紫草素对人结肠癌细胞HCT116自噬和凋亡的影响Δ

邵　鑫[1*]，蒋先虹[2]，王　瑞[3]，蒲强红[1]，韩　彬[4]，刘　福[4#]（1.乐山市人民医院药学部，四川 乐山　614000；2.乐山市人民医院胃肠外科，四川 乐山　614000；3.乐山市人民医院风湿免疫科，四川 乐山　614000；4.川北医学院附属医院药剂科，四川 南充　637000）

中图分类号　R285　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2021）01-0051-05
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2021.01.10

摘　要　目的：研究紫草素对人结肠癌细胞HCT116自噬和凋亡的影响。方法：以0（空白对照）、10、20、40 μg/mL紫草素作用于HCT116细胞48 h后，采用MTT法检测细胞增殖抑制率；采用流式细胞术检测细胞凋亡率；分别采用实时荧光定量-聚合酶链式反应法和Western blotting法检测细胞中微管相关蛋白轻链3（LC3）和自噬相关蛋白Beclin-1、p62的mRNA及其蛋白表达水平。结果：与空白对照比较，10、20、40 μg/mL紫草素作用48 h后HCT116细胞的增殖抑制率和凋亡率均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$）。10、20、40 μg/mL紫草素作用于HCT116细胞48 h后均可不同程度地升高细胞中LC3、Beclin-1、p62 mRNA及其蛋白的表达水平，除10 μg/mL紫草素作用后细胞中LC3 mRNA表达水平升高不显著外，其余指标水平与空白对照比较差异均有统计学意义（$P<0.05$或$P<0.01$）。结论：紫草素可诱导人结肠癌细胞HCT116发生凋亡，并激活其自噬途径。

关键词　紫草素；人结肠癌细胞HCT116；自噬；凋亡

Effects of Shikonin on Autophagy and Apoptosis of Human Colon Cancer HCT116 Cells

SHAO Xin[1], JIANG Xianhong[2], WANG Rui[3], PU Qianghong[1], HAN Bin[4], LIU Fu[4]（1. Dept. of Pharmacy, Leshan People's Hospital, Sichuan Leshan 614000, China; 2. Dept. of Gastrointestinal Surgery, Leshan People's Hospital, Sichuan Leshan 614000, China; 3. Dept. of Rheumatology and Immunology, Leshan People's Hospital, Sichuan Leshan 614000, China; 4. Dept. of Pharmacy, the Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Sichuan Nanchong 637000, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE: To study the effects of shikonin on autophagy and apoptosis of human colon cancer HCT116 cells. METHODS: After treating HCT116 cells for 48 h with shikonin at 0 (blank control) 10, 20, 40 μg/mL, MTT method was used to detect inhibitory rate of cell proliferation. Flow cytometry was used to detect cell apoptosis rate. RT-qPCR assay and Western blotting were respectively used to detect mRNA and protein expressions of microtubule associated protein light chain 3 (LC3) and autophagy-related protein Beclin-1 and p62. RESULTS: Compared with blank control, after treated with 10, 20, 40 μg/mL shikonin for 48 h, proliferation inhibitory rate and apoptosis rate of HCT116 cells were increased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). After treated with 10, 20, 40 μg/mL shikonin for 48 h, mRNA and protein expressions of LC3, Beclin-1 and p62 in HCT116 cells were increased to different extents; except that mRNA expression of LC3 was not increased significantly after treated with 10 μg/mL shikonin, the difference were statistically significant in other indexes, compared with blank control ($P<0.05$ or $P<0.01$). CONCLUSIONS: Shikonin can induce the apoptosis of human colon cancer HCT116 cells and activate its autophagy pathway.

KEYWORDS　Shikonin; Human colon cancer HCT116 cells; Autophagy; Apoptosis

结肠癌是全世界发病率和病死率均位居前列的癌症之一，可能由多种危险因素引起，且其病死率呈逐年上升趋势[1-2]。目前，化疗仍是结肠癌治疗的主要手段之一，但化疗药物具有较大的毒副作用[3-4]，且患者5年生存率仅为42.7%[5]。因此，高效、低毒的新型天然抗结肠癌药物越来越受到人们的关注[6]。近年来，天然药物已显示出对多种癌症的治疗前景，因其化学及生物活性多样、毒性低以及具有调节各种信号转导途径和细胞过程的能力而在癌症治疗方面受到重视[3]。

