

自噬对双去甲氧基姜黄素诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡作用的影响

苗久旺, 荆雪宁, 高荧, 姜旭光, 房逢立, 张钦德*
(山东中医药高等专科学校, 山东烟台 264199)

[摘要] **目的:**探讨自噬对双去甲氧基姜黄素诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡作用的影响。**方法:**以 $24 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 双去甲氧基姜黄素或联合 $5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤 (3-methyladenine, 3-MA) 对 HepG2 细胞作用 24, 48 h, 以四甲基偶氮唑盐 (methyl thiazolye telrazlium, MTT) 比色法检测细胞活力; 以 $24 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 双去甲氧基姜黄素单用或联合 3-MA 对 HepG2 细胞作用 48 h, Hoechst 33342 染色倒置荧光显微镜观察细胞凋亡形态, 磷脂结合蛋白 V/碘化丙啶 (Annexin V/propidium iodide, PI) 双染检测细胞凋亡率, 罗丹明 123 (Rhodamine 123, Rh123) 染色检测线粒体膜电位, 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测自噬相关蛋白 Beclin-1, LC3, 半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3), 活化型 Caspase-3 (cleaved Caspase-3), B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 的活性表达。**结果:**与空白组比较, 双去甲氧基姜黄素可抑制 HepG2 细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 降低线粒体膜电位, 使 pro-Caspase-3, Bcl-2, LC3- I 蛋白表达降低 ($P < 0.01$), 升高 cleaved Caspase-3, Bax, Beclin-1, LC3- II 蛋白的表达 ($P < 0.01$); 3-MA 可增强双去甲氧基姜黄素所诱导的 HepG2 细胞凋亡, 提高凋亡率 ($P < 0.01$), 增加其降低线粒体膜电位作用 ($P < 0.01$), 明显下调 pro-Caspase-3, Bcl-2 蛋白的表达 ($P < 0.01$), 并上调 Beclin-1, LC3, cleaved Caspase-3 蛋白的表达 ($P < 0.01$)。**结论:**双去甲氧基姜黄素可经线粒体机制诱导 HepG2 细胞凋亡, 并诱导细胞自噬, 自噬对凋亡有抑制作用。

[关键词] 双去甲氧基姜黄素; 3-甲基腺嘌呤; 肝癌; 细胞凋亡; 线粒体膜电位

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R273; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)17-0167-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181525

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180516.0922.009.html>

[网络出版时间] 2018-05-17 9:28

Effect of Autophagy on Bisdemethoxycurcumin-induced Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells

MIAO Jiu-wang, JING Xue-ning, GAO Ying, JIANG Xu-guang, FANG Feng-li, ZHANG Qin-de*
(Shandong College of Traditional Chinese Medicine, Yantai 264199, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of autophagy on bisdemethoxycurcumin (BDMC) -induced apoptosis in hepatocellular carcinoma HepG2 cells. **Method:** Cells were treated with $24 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BDMC or BDMC + $5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-methyladenine (3-MA) for 24, 48 h, and then the cell activity was detected by methyl thiazolye telrazlium (MTT) assay. Cells were treated with $24 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of BDMC alone or combination with $5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-MA for 48 h, and then the morphologies were observed by Hoechst 33342 staining by using inverted fluorescence microscope. The apoptosis rate and the mitochondrial membrane potential (MMP) were assessed by Annexin V/propidium iodide (PI) staining and Rhodamine 123 (Rh123) staining respectively; the protein expression levels of Beclin-1, LC3, cleaved Caspase-3, B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), and Bcl-2 associated X protein (Bax) were evaluated by Western blot. **Result:** As compared with the blank control group, BDMC could inhibit the proliferation and induce apoptosis in HepG2 cells, decrease the MMP, decrease the protein expression levels of pro-Caspase-3, Bcl-2, LC3- I ($P < 0.01$), and increase the protein expression levels of cleaved

[收稿日期] 20171207(007)

[基金项目] 山东省高校科技发展计划项目(J11LF68); 山东省中医药科技发展计划项目(2011-151)

