柠檬苦素对大鼠肝纤维化的影响及机制初探Δ

肖玉洪[1*]，安祯祥[2#]（1.贵州中医药大学第一临床医学院，贵阳 550002；2.贵州中医药大学第一附属医院消化内科，贵阳 550001）

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1001-0408（2022）24-2968-05
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.24.05

摘 要 目的 探讨柠檬苦素对大鼠肝纤维化的影响及机制。**方法** 将42只SD雄性大鼠随机分为正常组、模型组、阳性对照组（秋水仙碱0.1 mg/kg）和柠檬苦素低、高剂量组（12.5、50 mg/kg），正常组和模型组各9只，其余组各8只。除正常组外，采用四氯化碳构建肝纤维化模型。造模成功后，正常组及模型组灌胃水，其余各组灌胃相应药物，每日1次，持续4周。末次给药后，采用酶联免疫吸附测定法检测各组大鼠血清中丙氨酸转氨酶（ALT）、天冬氨酸转氨酶（AST）、透明质酸（HA）、层粘连蛋白（LN）含量；采用苏木精-伊红（HE）及Masson染色观察肝组织形态和肝纤维化变化；采用Western blot法检测肝组织中蛋白激酶B（Akt）、磷酸化Akt（p-Akt）、E-钙黏蛋白（E-cadherin）、波形蛋白（vimentin）蛋白表达水平，并计算p-Akt/Akt比值。**结果** 与正常组比较，模型组大鼠血清ALT、AST、HA、LN含量均显著升高（$P<0.01$），HE及Masson染色均观察到肝组织有大量纤维组织增生，肝组织中Akt、p-Akt、vimentin蛋白表达水平及p-Akt/Akt比值均显著升高（$P<0.01$），E-cadherin蛋白表达水平显著降低（$P<0.01$）。与模型组比较，柠檬苦素低、高剂量组大鼠肝组织的纤维增生程度均有所减轻，除柠檬苦素低剂量组的LN、E-cadherin指标外其余指标均显著逆转（$P<0.05$或$P<0.01$）。**结论** 柠檬苦素能改善大鼠肝纤维化，作用机制可能与抑制Akt磷酸化及逆转上皮间质转化进程有关。

关键词 柠檬苦素；肝纤维化；上皮间质转化；大鼠

Effect of limonin on liver fibrosis in rats and preliminary exploration of its mechanism

XIAO Yuhong[1], AN Zhenxiang[2] (1. The First Clinical Medical College, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China; 2. Dept. of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE To explore the effect and mechanism of limonin on liver fibrosis in rats. **METHODS** Forty-two SD male rats were randomly divided into normal group, model group, positive control group (colchicine, 0.1 mg/kg), low-dose group of limonin (12.5 mg/kg) and high-dose group of limonin (50 mg/kg), with 9 rats in normal group and model group, and 8 rats in other groups. Except for normal group, the model of liver fibrosis was established by carbon tetrachloride. After modeling, normal group and model group were given distilled water intragastrically, and administration groups were given relevant medicine intragastrically, once a day, for consecutive 4 weeks. After the last medication, the serum contents of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), hyaluronic acid (HA) and laminin (LN) in rats were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. HE and Masson staining were used to observe the pathological changes and fibrotic change of liver tissue. Western blot assay was used to detect the protein expressions of protein kinase B (Akt), phosphorylated-protein kinase B (p-Akt), E-cadherin and vimentin in liver tissue; ratio of p-Akt/Akt was calculated. **RESULTS** Compared normal group, the serum contents of ALT, AST, HA and LN in rats were all increased significantly in model group ($P<0.01$); HE and Masson staining showed that a large number of fibrous tissue hyperplasia, protein expressions of Akt, p-Akt and vimentin as well as p-Akt/Akt ratio in liver tissue were significantly increased ($P<0.01$), while E-cadherin protein expression was significantly decreased ($P<0.01$). Compared with model group, the degree of fibrosis hyperplasia in liver tissue was relieved in high-dose group and low-dose group of limonin, and other indexes were all reversed significantly except for LN and E-cadherin in the low-dose group of limonin ($P<0.01$ or $P<0.05$). **CONCLUSIONS** Limonin can improve liver fibrosis in rats, the mechanism of which may be related to the inhibition of Akt phosphorylation and reversal of epithelial-mesenchymal transition process.

