

• 论 著 •

姜黄素类似物对人结肠癌 HT-29 细胞增殖与自噬的影响^{*}

黄屹沅¹, 陈 云¹, 陈瑞骥², 王 威^{1△}

(1. 泰州市中医院药学部, 江苏 泰州 225300; 2. 解放军总医院海南医院, 海南 三亚 572022)

[摘 要] **目的** 初步探究姜黄素类似物——WH-8 对人结肠癌 HT-29 细胞增殖和自噬的影响。**方法** 选用不同浓度 WH-8 作用于人结肠癌 HT-29 细胞, 应用四甲基偶氮唑盐还原法观察药物对细胞的生长抑制作用; 通过荧光染色技术和细胞成像技术观察 WH-8 作用下细胞自噬囊泡的变化; 四甲基偶氮唑盐还原法检测经自噬特异性抑制剂 3-MA 预处理后 WH-8 对细胞生长抑制率的影响; 蛋白质印迹法观察 WH-8 作用下细胞自噬特征性蛋白酵母自噬相关基因 1(Beclin 1)和微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)的表达情况。**结果** WH-8 呈时间-剂量依赖性抑制人结肠癌 HT-29 细胞增殖, 48 h 平均半数抑制浓度为 $(12.5 \pm 1.3) \mu\text{mol/L}$; 一定浓度下 WH-8 可诱导细胞的自噬囊泡增多; 3-MA 可逆转 WH-8 对人结肠癌 HT-29 细胞的生长抑制作用, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); WH-8 可诱导 Beclin-1 表达上调, 且在一定时间内促进 LC3 I 向 LC3 II 转化。**结论** WH-8 可抑制人结肠癌 HT-29 细胞增殖并诱导细胞自噬。

[关键词] 姜黄素类似物; 结肠癌; 人结肠癌 HT-29 细胞; 增殖; 自噬

DOI: 10.3969/j.issn.1009-5519.2023.07.004 **中图法分类号:** R735.3+5; R282.71

文章编号: 1009-5519(2023)07-1094-06 **文献标识码:** A

Effects of curcumin analogue on proliferation and autophagy of human colon cancer HT-29 cells^{*}

HUANG Yiyuan¹, CHEN Yun¹, CHEN Ruiji², WANG Wei^{1△}

(1. Department of Pharmacy, Taizhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Taizhou, Jiangsu 225300, China; 2. Hainan Hospital Affiliated to General Hospital of PLA, Sanya, Hainan 572022, China)

[Abstract] **Objective** To initially investigate the effects of curcumin analog WH-8 on the proliferation and autophagy of human colon cancer HT-29 cells. **Methods** Different concentrations of WH-8 were used to act on HT-29 cells, and MTT method was used to investigate its inhibitory effect on cell growth; fluorescence staining and cell imaging techniques were used to investigate the changes of autophagic vesicles induced by WH-8; MTT method was used to detect the effect of WH-8 on cell growth inhibition rate after pretreatment with autophagy-specific inhibitor 3-MA; western blot was used to investigate the expression of autophagy characteristic proteins [Beclin-1 and microtubule-associated protein 1 light chain 3(LC3)] in WH-8 cells. **Results** WH-8 inhibited the proliferation of HT-29 cells in a time-dose dependent manner, with an IC₅₀ value of $(12.5 \pm 1.3) \mu\text{mol/L}$ in 48 hours; WH-8 at a certain concentration could induce an increase in autophagic vesicles in cells; 3-MA could reverse the growth inhibition of WH-8 on human colon cancer HT-29 cells, and the difference is statistically significant ($P < 0.05$); WH-8 could induce the up-regulation of the expression of Beclin-1, and promote the transformation from LC3 I to LC3 II within a certain period of time. **Conclusion** The curcumin analog WH-8 could inhibit the proliferation of HT-29 cells and induce autophagy.