[第一作者] 苗久旺, 博士, 讲师, 从事中药抗肿瘤药理研究, Tel:0535-5136913, E-mail: miao02@sina.com

[通信作者] *张钦德, 教授, 从事中药资源与质量控制研究, Tel:0535-5136727, E-mail: zhangqinde0929@163.com

Caspase-3, Bax, Beclin-1, LC3-II ($P < 0.01$); 3-MA could enhance the effect of BDMC-induced HepG2 cell apoptosis, increased the apoptotic rates ($P < 0.01$), decreased the MMP ($P < 0.01$), lowered the protein expression levels of pro-Caspase-3, Bcl-2 ($P < 0.01$) and increased the protein expression levels of Beclin-1, LC3, and cleaved Caspase-3 ($P < 0.01$). **Conclusion:** BDMC could induce apoptosis via a mitochondria pathway in HepG2 cells, and could induce cells autophagy which could inhibit the cell apoptosis.

[**Key words**] bisdemethoxycurcumin; 3-methyladenine; hepatocellular carcinoma; apoptosis; mitochondrial membrane potential

原发性肝癌是目前我国排位第 4 位的常见恶性肿瘤,肿瘤致死病因顺位中仅次于肺癌、胃癌而居第 3 位,严重威胁着人民的生命和健康^[1-2]。临床用于治疗肝癌的化疗药物如 5-氟尿嘧啶、阿霉素、铂类药物等虽作用确切,但存在肝脏毒性大、可引起骨髓抑制等的缺陷^[3]。中医药因不良反应少、毒性反应低等特点用于辅助治疗肿瘤具有一定优势,但其物质基础及作用机制研究尚未完全阐明^[4]。姜黄为姜科植物,其干燥根茎为有效药用部位,具有活血行气、通经止痛之功效,主治胸胁刺痛、胸痹心痛、痛经经闭、风湿痹痛、跌扑肿痛等。古代有文字记载姜黄有防治肿瘤作用,如《新修本草》记载姜黄“主心腹结积、破血、除风热、消痈肿”,《日华子本草》中对姜黄有“治癥瘕血块、痈肿、消肿毒”等描述,现代药理研究表明,姜黄的有效成分对消化道肿瘤有一定疗效。双去甲氧基姜黄素(BDMC)为姜黄的有效成分之一,是姜黄素的天然衍生物,具有抑制脂质积聚、杀虫杀螨、抗肿瘤等作用^[5-7]。文献报道,BDMC 可诱导肿瘤细胞发生凋亡,但其潜在的机制尚未被完全阐明^[8]。细胞发生凋亡时可伴有自噬发生,自噬既可促进凋亡、也可抑制凋亡^[9]。前期课题组探讨了 BDMC 可通过降低线粒体膜电位机制诱导人白血病 K562 细胞凋亡^[10]。本文以人肝癌 HepG2 细胞为模型,探讨自噬对 BDMC 诱导 HepG2 细胞凋亡的作用及机制,从而丰富中药姜黄抗肿瘤作用的物质基础研究,也为临床药物的开发提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞 人肝癌 HepG2 细胞由江苏凯基生物技术股份有限公司提供。

1.2 药品和试剂 DMEM 培养基,胎牛血清(美国 Gibco 公司,货号分别为 11965-084,10082147);自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-MA,美国 Sigma 公司,批号 084M4087V);BDMC(上海阿拉丁试剂公司,批号 G1415005,纯度 $\geq 98\%$);噻唑蓝(MTT)比色法细胞增殖检测试剂盒,Hoechst 33342 染色液,罗丹明 123(Rhodamine 123, Rh123)染色试剂盒,磷脂结合蛋白

V/碘化丙啶(Annxin V/propidium iodide, Annxin V/PI)双染细胞凋亡检测试剂盒,青霉素,链霉素溶液,抗体自噬相关基因 Beclin-1, LC3,半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3),活化型 Caspase-3(cleaved Caspase-3),B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2),Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(江苏凯基生物技术股份有限公司,货号分别为 KGA311, KGA212-10, KGA217, KGA105, KGY002, KGYM0060-7, KGATG007-1, KGYC0026-6, KGYC0004-6, KGYM0058-7, KGYT0460-8, KGAA002)。

