

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.07.005

· 基础研究 ·

木香炔内酯对人胆管癌 RBE 细胞生物学行为的影响及其作用机制

林雪晶, 刘春颖, 彭章晓, 孙斌, 吴孟超, 苏长青(第二军医大学 东方肝胆外科医院 分子肿瘤实验室&国家肝癌科学中心, 上海 200438)

[摘要] **目的:**探讨木香炔内酯(costunolide, Cos)对人肝内胆管癌RBE细胞生物学行为的影响及其作用机制。**方法:**以不同质量浓度(0、2、4、6、8、12、16、20 $\mu\text{g/ml}$)Cos作用RBE细胞,通过CCK-8法、流式细胞术分别检测Cos对细胞增殖能力和周期分布的影响,Annexin V-FITC/PI双染法、Transwell小室实验分别检测Cos对细胞凋亡和迁移侵袭的影响,qRT-PCR检测与侵袭相关因子MMP2、MMP9 mRNA的表达,Western blotting检测PI3K/AKT信号通路相关蛋白的表达。**结果:**Cos能够显著抑制RBE细胞的增殖活性($P<0.05$ 或 $P<0.01$),阻滞细胞周期于S、G2/M期,同时诱导RBE细胞的凋亡($P<0.01$)、且呈质量浓度依赖性,Transwell及qRT-PCR结果显示Cos能够显著抑制RBE细胞的侵袭能力、降低侵袭相关转录因子MMP2和MMP9 mRNA的表达,Western blotting结果显示Cos明显抑制p-AKT、Bcl-2、MMP2及MMP9的表达,但促进Bax的表达。**结论:**Cos通过抑制PI3K/AKT信号通路降低胆管癌RBE细胞的增殖、迁移及侵袭能力。

[关键词] 木香炔内酯;胆管癌;RBE细胞;细胞增殖;迁移;侵袭;PI3K/AKT信号通路

[中图分类号] R735.8; R730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)07-0687-06

Effects of costunolide on the biological behaviours of cholangiocarcinoma RBE cells and its mechanism

LIN Xuejing, LIU Chunying, PENG Zhangxiao, SUN Bin, WU Mengchao, SU Changqing (Department of Molecular Oncology, Eastern Hepatobiliary Surgical Hospital & National Center of Liver Cancer, Second Military Medical University, Shanghai, 200438, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of costunolide (Cos) on the proliferation, apoptosis, migration and invasion of cholangiocarcinoma RBE cells, and explore its potential mechanism. **Methods:** The CCK-8, flow cytometry, Annexin V-FITC/PI double staining, Transwell assays were used to examine the influence of Cos on proliferation, cell cycle, apoptosis, migration and invasion of RBE cells after treated with gradient concentrations of Cos. The expressions of MMP2 and MMP9 were detected by qRT-PCR, and the expression of PI3K/AKT-associated signal proteins was detected by Western blotting. **Results:** Cos dose-dependently inhibited proliferation activity of RBE cells ($P<0.05$ or $P<0.01$), arrested cell cycle at S and G2/M phases and induced RBE cell apoptosis ($P<0.01$). Transwell and qRT-PCR results demonstrated that Cos impeded RBE cell migration, invasion, and reduced the transcription of MMP2 and MMP9. Cos inhibited the expression of p-AKT, Bcl-2, MMP2 and MMP9, the level of Bax. **Conclusion:** Cos restrained the proliferation, migration and invasion of RBE cells by suppressing PI3K/AKT pathway.

[Key words] costunolide; cholangiocarcinoma; RBE cell; proliferation; migration; invasion; PI3K/AKT pathway

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(7): 687-692. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.07.005]

胆管癌是一种常见的胆道系统肿瘤,根据其发生部位分为肝内胆管癌、肝门部胆管癌及末梢胆管癌^[1]。近年来,胆管癌的发病率呈上升趋势,仅次于肝癌,占肝部癌症的30%^[2]。由于胆管癌的恶性程度高、发病隐匿、诊治困难,其5年生存率低于10%^[1]。目前胆管癌的治疗方法为手术切除、肝移植及化疗,但胆管癌发现时多为晚期,超出手术切除的范围,故术后患者的平均生存时间仅为12个月左右^[2-3],所以多采用化疗进行治疗。然而现今的化疗药物并不能有效地提高胆管癌患者的生存率,表现为放化疗耐药性和不敏感性的特点,由此引发胆管癌的复发率

