

## 胺碘酮联合甘草次酸增强肝癌 HepG2 细胞 凋亡和自噬的实验研究\*

韦庆祝<sup>1</sup>, 何黎黎<sup>1△</sup>, 王晓云<sup>2</sup>, 吴玲<sup>1</sup>, 龚林慧<sup>1</sup>, 宋相容<sup>2</sup>

1. 西南民族大学药学院(成都 610041); 2. 四川大学华西医院 生物治疗国家重点实验室(成都 610041)

**【摘要】** 目的 研究胺碘酮联合甘草次酸对人肝癌 HepG2 细胞的活性、凋亡及自噬的影响。方法 单独使用或联合使用 20  $\mu\text{mol/L}$  胺碘酮与不同浓度甘草次酸处理 HepG2 细胞 48 h 后,采用 MTT 法检测细胞存活率;单独或联合作用 24 h 后采用 Annexin V/PI 流式细胞术检测细胞凋亡,采用蛋白质印迹技术检测自噬相关蛋白 Beclin-1、LC3 和 p62 的表达;荧光显微镜下观察 EGFP-LC3 绿色荧光聚集体的形成;另外,预先加入自噬抑制剂羟氯喹(HCQ)和自噬促进剂雷帕霉素,采用同样的实验方法研究自噬对细胞活性和凋亡的影响。结果 不同浓度甘草次酸与 20  $\mu\text{mol/L}$  胺碘酮联合作用 48 h 后 HepG2 细胞存活率均低于单药组,当 80  $\mu\text{mol/L}$  甘草次酸与 20  $\mu\text{mol/L}$  胺碘酮时,细胞存活率为 50%左右,故后续实验中甘草次酸浓度均为 80  $\mu\text{mol/L}$ 。联合作用组细胞凋亡率高于单药组,Beclin-1 和 LC3 II 蛋白的表达量高于单药组,p62 蛋白的表达量低于单药组;荧光显微镜观察结果显示联合作用组 EGFP-LC3 荧光聚集体数量多于单药组;胺碘酮与甘草次酸联合作用于 HepG2 细胞,加入自噬抑制剂可抑制自噬促进细胞凋亡,降低细胞活性,采用自噬促进剂促进自噬细胞凋亡率降低,活性增加。结论 胺碘酮与甘草次酸联用可诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡增加,细胞活性降低,自噬水平增加;其诱导的自噬对细胞是一种保护性机制。

**【关键词】** 胺碘酮 甘草次酸 自噬 联合给药 肝癌

**Study on Autophagy and Apoptosis Induced by Amiodarone Combined with Glycyrrhetic Acid in HepG2 Cells** WEI Qing-zhu<sup>1</sup>, HE Li-li<sup>1△</sup>, WANG Xiao-yun<sup>2</sup>, WU Ling<sup>1</sup>, GONG Lin-hui<sup>1</sup>, SONG Xiang-rong<sup>2</sup>. 1. College of Pharmacy, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China; 2. State Key Laboratory of Biotherapy, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: lilihes@163.com

**【Abstract】** **Objective** To investigate the effects of amiodarone combined with glycyrrhetic acid on the activity, apoptosis and autophagy in human hepatoma HepG2 cells. **Methods** After using amiodarone and glycyrrhetic acid alone or in combination treatment for HepG2 cells, MTT assay was used to detect cell proliferation, Annexin V/PI flow cytometry was used to detect apoptosis; Western blot was used to detect the expression of autophagy-related proteins Beclin-1, LC3 and p62. The formation of EGFP-LC3 green fluorescent aggregates was observed under a fluorescence microscope. The effects of autophagy on cell proliferation and apoptosis were studied by autophagy inhibitor hydroxychloroquine (HCQ) and autophagy promoter Rapamycin. **Results** The cell viability in combination group was lower than that in single drug group, and the apoptosis rate was higher than that in single drug group. Compared with single-drug group, the expressions of Beclin-1 and LC3 II protein in the combination group were higher than that in the single-drug group, while the expression of p62 protein was lower in the single-drug group. Fluorescence microscopy results showed that the number of EGFP-LC3 fluorescent aggregates in the combination group were more than that in the single-drug. Using amiodarone and glycyrrhetic acid treated HepG2 cells, inhibition of autophagy could decrease cell viability, increase apoptosis rate of cells; promoting autophagy would decrease the apoptosis rate and increase cells viability. **Conclusion** By increasing apoptosis of hepatocellular carcinoma HepG2 cells and autophagy level, and decreasing the cell activity, amiodarone combining with glycyrrhetic acid treatment inducing autophagy a protective mechanism for cells.

