

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.04.007

# 黄杨碱诱导胶质母细胞瘤细胞 T98G 凋亡及其自噬的影响\*

张琳,傅若秋,段冬玉,李紫薇,陈剑鸿<sup>△</sup>

(中国人民解放军陆军军医大学大坪医院药剂科,重庆 400042)

**摘要:**目的 探讨黄杨碱诱导胶质母细胞瘤细胞(T98G)凋亡和阻断其自噬降解的作用及其机制。方法 以黄杨碱(0,40,80,120,160  $\mu\text{mol/L}$ )处理细胞24 h(即对照组,黄杨碱1组、2组、3组、4组)。采用CCK-8法检测细胞活性,并计算细胞存活率;采用Annexin V-FITC/PI双染色法及流式细胞术检测细胞凋亡情况,并计算细胞凋亡率;采western blot法检测相关蛋白表达水平;采用Lipofectamine 3000进行tflc3质粒转染,并以荧光显微镜观察细胞中自噬荧光团的变化。结果 与对照组比较,黄杨碱1组、2组、3组、4组的细胞存活率显著降低,细胞凋亡率显著升高,且均呈量效依赖趋势( $P < 0.05$ );cleaved-PARP(C-PARP),cleaved-Caspase3(C-Caspase3)蛋白表达水平均显著升高( $P < 0.05$ );LC3 II蛋白表达水平显著升高( $P < 0.05$ ),转染tflc3双光质粒显示黄杨碱可阻断细胞的自噬降解过程;黄杨碱2组、3组、4组的P-ERK及P-mTOR蛋白表达水平均显著降低( $P < 0.05$ );黄杨碱3组、4组的P-Akt蛋白表达水平显著降低( $P < 0.05$ )。结论 黄杨碱可能通过Akt/mTOR/ERK信号通路诱导T98G细胞凋亡,并阻断其自噬降解过程。

**关键词:**黄杨碱;胶质母细胞瘤;Akt/mTOR/ERK信号通路;自噬;细胞凋亡

中图分类号:R965

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)04-0025-05

## Apoptosis of T98G Cells Induced by Cyclovirobuxine D and Its Effect on Autophagy

ZHANG Lin, FU Ruogui, DUAN Dongyu, LI Ziwei, CHEN Jianhong

(Department of Pharmacy, Daping Hospital, Army Medical University, Chongqing, China 400042)

**Abstract: Objective** To investigate the effect and mechanism of cyclovirobuxine D(CVBD) in inducing apoptosis and blocking autophagy degradation of T98G cells. **Methods** T98G cells were treated with 0,40,80,120,160  $\mu\text{mol/L}$  CVBD for 24 h, which were taken as the control group, CVBD 1,2,3,4 groups respectively. Cell viability was measured by CCK-8 assay, and the cell viability was calculated. The cell apoptosis was detected with Annexin V-FITC/PI staining and flow cytometry, and the cell apoptosis rate was calculated. The expression level of protein was measured by western blot. The tflc3 plasmids were transfection with Lipofectamine 3000 and the autophagy fluorophore changes in cells were observed by fluorescence microscopy. **Results** Compared with those in the control group, the cell viability rate was significantly decreased, while the apoptosis rate in CVBD 1,2,3,4 groups were significantly increased, and showed a dose-dependent manner( $P < 0.05$ ), the expression levels of cleaved-PARP(C-PARP), cleaved-Caspase3(C-Caspase3) and LC3 II protein in CVBD 1,2,3,4 groups were significantly increased( $P < 0.05$ ), and the transfection of tflc3 double light plasmids showed that CVBD could block the autophagy degradation process. Compared with those in the control group, the protein expression levels of phospho-ERK(P-ERK) and phospho-mTOR(P-mTOR) in CVBD 2,3,4 groups were significantly decreased( $P < 0.05$ ), the protein expression levels of phospho-Akt(P-Akt) in CVBD 3,4 groups were significantly decreased( $P < 0.05$ ). **Conclusion** CVBD may induce the apoptosis of T98G cells through Akt/mTOR/ERK signaling pathway and block the process of autophagic degradation.