仍然很高。因此,对抗胆管癌药物及其具体作用机制的研究是目前的主要任务。

木香炔内酯(costunolide, Cos)主要来源于木香、月桂树、木兰等植物,是一种倍半萜内酯类化合物^[4]。

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No.81773251, 81702735, 81503307)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81773251, 81702735, 81503307)

[作者简介] 林雪晶(1990-),女,研究实习员,主要从事肿瘤相关基础研究,E-mail:linxuejinga@163.com

[通信作者] 苏长青(SU Changqing, corresponding author),教授,博士生导师,主要从事肿瘤发生机制及抗肿瘤新药研发,E-mail:suchangqing@gmail.com

木香是我国中医药常用治疗肿瘤复方的成分之一,近年来随着分离、纯化技术的发展,木香的主要活性成分 Cos 被国内外的众多研究者所报道。研究发现 Cos 具有多方面的药理活性,包括抗肿瘤^[4]、抗炎^[5]、抗病毒^[6]、抗氧化^[7]等。其中, Cos 的抗肿瘤作用受到国内外众多研究者的关注^[4]。本课题组前期研究^[8]也发现, Cos 可以抑制肝癌 SMMC-7721、Hep3B 细胞的增殖、迁移侵袭及诱导细胞凋亡,体内实验也表现出其抑瘤作用。胆管癌与肝癌存在密不可分的关系,而关于 Cos 对胆管癌的影响目前尚未见报道。因此,本研究通过体外细胞学实验研究 Cos 对胆管癌 RBE 细胞的增殖、凋亡、迁移、侵袭等细胞生物学行为的影响,同时探究其影响的相关信号通路,阐述 Cos 在胆管癌治疗中的应用前景。

1 材料与方法

1.1 细胞株与药物

人肝内胆管癌 RBE 细胞由上海生命科学院细胞库提供。Cos 购自上海源叶生物科技有限公司,化学结构式见图 1。实验前将 Cos 粉末用 DMSO 溶解制成 10 mg/ml 的母液,置于 4 °C 冰箱备用,使用时再稀释成需要的质量浓度。

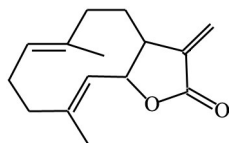


图 1 Cos 的化学结构式

Fig.1 The chemical structural formula of Cos

1.2 主要试剂

RPMI 1640 培养基、胎牛血清(FBS)(美国 Gibco 公司),CCK-8 试剂、胰蛋白酶(碧云天生物技术有限公司),DMSO(上海玉博生物技术有限公司),细胞周期、凋亡检测试剂盒(上海联科生物技术有限公司)。AKT、p-AKT、MMP9、MMP2、Bax、Bcl-2 抗体(美国 CST 公司),兔二抗(英国 Abcam 公司),GAPDH(康成生物公司)。qRT-PCR 引物(表 1)由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.3 RBE 细胞的培养

将冻存于液氮中的 RBE 细胞于 37 °C 水浴中复苏,然后于 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基中培养,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中,传代时可用 0.25% 胰酶消化,根据需要的密度进行接种。

1.4 CCK-8 法检测 Cos 对 RBE 细胞增殖能力的影响

将处于对数生长期的 RBE 细胞用胰酶消化、离心、计数,用 10% FBS 稀释成 5 000 个/100 μl,铺于 96

孔板中。细胞培养过夜后,给予不同质量浓度的 Cos (0、2、4、6、8、12、16、20 μg/ml)进行处理,每个质量浓度分别设置 3 个复孔。待 24、48 或 72 h 后,加入 10 μl 的 CCK-8 反应液,避光条件孵育 2 h,于酶联免疫检测仪上检测 D 值,检测波长为 450 nm。根据公式计算 RBE 细胞的增殖活性。细胞增殖率(%)=(实验组 D 值/对照组 D 值)×100%,利用 Graphpad Prism 5 软件计算出相应的半数抑制浓度 IC₅₀ 值。