**【Key words】** Amiodarone Glycyrrhetic acid Autophagy Combined administration Liver cancer

\* 四川省科技厅应用基础项目(No. 2018JY0143)、西南民族大学研究生“创新型科研项目”(No. CX2016SZ047)、国家留学基金委西部地区人才培养特别项目(No. CSC201608515150)和中央高校科研业务费专项项目(No. 2018NQN16)资助

△ 通信作者, E-mail: lilihes@163.com

肝癌是世界范围内癌症相关的第三大死因,全世界每年大约有 85 万新增病例,每年造成约 60 万患者死亡<sup>[1]</sup>;尽管肝癌的诊疗技术已取得长足进步,但肝癌患者的 5 年生存率仍极低<sup>[2]</sup>。因此,亟待寻找更有效的肝癌治疗策略。

已有研究报道,胺碘酮(AM)可使肝癌 HepG2 细胞周期阻滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期从而抑制细胞增殖<sup>[3]</sup>,可通过线粒体途径诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡<sup>[4]</sup>,也可通过下调 miR-224 的表达发挥抗肝癌作用<sup>[5]</sup>。但 AM 在体内分布广,生物利用度低,长期使用会产生肝、肺毒性和甲状腺功能障碍等毒副作用<sup>[6]</sup>。甘草次酸(GA)可通过激活 caspase 通路诱导 HepG2 细胞凋亡,促进细胞色素 C 及 LDH 的释放、促进 HepG2 细胞死亡,以及使 HepG2 细胞周期阻滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期发挥抗肝癌作用<sup>[7-8]</sup>,此外,GA 亦可诱导肝癌细胞发生自噬<sup>[8]</sup>。目前认为细胞有凋亡、自噬性死亡和坏死 3 种死亡形式,其中自噬与凋亡存在独立的与相互联系的调控通路,二者关系密切且复杂<sup>[9]</sup>。基于此,本课题旨在探索 AM 与 GA 联用对人肝癌 HepG2 细胞的活性、凋亡及自噬的影响,并初步探讨自噬对细胞活性与凋亡的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与材料

BT125D 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司),Milli-Q Integral 纯水机(法国 Millipore 公司),SW-CJ-2D 型双人单面净化工作台(苏州净化设备有限公司),MAX M5 型酶标仪(美国 Thermo Scientific 公司),BX-53 型正置荧光显微镜(日本 Olympus 公司),IX-73 型倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司)。

AM(美国 MCE 公司),GA(西安富捷药业有限公司),3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT,美国 Sigma 公司),Hoechst 33258(美国 Sigma 公司),DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司),胎牛血清(杭州四季青公司),自噬抑制剂羟氯喹(HCQ,美国 Sigma 公司),自噬激动剂雷帕霉素(美国 Sigma 公司),Lipofectamine™ 3000 转染试剂盒(美国 Thermo Scientific 公司),Beclin-1、LC3 和 p62 一抗(均为兔抗)购于美国 CST 公司,内参 β-actin 一抗购于美国 abcam 公司,过氧化物酶标记的二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司,Annexin V-FITC 凋亡检测试剂购于北京四正柏生物技术有限公司。

人肝癌细胞 HepG2 购自美国菌种保藏中心 ATCC,由四川大学华西医院生治疗国家重点实验室进行传代和保存,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基(含 100 μg/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素)在 37 °C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。

### 1.2 通过 MTT 实验确定 GA 实验浓度

取对数期生长的 HepG2 细胞以每孔 3 000 个细胞的密度接种于 96 孔板中,置于体积分数 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 培养箱中培养过夜使细胞充分贴壁后,分别给予不同浓度的 GA(0、10、20、40、80、120、160、200 μmol/L)单独及联合 20 μmol/L AM 处理。每组设 6 个复孔,作用 48 h 后,每孔加入 20 μL 5 mg/mL MTT 溶液,于细胞培养箱中孵育 4 h 后弃去孔板中的液体,每孔加二甲基亚砜(DMSO)150 μL,于室温酶标仪上振荡 40 s,使甲瓞结晶充分溶解。酶标仪检测 570 nm 处各孔的吸光度值(A<sub>570</sub>),实验重复 3 次,取其均值计算细胞存活率:细胞存活率(%) = 给药组 A<sub>570</sub>/对照组 A<sub>570</sub> × 100%。选择联合组中细胞存活率约为 50% 时的 GA 浓度作为后续实验药物浓度。

