

瑞香素对胃癌细胞的抑制作用及其机制

朱春阳 赵淑芬 王艳 方媛媛 张思怡 齐卫卫

(青岛大学附属医院肿瘤科, 山东 青岛 266100)

[摘要] **目的** 探讨瑞香素(Dap)对胃癌细胞的抑制作用及其机制。**方法** 通过 MTT 实验检测浓度为 0、30、60、90、120、150 $\mu\text{mol/L}$ 的 Dap 处理胃癌 AGS 细胞 48 h 后对细胞存活率的影响。将 AGS 细胞分为 A~E 组, 分别用 0、30、60、90、120、150 $\mu\text{mol/L}$ 的 Dap 培养 48 h, 通过光镜和结晶紫染色观察各组细胞数量和细胞形态的变化情况。DCF 染色评估 Dap 对 A~D 组 AGS 细胞内活性氧(ROS)水平的影响。JC-1 染色评估 Dap 对 A~D 组 AGS 细胞内线粒体膜电位(MMP)水平的影响。采用 Western blot 实验检测 A~D 组 AGS 细胞内 LC3 和 P62 蛋白的表达水平。通过 Ad-mCherry-GFP-LC3B 染色检测 AGS 细胞内自噬流的变化。**结果** Dap 以浓度依赖性的方式显著抑制 AGS 细胞的存活率($F=321.50, t=12.44\sim 34.77, P<0.05$), 处理 48 h 时 AGS 细胞的 IC_{50} 约为 90 $\mu\text{mol/L}$ 。Dap 处理 48 h 后, 随 Dap 浓度的增加, A~E 组 AGS 细胞数量逐渐减少, 扭曲和皱缩形状的 AGS 细胞逐渐增多。随着 Dap 浓度的升高, A~D 组 AGS 细胞内 ROS 水平逐渐增高。C 和 D 组 AGS 细胞中 JC-1 绿色/红色荧光强度比值显著高于 A 组($F=10.92, t=3.09, 4.96, P<0.05$)。Western blot 实验结果表明, B~D 组与 A 组相比, 细胞内 LC3B/LC3A 比值显著增高($F=36.46, t=3.17\sim 9.78, P<0.05$), P62 的表达也显著升高($F=109.90, t=12.38\sim 16.78, P<0.05$)。Ad-mCherry-GFP-LC3B 染色发现, Dap 可抑制自噬小体与溶酶体的融合, 导致自噬流阻断。**结论** Dap 能够抑制胃癌细胞的增殖, 其作用机制可能与诱导胃癌细胞内 ROS 大量产生以及阻断自噬流有关。

[关键词] 胃肿瘤; 瑞香素; 自噬; 活性氧; 膜电位; 线粒体

[中图分类号] R735.2

[文献标志码] A

Inhibitory effect of daphnetin on gastric cancer cells and its mechanism ZHU Chunyang, ZHAO Shufen, WANG Yan, FANG Yuanyuan, ZHANG Siyi, QI Weiwei (Department of Oncology, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266100, China)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the inhibitory effect of daphnetin (Dap) on gastric cancer cells and its mechanism. **Methods** Gastric cancer AGS cells were treated with Dap at concentrations of 0, 30, 60, 90, 120, and 150 $\mu\text{mol/L}$, and the effect on cell viability was evaluated after 48 h using the MTT assay. AGS cells were divided into groups A to E, and each group was treated with Dap at concentrations of 0, 30, 60, 90, 120, and 150 $\mu\text{mol/L}$, respectively, for 48 h. Each group was observed for changes in cell count and morphology using optical microscopy and crystal violet staining. DCF staining was used to evaluate the effect of Dap on intracellular reactive oxygen species (ROS) levels in AGS cells in groups A to D, while JC-1 staining was used to evaluate the effect of Dap on the level of mitochondrial membrane potential (MMP) in AGS cells in groups A to D. Western blot was conducted to measure the expression levels of LC3 and P62 proteins in AGS cells in groups A to D, and changes in autophagic flux in AGS cells were measured by Ad-mCherry-GFP-LC3B staining. **Results** Dap significantly inhibited AGS cell viability in a concentration-dependent manner ($F=321.50, t=12.44\sim 34.77, P<0.05$), with an IC_{50} of approximately 90 $\mu\text{mol/L}$ at 48 h of treatment. After 48 h of Dap treatment, the number of AGS cells in groups A to E gradually decreased, and the number of twisted and wrinkled AGS cells gradually increased with the increase in Dap concentration. Intracellular ROS in AGS cells in groups A to D also gradually increased with the increase in Dap concentration. The ratio of JC-1 green/red fluorescence intensity in AGS cells in groups C and D was significantly higher than that in group A ($F=10.92, t=3.09, 4.96, P<0.05$). Western blot revealed that groups B to D had a significant increase in the ratio of LC3B/LC3A ($F=36.46, t=3.17\sim 9.78, P<0.05$) and in the expression of P62 ($F=109.90, t=12.38\sim 16.78, P<0.05$) compared to group A. Ad-mCherry-GFP-LC3B staining revealed that Dap inhibited the fusion of autophagosomes with lysosomes, resulting in the blockage of autophagic flux. **Conclusion** Dap can inhibit the proliferation of gastric cancer cells, and its mechanism of action may be related to inducing significant production of ROS within gastric cancer cells and blocking the autophagic flux.