紫草素是一种来自天然植物药紫草的萘醌类化合物，具有抗炎、抗菌、抗病毒、抗肿瘤等多种生物活性[7]。研究表明，紫草素对神经胶质瘤、黑色素瘤、结肠癌等多种肿瘤细胞具有广泛的抑制作用[8-10]，有可能开发成为一种新的高效、低毒的抗癌药物。目前，细胞自噬与凋亡在肿瘤发生发展中的作用备受关注，自噬诱导的细胞死亡可能抑制肿瘤细胞的生长，从而抑制肿瘤的发生[11]。因此，本研究以人结肠癌细胞HCT116为研究对象，研究紫草素对其自噬和凋亡的影响，初步探讨紫草

Δ 基金项目：四川省科技计划项目（No.2019YJ0386）

* 药师，硕士。研究方向：临床药学、循证药学。E-mail：18284165610@163.com

通信作者：主任药师，教授。研究方向：医院药学。E-mail：nslf91@163.com

素抗结肠癌的作用机制，从而为该药的开发及结肠癌的临床治疗提供参考。

1 材料

1.1 仪器

HF90型CO_2培养箱（上海力新仪器有限公司）；M200 PRO全波长全自动酶标仪（瑞士Tecan公司）；BDFACS Aria Ⅲ型流式细胞仪（美国BD公司）；Light Cycler 96型实时荧光定量-聚合酶链式反应（RT-qPCR）仪（瑞士Roche公司）；INFINITY 3026型凝胶成像系统（法国Vilber Lourmat公司）；Pultton P200+型紫外分光光度计（北京五洲东方科技发展有限公司）。

1.2 药品与试剂

紫草素对照品（中国食品药品检定研究院，批号：0769-9903，纯度：≥98.0%）；胎牛血清、二甲基亚砜（DMSO）、胰蛋白酶（美国Gibco公司）；Trizol试剂（北京索莱宝科技有限公司）；MTT试剂（上海碧云天生物技术有限公司）；Annexin Ⅴ-FITC/PI双染检测试剂盒（南京凯基生物技术有限公司，批号：KGA105-KGA108）；鼠抗人*β*-肌动蛋白（*β*-actin）单克隆抗体、兔抗人微管相关蛋白轻链3Ⅱ/Ⅰ（LC3Ⅱ/LC3Ⅰ）单克隆抗体、兔抗人自噬相关蛋白Beclin-1单克隆抗体、兔抗人自噬相关蛋白p62单克隆抗体（美国CST公司，批号：3700S、12741S、3495S、23214S）；RPMI 1640培养基、青-链霉素（美国Hyclone公司）；辣根过氧化物酶（HRP）标记的羊抗鼠免疫球蛋白G（IgG）二抗、HRP标记的羊抗兔IgG二抗（成都正能生物技术有限责任公司，批号：511103、511203）；Transcription Kit Quanti Nova逆转录试剂盒（德国Qiagen公司）；二喹啉甲酸（BCA）蛋白浓度测定试剂盒（美国Thermo Fisher Scientific公司）；RIPA蛋白裂解液（上海碧云天生物科技有限公司）；ECL化学发光液（合肥Biosharp生物公司）；聚偏二氟乙烯（PVDF）膜（美国Millipore公司）；PCR引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成；其余试剂均为分析纯或实验室常用规格，水为蒸馏水。

1.3 细胞株

人结肠癌细胞株HCT116购自中国医学科学院细胞库。

2 方法

2.1 细胞培养及样品溶液制备

将HCT116细胞培养于含10%胎牛血清、1%青-链霉素的RPMI 1640完全培养基中，将细胞置于37 ℃、5%CO_2培养箱中贴壁培养2～3 d，待细胞融合度至80%左右时，用0.25%胰蛋白酶消化细胞，进行传代培养。本研究选用传代10～20代的HCT116细胞进行试验。将50 μg紫草素溶解于50 μL的DMSO中，制备成质量浓度为1 mg/mL的母液，分装后冻存于－20 ℃冰箱中，备用。使用时，用RPMI 1640完全培养基将母液分别稀释为10、20、40 μg/mL的样品溶液。

