论　著

丁香活性组分体外抗结肠癌活性及对细胞自噬的影响

王　健[1]，刘　琳[1]，杨小会[1]，张　红[1]，赵　革[2]，刘明华[1]
1.西南医科大学药学院　药理教研室（泸州 646000）；2.西南医科大学附属医院 药学部（泸州 646000）

【摘　要】**目的** 体外实验评价丁香活性组分（active fraction from clove，AFC）的抗结肠癌活性，探讨AFC对敏感结肠癌细胞自噬的影响。**方法** 采用Cell Counting Kit-8 assay检测AFC对多株结肠癌细胞LOVO、HCT116、HCT8、SW620增殖的抑制作用，体外筛选敏感的人结肠癌细胞。GFP-LC3转染后荧光显微镜检测自噬水平的强弱，透射电镜观察自噬体和自噬溶酶体的形成，Western Blot检测自噬相关蛋白LC3、Beclin-1的表达。**结果** AFC对LOVO、HCT116、HCT8、SW620细胞的IC_{50}分别是280.90 ± 12.61、113.50 ± 7.83、211.71 ± 7.29、174.92 ± 9.52 μg/mL，最敏感的细胞是HCT116，最佳干预时间为48 h。AFC处理细胞48 h后，荧光显微镜观察到HCT116细胞GFP-LC3转染后出现明显自噬斑点，透射电镜观察到HCT116细胞大量的自噬体和自噬溶酶体形成。Western blot结果表明，HCT116细胞AFC处理组自噬相关蛋白LC3Ⅱ/LC3Ⅰ、Beclin-1相对表达量明显增高，呈现一定的时间与浓度依赖性，与对照组细胞比较差异明显（$P < 0.05$）。**结论** AFC抗结肠癌活性较强，对HCT116细胞最敏感，可能与其上调自噬相关蛋白LC3Ⅱ/LC3Ⅰ、Beclin-1的表达，诱导HCT116细胞发生自噬有关。

【关键词】丁香活性组分；HCT116细胞；增殖；自噬
【中图分类号】R979.1；R285.5　　文献标志码 A　　DOI：10.3969/j.issn.2096-3351.2023.02.016

Anti-colon cancer activity and effect on autophagy of active fraction from clove in vitro

WANG Jian[1]，*LIU Lin*[1]，*YANG Xiaohui*[1]，*ZHANG Hong*[1]，*ZHAO Ge*[2]，*LIU Minghua*[1]
1.*Department of Pharmacology，School of Pharmacy，Southwest Medical University，Luzhou 646000，China*；2.*Department of Pharmacy，the Affiliated Hospital of Southwest Medical University，Luzhou 646000，China*

【**Abstract**】**Objective** To study the anti-colon cancer activity of active fraction from clove（AFC）and the effect of AFC on autophagy of sensitive colon cancer cells in vitro. **Methods** Cell Counting Kit-8 assay was used to detect the inhibitory effect of AFC on the proliferation of Human Colon Cancer Cells LOVO、HCT116、HCT8 and SW620，in order to screen the sensitive cells. The level of autophagy was detected by GFP-LC3 transfection，the formation of autophagy and autophagy lysosome were observed by transmission electron microscope，and the expression of LC3 and Beclin-1 were detected by western blotting. **Results** The IC_{50} values of Lovo cells，HCT116 cells，HCT8 cells and SW620 cells were 280.90 ± 12.61，113.50 ± 7.83，211.71 ± 7.29，174.92 ± 9.52 μg/mL，respectively. The most sensitive cells were HCT116 cells，and the optimal intervention time was 48 hours. After transfection with GFP-LC3，autophagy spots were observed in the HCT116 cell of AFC treatment by fluorescence microscope. A large number of autophagosomes and autophagolysosomes were observed by transmission electron microscope. Western blot showed that the relative expression levels of autophagy-related proteins LC3II/LC3I and Beclin-1 in the HCT116 cell of AFC treatment were increased in a concentration-dependent manner and time-dependent manner，compared with the control group cell，$P < 0.05$. **Conclusion** AFC showed strong anti-colon cancer activity and it was most sensitive to HCT116 cells，which might be related to up-regulating autophagy-related protein LC3 ii/LC3 I，Beclin-1 expression and inducing autophagy in HCT116 cells.

