

隐丹参酮对肝癌细胞凋亡的影响及其机制

张海霞^{1,2} 李康康¹ 程明阳¹ 陈雪红¹

(1 青岛大学基础医学院医学药理学系, 山东 青岛 266071; 2 淄博市第一医院药品调剂科)

[摘要] **目的** 探讨隐丹参酮(CPT)对 HepG2 细胞凋亡的影响及其机制。**方法** 采用 MTT 试验检测终浓度为 0、1、5、10、20、40、100 $\mu\text{mol/L}$ 的 CPT 对 HepG2 细胞活性的影响,并计算出 CPT 对 HepG2 细胞的半数致死浓度(IC_{50})。将 HepG2 细胞分为 A~D 组,分别使用终浓度 0、1、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 的 CPT 培养 48 h,分别通过划痕实验、JC-1 染色和流式细胞术检测各组 HepG2 细胞的迁移能力、线粒体膜电位以及细胞凋亡率。将 HepG2 细胞分为 E~H 组,分别使用含有 0 $\mu\text{mol/L}$ CPT+20 $\mu\text{mol/L}$ Spautin-1、1 $\mu\text{mol/L}$ CPT+20 $\mu\text{mol/L}$ Spautin-1、5 $\mu\text{mol/L}$ CPT+20 $\mu\text{mol/L}$ Spautin-1、10 $\mu\text{mol/L}$ CPT+20 $\mu\text{mol/L}$ Spautin-1 的培养液培养。采用 MTT 实验检测 E~H 组处理 48 h 时的细胞活性,Western blot 方法检测 A、D、H 组处理 48 h 时 HepG2 细胞中 LC3B-II 蛋白的表达情况,JC-1 染色检测 A、D、E、H 组处理 48 h 时的细胞线粒体膜电位,流式细胞术检测 A、D、E、H 组处理 24 h 时的细胞凋亡情况。**结果** 随着 CPT 浓度的递增,HepG2 细胞活性明显下降,处理 48 h 时的 IC_{50} 值为 3.9 $\mu\text{mol/L}$ 。随着 CPT 浓度的升高,抑制 HepG2 细胞迁移的能力逐渐增强($t=5.96\sim 29.63, P<0.05$);绿色荧光与红色荧光比值也逐渐升高($t=4.24\sim 23.36, P<0.05$);HepG2 细胞的细胞凋亡率逐渐增高($t=7.30\sim 18.15, P<0.05$)。A~H 组间比较,细胞活性均有显著性差异($F=231.15, P<0.05$),E~H 与 A~D 组相比,细胞活性增高($t=3.96\sim 18.80, P<0.05$)。H 组与 D 组相比,自噬相关蛋白 LC3B-II 蛋白表达显著降低($t=3.52, P<0.05$)。JC-1 染色结果显示,E 组、H 组与 D 组比较绿色荧光与红色荧光比值均有显著差异($t=3.58, 14.76, P<0.05$)。流式细胞术检测细胞凋亡的结果显示,E 组、H 组与 D 组比较绿色荧光与红色荧光比值均有显著差异($t=12.38, 4.99, P<0.05$)。**结论** CPT 可能通过诱导自噬从而促进 HepG2 细胞的凋亡,达到对 HepG2 细胞活性的抑制作用。