2.2 紫草素对HCT116细胞增殖的影响考察

采用MTT法检测。取对数生长期的HCT116细胞，接种于RPMI 1640完全培养基中，调整细胞密度为1×10^5个/mL，将细胞接种至96孔板中，每孔100 μL。将细胞分为空白对照组（0 μg/mL）和紫草素低、中、高质量浓度组（10、20、40 μg/mL），并设置不加细胞的阴性对照组，每组均设置3个复孔。每孔接种100 μL药液（各给药组）或RPMI 1640培养基（空白对照组和阴性对照组），每孔中DMSO的终浓度均为1%。培养48 h后，每孔中加入5 mg/mL的MTT溶液20 μL，将细胞置于37 ℃、5%CO_2培养箱中培养4 h；吸弃培养液，每孔中加入DMSO溶液100 μL，溶解沉淀，继续培养10 min。采用酶标仪检测各孔在570 nm波长处的光密度（OD）值，计算细胞增殖抑制率：细胞增殖抑制率（%）=[1－（阴性对照组OD值－加药组细胞OD值）/（阴性对照组细胞OD值－空白对照组细胞OD值）]×100%。试验重复3次。

2.3 紫草素对HCT116细胞凋亡的影响考察

采用流式细胞仪检测。取对数生长期HCT116细胞，处理、接种、分组、给药方法均同“2.2”项下，每组均设置3个复孔。培养48 h后，用胰酶消化并收集细胞，以磷酸盐缓冲液（PBS）漂洗后，将细胞重悬于Loading buffer缓冲液中，分别加入5 μL的Annexin Ⅴ-FITC染色液和5 μL的PI染色液，避光孵育15 min，所有操作均在冰上进行。采用流式细胞仪在1 h内对染色细胞进行检测，并用FlowJo V10软件测定细胞凋亡率。试验重复3次。

2.4 紫草素对HCT116细胞自噬相关基因mRNA表达的影响考察

采用RT-qPCR法检测。取对数生长期HCT116细胞，接种于RPMI 1640完全培养基中，调整细胞密度为1×10^5个/mL，然后接种至6孔板中，每孔2 mL。细胞分组和给药方法同“2.2”项下，每组均设置3个复孔。培养48 h后，用Trizol试剂提取各组细胞总RNA，采用紫外分光光度法检测RNA浓度及纯度后，将RNA逆转录合成cDNA，并进行PCR扩增。反应体系（共20 μL）：cDNA模板2 μL，Mix 10 μL，上、下游引物各0.4 μL，ddH_2O 7.2 μL。扩增条件：95 ℃预变性30 s；95 ℃变性5 s，60 ℃退火30 s，72 ℃延伸20 s，共40个循环。以*β*-actin作为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算各目标基因mRNA的表达水平。试验重复3次。引物序列及产物长度见表1。

表1 引物序列及产物长度

Tab 1 Primer sequence and product length

基因名称	上游引物序列（5′-3′）	下游引物序列（5′-3′）	产物长度，bp
β-actin	AGCACTGTGTTGGCGTACAG	TCCCTGGAGAAGAGCTACGA	194
LC3	AATCCCGGTGATCATCGAGC	GCCGGATGATCTTGACCAAC	119
Beclin-1	CCGCAAGATAGTGGCAGAA	CGACCCAGCCTGAAGTTAT	264
p62	ACATAGCTTGCCTAATGGCTTTCAC	ACATAGCTTGCCTAATGGCTTTCAC	139

2.5 紫草素对HCT116细胞中自噬相关蛋白表达的影响考察

采用Western blotting法检测。取对数生长期的HCT116细胞，接种、分组、给药方法均同“2.4”项下，每组均设置3个复孔。培养48 h后，用RIPA裂解液充分裂解细胞并提取细胞中总蛋白，采用BCA法进行蛋白定量，然后行变性处理后取蛋白50 μg在80 V电压下行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）150 min，再以电流200 mA湿法转膜80 min至PVDF膜上，以5%脱脂奶粉进行常温封闭1 h；加入β-actin、LC3Ⅱ/LC3Ⅰ、Beclin-1、p62一抗（稀释度均为 1∶1 000），4 ℃下孵育过夜；以PBST缓冲液洗膜3次，然后加入相应二抗（稀释度均为1∶10 000），室温孵育1 h；以PBST缓冲液洗膜3次，然后在凝胶成像系统中采用ECL化学发光液显色。采用Image J 1.52a软件对蛋白条带进行分析，以Beclin-1、p62蛋白条带与内参β-actin蛋白条带的灰度值之比表示Beclin-1、p62蛋白的表达水平，以LC3Ⅱ/LC3Ⅰ的灰度值之比表示LC3蛋白的表达水平。试验重复3次。