**Key words:** cyclovirobuxine D; glioblastoma; Akt/mTOR/ERK signaling pathway; autophagy; cell apoptosis

胶质瘤是中枢神经系统最常见的恶性肿瘤,占所有颅内肿瘤的40%~50%<sup>[1]</sup>。世界卫生组织(WHO)将胶质母细胞瘤(GBM)列为Ⅳ级<sup>[2]</sup>。GBM患者中位生存期约为18个月,30%的患者生存期为2年,达到5年生存期的患者低于7%<sup>[3-5]</sup>。目前,对于GBM的标准疗法为手术切除联合放射治疗,并采用替莫唑胺辅以化学治疗(简称化疗)<sup>[6-7]</sup>。标准疗法尽管在一定程度上延长了患者的生存时间,但预后仍不乐观,主要因为GBM对化疗药物产生了严重耐药性,最终导致治疗失败<sup>[8-9]</sup>。故

寻找一种新型抗胶质瘤药物是目前亟须解决的问题。黄杨碱(CVBD)是小叶黄杨及其同属植物中提取的生物碱,最初用于治疗心律失常等疾病<sup>[10]</sup>。有研究表明, CVBD对乳腺癌、肝癌、结直肠癌等细胞具有抑制作用<sup>[11-13]</sup>,但目前尚无抗GBM作用及机制研究的报道。本研究中探讨了CVBD抗GBM细胞T98G(简称T98G细胞)活性的初步机制,发现CVBD可能通过Akt/mTOR/ERK信号通路诱导了T98G细胞的凋亡,并阻碍了其自噬降解过程,为将CVBD进一步开发成新型抗胶质瘤药物提

\*基金项目:重庆市卫生计生委中医药科技项目[ZY201801004]。

第一作者:张琳,女,在读硕士研究生,药师,研究方向为药理学,(电子信箱)zljxx220@163.com。

<sup>△</sup>通信作者:陈剑鸿,女,博士研究生,主任药师,研究方向为抗感染与化疗的分子机制,临床药理、天然植物药作用机制和新药研发,(电话)023-68746956。

供理论依据。现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器、试剂与细胞

#### 1.1.1 仪器

HR30-11A2 型生物安全柜(青岛海尔股份有限公司);3111 型 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(美国 Thermo 公司);CKX41 型光学倒置显微镜(日本 Olympus 公司);EVOSF1 型荧光显微镜(美国 Thermo 公司);GS-15K 型高速冷冻离心机(美国 Beckman 公司);STENERGY H1 型酶标仪(美国 Agilent 公司);C6 型流式细胞仪(美国 BD 公司);165-8001 型蛋白电泳仪、转膜槽、Chem I Doc 型超高灵敏度化学发光成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

#### 1.1.2 试剂

CVBD(成都曼思特生物科技有限公司,批号为 MUST-18081102,纯度≥99%)。DMEM 高糖培养基(美国 Hyclone 公司,批号为 SH30022.01);胎牛血清(天津康源生物技术有限公司,批号为 20180918);胰酶消化液(批号为 C0201),western 细胞裂解液(批号为 P0031),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型,批号为 P0009),均购自上海碧云天生物技术有限公司;预染蛋白(美国 Thermo 公司,批号为 26619);cleaved-Caspase 3(C-Caspase 3,批号为 19677-1-AP),PARP(批号为 13371-1-AP),均购自美国 Proteintech 公司;GADPH(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号为 2118S);phospho-Akt(P-Akt,美国 CST 公司,批号为 4060S);phospho-ERK(P-ERK,批号为 ab50011),phospho-mTOR(P-mTOR,批号为 ab137133),ERK(批号为 ab17942),Akt(批号为 ab200195),mTOR(批号为 ab2723),均购自美国 Abcam 公司;LC3 II(美国 Sigma 公司,批号为 L7543)及辣根酶标记山羊抗兔 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号为 ZB2305);Bafilomycin A1(批号为 HY-00558)及 CCK-8 试剂盒(美国 MCE 公司);细胞凋亡检测试剂盒(美国 BD 公司,批号为 556547);Rapamycin(美国 Selleck Chemicals 公司,批号为 S1039)。