[关键词] 癌,肝细胞;隐丹参酮;细胞凋亡;自噬;细胞运动;膜电位;线粒体;细胞增殖

[中图分类号] R735.7;R963

[文献标志码] A

EFFECT OF CRYPTOTANSHINONE ON APOPTOSIS OF LIVER CANCER CELLS AND ITS MECHANISM OF ACTION ZHANG Haixia, LI Kangkang, CHENG Mingyang, CHEN Xuehong (Department of Medical Pharmacology, School of Basic Medicine, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the effect of cryptotanshinone (CPT) on the apoptosis of HepG2 cells and the underlying mechanism. **Methods** The MTT assay was used to measure the effects of CPT at final concentrations of 0, 1, 5, 10, 20, 40, and 100 $\mu\text{mol/L}$ on the viability of HepG2 cells. The median lethal concentration (IC_{50}) of CPT for HepG2 cells was calculated. HepG2 cells were divided into groups A to D for 48 h culture with CPT at final concentrations of 0, 1, 5, and 10 $\mu\text{mol/L}$, respectively. The migration ability, mitochondrial membrane potential, and apoptosis rate of HepG2 cells were determined by wound healing assay, JC-1 staining, and flow cytometry, respectively. HepG2 cells were divided into groups E to H for culture with 0 $\mu\text{mol/L}$ CPT+20 $\mu\text{mol/L}$ Spautin-1, 1 $\mu\text{mol/L}$ CPT+20 $\mu\text{mol/L}$ Spautin-1, 5 $\mu\text{mol/L}$ CPT+20 $\mu\text{mol/L}$ Spautin-1, 10 $\mu\text{mol/L}$ CPT+20 $\mu\text{mol/L}$ Spautin-1, respectively. After 48 h culture, cell viability in groups E to H was measured by the MTT assay; LC3B-II protein expression in groups A, D, and H was determined by Western blot; the mitochondrial membrane potential in groups A, D, E, and H was measured with JC-1 staining; and cell apoptosis in groups A, D, E, and H was measured by flow cytometry. **Results** With the increase of CPT concentrations, the viability of HepG2 cells was decreased significantly, with the IC_{50} value being 3.9 $\mu\text{mol/L}$ after 48 h culture. As CPT concentrations increased, the migration ability of HepG2 cells was decreased significantly ($t=5.96\sim 29.63, P<0.05$); the green/red fluorescence ratio was increased significantly ($t=4.24\sim 23.36, P<0.05$); the apoptosis rate of HepG2 cells was increased significantly ($t=7.30\sim 18.15, P<0.05$). There was a significant difference in cell viability between groups A to H ($F=231.15, P<0.05$), with higher cell viability in groups E-H than in groups A-D ($t=3.96\sim 18.80, P<0.05$). Group H showed significantly lower expression of the autophagy-related protein LC3B-II than group D ($t=3.52, P<0.05$). The JC-1 staining results showed that groups E and H significantly differed from group D in the green/red fluorescence ratio ($t=3.58, 14.76, P<0.05$). The results of apoptosis by flow cytometry showed significant differences between group E and group D as well as between group H and group D ($t=12.38, 4.99, P<0.05$). **Conclusion** CPT can effectively inhibit the viability of HepG2 cells through autophagy-mediated apoptosis.

[收稿日期] 2023-02-09; **[修订日期]** 2023-04-02

[基金项目] 山东省自然科学基金项目(RZ2200000513)

[通讯作者] 陈雪红, Email: chenxuehong@qdu.edu.cn

[KEY WORDS] Carcinoma, hepatocellular; Cryptotanshinone; Apoptosis; Autophagy; Cell movement; Membrane potential, mitochondrial; Cell proliferation

肝细胞癌是世界范围内常见的恶性肿瘤^[1],早期阶段可以通过手术治疗,但预后不好,易转移和复发。约有 80% 的患者确诊时已是中晚期^[2],错过有效的手术时机,通常只能使用药物进行治疗^[3]。虽然临床可用的化疗药物可显著改善肝细胞癌患者的预后,但毒副作用较大,还易产生药物耐受^[4],因此临床迫切需要寻找更为安全有效的药物对肝癌患者进行治疗。

近年来,多种植物来源的天然化合物被开发用于肿瘤治疗,且表现出高效低毒的特性^[5]。隐丹参酮(CPT)是从中药丹参中提取出的一种橙色针状结晶的天然活性化合物,易溶于氯仿、甲醇等有机溶剂,微溶于水。具有抗炎、抗肿瘤和抗氧化等作用,被广泛用于心血管系统疾病、癌症等多种疾病的治疗^[6-8]。研究发现,CPT 可有效抑制肺癌、乳腺癌、结直肠癌等多种肿瘤的发展^[9-11],其还可以有效诱导肝癌细胞凋亡^[12],但目前关于 CPT 是否可以调节肿瘤细胞的自噬尚不清楚。本研究通过检测不同浓度的 CPT 处理 HepG2 细胞以后,对细胞活性、迁移能力以及细胞凋亡率的影响,以及加入自噬抑制剂 Spautin-1 后,HepG2 细胞凋亡情况的变化,探讨 CPT 对 HepG2 细胞凋亡的作用及其机制,旨在为 CPT 应用于肝癌治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