KEYWORDS limonin; liver fibrosis; epithelial-mesenchymal transition; rat

Δ **基金项目** 国家自然科学基金资助项目（No.82160893，No.81760865）；国家中医药管理局第五批全国中医临床优秀人才研修项目（No.国中医药人教函〔2022〕1号）

* **第一作者** 硕士研究生。研究方向：中西医结合防治消化系统疾病的基础及临床研究。E-mail：paulhsiao2021@163.com

通信作者 主任医师，教授，博士生导师，博士。研究方向：中西医结合防治消化系统疾病的基础及临床研究。E-mail：407206115@qq.com

肝纤维化是由各种致病因子导致慢性肝损伤的病理性修复过程，细胞外基质过度沉积是其主要病理特征。肌成纤维细胞是产生细胞外基质的核心细胞，而肝细胞、肝星状细胞和胆管上皮细胞可通过上皮间质转化（epithelial mesenchymal transition，EMT）为肌成纤维细胞[1]。近年来研究发现，EMT可促进肝纤维化的发生发展，但EMT过程是可逆的，抑制细胞EMT过程，能减缓甚至逆转肝纤维化进程[2]。这使得逆转EMT成为抗肝纤维化的潜在策略。

柠檬苦素是一种三萜类化合物，也是橙子和柠檬种子以及果皮中的主要活性成分，具有保肝、抗肝癌、抗炎等药理作用[3]。有研究表明，柠檬苦素可通过转化生长因子β_1（transforming growth factor-β_1，TGF-β_1）/Smad信号通路来逆转博来霉素诱导的肺组织EMT过程，减轻小鼠的肺纤维化[4]。为探究柠檬苦素对肝纤维化的改善作用，以及其抗肝纤维化作用是否与调控EMT相关，本研究以四氯化碳（CCl_4）造模法构建肝纤维化大鼠模型，观察柠檬苦素对大鼠肝纤维化的影响，并基于EMT角度，初步探讨其可能的作用机制，旨在为柠檬苦素的药理研究与开发利用提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有DM500型光学显微镜（德国Leica公司）、TGL-20M型台式高速冷冻离心机（长沙高新开发区湘仪贝克仪器仪表有限公司）、EPS-300型电泳仪（上海天能科技有限公司）、RS-25S型超声波细胞粉碎机（宁波荣顺科技仪器厂）、EL10A型自动酶标仪（博科控股集团有限公司）、Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System型蛋白电泳槽和Mini Trans-Blot型蛋白转印系统（美国Bio-Rad公司）、LIDE 200型扫描仪（日本Canon公司）等。

1.2 主要药品与试剂

柠檬苦素对照品（批号NMKS2021081，纯度99.58%）购自南京春秋生物工程有限公司；秋水仙碱片（批号201202，规格0.5 mg）购自西双版纳版纳药业有限责任公司；CCl_4（批号20181008，纯度≥99.5%）购自天津市大茂化学试剂厂；透明质酸（hyaluronic acid，HA）、层粘连蛋白（laminin，LN）试剂盒（货号分别为RA20032/20211010、RA20606/20211010）均购自武汉贝茵莱生物科技有限公司；丙氨酸转氨酶（alanine aminotransferase，ALT）、天冬氨酸转氨酶（aspartate aminotransferase，AST）试剂盒（批号分别为20211015、20211016）均购自南京建成生物工程研究所；ECL高灵敏度化学发光检测试剂盒、ECL低背景发光检测试剂盒和辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）标记的羊抗兔及羊抗鼠免疫球蛋白G抗体（批号分别为30330、50330、20330、30324）均购自江苏康为世纪生物科技有限公司；鼠源蛋白激酶B（protein kinase B，Akt）、磷酸化Akt（p-Akt）（Ser473）、波形蛋白（vimentin）克隆抗体（批号分别为10021367、10020148、10010984）均购自Proteintech中国公司；兔源E-钙黏蛋白（E-cadherin）多克隆抗体（批号AF06224214）购自北京博奥森生物技术有限公司；兔源甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）多克隆抗体（批号GR3316865-11）购自英国Abcam公司；水为蒸馏水。