#### 1.1.3 细胞

胶质母细胞瘤细胞 T98G 源于美国菌种保藏中心(ATCC)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

T98G 细胞用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基在适宜湿度、37℃ 及 5% CO<sub>2</sub> 条件下恒温培养,隔 1 d 换液,待细胞汇合率达 90% 时用胰酶消化进行传代,取对数期生长细胞进行后续试验。试验分为对照组

(0 μmol/L)和 CVBD 1,2,3,4 组(40,80,120,160 μmol/L)。同法培养 T98G 细胞 24 h。

#### 1.2.2 细胞存活率的检测

将 T98G 细胞以  $5 \times 10^3$  个/孔的密度接种于 96 孔板,37℃ 及 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 24 h,按 1.2.1 项下方法处理细胞。每孔加入 10 μL CCK-8 工作液,恒温孵育 2 h,于 450 nm 波长处检测吸光度,并计算细胞存活率。

#### 1.2.3 细胞凋亡率的检测

T98G 细胞以  $2 \times 10^5$  个/孔的密度接种于 6 孔板,37℃ 及 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 24 h,按 1.2.1 项下方法处理细胞。去除培养基,取 1 mL PBS 漂洗 1 遍后加 500 μL 胰酶消化液,轻柔吹打,混匀,转移至离心管,800 r/min 离心 5 min。去除上清液,PBS 清洗 2 遍,800 r/min 离心 5 min。用 Annexin V-FITC/PI 双染色,即将 2 μL PI 与 5 μL FITC 和 100 μL binding buffer 混匀,并轻柔重悬细胞团,室温避光处染色 15 min。用流式细胞仪检测 T98G 细胞凋亡情况,并计算凋亡率。

#### 1.2.4 蛋白表达水平

T98G 细胞以  $1.5 \times 10^6$  个/皿的密度接种于 100 mm 细胞培养皿,37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 24 h,按 1.2.1 项下方法处理细胞。提取 T98G 全细胞蛋白,用 BCA 法测定蛋白含量。每组加入  $5 \times$  loading buffer 涡旋混匀,96℃ 金属浴,使蛋白变性得蛋白样品。每组取 15 μg 上样,在电压为 60~120 V 条件下,进行聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE)90 min。恒电流 300 mA 转膜 150 min 至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉常温封闭 2 h,TBST 漂洗,4℃ 孵育目标抗体至过夜。次日回收一抗,TBST 漂洗,在室温下孵育相应二抗 2 h。TBST 漂洗后用凝胶成像系统进行曝光。将条带灰度值数字化,目的条带与内参条带灰度比值为各目的蛋白表达水平。

#### 1.2.5 细胞自噬情况

T98G 细胞以  $2 \times 10^4$  个/孔的密度接种于 24 孔板,37℃ 及 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 24 h。试验分为对照组(A组,0 μmol/L)及 CVBD 组(B组,120 μmol/L)、Bafilomycin A1 组(C组,20 nmol/L)、Rapamycin 组(D组,0.25 μmol/L)。以 Lipofectamine 3000 转染 tFLC3 质粒。取 2 支 1.5 mL 离心管,先分别加入 25 μL Opti-MEM,其后,1 支加入 0.75 μL Lipofectamine 3000,另 1 支加入 500 ng tFLC3 质粒和 1 μL P3000 试剂,充分混匀。将 2 支离心管的内容物混匀,室温孵育 5 min,形成质粒-脂质体混合物。将质粒-脂质体混合物加入细胞中,每孔 50 μL,振荡,混匀,37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 12 h,换液,24 h 后分组,同 1.2.1 项下方法处理细胞。

#### 1.2.6 统计学处理

采用 SPSS19.0 统计学软件分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,

行单因素方差分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 细胞增殖情况

与对照组比较, CVBD 1 组、2 组、3 组、4 组的细胞存活率随着 CVBD 浓度的增加而逐渐降低, 且呈量效依赖趋势 ( $P < 0.05$ )。详见表 1。

