

养肺控瘤方通过 Beclin-1 促进自噬并抑制肺癌细胞 A549 转移 *

沈水杰^{1#}, 陈璇^{2#}, 顾小侠¹, 姜水菊³, 姚登福^{4△}

(1. 南通市中医院, 江苏 南通 226000; 2. 苏州科技城医院, 江苏 苏州 215153;

3. 南通市第三人民医院, 江苏 南通 226000; 4. 南通大学附属医院, 江苏 南通 226001)

摘要: **目的** 研究养肺控瘤方(yangfeikongliu formula, YKF)在肺癌 A549 细胞自噬和转移中的作用。**方法** 大鼠的 YKF 的给药剂量将通过对人体临床的剂量换算后得出, 给大鼠灌服人体等效剂量的 5 倍、10 倍和 15 倍的 YKF, 并收集它们的血液以制备 5×、10× 和 15× 的含药血清。使用含有 10% YKF 含药血清的培养基对 A549 细胞进行培养。通过电子显微镜、LC3 II/LC3 I 的比例和自噬流串联 mRFP-GFP-LC3 来评估 A549 细胞自噬情况。通过 Transwell 测定法评估细胞迁移和侵袭, 并使用 CCK-8 测定细胞活性。**结果** 3 种剂量 YKF 含药血清均抑制了肿瘤细胞活性, 增加了 A549 细胞的 LC3 II/LC3 I 比值和 p62 及 Beclin-1 表达水平, 表明 YKF 可促进 A549 细胞自噬死亡。支持本结果的指标为, 5× YKF 含药血清诱导的 LC3 点状点的增加在 3-MA 抑制自噬后被消除。此外, 研究观察到沉默 Beclin-1 可以废除 YKF 诱导的 LC3 II/I 比值和 p62 表达的增加, 以及细胞活性、迁移和侵袭的减少。**结论** 养肺控瘤方具有促进肺癌细胞 A549 自噬和抑制转移的抗肿瘤活性, 且 Beclin-1 是其抗肿瘤活性的关键分子。

关键词: 养肺控瘤方; 自噬; Beclin-1; 肺癌细胞 A549; LC3 II/I 比值

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2022)03-0053-08

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2022.03.010

Effect of Yangfeikongliu Formula in Promoting Autophagy and Inhibiting Metastasis of Lung Tumor Cell A549 via Beclin-1

SHEN Shuijie^{1#}, CHEN Xuan^{2#}, GU Xiaoxia¹, JIANG Shuiju³, YAO Dengfu⁴

(1. Nantong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nantong 226000, China;

2. Suzhou Science & Technology Town Hospital, Suzhou 215153, China;

3. The Third People's Hospital of Nantong, Nantong 226000, China;

4. Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China)

ABSTRACT: **Objective** Traditional Chinese medicine has been used for serval centuries and proved to be an alternative treatment method for cancer. This study aims to investigate the role of traditional Chinese medicine Yangfei-kongliu Formula (YKF) in autophagy and metastasis of lung tumor A549 cells. **Methods** The YKF dose for rats was converted according to the human clinical dose. Rats were given YKF by gavage of 5-, 10-, and 15-fold of the equivalent human dose, and their blood was collected to prepare 5×, 10×, and 15× YKF-contained serum. A549 cells were cultured with a medium containing 10% YKF-contained serum. Autophagy was evaluated by electron microscopy, LC3 II/LC3 I ratio, and autophagic flux tandem mRFP-GFP-LC3. Cell migration and invasion were evaluated by Transwell assay. Cell activity was determined using CCK-8. **Results** Three doses of YKF-contained serum inhibited cell activity and increased LC3/LC3 I ratio and p62 and Beclin-1 expression level in A549 cells indicating YKF promotes autophagic death. The result in support of this indication is that the increase of LC3 puncta induced by 5×YKF-contained serum was abolished after autophagy

收稿日期: 2022-01-18

* 基金项目: 江苏省中医药科技发展计划项目(YB201961)

第一作者简介: 沈水杰和陈璇为共同第一作者。

△通信作者: 姚登福, E-mail: yaodf@ahnmc.com

inhibition by 3-MA. Besides, the research observed that silencing Beclin-1 abolished YKF-induced the increase in LC3 II/I ratio and p62 expression, and the decrease in cell activity, migration, and invasion. **Conclusion** Traditional Chinese medicine YKF exerts antitumor activity in promoting autophagy and inhibiting metastasis of lung tumor cell A549 and Beclin-1 is the key molecule of its antitumor activity.

KEY WORDS: Yangfeikongliu Formula; autophagy; Beclin-1; lung tumor cell A549; LC3 II/I ratio

与 I 型细胞程序性死亡凋亡不同,自噬被认为是属于 II 型细胞程序性死亡的细胞死亡机制^[1]。在生理条件下,自噬通过清除受损的细胞器、蛋白质聚集体和细胞内病原体等途径,对应激条件下细胞内稳态的维持起关键作用。在癌症的病理状态下,诱导自噬激活细胞死亡(称为自噬样细胞死亡)可以有效促进肿瘤细胞的清除^[2-4]。有相关研究表明,在癌症治疗药物的开发中,药物对细胞自噬作用的影响是一个很有价值的研究方向^[5]。

