

促凋亡蛋白 Bax 和自噬相关蛋白 LC3-Ⅱ 参与穿心莲内酯对结肠癌细胞的抑制作用

李 静,何 亮,杨俐萍,赵文静,钱红燕,刘焕良,邵晶晶,王勇军

(南通大学附属肿瘤医院肿瘤研究所中心实验室,江苏 南通 226361)

摘 要: [目的] 观察穿心莲内酯(Andrographolide, Andro)对不同分化结肠癌细胞克隆形成、迁移及凋亡的影响,检测凋亡蛋白 Bax 和自噬蛋白 LC3-Ⅱ 表达改变,探讨其分子机制。 [方法] 不同浓度 Andro 分别作用人结肠癌细胞株 Caco-2(高分化)和 Lovo(低分化)24h 后,MTT 法检测药物细胞毒性;划痕愈合、transwell 观察细胞迁移能力;检测细胞克隆形成能力;流式细胞术检测细胞凋亡;Western blot 检测 Bax、LC3-Ⅱ 及 cleaved-caspase-3 的蛋白表达水平。 [结果] (1) Andro 以时间和浓度依赖的方式抑制结肠癌细胞生长,Lovo 细胞对 Andro 的敏感性高于 Caco-2 细胞。(2) Andro 明显抑制 Caco-2 和 Lovo 细胞的迁移及克隆形成能力,Lovo 细胞的效应更为显著。(3) Andro 增加 Bax 和 LC3-Ⅱ 表达,且在 Lovo 细胞中表现更明显。(4) 凋亡酶 caspase-3 的激活参与了 Andro 诱导 Caco-2 和 Lovo 细胞的凋亡。 [结论] 低分化结肠癌细胞 Lovo 对 Andro 的敏感性明显高于高分化 Caco-2 细胞,Andro 通过增加 Bax 的表达,激活 caspase-3 介导凋亡信号通路,同时通过增强 LC3-Ⅱ 表达,促进自噬过程,最终抑制结肠癌细胞生长。

关键词: 穿心莲内酯;结肠肿瘤;克隆形成;细胞迁移;凋亡;自噬

中图分类号:R735.3 文献标识码:A 文章编号:1671-170X(2017)12-01085-08

doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2017.12.B008

Pro-apoptotic Protein Bax and Autophagy-related Protein LC3-Ⅱ Contribute to Inhibition of Andrographolide to Colon Cancer Cells

LI Jing, HE Liang, YANG Li-ping, et al.

(Key Laboratory of Cancer Research Center Nantong, Affiliated Tumor Hospital of Nantong University, Nantong 226361, China)

Abstract: [Objective] To observe the effects of Andrographolide (Andro) on cellular clone formation, migration and apoptosis of different differentiated colon cancer cells, and to detect the expression of pro-apoptotic protein Bax and autophagy-related protein LC3-Ⅱ. [Methods] Human colon cancer cell lines Caco-2 (well-differentiated) and Lovo (poorly differentiated) were treated with different concentrations of Andro for 24 h. MTT assay was used to detect Andro cytotoxicity. Wound healing and transwell assays were used to observe cell migration. Clone formation assay was used to detect cellular cloning ability. Flow cytometry was used for analysis of apoptosis. The expression of Bax, LC3-Ⅱ and cleaved-caspase-3 protein was detected by Western blot. [Results] (1) Andro inhibited the growth of colon cancer cells in a time- and concentration-dependent manner. Lovo cells were more sensitive to Andro treatment than Caco-2 cells. (2) Andro significantly inhibited the cell abilities for migration and clone formation of Caco-2 and Lovo cells, especially to Lovo cells. (3) Andro induced the expression of Bax and LC3-Ⅱ, which were more in poorly differentiated Lovo than Caco-2 cells. (4) Andro induced Caco-2 and Lovo cells apoptosis by activating caspase-3. [Conclusion] The sensitivity of poorly differentiated colon cancer cell line Lovo to Andro is significantly higher than that of well-differentiated colon cancer cell line Caco-2. Andro inhibits colon cancer development through increasing Bax expression that activates caspase-3 apoptotic signaling pathway, meanwhile through increasing LC3-Ⅱ expression that induces autophagy process.

Subject words: Andrographolide; colon cancer; clone formation; cell migration; apoptosis; autophagy

结肠癌是世界范围内常见的恶性肿瘤之一,其

死亡率位居恶性肿瘤的第3位^[1]。目前,结肠癌的治疗多采取以手术为主、放疗和化疗为辅的综合治疗手段。随着化疗药物的广泛使用,结肠癌患者的生存率有了大幅提升,但同时也出现肿瘤耐药和药物毒副作用大等问题。因此,研发更加安全有效的药物和治疗方法显得尤为迫切。近年来,运用中草药作为结肠癌的辅助治疗手段已成为研究的热点^[2]。

基金项目: 江苏省创新创业人才基金(苏人才 20013-41);南通市市级科技计划项目(MS12015116)

李静、何亮并列第一作者

通讯作者: 杨俐萍,常务副所长,中心实验室主任,教授,博士;南通大学附属肿瘤医院肿瘤研究所南通大学附属肿瘤医院肿瘤研究所中心实验室,江苏省南通市通州区平潮镇通扬北路30号(226361);E-mail:liping.yang@ntu.edu.cn

