

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.12.014

姜黄素联合索拉菲尼对肝癌细胞系 HepG-2 细胞增殖及自噬的影响

刘国龄¹ 沈方臻^{1Δ} 孟令君¹ 王耀庭¹ 张炳远²

(1 青岛大学附属医院肿瘤科 山东 青岛 266003; 2 青岛大学附属医院肝胆外科 山东 青岛 266003)

摘要 目的:研究姜黄素联合索拉菲尼对肝癌细胞系 HepG-2 细胞增殖及自噬的影响。**方法:**体外培养肝癌细胞系 HepG-2 细胞,用不同浓度姜黄素(0、10、20、30、40、50 mmol/L)、不同浓度索拉菲尼(0、5、10、15、20 μmol/L)及两药联合处理肝癌细胞系 HepG-2 细胞 24 h 后,用 CCK8 实验检测细胞存活率。用姜黄素 30 mmol/L、索拉菲尼 10 μmol/L 及两药联合处理肝癌细胞系 HepG-2 细胞 24 h 后,用荧光定量 PCR 检测自噬相关信号通路关键蛋白 AKT、mTOR 及自噬相关蛋白 LC3-II 的 mRNA 表达情况。**结果:**姜黄素、索拉菲尼及两药联合对 HepG-2 细胞均有增殖抑制作用,且呈浓度依赖性。与姜黄素或索拉菲尼单药组相比,姜黄素联合索拉菲尼组能显著抑制肝癌细胞系 HepG-2 细胞的增殖 ($P<0.001$);能显著抑制 AKT、mTOR 的 mRNA 表达而增加自噬相关蛋白 LC3-II 的 mRNA 的表达 ($P<0.001$)。**结论:**姜黄素联合索拉菲尼组抑制肝癌细胞系 HepG-2 细胞增殖作用较单药组明显增强,两药联合协同诱导肝癌细胞系 HepG-2 细胞产生自噬,其作用机制可能与抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路有关。

关键词:姜黄素;索拉菲尼;自噬;肝癌

中图分类号:R-33;R735.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)12-2268-05

Effect of Curcumin Combined with Sorafenib to Proliferation and Autophagy in Vitro Hepatocellular Carcinoma HepG-2 Cells

LIU Guo-ling¹, SHEN Fang-zhen^{1Δ}, MENG Ling-jun¹, WANG Yao-ting¹, ZHANG Bing-yuan²

(1 Department of Oncology, Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao, Shandong, 266003, China;

2 Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao, Shandong, 266003, China)

ABSTRACT Objective: To study the effect of Curcumin, Sorafenib, Curcumin combined to proliferation and autophagy in Vitro Hepatocellular Carcinoma HepG-2 Cells. **Methods:** HepG-2 cells were treated by different concentrations of Curcumin (0, 10, 20, 30, 40, 50 mmol/L), Sorafenib (0, 5, 10, 15, 20 μmol/L) alone and the combination (Curcumin 30mmol/L combined with Sorafenib 10 μmol/L) for 24 h. Cell proliferation were detected by CCK8 assay. And the mRNA expression of autophagy-related protein AKT, mTOR and LC3 were detected by Real-time PCR. **Results:** Compared with using Curcumin or Sorafenib alone, the both combination group had more abilities to depressing the cell proliferation ($P<0.001$), decreasing the mRNA expression of autophagy-related protein AKT, mTOR and increasing that of LC3-II ($P<0.001$). **Conclusion:** Curcumin combined with Sorafenib can effectively depress the cell proliferation in Vitro Hepatocellular Carcinoma HepG-2 Cells and maybe induce cell autophagy through PI3K/AKT/mTOR signal pathway.