2.6 统计学方法

采用SPSS 13.0统计软件对试验数据进行统计分析。计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，两组间比较采用LSD检验。$P<0.05$表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 紫草素对HCT116细胞增殖的影响

与空白对照组（细胞增殖抑制率计为0）比较，紫草素低、中、高质量浓度组细胞的增殖抑制率[依次为(30.76±5.57)%、(43.02±7.11)%、(68.18±9.29)%]均显著升高（$P<0.05$），并具有一定的浓度依赖性趋势。

3.2 紫草素对HCT116细胞凋亡的影响

与空白对照组比较，紫草素低、中、高质量浓度组细胞的凋亡率均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$），并具有一定的浓度依赖性趋势。各组细胞凋亡情况的流式细胞图见图1，凋亡率测定结果见表2。

3.3 紫草素对HCT116细胞中自噬相关基因mRNA表达的影响

与空白对照组比较，紫草素中、高质量浓度组细胞中LC3 mRNA表达水平和紫草素低、中、高质量浓度组细胞中Beclin-1 mRNA表达水平均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$），紫草素低、中、高质量浓度组细胞中p62 mRNA表达水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。各组细胞中LC3、Beclin-1和p62 mRNA表达水平测定结果见表3。

3.4 紫草素对HCT116细胞中自噬相关蛋白表达的影响

与空白对照组比较，紫草素低、中、高质量浓度组细胞中LC3和Beclin-1蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$），p62蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。各组细胞中LC3、Beclin-1和p62蛋白表达的电泳图见图2，表达水平测定结果见表4。

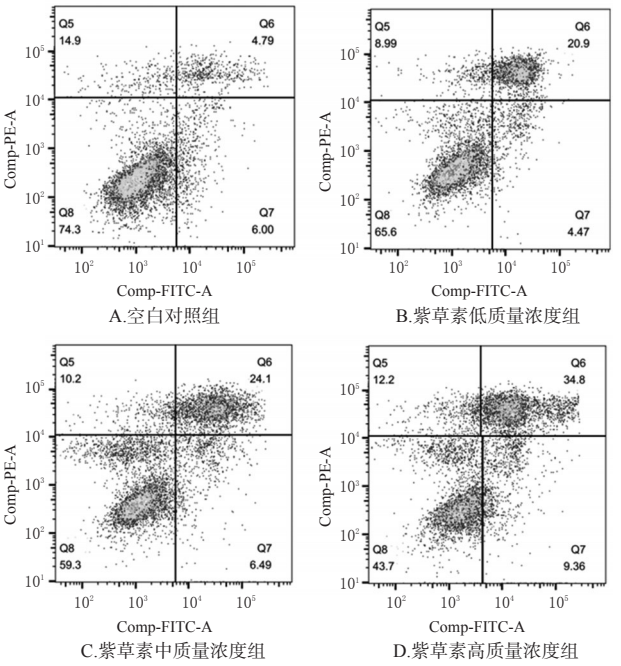


图1 各组细胞凋亡情况的流式细胞图

Fig 1 Flow cytometry of cell apoptosis in each group

表2 各组细胞凋亡率测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Tab 2 Apoptosis rate of cells in each group（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	凋亡率，%
空白对照组	8.34±3.57
紫草素低质量浓度组	22.46±5.23*
紫草素中质量浓度组	28.78±4.85*
紫草素高质量浓度组	41.39±7.90**

注：与空白对照组比较，*$P<0.05$，**$P<0.01$

Note：vs. blank control group，*$P<0.05$，**$P<0.01$

表3 各组细胞中LC3、Beclin-1、p62 mRNA表达水平测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Tab 3 mRNA expression of LC3，Beclin-1 and p62 in cells of each group（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	LC3 mRNA	Beclin-1 mRNA	p62 mRNA
空白对照组	1.098 5±0.098 0	1.645 8±0.107 5	2.379 6±0.157 9
紫草素低质量浓度组	1.249 6±0.239 4	1.938 9±0.094 8*	1.975 9±0.189 5*
紫草素中质量浓度组	1.579 4±0.264 8*	2.158 9±0.265 1*	1.176 0±0.085 8*
紫草素高质量浓度组	2.083 5±0.335 2*	2.565 9±0.315 9**	1.075 1±0.076 4**