【**Key words**】Active fraction from clove; HCT116 cells; Proliferation; Autophagy

根据2021年癌症统计最新数据，结肠癌（colon cancer）是中国发病率和病死率均较高的恶性肿瘤，仅次于肺癌和胃癌[1]。自噬（autophagy）与细胞凋亡不同，是一种在进化上高度保守的溶酶体吞噬降解自身成分的代谢途径，亦被称为Ⅱ型程序性细胞死亡。研究发现[2-3]，恶性肿瘤的发生、发展及转移均与自噬相关，因此针对自噬干预的相关策略有望成为一种新的肿瘤防治手段。丁香活性组分（active fraction from clove，AFC）是采用乙醇、丙酮及层析分离从桃金娘科植物丁香（*Eugenia caryophyllata* Thunb.）中提取的活性组分，经分离鉴定含2种抗肿瘤活性成分，分别为单体化合物齐墩果酸（OA）与单体化合物丁香酚（eugenol）[4-6]。

基金项目：四川省科技厅重点研发项目（2019YFS0116）；泸州市-西南医科大学联合项目（20YKDHZ0008）；叙州区人民政府-西南医科大学科技专项（2019-YBXNYD-2）；四川省杰出青年科技人才项目（2019JDJQ33）
通信作者：刘明华，Email：liumhvip@163.com
引用本文：王健，刘琳，杨小会，等. 丁香活性组分体外抗结肠癌活性及对细胞自噬的影响[J]. 西南医科大学学报，2023，46（2）：167-170，179. DOI：10.3969/j.issn.2096-3351.2023.02.016

前期研究发现OA与Eugenol均有一定体内抗胰腺癌活性，但均不如AFC抑瘤活性明显[7-8]。本研究系统评价AFC的体外抗结肠癌活性，观察AFC对LOVO、HCT116、HCT8、SW620细胞的抑制作用，筛选活性最强的结肠癌细胞，并探讨AFC对最敏感的结肠癌细胞自噬的影响，阐明其抗结肠癌作用的分子机制，旨在为AFC的临床应用及开发中药有效成分的抗肿瘤研究提供科学依据及新的思路。

1 材料

1.1 细胞株

多株人结肠癌细胞（LOVO、HCT116、HCT8、SW620），分别购自上海中国科学院细胞资源中心或武汉大学保藏中心（简称CCTCC）。细胞均采用RPMI1640 + 10%FBS培养，基本实验室常规培养、传代、冻存。

1.2 药物与试剂

AFC：为棕褐色粉末，由首都医科大学林秀坤教授提供，本实验室4 ℃保存，临用时用生理盐水超声助溶。AFC制备工艺如下：丁香粉末10.0 kg（山东青岛中药公司，批号20200514），用40 L的95%乙醇在室温下提取、过滤，72 h后将过滤液悬浮于蒸馏水中，浓缩获得丁香粗提物。乙酸乙酯进行再提取，然后分别用硅胶柱色谱法（CC，200目，400目）和Sephadex lh-20cc进行分离，获得丁香活性组分AFC。AFC最后被青岛大学化学和分子工程研究室采用1H-和13C-NMR确定，其中丁香酚含量为75.6%，齐墩果酸为24.4%。兔抗人Beclin1抗体、LC3（微管相关蛋白1轻链3）抗体、鼠抗人β-actin抗体，购自美国Cell Signaling Technology公司。Cell Counting Kit-8试剂盒、Ad-mCherry-GFP-LC3B重组腺病毒、RIPA裂解液（强）、增强型BCA蛋白检测试剂盒、HRP标记山羊抗兔IgG二抗、PBS缓冲液、SDS-PAGE蛋白上样缓冲液（5×）、即用型Western转膜液、Super ECL Plus超敏发光液等均购自上海碧云天生物技术有限公司。