收稿日期: 2017-05-12; **修回日期:** 2017-09-07

穿心莲内酯 (Andrographolide, Andro) 为爵床科植物穿心莲中提取得到的二萜内酯类化合物, 分子式为 $C_{20}H_{30}O_5$, 是中药穿心莲的主要活性成分之一, 具有广泛的药理活性, 除主要的抗炎抗菌、抗病毒和保肝利胆等作用外, 还具有抗肿瘤的作用^[2]。近年来的研究表明, Andro 对多种类型的肿瘤细胞, 如乳腺癌^[3,4]、前列腺癌^[5-7]、肺癌^[8-10]、肝癌^[11-14]、宫颈癌^[15]、口腔癌^[16]、胶质瘤^[17]、鼻咽癌^[18]、白血病^[19,20]、结肠癌^[11,21-25]等均有抑制作用。Andro 可抑制 Lovo 细胞的迁移和侵袭能力^[22,23]。Andro 还能恢复结肠癌细胞对顺铂发挥细胞毒作用的敏感性^[24], 且能通过增加促凋亡蛋白 Bax 的表达水平逆转结肠癌细胞对 5-氟尿嘧啶的耐药性^[25]。我们前期的报道表明, 不同分化结肠癌细胞株对 Andro 的敏感性有所差别^[26]。然而, 关于 Andro 对不同分化结肠癌细胞抑制作用及其具体的分子机制尚未完全阐明。

本研究通过选取不同分化结肠癌细胞 Caco-2 (高分化) 和 Lovo (低分化), 更深入地研究促凋亡蛋白 Bax 和自噬相关蛋白 LC3-II 的表达变化对 Andro 抑制不同分化结肠癌细胞的影响, 分析参与 Bax 诱导结肠癌细胞凋亡的通路, 以期加深对 Andro 抗肿瘤机制的认识, 同时也为 Andro 应用于结肠癌的个体化用药和精准治疗提供更多的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

细胞系: 人结肠癌细胞株 Caco-2 (高分化) 和 Lovo (低分化) 均购自美国 ATCC。

药品与试剂: 穿心莲内酯购自南京植朗公司 (纯度 >98%), 用二甲基亚砜 (DMSO) 溶解, 配制成 100 mg/ml 的溶液, -20℃ 保存备用; Bax、Lc3b、GAPDH 抗体均购自江苏碧云天生物技术研究所, cleaved-caspase 3 购自谷歌生物有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及鉴定

复苏 Caco-2 和 Lovo 细胞, 分别用含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基重悬细胞, 置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱进行常规培养, 2~3d 传代一次, 取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 MTT 法

实验设阴性对照组、DMSO 溶剂对照组、不同穿

心莲内酯浓度组 (3.75、7.5、15、30、60 和 120 μg/ml)。每个浓度设 6 个复孔, 取对数生长期细胞制成单细胞悬液, 调整细胞密度为 5×10^4 个/ml, 以 100 μl/孔接种于 96 孔培养板, 待细胞贴壁后加药处理 24h, 加入 20 μl MTT (5 mg/L) 37℃ 培养 4h, 弃培养基, 每孔加入 150 μl DMSO, 摇床轻柔震荡 10 min。采用酶标仪 (A_{490nm}/A_{630nm}) 检测吸光度, 细胞生长抑制率 (IR) = $[1 - (A_{490nm} \text{ Sample} - A_{490nm} \text{ blank}) / (A_{490nm} \text{ control} - A_{490nm} \text{ blank})] \times 100\%$ 。通过等比浓度药物作用癌细胞后产生的 IR 值, 计算可得 IC₂₀、IC₃₀ 和 IC₅₀ 值。每组实验重复 3 次。

1.2.3 细胞形态观察

取对数生长期细胞, 调整细胞密度为 1×10^5 个/ml, 吹打混匀为单细胞悬液后接种于六孔板中, 待细胞贴壁后, 分别用不同浓度 Andro 作用 Caco-2 和 Lovo 细胞 24h 后, 在倒置显微镜下 (×200) 观察药物作用前后细胞形态的变化。

1.2.4 划痕愈合实验

取对数生长期细胞接种于 35 mm 培养皿中, 培养至细胞铺满皿底。采用无菌 200 μl 的枪头在培养皿中划出等宽的直线划痕, 并采用无菌 PBS 清洗 3 次, 加入不同浓度 (IC₂₀, IC₃₀, IC₅₀) Andro (实验组) 及 DMSO (对照组), 分别作用 24h 后, 更换无血清培养基, 48h 后在倒置相差显微镜下观察划痕愈合后距离, 并采集图片, 每组实验重复 3 次。

1.2.5 Transwell 实验

取孔径为 8 μm 的小室置于 24 孔板中, 下室加入 650 μl 的含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 收集饥饿过夜的 Caco-2 和 Lovo 细胞混合入无血清 DMEM 培养基, 计数至 1×10^6 个/ml, 取 200 μl 细胞悬液置于上室, 每孔分别加入不同浓度 (IC₂₀, IC₃₀, IC₅₀) Andro (实验组) 及 DMSO (对照组), 每组共设 3 个复孔, 孵箱培育细胞 24h 后取出小室, 弃上室液, 4% 多聚甲醛固定细胞 20 min, 0.1% 结晶紫染色 30 min, 用 PBS 清洗小室, 未穿过室膜的细胞用棉签拭去, 光学显微镜 (×100) 下观察穿过小室的细胞情况并拍照, 计算穿过小室膜的细胞数。

1.2.6 细胞克隆形成实验

取生长状态良好、处对数生长期的 Caco-2 及 Lovo 细胞, 常规胰酶消化后, 用标准血细胞计数板计数细胞, 确保 6 孔板中每个孔内接种细胞数量 150~200 个。待培养细胞贴壁后, 每孔加入不同浓度 (IC₂₀, IC₃₀, IC₅₀) Andro (实验组) 及 DMSO (对照组),