1.3 仪器 Multiscan MK 3 型酶标仪(美国 Thermo 公司);BC-J80S 型 CO₂ 培养箱(上海博迅实业有限公司);SW-CJ-2FD 型净化工作台(苏州净化设备厂);IX51 型倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司);FACSCalibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司);164-5051 型蛋白免疫印迹法(Western blot)电泳仪及转膜仪,Gel Doc XR 型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养及分组 HepG2 细胞培养于 90% DMEM,10% 胎牛血清培养基中,并于 37 °C 5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养,取对数生长期的细胞用于各实验。实验分 4 组,分别是空白组,3-MA 组,BDMC 组及 3-MA + BDMC 组,实验时 3-MA 预处理细胞 1 h,浓度为 5 mol·L⁻¹,BDMC 终质量浓度为 24 mg·L⁻¹。

2.2 MTT 比色法检测药物对 HepG2 细胞增殖的抑制活性^[11] 取对数生长期细胞以每孔 3 000 个接种于 96 孔板,贴壁后每孔加入相应的含药培养基 100 μL,空白组加入等体积无血清培养基,设置 3 个复孔,培养 48 h 后,每孔加入 5 g·L⁻¹ MTT 20 μL,继续培养 4 h,弃上清,每孔加入 DMSO 150 μL,摇床 10 min 轻轻地混匀,于 490 nm 处检测吸光度 A,并计算细胞抑制率。

2.3 Hoechst 33342 染色检测细胞凋亡的形态^[12] 采用细胞爬片法,并经不同药物预处理 48 h 后,自然晾干细胞样本,浸入 4% 的多聚甲醛固定液中

30 min, 磷酸盐缓冲液(PBS)浸洗 3 次, 每次 3 min, 加入 5 mg·L⁻¹ Hoechst 33342 染色液覆盖待染色细胞, 室温放置 10 min, PBS 浸洗 3 次, 每次 3 min, 用抗荧光淬灭封片液封片后于荧光显微镜下观察。

2.4 Annexin-V-FITC/PI 双染检测细胞凋亡率^[13]

药物作用 48 h 后, 收集细胞, PBS 洗涤细胞 2 次, 取 5 × 10⁵ 个细胞, 加入 Binding buffer 500 μL 悬浮细胞, 加入 Annexin V-FITC 5 μL 混匀后, 最后加入 PI 5 μL, 混匀, 室温、避光、反应 10 min, 流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2.5 Rh123 染色法检测线粒体膜电位^[13]

药物作用 48 h 后, 收集细胞, PBS 洗涤细胞 2 次, 调整细胞密度为 1 × 10⁶ 个/mL, 取 Rh123 染液加入细胞悬浮液中, 混匀, 37 °C 5% CO₂ 的培养箱避光孵育 30 min, 收集细胞, 用培养基洗 2 次, 流式细胞仪检测 Rh123 荧光强度。

2.6 Western blot 检测自噬和凋亡蛋白活性表达^[14]

收集经不同药物作用 48 h 后的细胞, 细胞裂解液冰浴裂解 30 min, 14 000 × g 离心 15 min, 收集上清, 蛋白定量后, 12% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白质。电泳后将蛋白转印至硝酸纤维素膜上, 脱脂奶粉封闭后, 加入一抗溶液(1:200)封闭, 4 °C 摇床振荡孵育过夜。第 2 天取出, 室温振荡 30 min, 吸弃一抗, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 加入二抗溶液(1:2 000)封闭, 室温摇床振荡反应 1 h, 加入 ECL 化学发光液反应后, 使用凝胶成像系统扫描, 并用软件分析灰度值。

2.7 统计分析处理

用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间采用单因素方差分析和 *t* 检验, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 自噬减弱 BDMC 抑制 HepG2 细胞的增殖活性

HepG2 细胞经 BDMC 作用 24, 48 h 后, 与空白组比较, BDMC 组, 3-MA + BDMC 组的抑制率均升高 (*P* < 0.01); 与 BDMC 组比较, 3-MA + BDMC 组的抑制率继续升高, 其中 48 h 抑制率升高显著 (*P* < 0.01), 见表 1。