2 方法

2.1 CCK-8检测AFC体外抗结肠癌活性

分别选取在指数生长期的人结肠癌LOVO、HCT116、HCT8、SW620细胞，调整细胞数为5 × 10^4/mL，以90 μL/孔接种于96孔培养板。AFC储备液配制为5 mg/mL，实验时用培养基稀释为5个不同浓度，按每孔10 μL加药，使AFC终浓度分别为25、50、100、200、400 μg/mL。此外，阴性对照为等体积无血清培养基，阳性对照为顺铂（0.1、1.0、10 μg/mL）。每个浓度重复设4孔，分别设三个药物干预时间点（即24 h、48 h及72 h）。最后每孔加10 μL检测试剂Cell Counting Kit-8，孵育1 h后用美国MD公司SpectraMax M3多功能酶标仪检测培养板每孔的吸光度A450（450 nm）。首先根据A450按下列公式计算增殖抑制率（%），然后用IC_{50}（半数抑制浓度）计算软件根据增殖抑制率计算IC_{50}。

$$增殖抑制率(\%)=1-\frac{给药孔A450-空白孔A450}{对照孔A450-空白孔A450}\times 100\%$$

2.2 GFP-LC3重组腺病毒转染观察细胞自噬

取在对数生长期AFC最敏感的结肠癌细胞，细胞数调整为4 × 10^5/mL，500 μL/每孔接种于含细胞爬片的24孔板，24 h后加入Ad-mCherry-GFP-LC3重组腺病毒。按照病毒感染复数50 MOI（multiplicity of infection，MOI）计算所需病毒量，腺病毒冰上解冻，混匀后加入24孔板内。24 h后去除含病毒的培养液，换成500 μL含100 μg/mL AFC的培养基，对照组加等体积无血清培养基。培养48 h后去除培养液，PBS洗2次，每次2 min，然后细胞爬片用4%多聚甲醛固定10 min，PBS洗2次，每次3 min，最后用荧光显微镜拍照观察细胞自噬情况。

2.3 透射电镜观察自噬体和自噬溶酶体形成

取对数生长期AFC最敏感的结肠癌细胞，细胞数调整为1 × 10^6/mL，接种于60 mm培养皿中。24 h后加入含AFC的培养基处理细胞，使AFC终浓度为100（g/mL，对照组加等体积无血清培养基。培养48 h后收集细胞，PBS洗2次，采用2.5%戊二醛在室温下固定细胞，2 h后用1%四氧化锇，处理细胞约30 min。依次用50%、70%、95%、100%浓度的乙醇进行梯度脱水，包埋用环氧树脂812，然后超薄切片，厚度仅为l00 nm。采用醋酸双氧铀、醋酸铅溶液进行双重染色，然后透射电子显微镜观察细胞并拍照观察HCT116细胞超微结构变化，特别是自噬体和自噬溶酶体的形成情况。

2.4 Western blot检测LC3Ⅱ/LC3-Ⅰ、Beclin-1的表达

取对数生长期AFC最敏感的结肠癌细胞，细胞数调整为4 × 10^5/mL，接种于6孔板中。AFC干预浓度分别为25、50、100 μg/mL，阴性对照为等体积无血清培养基，AFC干预时间依次为12 h、24 h、48 h。裂解液冰上裂解细胞30 min，12 000 rpm冷冻高速离心20 min提取总蛋白。蛋白浓度测定采用增强型BCA法，-80 ℃超低温保存上清液。SDS-PAGE胶电脉，转膜后封闭2 h，一抗（Beclin1、LC3 、β-actin）孵育，4 ℃过夜放置，二抗室温孵育1 h，ECL化学发光，Bio-Rad凝胶成像仪曝光，分析各组细胞自噬相关蛋白LC3Ⅱ/LC3Ⅰ、Beclin-1的表达情况。

2.5 统计学分析

蛋白相对表达量采用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，统计分析采用IBM公司SPSS 22.0统计学软件，自噬相关蛋白组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 AFC体外抗结肠癌活性

CCK8检测结果表明，AFC对LOVO、HCT116、HCT8、SW620细胞的IC_{50}分别是(280.90 ± 12.61)、(113.50 ± 7.83)、(211.71 ± 7.29)、(174.92 ± 9.52) μg/mL，因此HCT116细胞是AFC体外最敏感的人结肠癌细胞。细胞存活率曲线见图1。AFC不同时间干预HCT116细胞后，其最佳作用时间为48 h，结果见图2。