每组共设 3 个复孔。每天观察细胞生长情况,克隆培养时间 20d。到达预期孵育时相点终止培养,用负压泵吸去培养基,PBS 清洗细胞 2 次后,用 100%甲醇 4℃固定细胞 15min;室温晾干,以吉姆萨染液室温染色 15min。染色结束后,清水清洗 3~5 次,室温晾干、拍照。

1.2.7 AnnexinV-FITC/PI 标记染色测定凋亡细胞

不同浓度 Andro 分别作用 Caco-2 和 Lovo 细胞 24h 后,调整细胞密度为 1×10^6 个/ml,收集全部细胞,PBS 洗涤 2 次,弃上清,混入 100 μ l 预冷的结合缓冲液重悬细胞,加入 5 μ l AnnexinV-FITC 和 10 μ l PI(浓度为 20g/L),混匀后避光室温孵育 15min,在反应管中加入 400 μ l 结合缓冲液,置流式细胞仪进行检测。

1.2.8 Western blot 检测 Bax、Lc-3b 及 cleaved-caspase-3 蛋白的表达

取对数生长期细胞以 3×10^7 个/ml 的密度接种于六孔板,细胞贴壁后,各组分别加入不同浓度 Andro,孵育 24h 后吸除培养液,PBS 洗涤,每孔加入 100 μ l 裂解液(含 1% PMSF),提取总蛋白,BCA 法蛋白定量。总蛋白经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳(Bax 蛋白)和 12% SDS-PAGE 凝胶电泳(LC3b 及 cleaved-caspase-3 蛋白)进行电泳,湿转至 PVDF 膜,5%脱脂牛奶室温封闭 2h,一抗 4℃孵育过夜,TBST 洗膜,加 HRP 酶标记的二抗室温孵育 1h,洗膜,E-CL 显色。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 21.0 软件进行数据处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

Lovo 细胞,待细胞处于对数生长期,收集细胞,经 HE 染色后,显微镜下观察细胞形态和结构。发现 Caco-2 细胞核浆比例大约 1:2,细胞大小不一,核形不规则且较深染,而 Lovo 细胞核浆比例显著缩小,约小于 1:1,细胞核明显深染且分叶(Figure 1),提示 Lovo 细胞较 Caco-2 细胞更恶性,分化程度更低。

2.2 Andro IC₂₀、IC₃₀、IC₅₀ 值检测

Andro 作用 Caco-2 和 Lovo 细胞 24h 的 IC₂₀、IC₃₀、IC₅₀ 值详见 Table 1。Andro 对 Caco-2 细胞的 IC₂₀、IC₃₀ 及 IC₅₀ 浓度比 Lovo 细胞的相应浓度高约 3.4 倍、2.9 倍以及 2.3 倍,提示低分化的结肠癌细胞 Lovo 对 Andro 的敏感性明显高于高分化的结肠癌细胞 Caco-2。

选取 IC₂₀ 以及 IC₃₀ 浓度的 Andro 分别作用 Caco-2 和 Lovo 细胞 24h,倒置显微镜下观察发现,与 DMSO 溶剂对照组相比,实验组 Caco-2 和 Lovo 细胞数量明显减少,细胞间开始失去连接,部分细胞破碎

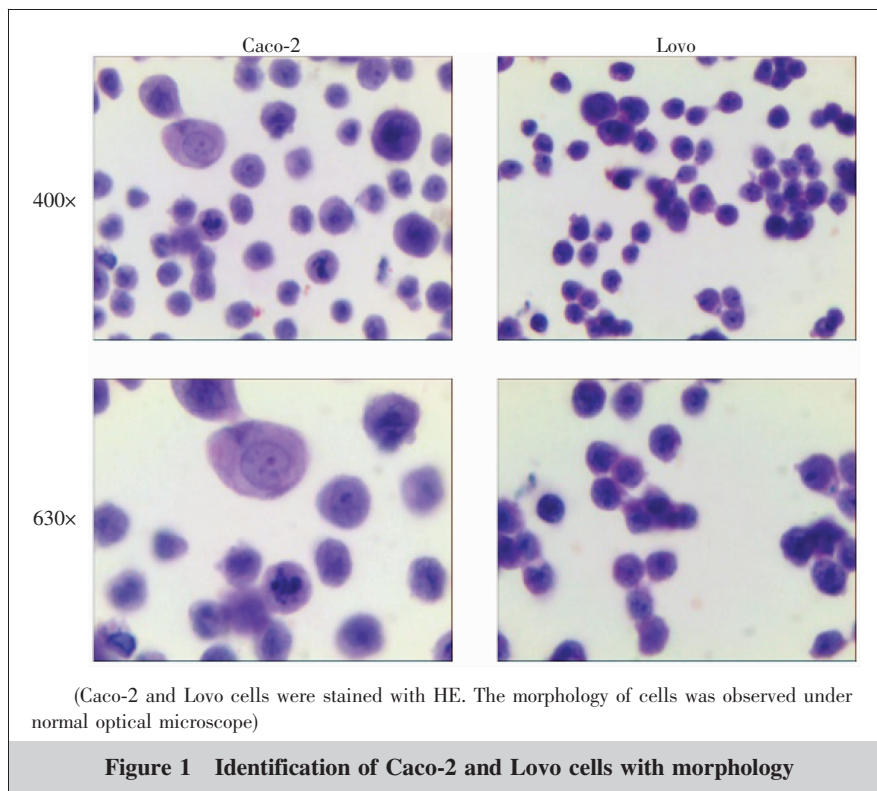


Table 1 IC₂₀, IC₃₀ and IC₅₀ values of Caco-2 and Lovo cells treated with Andro for 24h