中医药的使用已经延续了几个世纪,在预防和消除肿瘤细胞方面,中药已被证实能够发挥重要作用^[6]。临床治疗、动物及细胞试验的研究表明:中药具有抑制肿瘤发生、转移和血管生成的作用^[7-8]。养肺控瘤方(yangfeikongliu formula, YKF),以生黄芪、生晒参补益肺脾,益气固本,北沙参养阴润肺,薏苡仁、仙鹤草健脾补虚,白花蛇舌草清热解毒散瘤,全方起益气养阴,消瘤散结之效^[9]。已有研究表明:YKF 联合顺铂可抑制荷瘤小鼠癌细胞中 Lewis 肺肿瘤细胞的生长和转移^[10]。此外, YKF 能抑制肿瘤生长,与顺铂协同降低 Lewis 晚期肺癌小鼠模型血清 IL-2、TNF- α 的表达^[11]。但目前对于 YKF 影响肺癌细胞自噬作用的相关研究仍较少。

据报道,自噬相关蛋白,如 Beclin-1、LC3 和 p62 等,在癌组织中的表达减少与癌症预后不良有关,并可能影响恶性肿瘤的发展或进展^[12-14]。Beclin-1 是一种重要的自噬相关蛋白,是自噬体形成所需的 III 类磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K-III) 复合物的核心成分。Beclin-1 通过抑制 MCF7 细胞中荷瘤小鼠体外细胞生长和体内肿瘤发生的发挥其作用^[15]。LC3 也是通过磷脂酰乙醇胺 (PE) 结合形成自噬体所必需的成分之一。因此,通常通过跟踪荧光标记 LC3 或在 SDS-PAGE 凝胶上检测快速迁移的脂化 LC3 (LC3-II) 和 LC3-I 的强度比来观察自噬活性^[16]。p62(SQSTM1) 是一种通过与 LC3 进行相互作用而发挥功能的自噬关键分子, p62 的上调/下调与肿瘤形成、促进和抗癌治

疗有关^[17]。目前, YKF 诱导的 A549 细胞自噬相关蛋白的变化尚未清楚。

本研究通过检测 p62 和 Beclin-1 的表达、LC3 I-II/I 比值、电子显微镜下的自噬体和 LC3 斑点来评估 YKF 在 A549 细胞自噬中的作用。

1 材料和方法

1.1 YKF 和含 YKF 的血清制备 养肺控瘤方购自南通市中医院中药房。组成:生黄芪 45 g,生晒参 15 g,北沙参 30 g,白花蛇舌草 30 g,仙鹤草 30 g,薏苡仁 30 g。药物以等效人剂量的 5 倍、10 倍和 15 倍煎煮。剂量转换根据《中药药理学实验方法学(第 3 版)》提供的方法进行换算。

将雄性 SD 大鼠随机分为 4 组制备含药血清,分别为对照组、5 倍剂量组(5 $\times$)、10 倍剂量组(10 $\times$)和 15 倍剂量组(15 $\times$)。药物治疗组给予 YKF 3 g/mL、6 g/mL、9 g/mL(相当于 5 倍、10 倍和 15 倍剂量),对照组给予等量蒸馏水。每组每天以 3 mL/次进行 2 次灌胃(早晨和晚上)。在第 6 次灌胃后 2 h 收集血液以制备含 YKF 的血清。灭活和灭菌后,将血清储存在冰箱中供以后使用。动物试验严格遵守美国国立卫生研究院《实验动物护理和使用指南》(NIH Pub.No.85-23,1996 修订),并经南通市中医院伦理委员会批准。

1.2 细胞培养 肺癌 A549 细胞系从国家认证细胞培养物收藏中心(中国上海)获得。含有青霉素-链霉素的 Opti-MEM(Gibco)用于培养细胞。对于含有 YKF 的血清处理,将 A549 细胞接种在 6 孔板中并培养过夜。第 2 天,将细胞在不同剂量含有 10% YKF 血清的新鲜完全培养基中培养 48 h。使用自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-MA)处理细胞以干扰自噬体的形成。

1.3 电子显微镜检测自噬 药物处理 48 h 后,将细胞消化并重悬于 PBS 中。细胞用 PBS 洗涤 3 次。离心后,沿着管壁加入 2.5%戊二醛并在 4 $^{\circ}$ C 下固定过夜。第 2 天,用 PBS 固定细胞并漂洗 3 次,然后,用 1%四氧化锇在 4 $^{\circ}$ C 固定 30 min。将不同浓度的丙酮连续

加入到细胞中进行脱水(顺序为50%,70%,90%,100%)。将细胞与稀释的包埋剂在室温下混合30 min,并在室温下用纯包埋剂代替过夜。将细胞质量移至胶囊底部并加入包埋溶液的混合物。然后,将它们在60℃的烤箱中烘烤以凝固成一个硬块。将硬块切成约1 μm厚的半薄切片并用醋酸铅和柠檬酸铅染色。在电子显微镜下观察自噬体。当自噬体和溶酶体融合形成自噬体时,它们呈现单层结构。

1.4 mRFP-GFP-LC3 慢病毒载体制备和自噬流检测 在293 T细胞中制备pLVX-puro-mRFP-EGFP-LC3B慢病毒载体,将293 T细胞接种在培养皿中并培养至80%时传代。将5 μg pLVX-puro-mRFP-EGFP-LC3B,5 μg psPAX2和5 μg pMD2.G的质粒混合物溶解于600 μL opti-MEM中。并制备另一种20 μL lipo3 000和600 μL opti-MEM的混合物。将2种混合物溶液混合后在室温下放置20 min,加入细胞培养皿中。细胞培养48 h。收集上清液以获得慢病毒载体,并用0.45 μm过滤器过滤。通过超速离心浓缩慢病毒载体,并用0.22 μm过滤器过滤。然后,测量了病毒滴度。为了检测A549细胞中的自噬流,将对数生长阶段的细胞以每孔 5×10^4 个细胞接种到24孔板中。接着,将细胞置于细胞培养箱中过夜。第2天,每个孔以MOI=20的病毒量加入新鲜培养液。感染24 h后,去除含有病毒的培养基。共孵育48 h后,将细胞用多聚甲醛固定并密封。用共聚焦显微镜观察绿色斑点和红色斑点,并以800×拍照。