1.5 流式细胞术分别检测 Cos 对 RBE 细胞周期分布的影响

将 RBE 细胞以 15×10⁴ 个/孔的密度接种于 6 孔板中,细胞培养过夜后,以 Cos(0、2、4、8 μg/ml)处理细胞;48 h 后,胰酶消化收集细胞,PBS 洗 2 次(350×g 离心 3 min),再用 75% 的乙醇固定过夜(4 °C 冰箱);PBS 洗 3 次去除乙醇,加入适量的 PI 进行染色,避光反应 30 min 后上机检测。

1.6 Annexin V-FITC/PI 双染法检测 Cos 对 RBE 细胞凋亡的影响

将 RBE 细胞以 15×10⁴ 个/孔的密度接种于 6 孔板中,待细胞过夜贴壁后,给予 Cos(0、2、4、8 μg/ml)处理;48 h 后,胰酶消化收集细胞及上清液,PBS 洗 3 次(350×g 离心 3 min),加入 100 μl 左右的 Buffer,轻微地将细胞重悬,然后再加入 5 μl Annexin V-FITC(AV)和 5 μl PI 混匀,避光条件下置于冰上反应,10 min 后上机检测。

1.7 Transwell 小室实验检测 Cos 对细胞迁移和侵袭能力的影响

将 RBE 细胞以 3×10⁴ 个/200 μl 的密度接种于 Transwell 上室(用不含 FBS 的 RPMI 1640 培养基稀释),在下室加入 500 μl 含 20% FBS 培养基。上下室分别加入一定量的 Cos 使得最终质量浓度一致,分别为 0、1、2、4 μg/ml。置于培养箱中培养。48 h 后加入适量的结晶紫染色 10 min,用 PBS 洗 5 次,擦去小室中多余的细胞。最后在显微镜下(200×)进行拍照记录,观察其迁移能力的变化。观察侵袭能力时采用铺有基质胶的 Transwell 小室,细胞密度 5×10⁴ 个/200 μl,其余步骤和上面操作一致。

1.8 qRT-PCR 检测癌细胞相关转录因子基因表达

将 RBE 细胞暴露于 Cos(0、1、2、4 μg/ml)中 48 h,用 TRIzol 法提取各处理组细胞总 RNA,经过反转录及荧光实时定量 PCR 对基因进行相对定量,以 GAPDH 作为内参基因,采用 2^{-ΔΔCT} 法计算相对转录量。所用引物如表 1。

1.9 Western blotting 检测 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白的表达

将 RBE 细胞暴露于 Cos(0、2、4、8 μg/ml)中 48 h

后,用PBS洗2次,吸净剩余的PBS,根据细胞密度加入一定量的蛋白裂解液,用刮刀收集裂解液,置于冰上裂解;20 min后,于预冷高速离心机中离心,收集上清液,加入上样缓冲液,水中煮沸10 min,最后置于-80 °C冰箱中备用。配制SDS-PAGE凝胶,每组上样量约为10 μ l,70 V恒压电泳约2 h;采用湿转恒流250 mA、120 min的条件进行电转,再用5%脱脂牛奶封闭,一抗孵育AKT、p-AKT、MMP9、MMP2、Bax、Bcl-2、GAPDH室温2 h、4 °C过夜,TBST洗涤,孵育兔二抗室温1 h,TBST洗涤后用ECL发光液于暗室中发光显影。

表1 qRT-PCR引物序列

Tab.1 Primer sequences of qRT-PCR

Gene	Primer sequence
MMP2	F: 5'-AGCGAGTGGATGCCGCCTTAA-3'
	R: 5'-CATTCCAGGCATCTGCGATGAG-3'
MMP9	F: 5'-GCCACTACTGTGCCTTTGAGTC-3'
	R: 5'-CCCTCAGAGAATCGCCAGTACT-3'
GAPDH	F: 5'-GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG-3'
	R: 5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA-3'

1.10 统计学处理

采用SPSS 19.0及Graphpad Prism 5软件进行统计分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,数据间比较采用ANOVA方差分析,灰度值采用Image-Pro Plus 6.0软件分析,统计图采用Graphpad Prism 5软件制作。以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Cos对RBE细胞增殖有明显抑制作用

