

紫云英苷对未分化胃癌细胞凋亡的影响*

褚智恒⁺, 何施燕⁺, 王瑜, 朱若婷, 顾益玲, 陈佳玉[△]
(绍兴文理学院医学院, 浙江 绍兴 312000)

【摘要】 目的: 探讨紫云英苷(Astragaloside)对未分化胃癌细胞 HGC-27 的作用及相关分子机制。**方法:** 将紫云英苷作用 HGC-27 细胞, 设置对照组(0 $\mu\text{g/ml}$)和 Astragaloside 组(12.5、25、50 $\mu\text{g/ml}$), 每组设置 3 复孔, 用 CCK-8 法分别在用药 0、24、48、72 h 后检测细胞增殖活性; 在浓度为 0、50 $\mu\text{g/ml}$ 的 Astragaloside 作用 24 h 后, 倒置显微镜下观察细胞形态, hoechst 33342、JC-1 染色观察其核形和线粒体膜电位, 流式细胞仪检测细胞周期和凋亡率的改变, 二代测序仪分析基因的逆转录水平。**结果:** 紫云英苷可明显抑制 HGC-27 的增殖($P < 0.01$), 下调细胞线粒体膜电位, 诱导细胞凋亡, 使细胞周期阻滞于 G1 期($P < 0.01$)。同时, 紫云英苷上调基因 bax、bad 的转录水平, 抑制 egf、egfr、pik3cb、pdk1、akt3、bcl-2 和 sgk3 基因的转录($P < 0.01$)。Western blot 实验也证实紫云英苷降低 PI3K 和 AKT 蛋白的表达, 同时 BAX 和 BCL-2 蛋白的比例也显著增加($P < 0.01$)。**结论:** 紫云英苷可通过抑制 EGFR/PDK/AKT 信号通路诱导未分化型胃癌细胞 HGC-27 凋亡, 并将细胞周期阻滞于 G1 期, 对未分化胃癌具有一定的治疗作用。

【关键词】 紫云英苷; 胃癌; 信号通路; 细胞凋亡; 细胞培养

【中图分类号】 R735.2

【文献标识码】 A

【文章编号】 1000-6834(2024)01-136-006

【DOI】 10.12047/j.cjap.6259.2022.097

Effects of Astragaloside on apoptosis of undifferentiated gastric cancer cells

CHU Zhi-heng⁺, HE Shi-yan⁺, WANG Yu, ZHU Ruo-ting, GU Yi-ling, CHEN Jia-yu[△]
(Shaoxing University School of Medicine, Shaoxing 312000, China)

【ABSTRACT】 Objective: To investigate the effects and related molecular mechanisms of Astragaloside on undifferentiated gastric cancer cell HGC-27. **Methods:** Astragaloside was used to treat HGC-27 cells, the cell proliferation activity was detected by CCK-8 method, the cell morphology was observed under inverted microscope, hoechst 33342 and JC-1 staining were used to observe the changes of nucleus formation and mitochondrial membrane potential, the cell cycle and apoptosis rate were detected by flow cytometry, the reverse transcription level of the gene was analyzed by the second-generation sequencer. **Results:** Astragaloside inhibited the proliferation of HGC-27 significantly ($P < 0.01$), down-regulated mitochondrial membrane potential, induced cell apoptosis, blocked the cell cycle in G1 phase. At the same time, Astragaloside up-regulated the transcription levels of genes bax and bad, down-regulated the transcription levels of genes egf, egfr, pik3cb, pdk1, akt3 and bcl-2. Western blot analysis also showed that the expressions of PI3K and Akt protein were decreased, and the proportion of Bax and BCL-2 protein was increased significantly ($P < 0.01$). **Conclusion:** The apoptosis of undifferentiated gastric cancer cell line HGC-27 can be induced by Astragaloside through inhibition of EGFR/PDK/Akt signaling pathway, and the cell cycle can be blocked in G1 phase, which has a certain therapeutic effect on undifferentiated gastric cancer.

