

# 圣草酚调控 Akt/mTOR 通路对胶质瘤细胞自噬的影响

刘庆龙<sup>1</sup>, 郑相如<sup>2</sup>, 李文军<sup>1\*</sup>, 刘松青<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>重庆医科大学附属第三医院药剂科; <sup>2</sup>重庆医科大学附属第三医院肝胆胰外科, 重庆 401120

**摘要:**为研究圣草酚对胶质瘤细胞自噬的影响,探讨其通过调控 Akt/mTOR 通路在胶质瘤自噬过程中的作用。本研究采用 CCK8 和细胞克隆形成实验检测圣草酚对胶质瘤细胞增殖的影响。构建 GFP-mRFP-LC3B 稳定表达的细胞株,圣草酚(100  $\mu\text{mol/L}$ )处理 48 h,观察自噬小体的形成情况;然后分别用圣草酚(100  $\mu\text{mol/L}$ )、雷帕霉素(200 nmol/L)以及圣草酚(100  $\mu\text{mol/L}$ ) + 雷帕霉素(200 nmol/L)处理 48 h 后观察自噬流的情况。利用蛋白免疫印迹法检测圣草酚对自噬及 Akt/mTOR 通路相关蛋白表达水平的影响。建立裸鼠皮下移植瘤模型,观察圣草酚在体内对胶质瘤自噬过程的影响。实验结果显示,圣草酚能够显著抑制胶质瘤细胞的增殖,且呈时间-剂量依赖性( $P < 0.05$ )。圣草酚使胶质瘤细胞中绿色自噬小体明显增多,LC3 II、Beclin 1、ATG5 蛋白表达上调。圣草酚处理 GFP-mRFP-LC3B 稳转细胞株 48 h 后呈亮黄色,且减弱了雷帕霉素对自噬流的促进作用,并上调 P62 蛋白的表达。此外,圣草酚可抑制 p-Akt、p-mTOR 的表达,但该作用被 Akt 激动剂 740 Y-P 逆转。体内实验结果同体外一致。说明圣草酚能够抑制胶质瘤细胞的增殖和自噬流,其影响自噬过程的作用机制可能与下调 Akt/mTOR 通路有关。

**关键词:**圣草酚;胶质瘤;自噬;增殖;Akt/mTOR

中图分类号:R962

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2023)1-0013-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.1.002

## Effect of eriodictyol on autophagy in glioma cells via Akt/mTOR signaling pathway

LIU Qing-long<sup>1</sup>, ZHENG Xiang-ru<sup>2</sup>, LI Wen-jun<sup>1\*</sup>, LIU Song-qing<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacy, the Third Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

<sup>2</sup>Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, the Third Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 401120, China

**Abstract:** This study was designed to investigate the effect of eriodictyol on glioma cell autophagy and its role in glioma autophagy by regulating the Akt/mTOR pathway. In this essay, CCK-8 assay and colony formation were conducted to evaluate the effects of eriodictyol on proliferation. The glioma cell lines with stable GFP-mRFP-LC3B expression were constructed to observe the autophagic flux. After treatment of eriodictyol (100  $\mu\text{mol/L}$ ) for 48 h, autophagosomes were observed by fluorescent microscopy. Then, respectively treated with eriodictyol (100  $\mu\text{mol/L}$ ), rapamycin (200 nmol/L), or eriodictyol (100  $\mu\text{mol/L}$ ) + rapamycin (200 nmol/L) for 48 h, glioma cell lines were observed using fluorescent microscopy to ensure autophagic flux. The autophagy and AKT/mTOR pathway-related proteins were detected by immunoblotting. Moreover, A model of glioma subcutaneously transplant in nude mice was constructed to study the effects of eriodictyol on the autophagy of glioma *in vivo*. The results showed that the proliferation of glioma cells was significantly inhibited by eriodictyol in a dose and time-dependent manner ( $P < 0.05$ ). The formation of autophagosome and the expressions of LC3 II, Beclin 1, ATG5 proteins were enhanced by eriodictyol. After treatment with eriodictyol, the glioma cells expressing GFP-mRFP-LC3B appeared bright yellow. Eriodictyol weakened the effect of rapamycin on autophagic flux and increased P62 expression in glioma cells. Furthermore, the inhibition of p-Akt and p-mTOR proteins by eriodictyol in glioma cells was rescued by Akt agonist 740 Y-P. *In vivo*, similar results were obtained as *in vitro*. In summary, the proliferation and autophagic flux in glioma cells was inhibited by eriodictyol.

收稿日期:2022-07-25

接受日期:2022-12-29

基金项目:重庆市应用创新与应用发展专项面上项目(cstc2020jcsx-mxm0123);重庆市自然科学基金(cstc2020jcyj-msxm0371)

\*通信作者 Tel:86-018523582870; E-mail:liwenjun0928@outlook.com, liusq@hospital.cqmu.edu.cn

The mechanism of eriodictyol affecting autophagy might be through the downregulation of Akt/mTOR pathway.