以不同质量浓度Cos(0、2、4、6、8、12、16、20 μ g/ml)分别处理RBE细胞24、48及72 h后,CCK-8法检测结果(图2)显示,RBE细胞的活性受到明显的抑制,且呈时间和浓度依赖性。Cos作用24、48及72 h的 IC_{50} 值分别为(10.03 \pm 0.31)、(7.33 \pm 0.34)和(4.58 \pm 0.12) μ g/ml。考虑到Cos的作用时间及质量浓度,后期实验均采用作用48 h来研究Cos对RBE细胞生物学行为的影响。

2.2 Cos使RBE细胞周期阻滞于S和G2/M期

以不同质量浓度的Cos(0、2、4、8 μ g/ml)处理RBE细胞48 h,细胞周期检测结果(图3)显示,Cos可明显增加S、G2/M期细胞比例,同时降低G0/G1期细胞比例。由此说明Cos是通过影响RBE细胞周期的分布,阻滞细胞周期于S、G2/M期,从而抑制RBE细胞的增殖能力。

2.3 Cos能明显诱导RBE细胞凋亡

抗肿瘤药物的一个主要特点是促进肿瘤细胞凋

亡。流式细胞术检测结果(图4)显示,Cos在2 μ g/ml时即可明显诱导RBE细胞的凋亡,主要表现在早期凋亡;随着Cos浓度的增加,细胞凋亡率逐渐上升,且逐渐向晚期凋亡移动。说明Cos能诱导RBE细胞的凋亡。

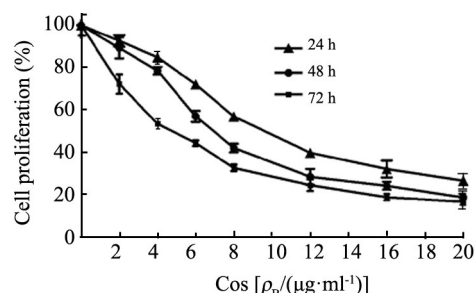


图2 CCK-8实验检测不同质量浓度的Cos在不同时间段(24、48及72 h)对RBE细胞增殖的影响

Fig.2 The CCK-8 assay was used to examine the influence of Cos on proliferation of RBE cells after treatment with gradient mass concentrations of Cos at 24, 48 and 72 h

2.4 Cos明显抑制RBE细胞的迁移和侵袭能力

以低质量浓度Cos(0、1、2、4 μ g/ml)处理RBE细胞48 h,通过Transwell检测发现,Cos能够在低质量浓度条件(对RBE细胞增殖能力影响较小的条件下)抑制RBE细胞的迁移及侵袭能力,且随着浓度的增加,抑制能力不断增强(图5A、B)。qRT-PCR检测结果显示,随着Cos浓度的增加,侵袭相关转录因子MMP9和MMP2 mRNA表达水平明显降低(图5C),进一步表明Cos可降低RBE细胞的迁移侵袭能力。

2.5 Cos对RBE细胞中PI3K/AKT信号通路的影响

Western blotting检测显示,Cos抑制了p-AKT蛋白在RBE细胞中的表达,同时凋亡相关蛋白Bcl-2及侵袭相关蛋白MMP2、MMP9的表达随着浓度的增加,剂量依赖性地减少(图6)。因此,Cos是通过降低了PI3K/AKT信号通路的活性,诱导RBE细胞的凋亡,抑制其迁移和侵袭。

3 讨论

胆管癌是临床中常见的一种胆道系统肿瘤,由于早期症状不明显、易转移等特性,导致其具有较高的死亡率。目前手术切除是胆管癌根治性的治疗手段,但发现时多为晚期,失去最佳治疗时期,术后只有12~15个月的中位生存期^[9]。因此,寻找胆管癌新的治疗手段显得尤为迫切。本研究首次证明,Cos能够抑制胆管癌RBE细胞的增殖、迁移及侵袭,其机制与PI3K/AKT信号通路的失活密切相关。

本研究首先发现Cos可抑制RBE细胞的增殖,

且阻滞细胞周期于S、G2/M期。抗肿瘤药物的另一个主要特点是能够诱导肿瘤细胞凋亡。Bcl-2家族蛋白是线粒体凋亡途径中最主要的调控因子,包括诱导凋亡蛋白Bax、Bak等和抑制凋亡蛋白Bcl-2、Bcl-xl等两大类^[10-12]。SINGIREESU等^[13]报道了Cos可明显提高卵巢癌细胞中促凋亡蛋白Bax的表达、减少抗凋