[Key words] Curcumin analogs; Colon cancer; HT-29 cells; Proliferation; Autophagy

结肠癌是一种严重威胁人类生命健康的恶性肿瘤。在中国, 结肠癌发病率正逐年递增, 现已成为第

^{*} 基金项目: 国家中医临床研究基地/江苏省中医药管理局科技项目资助/江苏省中医药研究院开放课题基金项目(JD2019SZXYB21)。

作者简介: 黄屹沅(1993—), 硕士研究生, 主管中药师, 主要从事中药分子药理学、中药抗肿瘤及抗代谢性疾病基础研究工作。△ 通信

作者, E-mail: Ww1950@126.com。

四大恶性肿瘤^[1]。目前,常用治疗结肠癌的化疗药物有奥沙利铂、伊立替康等,但这些传统化疗药物在使用的同时会产生耐药性,是中晚期结直肠癌治疗过程中的“拦路虎”之一^[2]。因此,寻求高效、低毒、耐药性低的新型抗结肠癌药物一直是医学界研究的重点和热点。细胞自噬又称为Ⅱ型程序性细胞死亡,指细胞内部分损伤、衰老的蛋白质或细胞器通过自噬被降解并循环利用,从而保持机体的平衡^[3]。近年来,有研究发现,自噬与抗肿瘤药物治疗过程中面临的耐药性问题密切相关^[4]。因此,探究自噬在肿瘤发生、发展过程中的作用及机制或许能揭开肿瘤治疗新篇章。

中医药在当今恶性肿瘤的综合治疗中发挥着巨大作用。姜黄作为一味传统中药,具有治疗血瘀气滞诸证的功效,与肿瘤的治则一致^[5]。姜黄素是从中药姜黄中分离得到的黄色色素,具有植物界罕见的二酮结构,是姜黄的主要成分之一,是其发挥生物活性的主要物质^[6]。目前,姜黄素的抗肿瘤作用日益引起国内外学者的广泛关注,已被美国国立癌症研究所列为第 3 代肿瘤化学预防药物进行临床研究^[7]。虽然姜黄素抗肿瘤作用具有潜在的临床应用价值,但有研究表明,其在体内代谢过快、难以在生物体内达到有效的药物浓度。近年来,姜黄素类似物逐渐引起了医药界学者的关注,有研究证实,姜黄素类似物同样具有抗肿瘤作用^[8]。本研究运用四甲基偶氮唑盐(MTT)还原法、高内涵药物筛选法、蛋白质印迹(Western blot)等技术通过研究姜黄素类似物——WH-8 对人结肠癌 HT-29 细胞增殖及细胞自噬的影响,探讨了 WH-8 治疗结肠癌的可能机制,并对其作用机制进行了初步阐释,不仅有利于加深对中药抗肿瘤临床新型应用的理解,且可改善肿瘤细胞对传统结肠癌化疗药物产生耐药性的现状。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞 人结肠癌 HT-29 细胞株来源于中科院上海细胞库。

1.1.2 仪器与试剂 细胞培养板(Corning Costar)、二氧化碳(CO₂)恒温培养箱(上海力申公司)、倒置显微镜(Motic)、超净工作台(苏净集团安泰公司)、Operetta 细胞成像系统(Perkin Elmer)、酶标仪(Bio-Tech)、垂直电泳槽及转膜仪(北京百晶公司)、冷冻离心机(Thermo Scientific)、超声仪(昆山市超声仪器公司)、电子分析天平(ACCULAB)、MTT(Sigma 公司)、RPMI-1640 培养基(Cobioer)、胎牛血清、青霉素(东北制药集团公司)、链霉素(山东鲁抗医药股份有

限公司)、胰蛋白酶(Sigma 公司)、二甲基亚砷(DMSO, Aladdin 公司)、 β -肌动蛋白抗体(ProteinTech)、抗-微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3, SantaCruz)、抗-酵母自噬相关基因 1(Beclin 1, Bioss)、辣根酶标记山羊抗小鼠免疫球蛋白 G(IgG, 中杉金桥)、辣根酶标记山羊抗兔 IgG(中杉金桥)、增强型化学发光剂(Thermo Scientific)、赫斯特荧光染料(Hoechst 33342)荧光分子探针(Invitrogen)、丹磺酰戊二胺(MDC, Sigma 公司)、细胞组织快速裂解液(Solarbio)、4%多聚甲醛(北京索莱宝科技有限公司)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(Solarbio)、Triton[®] X-100(Sigma 公司)等。

1.1.3 实验药物 姜黄素及 WH-8 均由本课题组制备,经高效液相色谱鉴定纯度大于 99.8%。5-氟尿嘧啶(5-FU)购于中国食品药品检定研究院。在无菌条件下将实验药物溶解于 DMSO,并分装于 0.5 mL 的离心管中,置于-20℃冰箱保存。药品使用前用相应的细胞培养基稀释至所需浓度,并确保 DMSO 终浓度小于 0.1%,对细胞的存活率无影响。