1.3 动物

SD大鼠42只，SPF级，雄性，体质量180～220 g，购自辽宁长生生物技术股份有限公司，生产许可证号为SCXK（辽）2020-0001。大鼠由贵州中医药大学实验动物中心喂养。大鼠自由饮水摄食，适应性喂养1周后开始实验。本实验由贵州中医药大学动物实验伦理委员会批准（批号20210008）。

2 方法

2.1 动物分组、建模、给药及取材

将大鼠随机分成正常组、模型组、阳性对照组（秋水仙碱0.1 mg/kg）[5]和柠檬苦素低、高剂量组（12.5、50 mg/kg）[4]，正常组和模型组各9只，其余每组各8只。除正常组大鼠腹腔注射橄榄油外，其余各组大鼠均腹腔注射含50%CCl_4的橄榄油混合溶液（体积比1∶1），注射体积为1.5 mL/kg，每周2次，连续注射8周，构建肝纤维化模型[6]。注射造模8周后，从正常组和模型组中各抽取1只大鼠处死并取出肝脏行苏木精-伊红（HE）染色，依据Scheuer评分系统评估造模成功[7]。从第9周起，各组大鼠按10 mL/kg灌胃，正常组及模型组给予水，其余各组大鼠给予相应药物（临用时用水溶解），每日1次，连续给药4周。末次给药后（第12周末），大鼠禁食不禁水12 h，腹腔注射3%戊巴比妥钠麻醉后采血，离心后留取血清，于－20 ℃保存，用于酶联免疫吸附测定；大鼠采血后处死，将肝右叶组织用4%多聚甲醛溶液固定，用于HE和Masson染色；剩余肝组织立即冻存在－80 ℃冰箱中，用于Western blot检测。整个实验期间，正常组和模型组大鼠无死亡，阳性对照组和柠檬苦素低、高剂量组各死亡1只大鼠，总计死亡3只大鼠。

2.2 血清中肝功能指标和肝纤维化指标的检测

采用酶联免疫吸附测定法，按试剂盒说明书步骤操作，检测各组大鼠血清中ALT、AST、HA、LN含量。

2.3 肝组织形态和肝纤维化的观察

取“2.1”项下各组3只大鼠固定于4%多聚甲醛溶液的肝组织，石蜡包埋、切片，每只大鼠取3个切片进行HE染色，另外取3个切片进行Masson染色，用光学显微镜观察肝组织形态和肝纤维化并采集图像，用Image-Pro Plus 6.0软件测定Masson染色图像的光密度和面积，计算平均光密度。

2.4 肝组织中Akt、p-Akt、E-cadherin、vimentin蛋白表达的检测

取“2.1”项下各组3只大鼠冻存在－80 ℃冰箱中的肝组织，称定质量后尽可能剪碎，加入组织蛋白抽提试剂，冰浴匀浆、超声破碎及离心后收集上清液，测定各样本蛋白含量。对蛋白进行加热变性处理后，电泳分离蛋白，转膜，封闭，洗膜后，分别加入E-cadherin、p-Akt、Akt、vimentin、GAPDH一抗（稀释度分别为1∶1 000、1∶3 000、1∶3 000、1∶10 000、1∶10 000），4 ℃孵育过夜；膜洗涤后加入相应的二抗（稀释度为1∶200），室温孵育后，漂洗，ECL化学发光和曝光显影及定影。使用Gel-Pro Analyzer 4软件分析目标蛋白的灰度值，以目标蛋白与内参蛋白（GAPDH）的灰度值比值表示目标蛋白的表达水平，并计算p-Akt/Akt比值。

2.5 统计学方法

使用SPSS 26.0软件进行统计分析。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，方差齐性时组间两两比较采用LSD-t检验，方差不齐时组间两两比较选择Tamhane-$T2$检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 柠檬苦素对肝纤维化模型大鼠血清肝功能指标的影响

与正常组比较，模型组大鼠血清中ALT、AST含量均显著升高（$P<0.01$）；与模型组比较，阳性对照组和柠檬苦素低、高剂量组大鼠血清中ALT、AST含量均显著降低（$P<0.01$）。结果见表1。