Key words: Curcumin; Sorafenib; Autophagy; Hepatocellular Carcinoma

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)12-2268-05

前言

肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)是目前我国第四位常见的恶性肿瘤及第三位的肿瘤致死病因^[1],起病隐匿,进展迅速。早期肝癌患者以手术治疗为主,但我国大部分患者就诊时已属中晚期,失去手术治疗机会,多采用介入、射频、放疗等局部治疗和化疗及靶向等全身治疗手段,以延缓肿瘤进展,延长患者生存期。肝癌综合治疗 5 年生存率也仅为 10.2%^[2]。靶向药物与化疗药物联合的治疗模式已成为肿瘤治疗的新方向。

作者简介:刘国龄(1991-),硕士研究生,主要从事肿瘤化疗及分子靶向治疗研究,电话:15563928507,

E-mail:liuguoling2013@163.com

Δ 通讯作者:沈方臻(1962-),硕士,主任医师,主要从事肿瘤化疗及分子靶向治疗研究,E-mail:shenfangzhen@163.com

(收稿日期:2017-12-28 接受日期:2018-01-25)

自噬是真核细胞内蛋白质和细胞器分解的溶酶体降解途径。在维持细胞内环境的稳态、调节代谢、去除损伤的蛋白质和细胞器等方面发挥了重要作用。研究表明 LC3-II(微管相关蛋白轻链 3-II)在细胞中的含量与自噬小体的形成有关,LC3-II 蛋白作为哺乳细胞中常见的自噬小体标记蛋白之一,参与了自噬的形成^[3]。mTOR 激酶是诱导自噬信号通路中关键的分子,激活 mTOR 的通路如 Akt 和 MAPK 抑制细胞自噬,负调控 mTOR 的通路如 AMPK 和 p53 促进细胞自噬。肝癌细胞中 PI3K/AKT/mTOR 信号通路处于激活状态,阻断肝癌细胞中 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的过度激活从而诱导肝癌细胞产生自噬可能是治疗癌症的新途径^[4]。

本实验主要探究了单药姜黄素、单药索拉菲尼以及两药联合对肝癌细胞增殖的抑制作用及是否能够通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路诱导肝癌细胞产生自噬,以及两药联合是否有

协同作用。以期为肝癌的临床联合用药治疗提供参考依据。

1 材料及方法

1.1 材料

人肝癌细胞系 HepG-2 来自青岛大学微生物教研室馈赠, 索拉菲尼购自 Selleck 公司, 姜黄素购自美国 Bellancom 公司, BI 胎牛血清购自上海逍鹏生物科技有限公司, Hyclone RPMI1640 培养基购自上海慧颖生物科技有限公司, CCK8 试剂盒购自青岛博康生物, 实时荧光定量聚合酶链反应(Real-time PCR)试剂盒购自 Thermo Fisher Scientific。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人肝癌细胞系 HepG-2 细胞接种于含有 10% 胎牛血清和 2% 双抗的 RPMI1640 培养基中, 37℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养。

1.2.2 细胞增殖实验 取对数生长的细胞, 以 1×10^4 个 / mL

密度接种于 96 孔板(每孔 100 μ L), 分别加入不同浓度的姜黄素 (0、10、20、30、40、50 mmol/L), 索拉菲尼 (0、5、10、15、20 μ mol/L), 及两药(姜黄素 30 mmol/L, 索拉菲尼 10 μ mol/L) 联合应用, 设空白对照及 DMSO 对照组, 每种给药方式设 6 个复孔。孵育 24 h, 每孔加入 10 μ L CCK8 试剂, 37℃ 温箱中反应 2 h, 酶标仪在 450 nm 波长处测各孔吸光度(Absorbance/A)并计算肿瘤细胞存活率。肿瘤细胞存活率 = (用药组 A 值 / 对照组 A 值) $\times$ 100%。

1.2.3 Real-time PCR 检测自噬相关蛋白的 mRNA 表达情况 以姜黄素 30 mmol/L, 索拉菲尼 10 μ mol/L 单药及联合处理细胞, 并设空白对照组, 药物处理 24 h 后用 Trizol 法提取总 RNA, 检测 RNA 浓度及纯度, 取合格 RNA 进行逆转录, 根据 PCR 试剂盒配置 PCR 反应体系, 以 β -actin 为内参进行 RT-PCR 检测。基因引物序列见表 1。