### 1.3 检测 GA 和 AM 联用对细胞凋亡的影响

将 HepG2 细胞分为 AM 组、GA 组、AM 联合 GA 组(浓度同单药组),同时设空白对照组(无 AM 和 GA)。各组细胞与药物作用 24 h 后用胰蛋白酶消化,离心(1 000 r/min, 5 min)收集细胞,以 PBS 洗涤细胞 2 遍后加入 0.4 mL Binding Buffer 重悬细胞,每组加入 5 μL Annexin-FITC 室温避光孵育 15 min,再加入 3 μL PI 室温避光孵育 10~15 min,于流式细胞仪上收集 15 000 个细胞,采用 Flow Jo 软件分析,计算细胞凋亡率。

### 1.4 检测 GA 和 AM 联用对细胞自噬的影响

**1.4.1 Western blot 检测细胞自噬相关蛋白的表达** 对数期生长的 HepG2 细胞以每孔 5 × 10<sup>5</sup> 个细胞的密度接种于 6 孔板,置于体积分数 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 培养箱中培养过夜使细胞贴壁完全。次日进行分组加药处理。细胞分组同 1.3。药物与细胞作用 24 h 后,用 RIPA 裂解液裂解细胞,BCA 法测定蛋白浓度,将提取的蛋白上样 50 μg 进行 SDS-PAGE 电泳,转膜和封闭后,分别加入兔抗人 Beclin-1、LC3、p62 和内参 β-actin 抗体(1:1 000),4 °C 孵育过夜,TBST 洗涤条带,然后条带用辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(1:5 000)二抗于室温孵育 1 h,ECL 显影,TANTEN 成像仪曝光显影并记录结果。结果用 Image J 分析,以 β-actin 为内参,

统计目的蛋白光密度值与内参蛋白光密度值的相对表达量。

**1.4.2 正置荧光显微镜观察 EGFP-LC3 荧光聚集体的形成** 将 HepG2 细胞以每孔  $2 \times 10^5$  个细胞的密度接种于含圆形爬片的 24 孔板中, 分组同 1.3 (每组 3 个复孔), 置于体积分数 5%  $\text{CO}_2$ 、37 °C 培养箱中培养。次日待细胞密度为 70% ~ 80% 时, 用 Lipofectamine™ 3000 试剂转染质粒 EGFP-LC3, 每孔质粒用量为 1  $\mu\text{g}$ , 在 37 °C 体积分数 5%  $\text{CO}_2$  孵育箱内孵育 6 h, 更换含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 再培养 24 h 后, 分别将药物加于各组的复孔中, 药物与细胞作用 24 h 后, 细胞用冷的 PBS 洗涤 3 次, Hoechst 33258 染细胞核, 随后于荧光显微镜下观察拍照, 并分析平均每个细胞中 EGFP-LC3 荧光点的数量 (每孔随机统计 100 个细胞)。

### 1.5 观察自噬对细胞凋亡和活性的影响

将 HepG2 细胞分为 12 组, 除 AM 组、GA 组、AM+GA 组和空白对照组以外, 以上各组分别加入自噬抑制剂 (先用 10  $\mu\text{mol/L}$  HCQ 预处理 6 h, 再加入药物处理) 和自噬激动剂 (先用 500 nmol/L 雷帕霉素预处理 1 h 再加入药物处理) 进行干预。分别采用 MTT 实验 (同 1.2) 和流式细胞术 (同 1.3) 检测各组细胞存活率和凋亡率。

### 1.6 统计学方法

采用 Graphpad prism 6.0 软件对统计结果进行分析, 统计结果均用  $\bar{x} \pm s$  表示。组间比较采用  $t$  检验, 多组间比较采用单因素方差分析,  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 AM 与 GA 联用对 HepG2 活性的影响