亡蛋白Bcl-2的表达,通过线粒体介导细胞凋亡。所以,本研究检测Cos对Bcl-2家族蛋白表达的影响,结果显示,Cos促进了Bax的表达、同时降低Bcl-2的表达,且成剂量依赖性,进一步说明其可诱导RBE细胞凋亡。

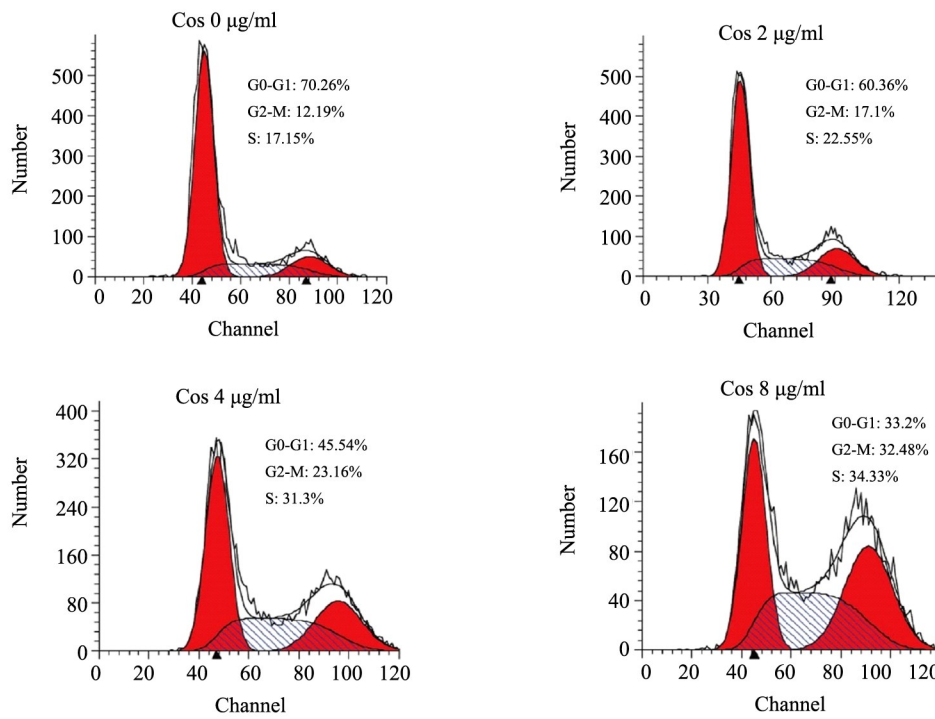
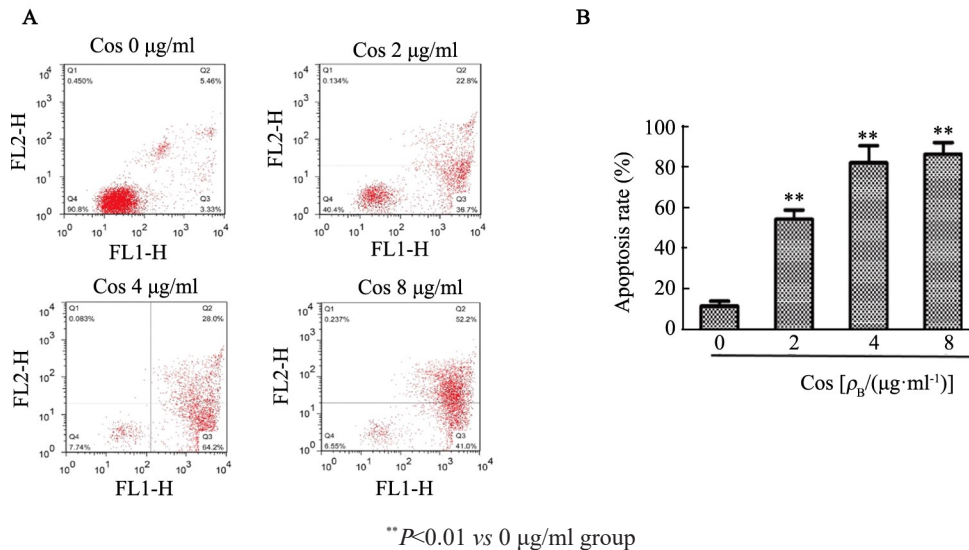