表 1 基因引物种类及其序列

Table 1 Primer names, sequences and predicted PCR product sizes

Primer name	primer sequence	predicted product (bp)	
B-actin	F: 5'-GATGAGATTGGCATGGCTTT-3'	268	R: 5'-CACCTTCACCGTTCCAGTTT-3'
AKT	F: 5'-ACTGCGCTGGACGATAGCTT-3'	107	R: 5'-AGGACAGCGTGGCTTCTCTC-3'
mTOR	F: 5'-ATTCAGATCGCTGGCAGCCT-3'	178	R: 5'-CCCTGTGTTTCAGCACCTCCA-3'
LC3-II	F: 5'-CGAGCGCTACAAGGGTGAGA-3'	195	R: 5'-TCGTAGATGTCCGCGATGGG-3'

对 Real Time PCR 结果进行分析, 采用 $2^{-\Delta \Delta CT}$ 法数据分析: 第一步, Real Time PCR 扩增结束后输出对照组和待测组的目 CT 值;

第二步, 用内参基因的 CT 值归一化目的基因的 CT 值。计算 ΔCT , $\Delta CT = CT_{(GOI)} - CT_{(\beta-Actin)}$;

第三步, 用对照组的 ΔCT 值归一化待测组的 ΔCT 值。计算 $\Delta \Delta CT$, $\Delta \Delta CT = \Delta CT_{(待测组)} - \Delta CT_{(对照组)}$;

第四步, 计算相对于对照组的表达水平比率。求 $2^{-\Delta \Delta CT}$; 将 $2^{-\Delta \Delta CT}$ 的结果代入 GraphPad Prism 6.0 计软件绘制统计图。

1.3 统计学分析

应用 SPSS17.0 软件对实验结果进行统计学分析, 所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间的比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 q 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 索拉菲尼与姜黄素联合应用增加对 HepG-2 细胞增殖抑制作用

姜黄素、索拉菲尼及其对应浓度联合应用对 HepG-2 细胞增殖抑制结果如图 1、2、3, 索拉菲尼与姜黄素单独应用时, 随着浓度增加对 HepG-2 细胞增殖抑制作用增加(表 2, 3), 差异有统计学意义(索拉菲尼 $F=5240.786$, $P < 0.001$; 姜黄素 $F=853.840$, $P < 0.001$)。分别选取空白对照组、姜黄素 30 mmol/L、索拉菲尼 10 μ mol/L 以及两者联合作用于 HepG-2 细胞 24 h 后(图 3), 各组细胞存活率分别为 100%、(45.57 $\pm$ 0.6)%、(44.37 $\pm$ 0.04)%、(33.29 $\pm$ 0.12)%, 联合组与单药组及对照组比较对 HepG-2 的细胞增殖抑制作用增加, 差异有统计学意义($F=2439.208$, $P < 0.001$)。

表 2 不同浓度姜黄素处理 HepG-2 细胞后细胞的吸光度值和细胞存活率

Table 2 The absorbance value and survival rate in HepG-2 cells treated by different concentrations of curcumin

Groups	Concentrations of curcumin	Absorbance value($\bar{x} \pm s$)	Survival rate
blank control group	-	1.836 $\pm$ 0.029	-
curcumin groups	10 mmol/L	1.549 $\pm$ 0.038	0.844
	20 mmol/L	1.283 $\pm$ 0.020	0.699
	30 mmol/L	0.866 $\pm$ 0.023	0.472
	40 mmol/L	0.714 $\pm$ 0.009	0.389
	50 mmol/L	0.602 $\pm$ 0.008	0.328