如图 1 A 所示, GA 浓度越大, HepG2 细胞的存活率越低。80  $\mu\text{mol/L}$  GA 与 20  $\mu\text{mol/L}$  AM 联合处理细胞时, 细胞存活率为  $(51.43 \pm 3.28)\%$ , 因此在后续实验中选择 GA 浓度为 80  $\mu\text{mol/L}$ 。当  $\text{GA} \leq 20 \mu\text{mol/L}$  时, 两者联合处理组细胞存活率低于同浓度 GA 组 ( $P < 0.001$ ), 但与 20  $\mu\text{mol/L}$  AM 单用组差异无统计学意义; 当 GA 浓度为 40 ~ 160  $\mu\text{mol/L}$  时, GA+20  $\mu\text{mol/L}$  AM 组细胞存活率均低于同浓度 GA 单独处理组 ( $P < 0.001$ )。但当 GA 浓度为 200  $\mu\text{mol/L}$  时, 两组差异无统计学意义。

### 2.2 AM 与 GA 联用对 HepG2 细胞凋亡水平影响

20  $\mu\text{mol/L}$  AM 和 80  $\mu\text{mol/L}$  GA 联合处理 HepG2 细胞 24 h 后, 细胞凋亡率明显高于与单药

组 ( $P < 0.001$ ), 说明 AM 联合 GA 能增强细胞的凋亡诱导作用, 见图 1B。

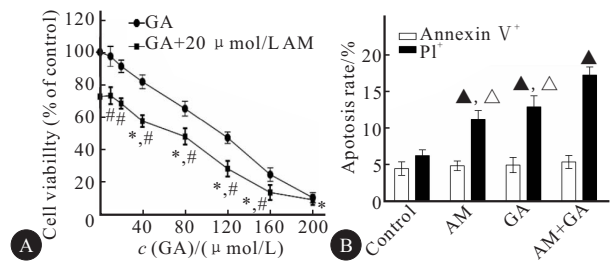


图 1 AM 联合 GA 对 HepG2 存活率(A)和凋亡水平(B)的影响  
Fig 1 The effects of AM combined with GA on viability and apoptosis of HepG2 cells

\*  $P < 0.001$ , vs. 20  $\mu\text{mol/L}$  AM+0  $\mu\text{mol/L}$  GA group; #  $P < 0.001$ , vs. GA group at the same concentration,  $\blacktriangle$   $P < 0.001$ , vs. control group in  $\text{PI}^+$ ;  $\triangle$   $P < 0.001$  vs. AM+GA group in  $\text{PI}^+$

### 2.3 AM 与 GA 联用对 HepG2 细胞自噬水平影响

Western blot 法检测结果 (图 2) 显示, AM+GA 联合处理组 Beclin-1 和 LC3 II 蛋白的表达量较单药组增加, p62 蛋白的表达量较单药组减少 ( $P < 0.01$ )。EGFP-LC3 转染后加药处理, 如图 3 所示, 对照组细胞未加任何药物处理, 只有极少量的点状荧光颗粒弥散分布在胞浆中, 自噬阳性细胞数极少。AM 与 GA 组可见部分细胞质内出现多个明亮的绿色荧光聚集体, 表明药物处理后自噬体形成增多, 联合给药组相对于单药组自噬阳性细胞明显增加。以上结果提示, AM 与 GA 可诱导肝癌细胞 HepG2 发生不同程度的自噬, 两药联用自噬水平提高。

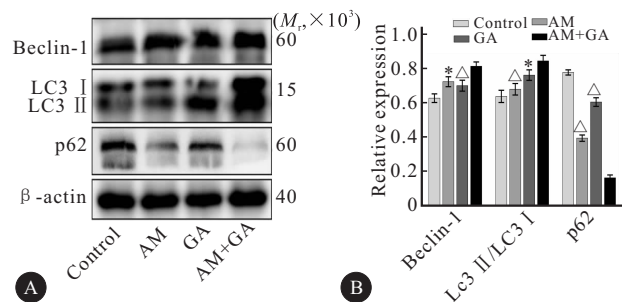


图 2 AM 与 GA 联用对 HepG2 细胞自噬相关蛋白表达的影响  
Fig 2 Effects of AM combined with GA on the expressions of autophagy related proteins in HepG2 cells

A: Western blot bands; B: Quantitative analysis. \*  $P < 0.01$ ,  $\triangle$   $P < 0.001$ , vs. AM + GA group

