKT 信号通路在细胞生长及生存的生理、病理方面均起重要作用。磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)位于胞膜上,由 PIK3CA 基因编码。Ia 类 PI3Ks 由催化亚基 p110 和调节亚基 p85 组成,与 RTK 信号通路密切相关[21-23]。当 PI3K 被多种 RTK 激活时,磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸(PIP2)磷酸化,启动信号级联,导致磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸(PIP3)积累[24]。Akt 是一种具有广泛底物的细胞质丝氨酸-苏氨酸激酶,上述脂质产物可将 Akt 召集到细胞膜上,并使其磷酸化,通过激活底物,如哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)等,最终促进蛋白合成,细胞生长[25-26]。已有研究表明:突变的 KIT 或 PDGFRA 基因通过上调其下游的 RAS/RAF/MAPK 和 PI3K/AKT/mTOR,促进 GIST 细胞增殖,减少凋亡,与 GIST 疾病发展密切相关[27]。

为了研究 TSN 是否可以抑制 GIST 致病突变 c-KIT 的表达,我们进行了相关实验。结果证实:TSN 可从基因水平下调 GIST-T1 细胞系中 c-KIT 的表达,Western blot 结果表明:与对照组比较,c-KIT 总蛋白及磷酸化蛋白表达均明显受到抑制。对 PI3K/AKT/mTOR 通路进行检测,结果发现:15、30 nmol/L 的 TSN 作用于 GIST-T1 细胞 48 h 后,亦可从基因及蛋白质水平下调 PI3K/AKT/mTOR 通路表达,从而抑制了 GIST-T1 细胞的增殖,促进其凋亡。结合以往文献可知,TSN 可抑制 GIST-T1 细胞 c-KIT 的表达,且至少部

分通过下调 c-KIT 表达,抑制了 PI3K/AKT/mTOR 通路的表达。至于 TSN 是否抑制其他通路或相关蛋白表达,还有待进一步研究。PI3K/AKT/mTOR 通路的激活程度与其磷酸化程度密切相关,Western blot 结果显示:TSN 对 c-KIT 及其下游总蛋白、磷酸化蛋白水平均可抑制,但磷酸化蛋白/总蛋白比值水平差异无统计学意义,可见 TSN 主要是通过抑制总蛋白表达,从而间接实现蛋白磷酸化水平的降低,其总的效应仍旧是降低了 c-KIT 及其下游通路蛋白的磷酸化程度,使得 PI3K/AKT/mTOR 通路活性下调。

综上所述,TSN 可通过下调 GIST-T1 细胞 c-KIT 及其下游 PI3K/AKT/mTOR 信号通路表达,从而抑制 GIST-T1 细胞增殖,促进凋亡,并使其细胞周期阻滞在 S 期。本研究仅从体外实验角度进行了初步探索,进一步的机制探索或者体内实验效果是否理想,均有待进一步研究证实。

参考文献:

[1] HEMMING M L, LAWLOR M A, ANDERSEN J L, *et al*. Enhancer domains in gastrointestinal stromal tumor regulate KIT expression and are targetable by BET bromodomain inhibition[J]. Cancer Res, 2019, 79(5): 994-1009. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-1888.

[2] DONG Y, LIANG C, ZHANG B, *et al*. Bortezomib enhances the therapeutic efficacy of dasatinib by promoting c-KIT internalization-induced apoptosis in gastrointestinal stromal tumor cells[J]. Cancer Lett, 2015, 361(1): 137-146. DOI:10.1016/j.canlet.2015.02.044.

[3] NILSSON B, BÜMMING P, MEIS-KINDBLOM J M, *et al*. Gastrointestinal stromal tumors: the incidence, prevalence, clinical course, and prognostication in the preimatinib mesylate era: a population-based study in western Sweden [J]. Cancer, 2005, 103(4): 821-829. DOI: 10.1002/cncr.20862.

[4] YAN L H, CHEN Z N, LI C J, *et al*. Prolonging gastrointestinal-stromal-tumor-free life, an optimal suggestion of imatinib intervention ahead of operation[J]. J Cancer, 2018, 9(21): 3850-3857. DOI:10.7150/jca.25263.

[5] 孙祥飞,高晓东,沈坤堂.胃肠间质瘤中伊马替尼继发性耐药机制的研究进展[J].中华胃肠外科杂志,2019, 22(9): 886-890. DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-0274.2019.09.014.
SUN X F, GAO X D, SHEN K T. Research advances in the secondary resistance mechanism of imatinib in gastrointestinal stromal tumors[J]. Chin J Gastrointest Surg, 2019, 22(9): 886-890. DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-0274.2019.09.014.

[6] KANG Y K, RYU M H, YOO C, *et al*. Resumption of imatinib to control metastatic or unresectable gastrointestinal stromal tumours after failure of imatinib and sunitinib (RIGHT): a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial [J]. Lancet Oncol, 2013, 14(12):1175-1182. DOI: 10.1016/S1470-2045(13)70453-4.

[7] SOHRETOGLU D, HUANG S. Ganoderma lucidum polysaccharides as an anti-cancer agent[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2018, 18(5): 667-674. DOI:10.2174/1871520617666171113121246.

[8] KIM B, KIM E Y, LEE E J, *et al*. Panax notoginseng inhibits tumor growth through activating macrophage to M1 polarization[J]. Am J Chin Med, 2018, 46(6): 1369-1385. DOI:10.1142/s0192415x18500726.

