

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.06.004

· 基础研究 ·

## 熊果酸对胃癌细胞株 MGC-803 凋亡和自噬的调控及其作用机制

陈伟妍, 刘春英(辽宁中医药大学 研究生院, 辽宁 沈阳 110847)

**[摘要]** **目的:**观察熊果酸(UA)对胃癌细胞株 MGC-803 自噬和凋亡的调控作用,并探讨 UA 基于 PI3K/AKT/mTOR 信号通路诱发 MGC-803 细胞自噬的机制。**方法:**体外培养人胃癌细胞株 MGC-803,分为空白对照组、UA 干预组和 UA+3-MA 组。采用流式细胞术检测各组细胞凋亡水平,双荧光 mRFP-eGFP-LC3 质粒转染细胞法检测各组细胞自噬发生情况,qPCR 实验检测各组细胞 LC3B、BAX、Bcl-2 mRNA 的表达水平,WB 实验检测各组细胞 I 型 PI3K、p-AKT、p-mTOR、ULK1、LC3B、BAX、Bcl-2 蛋白的表达水平。**结果:**与空白对照组相比,UA 干预组细胞凋亡率显著增加( $P<0.05$ );与 UA 干预组相比,UA+3-MA 组细胞凋亡率显著降低( $P<0.05$ )。双荧光 mRFP-eGFP-LC3 质粒转染法显示,与空白对照组相比,UA 干预组绿色和红色荧光亮点数均显著增加( $P<0.05$ );与 UA 干预组相比,UA+3-MA 组绿色和红色荧光亮点数均显著减少( $P<0.05$ )。qPCR 和 WB 实验结果显示,与空白对照组相比,UA 干预组 BAX 和 LC3B mRNA 和蛋白以及 ULK1 蛋白表达水平均显著上调,Bcl-2 基因和蛋白表达水平以及 I 型 PI3K、p-AKT、p-mTOR 蛋白表达水平均显著下调(均  $P<0.05$ );与 UA 干预组相比,UA+3-MA 组 BAX、LC3B mRNA 和蛋白表达水平显著下调,Bcl-2 基因和蛋白表达水平显著上调(均  $P<0.05$ ),I 型 PI3K、p-AKT、p-mTOR 和 ULK1 蛋白表达水平无显著差异( $P>0.05$ )。**结论:**UA 诱导的自噬可以促进胃癌细胞 MGC-803 的凋亡,其机制可能与 UA 参与调控 PI3K/AKT/mTOR 信号通路相关蛋白表达有关。

**[关键词]** 熊果酸;人胃癌细胞株 MGC-803;凋亡;自噬;PI3K/AKT/mTOR 信号通路

**[中图分类号]** R392.12; R735.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)06-0638-06

## Ursolic acid regulates apoptosis and autophagy of gastric cancer cell line MGC-803 and its mechanism

CHEN Weiyan, LIU Chunying (Graduate School of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, Liaoning, China)

**[Abstract] Objective:** To observe the effect of ursolic acid (UA) on autophagy and apoptosis of gastric cancer cell line MGC-803, and to explore the mechanism of UA-induced autophagy of MGC-803 cells based on PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. **Methods:** Human gastric cancer cell line MGC-803 was cultured *in vitro* and divided into blank control group, UA intervention group and UA+3-MA group. The cell apoptosis in each group was detected by flow cytometry. Cell autophagy was detected by double fluorescence mRFP-eGFP-LC3 plasmid transfection method. The mRNA expression levels of LC3B, BAX and Bcl-2 were detected by qPCR. The protein expression levels of PI3K type I, p-AKT, p-mTOR, ULK1, LC3B, BAX and Bcl-2 were detected by WB. **Results:** Flow cytometry showed that the cell apoptotic rate of UA intervention group was significantly higher than that of blank control group ( $P<0.05$ ). Compared with UA intervention group, the apoptotic rate in UA + 3-MA group was significantly reduced ( $P<0.05$ ). The double fluorescence mRFP-eGFP-LC3 plasmid transfection method showed that the green and red fluorescent bright spots in UA intervention group increased significantly compared with the blank control group ( $P<0.05$ ), and the green and red fluorescent bright spots in UA+3-MA group were significantly reduced compared with UA intervention group ( $P<0.05$ ). Real-time quantitative PCR and WB method showed that compared with the blank control group, the mRNA and protein expressions of BAX and LC3B, and ULK1 protein were significantly increased in UA intervention group, while the mRNA and protein expressions of Bcl-2, and the protein expressions of PI3K, p-AKT and p-mTOR were significantly decreased in UA intervention group (all  $P<0.05$ ); Compared with UA intervention group, mRNA and protein expressions of BAX and LC3B were significantly down-regulated and the mRNA and protein expressions of Bcl-2 were significantly up-regulated in UA+3-MA group (all  $P<0.05$ ), while protein levels of PI3K, p-AKT, p-mTOR and ULK1 were not significantly