### 2.2 细胞凋亡情况

与对照组比较, CVBD 1 组、2 组、3 组、4 组的细胞凋亡率随着 CVBD 浓度的增加而逐渐升高, 且呈量效依赖趋势 ( $P < 0.05$ )。详见表 1 和图 1。

表 1 各组 T98G 细胞存活率和凋亡率比较 ( $\bar{X} \pm s, n=3$ )  
Tab.1 Comparison of viability rate and apoptosis rate of T98G cells in each group ( $\bar{X} \pm s, n=3$ )

| 组别      | 浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ ) | 细胞存活率 (%)          | 细胞凋亡率 (%)          |
|---------|--------------------------|--------------------|--------------------|
| 对照组     | 0                        | 100.00             | $3.86 \pm 0.52$    |
| 黄杨碱 1 组 | 40                       | $59.62 \pm 3.94^*$ | $15.64 \pm 0.69^*$ |
| 黄杨碱 2 组 | 80                       | $49.46 \pm 3.34^*$ | $38.37 \pm 1.32^*$ |
| 黄杨碱 3 组 | 120                      | $47.92 \pm 2.57^*$ | $44.16 \pm 1.42^*$ |
| 黄杨碱 4 组 | 160                      | $41.49 \pm 3.66^*$ | $49.93 \pm 2.34^*$ |

注: 与对照组比较,  $^* P < 0.05$ 。表 2 同。

Note: Compared with those in the control group,  $^* P < 0.05$ , as well as Tab.2.

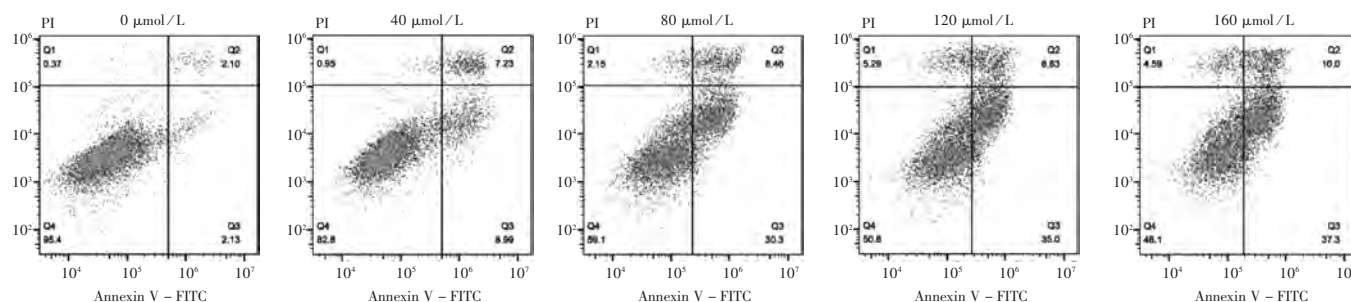


图 1 T98G 细胞凋亡情况

Fig.1 The apoptosis of T98G cells

表 2 各组细胞凋亡、信号通路及自噬相关蛋白表达水平比较 ( $\bar{X} \pm s, n=3$ )

Tab.2 Comparison of the expression levels of apoptosis, signaling pathway and autophagy related - proteins of cells in each group ( $\bar{X} \pm s, n=3$ )

| 组别      | 浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ ) | C - PARP/PARP       | C - Caspase 3/GAPDH | P - Akt/Akt         | P - mTOR/mTOR       | P - ERK/ERK         | LC3 II/GAPDH        |
|---------|--------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 对照组     | 0                        | $0.263 \pm 0.096$   | $0.017 \pm 0.003$   | $0.636 \pm 0.040$   | $0.968 \pm 0.040$   | $1.163 \pm 0.135$   | $0.452 \pm 0.129$   |
| 黄杨碱 1 组 | 40                       | $0.400 \pm 0.055^*$ | $0.129 \pm 0.025^*$ | $0.626 \pm 0.029$   | $0.972 \pm 0.007$   | $1.113 \pm 0.168$   | $1.015 \pm 0.092^*$ |
| 黄杨碱 2 组 | 80                       | $1.005 \pm 0.135^*$ | $0.913 \pm 0.078^*$ | $0.645 \pm 0.053$   | $0.698 \pm 0.078^*$ | $0.493 \pm 0.157^*$ | $1.131 \pm 0.041^*$ |
| 黄杨碱 3 组 | 120                      | $2.663 \pm 0.396^*$ | $1.069 \pm 0.120^*$ | $0.292 \pm 0.035^*$ | $0.400 \pm 0.033^*$ | $0.263 \pm 0.029^*$ | $1.172 \pm 0.016^*$ |
| 黄杨碱 4 组 | 160                      | $3.326 \pm 0.538^*$ | $1.308 \pm 0.099^*$ | $0.181 \pm 0.012^*$ | $0.320 \pm 0.014^*$ | $0.235 \pm 0.013^*$ | $1.287 \pm 0.042^*$ |