**Key words:** eriodictyol; glioma; autophagy; proliferation; Akt/mTOR

胶质瘤 (glioblastoma multiforme, GBM) 是中枢神经系统中最常见的恶性肿瘤,其恶性程度高,具有高侵袭性,即便采用手术加放化疗的综合治疗后仍面临复发与转移的风险<sup>[1]</sup>。替莫唑胺 (temozolomide, TMZ) 是临床上的一线抗胶质瘤药物。然而,由于其严重的不良反应如血液毒性等,这大大限制了 TMZ 的临床使用,严重影响了疗效<sup>[2]</sup>。因此,寻求高效、低毒的新型抗胶质瘤药物具有重要意义。

自噬作为一种细胞程序性死亡方式,是一个动态降解和循环系统<sup>[3]</sup>。自噬是一个动态过程,包含吞噬泡 (phagophore), 自噬小体 (autophagosome) 以及自噬溶酶体 (autolysosome) 三种状态<sup>[4]</sup>。近年来研究发现,细胞自噬的异常与肿瘤发生发展密切相关<sup>[5]</sup>。在胶质瘤中,自噬的异常调控可促进肿瘤的生长,而通过干预细胞自噬可导致胶质瘤细胞死亡进而遏制肿瘤的进展。因此,以自噬为靶点探寻新的胶质瘤治疗手段是极具潜力的研究方向<sup>[6]</sup>。

圣草酚 (eriodictyol, ERD) 化学结构见图 1, 是一种天然的可食用黄酮,广泛存在于蔬菜和水果中,尤其在柑橘类水中含量最为丰富。研究表明圣草酚具有多种药理作用,包括抗氧化、抗炎、抗肿瘤等<sup>[7]</sup>。我们前期研究发现,圣草酚能够诱导胶质瘤细胞凋亡并抑制其转移,但其对自噬的作用目前尚未研究<sup>[8,9]</sup>。本研究旨在通过实验探讨圣草酚对胶质瘤细胞增殖和自噬的影响,并进一步研究可能的分子机制,为阐明圣草酚抗胶质瘤药理作用机制提供基础。

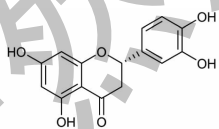


图 1 ERD 的化学结构

Fig. 1 Structure of ERD

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞

人胶质瘤细胞 U87-MG 和 CHG-5 (上海中桥新舟生物科技有限公司)。

### 1.2 动物

4~6 周龄 SPF 级 BALB/c 裸鼠,雌性,体重 17~20 g,购自北京华阜康生物技术股份有限公司

[SCXK(京)2014-0004], 饲养于重庆医科大学动物实验中心。所有动物实验均通过重庆医科大学动物伦理委员会审批 (2020013 号)。

### 1.3 药品与试剂

ERD, 纯度  $\geq 98\%$ , 由美国 Syntech International 公司馈赠; Beclin1、LC3 II、ATG5、P62、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR 以及  $\beta$ -actin 抗体 (美国 Proteintech 公司, Cat. No. 11306-1-AP、14600-1-AP、10181-2-AP、18420-1-AP、60203-2-Ig、66444-1-Ig、66888-1-Ig、67778-1-Ig、66009-1-Ig); Cell Counting Kit-8 (CCK-8) (美国 Bimake 公司, Cat. No. B34304); GFP-mRFP-LC3B 双荧光质粒 (上海海吉浩格生物科技有限公司, Cat. No. 5820); DMEM 培养基、胎牛血清 (以色列 Biological Industries 公司, Cat. No. 06-1055-57-1A、04-010-1A)。

### 1.4 仪器

光学倒置显微镜、倒置荧光显微镜 (日本 Nikon 公司); 蛋白凝胶电泳和转印系统 (美国 Bio-Rad 公司); 凝胶成像分析系统 (美国 LI-COR Biosciences 公司); 酶标仪 (美国 Bio-tek 公司)。

### 1.5 方法

#### 1.5.1 细胞培养

U87-MG 和 CHG-5 细胞用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素与 100  $\mu$ g/mL 链霉素的 DMEM 培养基置于 37  $^{\circ}$ C, 5%  $\text{CO}_2$  培养箱内培养, 取对数生长期的细胞进行后续实验。

#### 1.5.2 裸鼠皮下移植瘤模型的建立与给药

将人胶质瘤细胞 U87-MG 接种于裸鼠右臀皮下, 建立皮下移植瘤模型。待肿瘤体积生长至 50  $\text{mm}^3$  左右时, 将裸鼠随机分为 4 组, 即对照组 (CON)、50 mg/kg ERD 组、100 mg/kg ERD 组以及 200 mg/kg ERD 组, 每组 5 只。各给药组腹腔注射相应剂量的 ERD, CON 组注射同体积溶剂, 每日一次, 每 3 日测量裸鼠体重及肿瘤体积, 连续给药 3 周后处死小鼠。

#### 1.5.3 CCK-8 法检测细胞活力

将 U87-MG 和 CHG-5 细胞以  $3 \times 10^3$  的密度种植于 96 孔板中, 待细胞贴壁后, ERD (0~400  $\mu$ mol/L) 处理 24、48、72 h 后使用 CCK-8 检测细胞活力。

#### 1.5.4 克隆形成实验

将 U87-MG 和 CHG-5 细胞以 500 个每孔接种

于24孔板中,待细胞贴壁后,ERD(0~100  $\mu\text{mol/L}$ )处理12天,多聚甲醛固定,结晶紫染色、拍照、计数、统计分析。

### 1.5.5 GFP-mRFP-LC3B 稳转细胞株的构建

将约  $5 \times 10^4$  个293T细胞种植于6 cm培养皿中,次日替换新鲜培养基,加入8  $\mu\text{L}$  Lipo8000 转染试剂,psPAX2 质粒800 ng,pMD2. G 质粒200 ng 以及GFP-mRFP-LC3B 质粒1  $\mu\text{g}$  培养过夜。次日,替换新鲜培养基,72 h后收集293T细胞培养基,过滤得到病毒液。