### 2.4 自噬对细胞凋亡和活性的影响

见图 4A 和图 4B。流式细胞术检测凋亡结果显示, 各个处理组细胞早期凋亡率差异无统计学意义, 用 HCQ 抑制后细胞晚期凋亡率增加, 而用雷帕霉素激动后晚期凋亡率减少 ( $P$  均  $< 0.05$ )。MTT

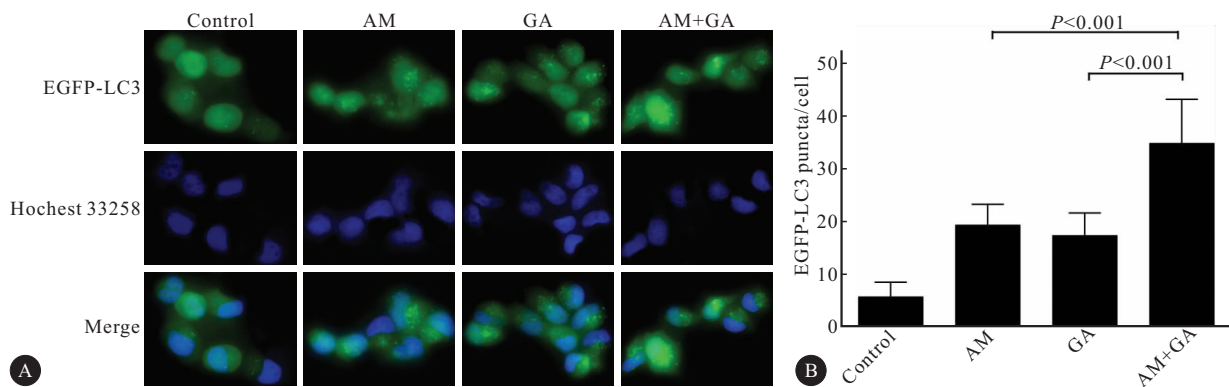


图 3 AM 与 GA 联用对 HepG2 细胞内自噬体形成的影响

Fig 3 Effects of AM combined with GA on autophagosome formation in HepG2 cells

A: After transient transfection of HepG2 cells with EGFP-LC3, the autophagosome formation was observed by fluorescence microscopy after using AM combined with GA treatment for 24 h ( $\times 200$ ); B: Quantitative analysis of the formation of autophagosome in HepG2 cells

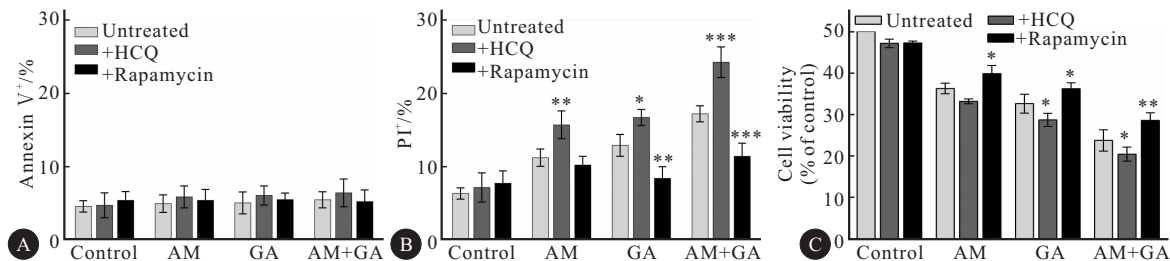


图 4 自噬抑制与促进对 HepG2 细胞凋亡和活性的影响

Fig 4 The effects of autophagy suppression and promoting on the apoptosis and viability of HepG2 cells

A: Apoptosis at early stage of HepG2 cells; B: Apoptosis at late stage of HepG2 cells; C: The viability of HepG2 cells were detected by MTT; Untreated; Untreated with HCQ or rapamycin; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , vs. untreated group

实验结果显示(图 4C), HCQ 与雷帕霉素能降低 GA 组、AM+GA 组细胞活性( $P < 0.05$ ), 雷帕霉素能提高 AM 组、GA 组、AM+GA 组的细胞存活率( $P < 0.05$ ), 但这两种药物均未对对照组细胞生存率产生影响。