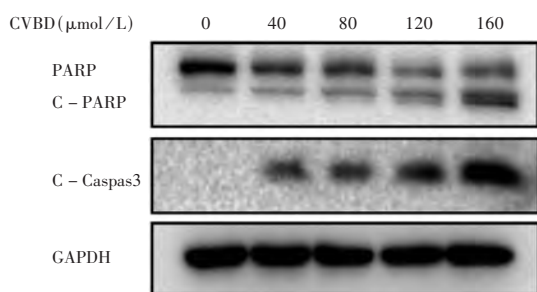


图 2 T98G 细胞凋亡相关蛋白表达情况

Fig.2 The expression of apoptosis - related proteins of T98G cells

### 2.3 细胞凋亡相关蛋白表达情况

与对照组比较, CVBD 1 组、2 组、3 组、4 组 cleaved - PARP (C - PARP) 和 C - Caspase 3 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ )。详见表 2 和图 2。

### 2.4 信号通路相关蛋白表达情况

与对照组比较, CVBD 2 组、3 组、4 组的 P - mTOR 和 P - ERK 蛋白表达水平及 CVBD 3 组、4 组的 P - Akt

蛋白表达水平均显著降低。详见表 2 和图 3。

### 2.5 细胞自噬情况

与对照组比较, CVBD 1 组、2 组、3 组、4 组的 LC3 II 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ )。详见表 2 和图 4 A。通过荧光显微镜观察荧光团发现, CVBD 与 Bafilomycin A1 分别作用于 T98G 细胞后均只观察到黄色荧光点, 而 Rapamycin 作用于 T98G 细胞后能观察到较多的红色荧光点。详见图 4 B。

## 3 讨论

CVBD 最初用于治疗心律失常等疾病<sup>[10]</sup>。近年来, 越来越多的研究揭示了 CVBD 新的药理学效应, 如抗肿瘤活性。研究表明, CVBD 对乳腺癌、肝癌、结直肠癌及胃癌肿瘤细胞有一定抑制作用, 可通过抑制细胞增殖、阻碍细胞侵袭、引起线粒体损伤、诱导细胞凋亡发挥抗肿瘤效应<sup>[11-14]</sup>。