MTT 试剂盒、JC-1 试剂盒以及 FITC Annexin V-PI 流式凋亡试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);PMSF、彩色预染 Marker、ECL 化学发光液(上海雅酶生物医药科技有限公司);CPT、Spautin-1(上海麦克林生化科技股份有限公司);LC3B-II 和 β 肌动蛋白(β -ACTIN)抗体和辣根过氧化物酶标记二抗(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.2 MTT 实验检测 CPT 对 HepG2 细胞增殖能力的影响

HepG2 细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司,培养于含体积分数 0.10 胎牛血清(武汉普诺赛生命科技有限公司)和体积分数 0.01 青霉素-链霉素溶液(武汉普诺赛生命科技有限公司)的培养液中,置于 37 °C、含体积分数 0.05 的 CO₂ 的恒温培养箱中培养。CPT 和 Spautin-1 均先使用二甲基亚砜(DMSO)溶解配成母液,然后使用无血清培养基配制成实验所需的各种浓度。将处于对数生长期的 HepG2 细胞接种于 96 孔板之中,培养 24 h。吸出

原培养液以后,分别加入浓度为 0、1、5、10、20、40、100 μ mol/L 的 CPT 培养液 100 μ L,继续培养 48 h。吸出原培养液,加入 100 μ L 的 MTT 溶液,再孵育 4 h。吸出 MTT 溶液,加入 100 μ L DMSO,摇床振荡 5 min,以酶标仪(美国伯腾仪器有限公司)测定波长 490 nm 处的吸光度值。计算细胞活性和半数致死浓度(IC₅₀)值。以 IC₅₀ 值为依据,选择后续实验的 CPT 浓度。

1.3 划痕实验检测 CPT 对 HepG2 细胞迁移能力的影响

将对数生长期的 HepG2 细胞接种于 6 孔板中,待细胞密度大于 90% 时,使用 200 μ L 枪头对板底部细胞进行划痕,PBS 洗 2 次,于培养基中分别加入浓度为 0、1、5、10 μ mol/L 的 CPT 培养液 100 μ L (A~D 组),继续培养 48 h。倒置光学显微镜下(日本尼康株式会社)观察、拍照,记录划痕愈合情况并计算迁移率。

1.4 JC-1 染色检测 CPT 对 HepG2 细胞线粒体膜电位的影响

将对数生长期的 HepG2 细胞接种于 6 孔板中,取培养 48 h 的 A~D 组细胞,吸去上层培养液,然后加入 JC-1 工作液,室温下避光孵育 30 min,PBS 清洗 3 次。荧光显微镜(德国徕卡仪器有限公司)下观察、拍照。计算绿色荧光与红色荧光比值,该比值越大,表示线粒体膜电位越低。

1.5 流式细胞术检测 CPT 对 HepG2 细胞凋亡的影响

取培养 24 h 的 A、B、C、D 组细胞,置于离心管中,以 800 r/min 离心 5 min,PBS 缓冲液重悬,再以 800 r/min 离心 5 min,弃上清液,每管加 300 μ L 上样缓冲液重悬后,分别加入 5 μ L FITC Annexin V 和 10 μ L PI 染色液。使用流式细胞仪(美国贝克曼库尔特有限公司)分析 HepG2 细胞的凋亡情况,计算细胞凋亡率。

1.6 MTT 实验检测联用自噬抑制剂 Spautin-1 和 CPT 对 HepG2 细胞增殖能力的影响

将对数生长的 HepG2 细胞接种于 96 孔板中,设置为 E~H 组,分别加入含 0 μ mol/L CPT + 20 μ mol/L Spautin-1、1 μ mol/L CPT + 20 μ mol/L Spautin-1、5 μ mol/L CPT + 20 μ mol/L Spautin-1 以及 10 μ mol/L CPT + 20 μ mol/L Spautin-1 的无血清培养液,继续培养 48 h 后,采用 MTT 实验检测各组 HepG2 细胞活性。

1.7 Western blot 方法检测 Spautin-1 以及 CPT

对 HepG2 细胞 LC3B-II 蛋白表达的影响

取培养 48 h 的 A、D、H 组细胞,裂解细胞,收集细胞悬液。12 000 r/min 离心 30 min,分离上清液,−80 °C 冰箱保存备用。采用 BCA 蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度后。然后使用 PAGE 凝胶快速制备试剂盒制备 SDS-PAGE 凝胶,每孔上样 10~20 μL 样品后,80 V 电泳 20 min,120 V 电泳 60~80 min。随后 300 mA 转膜 90 min,BSA 封闭液封闭 1 h,一抗 4 °C 下孵育 12 h,二抗室温孵育 2 h 后,ECL 显影,显影仪(法国 VILBER LOURMAT 公司)下拍照,Image J 对条带进行量化。