图3 RBE细胞经不同质量浓度Cos处理48 h后细胞周期分布的变化

Fig.3 The distribution of RBE cell cycle was examined after treated with gradient mass concentrations of Cos for 48 h



** $P < 0.01$ vs 0 $\mu\text{g/ml}$ group

A : Annexin V-FITC/PI double staining assays for RBE cell apoptosis; B: Data processing of cell apoptosis

图4 Cos可诱导RBE细胞发生凋亡

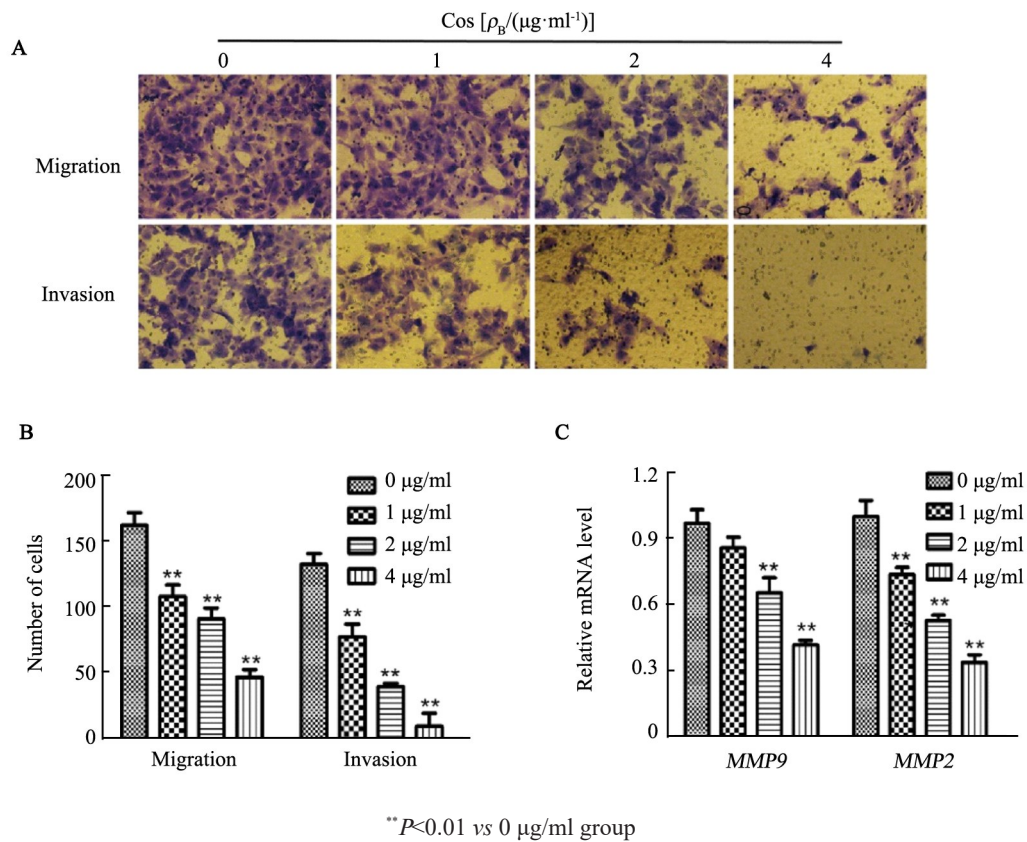
Fig.4 Cos could induce RBE cell apoptosis

胆管癌患者预后不良的一个主要原因是易发生转移,所以作为胆管癌治疗药物的一个关键作用就

是降低其迁移侵袭能力。肿瘤细胞要转移,必须先对细胞外基质(extracellular matrix, ECM)进行降

解, 而MMP2、MMP9是降解ECM的主要蛋白酶^[14-15]。LOHBERGER等^[16]用Cos处理软组织肉瘤细胞, 可明显抑制癌细胞的侵袭; 通过qRT-PCR检测MMP2、MMP7及MMP9的含量变化, 发现用Cos处理TE-671细胞后, MMP2和MMP9的含量明显减少了。因此,

本研究检测Cos对MMP家族基因及蛋白表达的影响, Cos处理后, MMP2、MMP9 mRNA及蛋白的表达都明显降低了, 进一步验证了Cos可降低RBE细胞的迁移侵袭能力。