将U87-MG和CHG-5细胞以  $1 \times 10^4$  的密度种植于24孔板中。次日,将培养基替换为收集的病毒液,并加入0.5  $\mu\text{L}$  Polybrene 转染试剂,转染72 h,将病毒液替换为含2  $\mu\text{g/mL}$  嘌呤霉素的新鲜培养基筛选得到稳转细胞株。

### 1.5.6 荧光显微镜观察圣草酚对胶质瘤细胞自噬小体与自噬流的影响

将GFP-mRFP-LC3B 稳转的U87-MG和CHG-5细胞分为对照组(CON)和ERD组,以  $1 \times 10^4$  的密度种植于24孔板中,ERD组加入含有100  $\mu\text{mol/L}$  ERD的完全培养基,培养48 h,CON组为不含药的完全培养基。48 h后观察绿色荧光的自噬小体的密度。

将GFP-mRFP-LC3B 稳转的U87-MG和CHG-5

细胞以  $1 \times 10^4$  的密度种植于24孔板中。分别加入不含药的完全培养基及含有ERD(100  $\mu\text{mol/L}$ )、雷帕霉素(rapamycin, RAP, 200 nmol/L)和ERD + RAP的培养基处理细胞48 h,荧光显微镜观察荧光颜色的变化。

### 1.5.7 Western blot 检测自噬及 Akt/mTOR 通路相关蛋白的表达

将处于对数生长期的U87-MG和CHG-5细胞消化,接种于6 cm皿中,待细胞贴壁后,给与ERD处理48 h。细胞蛋白/动物组织,裂解,定量,凝胶电泳,转膜,封闭,4  $^{\circ}\text{C}$  孵育一抗过夜,洗膜,室温孵育二抗2 h,显影。

## 1.6 统计分析

用Graphpad prism 8.0软件进行统计分析,计量资料用均值  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较用Dunnet-t检验,多组间比较采用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 ERD 抑制胶质瘤细胞 U87-MG 和 CHG-5 活力

将不同浓度的ERD(0、25、50、100、200、400  $\mu\text{mol/L}$ )与U87-MG和CHG-5细胞分别共培养24、48、72 h,CCK-8结果显示,两种细胞的细胞活力被抑制,且呈剂量—时间依赖性(见图2A)。后续实验选用0、25、50、100  $\mu\text{mol/L}$  处理细胞。

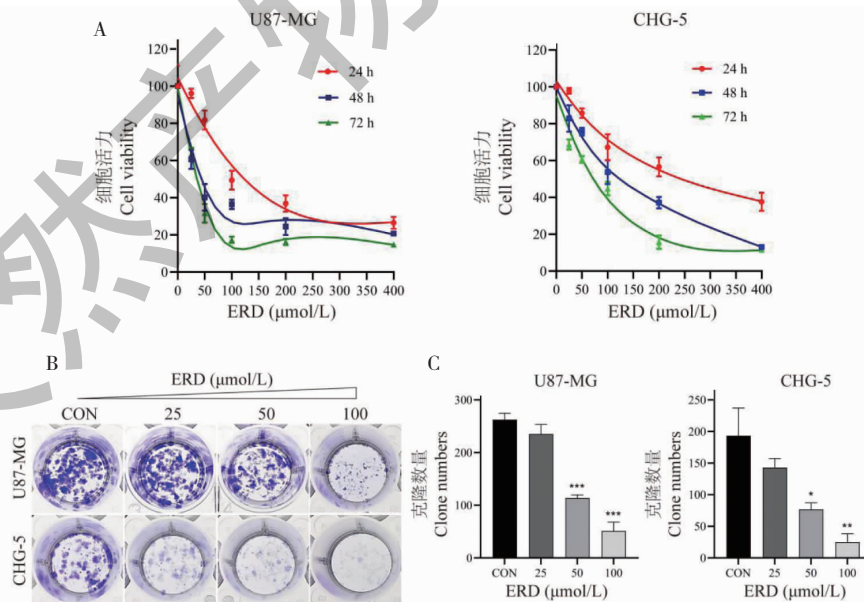


图2 ERD对胶质瘤细胞活力与克隆形成的影响

Fig. 2 The effect of ERD on the viability and clone formation of glioma cells

注:与CON组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ 。Note:Compared with the CON group,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ 。

## 2.2 ERD 抑制胶质瘤细胞 U87-MG 和 CHG-5 克隆形成

不同浓度 ERD 与 U87-MG 和 CHG-5 细胞共培养后,随着 ERD 浓度增加,细胞克隆数量显著减少,用 ImageJ 软件对克隆细胞数量统计分析发现差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),说明 ERD 能有效抑制胶质瘤细胞的克隆形成(见图 2B、2C)。