1.2 方法

1.2.1 细胞复苏 快速取出保存在液氮罐中的细胞,然后立即置于 37℃恒温水浴锅中,迅速振荡使其在短时间内融化,之后立刻将溶解的细胞转移到超净台中,用移液枪吸取溶解好的细胞悬液至含有 6 mL 的完全培养基的培养瓶(25 cm²)中,轻轻振荡使细胞分布均匀。最后置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养过夜,次日更换培养基继续进行培养。

1.2.2 细胞培养及传代 人结肠癌 HT-29 细胞用含 10%胎牛血清、1×10⁵ U/L 青霉素、100 g/L 链霉素的 RPMI-1640 培养基置于 37℃、5%CO₂、饱和湿度条件下培养。每 1~2 天更换培养液 1 次,待细胞生长融合率达 80%以上时给予传代。首先弃培养瓶中的原有培养基,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 1 次,再以 0.25%胰蛋白酶消化 2~5 min,待细胞在显微镜下呈圆形或椭圆形时轻拍培养瓶,使其完全脱离瓶底,随后以含血清的培养基终止其消化;将消化后的细胞悬液倒入 15 mL 离心管中 1 000 r/min 离心 5 min,然后弃上清液,加入适量含 10%胎牛血清的培养基重悬细胞,最终分至新培养瓶中,传代比例为 1:3 或 1:2。全部实验均选用对数生长期状态良好的细胞。

1.2.3 MTT 还原法观察细胞生长抑制率 取处于对数生长期、状态良好的细胞接种于 96 孔培养板中培养 24 h,待细胞完全贴壁后将培养液更换为含有不同浓度药物的培养液。继续培养至药物作用时间点

或用自噬特异性抑制剂——3-MA(5 mmol/L)预处理细胞 1 h 后再加入 12.5 μmol/L 浓度 WH-8 作用 48 h。培养结束后每孔用 100 μL 的 PBS 洗 1 遍,随后每孔加入 100 μL MTT(5 mg/mL)继续培养 2.5~3.0 h,弃孔中培养液,每孔加入 150 μL DMSO,用微量振荡器振荡 10 min,使蓝紫色结晶完全溶解,然后用酶标仪在 490 nm 波长下测定吸光度(A 值),并计算抑制率:抑制率 = $[A_{490(对照)} - A_{490(样本)}] / [(A_{490(对照)} - A_{490(空白)}) \times 100\%$ 。考察 3.125~50.000 μmol/L 不同浓度 WH-8 分别作用 6、12、24、36、48 h 后对人结肠癌 HT-29 细胞的生长抑制作用。

1.2.4 细胞染色与细胞成像 取处于生长对数期细胞接种于 96 孔黑色透底细胞培养板中,然后置于细胞培养箱中继续培养 24 h 后(覆盖率为 70%~80%)取出,弃板中原有培养基,分别加入各浓度待测药物,继续培养 48 h,然后取出细胞培养板,每孔吸出 50 μL 原培养基。于避光环境中将含 Hoechst 33342 (3 mol/L)和 MDC(0.5 mol/L)的 RPMI-1640 完全培养基加入细胞培养板中(每孔 50 μL),再置于细胞培养箱中避光培养 30 min,取出后用 PBS 洗板 1~2 次(每孔 100 μL),最后加入 RPMI-1640 完全培养基(每孔 100 μL)。用 Operetta 细胞成像系统选择 Hoechst 33342、DMC 通道,于 20×物镜下进行活细胞成像,观察细胞中自噬囊泡的变化。自噬是细胞程序性死亡的另一种形式^[9],为检测经 WH-8 处理后的细胞是否发生自噬用 Hoechst 33342、MDC 进行荧光染色后通过细胞成像技术检测细胞自噬的发生情况。人结肠癌 HT-29 细胞分别经 6.25、12.5 μmol/L 不同浓度 WH-8 和阳性药 5-FU 作用 48 h 后荧光染色。

1.2.5 Western blot 法 将收集得到的细胞重悬于细胞组织快速裂解液,于 4 ℃裂解 1 h,随后 4 ℃、13 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白定量检测,加 5×上样缓冲液后 95 ℃金属浴 10 min,使蛋白变性,再将样品用