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No.81473569)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No.81473569)

**[作者简介]** 陈伟妍(1980-),女,主治医师,博士生,主要从事中药抗肿瘤作用机制的研究,E-mail:cwy\_yx@163.com

**[通信作者]** 刘春英(LIU Chunying, corresponding author),博士,教授,博士生导师,主要从事中药抗肿瘤作用机制的研究,E-mail:1781313365@qq.com

changed in UA+3-MA group ( $P>0.05$ ). **Conclusion:** UA can promote apoptosis of MGC-803 cells via inducing autophagy, which may be related to UA's involvement in regulating the expressions of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway-related proteins.

**[Key words]** ursolic acid; human gastric cancer cell line MGC-803; apoptosis; autophagy; PI3K/AKT/mTOR signaling pathway

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(6): 638-643. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.06.004]

胃癌是起源于胃黏膜上皮的恶性肿瘤,在中国各种恶性肿瘤中发病率居首位。胃癌发病有明显的地域性差别,在中国的西北与东部沿海地区胃癌发病率明显高于南方地区<sup>[1-2]</sup>。自噬和凋亡是细胞两种不同的程序性死亡途径,在肿瘤的发生发展过程中均起着非常重要的作用。PENNARUN 等<sup>[3]</sup>研究发现,生物体内的恶性细胞等有害细胞主要通过凋亡以一种无害的方式被清除。而自噬对于肿瘤细胞而言则是一把双刃剑,不但可以促进肿瘤细胞死亡,还可维持肿瘤细胞生长<sup>[4-5]</sup>。熊果酸(ursolic acid, UA)为一种五环三萜类化合物,广泛存在于蔬菜水果及栀子、女贞子和白花蛇舌草等中草药中。本课题组前期研究<sup>[6]</sup>发现,UA 可以通过促进 MGC-803 细胞凋亡而抑制胃癌细胞生长,且在该过程中细胞自噬也被激活。有研究<sup>[7]</sup>表明,磷脂酰肌 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B(AKT)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)自噬相关信号通路在包括胃癌在内的肿瘤细胞中异常活跃。故本研究通过观察 UA 诱导的细胞自噬与凋亡之间的关系,探讨 UA 诱导自噬发生的可能作用机制,为临床治疗提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株、主要试剂和仪器

人胃癌细胞株 MGC-803 购自中国科学院上海细胞生物研究所。UA(中国药品生物制品检定所,北京),RPMI 1640 培养基(Gibco BRL 公司,美国),胎牛血清、双抗(青霉素 100 U/ml,链霉素 0.1 mg/ml)、0.25% 胰蛋白酶(Hyclone 公司,美国),自噬抑制剂 3-MA(Sigma 公司,德国),Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(凯基生物公司,江苏);mRFP-GFP-LC3 质粒(兴拓生物医药科技有限公司,上海),Lipofectamine 3000 转染试剂盒(Life Technologies 公司,上海),RNAiso Plus、PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser、SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II 试剂盒(TaKaRa 公司,大连);蛋白质裂解液、ECL 化学发光试剂、一抗稀释液(碧云天公司,中国),蛋白测定试剂盒(鼎国公司,中国),兔抗人 I 型 PI3K 多克隆抗体、兔抗人 p-AKT 多克隆抗体、兔抗人 p-mTOR 多克隆抗体、兔抗人 ULK1 多克隆抗体、兔抗人 LC3A/B 多克隆抗体、兔抗人 BAX 多克隆抗体、兔抗人 Bcl-2 多克隆抗体、二抗羊抗兔 HRP-IgG(Cell Signal 公司,美国),兔抗人 Beclin1 多克隆抗体、兔抗人  $\beta$ -actin 多

