

引用本文: 杨双, 俞思全. 紫草素促进食管癌细胞凋亡及细胞周期阻滞的作用机制研究[J]. 安徽医药, 2023, 27(1): 79-82. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2023.01.017.



◇ 药学研究 ◇

紫草素促进食管癌细胞凋亡及细胞周期阻滞的作用机制研究

杨双, 俞思全

作者单位: 苍溪县人民医院肿瘤内科, 四川 广元 628400

通信作者: 俞思全, 男, 副主任医师, 研究方向为肿瘤内科、化学药物治疗, Email: 642726193@qq.com

摘要: **目的** 研究紫草素促进食管癌细胞凋亡及细胞周期阻滞的作用及机制。**方法** 2019年1月至2020年6月期间开展细胞实验, 培养食管癌Eca109细胞, 分为不含药物杜氏改良 Eagle 培养基(DMEM)处理的对照组, 含不同剂量紫草素 DMEM 处理的紫草素组, 含 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素和 10 $\mu\text{g/L}$ 胰岛素样生长因子-1(IGF-1) DMEM 处理的 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素+10 $\mu\text{g/L}$ IGF-1 组。检测细胞凋亡率、细胞周期及凋亡基因活化的胱天蛋白酶-3(cleaved caspase-3)、细胞周期蛋白 D1(cyclin D1)、磷酸化磷酸肌醇 3 激酶(PI3K)、蛋白激酶 B(AKT)的表达量。**结果** 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组、2.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组的细胞凋亡率、细胞周期 G1 期比例、cleaved caspase-3 的表达量[0.5 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组(0.64 $\pm$ 0.14)、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组(0.81 $\pm$ 0.19)、2.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组(1.02 $\pm$ 0.24)]高于对照组 0.41 $\pm$ 0.07, 细胞周期 S 期、G2 期比例及 cyclin D1[0.5 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组(0.80 $\pm$ 0.16)、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组(0.68 $\pm$ 0.13)、2.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组(0.45 $\pm$ 0.09)], p-PI3K、p-AKT 表达量低于对照组[cyclin D1 表达量(0.91 $\pm$ 0.18)]($P<0.05$); 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素+10 $\mu\text{g/L}$ IGF-1 组的细胞凋亡率、细胞周期 G1 期比例、cleaved caspase-3 的表达量低于 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组, 细胞周期 G2 期比例及 cyclin D1、p-PI3K、p-AKT 表达量高于 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组($P<0.05$)。**结论** 紫草素具有促进食管癌细胞凋亡及细胞周期阻滞的作用, 该作用与抑制 PI3K/AKT 通路激活有关。

关键词: 食管肿瘤; 紫草素; 凋亡; 细胞周期; PI3K/AKT 通路

Effect and mechanism of shikonin on apoptosis and cell cycle arrest of esophageal cancer cells

YANG Shuang, YU Siquan

Author Affiliation: Oncology Department, Cangxi People's Hospital, Guangyuan, Sichuan 628400, China

Abstract: **Objective** To study the effect and mechanism of shikonin on apoptosis and cell cycle arrest of esophageal cancer cells. **Methods** Cell experiments were carried out from January 2019 to June 2020. Esophageal cancer ECA 109 cells were cultured and assigned into groups: control group treated with Duchenne modified Eagle medium (DMEM) without drug, shikonin groups treated with DMEM containing different doses of shikonin, which included 2.0 $\mu\text{mol/L}$ shikonin+10 $\mu\text{g/L}$ insulin-like growth factor-1 (IGF-1) group treated with DMEM containing 2.0 $\mu\text{mol/L}$ shikonin and 10 $\mu\text{g/L}$ IGF-1. Apoptosis rate, cell cycle and the expressions of apoptotic gene-activated caspase-3 (cleaved caspase-3), cyclin D1, phosphorylated phosphoinositol 3 kinase (PI3K) and protein kinase B (AKT) were detected. **Results** The apoptotic rate, the proportion of G1 phase and the expression of cleaved caspase-3 [0.5 $\mu\text{mol/L}$ shikonin group (0.64 $\pm$ 0.14), 1.0 $\mu\text{mol/L}$ shikonin group (0.81 $\pm$ 0.19), 2.0 $\mu\text{mol/L}$ shikonin group (1.02 $\pm$ 0.24)] in 0.5 $\mu\text{mol/L}$, 1.0 $\mu\text{mol/L}$ and 2.0 $\mu\text{mol/L}$ shikonin groups were higher than those in the control group 0.41 $\pm$ 0.07, while the proportions of S phase and G2 phase and the expressions of cyclin D1 [0.5 $\mu\text{mol/L}$ shikonin group (0.80 $\pm$ 0.16), 1.0 $\mu\text{mol/L}$ shikonin group (0.68 $\pm$ 0.13), 2.0 $\mu\text{mol/L}$ shikonin group (0.45 $\pm$ 0.09)], p-PI3K and p-AKT were lower than those in the control group [cyclin D1 expression: (0.91 $\pm$ 0.18)] ($P<0.05$). The apoptotic rate, the proportion of G1 phase and the expression of cleaved caspase-3 in 2.0 $\mu\text{mol/L}$ shikonin+10 $\mu\text{g/L}$ IGF-1 group were lower than those in 2.0 $\mu\text{mol/L}$ shikonin group, while the proportion of G2 phase and the expressions of cyclin D1, p-PI3K and p-AKT were higher than those in 2.0 $\mu\text{mol/L}$ shikonin group ($P<0.05$). **Conclusion** Shikonin can promote the apoptosis and cell cycle arrest of esophageal cancer cells, which is related to the inhibition of PI3K/Akt pathway activation.