表1 柠檬苦素对肝纤维化模型大鼠血清肝功能指标的影响（$\bar{x}\pm s$，U/L）

组别	n	ALT	AST
正常组	8	4.88±2.14	6.78±2.25
模型组	8	56.65±9.30[a]	75.80±12.12[a]
阳性对照组	7	19.44±6.05[b]	21.10±6.61[b]
柠檬苦素高剂量组	7	27.41±4.95[b]	16.30±6.58[b]
柠檬苦素低剂量组	7	21.74±3.01[b]	18.82±2.57[b]

a：与正常组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.01$

3.2 柠檬苦素对肝纤维化模型大鼠血清纤维化指标的影响

与正常组比较，模型组大鼠血清中HA、LN含量均显著升高（$P<0.01$）；与模型组比较，阳性对照组和柠檬苦素低、高剂量组大鼠血清中HA含量均显著降低（$P<0.01$），阳性对照组和柠檬苦素高剂量组大鼠血清中LN含量均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$），柠檬苦素低剂量组大鼠血清中LN含量差异无统计学意义（$P>0.05$）。结果见表2。

表2 柠檬苦素对肝纤维化模型大鼠血清纤维化指标的影响（$\bar{x}\pm s$，ng/mL）

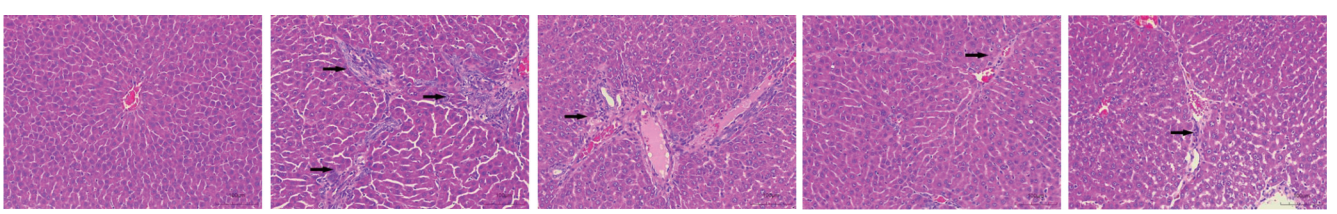
组别	n	HA	LN
正常组	8	19.28±5.30	119.07±16.13
模型组	8	69.43±12.64[a]	187.63±40.22[a]
阳性对照组	7	27.46±1.80[b]	140.37±26.30[b]
柠檬苦素高剂量组	7	21.17±4.20[b]	149.14±12.44[c]
柠檬苦素低剂量组	7	27.06±5.45[b]	181.43±21.45

a：与正常组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.01$；c：与模型组比较，$P<0.05$

3.3 柠檬苦素对肝纤维化模型大鼠肝组织病理学变化的影响

3.3.1 组织形态 如图1所示，正常组大鼠肝窦无扩张，门管区结构完整，未见纤维组织增生及炎性细胞浸润。模型组大鼠可见纵横交错的纤维间隔，纤维组织大量增生，肝小叶紊乱，门管区变宽，大量炎性细胞浸润，少量肝细胞坏死，肝细胞脂肪变性明显。阳性对照组大鼠肝脏被膜完整，纤维组织明显增生，纤维间隔内可见炎性细胞浸润。柠檬苦素高剂量组大鼠肝脏被膜完整，肝细胞轻度脂肪变性，纤维组织少量增生，可见炎性细胞浸润。柠檬苦素低剂量组大鼠肝脏被膜完整，纤维组织中度增生，门管区见明显炎性细胞浸润。与模型组比较，阳性对照组和柠檬苦素低、高剂量组大鼠肝组织纤维增生程度均有所减轻，炎症程度均有所改善。