1.5 细胞转染 用无菌PBS洗涤对数生长阶段的A549细胞1次,并用胰蛋白酶消化。将细胞沉淀重悬于完全培养基中。计数后,将细胞以每孔 3×10^5 个/mL接种到6孔板中,并置于细胞培养箱中过夜。第2天,将Si-Beclin-1-1/2/3或siRNA阴性对照(NC)与Lipofectamine 3 000混合,并加入细胞培养液中。将细胞置于细胞培养箱中6 h,然后换成完整的培养基再培养48 h。最后,收集细胞用于进一步试验。

1.6 实时定量PCR(qRT-PCR) 为了确定Beclin-1 mRNA的表达水平,使用qRT-PCR分析不同方法处理的细胞。用RNAiso Plus(Trizol)加入细胞并充分裂解,并通过光谱仪测定RNA的纯度和浓度。使用PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time)(TAKARA)将等质量的RNA逆转录成cDNA。以

ABI ViiA7 荧光定量PCR仪中的Power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo)扩增系统为基础,利用cDNA产物进行实时定量扩增。实时定量PCR的引物为:

Beclin-1-hF 5'-CCATGCAGGTGAGCTTCGT-3';

Beclin1-hR 5'-GAATCTGCGAGAGACACCATC-3';

GAPDH-hF 5'-TGACAACCTTTGCTATCGTGGAGG-3';

GAPDH-hR 5'-AGGCAGGGATGATGTTCTGGAGAG-3'。

Beclin-1 mRNA的表达水平相对于GAPDH。

1.7 CCK-8 将每孔以104的细胞接种在96孔板中并置于培养箱中过夜。第2天,将细胞与含有10% YKF血清的完整培养基分别培养24 h、48 h、72 h。孵育时间后,将96孔板的每个孔中加入10 μL CCK-8溶液并再温育2 h。在450 nm处测量每个孔的吸光度。

1.8 蛋白质印迹 处理过的细胞用PBS洗涤,然后在结冰条件下使用RIPA裂解物(Beyotime, Shanghai, China)裂解30 min。离心后收集的上清液是总蛋白质。基于BSA方法定量每个蛋白质样品。等质量的蛋白质在SDS-PAGE和电泳分离上加载缓冲中加载。将蛋白质从凝胶上转移到PVDF膜上。用5%脱脂牛奶封闭非特异性蛋白质,并用第一抗体印迹特异性蛋白质。印迹在用Millipore ECL系统孵育第二抗体和化学发光后可视化。第一抗体是anti-Beclin-1, anti-p62, anti-LC3, 和GAPDH(Proteintech)。第二抗体是HRP标记的山羊抗小鼠IgG (H+L)(Beyotime)。

1.9 Transwell 细胞迁移和侵袭实验 用胰蛋白酶消化A549对数生长期细胞,并用PBS洗涤。将细胞重悬于无血清培养基上,细胞密度调整至 4×10^5 个/mL。将直径为8 μm的Transwell小室置于含有培养基的24孔板中。将200 μL细胞悬浮液加入到上层小室中并培养48 h。取出小室并用PBS洗涤,并用4%多聚甲醛(PFA)固定20 min。细胞用结晶紫染色溶液染成紫色。将带有细胞的小室置于载玻片上并在显微镜下观察。Transwell分析细胞侵袭能力的方法与上述方法相同除了需要除了在Transwell小室中添加基

质胶以及在 Transwell 上室添加 10^5 个细胞外。

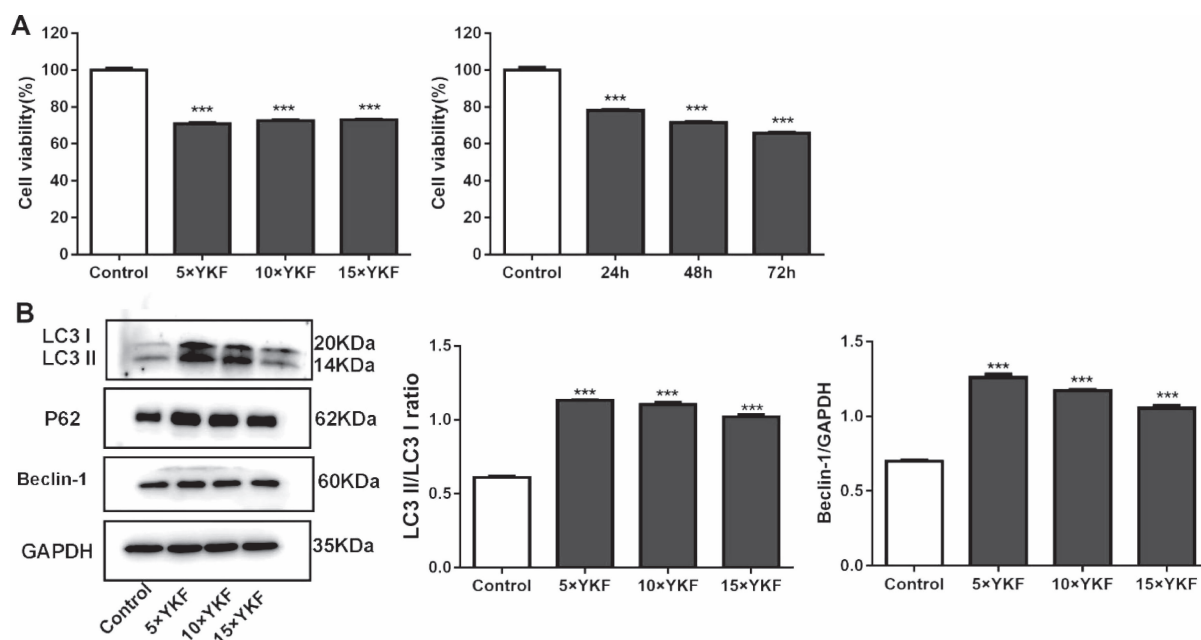
1.10 数据处理 试验数据采用 SPSS 21.0 进行分析,并用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 t 检验统计, $P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 YKF 含药血清促进 A549 细胞的自噬作用 分别用含 $5\times$ 、 $10\times$ 、 $15\times$ YKF 的血清对 A549 细胞处理 48 h,并评估 YKF 对细胞活力的影响。见图 1A 左。结果显示:含 YKF 的血清剂量越高,细胞活力越低,但 3 组间细胞活力差异无统计学意义($P>0.05$),表明较