Andro concentration	Caco-2 (Well-differentiation)	Lovo (Poor-differentiation)
IC ₂₀	7.158±0.912	2.102±0.141
IC ₃₀	11.234±1.967	3.849±0.231
IC ₅₀	22.970±2.993	9.961±0.004

2 结 果

2.1 Caco-2 和 Lovo 细胞鉴定

常规培养复苏的 Caco-2 和

失去正常梭形形态,细胞变圆、体积缩小(Figure 2)。

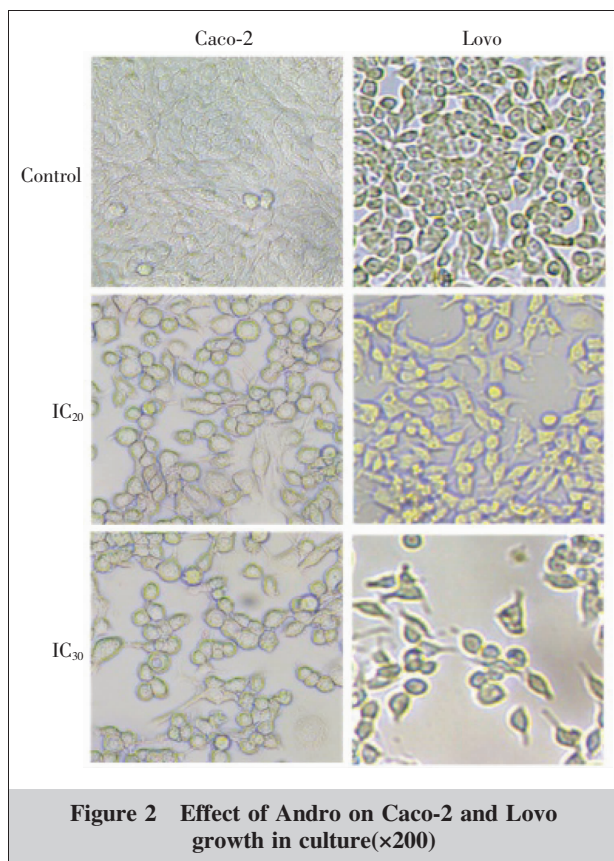


Figure 2 Effect of Andro on Caco-2 and Lovo growth in culture($\times 200$)

2.3 Andro 对 Caco-2 和 Lovo 细胞迁移及克隆形成能力的影响

细胞划痕愈合实验结果显示,不同浓度 Andro 作用 24h 后,换无血清培养体系继续培养 48h 后,对照组细胞划痕距离明显缩小、变窄。而不同浓度 Andro 处理的实验组的细胞迁移能力明显降低,与对照组(不含 Andro)相比,Caco-2 细胞: $IC_{20}:t=37.9885, P<0.001, IC_{30}:t=52.9761, P<0.001$; Lovo 细胞: $IC_{20}:t=19.4457, P<0.001, IC_{30}:t=49.9974, P<0.001$ (Figure 3 A、C)。

Transwell 实验结果显示,不同浓度 Andro 作用 24h 后,随着 Andro 浓度的增加,Andro 对于 Caco-2 及 Lovo 细胞迁移能力抑制作用增强 (Figure 3 B、D),与对照组(不含 Andro)相比差异有统计学意义(Caco-2 细胞: $IC_{20}:t=29.6901, P<0.001, IC_{30}:t=50.5212, P<0.001$; Lovo 细胞: $IC_{20}:t=31.938, P<0.001, IC_{30}:t=65.7339, P<0.001$)。

细胞克隆形成实验表明,不同浓度的 Andro 对于 Caco-2 和 Lovo 细胞的克隆形成均有抑制作用,

且对 Lovo 细胞克隆形成的抑制作用更明显。培养 20d 后, Lovo 细胞对照组(不含 Andro)形成克隆集落较大,平均 190 个克隆/孔, Caco-2 细胞对照组(不含 Andro)形成克隆较小,平均 165 个克隆/孔 (Figure 3 E、G)。而 Andro 处理 20d 后, IC_{20} 组、 IC_{30} 组、 IC_{50} 组的 Lovo 及 Caco-2 细胞均死亡,未能形成细胞克隆,由于 IC_{20} 组、 IC_{30} 组、 IC_{50} 组最终结果一样,仅以 IC_{20} 组结果为代表 (Figure 3 F、H)。

2.4 Andro 处理后 Caco-2 和 Lovo 细胞的 Bax 及 LC3-II 蛋白表达情况

Western blot 结果显示, Caco-2 和 Lovo 细胞的促凋亡蛋白 Bax 的表达量随 Andro 浓度增加而增加 (Figure 4A)。此外,自噬相关蛋白 LC3-II 的表达水平也随 Andro 浓度的增加而升高, Lovo 细胞的反应显著 (Figure 4B)。