[KEY WORDS] Stomach neoplasms; Daphnetin; Autophagy; Reactive oxygen species; Membrane potential, mitochondrial

胃癌是世界范围内常见的恶性肿瘤之一, 在所

有肿瘤中的发病率高居第五位^[1]。目前晚期胃癌患者的治疗方案仍是以化疗为主, 但化疗常会导致患者严重的不良反应和耐药性。因此, 亟需寻找治疗胃癌的有效新药物。

[收稿日期] 2024-03-26; **[修订日期]** 2024-05-17

[基金项目] 青岛大学附属医院青年科研基金(QDFYQN2021-01007)

[通讯作者] 齐卫卫, Email: qwwdz@qdu.edu.cn

瑞香素(Dap)是一种天然化合物,临床上常用于血栓闭塞性脉管炎和冠心病的辅助治疗^[2]。近几年研究还发现,其同时具有抗炎、抗缺氧、抗菌和抗肿瘤等多种药理作用^[3-5],特别是其抗肿瘤作用逐渐成为目前研究的重点。研究发现,Dap 可以通过调节 AMPK/Akt/mTOR 通路诱导卵巢癌 A2780 细胞内 ROS 水平升高,从而致细胞凋亡^[6];Dap 还可通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路诱导肝癌 Huh7 和 SK-HEP-1 细胞发生细胞周期阻滞以及细胞凋亡^[7];以 30 mg/kg 的 Dap 腹腔注射裸鼠皮下成瘤模型后,可显著抑制小鼠肿瘤的生长^[6]。但目前尚不清楚 Dap 对胃癌的发生发展是否同样具有抑制作用。本研究使用不同浓度的 Dap 处理胃癌 AGS 细胞,检测 Dap 对 AGS 细胞增殖、氧化还原内环境和自噬的影响,探讨 Dap 对 AGS 细胞的作用及其机制,旨在为胃癌的新药研发提供实验数据参考。

1 材料与方法

1.1 试剂

2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(DCF)、BCA 蛋白检测试剂盒、Ad-mCherry-GFP-LC3B 融合蛋白腺病毒购自上海碧云天生物技术有限公司,JC-1 试剂盒和 ECL 超敏化学发光试剂盒购自上海翌圣生物科技有限公司,P62(ab207305)和 LC3(ab192890)购买于英国 Abcam 公司,Dap(HY-N0281)、氯喹(HY-17589A)和雷帕霉素(HY-10219)购买于美国 MedChemExpress 公司。

1.2 细胞培养

人源胃癌细胞株 AGS 以及人正常胃黏膜细胞 GES1 购自中国科学院细胞研究所,分别使用相对应的细胞专用培养液(武汉普诺赛生命科技有限公司)置于 37 °C、含体积分数 0.05 的 CO₂、湿度充足的培养箱中,培养至对数生长期且生长状态良好时用于后续实验。

1.3 MTT 实验检测 Dap 对 AGS 和 GES1 细胞存活率的影响

将 Dap 粉末溶于二甲基亚砜(DMSO)中配成母液,分别用 AGS 和 GES1 细胞培养液配制成浓度为 0、30、60、90、120、150 μ mol/L 的 Dap 培养液。将培养至对数生长期并且生长状态良好的 AGS 和 GES1 细胞分别接种于 24 孔板中,培养 24 h 后弃去原培养液,分别加入上述不同浓度的 Dap 培养液 500 μ L,继续培养 48 h 以后。弃去原培养液,加入 500 μ L 的 MTT 工作液后放置于培养箱当中孵育