高剂量的 YKF 并不具有更好的抑制细胞活性的能力。选择含有 $5\times$ YKF 的血清对 A549 细胞处理 24 h、48 h、72 h,并进行 CCK-8 活力测定。见图 1A 右。结果显示:细胞活力随着处理时间的增加而降低。

使用蛋白质 LC3 II/LC3 I 比值来观察自噬体的形成和自噬情况。为了评估 YKF 对 A549 细胞自噬的影响,用含 YKF 的血清处理 A549 细胞 48 h 后,检测细胞中 LC3 II/I 比值、p62 和 Beclin-1 的表达。见图 1B。结果显示,LC3 II/I 比值升高,p62 和 Beclin-1 表达水平增加, ($P<0.001$)。结果表明:YKF 可能诱导 A549 细胞的自噬性死亡。



注:与对照相比,*** $P<0.001$ 。

图 1 养肺控瘤方(YKF)促进 A549 细胞自噬

2.2 通过 3-MA 抑制自噬逆转 YKF 对 A549 细胞的促进自噬作用 选择含 $5\times$ YKF 的血清处理 48 h 的 A549 细胞。并在放大 13 000 倍的电子显微镜下观察其自噬情况。见图 2A。为了进一步确定 YKF 的自噬促进作用,我们比较了含 $5\times$ YKF 血清处理的 A549 细胞用 3-MA 抑制自噬剂或不用 3-MA 抑制自噬剂后的 LC3 斑点。结果显示,与阴性对照组相比,含 $5\times$ YKF 血清可诱导 LC3 斑点增加,而这种增加在 3-MA 处理后消失,表明 YKF 对 A549 细胞发挥促进自噬的作用。见图 2B。

2.3 沉默 Beclin-1 逆转了 YKF 对 A549 细胞的促进自噬作用 我们通过 siRNA 干扰质粒转染敲除 A549

细胞中的 Beclin-1,并检测其对细胞活力的影响。经 si-Beclin1-1、si-Beclin1-2 和 si-Beclin1-3 转染 A549 细胞后,仅 si-Beclin1-2 能诱导 Beclin-1 下调, ($P<0.01$)。因此,在以下试验中选择 si-Beclin1-2 来沉默 Beclin-1。见图 3A。沉默 Beclin-1 降低了 YKF 诱导的 LC3II/I 比值和 p62 表达水平。同样,3-MA 也达到了与沉默 Beclin-1 相同的效果,抑制了 LC3II/I 比值和 p62 的表达水平,表明 YKF 诱导的 A549 细胞自噬依赖于 Beclin-1。见图 3B。以上结果表明:Beclin-1 沉默和 3-MA 均可逆转 YKF 诱导的细胞活力下降($P<0.001$)。见图 3C。