Key words: Esophageal neoplasms; Shikonin; Apoptosis; Cell cycle; PI3K/Akt pathway

食管癌是临床常见的消化道恶性肿瘤, 早期临床特征不典型、诊断难度大, 多数病人确诊时已经发展至中晚期、部分病人错过了手术切除的时机, 通过放化疗虽然能够杀伤癌细胞、缩小瘤体体积、延长生存时间, 但病人的总体预后仍较差、5 年生存

率不理想^[1-2]。近年来, 中药的抗癌作用受到越来越多关注, 多种中药材的活性成分被证实能够抑制癌细胞的恶性生物学行为。紫草素是中药紫草中的活性成分, 已有研究表明紫草素对胃癌、结直肠癌、肝癌等恶性肿瘤细胞的增殖、凋亡、细胞周期具有

调控作用^[3-5]。食管癌的发生发展与癌细胞增殖、凋亡、细胞周期的失控密切相关,但紫草素是否调控食管癌细胞的上述恶性生物学行为尚未明确。基于此,本研究将以食管癌Eca109细胞为对象,在2019年1月至2020年6月开展细胞实验,具体分析紫草素促进细胞凋亡及细胞周期阻滞的作用及机制,旨在为今后研究食管癌新的治疗药物提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料 食管癌Eca109细胞购自ATCC公司,紫草素、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)购自Sigma公司,Annexin V凋亡检测试剂盒[异硫氰酸荧光素(FITC)/碘化丙啶(PI)双染法]购自上海生工公司,细胞周期检测试剂盒购自南京建成研究所,RIPA裂解液购自上海碧云天公司,活化胱天蛋白酶(cleaved caspase-3)、细胞周期蛋白D1(cyclin D1)、磷酸化磷酸肌醇3激酶(p-PI3K)、磷酸化蛋白激酶B(p-AKT)抗体购自Abcam公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及分组给药 Eca109细胞在含有10%胎牛血清的杜氏改良Eagle培养基(DMEM)中贴壁培养,0.25%胰蛋白酶消化后在培养板中传代培养,待细胞密度长至80%~90%后进行分组给药。对照组用不含药物的DMEM处理,紫草素组用含有0.5 $\mu\text{mol/L}$ 、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 、2.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素的DMEM处理,2.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素+10 $\mu\text{g/L}$ IGF-1组用含有2.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素和10 $\mu\text{g/L}$ IGF-1的DMEM处理,每个处理调节设置5个复孔,连续处理24 h。

1.2.2 细胞凋亡率检测 取“1.2.1”中分组处理后的细胞,调节细胞密度至 $2 \times 10^5/\text{mL}$,按照Annexin V凋亡检测试剂盒(FITC/PI双染法)进行操作,分别孵育Annexin V-FITC和PI,在流式细胞仪上检测细胞凋亡率。

1.2.3 细胞周期检测 取“1.2.1”中分组处理后的细胞,调节细胞密度至 $5 \times 10^5/\text{mL}$,用-20 $^{\circ}\text{C}$ 无水乙醇固定过夜,次日按照细胞周期检测试剂盒进行操作,孵育PI后在流式细胞仪上检测细胞周期。