2 h。吸出 MTT 工作液,加入 300 μ L 的 DMSO 于摇床上震荡 3 min 混匀后,酶标仪测定波长 490 nm 处的吸光度值,计算细胞存活率。

1.4 光镜观察 Dap 对 AGS 细胞数量及形态的影响

将培养至对数生长期且生长状态良好的 AGS 细胞接种于 24 孔板中,分别加入浓度为 0、30、60、90、120、150 μ mol/L 的 Dap 培养液 500 μ L(A~F 组),培养 48 h 后弃去原培养液后用 PBS 清洗 2 次,于光学显微镜下观察细胞密度并拍照。拍照结束后将 AGS 细胞用 4%多聚甲醛固定 20 min,每孔加入 500 μ L 的结晶紫染色液,染色结束后在光学显微镜下观察细胞的形态并拍照。

1.5 DCF 染色检测 Dap 对于 AGS 细胞内活性氧(ROS)的影响

取接种于 6 孔板中培养 48 h 的 A~D 组细胞,弃去原培养液后每孔加入 1 mL 的 DCF 工作液,然后转移到培养箱内继续孵育 30 min,再用基础培养基清洗细胞 2 次,于荧光显微镜下观察细胞内 ROS 在绿色荧光通道下的染色情况并拍照。

1.6 JC-1 染色检测 Dap 对 AGS 细胞内线粒体膜电位(MMP)的影响

取接种于 6 孔板中培养 48 h 的 A~D 组细胞,弃去原培养液后每孔加入 1 mL 的 JC-1 染色工作液(10 μ mol/L),于培养箱中孵育 20 min 后用基础培养基清洗 2 次,使用荧光显微镜于相同视野下观察线粒体在红色和绿色荧光通道下染色情况并拍照。用 Image J 软件计算绿色/红色荧光强度比值,以绿色/红色荧光强度比值表示 MMP 变化情况。

1.7 Western blot 实验检测 Dap 对 AGS 细胞 LC3 和 P62 蛋白表达的影响

取接种于直径 10 cm 细胞培养皿中培养 48 h 的 A~D 组 AGS 细胞,弃去原培养液以后用 PBS 清洗 2 次。加入 RIPA 裂解液置于冰上裂解细胞 30 min,然后在 4 °C 条件下以 12 000 r/min 离心 10 min,收集蛋白上清液并通过 BCA 蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度。变性后的蛋白上清液使用聚丙烯酰胺凝胶电泳 1.5 h,随后在 290 mA 的条件下转膜 90 min,再用 5%的脱脂牛奶封闭 2 h。用 Tris-缓冲盐水和 Tween20 (TBST)清洗细胞 3 次,加入 P62 抗体(1 : 1 000 稀释)与 LC3 抗体(1 : 1 000 稀释)在 4 °C 摇床上孵育过夜。回收一抗后使用 TBST 清洗 3 次,加入相同种属的二抗(1 : 5 000 稀释)在室温下孵育 1.5 h。最后用 ECL 超敏化学发光试剂盒在凝胶成像系统上显影。使用 Image J 软件分析

LC3A、LC3B、P62 和 GAPDH 的灰度值,并计算相对表达量。实验重复 3 次,结果取均值。

1.8 以 Ad-mCherry-GFP-LC3B 染色检测 Dap 对 AGS 细胞内自噬流的影响

将培养至对数生长期且生长状态良好的 AGS 细胞接种于激光共聚焦培养皿中,每皿约 4 万个细胞,培养 24 h 后弃去原培养液,每皿加入新鲜的完全培养液 675 μL 和 Ad-mCherry-GFP-LC3B 腺病毒溶液 25 μL 感染 24 h,弃去原培养液,并使用 PBS 清洗细胞 1 次。将 AGS 细胞分为对照组、Dap 组、氯喹组和雷帕霉素组。对照组用 AGS 细胞专用培养液培养 48 h;Dap 组、氯喹组和雷帕霉素组分别加入浓度 90 $\mu\text{mol/L}$ 的 Dap 培养液、浓度 15 $\mu\text{mol/L}$ 的氯喹和浓度 5 $\mu\text{mol/L}$ 的雷帕霉素,培养 48 h。培养结束后用 PBS 清洗各组细胞 1 次,于激光共聚焦显微镜下观察 LC3B 在绿色和红色荧光通道下的染色情况并拍照。

1.9 统计学分析

使用 GraphPad Prism 8 对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 Dap 对细胞存活率的影响

0、30、60、90、120、150 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 Dap 处理 AGS 细胞 48 h,细胞存活率分别为 $(107.1 \pm 8.3)\%$ 、 $(76.3 \pm 5.6)\%$ 、 $(59.2 \pm 4.7)\%$ 、 $(48.2 \pm 3.3)\%$ 、