【KEY WORDS】 Astragaloside; gastric cancer; signaling pathway; cell apoptosis; cell culture

胃癌是一种常见的恶性肿瘤,全球 2018 年胃癌发病人数超过 100 万,死亡人数约 76 万^[1]。手术切除、放疗、化疗等方法为胃癌现有治疗手段。早期胃癌可通过单纯手术达到治愈目的,但由于胃癌发病隐匿,往往肿瘤确诊时已发展至中晚期,早已发生远端转移,无法通过手术获得良好的治疗效果^[2]。现阶段 S-1 化疗方案为胃癌中晚期患者治疗的主要方

式^[3],但该疗法费用高、副作用大、易产生耐药性,胃癌中晚期患者中位生存时间仅有 1 年左右^[3,4],故而临床上未实现对胃癌真正意义上的治疗。因此迫切需要寻找副反应少、疗效好的胃癌治疗新药。

紫云英苷(Astragaloside, Ast)是具有多种生物活性的一种天然黄酮醇苷,在柿叶、绿茶种子和多种药用植物中含量丰富^[5]。目前,紫云英苷被广泛应用于食品中,尚未发现其毒副作用^[6,7]。已有研究证实,紫云英苷具有抗炎、抗氧化、抗糖尿病、保护心脏和抑制肝癌细胞增殖等作用^[7,8],但其抗未分化胃癌的作用及其确切机制尚未完全揭示。因此,本实验

*【基金项目】 国家级大学生创新创业训练计划项目(202010349038)

【收稿日期】 2022-01-20 【修回日期】 2022-09-28

[△]【通讯作者】 Tel: 0575-88345826; E-mail: chenjujia10@163.com; ⁺: 为共同第一作者

将紫云英苷作用于未分化的胃癌细胞株 HGC-27, 分析其药效并揭示其作用的相关分子机制。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

人胃癌细胞株 HGC-27 为本实验室保存; RPMI 1640 培养液、胎牛血清、胰酶、PBS 购自美国 Gibco 公司; 青链霉素混合液来自北京 Solarbio 科技有限公司; 紫云英苷(用二甲基亚砷制成原液)、Cell Counting Kit-8 源自美国 Medchem Express 公司; 细胞凋亡检测试剂盒、细胞周期检测试剂盒购买于上海生工生物股份有限公司; Hoechst 33342 试剂、JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒源于上海碧云天; Trizol 由美国 Invitrogen 公司提供; 一抗和酶标二抗为武汉博士德生物公司产品。

1.2 细胞培养

将 RPMI 1640 完全培养基复苏后的 HGC-27 细胞放置于细胞孵箱中进行培养。待细胞呈指数倍增长时, 用 1640 完全培养液将细胞稀释至 5×10^4 cells/ml 后进行下述实验。

1.3 CCK-8 测定法检测细胞增殖情况

取上述浓度的胃癌细胞 HGC-27 以 $90 \mu\text{l/well}$ 接种入 96 孔细胞培养板中。待 HGC-27 细胞培养至贴壁后, 分别加入浓度为 0、125、250、500 $\mu\text{g/ml}$ 的紫云英苷药液($10 \mu\text{l/well}$, 终浓度为 0、12.5、25、50 $\mu\text{g/ml}$), 每个浓度设 3 复孔。将 96 孔板置于孵箱中分别培养 0、24、48、72 h, 使用倒置显微镜观察细胞形态, 按 $10 \mu\text{l/well}$ 加入 CCK-8 染液继续培养 3 h, 用酶标仪(BIO RAD iMark)在一定波长下(本实验选用 450 nm)测量吸光度, 记录后绘制细胞增殖曲线, 观察紫云英苷对 HGC-27 细胞的作用效果, 筛选该药作用有效浓度, 并以该浓度作为机制分析的实验浓度进行以下实验。

1.4 Hoechst 33342 染色观察细胞核形

取经过处理的浓度为 5×10^4 cells/ml 的胃癌细胞 HGC-27 铺于 96 孔细胞培养板中($90 \mu\text{l/well}$)。至 HGC-27 细胞贴壁后, 弃尽培养液, 分别加入终浓度为 0、50 $\mu\text{g/ml}$ 的紫云英苷药液($100 \mu\text{l/well}$), 在细胞培养箱中孵育 24 h。弃去培养液, PBS 洗涤后加入 10 ng/ml 的 hoechst 33342 染液($40 \mu\text{l/well}$), 在室温及暗视野环境下培养 10 min 后 PBS 清洗 2 遍, 弃尽液体, 以 $30 \mu\text{l/well}$ 的量加入 PBS, 使用荧光倒置显微镜观察细胞核核形变化并拍照。