10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,然后转至硝酸纤维素膜上用 5%脱脂奶粉封闭 2 h,运用多克隆抗体或单克隆抗体检测蛋白,并与含辣根过氧化酶的抗兔、抗鼠 IgG 结合,利用增强型化学发光剂化学发光底物显色,医用 X 射线胶片曝光。观察自噬特征性蛋白——Beclin-1、LC3 表达情况。

1.3 统计学处理 应用 Perkin Elmer 公司的 Harmony 3.0 及 Columbus 软件对高内涵图像进行数据量化处理。应用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 WH-8 可抑制人结肠癌 HT-29 细胞增殖 WH-8 具有明显抑制人结肠癌 HT-29 细胞增殖的作用,并且呈时间-剂量依赖性,48 h 平均半数抑制浓度为 $(12.5 \pm 1.3) \mu\text{mol/L}$ 。见图 1。

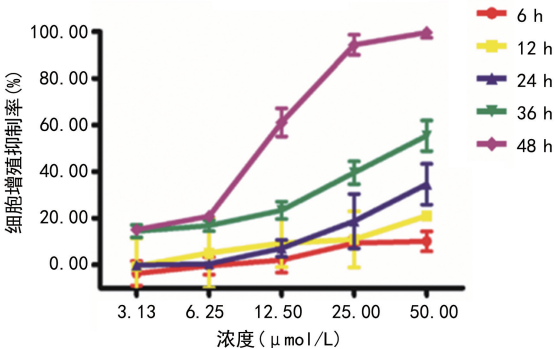


图 1 WH-8 呈时间-剂量依赖性降低人结肠癌 HT-29 细胞存活率

2.2 WH-8 诱导人结肠癌 HT-29 细胞形成自噬囊泡 与未加药组比较,药物处理组人结肠癌 HT-29 细胞质中呈现明显亮绿色颗粒(自噬囊泡),MDC 荧光强度、标记的颗粒数及其所占面积比例均增大,提示一定浓度下 WH-8 可诱导人结肠癌 HT-29 细胞发生自噬。见图 2。

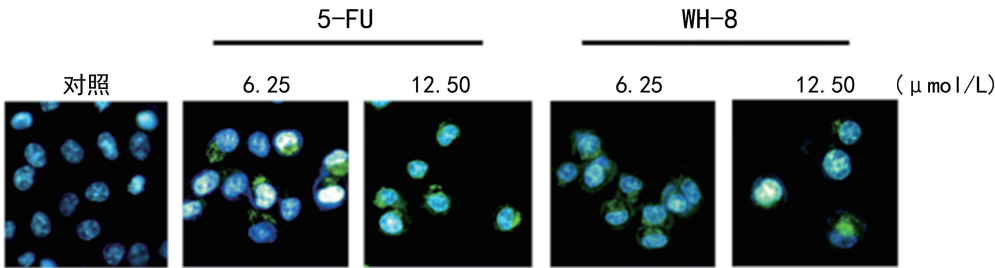
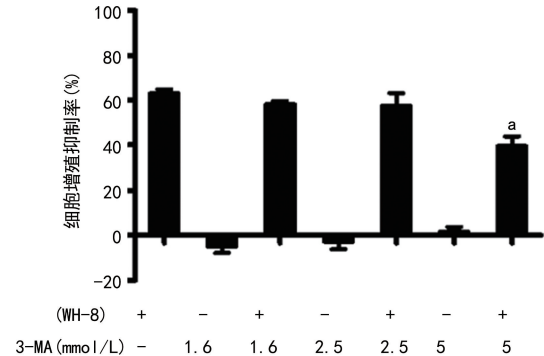


图 2 不同浓度 5-FU、WH-8 可诱导人结肠癌 HT-29 细胞形成自噬囊泡

2.3 3-MA 可逆转 WH-8 对人结肠癌 HT-29 细胞的生长抑制作用 与单独使用 WH-8 作用比较,细胞死

亡率明显下降,提示 3-MA 可显著逆转 WH-8 对人结肠癌 HT-29 细胞的生长抑制作用,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 3。