1.8 JC-1 染色检测 Spautin-1 和 CPT 对 HepG2 细胞线粒体膜电位的影响

取培养 48 h 的 A、D、E、H 组细胞,按 1.4 方法对各组细胞染色,计算绿色荧光与红色荧光比值。

1.9 流式细胞术检测 Spautin-1 和 CPT 对 HepG2 细胞凋亡的影响

取培养 24 h 的 A、D、E、H 组细胞,按 1.5 方法分析各组细胞的凋亡率。

2 结 果

2.1 CPT 对 HepG2 细胞细胞活性的影响

0、1、5、10、20、40、100 μmol/L 浓度的 CPT 处理 48 h 时,HepG2 细胞的细胞活性分别为(100.3±1.2)%、(83.7±4.0)%、(46.1±4.4)%、(22.1±2.3)%、(20.5±3.8)%、(19.1±1.2)%、(16.1±2.1)%。各浓度比较差异具有显著性($F=377.50, P<0.05$);随着 CPT 浓度的升高,HepG2 细胞的细胞活性呈显著性下降($t=5.40\sim 25.26, P<0.05$)。通过计算 CPT 作用 HepG2 细胞 48 h 时的 IC₅₀ 值为 3.9 μmol/L。根据 MTT 实验结果,采用 0、1、5 及 10 μmol/L 的 CPT 用于后续实验。

2.2 CPT 对 HepG2 细胞迁移能力的影响

CPT 作用于 HepG2 细胞 48 h 以后,A~D 组细胞的迁移率分别为(54.51±3.15)%、(37.14±3.11)%、(22.45±2.98)%、(0.00±0.19)%,各组间比较,HepG2 细胞的迁移率差异具有显著性($F=508.90, P<0.05$),且随着 CPT 浓度的升高,抑制 HepG2 细胞迁移能力逐渐增强($t=5.96\sim 29.63, P<0.05$)。

2.3 CPT 对 HepG2 细胞凋亡的影响

JC-1 染色结果显示,A~D 组 HepG2 细胞处理 48 h 时,绿色荧光与红色荧光比值分别为 0.00±0.03、0.45±0.15、1.50±0.19、7.18±0.59,各组间比

较差异有显著性($F=333.20, P<0.05$),随着 CPT 浓度的升高,HepG2 细胞中绿色荧光逐渐增强,绿色荧光与红色荧光的比值也逐渐升高($t=4.24\sim 23.36, P<0.05$)。

流式细胞术检测结果显示,A~D 组 HepG2 细胞处理 24 h 时,HepG2 细胞的凋亡率分别为(7.22±1.91)%、(16.85±3.40)%、(24.52±1.86)%、(30.22±2.96)%。各组间比较差异有显著意义($F=160.90, P<0.05$),随着 CPT 浓度的升高,HepG2 细胞的细胞凋亡率逐渐增高($t=7.30\sim 18.15, P<0.05$)。

2.4 联用自噬抑制剂 Spautin-1 和 CPT 对 HepG2 细胞毒性和细胞凋亡的影响

MTT 检测结果显示,E~H 组细胞处理 48 h 以后,细胞活性分别为(92.60±3.44)%、(86.84±2.28)%、(64.89±3.86)%、(45.04±2.92)%,各组间比较,细胞活性均具有显著性差异($F=231.15, P<0.05$),E 组与 A 组、F 组与 B 组、G 组与 C 组、H 组与 D 组相比,细胞活性均增加($t=3.96\sim 18.80, P<0.05$)。Western blot 实验的结果显示,A、D、H 组 LC3B-II 蛋白的相对表达量分别为 100.21±15.36、319.56±33.89、192.36±22.58。3 组细胞的 LC3B-II 蛋白表达比较差异均有显著性($F=602.36, P<0.05$),其中 A 组、H 组与 D 组比较,HepG2 细胞中 LC3B-II 蛋白表达比较均具有显著差异($t=9.17、3.52, P<0.05$)。