1.2.4 蛋白表达量检测 取“1.2.1”中分组处理后的细胞,加入RIPA裂解液、提取细胞中的蛋白,将

蛋白样本与上样缓冲液混合,加入SDS-PAGE后电泳,电转移至PVDF膜。在室温用5%脱脂牛奶封闭PVDF膜1 h,在4 $^{\circ}\text{C}$ 用1:1 000稀释的cleaved caspase-3、cyclin D1、p-PI3K、p-AKT抗体或1:5 000稀释的 β -actin抗体孵育PVDF膜过夜;洗膜3遍后,在室温用1:1 000稀释的HRP二抗孵育PVDF膜1 h,最后在凝胶成像系统中得到蛋白条带,扫描条带灰度值并以 β -actin为内参计算cleaved caspase-3、cyclin D1、p-PI3K、p-AKT的表达量。

1.3 统计学方法 采用SPSS 22.0软件录入数据并进行统计分析,五组间计量资料的比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 紫草素对Eca109细胞凋亡率的影响 与对照组比较,0.5 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组、2.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组Eca109细胞的凋亡率明显增加($P < 0.05$)且随着紫草素剂量增加,细胞的凋亡率也相应增加;与2.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组比较,2.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素+10 $\mu\text{g/L}$ IGF-1组Eca109细胞的凋亡率明显减少($P < 0.05$)。见图1。

2.2 紫草素对Eca109细胞中凋亡基因表达的影响 对照组、0.5 $\mu\text{mol/L}$ 、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 、2.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组及2.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素+10 $\mu\text{g/L}$ IGF-1组Eca109细胞中cleaved caspase-3的表达水平分别为 0.41 ± 0.07 、 0.64 ± 0.14 、 0.81 ± 0.19 、 1.02 ± 0.24 、 0.34 ± 0.08 。经统计学分析,与对照组比较,0.5 $\mu\text{mol/L}$ 、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 、2.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组Eca109细胞中cleaved caspase-3的表达明显增加($F = 11.31$, $P < 0.001$)且随着紫草素剂量增加,细胞中cleaved caspase-3的表达量相应增加;与2.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组比较,2.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素+10 $\mu\text{g/L}$ IGF-1组Eca109细胞中cleaved caspase-3的表达明显减少($t = 6.01$, $P < 0.001$)。见图2。

2.3 紫草素对Eca109细胞周期的影响 与对照组比较,0.5 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组、2.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组Eca109细胞G1期比例明显增加,S期比例明显减少($P < 0.05$)且随着紫草素剂量增加,细胞G1期比例相应增加,S期比例相应减少;与2.0

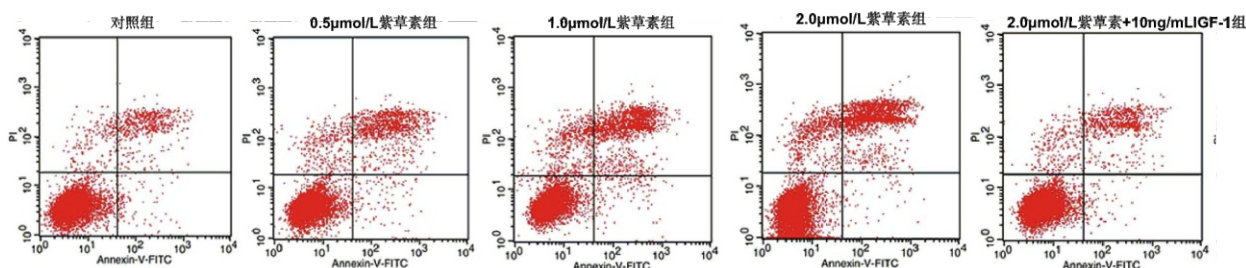
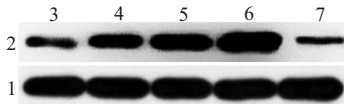


图1 五组食管癌Eca109细胞凋亡率的比较



注:1— β -肌动蛋白(β -actin);2—裂解型胱天蛋白酶(cleaved caspase-3);3—对照组;4—0.5 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组;5—1.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组;6—2.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组;7—2.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素+10 $\mu\text{g/L}$ IGF-1组。