$(31.3 \pm 2.8)\%$ 、 $(21.1 \pm 1.6)\%$,各浓度组间比较差异具有显著性($F = 321.50, P < 0.05$),随着 Dap 浓度的升高,AGS 细胞的细胞存活率呈显著下降趋势($t = 12.44 \sim 34.77, P < 0.05$)。Dap 处理 AGS 细胞 48 h 时的 IC_{50} 值约为 90 $\mu\text{mol/L}$ 。上述不同浓度的 Dap 处理 GES1 细胞 48 h 后,GES1 细胞存活率分别为 $(100.1 \pm 0.9)\%$ 、 $(98.3 \pm 3.9)\%$ 、 $(93.1 \pm 1.6)\%$ 、 $(91.8 \pm 0.7)\%$ 、 $(91.8 \pm 3.7)\%$ 、 $(91.4 \pm 2.9)\%$,各浓度组的细胞存活率均在 90% 以上。

2.2 不同浓度 Dap 对 AGS 细胞数量及细胞形态的影响

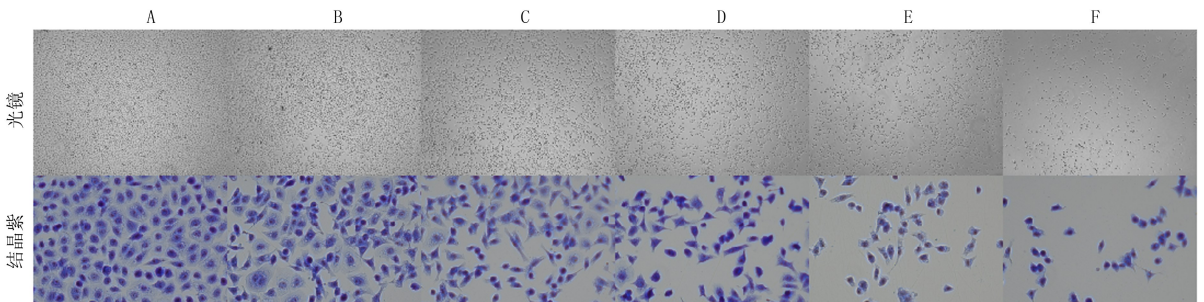
光镜下观察结果显示,随 Dap 浓度的增加,A~F 组 AGS 细胞数量逐渐减少。结晶紫染色结果显示,A~F 组 AGS 细胞的形态逐渐发生变化,随着 Dap 浓度增加,形状不规则、扭曲、皱缩的 AGS 细胞逐渐增多。见图 1。综合上面的实验结果,采用 0、30、60 及 90 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 Dap 用于后续实验。

2.3 不同浓度 Dap 对 AGS 细胞内 ROS 的影响

荧光显微镜观察结果显示,随着 Dap 浓度的升高,A~D 组 AGS 细胞内 ROS 水平逐渐增高,与 Dap 浓度呈正相关,见图 2,图中绿色荧光为染色的 ROS。

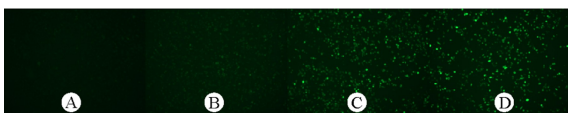
2.4 不同浓度 Dap 对 AGS 细胞 MMP 的影响

A~D 组 AGS 细胞中 JC-1 绿色/红色荧光强度比值分别为 0.08 ± 0.04 、 0.17 ± 0.09 、 0.68 ± 0.27 、 1.04 ± 0.37 ,各组间比较差异具有显著意义($F = 10.92, P < 0.05$),其中 C 和 D 组显著高于 A 组($t = 3.09, 4.96, P < 0.05$)。见图 3。



A~F 分别表示 A~F 组;光镜观察(40 倍),结晶紫染色(400 倍)