2.2 索拉菲尼联合姜黄素对 AKT、mTOR 及自噬相关蛋白 LC3-II 的 mRNA 的表达影响

在 4 组实验中, 与空白组相比较, 单药索拉菲尼、单药姜黄素组可抑制 AKT、mTOR 及增加自噬相关蛋白 LC3-II 的 mR-

NA 的表达,联合用药组作用更显著($P<0.001$)。

表 3 不同浓度索拉菲尼处理 HepG-2 细胞后细胞的吸光度值和细胞存活率

Table 3 The absorbance value and survival rate in HepG-2 cells treated by different concentrations of sorafenib

Groups	Concentrations of sorafenib	Absorbance value($\bar{x} \pm s$)	Survival rate
Blank control group	-	1.821 $\pm$ 0.027	-
Sorafenib groups	5 μ mol/L	1.426 $\pm$ 0.013	0.783
	10 μ mol/L	0.844 $\pm$ 0.007	0.463
	15 μ mol/L	0.716 $\pm$ 0.004	0.393
	20 μ mol/L	0.624 $\pm$ 0.017	0.343

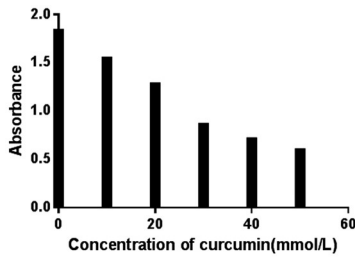


图 1 不同浓度姜黄素对 HepG-2 细胞增殖的抑制作用
($F=853.840, P<0.001$)

Fig.1 Inhibitory effects of different concentrations of curcumin on the proliferation of HepG-2 cells
($F=853.840, P<0.001$)

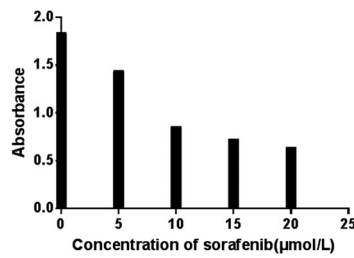


图 2 不同浓度索拉菲尼对 HepG-2 增殖的抑制作用
($F=5240.786, P<0.001$)

Fig.2 Inhibitory effects of different concentrations of sorafenib on the proliferation of HepG-2 cells
($F=5240.786, P<0.001$)

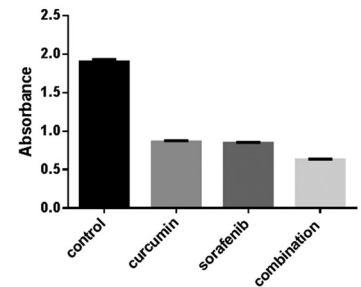


图 3 索拉菲尼 10 μ mol/L、姜黄素 30 mmol/L 以及两者联合对 HepG-2 细胞增殖的抑制作用
($F=2439.208, P<0.001$)

Fig. 3 Inhibitory effects of sorafenib 10 μ mol/L, curcumin 30 mmol/L and the combination of the two on the proliferation of HepG-2 cells
($F=2439.208, P<0.001$)