注：与空白对照组比较，*$P<0.05$，**$P<0.01$

Note：vs. blank control group，*$P<0.05$，**$P<0.01$

4 讨论

结肠癌是严重威胁人类健康的恶性肿瘤之一，据2018年全球癌症数据统计，结肠癌是导致癌症死亡的第四大原因[12]。目前认为癌症的发生与肿瘤细胞凋亡及

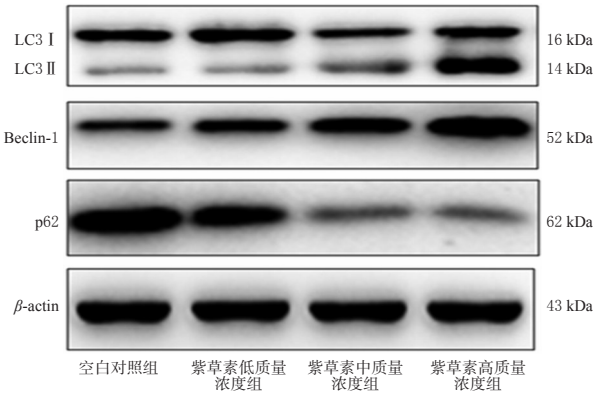


图2　各组细胞中LC3、Beclin-1和p62蛋白表达的电泳图

Fig 2　Electrophoresis diagram of protein expression of LC3, Beclin-1 and p62 in cells of each group

表4　各组细胞中LC3、Beclin-1和p62蛋白表达水平测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Tab 4　Protein expression of LC3, Beclin-1 and p62 in cells of each group（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	LC3Ⅱ/LC3Ⅰ	Beclin-1/β-actin	p62/β-actin
空白对照组	0.419 6±0.047 5	0.841 7±0.070 6	1.683 5±0.275 9
紫草素低质量浓度组	0.505 9±0.046 5*	1.079 4±0.105 9*	0.969 6±0.146 6*
紫草素中质量浓度组	0.776 0±0.105 9*	1.469 5±0.258 0*	0.557 9±0.073 6*
紫草素高质量浓度组	1.157 8±0.227 5**	1.775 1±0.276 1*	0.413 9±0.079 3**

注：与空白对照组比较，*$P<0.05$，**$P<0.01$

Note：vs. blank control group，*$P<0.05$，**$P<0.01$

自噬的异常存在密切关系：细胞凋亡是依赖于凋亡基因及其编码的蛋白所调控的Ⅰ型程序性死亡，对维持细胞内环境稳定和平衡具有重要作用；细胞自噬被称为Ⅱ型程序性细胞死亡，是依赖溶酶体降解细胞质内细胞器和大分子物质的代谢途径[13-15]。近年来研究证明，自噬可作为肿瘤细胞的保护机制，在饥饿或药物刺激时肿瘤细胞会迅速提高自身自噬水平，来提供自身所需要的营养物质和能量[16-17]。但是，过度的自噬也会抑制肿瘤细胞生长，致使细胞发生自噬性死亡[16-17]。细胞凋亡与自噬功能的异常与结肠癌的发生发展也具有密切关系[18]。手术加化疗是目前治疗结肠癌的常用方法，而恶性肿瘤细胞对化疗药物产生耐受性是导致治疗进程受阻的主要原因。由于中国传统中药具有多靶点、多成分的特性，因此在恶性肿瘤治疗方面逐渐受到关注[19]。紫草素目前已显示出了多种抗肿瘤活性，可能是潜在的有效药物[9]。

本课题组前期首先通过初步的MTT试验进行抗肿瘤活性筛选，计算出紫草素对HCT116细胞增殖的半数抑制浓度（IC_{50}）约为20 μg/mL。故在本研究中采用IC_{50}作为中质量浓度（20 μg/mL）、1/2的IC_{50}作为低质量浓度（10 μg/mL）、2倍IC_{50}作为高质量浓度（40 μg/mL）进行研究。结果发现，低、中、高质量浓度紫草素作用于HCT116细胞48 h后均能有效抑制其增殖活性，且具有一定的浓度依赖性趋势。在此基础上，本课题组进一步研究紫草素是否诱导HCT116细胞发生了经典的细胞Ⅰ型程序性死亡（凋亡）和Ⅱ型程序性死亡（自噬）。经Annexin Ⅴ-FITC/PI双染流式细胞术检测后发现，HCT116细胞在紫草素的诱导下发生了凋亡，其中在高质量浓度（40 μg/mL）紫草素的诱导下效果最为显著。