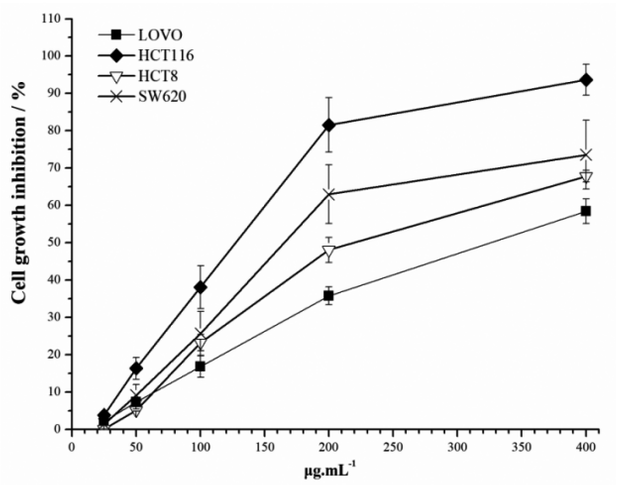


图1 AFC体外对结肠癌细胞的增殖抑制率(%，$n=3$)

Figure 1 Cell growth inhibition of AFC on colon cancer cell in vitro (%, $n=3$)

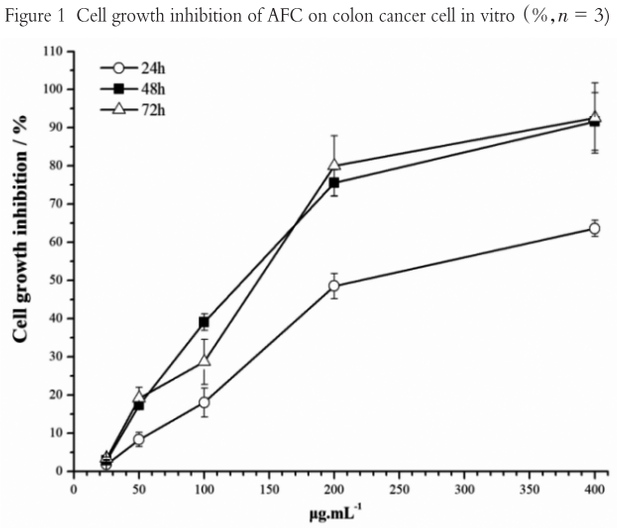


图2 AFC处理不同时间对HCT116细胞的增殖抑制率(%，$n=3$)

Figure 2 Cell growth inhibition of HCT116 cells treated with AFC at different times(%, $n=3$)

3.2 GFP-LC3腺病毒转染后观察细胞自噬

GFP-LC3腺病毒转染HCT116细胞后，对照组细胞mCherry-GFP-LC3B以弥散的绿色荧光、红色荧光的形式存在于胞质中，少量聚集在自噬体膜上，融合的黄色斑点非常少。但AFC处理组细胞荧光显微镜下见自噬体膜上聚集mCherry-GFP-LC3B，分别表现为绿色斑点、红色斑点，融合的黄色斑点较多，明显高于对照组细胞。结果见图3。

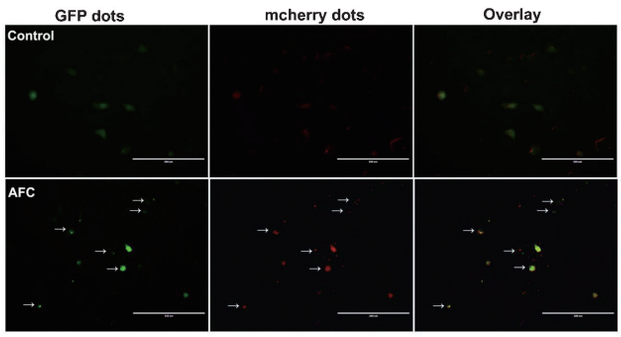


图3 倒置荧光显微镜观察GFP-LC3自噬斑点(× 200)

Figure 3 Autophagic spots of GFP-LC3 observed by inverted fluorescence microscope (× 200)

注：白色箭头指示发生自噬的细胞。

3.3 透射电子显微镜观察自噬体和自噬溶酶体

AFC100 μg/mL处理HCT116细胞48 h后，超微结构发现，细胞内出现多个吞噬小泡、自噬体以及自噬溶酶体(由自噬体与溶酶体形成)，对照组细胞内可见线粒体、细胞核，染色质均匀分布于细胞内，无吞噬小泡、自噬体形成，更无自噬溶酶体。结果见图4。