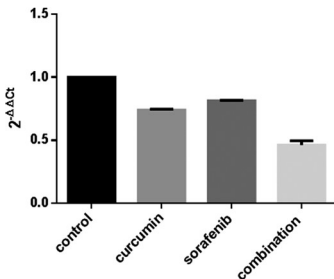


图 4 不同药物对 AKT mRNA 表达的影响
Fig.4 Different drugs on AKT mRNA expression

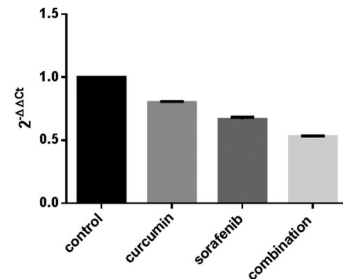


图 5 不同药物对 mTOR mRNA 表达的影响
Fig.5 Different drugs on mTOR mRNA expression

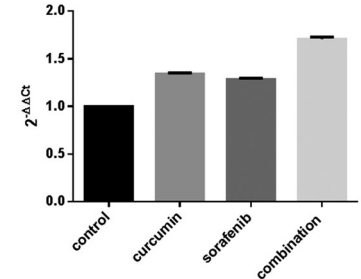


图 6 不同药物对 LC3-II mRNA 表达量的影响
Fig.6 Different drugs on LC3-II mRNA expression

3 讨论

AKT 也被称为蛋白激酶 B, 是分别由基因 PKB α , PKB β 和 PKB γ 编码表达的丝氨酸 / 苏氨酸激酶的三种亚型: AKT1, AKT2 和 AKT3, 这三种亚型具有类似的结构: N-末端 PH 结构域, 中心丝氨酸 / 苏氨酸催化结构域和小 C 末端调节结构域。AKT 活化是通过易位到质膜引发的, 通过将 AKT 的 N 末端区域中的 PH 结构域对接到膜上的 PI(3,4,5)P₃, 导致 AKT 的构象变化, 暴露两个关键磷酸化的氨基酸残基^[56]。PDK1 和 S473 的磷酸化都是 AKT 完全活化所必需的。已经明确了许多潜在的 PDK2, 包括 ILK(整联蛋白连接的激酶), PKC β II, DNA-PK(DNA 依赖性蛋白激酶)和 ATM(共济失调毛细血管扩张症突变)和 AKT 本身。然而, 目前认为在大多数情况下, mTOR C2

(mTOR / rictor 复合物)是 PDK2 活性的主要来源^[7]。一旦磷酸化并活化, AKT 磷酸化许多其它蛋白质, 例如, GSK3(糖原合成酶激酶 3)和 FOXO(转录因子的叉头家族), 从而调节涉及蛋白质合成, 细胞存活, 增殖和代谢的广泛的细胞过程^[8]。mTOR 通过监测营养物质的可利用性、细胞能量水平、氧水平和促有丝分裂信号在调节细胞生长和增殖中发挥关键作用。值得注意的是, mTOR 属于 PI3K 超家族中称为 IV 类 PI3K 的 Ser / Thr 蛋白激酶, 包括 ATM, ATR(共济失调毛细血管扩张症突变基因和 Rad3 相关), DNA-PK 和 SMG-1(SMG1 同源物, 磷脂酰肌醇 3-激酶相关激酶)。mTOR 存在于两个不同的复合物 -- mTOR C1 和 mTOR C2 中。mTOR C1 复合物由 mTOR 催化亚基, Raptor(mTOR 的调节相关蛋白), PRAS40(富含脯氨酸的 AKT 底物 40kDa)和蛋白质 mLST8 / GbL 组成。mTOR C2 由

mTOR, Rictor(mTOR 的雷帕霉素不敏感伴侣), mSIN1(哺乳动物应激激活蛋白激酶相互作用蛋白 1) 和 mLST8 / GbL 组成。AKT 可通过磷酸化 PRAS40 和 TSC2 (结节性硬化综合征) 来激活 mTOR, 以减弱其对 mTOR C1^[5,6] 的抑制作用。对 mTOR C1 与肿瘤抑制蛋白的复合物 TSC1 和 TSC2 的结合的发现提供了 mTOR 和癌症之间的分子联系^[9]。mTOR C1 的最好表征的下游靶标是 S6K1(p70S6 激酶) 和 4E-BP1(4E 结合蛋白), 两者都很大程度地参与蛋白质合成的调节。因此, mTOR 的活化可以通过促进蛋白质合成为肿瘤细胞提供生长优势。研究表明 PI3K/Akt/mTOR 信号通路在促进肿瘤血管形成、调节细胞周期、促进侵袭转移等方面发挥重要作用^[10], 阻断 PI3K/Akt/mTOR 信号通路能抑制肿瘤细胞的增殖以及诱导肿瘤细胞凋亡^[11-16]。