图2 五组食管癌Eca109细胞中cleaved caspase-3的蛋白条带

$\mu\text{mol/L}$ 紫草素组比较,2.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素+10 $\mu\text{g/L}$ IGF-1组Eca109细胞G1期比例明显减少、G2期比例明显增加($P<0.05$),S期比例无明显变化($P>0.05$)。见表1。

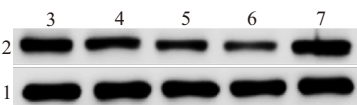
表1 五组食管癌Eca109细胞G1期、S期、G2期的比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	G1期	S期	G2期
对照组	5	24.85 $\pm$ 6.58	63.32 $\pm$ 10.93	11.83 $\pm$ 2.84
0.5 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组	5	33.22 $\pm$ 7.79 ^①	56.75 $\pm$ 8.28 ^①	10.02 $\pm$ 1.77
1.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组	5	45.41 $\pm$ 9.28 ^{①②}	45.47 $\pm$ 9.14 ^{①②}	9.12 $\pm$ 1.85 ^①
2.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组	5	59.39 $\pm$ 9.83 ^{①②③}	31.75 $\pm$ 7.75 ^{①②③}	8.86 $\pm$ 1.34 ^①
2.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素+10 $\mu\text{g/L}$ IGF-1组	5	30.72 $\pm$ 8.37 ^④	60.27 $\pm$ 12.38 ^④	9.01 $\pm$ 1.27
F值		13.29	8.64	2.13
P值		<0.001	0.001	0.128

注:IGF-1为胰岛素样生长因子-1。

①与对照组比较, $P<0.05$ 。②与0.5 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组比较, $P<0.05$ 。③与1.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组比较, $P<0.05$ 。④与2.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组比较, $P<0.05$ 。

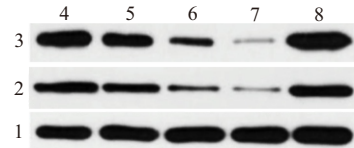
2.4 紫草素对Eca109细胞中细胞周期蛋白表达的影响 对照组、0.5 $\mu\text{mol/L}$ 、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 、2.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组及2.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素+10 $\mu\text{g/L}$ IGF-1组Eca109细胞中cyclin D1的表达水平分别为0.91 $\pm$ 0.18、0.80 $\pm$ 0.16、0.68 $\pm$ 0.13、0.45 $\pm$ 0.09、1.02 $\pm$ 0.20。经统计学分析,与对照组比较,0.5 $\mu\text{mol/L}$ 、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 、2.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组Eca109细胞中cyclin D1的表达量明显减少($F=9.37$, $P=0.001$)且随着紫草素剂量增加,细胞中cyclin D1的表达量相应减少;与2.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组比较,2.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素+10 $\mu\text{g/L}$ IGF-1组Eca109细胞中cyclin D1的表达量明显增加($t=5.81$, $P<0.001$)。见图3。



注:1—细胞周期蛋白D1(CyclinD1);2— β -肌动蛋白(β -actin);3—对照组;4—0.5 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组;5—1.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组;6—2.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组;7—2.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素+10 $\mu\text{g/L}$ IGF-1组。

图3 五组食管癌Eca109细胞中cyclin D1的蛋白条带

2.5 紫草素对Eca109细胞中PI3K/AKT通路的影响 与对照组比较,0.5 $\mu\text{mol/L}$ 、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 、2.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组Eca109细胞中p-PI3K、p-AKT的表达量明显减少($P<0.05$)且随着紫草素剂量增加,细胞中p-PI3K、p-AKT的表达量相应减少;与2.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组比较,2.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素+10 $\mu\text{g/L}$ IGF-1组Eca109细胞中p-PI3K、p-AKT的表达量明显增加($P<0.05$)。见图4,表2。



注:1— β -肌动蛋白(β -actin);2—磷酸化AKT(p-AKT);3—磷酸化PI3K(p-PI3K);4—对照组;5—0.5 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组;6—1.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组;7—2.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组;8—2.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素+10 $\mu\text{g/L}$ IGF-1组。