1.5 JC-1 染色检测线粒体膜电位

取上述浓度为 5×10^4 cells/ml 的 HGC-27 细胞

以 5 000 cells/well 种于 96 孔细胞培养板中。待 HGC-27 细胞贴壁生长后, 将培养液换成 100 μl 终浓度为 0、50 $\mu\text{g/ml}$ 的紫云英苷药液, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 及饱和适度的培养箱中培育 24 h。吸弃培养液 50 μl , 换成相应容积的 JC-1 染液, 在黑暗环境下培养 20 min 后, PBS 清洗 2 遍, 加完全细胞培养液 50 $\mu\text{l/well}$, 小高内涵显微镜观察细胞的线粒体膜电位变化。

1.6 流式细胞仪测定细胞周期

取浓度为 1×10^5 cells/ml 的胃癌细胞 HGC-27 以 2 ml/well 的量铺入 6 孔板中。待胃癌细胞 HGC-27 贴壁后, 换成终浓度为 0、50 $\mu\text{g/ml}$ 的紫云英苷药液(2 ml/well), 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 环境下培养 24 h。取出 6 孔板, PBS 清洗 2 遍, 滴加胰酶 200 μl , 收集消化后的细胞, 清洗离心(1 000 r/min, 5 min)后回收细胞, 加入 70% 冰乙醇混匀后, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏过夜。用相同条件离心回收 HGC-27 细胞后, 用 PBS 进行 2 遍洗涤。按照细胞周期检测试剂盒说明书的步骤进行 PI 染色, 并用流式细胞仪分析细胞周期。

1.7 流式细胞仪分析细胞凋亡率

取上述浓度为 1×10^5 cells/ml 的 HGC-27 细胞以 2 ml/well 的量铺入 6 孔板。待 HGC-27 细胞贴壁生长后, 换成终浓度为 0、50 $\mu\text{g/ml}$ 的紫云英苷药液(2 ml/well), 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 环境下培养 24 h。取出 6 孔培养板, PBS 洗涤 2 遍, 每孔滴加 200 μl 胰酶, 消化后收集细胞, 离心(1 000 r/min, 5 min)、回收并洗涤细胞。按细胞凋亡检测试剂盒说明书的步骤进行染色, 并用流式细胞仪分析细胞凋亡水平。

1.8 二代测序分析基因逆转录水平

取用 RPMI1640 培养液稀释成 1×10^5 cells/ml 的 HGC-27 细胞悬液, 2 ml/well 铺入 6 孔板。待胃癌细胞 HGC-27 开始贴壁生长后, 换成终浓度为 0、50 $\mu\text{g/ml}$ 的紫云英苷药液(2 ml/well), 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 环境下培养 24 h。弃上清完全后, 清洗 2 遍, 按 0.5 ml/well 加入 Trizol, 提取 RNA(试剂用量和方法参照 Trizol 使用说明书)。Nanodrop 2000 定量 RNA 后, 取 2 μg RNA 送至诺禾致源公司完成逆转录组测序和结果分析。

1.9 Western blot 分析蛋白表达的改变

紫云英苷配制浓度分别为 0 和 50 $\mu\text{g/ml}$ (DM-SO 浓度 $\leq 0.01\%$), 待 HGC-27 细胞在六孔板中生长至细胞融合度 70%, 每孔添加 200 μl 药液。将 6 孔板放回至培养箱内, 大黄酸作用于细胞 24 h。离心弃上清, 用 PBS 洗 2 次, 细胞回收后加入 SDS 裂解液使细胞裂解, 持续 2 s 后离心, 10 000 r/min 离

心 5 min,按比例加入 5×loading buffer,在金属浴中 95℃加热 5 min。以 GAPDH 为内参照进行 Western blot 检测,观察 PI3K、AKT、Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达水平。

1.10 统计学处理

由 SPSS 25 软件进行统计学分析实验数据,实验结果以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素分析(ANOVA)。