JC-1 染色结果显示,A、D、E、H 组 HepG2 细胞的绿色荧光与红色荧光比值分别为 0.13±0.05、3.02±0.15、0.31±0.16、0.68±0.24,各组间比较差异有显著性($F=103.25, P<0.05$),其中 E 组与 A 组比较,差异无显著性($P>0.05$);E 组、H 组与 D 组比较有显著差异($t=3.58、14.76, P<0.05$)。流式细胞术检测细胞凋亡的结果显示,A、D、E、H 组 HepG2 细胞的凋亡率分别为 8.51±2.44、29.99±2.39、10.42±1.15、20.35±2.72,各组间比较差异有显著性($F=221.69, P<0.05$),其中 E 组与 A 组比较,该比值无显著差异($P>0.05$),E 组、H 组与 D 组进行比较该比值均有显著差异($t=12.38、4.99, P<0.05$)。

3 讨 论

丹参通常使用其干燥根入药,被用于治疗多种疾病,例如心脑血管病、肝病、血液系统疾病、出血、月经紊乱、流产和失眠等^[13]。CPT 作为丹参的主要二萜衍生物,在不同的疾病中均表现出了优异的药

理活性,尤其在肿瘤的预防和治疗方面具有巨大潜力^[14]。研究表明 CPT 对肺癌、白血病、结肠癌、乳腺癌、肝癌、胃癌、神经瘤、膀胱癌等均具有抑制作用^[15-16],其作用机制主要包括抑制肿瘤细胞生长、转移、侵袭、血管生成、诱导凋亡、调节免疫、诱导细胞自噬等^[16-17]。如 CHEN 等^[14]研究发现,CPT 可调节 AMPK/TSC2/mTOR 信号通路,并且通过上调 AMPK 刺激 TSC2,进而抑制 mTOR 信号通路,达到抑制癌细胞增殖和生长的作用。

本研究发现,CPT 能显著抑制 HepG2 细胞活性,48 h 时的 IC₅₀ 值为 3.9 μmol/L。细胞迁移是肝细胞癌侵袭转移的重要因素,CPT 可以通过抑制 MMP-2 和 MMP-9 以及 PI3K/Akt/mTOR 信号通路,从两个方面干扰结肠癌细胞的迁移^[18]。还有研究表明 CPT 通过下调 PGE2 诱导的 β-连环蛋白表达和通过上调 E-钙黏蛋白和 GSK3-β 表达抑制细胞迁移^[19]。因此,针对 CPT 的抗迁移活性,本研究将梯度浓度的 CPT 处理 HepG2 细胞 48 h,结果显示 CPT 以浓度依赖的方式抑制 HepG2 细胞迁移。研究发现,CPT 可以通过抑制信号转导和转录激活因子 3(STAT3)磷酸化,从而调节线粒体功能并抑制肿瘤的进展^[20]。由此可以推测 CPT 可能会影响肿瘤细胞的线粒体功能。本研究 JC-1 染色实验结果显示,HepG2 细胞经过 CPT 处理后绿色荧光与红色荧光比值降低,线粒体膜电位下降,功能失调,这可能是由于 CPT 抑制了 STAT3 活性,从而使线粒体功能失调。为进一步研究 CPT 的凋亡诱导作用,本研究又通过流式细胞术实验对不同浓度 CPT 处理 24 h 后凋亡细胞进行分析,结果显示 CPT 可以有效诱导 HepG2 细胞凋亡。

有研究显示 CPT 可通过激活肿瘤细胞自噬诱导细胞凋亡^[21]。自噬是细胞物质被运送到溶酶体进行降解的过程,真核细胞利用自噬来调节细胞的生长和内部的稳态^[22]。自噬是细胞应对应激环境的重要手段之一,其在癌症发展的不同阶段中发挥着两种完全相反的作用,即抑瘤和促瘤作用^[23]。在癌症发展早期,自噬可以有效控制细胞的稳态,抑制肿瘤发生和发展^[23];但当癌症进展到晚期,由于肿瘤细胞生长过快,肿瘤内部严重缺乏营养物质和氧气等,在这种环境下自噬则成为了保护癌细胞存活的有效手段^[23]。XU 等^[24]研究发现,CPT 通过诱导 ROS 积累从而激活 MAPK/NF/κB 信号通路,诱导多药耐药人结肠癌细胞 SW620 的自噬和细胞死亡。基于此本研究通过 CPT 联用自噬抑制剂 Spautin-1