## 2.3 ERD 促进胶质瘤细胞 U87-MG 和 CHG-5 自噬小体的形成

胶质瘤细胞经 ERD 处理 48 h 后,使用荧光显微镜( $\times 400$ )观察发现与空白对照相比绿色的荧光蛋白 LC3B 明显增多(见图 3A)。Western blot 检测发现,随着 ERD 浓度增加,自噬相关蛋白 ATG5、Be-

clin1 和 LC3 II 的表达水平升高(见图 3B),以上结果提示,ERD 能够显著升高胶质瘤细胞中自噬体的数量。

## 2.4 ERD 抑制胶质瘤细胞 U87-MG 和 CHG-5 的自噬流

ERD(100  $\mu\text{mol/L}$ )、RAP(200 nmol/L)和 ERD + RAP 处理 GFP-mRFP-LC3B 稳转胶质瘤细胞 48 h 后,荧光显微镜( $\times 400$ )观察发现圣草酚使合并后显黄色荧光,且使 RAP 处理后合并的红色荧光减弱,而黄色荧光增加(见图 4A)。另外,Western blot 检测发现,ERD 使 P62 的表达增加,而 RAP 部分逆转了 ERD 的作用(见图 4B、4C)。这提示 ERD 阻碍了自噬体与溶酶体的融合,抑制了胶质瘤细胞的自噬流。

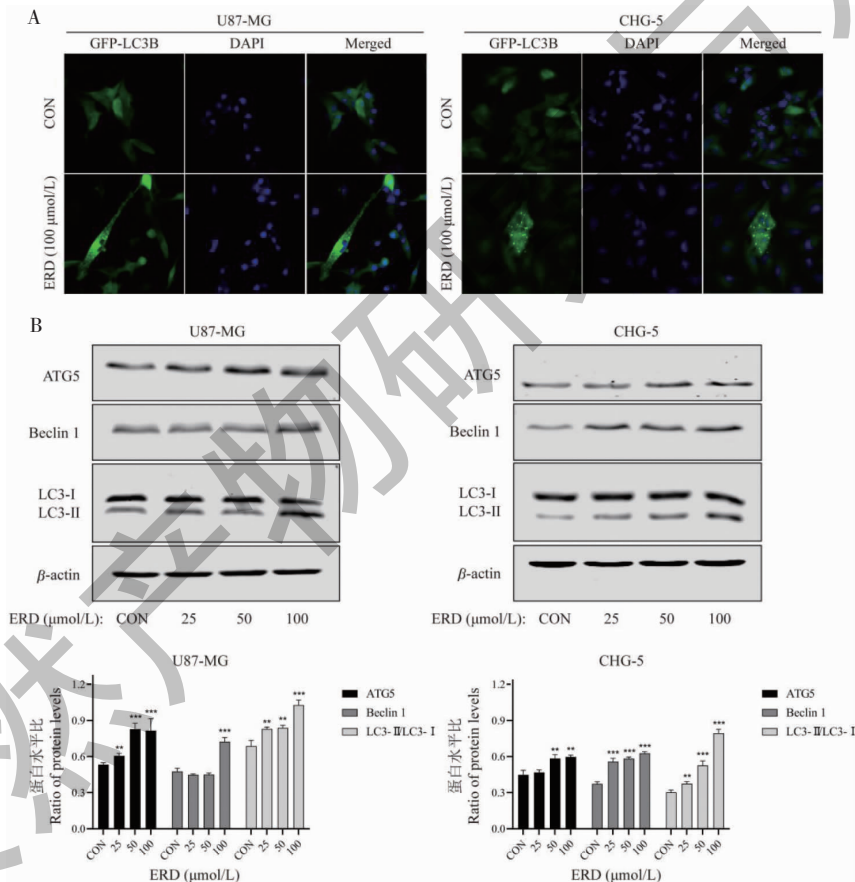


图3 ERD 对胶质瘤细胞自噬的影响

Fig. 3 The effect of ERD on the autophagy of glioma cells

注:与 CON 组比较, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。Note: Compared with the CON group, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

## 2.5 ERD 下调 Akt/mTOR 信号通路

将胶质瘤细胞与不同浓度 ERD 共培养 48 h 后,采用 Western blot 检测 Akt/mTOR 通路相关蛋白的表达水平。结果显示,与 CON 组相比,ERD 处理后 Akt 和 mTOR 的表达无明显差异, p-Akt 和 p-

mTOR 的表达水平显著降低,而 Akt 激动剂 740 Y-P (25  $\mu\text{g/mL}$ )部分逆转了 ERD 对 Akt/mTOR 通路的抑制作用,结果见图 5。提示 ERD 可能通过下调 Akt/mTOR 通路,影响胶质瘤细胞的自噬过程。