3.2 自噬抑制 BDMC 诱导 HepG2 细胞凋亡

空白组中 HepG2 细胞荧光染色后镜下可见细胞核呈弥散、大小均匀、荧光均匀。BDMC 组出现较典型的凋亡细胞特征, 如细胞核形态变小、核仁浓缩、细胞核碎裂、出现凋亡小体等, 3-MA + BDMC 组凋亡特征更为明显, 见图 1。

表 1 BDMC 及 3-MA 抑制 HepG2 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 3)

Table 1 Anti-proliferation effect after BDMC treatment with or without 3-MA in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, *n* = 3) %

组别	浓度	24 h 抑制率	48 h 抑制率
空白	-	0	0
3-MA	5 mol·L ⁻¹	10.37 ± 4.55	18.37 ± 2.52
BDMC	24 mg·L ⁻¹	38.01 ± 3.26 ¹⁾	45.32 ± 1.76 ¹⁾
3-MA + BDMC	5 mol·L ⁻¹ + 24 mg·L ⁻¹	48.38 ± 2.70 ^{1,2)}	63.47 ± 1.77 ^{1,3)}

注: 与空白组比较¹⁾ *P* < 0.01; 与 BDMC 组比较²⁾ *P* < 0.05, ³⁾ *P* < 0.01。

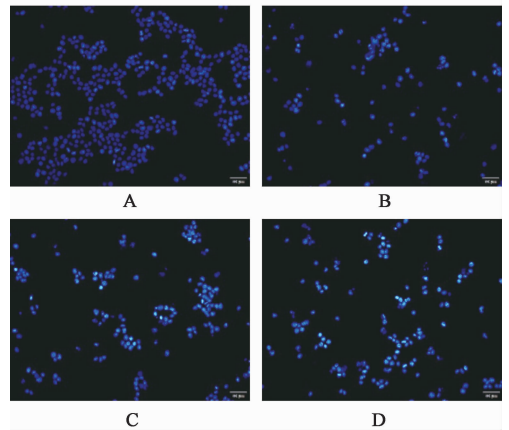


图 1 BDMC 及 3-MA 对 HepG2 细胞凋亡的形态学影响 (Hoechst 33342, ×200)

Fig. 1 Effect of BDMC or 3-MA on apoptotic morphology in HepG2 cells (Hoechst 33342, ×200)

3.3 自噬降低 BDMC 诱导 HepG2 细胞凋亡的凋亡率

与空白组比较, BDMC 组, 3-MA + BDMC 组的早期、晚期及总凋亡率均升高 (*P* < 0.01); 与 BDMC 组比较, 3-MA + BDMC 组的早期、总凋亡率显著升高 (*P* < 0.01), 见表 2。

表 2 BDMC 及 3-MA 对 HepG2 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 3)

Table 2 Effect of BDMC or 3-MA on apoptotic rate in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, *n* = 3) %

组别	浓度	早期凋亡	晚期凋亡	凋亡率
空白	-	1.65 ± 0.26	3.02 ± 0.14	4.65 ± 0.24
3-MA	5 mol·L ⁻¹	6.19 ± 0.66	5.86 ± 0.79	12.05 ± 1.45
BDMC	24 mg·L ⁻¹	34.54 ± 1.05 ¹⁾	11.21 ± 0.80 ¹⁾	45.75 ± 1.33 ¹⁾
3-MA + BDMC	5 mol·L ⁻¹ + 24 mg·L ⁻¹	52.48 ± 1.11 ^{1,2)}	12.69 ± 1.37 ¹⁾	65.17 ± 2.41 ^{1,2)}

注: 与空白组比较¹⁾ *P* < 0.01; 与 BDMC 组比较²⁾ *P* < 0.01 (表 3, 4 同)。

3.4 自噬抑制 BDMC 的降低 HepG2 细胞膜电位作用 与空白组比较, BDMC 组, 3-MA + BDMC 组的 Rh123 平均荧光强度降低 ($P < 0.01$), 与 BDMC 组比较, 3-MA + BDMC 组的平均荧光强度降低 ($P < 0.01$), 见表 3。