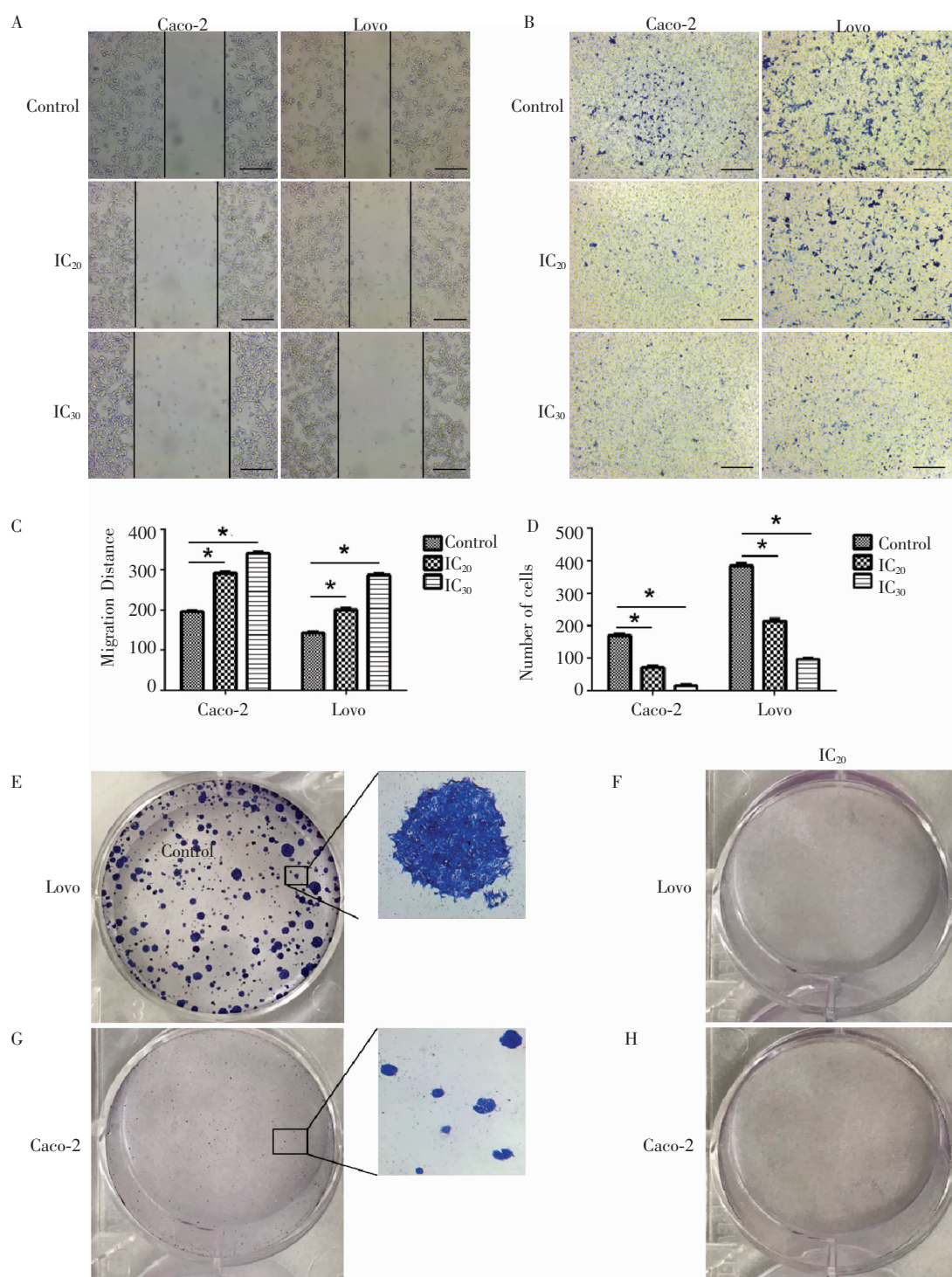
2.5 Andro 通过激活 caspase-3 通路诱导 Caco-2 和 Lovo 细胞凋亡

不同浓度的 Andro 分别作用 Caco-2 和 Lovo 细胞 24h 后,流式细胞术检测细胞凋亡情况。如 Figure 5A 所示,在低浓度 (IC_{20}) Andro 作用时,细胞就发生明显的凋亡,当浓度达到 IC_{50} 时, Andro 诱导约 55% (Caco-2) 和 65.8% (Lovo) 的细胞发生凋亡。值得一提的是,高浓度 (IC_{50}) 与低浓度 (IC_{20}) Andro 引起的效应比较, Lovo 细胞发生早期凋亡 (Annexin V+PI⁻) 率增加约 41%,中晚期凋亡 (Annexin V+PI⁺) 率增加约 4 倍。随着 Andro 浓度的增加,细胞凋亡率出现明显增加,分化程度更低的 Lovo 细胞比高分化的 Caco-2 细胞对药物反应更为明显。

进一步检测了细胞中凋亡酶 caspase-3 的表达。随着 Andro 浓度的增加, Caco-2 及 Lovo 细胞中 caspase-3 蛋白激活逐渐增强 (Figure 5B),提示 Andro 诱导 Caco-2 及 Lovo 细胞发生凋亡可能是通过激活 caspase-3 相关信号通路实现的。

3 讨论

Andro 是从我国传统中草药穿心莲中提取出来的二萜类化合物,它通常作为消炎解毒药物用于治疗各种感染性疾病^[27],近年来研究发现, Andro 除了传统的抗病毒作用外,也具有抗肿瘤的潜能^[28]。越来越多的研究发现 Andro 对多种类型的肿瘤细胞具有



(A: After scratching on the plate containing the cells, added different concentrations of Andro (IC₂₀ and IC₃₀) for 24 h, followed by the culture with serum-free medium, observed the width of the scratches after 48h(×100); B: In the transwell, added different concentrations of Andro (IC₂₀ and IC₃₀) for 24 h, the cells were stained with 0.1% crystal violet(×100); C, D: Statistic graphs for wound healing and transwell experimental data by SPSS21 software. The mean values of IC₂₀ and IC₃₀ were compared with those of control group (without Andro), *** $P < 0.001$; E, G: At day 20, in the control group (without Andro) the clones of Lovo (E) or Caco-2 (G) were stained with Giemsa; Images in the square show one or a few clones (×100); F, H: At day 20 after Andro (IC₂₀) treated Lovo (F) or Caco-2 (H), the clones were stained with Giemsa.)