自噬是真核细胞内蛋白质和细胞器分解的溶酶体降解途径。在维持细胞内环境的稳态、调节代谢、去除损伤的蛋白质和细胞器等方面发挥了重要作用。因此, 自噬能增加细胞应激耐受性, 限制恶劣环境对细胞的损伤并维持细胞的生存^[17]。然而, 自噬对肿瘤细胞的影响还存在着争议, 一种观点任务自噬增加肿瘤细胞应激耐受性对肿瘤细胞起保护性作用; 另一种观点认为, 自噬通过 II 型程序性细胞死亡的方式对肿瘤细胞具有一定的杀伤作用。自噬是细胞的生理及病理过程中一个基本过程, 明确自噬的功能状态对肿瘤发生、发展及治疗的影响, 将为肿瘤治疗和预防提供新的途径。研究发现 LC3-II (微管相关蛋白轻链 3-II) 在细胞中的含量与自噬小体的形成有关, LC3-II 蛋白作为哺乳细胞中常见的自噬小体标记蛋白之一, 参与了自噬的形成^[3]。磷脂肌醇-3 激酶(PI3K)-蛋白激酶 B(PKB, Akt)-雷帕霉素靶体蛋白(mTOR)通路的异常活化调节多种肿瘤细胞的存活和增殖^[18-20]。自噬的过程受 PI3K-Akt-mTOR 信号通路调控^[21]。mTOR 激酶是诱导自噬信号通路中关键的分子, 激活 mTOR 的通路如 Akt 和 MAPK 抑制细胞自噬, 负调控 mTOR 的通路如 AMPK 和 p53 促进细胞自噬。肝癌细胞中 PI3K/AKT/mTOR 信号通路处于激活状态^[22]。阻断肝癌细胞中 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的过度激活从而诱导肝癌细胞产生自噬可能是治疗癌症的新途径^[4]。

索拉菲尼作为口服多靶点酪氨酸激酶抑制剂, 开启了晚期无法手术或已有远处转移肝癌患者分子靶向治疗的时代, 作为晚期肝癌一线靶向治疗药物^[23], 主要作用于 Raf 激酶, 通过阻断由 MAPK 介导的细胞信号传导通路而直接抑制肿瘤细胞的增殖, 还可以抑制血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 和血小板衍生生长因子 (Platelet derived growth factor, PDGF) 受体阻断肿瘤新生血管的形成, 间接抑制肿瘤细胞生长。另外, 索拉菲尼可通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路抑制肝癌细胞增殖^[24], 同时诱导肝癌细胞自噬^[25]。索拉菲尼改善了部分患者的预后, 但仍存在生存期延长有限, 客观反应率低, 症状改善不明显和无法预测优势人群等问题, 新的治疗模式迫在眉睫。

姜黄素是从植物中分离出的一种酚类化合物, 具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等多种生物学作用^[26], 近年研究表明, 姜黄素具有较广谱的抗肿瘤活性^[27-30], 可抑制体内、外肿瘤的生长及诱导多种肿瘤细胞凋亡其抗肿瘤作用逐渐为大家所认识并引起

广泛重视, 但是期抗肿瘤机制尚未完全明确。研究表明姜黄素通过下调 PI3K/Akt/mTOR 信号通路诱导自噬^[31]。在对乳腺癌、黑色素瘤的研究表明姜黄素可以通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路, 上调 LC3-II 表达, 诱导肿瘤细胞自噬^[32,33]。姜黄素还能诱导肺癌、胃癌、肝癌等产生自噬^[34-37], 其具体机制有待进一步研究。