表 3 BDMC 及 3-MA 对 HepG2 细胞膜电位的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 3 Effect of BDMC or 3-MA on MMP in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度	荧光强度
空白	-	2 650.99 ± 228.22
3-MA	5 mol·L ⁻¹	2 113.11 ± 195.49
BDMC	24 mg·L ⁻¹	1 260.79 ± 137.54 ¹⁾
3-MA + BDMC	5 mol·L ⁻¹ + 24 mg·L ⁻¹	275.64 ± 30.32 ^{1,2)}

3.5 自噬下调可促进 BDMC 诱导 HepG2 细胞的凋亡相关蛋白的表达 与空白组比较, 3-MA 组, BDMC 组, 3-MA + BDMC 组的 Beclin-1, LC3-II 蛋白表达升高 ($P < 0.01$), LC3-I 蛋白表达减少 ($P < 0.01$), 与 BDMC 组比较, 3-MA + BDMC 组的 Beclin-1, LC3-II 蛋白表达下降 ($P < 0.01$)。与空

表 4 BDMC 及 3-MA 对 HepG2 细胞自噬和凋亡蛋白相对活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of BDMC or 3-MA on activity of autophagy or apoptosis protein in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度	Beclin-1 /GAPDH	LC3-I /GAPDH	LC3-II /GAPDH	pro-Caspase-3 /GAPDH	cleaved Caspase-3 /GAPDH	Bcl-2 /GAPDH	Bax /GAPDH
空白	-	1	1	1	1	1	1	1
3-MA	5 mol·L ⁻¹	1.37 ± 0.05 ¹⁾	0.49 ± 0.02 ¹⁾	1.40 ± 0.07 ¹⁾	1.01 ± 0.02	1.06 ± 0.07	0.85 ± 0.11	1.21 ± 0.09
BDMC	24 mg·L ⁻¹	1.20 ± 0.02 ¹⁾	0.37 ± 0.04 ¹⁾	2.89 ± 0.18 ¹⁾	0.79 ± 0.02 ¹⁾	1.96 ± 0.11 ¹⁾	0.63 ± 0.03 ¹⁾	2.17 ± 0.20 ¹⁾
3-MA + BDMC	5 mol·L ⁻¹ + 24 mg·L ⁻¹	0.61 ± 0.04 ^{1,2)}	0.35 ± 0.02 ¹⁾	1.76 ± 0.13 ^{1,2)}	0.12 ± 0.03 ^{1,2)}	3.73 ± 0.38 ^{1,2)}	0.27 ± 0.04 ^{1,2)}	2.46 ± 0.25 ¹⁾

4 讨论

中药的有效成分在肿瘤的预防和治疗中发挥着重要作用, 如长春碱、长春新碱、紫杉醇、喜树碱等均可从相应植物提取得到。现代药理研究证明, 姜黄发挥抗肿瘤作用主要依赖于所含的姜黄素类化合物, 以姜黄素为代表的本类化合物对胰腺癌、结直肠癌、胃癌、肝癌等的研究部分已进入各期临床试验阶段^[15-16]。姜黄素的天然衍生物 BDMC 对不同种类的肿瘤细胞也可表现出良好的化学治疗活性, 且稳定性较姜黄素好^[17], 前期课题组对 BDMC 诱导人白血病 K562 细胞凋亡的机制进行了报道^[10], 在此本课题组继续探讨其对肝癌 HepG2 细胞的诱导凋亡作用, 并进一步研究其是否可诱导自噬及自噬对凋亡的作用。

白组比较, BDMC 组, 3-MA + BDMC 组 pro-Caspase-3, Bcl-2 蛋白表达降低 ($P < 0.01$), 而 cleaved Caspase-3, Bax 蛋白表达升高 ($P < 0.01$), 与 BDMC 组比较, 3-MA + BDMC 组的 pro-Caspase-3, Bcl-2 蛋白表达降低 ($P < 0.01$), cleaved Caspase-3 蛋白表达升高 ($P < 0.01$), 见图 2, 表 4。