Figure 3 Effects of Andro on migration and cloning formation of Caco-2 and Lovo cells

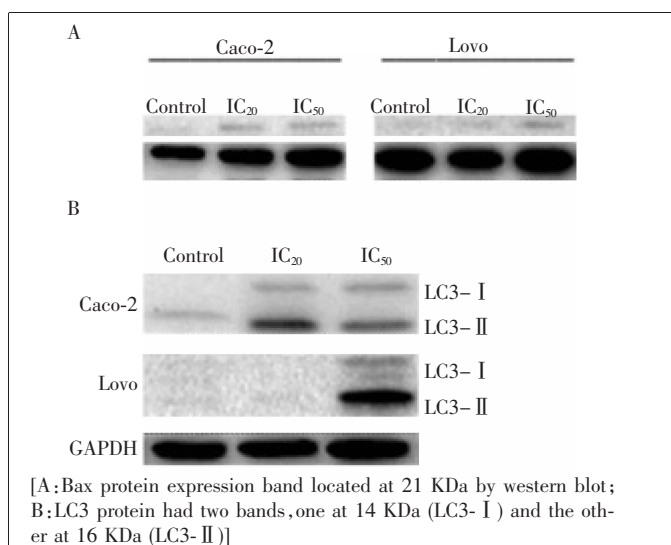


Figure 4 Bax and LC3-II expression by Andro treated to Caco-2 and Lovo cells

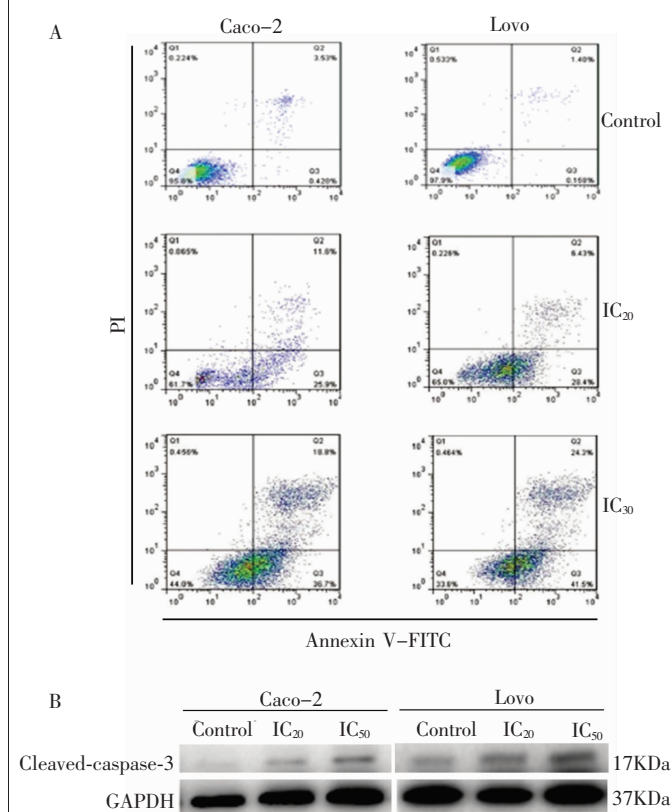


Figure 5 Apoptosis of Caco-2 and Lovo cells induced by Andro

抗肿瘤作用。据报道, Andro 能抑制人结肠癌细胞 Lovo 的细胞周期, 并可通过下调 MMP-7 表达从而抑制 Lovo 细胞的迁移和侵袭^[22]。我们之前的研究表明, Andro 以时间和浓度依赖方式抑制 Caco-2 和 Lovo 细胞的生长增殖; 进一步通过计算 IC₂₀、IC₃₀ 及 IC₅₀ 值, 发现低分化的结肠癌细胞 Lovo 对 Andro 的敏感性要高于高分化的结肠癌细胞 Caco-2。本研究的细胞功能实验表明, Andro 可明显抑制结肠癌细胞的迁移及克隆形成能力, 并且对低分化 Lovo 细胞的抑制效应更强。那么, Andro 通过什么途径抑制结肠癌细胞的生长, 侵袭和迁移的能力? 本研究中流式细胞仪检测发现, Andro 处理后的结肠癌细胞出现明显的细胞凋亡, 并随药物浓度的增加而凋亡细胞数量增多, 且分化程度更低的 Lovo 细胞比高分化的 Caco-2 细胞对药物反应更为明显。研究表明, Bcl-2 家族成员 Bax (促凋亡蛋白) 为 Andro 诱导的细胞死亡信号传递过程中关键的调节物^[29]。本研究显示, Caco-2 和 Lovo 细胞出现 Bax 蛋白表达量随加入 Andro 浓度增加而增强, 并且伴随激活凋亡酶 Caspase-3 增加, 说明 Andro 可通过调节上调 Bax 的表达而激活 Caspase-3, 从而诱导细胞凋亡及抑制肿瘤细胞的生长。