注:a 表示 $P<0.05$ 。

图 3 3-MA 可逆转 WH-8 对人结肠癌 HT-29 细胞的生长抑制作用

2.4 WH-8 可诱导细胞自噬特征性蛋白表达 与未加药组比较,Beclin-1 表达随 WH-8 作用时间增加而上调,LC3 I 向 LC3 II 转化在作用时间为 36 h 时最大。见图 4。

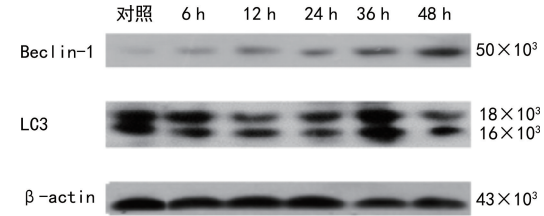


图 4 WH-8 可诱导细胞自噬特征性蛋白表达

3 讨 论

姜黄素是从姜黄中分离得到的黄色色素,被公认为具有确切的抗肿瘤活性,且不良反应小,但有研究表明,姜黄素在体内代谢过快、生物利用度低,这些固有的缺陷已成为限制其临床应用的主要因素^[10]。鉴于姜黄素临床应用的种种限制,有研究以姜黄素为母体合成了具有更高稳定性的 WH-8,并提出此姜黄素类似物同样具有抗肿瘤作用的观点^[8]。因此,为验证 WH-8 是否同样发挥抗结肠癌作用,本研究用不同浓度 WH-8 作用人结肠癌 HT-29 细胞不同时间,结果显示,WH-8 呈时间-剂量依赖性地对抑制人结肠癌 HT-29 细胞生长,提示 WH-8 具有抑制人结肠癌 HT-29 细胞增殖的作用。

细胞自噬又称为 II 型程序性细胞死亡。细胞内一些损伤或衰老的蛋白或细胞器通过自噬被降解和循环利用,从而维持机体平衡。细胞自噬相关蛋白 (Atg) 的转录后调节对自噬的发生过程具有重要影响^[11]。Beclin-1 是酵母自噬蛋白 Atg6 在哺乳动物中的同系物,与人自噬启动蛋白 1 和 Atg141 等通过相

互作用而形成自噬小泡膜的核心组成部分^[12];LC3 是酵母自噬蛋白 Atg8 的同系物,其有 I、II 型 2 种形式,在细胞质中 LC3 I 的甘氨酸残基与自噬小泡相连接后 LC3 I 型转为 II 型,因此,LC3 II / I 上调意味着自噬小泡的形成,表示细胞自噬程度的加深^[13]。所以,Beclin-1、LC3 II / I 是细胞发生自噬的主要标志。

作为细胞程序性死亡方式之一,细胞自噬与肿瘤的发生、发展息息相关,一方面细胞自噬是细胞在不良环境中一种自我保护的机制;另一方面过度自噬会引发自噬性细胞死亡^[14-15]。因此,调节自噬也是肿瘤治疗的新策略。有研究表明,细胞自噬是姜黄素抗结肠癌作用的重要机制之一^[16-17],而对姜黄素类似物诱导结肠癌细胞死亡方式的研究却罕见相关文献报道。本研究为验证姜黄素类似物是否同样发挥抗结肠癌作用,综合运用高内涵筛选法和 Western blot 法对姜黄素类似物诱导人结肠癌 HT-29 细胞死亡方式进行了探讨。

药物高内涵筛选分析作为一项现代生物医药领域的领先技术具有动态化、多靶点、同步性、智能化等特点^[18],能自动集荧光显微成像和选择性定量图像分析于一体,多指标综合筛选药物对细胞空间及细胞形态的分析,从而对细胞凋亡、自噬及信号传导等进行考察分析^[19-20]。在细胞发生凋亡时原本分布均匀的 DNA 发生浓缩,即核浓缩现象,因此,与 DNA 结合的染料可用于观察这一现象^[21]。本研究采用的 Hoechst 33342 染料是可自由透过细胞膜的一类 DNA 染料,可特异性与 DNA 相结合发出蓝色荧光,并达到对细胞进行定位的目的^[22]。如今 Hoechst 33342 染色法已被广泛用于药学领域^[23-24]。在考察药物诱导的细胞自噬时本研究引入了检测自噬体形成的特异性标记染色剂——MDC,其能选择性地聚集于自噬体、溶酶体和自噬溶酶体等酸性囊泡中,在激发光下呈蓝绿色或黄绿色颗粒状结构^[25],从而非常清晰地考察细胞的自噬进程,MDC 染色法现已成为研究细胞自噬的常用手段之一^[26-28]。本研究参照文献^[29],同时采用 Hoechst 33342、MDC 对细胞核进行染色,并借助荧光显微成像分析的自动化平台比较了平均每个细胞中 MDC 的荧光强度、自噬囊泡数量及自噬囊泡所占面积,从而用 3 个指标综合考察了药物对细胞自噬的影响,增强了检测方法的全面度和可信度。