图 1 不同浓度 Dap 对 AGS 细胞数量和形态的影响



A~D 分别表示 A~D 组,100 倍

图 2 A~D 组 AGS 细胞内 ROS 荧光染色结果

2.5 不同浓度 Dap 对 AGS 细胞内 LC3 和 P62 蛋

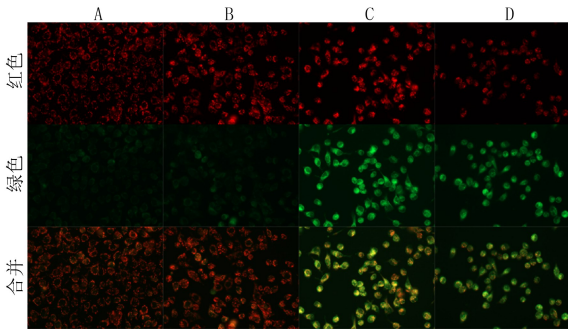
白表达的影响

Western blot 实验结果显示,A~D 组 AGS 细胞中 LC3B/LC3A 比值分别为 0.01 ± 0.00 、 0.35 ± 0.11 、 0.73 ± 0.14 、 1.04 ± 0.17 ,各组间比较差异有显著性($F = 36.46, P < 0.05$),其中 B、C、D 组均显著高于 A 组($t = 3.17 \sim 9.78, P < 0.05$);A~D 组 AGS

细胞中 P62 蛋白的相对表达量分别为 0.07 ± 0.01 、 0.75 ± 0.08 、 0.83 ± 0.06 、 0.99 ± 0.07 ，各组间比较差异具有显著性 ($F = 109.90, P < 0.05$)，其中 B、C、D 组均显著高于 A 组 ($t = 12.38 \sim 16.78, P < 0.05$)。见图 4。

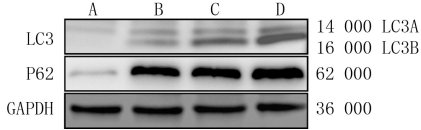
2.6 以 Ad-mCherry-GFP-LC3B 染色检测 Dap 对 AGS 细胞内自噬流的影响

激光共聚焦显微镜下观察 Ad-mCherry-GFP-LC3B 染色结果示，雷帕霉素组中 LC3B 红绿荧光染色结果合并后为红色荧光，氯喹组中 LC3B 红绿荧光染色结果合并后黄色荧光增加而红色荧光减少，Dap 组中 LC3B 红绿荧光染色结果合并后黄色荧光显著增加而红色荧光显著减少。与氯喹组相比，Dap 组黄色荧光更多。见图 5。



A~D 分别表示 A~D 组

图 3 AGS 细胞 JC-1 染色结果 (400 倍)



A~D 分别表示 A~D 组

图 4 AGS 细胞中 LC3 和 P62 蛋白表达情况

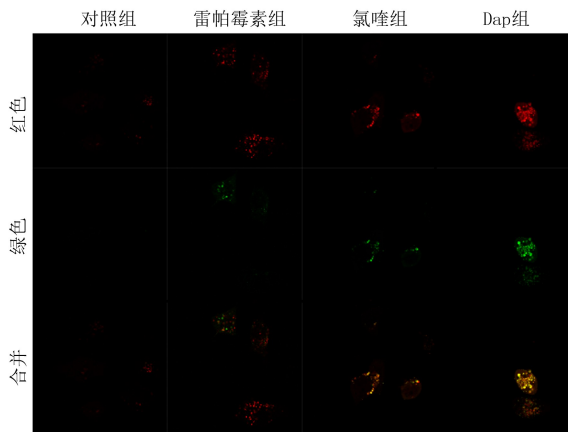


图 5 AGS 细胞 Ad-mCherry-GFP-LC3B 染色结果 (1 000 倍)

3 讨 论

胃癌是世界范围内的常见恶性肿瘤之一。含铂类似物的化疗方案，如顺铂和奥沙利铂，仍然是晚期

胃癌患者常用的化疗方案^[8]。但长期使用这些药物会致患者产生耐药性，从而降低疗效。许多研究显示源自植物的天然化合物对肿瘤细胞具有显著的抑制作用^[9]。Dap 是一种从长白瑞香中分离提取的香豆素衍生物，具有抑制肝癌、卵巢癌、肾癌等多种恶性肿瘤细胞增殖、迁移以及促进肿瘤细胞凋亡的作用^[10]。但是 Dap 对胃癌的作用鲜有研究，本研究旨在观察 Dap 是否具有抑制胃癌细胞增殖的作用，并探究其作用机制。

本研究显示，0、30、60、90、120、150 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 Dap 处理胃癌 AGS 细胞 48 h，随着 Dap 浓度的升高，AGS 细胞的细胞存活率呈显著性下降的趋势，即 Dap 对细胞活性的抑制程度与 Dap 浓度呈正相关，计算 Dap 处理 AGS 细胞 48 h 时的 IC_{50} 约为 90 $\mu\text{mol/L}$ 。而 0~150 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 Dap 处理人正常胃黏膜上皮 GES1 细胞 48 h 以后，各浓度组的细胞存活率均在 90% 以上，提示人正常胃黏膜上皮 GES1 细胞在该实验浓度范围内安全耐受。随后，本研究进一步观察上述不同浓度 Dap 对 AGS 细胞数量和形态的影响，结果显示，随着 Dap 浓度的增加，AGS 细胞数量逐渐减少，不规则、扭曲和皱缩形状的 AGS 细胞逐渐增多。癌细胞的增殖和迁移能力与细胞形态密切相关^[11]，因此本研究结果提示 Dap 能够显著抑制 AGS 细胞增殖和迁移。