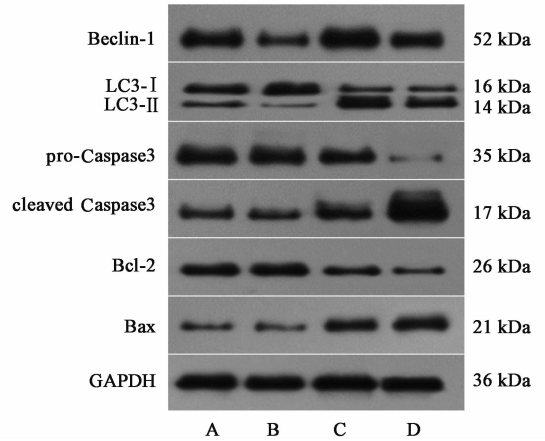


图 2 BDMC 作用 HepG2 细胞自噬和凋亡蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of BDMC or 3-MA on activity of autophagy or apoptosis protein in HepG2 cells

细胞发生凋亡时涉及一系列细胞形态、功能的改变。研究的结果显示, BDMC 能抑制 HepG2 细胞生长, 倒置荧光显微镜下可观察到细胞核浓缩、碎裂、凋亡小体等凋亡现象, 凋亡率较空白组增加, 并促使 Caspase-3 的活化, 降低 pro-Caspase-3, 升高 cleaved Caspase-3, 说明 BDMC 可诱导 HepG2 细胞凋亡。BDMC 使 HepG2 细胞线粒体膜上 Bcl-2 表达减少而 Bax 表达增加, 并使线粒体膜电位降低, 表明线粒体途径是 BDMC 诱导 HepG2 细胞凋亡的机制之一。这与 BDMC 抗胃癌^[18]的机制相似, 提示膜电位蛋白 Bcl-2 是 BDMC 抗肿瘤的作用靶点。

细胞发生凋亡时可伴有自噬发生^[9]。文献报道, BDMC 诱导的自噬在非小细胞肺癌中起到了促进凋亡的作用^[19], 而姜黄素衍生物 EF25-(GSH)₂

在抗肝癌 HepG2 细胞作用中自噬发挥了抑制凋亡的作用^[20]。探讨自噬对凋亡的调节作用常用自噬抑制剂 3-MA 或氯喹等抑制自噬后研究,抑制自噬后凋亡作用增强则表明自噬抑制凋亡,反之则自噬促进凋亡。Beclin-1 是自噬相关蛋白 6 (Atg6) 的同系物,是哺乳动物参与自噬的标志性蛋白^[21]。LC3 为酵母 Atg8 的同源蛋白,可被 Atg4 蛋白切割变为 LC3- I,细胞发生自噬时,LC3- I 与磷脂酰乙醇胺结合形成 LC3- II 增多^[22]。为探讨肝癌 BDMC 对于肝癌 HepG2 细胞能否诱导自噬及自噬对凋亡产生何种影响,本研究采用自噬抑制剂 3-MA 预处理 1 h 后验证自噬标志性蛋白 Beclin-1 及由 LC3- I 到 LC3- II 表达变化。Western blot 结果表明,BDMC 可使 HepG2 细胞 Beclin-1,LC3- II 表达升高,LC3- I 表达减少,说明 BDMC 可诱导 HepG2 细胞自噬;给予 3-MA 后,3-MA 可阻断 BDMC 所诱导的 HepG2 细胞自噬,阻断自噬后,BDMC 对 HepG2 细胞增殖的抑制活性、细胞凋亡率增大,cleaved Caspase-3 表达增加,说明 3-MA 增强了 BDMC 的诱导 HepG2 细胞凋亡作用,而自噬抑制了 BDMC 诱导的 HepG2 细胞凋亡,并对抗了 BDMC 的下调线粒体膜电位作用。本研究认为自噬对 BDMC 诱导的 HepG2 细胞凋亡具有抑制作用,可为姜黄素类化合物抗肝癌作用及机制研究提供参考。

[参考文献]

[1] CHEN W, ZHENG R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA-Cancer J Clin, 2016, 66(2):115-132.

[2] Torre L A, Bray F, Siegel R L, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA-Cancer J Clin, 2015, 65(2):87-108.