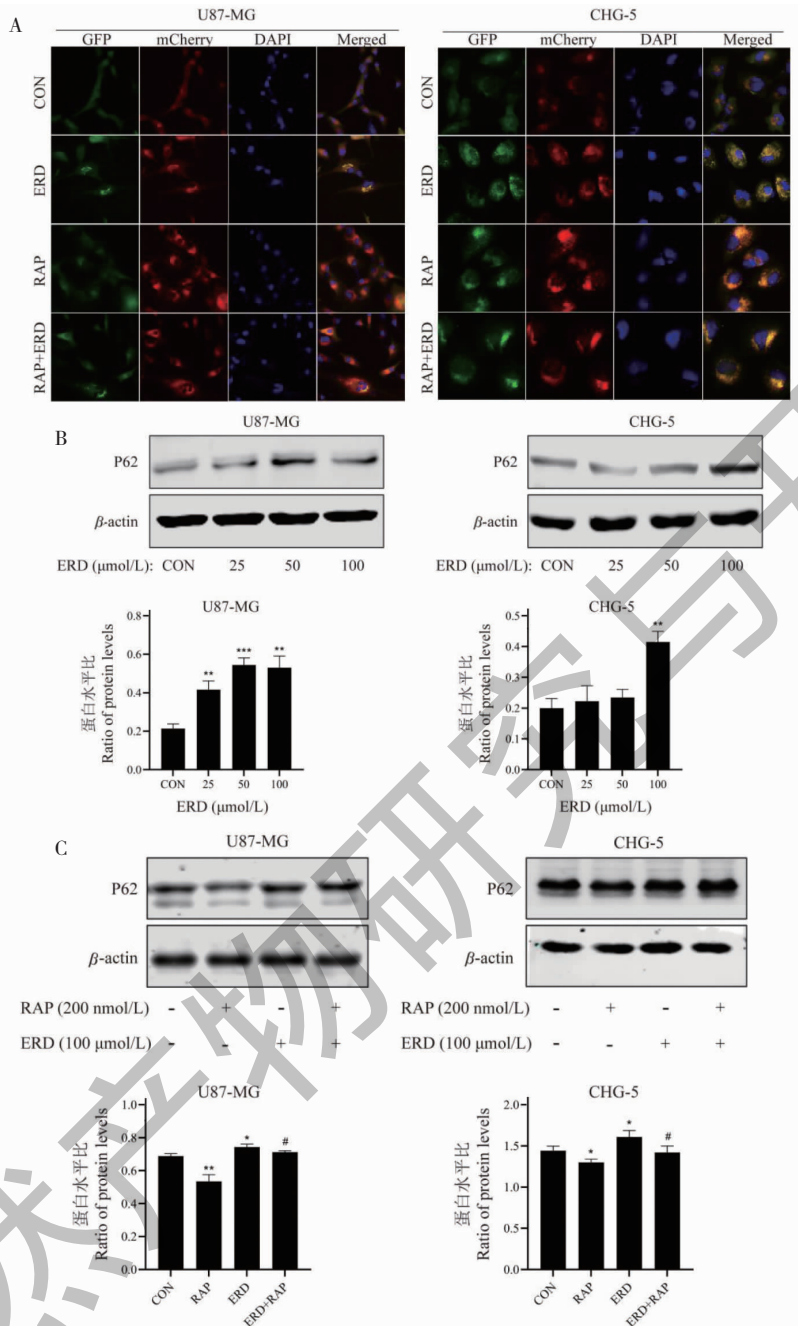


图4 ERD对胶质瘤细胞自噬流的影响

Fig. 4 The effect of ERD on the autophagic flux of glioma cells

注:与 CON 组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ;与 ERD 组比较, # $P < 0.05$ 。Note: Compared with the CON group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; Compared with the ERD group, # $P < 0.05$ .

## 2.6 ERD 抑制胶质瘤增殖, 促进胶质瘤组织中 LC3 II、P62、Beclin 1、ATG5 的表达, 抑制 Akt/mTOR 通路蛋白表达

与 CON 组相比, ERD 给药后减少了裸鼠皮下移植瘤体积和瘤体重量, 其中以 ERD 中、高剂量组最为显著 ( $P < 0.05$ )。说明在体内 ERD 同样对胶

质瘤细胞具有抑制作用(见图 6A、6C)。另外, 给药过程中 ERD 组小鼠体重与 CON 组无明显差异, 初步表明 ERD 毒性较小(见图 6D)。Western blot 检测肿瘤组织中 LC3、P62、Beclin 1、ATG5 和 Akt/mTOR 通路相关蛋白的表达水平, 结果显示在体内, ERD 同样能够上调 LC3、P62、Beclin 1、ATG5 的表达