克隆抗体(Cell Signal 公司,美国)。HERACell 150i 细胞培养箱(Thermo 公司,德国),LEICA DM IL 倒置荧光显微镜(徕卡公司,德国),流式细胞仪(BD 公司,美国)、Veriti 型梯度 PCR 仪、7500 型实时荧光定量 PCR 仪(生命技术公司,美国),SHZ-88 型水浴恒温振荡器(其林贝尔公司,中国),Mini-Protean tetra 型垂直板电泳装置、Trans-Blot SD 型半干转膜仪(Bio-Rad 公司,美国),F3 型全自动荧光与可见光凝胶成像分析系统(Syngene 公司,英国)。

### 1.2 细胞培养

使用含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 RPMI 1640 培养液,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 MGC-803 细胞。2~3 d 后当细胞长至 80%~90% 汇合度时,用 0.25% 胰蛋白酶消化成单个细胞并传代。3 次传代后取对数生长期细胞进入后续实验。

### 1.3 流式细胞术法检测各组细胞凋亡水平

MGC-803 细胞以  $6 \times 10^3$  个/ml 接种于 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶,分为空白对照、UA 干预和 UA+3-MA 组。待细胞贴壁后 UA 干预组加入含浓度为 40  $\mu$ mol/L 的 UA 培养液;UA+3-MA 组采用文献[8]的方法加入含 2.5 mmol/L 3-MA 培养液预处理细胞 1 h,用含 2.5 mmol/L 3-MA 和 40  $\mu$ mol/L 的 UA 培养液继续培养。3 组细胞生长 48 h 后,采用 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒检测各组细胞凋亡水平。使用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞,显微镜下观察。待细胞分离后使用培养液终止消化,收集最初培养液中细胞和消化后的细胞,制备单细胞悬液,PBS 洗 2 遍,1 500 $\times$ g 离心 3 min,Buffer 重悬细胞,严格按照说明书步骤操作后进行上机检测。Q1-LL 区域代表活细胞,Q1-LR 区域代表早期凋亡细胞,Q1-UR 区域代表晚期凋亡细胞,Q1-UL 区域代表坏死细胞。

### 1.4 双荧光 mRFP-eGFP-LC3 质粒转染细胞法检测各组细胞自噬水平

mRFP-eGFP-LC3 质粒转染 MGC-803 细胞 24 h,后续各组细胞处理方法同 1.3,200 倍荧光显微镜观察细胞内红色和绿 LC3 亮点变化,并拍照。

### 1.5 qPCR 法检测各组细胞 LC3B、BAX 和 Bcl-2 mRNA 的表达

MGC-803 细胞分组及处理方法同 1.3。待 3 组细胞分别培养 48 h 后,倒掉培养液,每瓶细胞加入 0.5 ml RNAiso Plus,严格按照说明书提取各组细胞 mRNA。紫外分光光度计测定 260 nm 及 280 nm 下的

光密度(*D*)值,计算各组细胞纯度合格的mRNA的浓度。引物由大连 TaKaRa 生物技术公司合成,选用 GAPDH 作为内参照。GAPDH 上游引物为 5'-CTTTTGCCTCGCCAGGTGAA-3',下游引物为 5'-GACCAAATCCGTTGACTCCGA-3';LC3B 上游引物为 5'-AAGGCTTTCAGAGAGACCCTG-3',下游引物为 5'-CCGTTTACCCTGCGTTTGTG-3';BAX 上游引物为 5'-TCATGGGCTGGACATTGGAC-3',下游引物为 5'-GAGACAGGGACATCAGTCGC-3';Bcl-2 上游引物为 5'-ATCTGGGCCACAAGTGAAGT-3',下游引物为 5'-GCTGATTGACGTTTTGCCT-3'。严格按照试剂盒说明书采用 Real-time PCR 法对上述 mRNA 进行逆转录和扩增。用  $\Delta\Delta CT$  法对上述扩增结果进行相对定量分析。

### 1.6 WB 实验检测各组细胞 I 型 PI3K、p-AKT、p-mTOR、ULK1 蛋白的表达

MGC-803 细胞分组及处理方法同 1.3。待 3 组细胞分别培养 48 h 后,倒掉培养液,加入适量蛋白裂解液提取各组细胞总蛋白,并用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒对各组细胞进行蛋白定量。以 40  $\mu\text{g}$  蛋白/泳道上样,经 SDS-PAGE (110 V, 约 30 min; 70 V, 约 80 min)后,湿转(100 V, 70 min)至 NC 膜,含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭液室温封闭 30 min 后,加入 1:800 兔