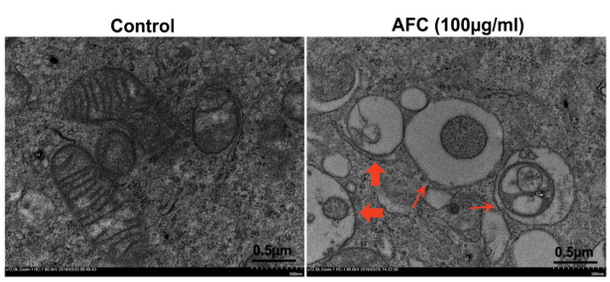


图4 透射电镜观察细胞自噬的超微结构变化(× 1000)

Figure 4 Ultrastructural changes of autophagy observed by transmission electron microscope (× 1000)

注：➞指示自噬体，➡指示自噬溶酶体。

3.4 自噬相关蛋白LC3-II/LC3-I、Beclin-1的相对表达

AFC不同浓度25、50、100 μg/mL分别处理HCT116细胞12 h、24 h、48 h后，与对照组细胞比较，HCT116细胞自噬相关蛋白LC3-II/LC3-I、Beclin-1表达明显上调，且呈现一定的剂量和时间依赖性。结果见图5。

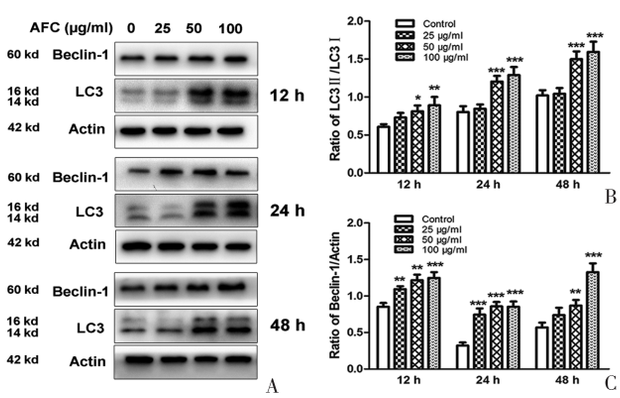


图5 Western Blot检测LC3-II/LC3-I、Beclin-1的蛋白表达

Figure 5 Expression of LC3-II/LC3-1 and Beclin-1 protein by western blot

注：A：蛋白条带；B：LC3-II/LC3-I相对表达量；C：Beclin-1相对表达量；与对照组比较，* $P<0.05$，** $P<0.01$，*** $P<0.001$。

4 讨论

结肠癌是发生于结肠部位常见的消化道恶性肿瘤，好发于乙状结肠与直肠交界处，通常与直肠癌一起统称为结直肠癌（colorectal cancer，CRC）。在全球恶性肿瘤中，结直肠癌发病率已上升至第3位，仅次于肺癌和胃癌[9-10]。研究证实[11-13]，结肠癌的发生、发展及转移与多基因参与、多阶段多步骤发展密切相关。中药抗肿瘤具有多种有效成分、多种作用靶点、多种调控通路的特点，在各种恶性肿瘤的发生、发展、转移等治疗中发挥重要作用，逐渐受到国内外研究的重视[14-16]。本课题组前期研究证实：①AFC能明显活化ATP-actived蛋白激酶，从而诱导肿瘤细胞的代谢适应[17-18]；②AFC能通过靶向JNK、mTOR信号通路诱导肿瘤细胞自噬，对K-ras高表达细胞的增殖与侵袭具有明显的抑制作用[19-20]；③AFC与5-FU联合应用，对裸鼠人胰腺癌Panc-28细胞移植瘤具有明显的协同增效作用，且能降低毒副反应[21-22]。

本研究选择了4株人结肠癌细胞LOVO、HCT116、HCT8及SW620，体外采用CCK8试验评价其抗结肠癌活性，结果发现，HCT116细胞是AFC体外最敏感的人结肠癌细胞。当用不同浓度的AFC处理HCT116细胞24 h后，细胞增殖抑制作用随浓度的增高而增强。AFC作用48 h和72 h后，各浓度组抑制作用也随浓度增高而增强，由于AFC作用48 h与作用72 h的结果相近，均强于24 h，因此AFC对HCT116细胞最佳作用时间为48 h。