[3] 姚连昌,杨仁杰.原发性肝癌化疗用药的现状与展望 [J]. 临床肝胆病杂志, 2005, 21(1):62-64.

[4] 张康乐,司文涛,邵宏敏.中医药治疗在肿瘤化疗不良反应中的应用 [J]. 中国中医急症, 2015, 24(7):1212-1214.

[5] LAI C S, CHEN Y Y, Lee P S, et al. Bisdemethoxycurcumin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes and suppresses obesity in high-fat diet-fed C57BL/6 mice [J]. J Agric Food Chem, 2016, 64(4):821-830.

[6] 雍小菊,丁伟,张永强,等. 双去甲氧基姜黄素对朱砂叶螨的生物活性及作用方式 [J]. 应用生态学报, 2011, 22(6):1592-1598.

[7] LI Y B, GAO J L, ZHONG Z F, et al. Bisdemethoxycurcumin suppresses MCF-7 cells proliferation by inducing ROS accumulation and

modulating senescence-related pathways [J]. Pharmacol Rep, 2013, 65(3):700-709.

[8] 姚滢,黄燕芬. 二脱甲氧基姜黄素对体外 HepG2 Caspase-3 活性的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(3):493-495.

[9] Yonekawa T, Thorburn A. Autophagy and cell death [J]. Essays Biochem, 2013, 55(1):105-117.

[10] 苗久旺,张钦德,王洪波,等. 双去甲氧基姜黄素通过降低线粒体膜电位诱导人白血病 K562 细胞凋亡 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(24):109-113.

[11] LV G, SUN D, ZHANG J, et al. Lx2-32c, a novel semi-synthetic taxane, exerts antitumor activity against prostate cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Acta Pharm Sin B, 2017, 7(1):52-58.

[12] LIU Y, BI T, SHEN G, et al. Lupeol induces apoptosis and inhibits invasion in gallbladder carcinoma GBC-SD cells by suppression of EGFR/MMP-9 signaling pathway [J]. Cytotechnology, 2016, 68(1):123-133.

[13] LIU X, ZHU X, CHEN M, et al. Resveratrol protects PC12 cells against OGD/R-induced apoptosis via the mitochondrial-mediated signaling pathway [J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2016, 48(4):342-353.

[14] 张亚宏,甘莹,郭子华,等. 紫草素通过 ROS/p38 信号通路诱导人宫颈癌 HeLa 细胞凋亡 [J]. 中国药理学通报, 2011, 27(6):864-867.

[15] 杨苏钰,唐德才,曹子丰,等. 黄芪甲苷配伍姜黄素对人卵巢癌 HO-8910 原位移植瘤转移的抑瘤作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(6):155-160.

[16] ZANG S, LIU T, SHI J, et al. Curcumin: a promising agent targeting cancer stem cells [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2014, 14(6):787-792.

[17] 韩刚,崔静静,毕瑞,等. 姜黄素、去甲氧基姜黄素和双去甲氧基姜黄素稳定性研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, (22):2611-2614.

[18] LUO C, DU Z, WEI X, et al. Bisdemethoxycurcumin attenuates gastric adenocarcinoma growth by inducing mitochondrial dysfunction [J]. Oncol Lett, 2015, 9(1):270-274.

[19] XU J H, YANG H P, ZHOU X D, et al. Autophagy accompanied with bisdemethoxycurcumin-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells [J]. Biomed Environ Sci, 2015, 28(2):105-115.

[20] ZHOU T, YE L, BAI Y, et al. Autophagy and apoptosis in hepatocellular carcinoma induced by EF25-(GSH) 2: a novel curcumin analog [J]. PLoS One, 2014, 9(9):e107876.

[21] 晋龙,眭玉霞,孙阳,等. 自噬相关基因 Beclin1 和 LC3 在卵巢浆液性癌中的表达及临床意义 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2017, 33(11):1219-1224.

[22] 李媛媛,马泰,仲飞,等. 奥沙利铂诱导的人肝癌细胞株 HepG2 自噬潮增加及其对细胞生存率的影响 [J]. 肿瘤, 2013, 33(2):132-137.

[责任编辑 张丰丰]