### 3 讨论

AM 是一种广泛使用的抗心律失常药物, 目前的研究表明 AM 可抑制 HepG2 细胞增殖, 诱导 HepG2 细胞凋亡, 还可诱导自噬使 miR-224 表达降低发挥抗肝癌作用<sup>[3-4]</sup>。GA 是从传统中药甘草中分离出来的一种具有五环三萜类结构的化合物, 对于肝癌、肺癌、宫颈癌、胃癌、结肠癌等多种疾病具有广泛的抑制作用。GA 可诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡、阻遏细胞周期<sup>[7-8]</sup>。AM 与 GA 单独使用均具有抗肝癌效果, 为了研究两者联合使用是否能在较低浓度更有效地发挥抗癌作用, 本研究根据前期 AM 对 HepG2 细胞活性考察的研究数据<sup>[10]</sup>, 选择

了低于其  $IC_{50}$  的浓度, 即  $20 \mu\text{mol/L}$  AM 与不同浓度的 GA 联合使用, 发现当 GA 浓度在  $20 \sim 160 \mu\text{mol/L}$  范围内, AM 与 GA 联用相比于单独使用时细胞存活率均显著下降, 说明两药联用能发挥更好地抑制肝癌 HepG2 细胞增殖。

自噬与凋亡关系密切且复杂, 在凋亡的早期, 细胞出现应激反应会诱导自噬的发生。为研究 AM 与 GA 诱导的细胞死亡是否与凋亡有关, 本研究采用流式细胞术检测 AM 与 GA 单独或联用对 HepG2 细胞凋亡的影响, 结果表明两药联用可显著促进细胞凋亡。研究表明 AM 与 GA 单独使用时均可诱导肝癌细胞发生自噬, 为研究 AM 与 GA 联用对 HepG2 细胞自噬水平的影响, 本研究通过 Western blot 检测自噬标志分子的表达, 实验中 AM 联合 GA 能显著增加 LC3 II、Beclin-1 蛋白的表达, 下调 p62 蛋白的表达, 说明两药能增强自噬的诱导作用。进一步通过 EGFP-LC3 质粒转染, 观察自噬体的形成研究自噬活性。正常情况下, 绿色荧

光蛋白在胞质中均匀分布,而在自噬发生后,EGFP-LC3 融合蛋白转位至自噬体膜并发生聚集,在荧光显微镜下可见多个明亮的绿色荧光斑点。实验观察到,合药组细胞内绿色点状聚集荧光显著多于对照组和单药组,自噬阳性细胞数量增加,说明两药联合可使细胞自噬作用增强。

自噬和细胞凋亡的关系存在两面性,根据应激种类、细胞与应激环境相互作用的时间和强度、细胞的代谢状态和固有因素,自噬可以表现为促存活或促死亡机制<sup>[11]</sup>。饥饿状态下自噬可促进细胞存活;WANG 等<sup>[12]</sup>的研究表明重金属镉诱导 PC-12 细胞发生保护性自噬,镉浓度越大,自噬水平和凋亡水平增加,使用自噬抑制剂氯喹(CQ)与镉共处理细胞,细胞活性降低,凋亡率增加,使用自噬促进剂雷帕霉素则趋势相反;磷酸三(1,3-二氯-2-丙基)酯(TDCIPP)通过 ROS 调节的 AMPK/mTOR/ULK1 通路诱导 SH-SY5Y 发生细胞保护性的自噬和凋亡,TDCIPP 诱导的自噬和凋亡水平随药物浓度增加而增加,加入自噬抑制剂 3-MA 可增强 TDCIPP 的细胞凋亡诱导作用,细胞存活率降低,使用自噬促进剂雷帕霉素细胞凋亡率降低活性增加<sup>[13]</sup>。有研究表明 GA 通过 EPR 通路诱导 HepG2 的自噬是细胞保护性的,抑制自噬细胞活性降低<sup>[8]</sup>;GA 通过激活 IRE1 $\alpha$ -JNK/c-Jun 通路诱发非小细胞肺癌细胞发生保护性的自噬<sup>[14]</sup>。本实验证明了 AM 与 GA 既能诱导 HepG2 细胞凋亡和死亡,又能诱导其发生自噬,为研究 AM 与 GA 诱导的自噬对细胞活性和凋亡的影响,我们分别采用自噬抑制剂 HCQ 和自噬激动剂雷帕霉素预处理细胞,再采用 AM 与 GA 处理。发现在 HCQ 联合作用下,细胞死亡率和凋亡率增加;在雷帕霉素联合作用下,细胞死亡率和凋亡率降低。实验结果提示 AM 与 GA 诱导的是细胞保护性自噬。