图4 五组食管癌Eca109细胞中p-PI3K、p-AKT的蛋白条带

表2 五组食管癌Eca109细胞中p-PI3K、p-AKT表达量的比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	p-PI3K	p-AKT
对照组	5	0.92 $\pm$ 0.19	0.87 $\pm$ 0.20
0.5 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组	5	0.81 $\pm$ 0.14 ^①	0.75 $\pm$ 0.14 ^①
1.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组	5	0.44 $\pm$ 0.08 ^{①②}	0.40 $\pm$ 0.08 ^{①②}
2.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组	5	0.20 $\pm$ 0.07 ^{①②③}	0.23 $\pm$ 0.05 ^{①②③}
2.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素+10 $\mu\text{g/L}$ IGF-1组	5	1.19 $\pm$ 0.25 ^④	1.05 $\pm$ 0.23 ^④
F值		25.67	23.52
P值		<0.001	<0.001

注:p-PI3K为磷酸化PI3K,p-AKT为磷酸化AKT。

①与对照组比较, $P<0.05$ 。②与0.5 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组比较, $P<0.05$ 。③与1.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组比较, $P<0.05$ 。④与2.0 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素组比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

紫草素的抗癌作用与其促进癌细胞凋亡及细胞周期阻滞有关,本实验将紫草素用于食管癌Eca109细胞的干预,旨在发挥其抗癌作用。细胞凋亡及细胞周期的异常与食管癌的发生密切相关,在使用不同剂量紫草素处理食管癌Eca109细胞后,细胞凋亡率及细胞周期G1期的比例明显增加,细胞周期S期和G2期的比例明显减少,说明紫草素能够促进食管癌Eca109细胞发生凋亡,同时使细胞周期大量停滞于G1期、不进入S期及G2期,这与紫草素在其他恶性肿瘤细胞中促进细胞凋亡及细胞周期阻滞的作用一致,也表明紫草素具有抗食管癌的作用。

Huang、Hu^[6]在子宫内膜癌及Guo等^[7]在肺癌中的研究证实,紫草素通过调节B淋巴细胞瘤-2基因(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)及Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2-associated X protein, Bax)的表达来促进细胞的线

粒体途径凋亡。Bcl-2和Bax是调节线粒体途径凋亡的关键基因,前者抑制线粒体内细胞色素C向细胞质的释放,后者则促进线粒体内细胞色素C向细胞质的释放;细胞色素C进入细胞质后,能够启动一系列级联放大反应并使有活性的cleaved caspase-3增多,最终增强细胞凋亡。在食管癌的发病过程中,bcl-2的表达增多、Bax的表达减少,癌细胞的线粒体途径凋亡受到抑制,进而造成了细胞增殖活力的增强^[8-9]。在本研究中,不同剂量紫草素处理食管癌Eca109细胞后,cleaved caspase-3的表达明显增加,与紫草素增加Eca109细胞凋亡率的作用吻合,进一步确认了紫草素用于食管癌细胞干预的促凋亡作用。

在肺癌及膀胱癌中的研究证实,紫草素能够抑制cyclin D1的表达,进而使细胞周期发生停滞^[10-12]。CyclinD1是调控细胞周期的关键蛋白,与相应的激酶CDK4、CDK6形成复合物后时细胞快速通过细胞周期检查点并大量进入有丝分裂期。在食管癌组织中,cyclin D1的表达明显增多、加速细胞周期的作用增强,有利于癌细胞的有丝分裂^[13-14]。在本研究中,不同剂量紫草素处理食管癌Eca109细胞后,cyclin D1的表达明显减少,与紫草素增加Eca109细胞G1期比例的作用吻合,进一步确认了紫草素用于食管癌细胞干预的细胞周期阻滞作用。

食管癌细胞的恶性生物学行为受到复杂机制的调控,其中PI3K/AKT通路在细胞凋亡及细胞周期的调控中起关键作用,该通路的激活对线粒体凋亡基因及细胞周期蛋白的表达均有调控作用^[15-16]。在胃癌、肺癌、白血病细胞中,紫草素均对PI3K/AKT通路的激活具有抑制作用^[3,17-18]。本研究在使用不同剂量紫草素处理食管癌Eca109细胞后,细胞中p-PI3K、p-AKT的表达明显减少,表明紫草素能够抑制食管癌细胞中PI3K/AKT通路的激活,这也可能是紫草素促进食管癌细胞凋亡及细胞周期阻滞的可能机制。为了验证这一机制,PI3K/AKT通路的激动剂IGF-1被用于细胞处理,紫草素与IGF-1联合使用后,紫草素促进细胞凋亡及细胞周期阻滞、调节凋亡基因及细胞周期蛋白表达的作用均发生了逆转,表明紫草素促进食管癌细胞凋亡及细胞周期阻滞的作用与抑制PI3K/AKT通路的激活有关。

综上所述,紫草素具有促进食管癌细胞凋亡及细胞周期阻滞的作用,该作用与抑制PI3K/AKT通路激活有关,今后紫草素有望成为治疗食管癌的辅助药物,但仍需更多的在体实验进行验证。

参考文献

[1] 陈茹,郑荣寿,张思维,等. 2015年中国食管癌发病和死亡情

况分析[J]. 中华预防医学杂志, 2019, 53(11): 1094-1097.