A and B: Transwell assays were used to examine the influence of Cos on migration and invasion of RBE cells after treated with gradient mass concentrations of Cos; C: The expressions of MMP2 and MMP9 were detected by qRT-PCR

图5 Cos可降低RBE细胞的迁移侵袭能力(×200)

Fig.5 Cos impeded RBE cell migration and invasion (×200)

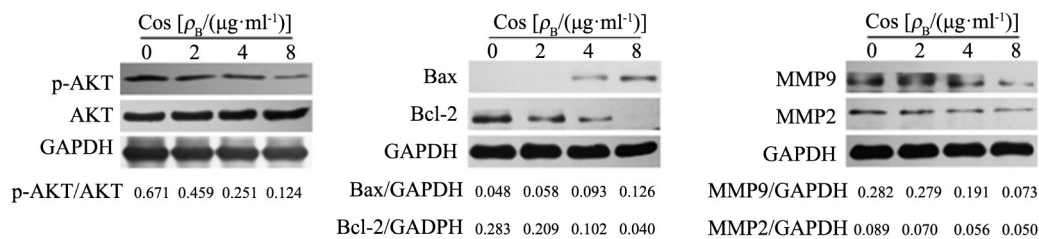


图6 Cos抑制RBE细胞中PI3K/AKT信号通路相关分子

Fig.6 Cos inhibited the relative molecules of PI3K/AKT pathway in RBE cells

PI3K/AKT信号通路与肿瘤细胞的增殖、迁移侵袭、化疗耐药性等密切相关, PI3K/AKT信号通路对正常细胞的生长和生存等过程具有重要意义。由于其在肝癌、肺癌、胃癌等众多肿瘤中处于过度激活状态, 从而促进了肿瘤细胞的增殖、迁移侵袭、化疗耐药性等, 是肿瘤患者预后不良的危险因素^[17-19]。研

究^[20-21]显示, AKT可通过调节Bcl-2及MMPs家族相关蛋白的表达, 从而影响细胞的凋亡、迁移、侵袭能力。因此, 本研究检测了Cos对RBE细胞内p-AKT蛋白的表达水平的影响, 结果表明, Cos能够剂量依赖性降低p-AKT的表达。综上, Cos是通过抑制PI3K/AKT信号通路, 影响Bcl-2及MMPs家族蛋白

的表达,从而诱导RBE细胞的凋亡,降低其迁移侵袭能力。

目前,关于Cos抗肿瘤能力的证据已在各种特定的癌症细胞系中得到了证实。体内动物实验也显示,Cos在治疗移植瘤裸鼠上表现出高抑瘤率、低毒性和轻微副作用。本课题将在胆管癌移植瘤裸鼠上验证Cos在体内的作用,以期获得Cos作为抗胆管癌化疗药物的有利证据。

[参考文献]