本研究又对 Dap 抑制 AGS 细胞增殖的机制进行了探索，结果显示，当 0、30、60、90 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 Dap 处理 AGS 细胞 48 h，随着 Dap 浓度的升高，AGS 细胞内 ROS 水平逐渐增高，并且与 Dap 浓度呈正相关，说明 Dap 能够诱导胃癌细胞内产生大量的 ROS。细胞内过量的 ROS 会对细胞产生致命的细胞毒性作用^[12]。FAN 等^[6]的研究亦显示，经 Dap 处理以后的卵巢癌 A2780 细胞内也产生了大量的 ROS，并抑制了卵巢癌 A2780 细胞的增殖，与本研究结果一致。本研究 JC-1 染色显示，浓度为 60 和 90 $\mu\text{mol/L}$ 的 Dap 处理 AGS 细胞 48 h，细胞内 MMP 的绿色荧光与红色荧光比值显著增加，说明 Dap 能导致 AGS 细胞内 MMP 水平下降。过量的 ROS 可降低 MMP 水平和损伤线粒体功能，从而导致癌细胞死亡^[13]。研究发现银胶菊素通过降低胰腺癌 PANC-1 细胞内 MMP 水平，诱导 PANC-1 细胞发生凋亡^[14]。

研究发现，细胞内 ROS 过度产生和 MMP 水平下降与细胞的自噬密切相关^[15]，由此推测 Dap 可能对细胞自噬也有影响。自噬的发生发展包含以下 5

个阶段:隔离膜的起始诱导、隔离膜的延伸、自噬小体的成熟和运输、自噬小体与溶酶体的融合、自噬溶酶体内容物的降解^[16],该过程被称为自噬流。当自噬流的 5 个阶段顺利进行时,细胞内 LC3B/LC3A 蛋白比值增加而 P62 蛋白下降^[17]。本研究当以 0、30、60、90 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 Dap 处理 AGS 细胞 48 h, Western blot 实验结果显示,随着 Dap 浓度的升高, AGS 细胞内 LC3B/LC3A 蛋白比值逐渐增加,且与 Dap 浓度呈正相关,说明 Dap 诱导 AGS 细胞内自噬小体增加。同时本研究结果还显示,与对照组相比,以 30、60、90 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 Dap 处理 AGS 细胞 48 h,细胞内 P62 蛋白的表达也显著增加。P62 和 LC3B/LC3A 表达同时上调是晚期自噬流阻断的标志^[18]。WANG 等^[19]研究发现,重楼皂苷是通过阻断肝癌 Hep3B 细胞晚期自噬流,以抑制细胞的增殖,同样表现为 P62 和 LC3B/LC3A 蛋白表达同时上调,与本研究结果一致。

如果自噬小体与溶酶体不能正常融合,这种情况被称为自噬流阻断^[20]。研究表明,阻断癌细胞内自噬流可导致细胞内代谢失衡和自噬体的异常积累,最终导致细胞死亡^[18]。氯喹作为公认的晚期自噬抑制剂,通过阻断自噬小体与溶酶体的融合发挥自噬流阻断的作用^[21]。WANG 等^[22]研究发现,氯喹以剂量依赖性的方式显著抑制急性骨髓性白血病 MV-4-11 细胞自噬晚期自噬小体与溶酶体的融合,对 MV-4-11 细胞的增殖具有明显的抑制作用。雷帕霉素是一种常用的自噬诱导剂^[23]。既往研究发现,雷帕霉素可诱导子宫内膜癌 HEC1A 细胞发生自噬^[24]。本研究通过 Ad-mCherry-GFP-LC3B 染色检测 AGS 细胞自噬流的进展情况,这种染色方法是基于溶酶体内部的低 pH 值淬灭了 GFP 的绿色荧光,而 mCherry 在酸性环境中表现出稳定的红色荧光。因此,自噬小体和溶酶体顺利融合时,GFP 在溶酶体酸性环境中淬灭而红色荧光稳定存在,共定位表现出红色荧光。相反,如果自噬小体和溶酶体未能顺利融合,则红色和绿色荧光同时存在,共定位以后表现为黄色荧光。本研究采用 Ad-mCherry-GFP-LC3B 进行染色,结果显示,雷帕霉素组显示为红色荧光,而氯喹组和 Dap 组表现为黄色荧光数量增加,提示 Dap 发挥了与氯喹相似的作用,即抑制了 AGS 细胞内自噬小体与溶酶体的融合,从而阻断了自噬流。