CCK8 实验显示, 单药索拉菲尼、单药姜黄素均可对肝癌细胞增殖产生抑制作用, 且呈浓度依赖性, 而且两药联合对肝癌细胞增殖具有显著协同抑制作用 ($P < 0.001$)。我们通过 Real-time PCR 实验可以发现, 单药索拉菲尼组、单药姜黄素组及两药联合组的肝癌细胞 AKT、mTOR 的 mRNA 表达量较空白对照组减少, 而 LC3-II 的 mRNA 表达量增加, 差异具有统计学意义 ($P < 0.001$), 且以联合组变化最为显著, 说明索拉菲尼、姜黄素能抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路, 继而增加肝癌细胞自噬, 同时两药联合诱导肝癌细胞自噬具有协同作用。

综上所述, 索拉菲尼和姜黄素具有协同抑制肝癌细胞增殖作用, 且通过对 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的抑制作用增强肝癌细胞自噬。同时, 阻断肝癌细胞 PI3K/Akt/mTOR 信号通路能抑制肿瘤细胞的增殖^[16], 但索拉菲尼联合姜黄素诱导的肝癌细胞自噬与增殖抑制之间的关系有待于进一步深入研究。

参考文献 (References)

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65: 87-108, 2
- [2] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66: 115-132
- [3] Tanida I, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T, et al. Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy [J]. Autophagy, 2005, 1(2): 84-91
- [4] Samarin J, Laketa V, Malz M, et al. PI3K/AKT/mTOR -dependent stabilization of oncogenic far-upstream element binding proteins in hepatocellular carcinoma cells[J]. Hepatology, 2016, 63(3): 813-826
- [5] Manning BD, Tee AR, Logsdon MN, et al. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway [J]. Mol Cell, 2002, 10: 151-162
- [6] Vander Haar E, Lee SI, Bandhakavi S, et al. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40[J]. Nat Cell Biol, 2007, 9: 316-323
- [7] Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, et al. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor- mTOR complex [J]. Science, 2005, 307: 1098-1101
- [8] Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream[J]. Cell, 2007, 129: 1261-1274
- [9] Crino PB, Nathanson KL, Henske EP. The tuberous sclerosis complex [J]. N Engl J Med, 2006, 355: 1345-1356
- [10] LI Li, CC Han, XY Liu. Regulation of PI3K-Akt-mTORC1 signal pathway in the cell growth and proliferation [J]. Journal of Biology, 2014, 31(1): 75-77
- [11] J Walter, AS Krombholz, S Grube, et al. mTOR-inhibition and interruption of PI3K/Akt signaling leads to proliferation inhibition and induces apoptosis with defective autophagy in human meningioma cells[J]. Oncology Research & Treatment, 2014, 37(suppl 1):1-132
- [12] N Feng, J Luo, X Guo. Silybin suppresses cell proliferation and in-