抗人 I 型 PI3K、p-AKT、p-mTOR、ULK1、LC3A/B、BAX、Bcl-2 一抗,4  $^{\circ}\text{C}$  封闭过夜, TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。加入 HRP 标记的羊抗兔二抗(1:5 000),室温孵育 1 h, TBST 洗涤 4 次,每次 10 min。按试剂盒说明书配置适量发光液 4  $^{\circ}\text{C}$  避光保存,待洗膜结束后,将膜放在曝光板上,膜上滴适量的发光液,应用 F3 型全自动荧光与可见光凝胶成像分析系统曝光分析图片。

### 1.7 统计学处理

采用 SPSS19.0 统计学软件和 GraphPad PHsm6.0 作图软件,计量数据采用  $\bar{x}\pm s$  表示,两组间的比较用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,以  $P<0.05$  或  $P<0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 UA 干预能够促进 MGC-803 细胞凋亡

流式细胞术法检测结果(图 1)显示,与空白对照组比较,UA 干预组细胞凋亡率显著增加( $P<0.05$ ),其中早期凋亡细胞占 12.52%,晚期凋亡细胞占 6.89%;与 UA 干预组相比,UA+3-MA 组细胞凋亡率显著降低( $P<0.05$ ),其中早期凋亡细胞占 3.45%,晚期凋亡细胞占 4.96%。上述结果表明,UA 干预能够促进 MGC-803 细胞凋亡。

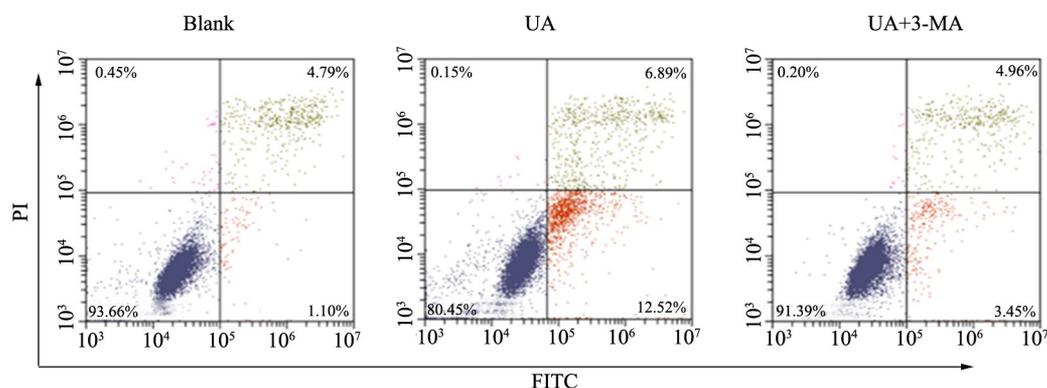


图 1 UA 干预对 MGC-803 细胞凋亡的影响

Fig.1 Effect of UA intervention on apoptosis of MGC-803 cells

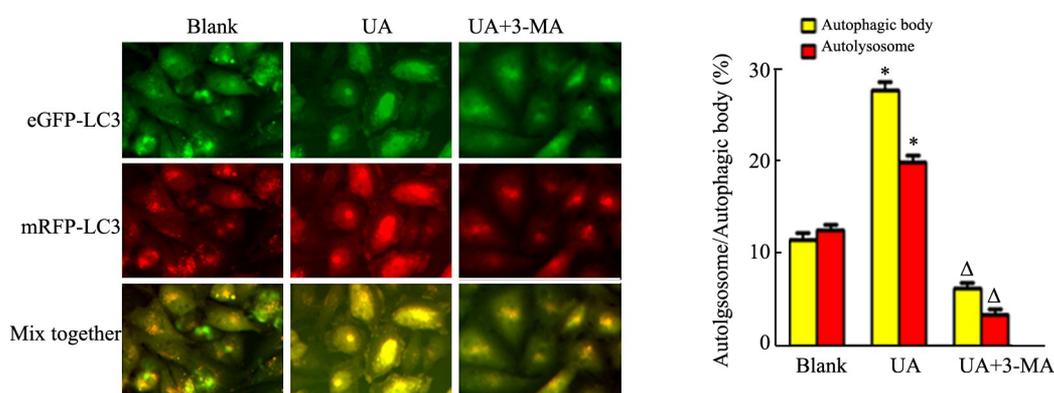
### 2.2 UA 干预能提高 MGC-803 细胞自噬能力

mRFP-eGFP-LC3 质粒转染细胞法检测结果(图 2)显示,与空白对照组相比,UA 干预组绿色和红色荧光亮点数均显著增加( $P<0.05$ );与 UA 干预组相比,UA+3-MA 组绿色和红色荧光亮点数均显著减少( $P<0.01$ )。结果表明,UA 干预能提高 MGC-803 细胞自噬能力。