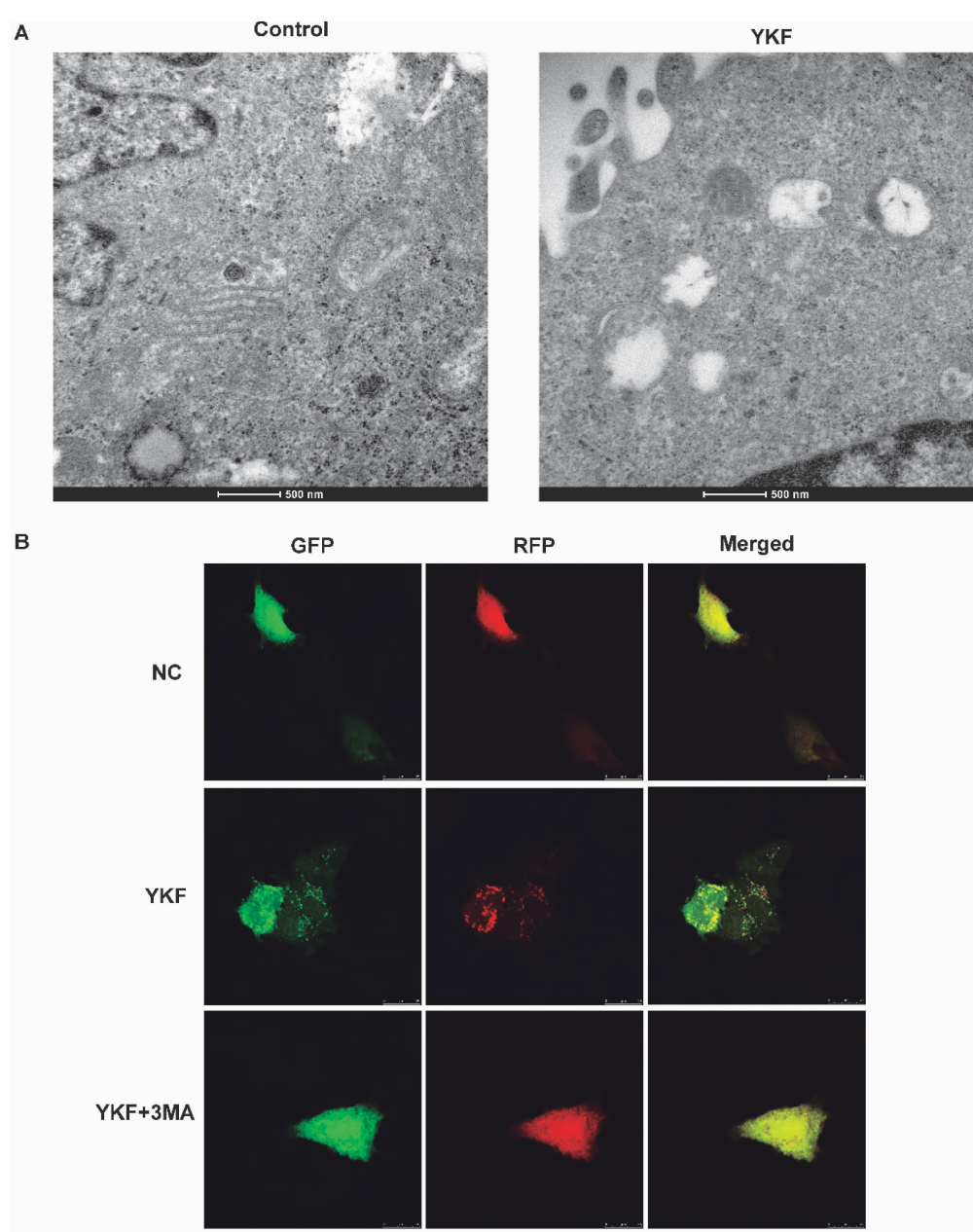
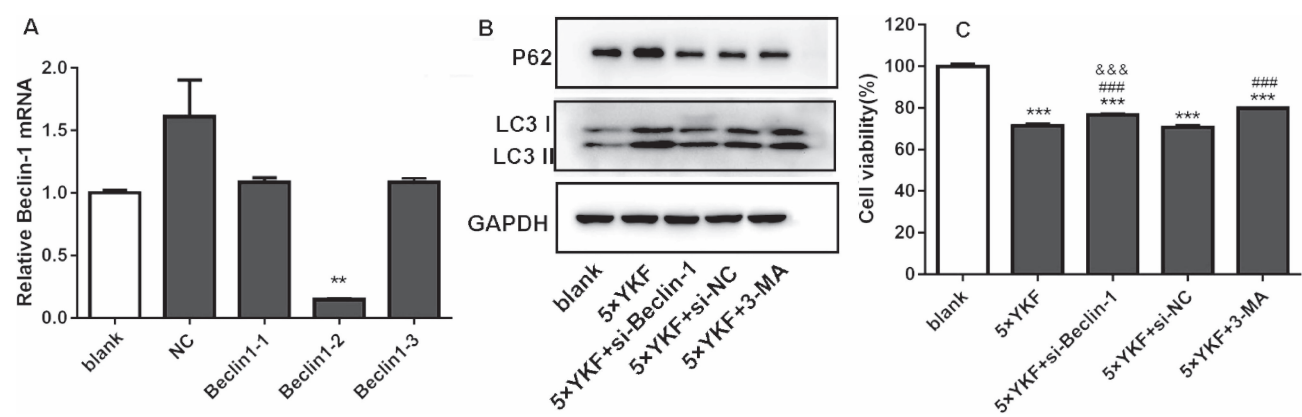


图 2 3-MA 抑制自噬对 YKF 诱导的 A549 细胞自噬的影响



注:与空白相比,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。与 5×YKF 相比,### $P<0.001$ 。与 5×YKF+si-NC 相比,ΔΔΔ $P<0.001$ 。

图 3 沉默 Beclin-1 可逆转含 YKF 的血清对 A549 细胞的自噬促进作用

2.4 沉默 Beclin-1 逆转含 YKF 的血清抑制细胞迁移 为了进一步确定 YKF 的抗肿瘤特性, 研究含 YKF 血清对 A549 细胞迁移的影响。结果显示, 与对照组相比, 含 $5 \times$ YKF 血清导致迁移的细胞数量显著减少 ($P < 0.001$)。在 Beclin-1 沉默的 A549 细胞中加入含 $5 \times$ YKF 的血清。与含 $5 \times$ YKF 血清和 si-Be-

clin-1 阴性对照细胞相比, Beclin-1 沉默的 A549 细胞迁移更多 ($P < 0.05$)。此外, 与含 $5 \times$ YKF 的血清和 si-Beclin-1 阴性对照细胞相比, 自噬抑制剂 3-MA 处理的 A549 细胞迁移更多 ($P < 0.01$)。这些数据表明, YKF 通过影响自噬和 Beclin-1 来抑制 A549 细胞迁移。见图 4。