[2] 左婷婷,郑荣寿,曾红梅,等. 中国食管癌发病状况与趋势分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2016, 38(9): 703-708.

[3] JIA L, ZHU Z, LI H, et al. Shikonin inhibits proliferation, migration, invasion and promotes apoptosis in NCI-N87 cells via inhibition of PI3K/AKT signal pathway [J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2019, 47(1):2662-2669.

[4] ZHANG N, PENG F, WANG Y, et al. Shikonin induces colorectal carcinoma cells apoptosis and autophagy by targeting galectin-1/JNK signaling axis[J]. Int J Biol Sci, 2020, 16(1):147-161.

[5] 武向丽. 紫草素对荷肝癌裸小鼠移植瘤生长的抑制作用及机制[J]. 安徽医药, 2019, 23(5): 852-855.

[6] HUANG C, HU G. Shikonin suppresses proliferation and induces apoptosis in endometrioid endometrial cancer cells via modulating miR-106b/PTEN/AKT/mTOR signaling pathway [J]. Biosci Rep, 2018, 38(2): BSR20171546. DOI: 10.1042/BSR20171546.

[7] GUO ZL, LI JZ, MA YY, et al. Shikonin sensitizes A549 cells to TRAIL-induced apoptosis through the JNK, STAT3 and AKT pathways[J]. BMC Cell Biol, 2018, 19(1):29.

[8] 尹博,王兵,牛磊,等. VEGF和Bcl-2在食管癌患者血清中的表达水平及其临床意义[J]. 癌症进展, 2019, 17(2): 154-157.

[9] 马永臻. Bax、Bcl-2和Caspase-3在食管癌的表达及临床意义[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(14): 3484-3486.

[10] ZHANG S, GAO Q, LI W, et al. Shikonin inhibits cancer cell cycling by targeting Cdc25s[J]. BMC Cancer, 2019, 19(1):20.

[11] TANG JC, REN YG, ZHAO J, et al. Shikonin enhances sensitization of gefitinib against wild-type EGFR non-small cell lung cancer via inhibition PKM2/stat3/cyclinD1 signal pathway [J]. Life Sci, 2018, 1(204): 71-77.

[12] ZHAI T, HEI Z, MA Q, et al. Shikonin induces apoptosis and G0/G1 phase arrest of gallbladder cancer cells via the JNK signaling pathway[J]. Oncol Rep, 2017, 38(6):3473-3480.

[13] 季伟,汪晓莺. Runx3、p27、cyclinD1在食管癌细胞及组织中的表达与意义[J]. 中国卫生标准管理, 2018, 9(7): 119-121.

[14] 胡艳萍,吴林林,杨建杰. Cortactin及CyclinD1在食管鳞状细胞癌组织中的差异表达及临床病理相关性分析[J]. 中国实验诊断学, 2017, 21(11): 1915-1919.

[15] SHI N, YU H, CHEN T. Inhibition of esophageal cancer growth through the suppression of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. Onco Targets Ther, 2019, 17(12): 7637-7647.

[16] SHI JJ, XING H, WANG YX, et al. PI3K α inhibitors sensitize esophageal squamous cell carcinoma to radiation by abrogating survival signals in tumor cells and tumor microenvironment [J]. Cancer Lett, 2019, 459(1): 145-155.

[17] LI B, YUAN Z, JIANG J, et al. Anti-tumor activity of Shikonin against afatinib resistant non-small cell lung cancer via negative regulation of PI3K/Akt signaling pathway [J]. Biosci Rep, 2018, 38(6): BSR20181693 DOI: 10.1042/BSR20181693.

[18] CHEN Y, WANG TT, DU J, et al. The critical role of PTEN/PI3K/AKT signaling pathway in shikonin-induced apoptosis and proliferation inhibition of chronic myeloid leukemia [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 47(3):981-993.

(收稿日期:2020-09-10,修回日期:2020-11-01)