越来越多的研究表明自噬与凋亡存在着内在的联系^[30]。自噬是一种细胞降解自身细胞器的方式, 同时也是细胞程序性死亡的一种形式, 对肿瘤细胞有抑癌和促癌双重作用。但是自噬在肿瘤治疗中的作用非常复杂, 在不同的药物与肿瘤中的作用机制都可能不同^[31]。由于自噬的两面性, 因此了解 Andro 是否通过自噬影响肿瘤的生长、迁移很有意义。已有研究表明, Andro 能明显增强人结肠癌细胞 HCT116、宫颈癌细胞 HeLa、乳腺癌细胞 MCF-7 等自噬标志分子 GFP-LC3 和 LC3-II 的表达水平, Andro 抑制自噬体的成熟是通过阻碍自噬溶酶体的融合而不是影响溶酶体的功能^[32]。我们的研究结果显示, 随着 Andro 浓度的增加, 结肠癌细胞中自噬相关蛋白 LC3-II 的表达水平逐渐升高, 并且 Lovo 细胞的反应显著。结果提示, 自噬也构成了 Andro 抑制结肠癌细胞的重要途径。

综上所述,低分化的结肠癌细胞 Lovo 对 Andro 的敏感性要明显高于高分化的结肠癌细胞 Caco-2。Andro 通过调节促凋亡蛋白 Bax 表达,激活 caspase-3 介导的凋亡信号通路,促进细胞的凋亡,并且还通过调节自噬相关蛋白 LC3-II 表达,促进细胞的自噬,最终抑制结肠癌细胞的生长作用。

参考文献:

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65 (2): 87-108.
- [2] Banerjee A, Ahmed H, Yang P, et al. Endoplasmic reticulum stress and IRE-1 signaling cause apoptosis in colon cancer cells in response to andrographolide treatment [J]. Oncotarget, 2016, 7(27): 41432-41444.
- [3] Banerjee M, Chattopadhyay S, Choudhuri T, et al. Cytotoxicity and cell cycle arrest induced by andrographolide lead to programmed cell death of MDA-MB-231 breast cancer cell line [J]. J Biomed Sci, 2016, 23: 40.
- [4] Liu HY, He QL, Zhou DL, et al. Effects of andrographolide on proliferation and cell cycle of human breast cancer cell line MCF-7 [J]. Guangdong Medical, 2016, 37 (23): 3511-3514. [刘红英, 何青莲, 周大磊, 等. 穿心莲内酯对人乳腺癌细胞 MCF-7 细胞增殖及细胞周期的影响 [J]. 广东医学, 2016, 37(23): 3511-3514.]
- [5] Mir H, Kapur N, Singh R, et al. Andrographolide inhibits prostate cancer by targeting cell cycle regulators, CXCR3 and CXCR7 chemokine receptors [J]. Cell Cycle, 2016, 15 (6): 819-826.
- [6] Guo MW, Hou LB, Xie JX. Apoptosis of andrographolide on prostate cancer PC-3 cells and its mechanism [J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2015, 31(6): 18-20. [郭明伟, 侯凌波, 谢建兴. 穿心莲内酯对前列腺癌 PC-3 细胞的凋亡作用及机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2015, 31(6): 18-20.]
- [7] Zhou DL, Zhang QQ, Liu HY, et al. Inhibition of andrographolide on the proliferation and neuroendocrine differentiation of prostate cancer cells [J]. Journal of Guangdong Pharmaceutical University, 2016, 32(1): 107-110. [周大磊, 章倩倩, 刘红英, 等. 穿心莲内酯对前列腺癌细胞的增殖及神经内分泌分化的抑制作用 [J]. 广东药学院学报, 2016, 32(1): 107-110.]
- [8] Mi S, Xiang G, Yuwen D, et al. Inhibition of autophagy by andrographolide resensitizes cisplatin-resistant non-small cell lung carcinoma cells via activation of the Akt/mTOR pathway [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2016, 310: 78-86.
- [9] Yuan H, Sun B, Gao F, et al. Synergistic anticancer effects of andrographolide and paclitaxel against A549 NSCLC cells [J]. Pharm Biol, 2016, 54(11): 2629-2635.
- [10] Luo XY, Zheng XS, Luo WM. Effect of andrographolide on human lung cancer cells proliferation and invasion-associated molecular expression [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2012, 12(17): 3249-3252. [罗湘玉, 郑雪松, 罗卫民. 穿心莲内酯对人肺癌细胞增殖以及侵袭相关分子表达的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(17): 3249-3252.]
- [11] Zhou J, Lu G, Ong C, et al. Andrographolide sensitizes cancer cells to TRAIL-induced apoptosis via p53-mediated death receptor 4 up-regulation [J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(7): 2170-2180.
- [12] Yang L, Wu D, Luo K, et al. Andrographolide enhances 5-fluorouracil-induced apoptosis via caspase-8-dependent mitochondrial pathway involving p53 participation in hepatocellular carcinoma (SMMC-7721) cells [J]. Cancer Lett, 2009, 276(2): 180-188.
- [13] Lu B, Sheng Y, Zhang J, et al. The altered microRNA profile in andrographolide-induced inhibition of hepatoma tumor growth [J]. Gene, 2016, 588(2): 124-133.
- [14] Peng P, Zhao YC, Zheng JX, et al. Effects of andrographolide on proliferation and apoptosis and expression of MDR1 and GST- π in HepG2 cells [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2014, 37 (4): 649-652. [彭鹏, 赵逸超, 郑建兴, 等. 穿心莲内酯对 HepG2 细胞增殖、凋亡和 MDR1、GST- π 表达的影响 [J]. 中药材, 2014, 37(4): 649-652.]
- [15] Alzaharna M, Alqouqa I, Cheung H. Taxifolin synergizes andrographolide-induced cell death by attenuation of autophagy and augmentation of caspase dependent and independent cell death in HeLa cells [J]. PLoS One, 2017, 12(2): e0171325.
- [16] Yang P, Hsieh P, Wang T, et al. Andrographolide impedes cancer stemness and enhances radio-sensitivity in oral carcinomas via miR-218 activation [J]. Oncotarget, 2017, 8 (3): 4196-4207.
- [17] Zhang QQ, Ding Y, Qi CL, et al. Inhibitory effect of andrographolide on cell proliferation of glioblastoma U87 cells and its mechanism [J]. Journal of Jilin University (Medicine Edition), 2013, 39(4): 676-679. [章倩倩, 丁一, 亓翠玲, 等. 穿心莲内酯对胶质瘤 U87 细胞增殖的抑制作用及其机制 [J]. 吉林大学学报 (医学版), 2013, 39 (4): 676-679.]
- [18] Wang BQ, Cheng AL. Andrographolide on human na-