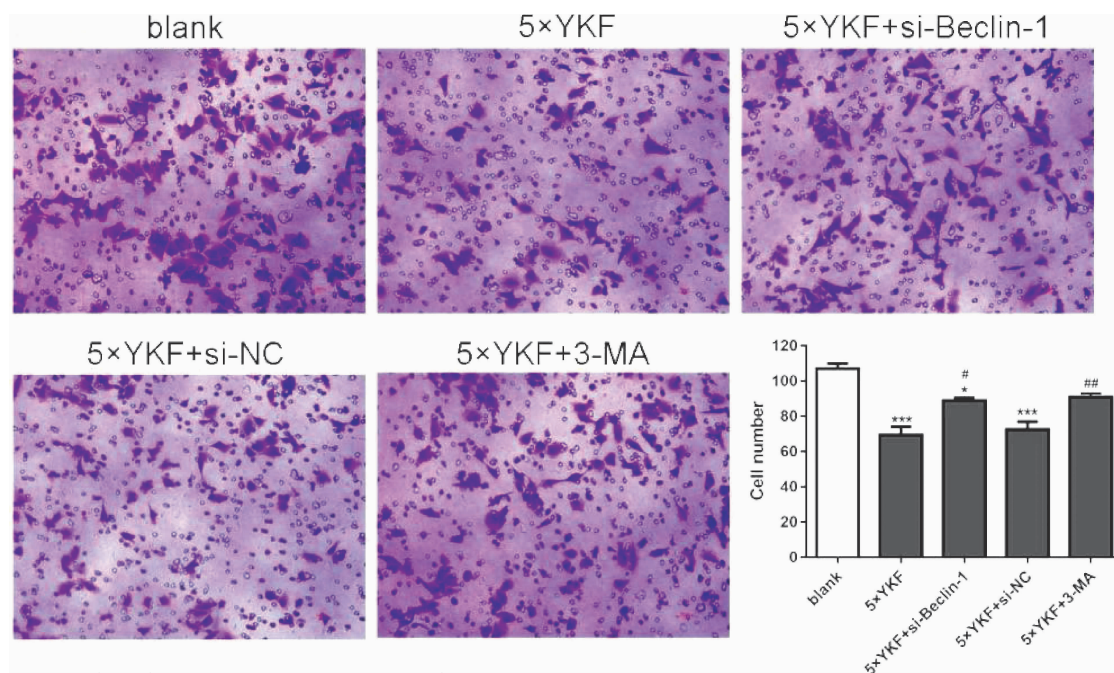


图 4 沉默 Beclin-1 逆转含 YKF 的血清抑制 A549 细胞迁移

2.5 沉默 Beclin-1 逆转含有 YKF 的血清对细胞侵袭的抑制作用 通过沉默 Beclin-1 逆转含 YKF 的血清以抑制 A549 细胞侵袭。结果显示, 与空白组相比, 含 $5 \times$ YKF 的血清导致侵袭细胞数量显著减少 ($P < 0.001$)。将含 $5 \times$ YKF 的血清添加到 Beclin-1 沉默的 A549 细胞中。与 $5 \times$ YKF 的血清和 si-Beclin-1 的阴性对照细胞相比, Beclin-1 沉默的 A549 细胞侵袭性更强 ($P < 0.05$)。此外, 与含 $5 \times$ YKF 的血清和 si-Beclin-1 的阴性对照细胞相比, 3-MA 处理的 A549 细胞侵袭性更强 ($P < 0.01$)。这些数据表明, YKF 通过影响自噬和 Beclin-1 来抑制 A549 细胞侵袭。见图 5。

3 讨论

近几十年来, 许多形式的补充医学和替代医学在世界范围内得到了广泛应用, 在改善癌症患者的生活质量方面发挥了作用^[18]。在中国, 中医药被广泛接受, 并成为有益于癌症患者补充疗法和替代疗法的重要手段^[6]。许多抗癌中药方剂已应用于临床, 并对癌症

患者产生了有益的效果。中草药治疗非小细胞性肺癌的 Meta 分析表明, 中草药可以有效提高患者生存质量和延长生存期, 在疗效、安全性和控制成本方面均具有显著的优势^[19-20]。本研究作为以细胞试验为基础的研究, 证实了 YKF 在促进肺癌细胞 A549 自噬、抑制肺癌细胞活力、迁移、侵袭等方面可发挥重要作用。

自噬在肿瘤存活或细胞死亡中具有复杂的双重作用^[1]。调控自噬是否有利于消除癌症目前尚不清楚。许多研究表明天然药物或药物成分可以诱导癌细胞的自噬性死亡, 如丹参酮^[21], 槲寄生^[22]和重楼皂苷 VI^[22]。许多中国传统药物或草药提取物可诱导肺癌细胞自噬性死亡^[23-25]。本研究结果显示: YKF 可抑制肿瘤细胞活力, 促进 A549 细胞中自噬相关蛋白 (Beclin-1, p62 和 LC3 II/I) 的表达和自噬体的形成, 进一步证实 YKF 可诱导 A549 细胞的自噬性死亡。同时, YKF 对 A549 细胞可发挥抗细胞迁移和侵袭的作用。综合来看, YKF 对 A549 细胞能够起到有效的抗肿瘤