本研究结果显示,不同浓度 WH-8 可不同程度地诱导人结肠癌 HT-29 细胞形成自噬囊泡,提示其可诱导人结肠癌 HT-29 细胞发生自噬。进而本研究应用 Western blot 法对 WH-8 诱导人结肠癌 HT-29 细

胞发生自噬在蛋白水平进行了验证,结果显示,在 WH-8 的作用下 Beclin-1、LC3 II 蛋白表达在一定时间内均呈上调趋势,说明 WH-8 可引起人结肠癌 HT-29 细胞发生自噬,不仅验证了大量文献报道的姜黄素可诱导结肠癌细胞自噬^[30-31],也进一步说明其类似物——WH-8 也可引起人结肠癌 HT-29 细胞发生自噬,从而可能发挥抗结肠癌的药效。

综上所述,WH-8 可抑制人结肠癌 HT-29 细胞增殖且诱其发生自噬,为探索姜黄素类似物对肿瘤细胞的作用机制,尤其是探讨自噬与增殖抑制的关系,为抗肿瘤,尤其是攻克肿瘤细胞对单一化疗药物的耐药性问题提供了新的思路。

参考文献

[1] YIANNAKOU I, BARBER L E, LI S, et al. A prospective analysis of red and processed meat intake in relation to colorectal cancer in the black women's health study[J]. J Nutr, 2022, 152(5):1254-1262.

[2] HERTZ D L, DOCKTER T J, SATELE D V, et al. Neuropathy severity at the time of oxaliplatin treatment alteration in patients with colon cancer (Alliance A151912) [J]. Support Care Cancer, 2021, 29(12):7855-7863.

[3] 张盼. 姜黄素调控 5-氟尿嘧啶对结肠癌 HCT116 细胞毒性及其作用机制的研究[D]. 上海:华东师范大学, 2014.

[4] JIA P, DAI C, CAO P, et al. The role of reactive oxygen species in tumor treatment [J]. RSC Adv, 2020, 10(13):7740-7750.

[5] SHANG Z P, XU L L, LU Y Y, et al. Advances in chemical constituents and quality control of turmeric[J]. J Tradit Chin Med, 2019, 5(2):50-55.

[6] SHARIFRAD J, RAYEES Y E, RIZK A A, et al. Turmeric and its major compound curcumin on health: Bioactive effects and safety profiles for food, pharmaceutical, biotechnological and medicinal applications [J]. Front Pharmacol, 2020, 11:01021.

[7] GROVER M, BEHL T, SACHDEVA M, et al. Focus on multi-targeted role of curcumin: A boon in therapeutic paradigm[J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2021, 28(15):18893-18907.

[8] ADELUOLA A, ZULFIKER A H M, BRAZ EAU D, et al. Perspectives for synthetic curcumin in chemoprevention and treatment of cancer: An update with promising analogues [J]. Eur J Pharmacol, 2021, 906:174266.

[9] TSVETKOV P, ASHER G, REISS V, et al. Inhibition of NAD(P)H: Quinine oxidoreductase 1 activity and induction of p53 degradation by the natural phenolic compound curcumin[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(15):5535-5540.

[10] 康宁, 王苗苗, 邱峰, 等. 四氢姜黄素的医药用途: 中国, CN104856980A[P]. 2015-08-26.

[11] IRESOON C, ORR S, JONES D J, et al. Characterization of metabolites of the chemopreventive agent curcumin in human and rat hepatocytes and in the rat in vivo, and evaluation of their ability to inhibit phorbol ester-induced prostaglandin E2 production[J]. Cancer Res, 2001, 61(3):1058-1064.

[12] LI L, BRAITEH F S, KURZROCK R. Liposome-encapsulated curcumin: In vitro and in vivo effects on proliferation, apoptosis, signaling, and angiogenesis [J]. Cancer, 2005, 104(6):1322-1331.