目前研究表明,多种化疗药物作用于细胞时可同时诱导细胞发生自噬和凋亡。药物浓度越大,应激作用越强,其可通过自噬与凋亡独立的或共同的调控通路,诱导细胞凋亡率和自噬水平增加。当细胞保护性自噬阻碍的凋亡不足以逆转其他途径诱导的凋亡时,总体表现为细胞凋亡率增加<sup>[11-13]</sup>。

本研究结果提示,AM 与 GA 联用能更好地诱导细胞凋亡和死亡,AM 与 GA 联用可诱导肝癌 HepG2 细胞发生更高水平的自噬。阻断自噬后 AM 与 GA 对 HepG2 的细胞存活率降低,凋亡率增加;促进自噬后 AM 与 GA 对 HepG2 的细胞存活

率增加,凋亡率降低,说明 AM 与 GA 诱导的自噬对于 HepG2 细胞是一种保护机制,这也可能是 AM 及 GA 在 HepG2 细胞上 IC<sub>50</sub> 较高的原因。自噬与细胞凋亡和死亡的调控机制较为复杂,因此 AM 与 GA 的作用机制有待进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] DING XX, ZHU QG, ZHANG SM, *et al.* Precision medicine for hepatocellular carcinoma: driver mutations and targeted therapy. *Oncotarget*,2017,8(33):55715-55730.
- [2] XIAO S, LIU Z, DENG R, *et al.* Aptamer-mediated gene therapy enhanced antitumor activity against human hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo*. *J Control Release*,2017,258(1):130-145.
- [3] 王君钰,谭诗云,朱少平. 胺碘酮对人肝癌 HepG2 细胞增殖的影响及其临床意义. *武汉大学学报(医学版)*,2008,29(3):324-327.
- [4] ISOMOTO S, KAWAKAMI A, OHTSURU A, *et al.* Antiarrhythmic amiodarone mediates apoptotic cell death of hepg2 hepatoblastoma cells through the mitochondrial pathway. *Acta Med Nagasaki*,2004,49(1):13-17.
- [5] LAN SH, WU SY, ZUCHINI R, *et al.* Autophagy suppresses tumorigenesis of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma through degradation of microRNA-224. *Hepatology*,2014,59(2):505-517.
- [6] VASSALLO P, TROHMAN RG. Prescribing amiodarone. *JAMA*,2007,298(11):1312-1322.
- [7] CAI Y, XU Y, CHEN HF, *et al.* Glycyrrhetic acid mediated drug delivery carriers for hepatocellular carcinoma therapy. *Mol Pharma*,2016,13(3):699-709.
- [8] TANG ZH, LI T, CHANG LL, *et al.* Glycyrrhetic acid triggers a protective autophagy by activation of extracellular regulated protein kinases in hepatocellular carcinoma cells. *J Agric Food Chem*,2014,62(49):11910-11916.
- [9] EDINGER AL, THOMPSON CB. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol*,2004,16(6):663-669.
- [10] GOLI-BENNOURA EE, ZOUAOU O, NOUIRA S, *et al.* Cytotoxicity effects of amiodarone on cultured cells. *Exp Toxicol Pathol*,2012,64(5):425-430.
- [11] BAEHRECKE EH. Autophagy: dual roles in life and death? *Nat Rev Mol Cell Biol*,2005,6(6):505-510.
- [12] WANG Q, ZHU J, ZHANG K, *et al.* Induction of cytoprotective autophagy in PC-12 cells by cadmium. *Biochem Biophys Res Commun*,2013,438(1):186-192.
- [13] LI R, ZHOU P, GUO Y, *et al.* Tris (1,3-dichloro-2-propyl) phosphate induces apoptosis and autophagy in SH-SY5Y cells: Involvement of ROS-mediated AMPK/mTOR/ULK1 pathways. *Food Chem Toxicol*,2017,100(1):183-196.
- [14] TANG ZH, ZHANG LL, LI T, *et al.* Glycyrrhetic acid induces cytoprotective autophagy via the inositol-requiring enzyme 1 $\alpha$ -c-Jun N-terminal kinase cascade in non-small cell lung cancer cells. *Oncotarget*,2015,6(41):43911-43926.

(2018-03-23 收稿,2018-06-11 修回)

编辑 汤洁