细胞自噬是细胞在营养缺乏条件下，细胞内一些受损、衰老、无用的蛋白或细胞器，被双层膜结构的自噬小泡包裹后，送入溶酶体进行分解代谢的过程，因此，细胞自噬在维持内环境稳定、促进物质代谢循环中起着重要作用[23-24]。本研究中荧光显微镜观察到AFC处理的HCT116细胞中存在大量的mCherry-GFP-LC3自噬斑点的形成，明显高于对照组细胞，表明AFC能够诱导HCT116细胞发生自噬。透射电子显微术能从超微结构形态上观察到吞噬小泡、自噬体、自噬内涵体以及自噬溶酶体等自噬现象，所以它是目前检测自噬形态改变的金指标，也是自噬最常用、最直接的检测手段。本实验观察AFC处理的HCT116细胞，在超微结构上发现细胞内出现多个吞噬小泡、自噬体，以及自噬体与溶酶体形成的自噬溶酶体，进一步揭示了AFC能够明显诱导HCT116细胞发生自噬。

LC3是微管关联蛋白轻链3（microtubule-associated protein 1 light chain 3），与酵母蛋白Atg8、Apg8、Aut7均具有较高同源性。细胞营养不利发生自噬时，胞浆型LC3（LC3-I）会酶解掉一小段多肽，转变为自噬体（膜型，即LC3-II），因此，LC3可作为细胞自噬的分子标志物，LC3-II/LC3-I水平可反映细胞自噬的强弱[25-26]。自噬蛋白Beclin 1与酵母自噬蛋白Atg6结构相似，是细胞发生自噬时关键的正向调控因子，同时也可促进细胞凋亡。Beclin-1自噬蛋白通过与多种分子如phosphatidylinositol 3 kinase（Ⅲ型PI3K）结合，在细胞自噬、凋亡及恶性肿瘤发生、发展发挥着重要的作用[27-29]。随着AFC浓度从25 μg/mL增加到100 μg/mL，干预时间从12 h延长到48 h，自噬相关蛋白LC3-II/LC3-I、Beclin-1/Actin的比例均明显增高，且呈现一定的剂量和时间依赖性。揭示AFC作用于HCT116细胞后，可能通过上调自噬相关蛋LC3-II/LC3-I比例、Beclin-1的表达，从而诱导结肠癌细胞发生自噬。

5 结论

丁香活性组分抗结肠癌活性较强，最敏感的是HCT116细胞，最佳作用时间为48 h，其抗结肠癌活性可能与通过调节自噬相关蛋LC3-II/LC3-I、Beclin-1/Actin的比例，诱导结肠癌细胞自噬有关。但是否有其他分子机制参与，有待进一步深入研究。本实验阐明AFC抗结肠癌作用的分子机制，为AFC的临床应用及开发中药有效成分的抗肿瘤研究提供了科学的实验依据及新的思路。

6 参考文献

[1] 袁蕙芸，蒋宇飞，谭玉婷，等. 全球癌症发病与死亡流行现状和变化趋势[J]. 肿瘤防治研究，2021，48(6)：642-646.
[2] LI XH，HE SK，MA BY. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer[J]. Mol Cancer，2020，19(1)：12.
[3] DEVIS-JAUREGUI L，ERITJA N，DAVIS ML，*et al*. Autophagy in the physiological endometrium and cancer[J]. Autophagy，2021，17(5)：1077-1095.
[4] 曾琼瑶，张文静，张昱，等. 丁香油超高压提取工艺的优化及其抗肿瘤研究[J]. 华西药学杂志，2020，35(3)：303-308.
[5] 马瑾煜，刘珊瑚，焦顺刚，等. 丁香属植物的化学成分和药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志，2020，45(8)：1833-1843.
[6] 赵革，张丹，杨小会，等. 丁香活性组分抑制PI3K/Akt/mTOR通路诱导人结肠癌HCT116细胞凋亡的研究[J]. 中国中药杂志，2021，46(5)：1197-1204.
[7] LIU HZ，SCHMITZ JC，WEI JT，*et al*. Clove extract inhibits tumor growth and promotes cell cycle arrest and apoptosis[J]. Oncol Res，2014，21(5)：247-259.
[8] UGBOGU OC，EMMANUEL O，AGI GO，*et al*. A review on the traditional uses，phytochemistry，and pharmacological activities of clove basil（Ocimum gratissimum L.）[J]. Heliyon，2021，7(11)：e08404.
[9] 宋华琛，唐晓楠，张海婧，等. 结肠炎相关结肠癌机制研究进展[J]. 基础医学与临床，2018，38(4)：568-572.
[10] KISHORE C，BHADRA P. Current advancements and future perspectives of immunotherapy in colorectal cancer research[J]. Eur J Pharmacol，2021，893：173819.
[11] ZHANG XN，ZHAO H，SHI XZ，*et al*. Identification and validation of an immune-related gene signature predictive of overall survival in colon cancer[J]. Aging（Albany NY），2020，12(24)：26095-26120.