2 结果

2.1 紫云英苷对 HGC-27 细胞增殖活性的影响

终浓度分别为 0、12.5、25、50 $\mu\text{g/ml}$ 的紫云英苷作用 HGC-27 细胞 0、24、48、72 h 后,CCK-8 检测发现(图 1-1),紫云英苷可下调 HGC-27 细胞的增殖活性,并且其作用效果与药物作用时长、药物浓度呈正相关。经统计学分析,在 72 h 时,浓度为 12.5、25 和 50 $\mu\text{g/ml}$ 的紫云英苷对 HGC-27 细胞的增殖均有一定的抑制作用,其中 50 $\mu\text{g/ml}$ 的紫云英苷对 HGC-27 细胞的抑制作用最显著($P<0.01$)。同时,倒置显微镜观察发现(图 1-2),50 $\mu\text{g/ml}$ 的紫云英苷作用 HGC-27 细胞 24 h 后,部分细胞收缩变圆,成泡状,极易脱落。因此后续实验选用 50 $\mu\text{g/ml}$ 这一用药终浓度作为 Astragalgin 作用机制分析的实验浓度。

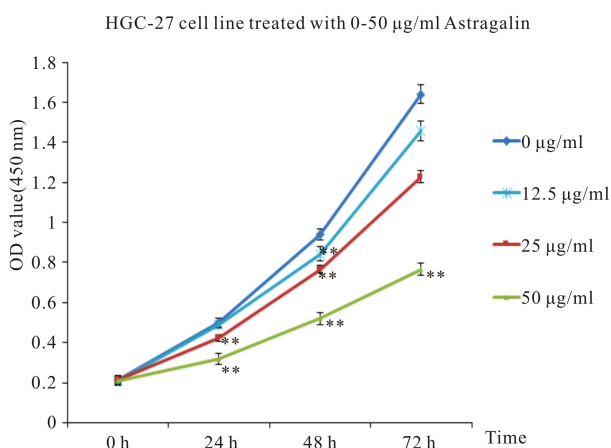


Fig. 1-1 The effects of Astragalgin on the proliferation ability of HGC-27 cells ($n=3$)

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs 0 $\mu\text{g/ml}$ group

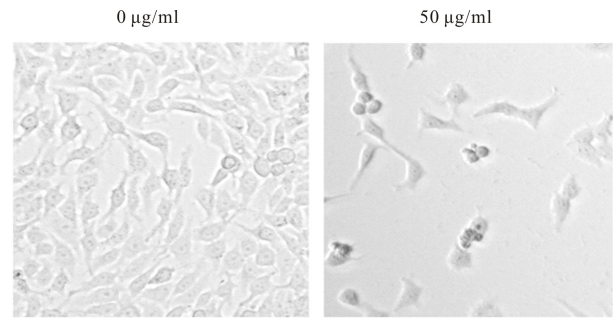


Fig. 1-2 The morphological changes of HGC-27 cells after Astragalgin treatment ($\times 100$)

2.2 紫云英苷对 HGC-27 细胞核形的影响

HGC-27 细胞经 50 $\mu\text{g/ml}$ 紫云英苷作用 24 h 后,hoechst 33342 染色结果显示(图 2),与对照组相比,实验组细胞数量明显减少,细胞核出现浓缩(红色)、碎裂(橙色)现象,并出现了凋亡小体。

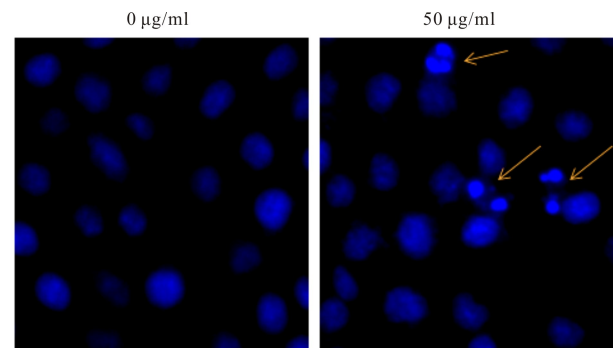


Fig. 2 The results of hoechst 33342 after Astragalgin treatment ($\times 100$)

2.3 ziyyg 对 HGC-27 细胞线粒体膜电位的影响

JC-1 染色结果显示(图 3),用终浓度为 50 $\mu\text{g/ml}$ 的紫云英苷作用 HGC-27 细胞 24 h,细胞回缩,JC-1 由聚合物变为单体,红色荧光颗粒减少,大量细胞仅发出绿色的荧光,提示紫云英苷可下调 HGC-27 细胞线粒体膜电位。