探讨了 CPT 是否是通过自噬诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡的,MTT 结果显示,Spautin-1 的加入逆转了 CPT 对于 HepG2 细胞活性的抑制;同时 Western blot 实验结果显示 Spautin-1 可以显著降低 CPT 诱导的自噬关键蛋白 LC3B-II 的表达。由此可以推测 CPT 是通过自噬抑制了 HepG2 细胞的增殖。LUO 等^[25]研究发现 CPT 是通过 PI3K/AKT/mTOR 途径诱导 Huh7 和 MHCC97-H 细胞的凋亡和自噬,进一步抑制其增殖。本课题组先前的研究也发现,CPT 可以通过激活结肠癌细胞 HCT116 内质网应激介导的自噬诱导细胞凋亡^[21]。本研究中 JC-1 染色和流式凋亡实验结果显示,相比于单用 CPT,联用自噬抑制剂 Spautin-1 后绿色荧光和红色荧光比值降低,凋亡细胞减少。提示 CPT 对 HepG2 细胞活性的抑制以及对凋亡的诱导作用,可能是通过诱导自噬实现的,这为 CPT 的研究拓展了思路。

综上,从临床常用的中药丹参中提取的天然化合物 CPT,可以通过诱导 HepG2 细胞凋亡抑制其增殖和迁移,其作用机制可能是通过诱导自噬进而促进了细胞的凋亡。本研究为 CPT 应用于肝癌治疗提供了理论和实验支持。

作者声明:张海霞、李康康、程明阳、陈雪红参与了研究设计;张海霞、李康康、陈雪红参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文。所有作者均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021,71(3):209-249.
- [2] BRUIX J, SHERMAN M, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LIVER DISEASES. Management of hepatocellular carcinoma: An update[J]. Hepatology, 2011, 53(3):1020-1022.
- [3] GIORGIO M D, FAGIUOLI S. Management of hepatocellular carcinoma[J]. Dig Dis, 2007, 25(3):279-281.
- [4] AYOUB W S, STEGGERDA J, YANG J D, et al. Current status of hepatocellular carcinoma detection: Screening strategies and novel biomarkers[J]. Ther Adv Med Oncol, 2019, 11:1758835919869120.
- [5] SENFT C, POLACIN M, PRIESTER M, et al. The nontoxic natural compound Curcumin exerts anti-proliferative, anti-migratory, and anti-invasive properties against malignant gliomas[J]. BMC Cancer, 2010,10:491.
- [6] 白皓天,杨婧,李娅兰,等. 红花多糖对人肝癌细胞凋亡和自噬的影响及潜在机制[J]. 中国药房, 2022,33(24):2962-2967, 2972.

[7] ZHOU Y, WANG X, YING W H, et al. Cryptotanshinone attenuates inflammatory response of microglial cells via the Nrf2/HO-1 pathway[J]. *Front Neurosci*, 2019,13:852.

[8] SUN H N, LUO Y H, MENG L Q, et al. Cryptotanshinone induces reactive oxygen species-mediated apoptosis in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes[J]. *Int J Mol Med*, 2019,43(2):1067-1075.

[9] 闫莉. 隐丹参酮通过铁死亡抑制三阴性乳腺癌的机制研究[D]. 中国人民解放军海军军医大学, 2021.

[10] 罗艺. 基于网络药理学研究隐丹参酮对肝癌细胞的作用机制[D]. 广州:广州中医药大学, 2020.

[11] BAI T, YANG K, QIN C, et al. Cryptotanshinone ameliorates renal ischaemia-reperfusion injury by inhibiting apoptosis and inflammatory response[J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2019,125(5):420-429.

[12] 王贞丽, 王晓雯, 付晓菁, 等. 隐丹参酮对肝癌细胞凋亡和内质网应激的影响[J]. *青岛大学学报(医学版)*, 2022,58(4):602-606.

[13] LI H Y, GAO C D, LIU C, et al. A review of the biological activity and pharmacology of cryptotanshinone, an important active constituent in Danshen[J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2021,137:111332.

[14] CHEN W X, PAN Y H, WANG S L, et al. Cryptotanshinone activates AMPK-TSC2 axis leading to inhibition of mTORC1 signaling in cancer cells[J]. *BMC Cancer*, 2017,17(1):34.

[15] 王加茹, 徐宛婷, 王玥, 等. 隐丹参酮抗癌作用的研究及展望[J]. *农产品加工*, 2018(2):57-58,61.