- sopharyngeal carcinoma cell proliferation and Na⁺-K⁺-ATPase activity [J]. Contemporary Medicine, 2012, 18(26): 27-28. [王柏琦, 程爱兰. 穿心莲内酯对人鼻咽癌细胞增殖以及 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性的影响 [J]. 当代医学, 2012, 18(26): 27-28.]
- [19] Lu JF, Tang YH, Wang YL, et al. Inhibitory effect of andrographolide on proliferation of different malignant hematopoietic tumor cell lines in vitro [J]. Central South Pharmacy, 2017, 15(3): 305-307. [陆静峰, 唐宇宏, 王育丽, 等. 穿心莲内酯对不同恶性血液肿瘤细胞株增殖抑制的影响 [J]. 中南药学, 2017, 15(3): 305-307.]
- [20] Tang YH, Wang YL, Lu JF, et al. Effects of andrographolide on proliferation and apoptosis of NB4 cells in vitro [J]. Journal of Shanghai Jiaotong University, 2015, 35(1): 47-50. [唐宇宏, 王育丽, 陆静峰, 等. 穿心莲内酯体外对 NB4 细胞凋亡及增殖的影响 [J]. 上海交通大学学报医学版, 2015, 35(1): 47-50.]
- [21] Jia H, Zhang Y, Wang R. Effect of andrographolide in inhibition of human colon cancer SW1116 cell [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010, 10(10): 1848-1850. [贾华, 张琰, 王茹. 穿心莲内酯抑制人结肠癌 SW1116 细胞增殖及诱导细胞凋亡作用的研究 [J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(10): 1848-1850.]
- [22] Shi M, Lin H, Chiang T, et al. Andrographolide could inhibit human colorectal carcinoma Lovo cells migration and invasion via down-regulation of MMP-7 expression [J]. Chem Biol Interact, 2009, 180(3): 344-352.
- [23] Chao H, Kuo C, Chiu J, et al. Andrographolide exhibits anti-invasive activity against colon cancer cells via inhibition of MMP2 activity [J]. Planta Med, 2010, 76(16): 1827-1833.
- [24] Lin H, Shi M, Tseng H, et al. Andrographolide sensitizes the cytotoxicity of human colorectal carcinoma cells toward cisplatin via enhancing apoptosis pathways in vitro and in vivo [J]. Toxicol Sci, 2014, 139(1): 108-120.
- [25] Wang W, Guo W, Li L, et al. Andrographolide reversed 5-FU resistance in human colorectal cancer by elevating BAX expression [J]. Biochem Pharmacol, 2016, 121: 8-17.
- [26] He L, Kang YH, Huang HJ, et al. Effect of andrographolide on colon cancer cell lines in various degrees of differentiation [J]. Journal of Zunyi Medical University, 2014, 37(2): 188-191. [何亮, 康亚辉, 黄厚今, 等. 穿心莲内酯对不同分化结肠癌细胞株体外增殖的影响 [J]. 遵义医学院学报, 2014, 37(2): 188-191.]
- [27] Lee KC, Chang HH, Chung YH, et al. Andrographolide acts as an anti-inflammatory agent in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages by inhibiting STAT3-mediated suppression of the NF-kappaB pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 135(3): 678-684.
- [28] Pratheeshkumar P, Kuttan G. Andrographolide inhibits human umbilical vein endothelial cell invasion and migration by regulating MMP-2 and MMP-9 during angiogenesis [J]. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 2011, 30(1): 33-41.
- [29] Zhou J, Zhang S, Ong C, et al. Critical role of pro-apoptotic Bcl-2 family members in andrographolide-induced apoptosis in human cancer cells [J]. Biochem Pharmacol, 2006, 72(2): 132-144.
- [30] Wei F, Wang SM. Apoptosis and autophagy molecular mechanisms in tumor research [J]. Journal of Practical Medicine, 2012, 28(5): 850-852. [魏芳, 汪森明. 凋亡与自噬分子机制在肿瘤方面的研究进展 [J]. 实用医学杂志, 2012, 28(5): 850-852.]
- [31] Kimmelman AC. The dynamic nature of autophagy in cancer [J]. Genes Dev, 2011, 25(19): 1999-2010.
- [32] Zhou J, Hu S, Tan S, et al. Andrographolide sensitizes cisplatin-induced apoptosis via suppression of autophagosome-lysosome fusion in human cancer cells [J]. Autophagy, 2012, 8(3): 338-349.