### 2.3 UA 干预可调节 MGC-803 细胞 LC3B、BAX、

### Bcl-2 mRNA 的表达

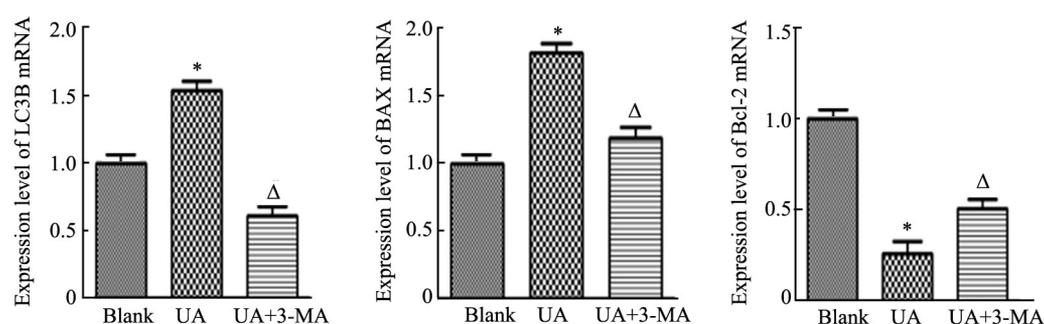
qPCR 法检测结果(图 3)显示,与空白对照组比较,UA 干预组 BAX 和 LC3B mRNA 表达水平显著上调,Bcl-2 mRNA 表达水平均显著下调(均  $P<0.05$ );与 UA 干预组相比,UA+3-MA 组 BAX 和 LC3B mRNA 表达水平显著下调,Bcl-2 mRNA 表达水平显著上调(均  $P<0.05$ )。上述结果表明,UA 干预可调节 MGC-803 细胞 LC3B、BAX、Bcl-2 mRNA 的表达。



\* $P < 0.05$  vs Blank group,  $^{\Delta}P < 0.01$  vs UA group

图2 UA干预对MGC-803细胞自噬体和自噬溶酶体的影响( $\times 100$ )

Fig. 2 Effects of UA intervention on autophagy and autophagic lysosome of MGC-803 cells( $\times 100$ )



\* $P < 0.05$  vs Blank group,  $^{\Delta}P < 0.05$  vs UA group

图3 UA干预对MGC-803细胞LC3B、BAX、Bcl-2 mRNA表达的影响

Fig. 3 Effects of UA intervention on the mRNA expressions of LC3B, BAX and Bcl-2 in MGC-803 cells

#### 2.4 UA干预可调节MGC-803细胞I型PI3K、p-AKT、p-mTOR、ULK1等蛋白的表达

WB实验检测结果(图4)显示,与空白对照组相比,UA干预组BAX、LC3B和ULK1蛋白表达水平均显著上调,I型PI3K、p-AKT、p-mTOR、Bcl-2蛋白表达水平均显著下调(均 $P < 0.05$ );与UA干预组相比,UA+3-MA组BAX和LC3B蛋白表达水平显著下调,Bcl-2蛋白表达水平显著上调(均 $P < 0.05$ ),I型PI3K、p-AKT、p-mTOR、ULK1蛋白表达水平无显著差异( $P > 0.05$ )。上述结果表明,UA干预可调节MGC-803细胞I型PI3K、p-AKT、p-mTOR、ULK1等蛋白的表达。

### 3 讨论

胃癌是起源于胃黏膜上皮的恶性肿瘤,是中国各种恶性肿瘤中发病率较高的疾病。临床早期无明显症状,或仅有嗝气、上腹部不适等非特异性症状,因症状不典型,易与胃炎、胃溃疡等慢性胃部疾病相混淆而不被人们重视。因此一旦确诊,大部分患者已经处于进展期,也正因为如此,其5年生存率仅为