（下转第179页）

[25] YOSHIO T, TSUCHIDA T, ISHIYAMA A, *et al*. Efficacy of double-scope endoscopic submucosal dissection and long-term outcomes of endoscopic resection for superficial pharyngeal cancer [J]. Dig Endosc, 2017, 29(2): 152-159.
[26] PHEE SJ, REDDY N, CHIU PWY, *et al*. Robot-assisted endoscopic submucosal dissection is effective in treating patients with early-stage gastric neoplasia[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2012, 10(10): 1117-1121.
[27] SAKAMOTO N, OSADA T, SHIBUYA T, *et al*. The facilitation of a new traction device (S-O clip) assisting endoscopic submucosal dissection for superficial colorectal neoplasms[J]. Endoscopy, 2008, 40 Suppl 2: E94-E95.
[28] RITSUNO H, SAKAMOTO N, OSADA T, *et al*. Prospective clinical trial of traction device-assisted endoscopic submucosal dissection of large superficial colorectal tumors using the S-O clip [J]. Surg Endosc, 2014, 28(11): 3143-3149.
[29] HASHIMOTO R, HIRASAWA D, IWAKI T, *et al*. Usefulness of the S-O clip for gastric endoscopic submucosal dissection (with video)[J]. Surg Endosc, 2018, 32(2): 908-914.
[30] MORI H, KOBARA H, NISHIYAMA N, *et al*. Novel effective and repeatedly available ring-thread counter traction for safer colorectal endoscopic submucosal dissection[J]. Surg Endosc, 2017, 31(7): 3040-3047.
[31] SUDO G, TANUMA T, SUZUKI Y, *et al*. Multiloop method for traction during colorectal endoscopic submucosal dissection[J]. VideoGIE, 2019, 4(1): 11-13.
[32] 刘晓, 王燕斌, 于剑锋, 等. 新型牵引装置在结直肠侧向发育型肿瘤内镜黏膜下剥离术中的有效性研究[J]. 中华消化内镜杂志, 2020, 37(12): 874-879.
[33] GE PS, AIHARA H. A novel clip-band traction device to facilitate colorectal endoscopic submucosal dissection and defect closure [J]. VideoGIE, 2020, 5(5): 180-186.
[34] LIU X, YU XY, WANG YB, *et al*. Effectiveness of a novel traction device in endoscopic submucosal dissection for colorectal lesions[J]. Surg Endosc, 2022, 36(11): 8021-8029.
[35] 陈相波, 许婷婷, 吴秋丽, 等. 橡皮圈牵引与牙线牵引辅助内镜黏膜下剥离术治疗消化道肿瘤的临床对比研究[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2017, 37(7): 1010-1014.
[36] SAITO Y, EMURA F, MATSUDA T, *et al*. A new sinker-assisted endoscopic submucosal dissection for colorectal cancer[J]. Gastrointest Endosc, 2005, 62(2): 297-301.
[37] DOBASHI A, STORM AC, WONG KEE SONG LM, *et al*. Efficacy and safety of an internal magnet traction device for endoscopic submucosal dissection: ex vivo study in a porcine model (with video)[J]. Surg Endosc, 2019, 33(2): 663-668.
[38] YE LS, YUAN XL, PANG MY, *et al*. Magnetic bead-assisted endoscopic submucosal dissection: a gravity-based traction method for treating large superficial colorectal tumors[J]. Surg Endosc, 2019, 33(6): 2034-2041.