PARP 即聚腺苷二磷酸核糖聚合酶, 是一类影响细胞生物学过程的蛋白质超家族, 在 DNA 修复、基因组稳

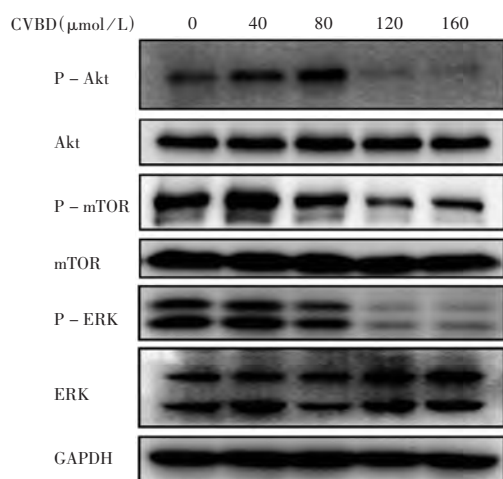
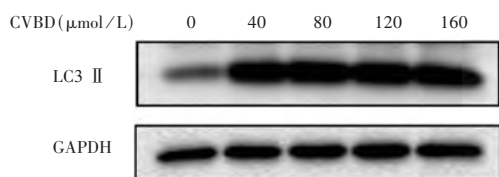
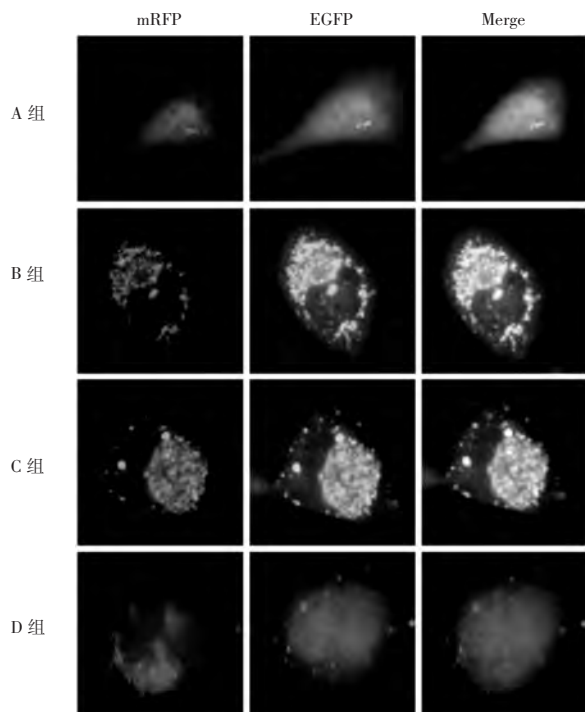


图 3 信号通路相关蛋白表达情况

Fig. 3 The expression of signaling pathway related - proteins of T98G cells



A



B

A. LC3 II 蛋白表达 B. 荧光显微镜图

图 4 T98G 细胞自噬情况

A. Expression of LC3 II protein B. Fluorescence microscopy

Fig. 4 Autophagy of T98G cells

定性和细胞程序性死亡中发挥着重要作用<sup>[15]</sup>。PARP 还是细胞凋亡核心成员半胱天冬酶 (Caspase) 的切割底物, 发生凋亡时, Caspase 信号通路被激活, 启动 Caspase

依赖的细胞内源性凋亡途径, 而 PARP 的降解和 Caspase3 的激活被认为是细胞发生凋亡的标志性事件<sup>[16]</sup>。本研究结果显示, CVBD 可抑制 T98G 细胞增殖和诱导其凋亡, 且呈浓度依赖趋势。此外, CVBD 还可激活凋亡相关蛋白 PARP 的降解, 升高 C - PARP 和 C - Caspase3 蛋白表达水平, 也呈浓度依赖趋势, 表明 CVBD 通过激活 Caspase3 凋亡信号通路诱导 T98G 细胞发生凋亡。

Akt/mTOR 信号通路在调节多种肿瘤细胞的增殖和凋亡方面起着关键作用。有研究表明, Akt/mTOR 信号通路的过度激活可使肿瘤细胞存活<sup>[17]</sup>。FENG 等<sup>[18]</sup>发现, 通过下调 P - AKT 和 P - mTOR 可诱导甲状腺癌细胞凋亡。本研究结果显示, CVBD 可降低 P - Akt 和 P - mTOR 蛋白表达水平, 提示 CVBD 可能通过 Akt/mTOR 信号通路诱导 T98G 细胞发生凋亡。ERK 属丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 家族, 它的激活与促进肿瘤细胞增殖密切相关, 而磷酸化的 ERK 可上调下游致癌激酶和转录因子的表达, 从而促进肿瘤细胞存活、生长和侵袭<sup>[19]</sup>。有研究显示, 金丝桃素可通过降低 ERK 磷酸化水平诱导胶质瘤细胞凋亡<sup>[20]</sup>。LIN 等<sup>[21]</sup>研究发现, 黄芩素可通过抑制 ERK 激活, 阻滞骨肉瘤细胞周期和抑制侵袭, 最终导致其凋亡。本研究结果显示, CVBD 可降低 ERK 磷酸化水平, 提示可能通过抑制 ERK 通路抑制 T98G 细胞增殖, 并诱导其凋亡。此外, Akt/mTOR 信号通路还与自噬密切相关, AKT 是一种丝氨酸苏氨酸激酶, 位于 PI3K 下游, 在 I 型 PI3K 作用下可形成 P - AKT, mTOR 是 PI3K/Akt 下游的一种重要蛋白激酶, 与细胞增殖、侵袭、凋亡密切相关, 同时也是调控自噬的重要因子<sup>[22 - 23]</sup>。本研究结果表明, CVBD 可降低 P - Akt 和 P - mTOR 的表达水平, 说明 CVBD 诱导的细胞凋亡可能与自噬有关。