[9] ZHOU Q, WU X, WEN C, *et al*. Toosendanin induces caspase-dependent apoptosis through the p38 MAPK pathway in human gastric cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 505(1): 261-266. DOI:10.1016/j.bbrc.2018.09.093.

[10] SHI Y L, LI M F. Biological effects of toosendanin, a triterpenoid extracted from Chinese traditional medicine[J]. Prog Neurobiol, 2007, 82(1): 1-10. DOI:10.1016/j.pneurobio.2007.02.002.

[11] PEI Z, FU W, WANG G. A natural product toosendanin inhibits epithelial-mesenchymal transition and tumor growth in pancreatic cancer *via* deactivating Akt/mTOR signaling [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 493(1): 455-460. DOI:10.1016/j.bbrc.2017.08.170.

[12] JU J, QI Z, CAI X, *et al*. Toosendanin induces apoptosis through suppression of JNK signaling pathway in HL-60 cells [J]. Toxicol in Vitro, 2013, 27(1): 232-238. DOI:10.1016/j.tiv.2012.09.013.

[13] 史杰, 王芳. 川楝素对 TRAIL 抗肝癌活性及其机制研究[J].浙江中西医结合杂志, 2017, 27(11): 936-939, 946.
SHI J, WANG F. Effect of toosendanin on TRAIL inhibiting hepatocellular carcinoma and the related mechanism[J]. Zhejiang J Integr Tradit Chin West Med, 2017, 27(11): 936-939,946.

[14] 王进, 卢忠心, 何於娟. 川楝素诱导 K562 细胞自噬性死亡的实验研究[J]. 山东医药, 2013, 53(1): 24-26.
WANG J, LU Z X, HE Y J. Experimental study on autophagy death of K562 cells induced by toosadirachtin

[J]. Shandong Med J, 2013, 53(1): 24-26.

[15] CAO L, QU D D, WANG H, *et al*. Toosendanin exerts an anti-cancer effect in glioblastoma by inducing estrogen receptor β- and p53-mediated apoptosis[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(11): 1928. DOI: 10.3390/ijms17111928.

[16] GAO T, XIE A, LIU X, *et al*. Toosendanin induces the apoptosis of human Ewing's sarcoma cells *via* the mitochondrial apoptotic pathway[J]. Mol Med Rep, 2019, 20(1): 135-140. DOI:10.3892/mmr.2019.10224.

[17] ZHANG T, LI J, YIN F, *et al*. Toosendanin demonstrates promising antitumor efficacy in osteosarcoma by targeting STAT3[J]. Oncogene, 2017, 36(47): 6627-6639. DOI: 10.1038/onc.2017.270.

[18] WANG G, FENG C C, CHU S J, *et al*. Toosendanin inhibits growth and induces apoptosis in colorectal cancer cells through suppression of AKT/GSK-3β/β-catenin pathway[J]. Int J Oncol, 2015, 47(5): 1767-1774. DOI:10.3892/ijo.2015.3157.

[19] ZHOU Q, WU X, WEN C, *et al*. Toosendanin induces caspase-dependent apoptosis through the p38 MAPK pathway in human gastric cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 505(1): 261-266. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.09.093.

[20] 李雨颖,邵喜英,金莉婷,等. 川楝素通过 Fas/FasL 信号通路诱导人卵巢癌细胞凋亡[J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 39(9): 1089-1094. DOI: 10.7661/j.cjim.20190729.089.

LI Y Y, SHAO X Y, JIN L T, *et al*. Apoptosis of qvarian cancer cells induced by toosendanin through Fas/FasL signaling pathway[J]. Chin J Integr Trad West Med, 2019, 39(9):1089-1094. DOI:10.7661/j.cjim.20190729.089.

[21] TEWARI D, PATNI P, BISHAYEE A, *et al*. Natural products targeting the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway in cancer: a novel therapeutic strategy[J]. Semin Cancer Biol, 2019. DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.12.008.

[22] XIA P, XU X Y. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in cancer stem cells: from basic research to clinical application[J]. Am J Cancer Res, 2015, 5(5): 1602-1609.

[23] KITAGISHI Y, MATSUDA S. Diets involved in PPAR and PI3K/AKT/PTEN pathway may contribute to neuroprotection in a traumatic brain injury[J]. Alzheimers Res Ther, 2013, 5(5): 42. DOI:10.1186/alzrt208.

[24] VIVANCO I, SAWYERS C L. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(7): 489-501. DOI:10.1038/nrc839.

[25] FRANKE T F, YANG S I, CHAN T O, *et al*. The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase[J]. Cell, 1995, 81(5): 727-736. DOI: 10.1016/0092-8674(95)90534-0.

[26] SARBASSOV D D, GUERTIN D A, ALI S M, *et al*. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex[J]. Science, 2005, 307(5712): 1098-1101. DOI:10.1126/science.1106148.

[27] DUENSING A, MEDEIROS F, MCCONARTY B, *et al*. Mechanisms of oncogenic KIT signal transduction in primary gastrointestinal stromal tumors (GISTs)[J]. Oncogene, 2004, 23(22): 3999-4006. DOI: 10.1038/sj.onc.1207525.

(**收稿**:2020-12-29;**修回**:2021-03-02)

(编辑 张 维)