- [1] CHUNG V. Systemic therapy for hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma[J]. *Surg Oncol Clin N Am*, 2015, 24(1): 187-198. DOI: 10.1016/j.soc.2014.09.009.
- [2] TYSON G L, E1-SERAG H B. Risk factors for cholangiocarcinoma[J]. *Hepatology*, 2011, 54(1): 173-184. DOI: 10.1002/hep.24351.
- [3] FARLEY D R, WEAVER A L, NAGORNEY D M. "Natural history" of unresected cholangiocarcinoma: patient outcome after noncurative intervention[J]. *Mayo Clin Proc*, 1995, 70(5): 425-429. DOI: 10.1016/S0025-6196(11)63877-9.
- [4] LIN X, PENG Z, SU C. Potential anti-cancer activities and mechanisms of costunolide and dehydrocostuslactone[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(5): 10888-10906. DOI: 10.3390/ijms160510888.
- [5] SCARPONI C, BUTTURINI E, SESTITO R, et al. Inhibition of inflammatory and proliferative responses of human keratinocytes exposed to the sesquiterpene lactones dehydrocostuslactone and costunolide[J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(9): e107904. DOI: 10.1371/journal.pone.0107904.
- [6] CHEN H C, CHOU C K, LEE S D, et al. Active compounds from saussurea lappa clarks that suppress hepatitis B virus surface antigen gene expression in human hepatoma cells[J]. *Antiviral Res*, 1995, 27(1-2): 99-109.
- [7] ELIZA J, DAISY P, IGNACIMUTHU S. Antioxidant activity of costunolide and eremanthin isolated from *Costus speciosus* (Koen ex. Retz) Sm[J]. *Chem Biol Interact*, 2010, 188(3): 467-472. DOI: 10.1016/j.cbi.2010.08.002.
- [8] LIN X, PENG Z, FU X, et al. Volatile oil from saussurea lappa exerts antitumor efficacy by inhibiting epithelial growth factor receptor tyrosine kinase-mediated signaling pathway in hepatocellular carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(48): 79761-79773. DOI: 10.18632/oncotarget.12962.
- [9] DEOLIVEIRA M L, CUNNINGHAM S C, CAMERON J L, et al. Cholangiocarcinoma: thirty-one-year experience with 564 patients at a single institution[J]. *Ann Surg*, 2007, 245(5): 755-62. DOI: 10.1097/01.sla.0000251366.62632.d3.
- [10] EDLICH F. BCL-2 proteins and apoptosis: recent insights and unknowns[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 500(1): 26-34. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.06.190.
- [11] ZHOU L, CAI X, HAN X, et al. CDK1 switches mitotic arrest to apoptosis by phosphorylating Bcl-2 / Bax family proteins during treatment with microtubule interfering agents[J]. *Cell Biol Int*, 2014, 38(6): 737-746. DOI: 10.1002/cbin.10259.
- [12] SPENCEER S L, SORGER P K. Measuring and modeling apoptosis in single cells[J]. *Cell*, 2011, 144(3): 926-939. DOI: 10.1016/j.cell.2011.03.002.
- [13] SINGIREESU S S N R, MISRA S, MONDAL S K, et al. Costunolide induces micronuclei formation, chromosomal aberrations, cytostasis, and mitochondrial-mediated apoptosis in Chinese hamster ovary cells [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2018, 34(2): 125-142. DOI: 10.1007/s10565-017-9411-z.
- [14] HU X, LI D, ZHANG W, et al. Matrix metalloproteinase-9 expression correlates with prognosis and involved in ovarian cancer cell invasion[J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2012, 286(6): 1537-1543. DOI: 10.1007/s00404-012-2456-6.
- [15] WANG L, WU H, WANG L, et al. Asporin promotes pancreatic cancer cell invasion and migration by regulating the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) through both autocrine and paracrine mechanisms[J]. *Cancer Lett*, 2017, 398: 24-36. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.04.001.
- [16] LOHBERGER B, RINNER B, STUENDL N, et al. Sesquiterpene lactones downregulate G2/M cell cycle regulator proteins and affect the invasive potential of human soft tissue sarcoma cells[J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(6): e66300[2018-01-25].<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0066300>.
- [17] YAN H, JUNG K H, KIM J, et al. Artemisia capillaris extract AC68 induces apoptosis of hepatocellular carcinoma by blocking the PI3K/AKT pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 98(12): 134-141. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.12.043.
- [18] LIOU C J, HUANG W C. Casticin inhibits interleukin-1 β -induced ICAM-1 and MUC5AC expression by blocking NF- κ B, PI3K-Akt, and MAPK signaling in human lung epithelial cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(60): 101175-101188. DOI: 10.18632/oncotarget.20933.
- [19] LV L, LIU B. Anti-tumor effects of bakuchiol on human gastric carcinoma cell lines are mediated through PI3K/AKT and MAPK signaling pathways[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6): 8977-8982. DOI: 10.3892/mmr.2017.7696.
- [20] MOU S, ZHOU Z, HE Y, et al. Curcumin inhibits cell proliferation and promotes apoptosis of laryngeal cancer cells through Bcl-2 and PI3K/Akt, and by upregulating miR-15a[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(4): 4937-4942. DOI: 10.3892/ol.2017.6739.
- [21] WANG Y, WAN D, ZHOU R, et al. Geraniin inhibits migration and invasion of human osteosarcoma cancer cells through regulation of PI3K/Akt and ERK1/2 signaling pathways[J]. *Anticancer Drugs*, 2017, 28(9): 959-966. DOI: 10.1097/CAD.0000000000000535.

[收稿日期] 2018-05-04

[修回日期] 2018-07-03

[本文编辑] 韩丹, 阮芳铭