27.4%<sup>[9-10]</sup>。UA又名乌索酸,属五环三萜类化合物,广泛存在于蔬菜水果以及中草药中,近年来,UA的抗肿瘤作用得到了国内外学者的广泛关注。刘忠庆等<sup>[11]</sup>对其抗肿瘤作用机制进行归纳和总结,结果发现UA可以通过诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞增殖、抗血管生成、抗侵袭和影响肿瘤细胞信号转导通路等途径参与肿瘤细胞的发生发展。本课题组<sup>[6]</sup>前期研究发现,UA可以通过促进MGC-803细胞凋亡而对胃癌细胞生长产生显著抑制作用,且在该过程中细胞自噬也被激活。本研究在前期研究的基础上,进一步明确UA诱导自噬的可能作用机制及UA诱导的凋亡与自噬之间的关系。

自噬是机体一种程序性细胞死亡,产生于饥饿、氧化、压力等应激状态下,作为真核细胞内广泛存在的降解和再循环系统,在维持细胞内环境稳定中起着非常重要的作用<sup>[12]</sup>。研究<sup>[13]</sup>发现,自噬过程影响肿瘤、神经退行性疾病、心脑血管疾病、多囊卵巢综合征等多种疾病的发生发展。本次实验首先采用mRFP-eGFP-LC3质粒转染MGC-803细胞,LC3携带mRFP的红色荧光和eGFP的绿色荧光可大量聚集在

自噬前体和自噬体膜上,图中黄色亮点是红绿荧光在荧光显微镜中的合成图像;由于绿色荧光在酸性条件下即自噬体与溶酶体融合形成自噬溶酶体时发生淬灭,而红色荧光耐受降解,可全程标记和追踪LC3,使自噬溶酶体呈红色亮点,而绿色荧光可以指示自

噬体和溶酶体的融合。故当自噬被诱导时,黄色亮点(主要是自噬体)和红色亮点(自噬溶酶体)都增加。本研究与空白对照组相比,UA干预组细胞内黄色和红色荧光亮点数均显著增加,表明UA可以诱导胃癌细胞MGC-803发生自噬。

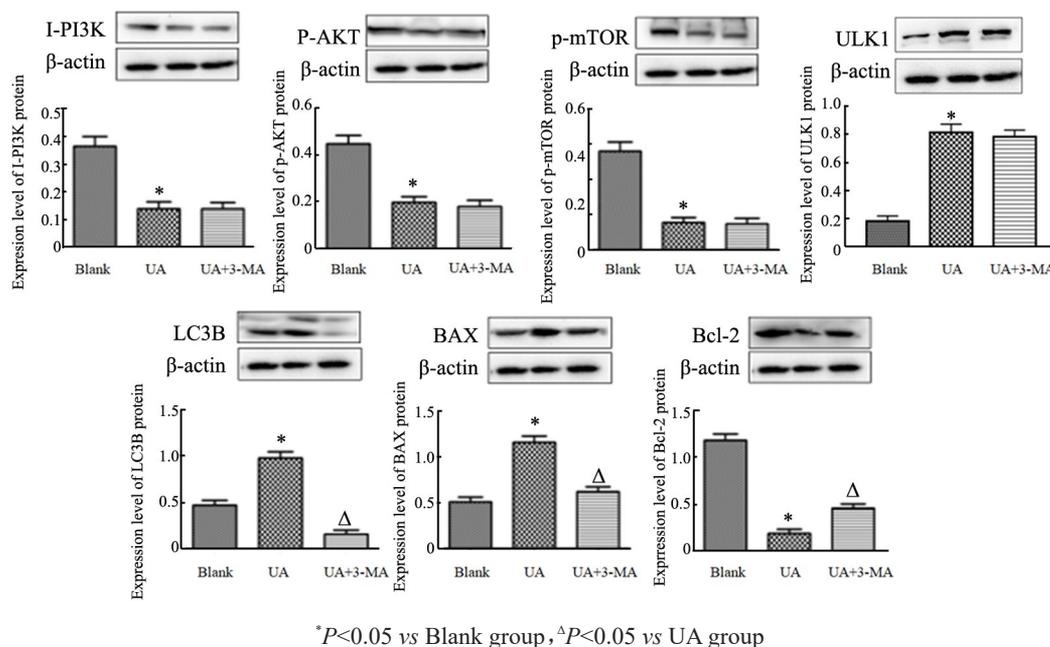


图4 UA干预对MGC-803细胞 I 型PI3K、p-AKT、p-mTOR、ULK1等蛋白表达的影响

Fig. 4 Effects of UA intervention on the protein expressions of I- PI3K, p-AKT, p-mTOR and ULK1 in MGC-803 cells