(利益冲突:无)

(收稿日期:2022-12-05;修回日期:2022-12-25)

(上接第170页)

[12] 薛无涯, 王舰梅, 夏天, 等. miR-204-5p对结直肠癌细胞增殖、侵袭、迁移及上皮间质转化的影响[J]. 西南医科大学学报, 2018, 41(2): 104-110.
[13] 柯东平, 朱金祥, 毛俊倩, 等. miR-181d-5p对人结肠癌细胞凋亡的影响及机制[J]. 贵州医科大学学报, 2019, 44(7): 814-820.
[14] 张丹, 朱伟, 余昕, 等. 美洲大蠊多肽提取物对SMMC-7721细胞凋亡及Bcl-2和Bax蛋白表达的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(4): 328-332.
[15] 李俊, 傅俊江. 百里醌抗肿瘤活性及其机制研究进展[J]. 西南医科大学学报, 2019, 42(4): 378-382.
[16] 何莹, 王春森, 李慧. 丹参酮类化合物对血液系统恶性肿瘤作用机制的研究进展[J]. 实用医院临床杂志, 2016, 13(5): 221-223.
[17] LIU J, ZHENG LH, WU N, *et al*. Oleanolic acid induces metabolic adaptation in cancer cells by activating the AMP-activated protein kinase pathway[J]. J Agric Food Chem, 2014, 62(24): 5528-5537.
[18] LIU MH, ZHAO G, ZHANG D, *et al*. Active fraction of clove induces apoptosis via PI3K/Akt/mTOR-mediated autophagy in human colorectal cancer HCT-116 cells[J]. Int J Oncol, 2018, 53(3): 1363-1373.
[19] LIU J, ZHENG LH, ZHONG JT, *et al*. Oleanolic acid induces protective autophagy in cancer cells through the JNK and mTOR pathways[J]. Oncol Rep, 2014, 32(2): 567-572.
[20] LIU J, ZHENG LH, MA LN, *et al*. Oleanolic acid inhibits proliferation and invasiveness of Kras-transformed cells via autophagy [J]. J Nutr Biochem, 2014, 25(11): 1154-1160.
[21] WEI JT, LIU HZ, LIU M, *et al*. Oleanolic acid potentiates the antitumor activity of 5-fluorouracil in pancreatic cancer cells[J]. Oncol Rep, 2012, 28(4): 1339-1345.
[22] ZHANG YY, LIU MH, WANG J, *et al*. Targeting protein kinase inhibitors with traditional Chinese medicine[J]. Curr Drug Targets, 2019, 20(15): 1505-1516.
[23] YAMAZAKI T, BRAVO-SAN PEDRO JM, GALLUZZI L, *et al*. Autophagy in the cancer-immunity dialogue[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2021, 169: 40-50.
[24] KOCATURK NM, AKKOC Y, KIG C, *et al*. Autophagy as a molecular target for cancer treatment[J]. Eur J Pharm Sci, 2019, 134: 116-137.
[25] SCHMITZ KJ, ADEMI C, BERTRAM S, *et al*. Prognostic relevance of autophagy-related markers LC3, p62/sequestosome 1, Beclin-1 and ULK1 in colorectal cancer patients with respect to KRAS mutational status[J]. World J Surg Oncol, 2016, 14(1): 189.
[26] MENG YC, LOU XL, YANG LY, *et al*. Role of the autophagy-related marker LC3 expression in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2020, 146(5): 1103-1113.
[27] VEGA-RUBÍN-DE-CELIS S, KINCH L, PEÑA-LLOPIS S. Regulation of beclin 1-mediated autophagy by oncogenic tyrosine kinases [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(23): 9210.
[28] LI X, YANG KB, CHEN W, *et al*. CUL3 (cullin 3)-mediated ubiquitination and degradation of BECN1 (beclin 1) inhibit autophagy and promote tumor progression[J]. Autophagy, 2021, 17(12): 4323-4340.
[29] ZHANG J, MAO W, LIU YY, *et al*. 3-MA enhanced chemosensitivity in cisplatin resistant hypopharyngeal squamous carcinoma cells via inhibiting beclin -1 mediated autophagy[J]. Curr Pharm Des, 2021, 27(7): 996-1005.

(利益冲突:无)

(收稿日期:2021-10-31;修回日期:2022-08-30)