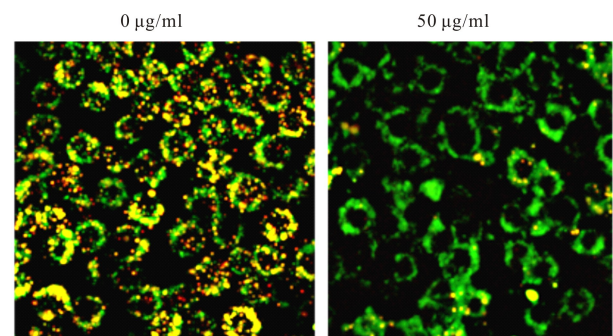


Fig. 3 The results of JC-1 staining after Astragalgin treatment ($\times 10$)

2.4 紫云英苷对 HGC-27 细胞周期的影响

细胞周期结果如图 4 表 1 所示,浓度为 50 $\mu\text{g/ml}$ 的紫云英苷作用于 HGC-27 细胞 24 h 后,处于 G1 期细胞的比例增加(74.89%→83.37%),G2 期细胞的比例显著减小(13.65%→6.90%, $P<$

0.01)。紫云英苷促进 HGC-27 细胞凋亡的同时可将细胞阻滞于 G1。

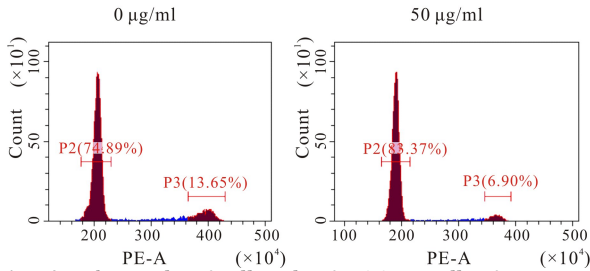


Fig. 4 The results of cell cycle of HGC-27 cells after Astragaloside treatment

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 $\mu\text{g/ml}$ group

Tab. 1 The results of cell cycle of HGC-27 cells after Astragaloside treatment

| Group | G1 | S | G2 |
|---------------------|-------|-------|--------|
| 0 $\mu\text{g/ml}$ | 74.89 | 11.46 | 13.65 |
| 50 $\mu\text{g/ml}$ | 83.37 | 9.73 | 6.90** |

** $P < 0.01$ vs 0 $\mu\text{g/ml}$ group

2.5 紫云英苷对 HGC-27 细胞凋亡率和死亡率的影响

结果显示(图 5,表 2),浓度为 0,50 $\mu\text{g/ml}$ 的紫云英苷作用于 HGC-27 细胞 24 h 后,经流式细胞仪检测发现浓度为 50 $\mu\text{g/ml}$ 的紫云英苷可显著诱导 HGC-27 细胞凋亡(1.4% \rightarrow 17.63%, $P < 0.01$)。

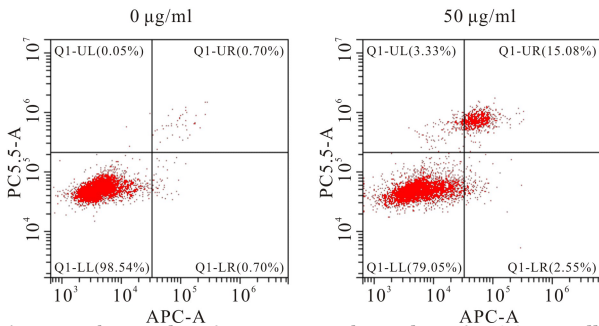


Fig. 5 The results of apoptosis and mortality of HGC-27 cells after Astragaloside treatment

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 $\mu\text{g/ml}$ group

Tab. 2 The results of apoptosis and mortality of HGC-27 cells after Astragaloside treatment

| Group | Normal | Apoptosis | Necrosis |
|---------------------|--------|-----------|----------|
| 0 $\mu\text{g/ml}$ | 98.54 | 1.4 | 0.05 |
| 50 $\mu\text{g/ml}$ | 79.05 | 17.63** | 3.33 |