但自噬相关信号转导通路错综复杂,目前关注较多的有mTOR、PI3K/AKT、ROS、NF-κB等几条重要的相关信号通路<sup>[14]</sup>。明确药物诱导的自噬与哪条相关信号转导通路有关,有助于医疗工作者选择适当的干预靶点从而更好的治疗疾病。有研究<sup>[6]</sup>表明,PI3K/AKT/mTOR自噬相关信号通路在包括胃癌在内的肿瘤细胞中异常活跃。PI3K依其结构可分为I型、II型和III型。有研究<sup>[15-16]</sup>发现,抑制I型PI3K,其下游的AKT和mTOR的活性被抑制。mTOR活性被抑制后,此时其下游靶基因ULK1活性被激活,ULK1的激活会诱导自噬相关基因Atg复合体的形成,促进自噬标志性蛋白LC3I像LC3II转化,LC3II在自噬相关蛋白Atg3和Atg7的作用下转移至细胞膜从而形成自噬小体<sup>[17-19]</sup>。本研究采用WB实验对该通路上的蛋白进行检测发现,与空白对照组相比,UA干预组I型PI3K、p-AKT、p-mTOR蛋白水平表达显著降低,自噬相关蛋白ULK1、LC3B的表达水平显著增高;同时本研究也采用qPCR实验在基因水平上对其进行验证,发现自噬标志性蛋白LC3B mRNA水平与空白对照比亦显著增高,说明UA诱导的胃癌细胞MGC-803自噬可能与其抑制PI3K/

AKT/mTOR自噬相关通路上的蛋白表达水平有关。

凋亡是肿瘤细胞死亡的主要原因,从而抑制肿瘤细胞的发生和发展。本实验首先采用流式细胞术检测各组细胞的凋亡水平,结果显示,与空白对照组比较,UA干预组的早期和晚期凋亡率均显著增加。qPCR和WB实验对促凋亡因子BAX和抗凋亡因子Bcl-2在蛋白和基因水平上检测发现,与空白对照组相比,UA干预组促凋亡因子BAX的基因和蛋白水平均显著增高,而抗凋亡因子Bcl-2的基因和蛋白水平均显著降低。上述研究结果表明,UA可以通过促进胃癌细胞MGC-803凋亡从而起到很好的抗癌作用。而自噬在肿瘤发生发展过程中起到的作用确是相互矛盾的,一方面自噬可以促进肿瘤细胞进入休眠状态,当机体的内环境改变适合其生长时,休眠状态就会被解除而重新生长<sup>[20]</sup>;另一方面自噬也可以通过消除有毒的蛋白质和受损的线粒体从而抑制肿瘤细胞的生长<sup>[21]</sup>。正因为自噬对肿瘤细胞的作用是双重的,本研究想确定UA诱导的自噬对胃癌细胞是保护作用还是杀伤作用。故采用自噬抑制剂3-MA进行干预,mRFP-eGFP-LC3质粒转染法、qPCR以及WB实验结果显示,与UA干预组相比,UA+3-MA

组细胞黄和红色 LC3B 荧光亮点以及 LC3B 的 mRNA 和蛋白水平均显著降低, 但流式细胞术、qPCR 以及 WB 实验结果显示, 与 UA 干预组相比, UA+3-MA 组细胞的凋亡率显著下降, 促凋亡因子 BAX 的 mRNA 和蛋白水平显著降低, 抗凋亡因子 Bcl-2 的 mRNA 和蛋白水平显著升高。说明在 UA 诱导胃癌细胞 MGC-803 发生的凋亡和自噬是协同作用, UA 诱导的自噬可以促进胃癌细胞 MGC-803 发生凋亡, 从而起到抑制胃癌细胞生长的作用。