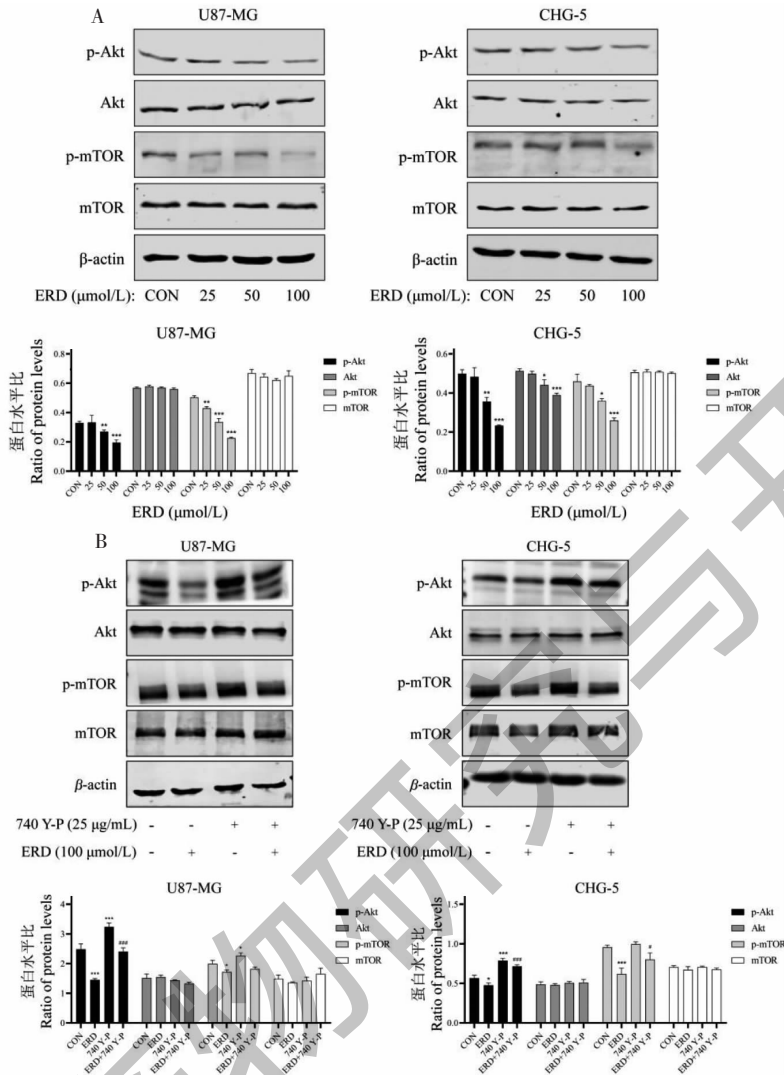


图5 ERD对胶质瘤细胞Akt/mTOR通路的影响

Fig. 5 The effect of ERD on the expression of proteins in the Akt/mTOR pathway in glioma cells

注:与CON组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ,与ERD组比较, # $P < 0.05$ , ### $P < 0.001$ 。Note: Compared with the CON group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; Compared with the ERD group, # $P < 0.05$ , ### $P < 0.001$ .

水平同时下调Akt/mTOR通路相关蛋白的表达,这与体外细胞实验的结果一致(见图6E、6F)。提示,在体内ERD同样可能通过调控Akt/mTOR途径影响胶质瘤的自噬过程。

### 3 讨论与结论

胶质瘤是发生率和死亡率均排在首位的中枢神经系统肿瘤,具有侵袭性强、恶性进展迅速、治愈率极低的特点,其中位生存期不足一年<sup>[10]</sup>。由于GBM高浸润性生长的生物学特性,导致手术几乎无法保证肿瘤的完全切除,术后复发率极高。因而临床上通常采用手术+放化疗的综合治疗手段<sup>[11]</sup>。

目前胶质瘤尚无作用理想的治疗药物。临床上

常用的药物主要包括生物烷化剂、靶向抗肿瘤药物以及免疫检查点抑制剂等<sup>[12]</sup>。其中TMZ是治疗GBM的一线化疗药物,但TMZ选择性差、易耐药、副作用强,治疗效果往往不理想。靶向抗肿瘤药物和免疫检查点抑制剂具有选择性高、副作用小的特点,在国外已逐渐成为主流抗胶质瘤药物<sup>[13]</sup>。然而,靶向药物和免疫检查点抑制剂价格较昂贵,长期使用患者经济负担重、压力大。因此,寻求高效低毒且价格适中的新型抗胶质瘤药物是目前脑胶质瘤研究领域的热点。我国传统中医药以及天然活性产物来源十分丰富,种类数量众多、毒副作用相对较小,并且具有广维度、多层次、多靶点综合作用的特点,