** $P < 0.01$ vs 0 $\mu\text{g/ml}$ group

2.6 紫云英苷对 HGC-27 细胞增殖、凋亡相关基因 mRNA 水平的影响

图 6 为逆转录组测序结果的示意图,从中可见,与 0 $\mu\text{g/ml}$ 组比较,50 $\mu\text{g/ml}$ 的紫云英苷可使 HGC-27 细胞的基因 bax、bad mRNA 水平明显上调,而 egf、egfr、pik3cb、pdk1、akt3、bcl-2、sgk3 等基因的

逆转录水平显著下调。

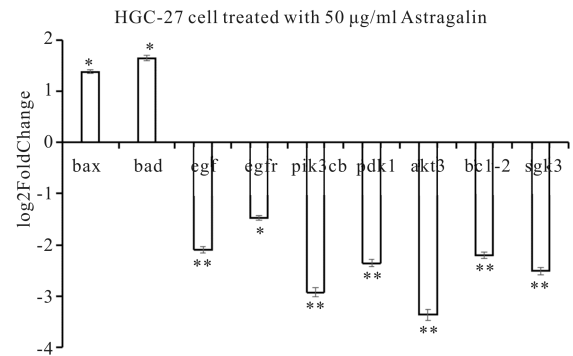


Fig. 6 The results of reverse transcriptome sequencing of HGC-27 cells after Astragaloside treatment

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 $\mu\text{g/ml}$ group

2.7 紫云英苷对 HGC-27 细胞蛋白表达水平的影响

Western blot 实验结果显示 HGC-27 细胞经 50 $\mu\text{g/ml}$ 紫云英苷作用 24 h 后,Western blot 检测结果显示, Bax 蛋白的表达水平显著上调,而 BCL-2、PI3K 和 AKT 蛋白的表达下调。



Fig. 7 The results of Western blot. HGC-27 cells were treated with 0 and 50 $\mu\text{g/ml}$ Astragaloside

3 讨论

胃癌严重危害人们的健康,其新药的发现和新治疗方案的探索一直受到人们的关注。胃癌的发生发展与癌细胞内基因的转录水平关系密切,其中 EGFR 是一种酪氨酸激酶型受体,可与配体 EGF 结合可形成二聚体^[9]。已有研究证明,通过引起 EGFR 活化或内化,可激活 PI3K/AKT 通路,而 PI3K/AKT 通路下游有许多具有调控细胞增殖,影响细胞凋亡等作用的因子(如 GSK3 β 、FOXO3A、P53),降低 PI3K/AKT 通路的活性对黑色素瘤、乳腺癌、胃癌等多种癌症的发生发展有抑制作用^[10-14]。因此,若能够抑制胃癌细胞 egfr 基因的转录和 PI3K/AKT 通路的活化,极有可能影响胃癌细胞增殖、凋亡和周期等生物学功能。

本实验将紫云英苷作用于胃癌细胞株 HGC-27,

结果显示,紫云英苷上调 HGC-27 细胞基因 *bax*、*bad* mRNA 水平,而 *egf*、*egfr*、*pik3cb*、*pdk1*、*akt3*、*bcl-2*、*sgk3* 等基因的逆转录水平显著下降。WB 结果显示,紫云英苷上调 HGC-27 细胞 BAX 的表达水平,下调 PI3K、AKT 和 BCL-2 的表达水平,BCL-2/BAX 的值显著下降。其中,EGF、EGFR 转录水平的下调,减少 EGFR 与配体 EGF 结合形成二聚体的几率,并抑制 *pik3cb*、*pdk1*、*akt3* 基因的转录。PIK3CB、PDK1、AKT3 为 PI3K/AKT 通路的重要成员,PIK3CB(编码 p110 β 基因)为 IA 类 PI3K 的组成成分,在细胞中广泛表达;PDK1 属于 AGC 蛋白激酶家族,可磷酸化 AKT3;*akt3* 作为一种致癌基因,它的高表达可介导癌症发展,在 PI3K/AKT 通路中发挥显著作用^[11, 14-16]。因此,当这三个表达水平受抑后,PI3K/AKT 下游级联反应也必将受抑,尤其是与该通路紧密相关的 *bcl-2* 基因家族成员的逆转录水平会被显著影响。*bcl-2* 家族是细胞凋亡过程中关键的凋亡调节因子,包括两类基因,一种是以 *bax*、*bad* 为代表的促凋亡基因,另一种是以 *bcl-2* 为代表的抗凋亡基因^[17]。而调控细胞凋亡的关键包括 *bcl-2/bax* 的比值,当 *bcl-2/bax* 下降时,*bax* 与 *bcl-2* 二聚体比值上升,促使线粒体膜电位下降及通透性增加,诱导 Cyt-c 释放并增强凋亡诱导因子活性,从而导致细胞凋亡^[17, 18]。本研究中逆转录组测序结果也证实紫云英苷作用后,HGC-27 细胞 *bad*、*bax* 基因的逆转录水平上调,而 *bcl-2* 基因逆转录下降,HGC-27 细胞内蛋白 BCL-2/BAX 的比值发生变化,出现线粒体膜电位降低,细胞核浓缩、碎裂,并形成凋亡小体。同时,在本研究中,作为 *pdk1* 下游因子的 *sgk3* 的逆转录水平显著下调。有研究表明,*sgk3* 已被证实多种肿瘤细胞的增殖和存活过程中发挥重要作用,当其活性被抑制时,可使细胞周期阻滞在 G1 期,进而抑制细胞增殖^[12],这与本实验中流式细胞仪检测细胞周期结果相符。