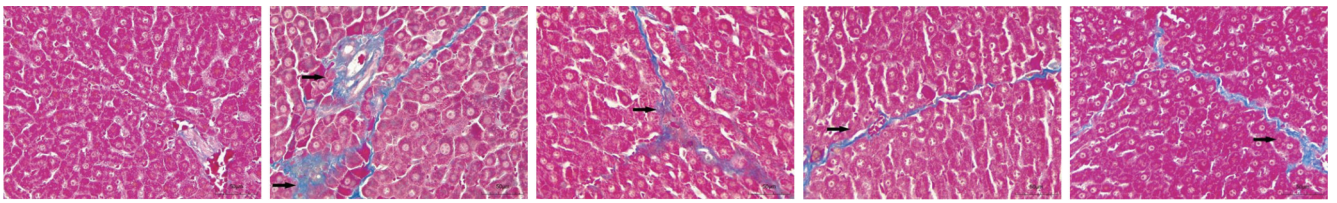
3.3.2 纤维化 如图2所示，正常组大鼠汇管区观察到少量蓝色胶原纤维沉积。模型组大鼠可见大量蓝色胶原纤维沉积，纤维增生明显；与模型组比较，阳性对照组和柠檬苦素低、高剂量组大鼠的蓝色胶原纤维沉积减少，纤维增生程度有所改善。正常组、模型组、阳性对照组和柠檬苦素低、高剂量组大鼠肝纤维化表达的平均光密度分别为0.023±0.009、0.282±0.012、0.198±0.010、0.199±0.060、0.191±0.009（$n=3$）。与正常组比较，模型组大鼠肝纤维化表达的平均光密度显著升高（$P<0.01$）；与模型组比较，阳性对照组与柠檬苦素高剂量组大鼠肝纤维化表达的平均光密度均显著降低（$P<0.01$），柠檬苦素低剂量组大鼠肝纤维化表达的平均光密度差异无统计学意义（$P>0.05$）。



A.正常组 B.模型组 C.阳性对照组 D.柠檬苦素高剂量组 E.柠檬苦素低剂量组

→：纤维组织

图1 柠檬苦素对肝纤维化模型大鼠肝组织形态变化的影响（HE染色，×200）



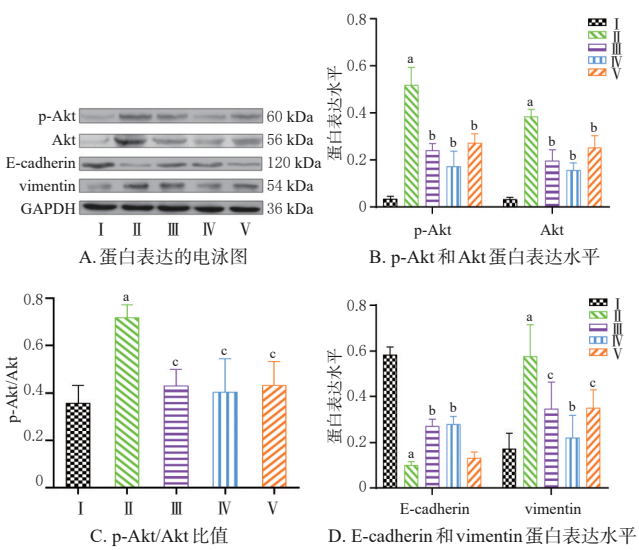
A. 正常组　B. 模型组　C. 阳性对照组　D. 柠檬苦素高剂量组　E. 柠檬苦素低剂量组

→：胶原纤维

图2　柠檬苦素对肝纤维化模型大鼠肝纤维化变化的影响（Masson染色，×400）

3.4　柠檬苦素对肝纤维化模型大鼠肝组织中Akt、p-Akt、E-cadherin、vimentin蛋白表达及p-Akt/Akt比值的影响

与正常组比较，模型组大鼠肝组织中Akt、p-Akt、vimentin蛋白表达水平及p-Akt/Akt比值均显著升高（$P<0.01$），E-cadherin蛋白表达水平显著降低（$P<0.01$）；与模型组比较，阳性对照组和柠檬苦素低、高剂量组大鼠肝组织中Akt、p-Akt、vimentin蛋白表达水平及p-Akt/Akt比值均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$），阳性对照组和柠檬苦素高剂量组大鼠肝组织中E-cadherin蛋白表达水平均显著升高（$P<0.01$），柠檬苦素低剂量组大鼠肝组织中E-cadherin蛋白表达水平差异无统计学意义（$P>0.05$）。结果见图3。



Ⅰ：正常组；Ⅱ：模型组；Ⅲ：阳性对照组；Ⅳ：柠檬苦素高剂量组；Ⅴ：柠檬苦素低剂量组；a：与正常组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.01$；c：与模型组比较，$P<0.05$

图3　柠檬苦素对肝纤维化模型大鼠肝组织中p-Akt、Akt、E-cadherin、vimentin蛋白表达及p-Akt/Akt比值的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