LC3是哺乳动物中酵母ATG8的同源物，参与自噬体的形成，常被作为细胞自噬的标志性因子[20]。本研究结果显示，紫草素作用48 h后，细胞中LC3 mRNA的表达水平显著升高，提示自噬体形成增多。自噬的发生主要受两条途径的调节：mTOR途径和Beclin-1途径。其中，*Beclin*-1是哺乳类动物中第1个被确认参与自噬调节的特异性基因，主要通过和磷脂酰肌醇3-激酶（P13K）形成复合体来参与自噬体的形成，在细胞的自噬和凋亡中发挥着重要作用[21]。本研究结果显示，紫草素作用48 h后，HCT116细胞中Beclin-1 mRNA的表达水平显著升高，提示HCT116细胞中的自噬途径受到调节，促进了自噬体的形成。p62是经典的自噬标志基因，是自噬活化过程中的重要调节分子，在调控细胞的生长过程中发挥着重要作用，最终在自噬溶酶体中进行降解[22]。本研究结果显示，紫草素作用48 h后，HCT116细胞中p62 mRNA的表达水平显著降低，这可能是由于LC3的生成增多，导致了p62的降解加快所致。

LC3蛋白存在LC3Ⅰ与LC3Ⅱ两种形式：当自噬发生时，LC3蛋白C端被蛋白酶切割形成LC3Ⅰ，定位于细胞质；LC3Ⅰ经泛素样加工修饰形成LC3Ⅱ，定位于自噬溶酶体膜上[23-24]。LC3Ⅱ/LC3Ⅰ比值能更直观地反映自噬活性，与自噬体形成的数量成正比[23-24]。为进一步明确紫草素是否激活HCT116细胞的自噬途径，本研究采用Western blotting法在分子水平上证实了紫草素作用48 h后可显著升高HCT116细胞中Beclin-1蛋白表达水平和LC3Ⅱ/LC3Ⅰ比值，显著降低p62蛋白表达水平。该结果提示，紫草素可以有效激活HCT116细胞中的Beclin-1自噬途径，这与伊曲康唑可通过激活人结肠癌细胞自噬而诱导凋亡的研究结果一致[25]。

综上所述，紫草素可诱导人结肠癌细胞HCT116发生凋亡，并激活其自噬途径，提示紫草素可能是有效治疗结肠癌的天然活性药物之一。但凋亡与自噬之间关系复杂，有研究显示，自噬的启动可诱导细胞凋亡[26]。本研究也发现，紫草素在诱导HCT116细胞凋亡的同时也能诱导其发生自噬，但两者之间具体的相关机制还需进一步研究。

参考文献

[1] ZHOU P, WANG C, HU Z, et al. Genistein induces apoptosis of colon cancer cells by reversal of epithelial-to-