### [参考文献]

- [1] FITZMAURICE C, DICKER D, et al. The global burden of cancer 2013[J/OL]. *JAMA Oncol*, 2015, 1(4): 505-527[2019-02-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4500822/>. DOI:10.1001/jamaoncol.2015.0735.
- [2] CHEN W Q, ZHENG R S, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA: A Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132. DOI: 10.3322/caac.21338.
- [3] PENNARUN B, MEIJER A, DE VRIES E G, et al. Playing the DISC: turning on TRAIL death receptor-mediated apoptosis in cancer[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1805(2): 123-140. DOI: 10.1016/j.bbcan.2009.11.004.
- [4] WHITE E, DIPAOLO R S. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer[J/OL]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(17): 5308-5316[2019-02-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2737083/>. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-07-5023.
- [5] KOREN I, KIMCHI A. Cell biology. Promoting tumorigenesis by suppressing autophagy[J]. *Science*, 2012, 338(6109): 889-890. DOI: 10.1126/science.1230577.
- [6] 陈伟妍, 刘春英. 熊果酸诱导人胃癌细胞株 MGC-803 发生凋亡和自噬[J/OL]. *中华中医药学刊*, 2019, 1-8 [2019-05-06]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20190328.1606.070.html>.
- [7] MUKHERJEE B, TOMIMATSU N, AMANCHERLA K, et al. The dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 is a potent inhibitor of ATM-and DNA-PKCs-mediated DNA damage responses[J/OL]. *Neoplasia*, 2012, 14(1): 34-43[2019-02-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3281940/>.
- [8] 李船. 去氢骆驼蓬碱诱导人胃癌细胞 MGC-803 及 SGC-7901 自噬及凋亡的机制研究[D]. 广东药科大学, 2017.
- [9] 高刚. 我国癌症 5 年生存率 30.9%[J]. *大家健康*, 2015, 2: 26-28.
- [10] 宋卫峰, 姚丽君, 裘正军, 等. AJCC 第 7 版与第 6 版胃癌 TNM 分期的比较: 一项基于预后分析的 918 例中国胃癌人群的回顾性研究[J]. *肿瘤*, 2012, 32(8): 615-621. DOI: 10.3781/j.issn.1000-7431.2012.08.009.
- [11] 刘忠庆, 廖洪利, 甘亚. 熊果酸的抗肿瘤作用研究进展[J]. *西南国防医药*, 2014, 24(6): 682-683. DOI: 10.3969/j.issn.1004-0188.2014.06.046.
- [12] MIZUSHIMA N, LEVINE B, CUERVO A M, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion[J/OL]. *Nature*, 2008, 451(7182): 1069-1075[2019-02-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2670399/>. DOI:10.1038/nature06639.
- [13] MARZETTI E, CSISZAR A, DUTTA D, et al. Role of mitochondrial dysfunction and altered autophagy in cardiovascular aging and disease: from mechanisms to therapeutics[J/OL]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2013, 305(4): H459-H476[2019-02-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3891249/>. DOI:10.1152/ajpheart.00936.2012.
- [14] 陈松峰, 邵增务. 自噬相关信号转导通路研究进展[J]. *国际骨科学杂志*, 2013, 34(4): 269-271, 280. DOI: 10.3969/j.issn.1673-7083.2013.04.011.
- [15] CHIU H W, LIN W, HO S Y, et al. Synergistic effects of arsenic trioxide and radiation in osteosarcoma cells through the induction of both autophagy and apoptosis[J]. *Radiat Res*, 2011, 175(5): 547-560. DOI:10.1667/RR2380.1.
- [16] SHRIVASTAVA S, BHANJA CHOWDHURY J, STEELE R, et al. Hepatitis C virus upregulates Beclin1 for induction of autophagy and activates mTOR signaling[J/OL]. *J Virol*, 2012, 86(16): 8705-8712[2019-02-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3421755/>. DOI:10.1128/JVI.00616-12.
- [17] JUNG C H, JUN C B, RO S H, et al. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery[J/OL]. *Mol Biol Cell*, 2009, 20(7): 1992-2003[2019-02-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2663920/>. DOI: 10.1091/mbc.e08-12-1249.
- [18] ARYAL P, KIM K, PARK P H, et al. Baicalein induces autophagic cell death through AMPK/ULK1 activation and downregulation of mTORC1 complex components in human cancer cells[J]. *FEBS J*, 2014, 281(20): 4644-4658. DOI:10.1111/febs.12969.
- [19] FUNDERBURK S F, WANG Q J, YUE Z Y. The Beclin 1-VPS34 complex at the crossroads of autophagy and beyond[J/OL]. *Trends Cell Biol*, 2010, 20(6): 355-362[2019-02-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3781210/>. DOI:10.1016/j.tcb.2010.03.002.
- [20] WHITE E, DIPAOLO R S. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer[J/OL]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(17): 5308-5316[2019-02-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2737083/>. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-07-5023.
- [21] KOREN I, KIMCHI A. Cell biology. Promoting tumorigenesis by suppressing autophagy[J]. *Science*, 2012, 338(6109): 889-890. DOI: 10.1126/science.1230577.

[收稿日期] 2019-02-12

[修回日期] 2019-04-13

[本文编辑] 王映红