4　讨论

柠檬苦素是一种天然化学物质，对急性肝损伤具有改善作用[8]，同时也可通过减少脂质积累、抑制炎症和氧化应激来缓解非酒精性脂肪性肝病的发展[9]。本研究采用CCl_4造模法构建肝纤维化大鼠模型，考察柠檬苦素对大鼠肝纤维化的影响，同时选用有明显抗肝纤维化作用的秋水仙碱作为阳性对照药物进行比较[10]。CCl_4造模法具有价格低廉、可靠性高、重复性好、与人类肝纤维化病理相似性高等特点，已成为了应用最广泛的肝纤维化造模方法[11]。CCl_4可造成肝细胞损害，引起肝细胞膜通透性增高，胞浆内的ALT、AST释放入血，使血液中ALT、AST含量升高，是判断肝细胞损伤与否及损伤程度的主要指标[12]。HA、LN是参与细胞外基质合成的主要成分，可反映肝内纤维增生情况[13]。本研究结果显示，与正常组比较，模型组大鼠血清中ALT、AST、HA、LN含量均显著升高，HE及Masson染色均观察到大量纤维组织增生，表明肝纤维化模型造模成功。与模型组比较，经柠檬苦素干预后，大鼠血清中HA、LN（柠檬苦素低剂量组除外）、AST、ALT含量均显著降低，肝组织纤维增生程度均有所减轻，表明柠檬苦素对肝纤维化模型大鼠的肝损伤和肝纤维化有一定的改善作用。

EMT是指上皮细胞在致病因子（如细胞生长因子、缺氧、炎症等）刺激下丧失细胞极性，细胞间黏附力降低，获得迁移的能力，变为具备间质细胞特征细胞的过程[14]。E-cadherin是黏附连接的关键成分，在维持细胞黏附和上皮表型中不可或缺，其表达下调会导致细胞间的黏附力降低，使细胞失去极性，是主要的上皮标志物[15]。vimentin是间质细胞骨架的主要组成部分，也是主要的间充质标志物，正常上皮细胞中vimentin表达较少，当发生EMT时上皮细胞角蛋白转化为以vimentin为主的细胞骨架，具有间质细胞形态和游走能力[16]。Akt磷酸化可调控细胞核内的转录因子，转录因子与E-cadherin结合，可导致E-cadherin表达下降，进而诱导EMT发生[17-18]。本研究结果显示，与模型组比较，阳性对照组和柠檬苦素低、高剂量组大鼠肝组织中Akt、p-Akt、vimentin蛋白表达水平及p-Akt/Akt比值均显著降低，E-cadherin蛋白表达水平（柠檬苦素低剂量组除外）均显著升高，表明柠檬苦素能抑制Akt蛋白磷酸化，逆转EMT进程。

综上所述，柠檬苦素能改善大鼠肝纤维化，作用机制可能与其抑制Akt磷酸化及逆转EMT进程有关。

参考文献

[1] XIE G, DIEHL A M. Evidence for and against epithelial-to-mesenchymal transition in the liver[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2013, 305(12): G881-G890.