mesenchymal via a Notch1/NF-κB/slug/E-cadherin pathway[J]. BMC Cancer，2017，17(1)：813-843.
[2] KUIPERS EJ，GRADY WM，LIEBERMAN D，et al. Colorectal cancer[J]. Nat Rev Dis Primers，2015. DOI：10.1038/nrdp.2015.6510.1038/nrdp.2015.65.
[3] MOREIRA H，SZYJKA A，PALISZKIEWICZ K，et al. Prooxidative activity of celastrol induces apoptosis，DNA damage，and cell cycle arrest in drug-resistant human colon cancer cells[J]. Oxid Med Cell Longev，2019. DOI：10.1155/2019/6793957.
[4] MINICOZZI P，VICENTINI M，INNOS K，et al. Comorbidities，timing of treatments，and chemotherapy use influence outcomes in stage Ⅲ colon cancer：a population-based European study[J]. Eur J Surg Oncol，2020，46(6)：1151-1159.
[5] SINGH KE，TAYLOR TH，PAN CG，et al. Colorectal cancer incidence among young adults in California[J]. J Adolesc Young Adult Oncol，2014，3(4)：176-184.
[6] JE HD，KIM HD，LA HO. The inhibitory effect of shikonin on the agonist-induced regulation of vascular contractility[J]. Biomol Ther：Seoul，2015，23(3)：233-237.
[7] WANG F，MAYCA POZO F，TIAN D，et al. Shikonin inhibits cancer through P21 upregulation and apoptosis induction[J]. Front Pharmacol，2020. DOI：10.3389/fphar.2020.00861.
[8] CAO HH，LIU DY，LAI YC，et al. Inhibition of the STAT3 signaling pathway contributes to the anti-melanoma activities of shikonin[J]. Front Pharmacol，2020. DOI：10.3389/fphar.2020.00748.
[9] MA X，YU M，HAO C，et al. Shikonin induces tumor apoptosis in glioma cells via endoplasmic reticulum stress，and Bax/Bak mediated mitochondrial outer membrane permeability[J]. J Ethnopharmacol，2020. DOI：10.1016/j.jep.2020.113059.
[10] CHANDIMALI N，SUN HN，KONG LZ，et al. Shikonin-induced apoptosis of colon cancer cells is reduced by peroxiredoxin Ⅴ expression[J]. Anticancer Res，2019，39(11)：6115-6123.
[11] LIU XD. MicroRNA-18a upregulates autophagy and ataxia telangiectasia mutated gene expression in HCT116 colon cancer cells[J]. Mol Med Rep，2013. DOI：10.3892/mmr.2012.1214.
[12] 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 Cancer J Clin，2018，68(6)：394-424.
[13] KIMMELMAN AC，WHITE E.Autophagy and tumor metabolism[J]. Cell Metab，2017，25(5)：1037-1043.
[14] ZHOU C，JIANG X，LIANG A，et al. COX10-AS1 facilitates cell proliferation and inhibits cell apoptosis in glioblastoma cells at post-transcription level[J]. Neurochem Res，2020. DOI：10.1007/s11064-020-03081-4.
[15] GU ZG，SHEN GH，LANG JH，et al. Effects of long noncoding RNA URHC on proliferation，apoptosis and invasion of colorectal cancer cells[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci，2020. DOI：10.26355/eurrev-202008-22444.
[16] LIU G，PEI F，YANG F，et al. Role of autophagy and apoptosis in non-small-cell lung cancer[J]. Int J Mol Sci，2017. DOI：10.3390/ijms18020367.
[17] LI YJ，LEI YH，YAO N，et al. Autophagy and multidrug resistance in cancer[J]. Chin J Cancer，2017，36(1)：52-85.
[18] GEORGOPOULOS SD，POLYMEROS D，TRIANTAFYLLOU K，et al. Hypergastrinemia is associated with increased risk of distal colon adenomas[J]. Digestion，2006，74(1)：42-46.
[19] ZHAO Q，LI J，WU B，et al. A nano-traditional Chinese medicine against lymphoma that regulates the level of reactive oxygen species[J]. Front Chem，2020. DOI：10.3389/fchem.2020.00565.
[20] KIHARA A，KABEYA Y，OHSUMI Y，et al. Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network[J]. EMBO Rep，2001，2(4)：330-335.
[21] YUE Z，JIN S，YANG C，et al. Beclin 1，an autophagy gene essential for early embryonic development，is a haploinsufficient tumor suppressor[J]. Proc Natl Acad Sci USA，2003，100(25)：15077-15082.
[22] APEL A，HERR I，SCHWARZ H，et al. Blocked autophagy sensitizes resistant carcinoma cells to radiation therapy[J]. Cancer Res，2008，68(5)：1485-1494.
[23] GOLDBERG AL. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins[J]. Nature，2003，426(6968)：895-899.
[24] YOSHIOKA A，MIYATA H，DOKI Y，et al. LC3，an autophagosome marker，is highly expressed in gastrointestinal cancers[J]. Int J Oncol，2008，33(3)：461-468.
[25] DENG H，HUANG L，LIAO Z，et al. Itraconazole inhibits the Hedgehog signaling pathway thereby inducing autophagy-mediated apoptosis of colon cancer cells[J]. Cell Death Dis，2020. DOI：10.1038/s41419-020-02742-0.
[26] WANG L，HU T，SHEN J，et al. Dihydrotanshinone Ⅰ induced apoptosis and autophagy through caspase dependent pathway in colon cancer [J]. Phytomedicine，2015，22(12)：1079-1087.

（收稿日期：2020-08-14　修回日期：2020-09-23）
（编辑：林　静）