- duces apoptosis of multiple myeloma cells via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2016, 13 (4): 336-343
- [13] H Li, Y Han, X Jin, et al. The study of cell proliferation and apoptosis and autophagy in renal cell carcinoma cells influence by the PI3K/AKT/mTor inhibitor NVP-BEZ235[J]. *Translational Andrology & Urology*, 2014, 3(Suppl 1): AB98
- [14] X Xing, L Zhang, X Wen, et al. PP242 suppresses cell proliferation, metastasis, and angiogenesis of gastric cancer through inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Anti-cancer drugs*, 2014, 25(10): 1129-1140
- [15] H Wu, X Dai, E Wang. Plumbagin inhibits cell proliferation and promotes apoptosis in multiple myeloma cells through inhibition of the PI3K/Akt-mTOR pathway[J]. *Oncology Letters*, 2016, 12(5): 3614
- [16] Hao Tang, Rong Ping Li, Ping Liang, et al. miR 125a inhibits the migration and invasion of liver cancer cells via suppression of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Oncology Letters*, 2015, 26 (5): 681-686
- [17] Eileen White, Robert S. DiPaola. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15 (17): 5308-5316
- [18] Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer[J]. *Front Oncol*, 2014, 4: 64
- [19] Fumarola C, Bonelli MA, Petronini PG, et al. Targeting PI3K/AKT/mTOR pathway in non small cell lung cancer[J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 90: 197-207
- [20] Sarris EG, Saif MW, Syrigos KN. The biological role of PI3K pathway in lung cancer[J]. *Pharmaceuticals*, 2012, 5: 1236-1264
- [21] Sun H, Wang Z, Yakisich JS. Natural products targeting autophagy via the PI3K/Akt/mTOR pathway as anticancer agents [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2013, 13(7): 1048-1056
- [22] Winnie Yeo, Stephen L Chan, Frankie KF Mo, et al. Phase I/II study of temsirolimus for patients with unresectable Hepatocellular Carcinoma (HCC)- a correlative study to explore potential biomarkers for response[J]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 395
- [23] Gauthier A, Ho M. Role of sorafenib in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma: An update [J]. *Hepatol Res*, 2013, 43(2): 147-154
- [24] Zhang CZ, Wang XD, Wang HW, et al. Sorafenib inhibits liver cancer growth by decreasing mTOR, AKT, and PI3K expression [J]. *J BUON*, 2015, 20(1): 218-222
- [25] He C, Jiang H, Dong X, et al. MiR-21 mediates sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting autophagy via the PTEN/Akt pathway[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(30): 28867-28881
- [26] Bharat B, Aggarwal, Bokyung Sung. Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2009, 30(2): 85-94
- [27] Liu H, He Z, Simon HU. Targeting autophagy as a potential therapeutic approach for melanoma therapy [J]. *Semin Cancer Biol*, 2013, 23: 352-360
- [28] Hönscheid P, Datta K, Mudders MH. Autophagy: Detection, regulation and its role in cancer and therapy response [J]. *Int J Radiat Biol*, 2014, 90: 628-635
- [29] Chu YL, Raghu R, Lu KH, et al. Autophagy therapeutic potential of garlic in human cancer therapy [J]. *J Tradit Complement Med*, 2013, 3: 159-162
- [30] Thorburn A, Thamm DH, Gustafson DL. Autophagy and cancer therapy[J]. *Mol Pharmacol*, 2014, 85: 830-838
- [31] Wang C, Zhang X, Teng Z, et al. Down regulation of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in curcumin-induced autophagy in APP/PS1 double transgenic mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 740: 312-320
- [32] Feng Guan, Youming Ding, Yemin Zhang, et al. Curcumin Suppresses Proliferation and Migration of MDA-MB-231 Breast Cancer Cells through Autophagy-Dependent Akt Degradation[J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0146553
- [33] Guangming Zhao, Xiaodong Han, Siwen Zheng, et al. Curcumin induces autophagy, inhibits proliferation and invasion by downregulating AKT/mTOR signaling pathway in human melanoma cells[J]. *Oncology Reports*, 2016, 35(2): 1065-1074
- [34] Deng Shu-wen, Yin Qing-hua, Su Qi. Influence of autophagic apoptosis induced by curcumin on human gastric carcinoma SGC7901 cells[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2012, 31
- [35] Xiong Er-meng, Gong Ai-hua, Jin Jie. Effects of curcumin combined with cisplatin on cell proliferation, autophagy and apoptosis in vitro hepatocellular carcinoma HepG2 cells [J]. *Jiangsu Medical Journal*, 2014, 01
- [36] Xu Ya-lai, Zhou Guang-zhou, Xia Xi-zheng. Curcumin analogs induce autophagy in A549 cells and inhibit proliferation [J]. *Chinese Journal of Oncology Prevention & Treatment*, 2013, 03
- [37] Cui H, Wu S, Shang Y, et al. Pleurotus nebrodensis polysaccharide (PN50G) evokes A549 cell apoptosis by the ROS/AMPK/PI3K/AKT/mTOR pathway to suppress tumor growth[J]. *Food Funct*, 2016 Mar, 7(3): 1616-1627