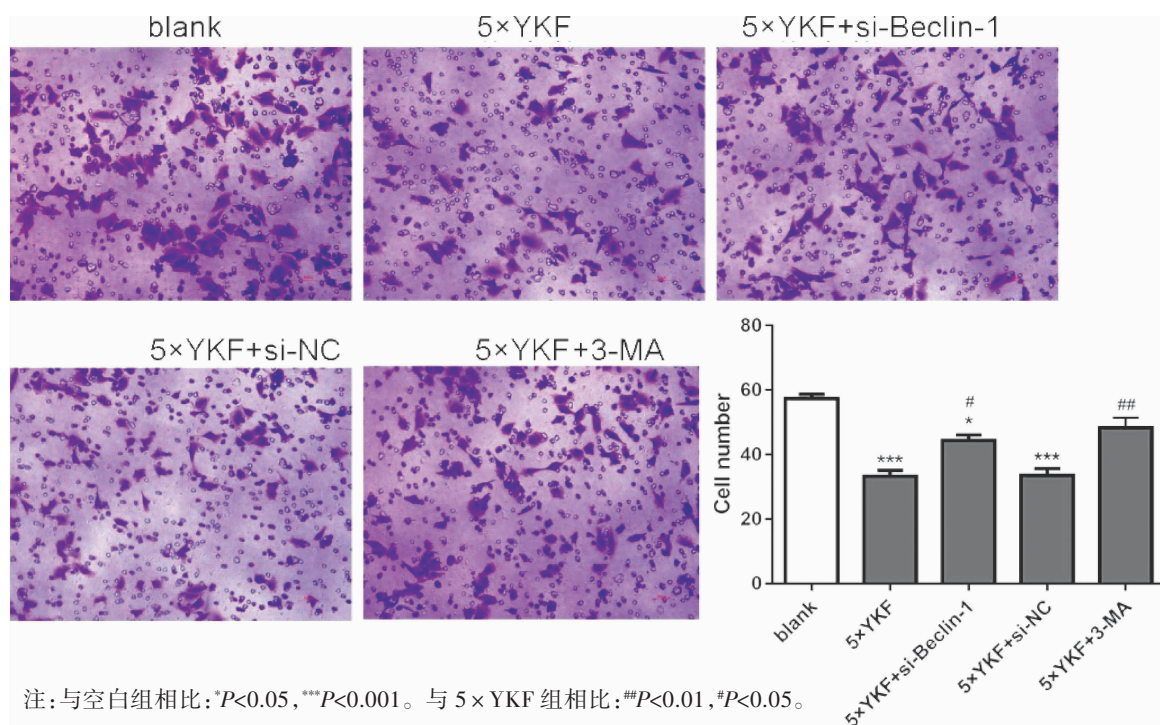


图 5 沉默 Beclin-1 逆转含 YKF 的血清以抑制 A549 细胞侵袭

活性的作用。

恶性细胞常常会表现出自噬缺陷和自噬相关蛋白的异常模式。Beclin-1 作为自噬的核心蛋白,显示出异常的表达模式和/或活性,这些异常与致癌作用呈正相关或负相关^[26-28]。文献报道,基于小鼠 Beclin-1 基因敲除的研究^[29]表明 Beclin-1 的杂合破坏导致体内细胞增殖增加和自噬减少,并表明 Beclin-1 或其他自噬基因的突变可能有助于人类癌症的发病机制。例如,有研究发现 Beclin-1 在胰腺癌和前列腺癌症等癌症患者中表达下调^[30-31]。此外,具有抗癌特性的药物对 Beclin-1 的抑制作用有利于癌症细胞的去除^[32]。本研究发现在含 YKF 血清诱导的 A549 细胞活力下降和自噬增加的情况下,Beclin-1 的表达水平显著提高,而基因敲除抑制了 YKF 对 A549 细胞 LC3 I-II 比值、p62 表达、迁移和侵袭的影响。由此,我们可以推断,Beclin-1 是 YKF 诱导细胞自噬、抑制 A549 细胞迁移和侵袭的抗癌特性中的一个关键性分子。

综上所述,本研究发现:YKF 对肺癌 A549 细胞具有很强的抗癌作用。此外,A549 细胞的 Beclin-1 依赖性自噬死亡是 YKF 抑制肺癌进展的机制。本研究基于传统处方 YKF 进行的基础试验来阐明抗癌药物 YKF 的作用机制,以期在未来的肿瘤治疗中提供更多科学依据和思路。

参考文献:

- [1] 代景友,韩卓越,田浩,等. 自噬在肿瘤发生、发展、治疗及预后中的作用[J]. 现代肿瘤医学,2012,20 (11):2423-2425.
- [2] WANG X,SHAO Q H,ZHOU H,et al. Ginkgolide B inhibits lung cancer cells promotion via beclin-1-dependent autophagy[J]. BMC Complement Med Ther,2020,20 (1):194.
- [3] KIM T W,LEE S Y,KIM M,et al. Kaempferol induces autophagic cell death via IRE1-JNK-CHOP pathway and inhibition of G9a in gastric cancer cells[J]. Cell Death Dis, 2018,9(9):875.
- [4] THAYYULLATHIL F,CHERATTA A R,PALLICHANKANDY S,et al. Par-4 regulates autophagic cell death in human cancer cells via upregulating p53 and BNIP3 [J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2020, 1867 (7): 118692.
- [5] LEVY J M M,TOWERS C G,THORBURN A,et al. Targeting autophagy in cancer[J]. Nat Rev Cancer,2017,17 (9):528-542.
- [6] XIANG Y,GUO Z,ZHU P,et al. Traditional Chinese medicine as a cancer treatment;Modern perspectives of ancient but advanced science[J]. Cancer Med,2019,8(5): 1958-1975.
- [7] PENG W,ZHANG S,ZHANG Z,et al. Jianpi Jiedu decoction