综上所述,Dap 具有抑制胃癌增殖的能力,作用机制可能与诱导细胞内产生大量 ROS 和阻断自噬

晚期的自噬小体与溶酶体融合有关。本研究为 Dap 的临床应用提供了实验参考。

作者声明:朱春阳、齐卫卫、赵淑芬参与了研究设计;朱春阳、王艳、方媛媛、张思怡参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文,且均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] SIEGEL R, MILLER K, WAGLE N S, et al. Cancer statistics, 2023[J]. CA A Cancer J Clin, 2023,73:17-48.
- [2] HANG S J, WU W H, WANG Y N, et al. Daphnetin, a coumarin in genus stelleria chamaejasme linn: Chemistry, bioactivity and therapeutic potential[J]. Chem Biodivers, 2022,19(9):e202200261.
- [3] JIMÉNEZ-OROZCO F A, RANDELOVIĆ I, HEGEDŰS Z, et al. *In vitro* anti-proliferative effect and *in vivo* antitumor action of daphnetin in different tumor cells[J]. Cir Cir, 2020,88(6):765-771.
- [4] 陈三洋,余起文,宋耀东,等. 瑞香素激活 Keap1/NRF2 通路减轻小鼠肝脏缺血再灌注损伤的实验研究[J]. 中国现代普通外科进展, 2023,9(3):175-178,183.
- [5] 赵敏,谢丽华,逯琴. 瑞香素通过抑制 TXNIP/NLRP3 信号通路来减轻 OGD/R 诱导的海马神经元炎症反应和凋亡[J]. 卒中与神经疾病, 2022,8(6):503-510.
- [6] FAN X Y, XIE M, ZHAO F J, et al. Daphnetin triggers ROS-induced cell death and induces cytoprotective autophagy by modulating the AMPK/Akt/mTOR pathway in ovarian cancer[J]. Phytomedicine, 2021,82:153465.
- [7] LIU C H, PAN J S, LIU H Y, et al. Daphnetin inhibits the survival of hepatocellular carcinoma cells through regulating Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. Drug Dev Res, 2022,83(4):952-960.
- [8] GUAN W L, HE Y, XU R H. Gastric cancer treatment: Recent progress and future perspectives[J]. J Hematol Oncol, 2023,16(1):57.
- [9] TEWARI D, PATNI P, BISHAYEE A, et al. Natural products targeting the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway in cancer: A novel therapeutic strategy [J]. Semin Cancer Biol, 2022,80:1-17.
- [10] JAVED M, SALEEM A, XAVERIA A, et al. Daphnetin: A bioactive natural coumarin with diverse therapeutic potentials [J]. Front Pharmacol, 2022,13:993562.
- [11] FONTANA R, MESTRE-FARRERA A, YANG J. Update on epithelial-mesenchymal plasticity in cancer progression[J]. Annu Rev Pathol, 2024,19:133-156.
- [12] AZMANOVA M, PITTO-BARRY A. Oxidative stress in cancer therapy: Friend or enemy? [J]. ChemBiochem, 2022, 23(10):e202100641.
- [13] SRINIVAS U S, TAN B W Q, VELLAYAPPAN B A, et al. ROS and the DNA damage response in cancer[J]. Redox Biol, 2019,25:101084.

s10143-019-01096-2.

- [9] MITTAL A M, PEASE M, MCCARTHY D, et al. Hunt-Hess score at 48Hours improves prognostication in grade 5 aneurysmal subarachnoid hemorrhage[J]. *World Neurosurg*, 2023,171:e874-e878.
- [10] GREVING J P, WERMER M J, BROWN R D Jr, et al. Development of the PHASES score for prediction of risk of rupture of intracranial aneurysms: A pooled analysis of six prospective cohort studies[J]. *Lancet Neurol*, 2014,13(1):59-66.
- [11] LIM Y C, KIM B M, SHIN Y S, et al. Structural limitations of currently available microcatheters and coils for endovascular coiling of very small aneurysms[J]. *Neuroradiology*, 2008,50(5):423-427.
- [12] GUPTA V, CHUGH M, JHA A N, et al. Coil embolization of very small (2 mm or smaller) berry aneurysms: Feasibility and technical issues[J]. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2009,30(2):308-314.
- [13] ZHANG J F, WANG D H, LI X G. Solitaire AB stent-assisted coiling embolization for the treatment of ruptured very small intracranial aneurysms[J]. *Exp Ther Med*, 2015,10(6):2239-2244.
- [14] WU P, OCAK P E, WANG D H, et al. Endovascular treatment of ruptured tiny intracranial aneurysms with low-profile visualized intraluminal support device[J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2019,28(2):330-337.
- [15] JINDAL G, MILLER T, IYOHE M, et al. Small intracranial