综上所述,紫云英苷可通过抑制 EGFR/PDK/AKT 信号通路,诱导细胞发生凋亡,使胃癌细胞增殖活性下调,细胞周期阻滞在 G1 期,具有潜在的抗胃癌的作用,值得进一步深入研究。

【参考文献】

- [1] Chung HC, Bang YJ, Fuchs CS, *et al.* First-line pembrolizumab/placebo plus trastuzumab and chemotherapy in HER2-positive advanced gastric cancer: KEYNOTE-811[J]. *Future Oncol*, 2021, 17(5): 491-501.
- [2] 赵翔宇,何振宇,宰守峰. 人参皂苷 Rg5 对胃癌细胞周期和侵袭的影响及其机制[J]. *中国应用生理学杂志*, 2020, 36(1): 51-55.
- [3] Ishigami H, Yamaguchi H, Yamashita H, *et al.* Surgery after intraperitoneal and systemic chemotherapy for gastric cancer with peritoneal metastasis or positive peritoneal cytology findings[J]. *Gastric Cancer*, 2017, 20(1): 128-134.
- [4] Kimura Y, Fujii M, Masuishi T, *et al.* Multicenter phase II study of trastuzumab plus S-1 alone in elderly patients with HER2-positive advanced gastric cancer (JACCRO GC-06)[J]. *Gastric Cancer*, 2018, 21(3): 421-427.
- [5] Liu L, Wang D, Qin Y, *et al.* Astragalín promotes osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells and bone formation in vivo[J]. *Front Endocrinol*, 2019, 10: 228-238.
- [6] Cid-Ortega S, Monroy-Rivera JA. Extraction of kaempferol and its glycosides using supercritical fluids from plant sources: A review[J]. *Food Technol Biotech*, 2018, 56(4): 480-493.
- [7] Li W, Hao J, Zhang L, *et al.* Astragalín reduces hexokinase 2 through increasing miR-125b to inhibit the proliferation of hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo[J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(29): 5961-5972.
- [8] Peng L, Gao X, Nie L, *et al.* Astragalín attenuates dextran sulfate sodium (DSS)-induced acute experimental colitis by alleviating gut microbiota dysbiosis and inhibiting NF- κ B activation in mice [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 2058-2058.
- [9] Guardiola S, Varese M, Sánchez-Navarro M, *et al.* A third shot at EGFR: New opportunities in cancer therapy [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2019, 40(12): 941-955.
- [10] Lindner AU, Carberry S, Monsefi N, *et al.* Systems analysis of protein signatures predicting cetuximab responses in KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA wild-type patient-derived xenograft models of metastatic colorectal cancer[J]. *Int J Cancer*, 2020, 147(10): 2891-2901.
- [11] Lin JX, Xie XS, Weng XF, *et al.* UFM1 suppresses invasive activities of gastric cancer cells by attenuating the expression of PDK1 through PI3K/AKT signaling[J]. *J Exp Clin Canc Res*, 2019, 38(1): 410-425.
- [12] Scortegagna M, Lau E, Zhang T, *et al.* PDK1 and SGK3 contribute to the growth of BRAF-mutant melanomas and are potential therapeutic targets[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(7): 1399-1412.
- [13] Chen L, Yang L, Yao L, *et al.* Characterization of PIK3CA and PIK3R1 somatic mutations in Chinese breast cancer patients[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1-17.