自噬是细胞的一个生物学过程, 细胞内部的待降解底物由双层膜包裹后形成自噬小体, 然后和溶酶体融合形成自噬溶酶体, 待降解物经过溶酶体酸性环境被水解后, 回到细胞质再循环利用<sup>[24]</sup>。如果自噬过程被阻断, 自噬小体无法与溶酶体结合, 那么自噬小体将会过度堆积, 导致细胞自噬性死亡<sup>[25]</sup>。有研究显示, CVBD 可通过激活自噬诱导乳腺癌细胞凋亡<sup>[12]</sup>。但仅通过 LC3 II 水平升高就推断是诱导自噬显然是不够的。本研究运用了检测自噬流的“金标准”, 即转染 tLC3 双光质粒, 结果表明, CVBD 可升高自噬标志蛋白 LC3 II 的表达水平, 同时转染 tLC3 质粒后可引起 T98G 细胞内产生黄色荧光团, 以上结果证实 CVBD 阻断了自噬降解过程。然而阻断自噬的原因有多种, CVBD 阻断细胞自噬降解的机制还有待进一步研究。

综上所述,CVBD可抑制T98G细胞增殖,并诱导其凋亡,作用机制可能是通过Akt/mTOR/ERK信号通路激活了Caspase凋亡途径且阻碍了T98G细胞的自噬降解过程,最终导致T98G细胞凋亡。