aneurysm treatment using target (©) ultrasoft™ coils[J]. *J Vasc Interv Neurol*, 2016,9(1):46-51.

- [16] JIA Z Y, LEE S H, KIM Y E, et al. Optimal guiding catheter length for endovascular coiling of intracranial aneurysms in anterior circulation in era of flourishing distal access system[J]. *Neurointervention*, 2017,12(2):91-99.
- [17] YAMAKI V N, BRINJIKJI W, MURAD M H, et al. Endovascular treatment of very small intracranial aneurysms: Meta-analysis[J]. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2016,37(5):862-867.
- [18] VAN ROOIJ W J, KEEREN G J, PELUSO J P P, et al. Clinical and angiographic results of coiling of 196 very small (< or = 3 mm) intracranial aneurysms[J]. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2009,30(4):835-839.
- [19] JOHNSTON S C. Leaving tiny, unruptured intracranial aneurysms untreated: Why is it so hard? [J]. *JAMA Neurol*, 2018,75(1):13-14.
- [20] 黄清海, 裴景浩, 吕楠, 等. 支架半释放技术辅助弹簧圈栓塞治疗破裂的颅内微小动脉瘤[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2013,18(6):325-327,331.
- [21] RUSSELL S M, LIN K, HAHN S A, et al. Smaller cerebral aneurysms producing more extensive subarachnoid hemorrhage following rupture: A radiological investigation and discussion of theoretical determinants[J]. *J Neurosurg*, 2003,99(2):248-253.

(本文编辑 范睿心 厉建强)

(上接第 332 页)

- [14] GÜÇLÜ E, ÇNAR AYANI, DURSUN H G, et al. Tomentosin induces apoptosis in pancreatic cancer cells through increasing reactive oxygen species and decreasing mitochondrial membrane potential[J]. *Toxicol In Vitro*, 2022,84:105458.
- [15] DONG L X, HE J Q, LUO L, et al. Targeting the interplay of autophagy and ROS for cancer therapy: An updated overview on phytochemicals[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2023,16(1):92.
- [16] YU L, CHEN Y, TOOZE S A. Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms[J]. *Autophagy*, 2018,14(2):207-215.
- [17] ESMAEILI Y, YARJANLI Z, PAKNIYA F, et al. Targeting autophagy, oxidative stress, and ER stress for neurodegenerative disease treatment[J]. *J Control Release*, 2022,345:147-175.
- [18] ZHANG Q, CAO S J, QIU F, et al. Incomplete autophagy: Trouble is a friend[J]. *Med Res Rev*, 2022,42(4):1545-1587.
- [19] WANG Y, CHEN Y Y, GAO G B, et al. Polyphyllin D punctures hypertrophic lysosomes to reverse drug resistance of he-

patocellular carcinoma by targeting acid sphingomyelinase[J]. *Mol Ther*, 2023,31(7):2169-2187.

- [20] ZHAO Y G, CODOGNO P, ZHANG H. Machinery, regulation and pathophysiological implications of autophagosome maturation[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021,22(11):733-750.
- [21] SHI T T, YU X X, YAN L J, et al. Research progress of hydroxychloroquine and autophagy inhibitors on cancer[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2017,79(2):287-294.
- [22] WANG H L, LI J N, KAN W J, et al. Chloroquine enhances the efficacy of chemotherapy drugs against acute myeloid leukemia by inactivating the autophagy pathway[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2023,44(11):2296-2306.
- [23] RANGARAJU S, VERRIER J D, MADORSKY I, et al. Rapamycin activates autophagy and improves myelination in explant cultures from neuropathic mice[J]. *J Neurosci*, 2010,30(34):11388-11397.
- [24] VENKATA P P, CHEN Y H, ALEJO S, et al. KDM1A inhibition augments the efficacy of rapamycin for the treatment of endometrial cancer[J]. *Cancer Lett*, 2022,524:219-231.

(本文编辑 耿波)