- tion, a traditional Chinese medicine formula, inhibits tumorigenesis, metastasis, and angiogenesis through the mTOR/HIF-1 α /VEGF pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 224: 140–148.
- [8] XU Z, ZHANG F, ZHU Y, et al. Traditional Chinese medicine Ze-Qi-Tang formula inhibit growth of non-small-cell lung cancer cells through the p53 pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 234: 180–188.
- [9] 沈水杰, 章永红. 养肺控瘤方联合康莱特及生物制剂治疗恶性胸腔积液观察[J]. *实用中医药杂志*, 2015, 31(10): 918–919.
- [10] SHEN S J, ZHANG Y H, GU X X, et al. Yangfei Kongliu Formula, a compound Chinese herbal medicine, combined with cisplatin, inhibits growth of lung cancer cells through transforming growth factor- β 1 signaling pathway[J]. *J Integr Med*, 2017, 15(3): 242–251.
- [11] 沈水杰, 徐玲俊. 养肺控瘤方对 Lewis 晚期肺癌小鼠的抑瘤作用及对白介素-2 和肿瘤坏死因子- α 表达的影响[J]. *世界中医药*, 2018, 13(2): 420–422.
- [12] 景正全, 吴大富, 陈明. PD-L1、Beclin-1、P62 在 NSCLC 中的表达与复发转移的关系[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2022, 14(1): 168–172.
- [13] 王婧喆, 王翠峰. Beclin-1、LC3 和 mTOR 在肺癌中的表达及意义[J]. *包头医学院学报*, 2022, 38(1): 45–49.
- [14] 薛小芳, 岳会珠, 何涯丽. 自噬相关蛋白 Atg5 和 Beclin-1 在宫颈癌组织中的表达及与临床病理的相关性[J]. *实用癌症杂志*, 2021, 36(10): 1601–1604, 1613.
- [15] LIANG X H, JACKSON S, SEAMAN M, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1[J]. *Nature*, 1999, 402(6762): 672–676.
- [16] TANIDA I, UENO T, KOMINAMI E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(12): 2503–2518.
- [17] ISLAM M A, SOORO M A, ZHANG P. Autophagic regulation of p62 is critical for cancer therapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(5): 1405.
- [18] BEHZADMEHR R, DASTYAR N, MOGHADAM M P, et al. Effect of complementary and alternative medicine interventions on cancer related pain among breast cancer patients: A systematic review[J]. *Complement Ther Med*, 2020, 49: 102318.
- [19] CHEN S, FLOWER A, RITCHIE A, et al. Oral Chinese herbal medicine (CHM) as an adjuvant treatment during chemotherapy for non-small cell lung cancer: A systematic review[J]. *Lung Cancer*, 2010, 68(2): 137–145.
- [20] LIU R, HE S L, ZHAO Y C, et al. Chinese herbal decoction based on syndrome differentiation as maintenance therapy in patients with extensive-stage small-cell lung cancer: an exploratory and small prospective cohort study[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 601067.
- [21] 邱叶. 丹参酮 II A 诱导口腔鳞癌细胞自噬的抗癌作用及分子机制研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2019.
- [22] 李宇华, 孙阳, 樊磊, 等. 重楼皂苷 VI 抑制结肠癌 LoVo 细胞转移的作用及机制研究[J]. *华南国防医学杂志*, 2015, 29(8): 571–574.
- [23] 王燕, 邵荣光, 王真. 以地高辛为代表的洋地黄类药物诱导非小细胞型肺癌自噬机制研究[C] // 2011 医学科学前沿论坛第十二届全国肿瘤药理与化疗学术会议论文集. 南京: 2011.
- [24] 王均琪, 葛莎莎, 张明烁, 等. 中药有效成分调控细胞自噬的研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(22): 5429–5437.
- [25] 相美亦, 李瑞蕾, 张志伟, 等. 天然中药单体及衍生物调控非小细胞肺癌自噬的研究新进展[J]. *中国肺癌杂志*, 2017, 20(3): 205–212.
- [26] TOTON E, LISIAK N, SAWICKA P, et al. Beclin-1 and its role as a target for anticancer therapy[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2014, 65(4): 459–467.
- [27] LEE H Y, SHIN J H, LEE K Y, et al. Prognostic role of beclin-1 in locally advanced non-small cell lung cancer in patients receiving docetaxel-platinum induction chemotherapy[J]. *Korean J Intern Med*, 2019, 34(2): 401–408.
- [28] ZHENG T, LI D, HE Z, et al. Prognostic and clinicopathological significance of Beclin-1 in non-small-cell lung cancer: a meta-analysis[J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11: 4167–4175.
- [29] QU X, YU J, BHAGAT G, et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene[J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(12): 1809–1820.
- [30] 柯能文, 刘续宝. Beclin-1 分子在胰腺癌组织中的表达及其临床意义[J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2017, 24(6): 671–679.
- [31] 徐凌凡, 梁朝朝, 邵胜, 等. 自噬基因 Beclin-1 在前列腺癌组织中的表达及意义[J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(12): 1799–1802.
- [32] HUANG Z, FANG W, LIU W, et al. Aspirin induces Beclin-1-dependent autophagy of human hepatocellular carcinoma cell[J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 823: 58–64.