- [6] 邵月, 陈胜强, 漆正堂, 等. 不同训练方式对骨骼肌 p53 调节线粒体有氧呼吸轴 p53、SCO2 和 COX II 基因表达的影响[J]. 体育科学, 2010, 30(3): 46-52.
- [7] 李洁, 张耀斌. 不同低氧训练模式对大鼠力竭运动后骨骼肌线粒体抗氧化能力及呼吸链酶复合体活性的影响[J]. 生理学报, 2011, 63(1): 55-61.
- [8] 李洁, 张耀斌, 邢良美. 不同低氧训练模式对大鼠肝脏及肾脏组织内自由基代谢的影响[J]. 体育科学, 2008, 28(5): 56-61.
- [9] Frezza C, Cipolat S, Scorrano L. Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts[J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(2): 287-295.
- [10] Picard M, Taivassalo T, Ritchie D, et al. Mitochondrial structure and function are disrupted by standard isolation methods[J]. *PLoS One*, 2011, 6(3): e18317.
- [11] Zhang XD, Qin ZH, Wang J, et al. The role of p53 in cell metabolism[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31(9): 1208-1212.
- [12] Iwao C, Shidoji Y. Upregulation of energy metabolism-related, p53-target TIGAR and SCO2 in HuH-7 cells with p53 mutation by geranylgeranoic acid treatment[J]. *Biomed Res*, 2015, 36(6): 371-381.
- [13] Humpton TJ, Vousden KH. Regulation of cellular metabolism and hypoxia by p53[J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2016, 6(7): a026146- a026146.
- [14] Tong XM, Zhao FP, Thompson CB, et al. The molecular determinants of de novo nucleotide biosynthesis in cancer cells[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2009, 19(1): 32-37.
- [15] Saleem A, Hood DA. Acute exercise induces tumour suppressor protein p53 translocation to the mitochondria and promotes a p53-Tfam-mitochondrial DNA complex in skeletal muscle[J]. *J Physiol*, 2013, 591(14): 3625-3636.
- [16] 邵月. 不同运动方式对 P53、TIGAR、HKII 基因表达和乳酸含量的影响[J]. 北京体育大学学报, 2011, 34(5): 60-62.
- [17] 李洁, 杨静, 赵丽丽. 不同负荷运动训练对大鼠骨骼肌线粒体三羧酸循环的影响及其机制研究[J]. 武汉体育学院学报, 2019, 53(5): 88-94.
- [18] Melissa L, Macdougall J D, Tamopolsky MA, et al. Skeletal muscle adaptations to training under normobaric hypoxic versus normoxic conditions[J]. *Med Sci Sports Exerc*, 1997, 29(2): 238-243.
- [19] 王荣辉, 刘桂华, 胡琪, 等. 低氧训练对大鼠骨骼肌乳酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶活性的影响[J]. 北京体育大学学报, 1998, 21(3): 31-33.

(上接第 140 页)

- [14] Zhang L, Li Y, Wang Q, Chen Z, et al. The PI3K subunits, P110 α and P110 β are potential targets for overcoming P-gp and BCRP-mediated MDR in cancer[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 10-27.
- [15] Yip PY. Phosphatidylinositol 3-kinase-AKT-mammalian target of rapamycin (PI3K-Akt-mTOR) signaling pathway in non-small cell lung cancer[J]. *Trans Lung Cancer Res*, 2015, 4(2): 165-176.
- [16] Wang X, Li G. MicroRNA-16 functions as a tumor-suppressor gene in oral squamous cell carcinoma by targeting AKT3 and BCL2L2[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(12): 9447-9457.
- [17] Glab JA, Cao Z, Puthalakath H. Bcl-2 family proteins, beyond the veil[J]. *Int Rev Cel Mol Bio*, 2020, 351: 1-22.
- [18] Kalashnikova I, Mazar J, Neal CJ, et al. Nanoparticle delivery of curcumin induces cellular hypoxia and ROS-mediated apoptosis via modulation of Bcl-2/Bax in human neuroblastoma[J]. *Nanoscale*, 2017, 9(29): 10375-10387.