[13] BISHT S, FELDMANN G, SONI S, et al. Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin ("nanocurcumin"): A novel strategy for human cancer therapy [J]. J Nanobiotechnol, 2007, 5:3.

[14] NING F, YANG Z, XU L, et al. Targeted tumor therapy by autophagy of nanoparticles[J]. Future Oncol, 2020, 16(12):793-803.

[15] ZAAROUR R F, AZAKIR B, HAJAM E Y, et al. Role of hypoxia-mediated autophagy in tumor cell death and survival[J]. Cancers (Basel), 2021, 13(3):533.

[16] AGGARWAL B B, SHISHODIA S, TAKADA Y, et al. Curcumin suppresses the paclitaxel-induced nuclear factor-kappaB pathway in breast cancer cells and inhibits lung metastasis of human breast cancer in nude mice[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(20):7490-7498.

[17] CHAKRABORTY S, GHOSH U, BHATTACHARYA N P, et al. Curcumin-induced ap-

- optosis in human leukemia cell HL-60 is associated with inhibition of telomerase activity[J]. *Mol Cell Biochem*, 2007, 297(1/2): 31-39.
- [18] 吴慧, 于建荣. 高通量药物筛选技术进展及新药开发策略[J]. *生物产业技术*, 2010, 20(1): 89-94.
- [19] 张堃. 高通量结合高内涵筛选抗乳腺癌天然小分子药物的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2011.
- [20] DRAGOWSKA W H, WEPPLER S A, WANG J C, et al. Induction of autophagy is an early response to gefitinib and a potential therapeutic target in breast cancer[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e76503.
- [21] CROWLEY L C, MARFELL B J, WATERHOUSE N J. Analyzing cell death by nuclear staining with hoechst 33342[J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2016, 25(9): 212-216.
- [22] JOANA R E, MEJUTO I, MYRIAM C. Detection of active cell death markers in rehydrated lichen thalli and the involvement of nitrogen monoxide (NO)[J]. *Symbiosis*, 2020, 82(2): 1-9.
- [23] GUNATHILAKA T L, DILRANGI K H, RANASINGHE P, et al. Mechanistic insight into apoptotic induction in human rhabdomyosarcoma and breast adenocarcinoma cells by *chnoospora minima*: A sri lankan brown seaweed[J]. *Pharmaceuticals(Basel)*, 2021, 14(11): 1154.
- [24] 王晨晓, 王志斌, 马贝贝, 等. 用高内涵分析技术初探绒毛诃子肝毒性物质基础[J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(5): 716-721.
- [25] ZHANG Y, ZHOU Y, ZHANG H, et al. DNA binding and evaluation of anticancer activity in vitro and in vivo of iridium (Ⅲ) polypyridyl complexes[J]. *J Inorg Biochem*, 2021, 224: 111580.
- [26] ZHANG Y, ZHANG Z N, LI N, et al. Nbr1-regulated autophagy in Lactoferrin-induced osteoblastic differentiation[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2020, 84(6): 1191-1200.
- [27] YUE J, WANG X S, FENG B, et al. Activation of g-protein-coupled receptor 30 protects neurons against excitotoxicity through inhibiting excessive autophagy induced by glutamate[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2019, 10(10): 4227-4236.
- [28] LAHA D, DEB M, DAS H. KLF2(kruppel-like factor 2 [lung]) regulates osteoclastogenesis by modulating autophagy[J]. *Autophagy*, 2019, 15(12): 2063-2075.
- [29] ELDER D J, HALTON D E, PLAYLE L C, et al. The MEK/ERK pathway mediates COX-2-selective NSAID-induced apoptosis and induced COX-2 protein expression in colorectal carcinoma cells[J]. *Int J Cancer*, 2002, 99(3): 323-327.
- [30] CHAKRABORTY S, GHOSH U, BHATTA CHAYYA N P, et al. Inhibition of telomerase activity and induction of apoptosis by curcumin in K-562 cells[J]. *Mutat Res*, 2006, 596(2): 81-90.
- [31] KARIN M, LIU Z, ZANDI E. AP-1 function and regulation[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1997, 9(2): 240-246.

(收稿日期: 2022-07-28 修回日期: 2022-11-16)