[2] YU K, LI Q, SHI G, et al. Involvement of epithelial-

mesenchymal transition in liver fibrosis[J]. Saudi J Gastroenterol, 2018, 24(1): 5-11.
[3] 尤文挺, 王洒, 何龙, 等. 柠檬苦素单体的药理活性研究进展[J]. 中药材, 2017, 40(1): 242-246.
[4] WANG X Q, OUYANG Z J, YOU Q, et al. Obaculactone protects against bleomycin- induced pulmonary fibrosis in mice[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2016, 303: 21-29.
[5] 丁茂鹏, 韦凌霞, 王志旺, 等. 鳖甲育肝颗粒对肝纤维化大鼠的作用机制研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(10): 1167-1170, 1175.
[6] 安祯祥, 李金芳, 戴鸿志, 等. 猕猴桃藤水提物对肝纤维化模型大鼠的保护作用及机制研究[J]. 中药新药与临床药理, 2022, 33(4): 426-432.
[7] 陆伦根, 尤红, 谢渭芬, 等. 肝纤维化诊断及治疗共识: 2019年[J]. 肝脏, 2019, 24(9): 975-983, 996.
[8] YANG R, YU H, CHEN J, et al. Limonin attenuates LPS-induced hepatotoxicity by inhibiting pyroptosis via NLRP3/gasdermin D signaling pathway[J]. J Agric Food Chem, 2021, 69(3): 982-991.
[9] WANG S W, LAN T, CHEN H F, et al. Limonin, an AMPK activator, inhibits hepatic lipid accumulation in high fat diet fed mice[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 833705.
[10] 韩秋玉, 韩爱琴, 陈林. 秋水仙碱治疗早期肝硬化的疗效观察[J]. 现代医药卫生, 2005, 21(24): 3367-3368.
[11] 庄子锐, 王明亮, 张婷, 等. 肝肾纤维化动物模型的研究进展及评价[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 845-852.
[12] 许琼梅, 李跃龙, 曹后康, 等. 溪黄草水提物对四氯化碳诱导大鼠肝纤维化的保护作用及机制研究[J]. 中国药房, 2018, 29(20): 2791-2796.
[13] 鲍丽雅, 刘梅, 杜瑶, 等. 血清肝纤四项检测在肝硬化诊断中的应用价值[J]. 检验医学与临床, 2020, 17(16): 2359-2361.
[14] 王鑫, 李峰, 谭家明. EMT与肿瘤侵袭转移的研究进展[J]. 蛇志, 2016, 28(3): 342-345.
[15] 李欢, 张评梅, 王郁, 等. lncRNA NORAD促进食管鳞状细胞癌EC9706细胞的增殖和迁移[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2020, 27(4): 359-364.
[16] 郭鱼波, 王春晖, 裴晓华. 乳腺癌细胞上皮间质转化的分子机制及其防治的研究进展[J]. 中国肿瘤, 2018, 27(12): 933-943.
[17] 熊盼盼, 刘菲. 上皮间质转化相关信号通路在肝纤维化中作用的研究进展[J]. 国际消化病杂志, 2016, 36(3): 153-155, 196.
[18] 许姗姗. Twist、Slug和Snail在食管鳞状细胞癌中的表达及其预后意义[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2021.

（收稿日期：2022-07-26　修回日期：2022-11-19）
（编辑：邹丽娟）

（上接第2967页）

[11] 卢丹, 彭小兰, 熊珊, 等. 高良姜素促进胰腺癌PCNA-1细胞凋亡和自噬并抑制移植瘤生长[J]. 广州中医药大学学报, 2021, 38(9): 1963-1971.
[12] 王娟娟, 王苏美, 吴万垠, 等. 山柰酚调控Akt/Bcl-2/Caspase通路促进非小细胞肺癌细胞发生凋亡[J]. 中药材, 2021, 44(8): 1946-1950.
[13] 齐鑫鑫, 刘涛. 细胞自噬与细胞凋亡及其交互作用在肝癌治疗中的研究进展[J]. 医学综述, 2020, 26(20): 4038-4042, 4048.
[14] MAFFEI S, DEL RY S, PRONTERA C, et al. Increase in circulating levels of cardiac natriuretic peptides after hormone replacement therapy in postmenopausal women [J]. Clin Sci (Lond), 2001, 101(5): 447-453.
[15] ZHANG L L, TU Y, HE W, et al. A novel mechanism of hepatocellular carcinoma cell apoptosis induced by lupeol via brain-derived neurotrophic factor inhibition and glycogen synthase kinase 3 beta reactivation[J]. Eur J Pharmacol, 2015, 762: 55-62.
[16] WEH K M, HOWELL A B, KRESTY L A. Expression, modulation, and clinical correlates of the autophagy protein Beclin-1 in esophageal adenocarcinoma[J]. Mol Carcinog, 2016, 55(11): 1876-1885.
[17] YU X, LONG Y C, SHEN H M. Differential regulatory functions of three classes of phosphatidylinositol and phosphoinositide 3-kinases in autophagy[J]. Autophagy, 2015, 11(10): 1711-1728.
[18] LI F, ZHAN Z, QIAN J, et al. Naringin attenuates rat myocardial ischemia/reperfusion injury via PI3K/Akt pathway-mediated inhibition of apoptosis, oxidative stress and autophagy[J]. Exp Ther Med, 2021, 22(2): 811-818.
[19] ZHENG R, HUANG S, ZHU J, et al. Leucine attenuates muscle atrophy and autophagosome formation by activating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in rotator cuff tears [J]. Cell Tissue Res, 2019, 378(1): 113-125.

（收稿日期：2022-06-01　修回日期：2022-11-05）
（编辑：张元媛）