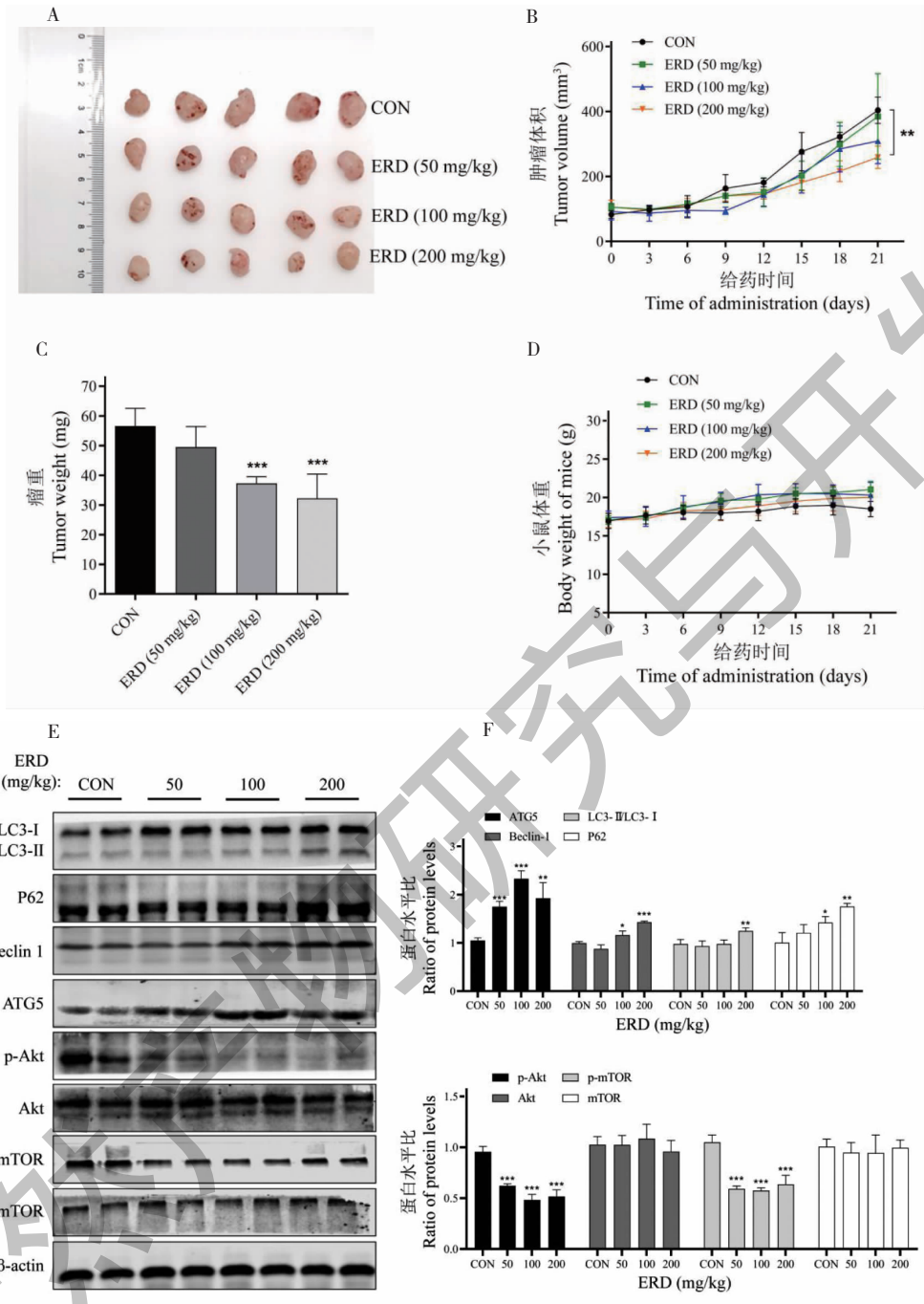


图 6 ERD 在体内对胶质瘤自噬的影响

Fig. 6 The effect of ERD on autophagy of glioma *in vivo*

注:与 CON 组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ 。 Note: Compared with the CON group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

在抗肿瘤方面有着独特的优势<sup>[14]</sup>。所以,从天然活性产物和中医药中探寻有效抗胶质瘤成分或许是解决目前困境的有效途径。

ERD 作为一种天然黄酮,因其具有广泛的生物活性而被关注和研究。在以往,ERD 的研究中主要

集中于抗炎和抗氧化作用方面,而近期我们的研究发现圣草酚能够显著抑制胶质瘤细胞的转移并诱导其凋亡。另外,Tang 等<sup>[15]</sup> 研究显示,在鼻咽癌 CNE1 细胞中,ERD 通过自噬介导显著抑制了细胞的增殖。Wang 等<sup>[16]</sup> 研究则表明,ERD 通过调控自

噬在大鼠脑缺血再灌注损伤中发挥了保护作用。以上研究结果提示,ERD 对细胞自噬具有调控作用,并可能通过影响自噬发挥抗癌作用。

本研究中探讨了 ERD 对胶质瘤自噬的影响。首先,我们通过 CCK-8 试剂和克隆形成实验证实了 ERD 对胶质瘤细胞具有良好的抑制效应,这与我们之前的研究结果一致。接下来,为探究 ERD 是否对胶质瘤自噬有所作用,我们检测了 LC3、Beclin 1 和 ATG5 自噬相关蛋白的表达水平,并通过荧光观察了自噬小体的数量。结果显示,经 ERD 处理的胶质瘤细胞中 LC3 II、Beclin 1 和 ATG5 的表达显著上调,自噬小体的数量也明显增多。说明 ERD 诱导了胶质瘤细胞自噬。自噬是一个动态过程,包括吞噬泡、自噬小体和自噬溶酶体三种状态。当细胞发生自噬时,首先形成自噬体,然后与溶酶体融合形成自噬溶酶体,进而降解包裹于其中的蛋白等物质<sup>[17]</sup>。我们采用 GFP-mRFP-LC3B 双荧光质粒转染细胞株,构建稳定表达红-绿荧光蛋白的细胞,利用 GFP 荧光蛋白在低 PH 值条件下荧光强度减弱这一特性观察自噬流的情况。即当自噬小体与溶酶体融合形成自噬溶酶体时,囊泡内 PH 值降低,红绿荧光合并后细胞呈现偏红色荧光,反之则趋向黄色。结果显示,ERD 处理后胶质瘤细胞呈亮黄色荧光,且 P62 蛋白表达升高,P62 为自噬溶酶体的底物,而当 ERD 与自噬流诱导剂——RAP 共处理细胞后,部分逆转了 ERD 的作用。以上实验结果提示,ERD 促进了胶质瘤细胞自噬小体的形成,但抑制了自噬流。

Akt/mTOR 信号通路在细胞自噬过程中发挥着关键调控作用,是肿瘤治疗的潜在靶点<sup>[18]</sup>。因此,为进一步探究 ERD 影响胶质瘤细胞自噬的潜在机制,我们检测了 ERD 对 Akt/mTOR 通路相关蛋白表达的影响。结果显示,ERD 能够抑制 p-Ak 与 p-mTOR 的表达,而该作用被 Akt 激动剂 740 Y-P 部分逆转。说明,ERD 可能通过下调 Akt/mTOR 通路影响胶质瘤细胞的自噬过程。最后,我们通过裸鼠皮下移植瘤模型观察 ERD 在体内对胶质瘤自噬的作用,实验结果同体外一致。

综上所述,本研究初步探索了 ERD 对胶质瘤细胞自噬的作用。发现,ERD 可能部分通过抑制 Akt/mTOR 通路,调控自噬相关蛋白 ATG5、Beclin1、LC3、P62 的表达,影响胶质瘤细胞自噬过程,进而抑制胶质瘤细胞增殖,最终发挥抗胶质瘤作用。然而,本研究仍未完全阐明 ERD 调控自噬流的分子机制,