[16] 王加茹, 徐宛婷, 刘畅, 等. 隐丹参酮抗肿瘤药理作用机制研究进展[J]. *药物评价研究*, 2018,41(6):1160-1163.

[17] 张佳, 李明花, 袁星, 等. 隐丹参酮抗肿瘤作用机制的研究进展[J]. *中医研究*, 2020,33(7):76-80.

[18] ZHANG L, CHEN C, DUANMU J X, et al. Cryptotanshinone inhibits the growth and invasion of colon cancer by suppressing inflammation and tumor angiogenesis through modulating MMP/TIMP system, PI3K/Akt/mTOR signaling and HIF-1 α nuclear translocation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018,65:429-437.

[19] CHANG J H, LIN C H, SHIBU M A, et al. Cryptotanshinone (Dsh-003) from *Salvia miltiorrhiza* Bunge inhibits prostaglandin E2-induced survival and invasion effects in HA22T hepatocellular carcinoma cells[J]. *Environ Toxicol*, 2018,33(12):1254-1260.

[20] LU L, LI C X, LI D, et al. Cryptotanshinone inhibits human glioma cell proliferation by suppressing STAT3 signaling[J]. *Mol Cell Biochem*, 2013,381(1-2):273-282.

[21] FU X J, ZHAO W W, LI K K, et al. Cryptotanshinone inhibits the growth of HCT116 colorectal cancer cells through endoplasmic reticulum stress-mediated autophagy [J]. *Front Pharmacol*, 2021,12:653232.

[22] BOYA P, REGGIORI F, CODOGNO P. Emerging regulation and functions of autophagy[J]. *Nat Cell Biol*, 2013,15(7):713-720.

[23] LI X H, HE S K, MA B Y. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer[J]. *Mol Cancer*, 2020,19(1):1-16.

[24] XU Z Y, JIANG H, ZHU Y H, et al. Cryptotanshinone induces ROS-dependent autophagy in multidrug-resistant colon cancer cells[J]. *Chem Biol Interact*, 2017,273:48-55.

[25] LUO Y, SONG L, WANG X Y, et al. Uncovering the mechanisms of cryptotanshinone as a therapeutic agent against hepatocellular carcinoma[J]. *Front Pharmacol*, 2020,11:1264.

(本文编辑 耿波 厉建强)

(上接第 163 页)

[16] KONG X, LI J, LI Y R, et al. A novel long non-coding RNA AC073352.1 promotes metastasis and angiogenesis via interacting with YBX1 in breast cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2021,12(7):670.

[17] LI W D, DONG X S, HE C J, et al. lncRNA SNHG1 contributes to sorafenib resistance by activating the Akt pathway and is positively regulated by miR-21 in hepatocellular carcinoma cells[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019,38(1):183.

[18] DONGRE A, WEINBERG R A. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019,20(2):69-84.

[19] BRABLETZ S, SCHUHWERK H, BRABLETZ T, et al. Dynamic EMT: A multi-tool for tumor progression[J]. *EMBO J*, 2021,40(18):e108647.

[20] HUANG S P, SUN Y M. Long noncoding RNA MNX1-AS1 functions as a competing endogenous RNA to regulate epithelial-mesenchymal transition by sponging miR-744-5p in colorectal cancer[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2021,85(3):568-578.

[21] TAN X, CHEN W B, LV D J, et al. lncRNA SNHG1 and RNA binding protein hnRNPL form a complex and coregulate CDH1 to boost the growth and metastasis of prostate cancer [J]. *Cell Death Dis*, 2021,12(2):138.

[22] SHEN J Z, LIANG C H, SU X M, et al. Dysfunction and ceRNA network of the tumor suppressor miR-637 in cancer development and prognosis[J]. *Biomark Res*, 2022,10(1):1-14.

[23] WANG Y F, YANG L, CHEN T X, et al. A novel lncRNA MCM3AP-AS1 promotes the growth of hepatocellular carcinoma by targeting miR-194-5p/FOXA1 axis [J]. *Mol Cancer*, 2019,18(1):28.

[24] LIU L, LI X J, WU H M, et al. The COX10-AS1/miR-641/E2F6 feedback loop is involved in the progression of glioma[J]. *Front Oncol*, 2021,11:648152.

(本文编辑 耿波 厉建强)