## 参考文献

- [1] OSTROM QT, BAUCHET L, DAVIS FG, et al. The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review [J]. *Neuro Oncol*, 2014, 16(7): 896 – 913.
- [2] LOUIS DN, PERRY A, REIFENBERGER G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary [J]. *Acta neuropathologica*, 2016, 131(6): 803 – 820.
- [3] OSTROM Q, TRUITT G, GITTLEMAN H, et al. Relative survival after diagnosis with a primary brain or other central nervous system tumor in the National Program of Cancer Registries, 2004 to 2014 [J]. *Neuro – Oncology Practice*, 2020, 7(3): 306 – 312.
- [4] SEYVE A, LOZANO – SANCHEZ F, THOMAS A, et al. Initial surgical resection and long time to occurrence from initial diagnosis are independent prognostic factors in resected recurrent IDH wild – type glioblastoma [J]. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 2020, 196: 106006.
- [5] WEN P, WELLER M, LEE E, et al. Glioblastoma in adults: a Society for Neuro – Oncology (SNO) and European Society of Neuro – Oncology (EANO) consensus review on current management and future directions [J]. *Neuro – oncology*, 2020, 22(8): 1073 – 1113.
- [6] LANZETTA G, MINNITI G. Treatment of glioblastoma in elderly patients: an overview of current treatments and future perspective [J]. *Tumori*, 2010, 96(5): 650 – 658.
- [7] 徐德琴, 吕晓燕, 徐学君, 等. 左乙拉西坦在脑胶质瘤治疗中的作用与研究进展 [J]. *中国药业*, 2020, 29(6): 156 – 158.
- [8] BI Y, LI H, YI D, et al. Corrigendum to "β – catenin contributes to cordycepin – induced MGMT inhibition and reduction of temozolomide resistance in glioma cells by increasing intracellular reactive oxygen species". [Cancer Lett. 435 (2018) 66 – 79] [J]. *Cancer Letters*, 2019, 461: 157 – 158.
- [9] LEE S Y. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme [J]. *Genes & Diseases*, 2016, 3(3): 198 – 210.
- [10] YU B, FANG TH, LU GH, et al. Beneficial effect of Cyclovirobuxine D on heart failure rats following myocardial infarction [J]. *Fitoterapia*, 2011, 82(6): 868 – 877.
- [11] JIANG F, CHEN Y, REN S, et al. Cyclovirobuxine D inhibits colorectal cancer tumorigenesis via the CTHRC1/AKT/ERK signaling pathway [J]. *International Journal of Oncology*, 2020, 57(1): 183 – 196.
- [12] LU J, SUN D, GAO S, et al. Cyclovirobuxine D induces autophagy – associated cell death via the Akt/mTOR pathway in MCF – 7 human breast cancer cells [J]. *Journal of Pharmacological Sciences*, 2014, 125(1): 74 – 82.
- [13] ZHANG J, CHEN Y, LIN J, et al. Cyclovirobuxine D Exerts Anti-cancer Effects by Suppressing the EGFR – FAK – AKT/ERK1/2 – Slug Signaling Pathway in Human Hepatocellular Carcinoma [J]. *DNA and Cell Biology*, 2020, 39(3): 355 – 367.
- [14] WU J, TAN Z, CHEN J, et al. Cyclovirobuxine D Inhibits Cell Proliferation and Induces Mitochondria – Mediated Apoptosis in Human Gastric Cancer Cells [J]. *Molecules*, 2015, 20(11): 20659 – 20668.
- [15] VO P HT, NGUYEN TDT, TRAN HT, et al. Cytotoxic components from the leaves of *Erythrophleum fordii* induce human acute leukemia cell apoptosis through caspase 3 activation and PARP cleavage [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2021, 31: 127673.
- [16] WANG W, ZHU M, XU Z, et al. Ropivacaine promotes apoptosis of hepatocellular carcinoma cells through damaging mitochondria and activating caspase – 3 activity [J]. *Biological Research*, 2019, 52(1): 36.
- [17] YAP T A, GARRETT MD, WALTON MI, et al. Targeting the PI3K – AKT – mTOR pathway: progress, pitfalls, and promises [J]. *Current Opinion in Pharmacology*, 2008, 8(4): 393 – 412.
- [18] FENG H, CHENG X, KUANG J, et al. Apatinib – induced protective autophagy and apoptosis through the AKT – mTOR pathway in anaplastic thyroid cancer [J]. *Cell Death & Disease*, 2018, 9(10): 1030.
- [19] PENG J, GASSAMA – DIAGNE A. Apicobasal polarity and Ras/Raf/MEK/ERK signalling in cancer [J]. *Gut*, 2017, 66(6): 986 – 987.
- [20] HSU FT, CHEN WT, WU CT, et al. Hyperforin induces apoptosis through extrinsic/intrinsic pathways and inhibits EGFR/ERK/NF – κB – mediated anti – apoptotic potential in glioblastoma [J]. *Environmental Toxicology*, 2020, 35(10): 1058 – 1069.
- [21] LIN H, HAO Y, WAN X, et al. Baicalein inhibits cell development, metastasis and EMT and induces apoptosis by regulating ERK signaling pathway in osteosarcoma [J]. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 2020, 40(1): 49 – 57.
- [22] XIA J, DAI L, WANG L, et al. Ganoderic acid DM induces autophagic apoptosis in non – small cell lung cancer cells by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR activity [J]. *Chemico – Biological Interactions*, 2020, 316: 108932.
- [23] XU Z, HAN X, OU D, et al. Targeting PI3K/AKT/mTOR – mediated autophagy for tumor therapy [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(2): 575 – 587.
- [24] GALLUZZI L, GREEN DR. Autophagy – Independent Functions of the Autophagy Machinery [J]. *Cell*, 2019, 177(7): 1682 – 1699.
- [25] ZHOU J, LI G, ZHENG Y, et al. A novel autophagy/mitophagy inhibitor liensinine sensitizes breast cancer cells to chemotherapy through DNML – mediated mitochondrial fission [J]. *Autophagy*, 2015, 11(8): 1259 – 1279.

(收稿日期: 2020 – 09 – 08; 修回日期: 2021 – 01 – 11)