这有待进一步研究。

#### 参考文献

- 1 Fangusaro J, Witt O, Driever P H, et al. Response assessment in paediatric high-grade glioma: recommendations from the response assessment in pediatric neuro-oncology (RAPNO) working group [J]. *Lancet Oncol*, 2021, 21(6): e317-e329.
- 2 Tomar MS, Kumar A, Srivastava C, et al. Elucidating the mechanisms of temozolomide resistance in gliomas and the strategies to overcome the resistance [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2021, 1876(2): 188616.
- 3 Li XH, He SK, Ma BY. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19: 12.
- 4 Ishaq M, Ojha R, Sharma AP, et al. Autophagy in cancer: recent advances and future directions [J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 66: 171-181.
- 5 Hernandez GA, Perera RM. Autophagy in cancer cell remodeling and quality control [J]. *Mol Cell*, 2022, 82: 1514-1527.
- 6 Yang K, Niu L, Bai YJ, et al. Glioblastoma: targeting the autophagy in tumorigenesis [J]. *Brain Res Bull*, 2019, 153: 334-340.
- 7 Islam A. The pharmacological and biological roles of eriodictyol [J]. *Arch Pharm Res*, 2020, 43: 582-592.
- 8 Li W, Du Q, Li X, et al. Eriodictyol inhibits proliferation, metastasis and induces apoptosis of glioma cells via PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 114.
- 9 Lv F, Du Q, Li L, et al. Eriodictyol inhibits glioblastoma: migration and invasion by reversing EMT via downregulation of the P38 MAPK/GSK-3 $\beta$ /ZEB1 pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 900: 174069.
- 10 Strobel H, Baisch T, Fitzel R, et al. Temozolomide and other alkylating agents in glioblastoma therapy [J]. *Biomedicines*, 2019, 7: 69.
- 11 Back M, Rodriguez M, Jayamanne D, et al. Understanding the revised fourth edition of the World Health Organization Classification of Tumours of the Central Nervous System (2016) for clinical decision-making: a guide for oncologists managing patients with glioma [J]. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 2018, 30: 556-562.
- 12 Yang K, Wu Z, Zhang H, et al. Glioma targeted therapy: insight into future of molecular approaches [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21: 39.
- 13 Ho RLY, Ho IAW. Recent advances in glioma therapy: combining vascular normalization and immune checkpoint blockade [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13: 3686.
- 14 Kundu M, Das S, Dhara D, et al. Prospect of natural products



- in glioma;a novel avenue in glioma management[J]. *Phytother Res*,2019,33:2571-2584.
- 15 Tang L, Qin Y, Ling K, et al. Eriodictyol inhibits the growth of CNE1 human nasopharyngeal cancer growth by targeting MEK/ERK signalling pathway, inducing cellular autophagy and inhibition of cell migration and invasion[J]. *J BUON*, 2020,25:2389-2394.
- 16 Wang C, Ma Z, Wang Z, et al. Eriodictyol attenuates MCAO-induced brain injury and neurological deficits via reversing the autophagy dysfunction [J]. *Front Syst Neurosci*, 2021, 15:655125.
- 17 Zhang SJ, Ma JY, SX, Yang DD. Lycorine induces gastric cancer SGC-7901 cell apoptosis and autophagy through the ERK signaling pathway[J]. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2020,32:1667-1673.
- 18 Xu ZR, Han X, Ou DM, et al. Targeting PI3K/AKT/mTOR-mediated autophagy for tumor therapy [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104:575-587.

(上接第 94 页)

- 15 Xiang HY, Huang YF, Jin Q, et al. Determination of three flavonoids in flower of *Meconopsis integrifolia* by UPLC [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志)*, 2018, 24:51-55.
- 16 Gong Y, Zhou HZ, Chen HL. Research progress of medicinal plants of *Artemisia* in recent ten years[J]. *J Chin Med Mater(中药材)*, 2020,43:758-763.
- 17 Huang YF, Cai X, Ran B, et al. Preliminary discovery of quality marker of herb *Meconopsis integrifolia* (non flower parts) based on spectrum-effect relationship[J]. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2020, 51:4521-4530.

(上接第 117 页)

- 20 Zhang Y, Zhang QH. Protective effects of different concentrations of ethanol eluate from cassia nomame on liver injury in mice[J]. *Chin Med Pharmacol Clin(中药药理与临床)*, 2019, 35:66-70.
- 21 Kim DW, Cho HI, Kim KM, et al. Isorhamnetin-3-*O*-galactoside protects against CCl<sub>4</sub>-induced hepatic injury in mice [J]. *Biomol Ther*, 2012, 20:406.
- 22 Zou Q, Wang N, Gao Z, et al. Antioxidant and hepatoprotective effects against acute CCl<sub>4</sub>-induced liver damage in mice from red-fleshed apple flesh flavonoid extract. [J]. *J Food Sci*, 2020, 85:3618-3627.
- 23 Li C, Zhou W. Protective effect of paeoniflorin on acute liver injury induced by concanavalin A in mice [J]. *Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志)*, 2022, 38:427-431.
- 24 Huang SM, Gao Y, Cao HK, et al. Protective effects and functional mechanism of *Clerodendrum philippinum* Schauer var. *simplex* Mlodenke total flavonoids on acute liver injury induced by carbon tetrachloride in mice [J]. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2018, 30:212-217.