

梁玉琼, 黄庆, 黄娟娟, 等. 薯蓣皂苷抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路促进肝癌细胞凋亡的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(8): 72-77, 86.

Liang YQ, Huang Q, Huang JJ, et al. Dioscin promotes apoptosis of HepG2 cells by inhibiting Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(8): 72-77, 86.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.08.008

薯蓣皂苷抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路促进肝癌细胞凋亡的研究

梁玉琼¹, 黄庆^{2*}, 黄娟娟¹, 梁芳¹, 滕丽娟¹, 郑洋¹

(1. 广西中医药大学赛恩斯新医药学院实验中心, 南宁 530222;

2. 广西中医药大学第一附属医院药理学部, 南宁 530023)

【摘要】 目的 研究薯蓣皂苷(DIO)对人 HepG2 肝癌细胞凋亡的影响及其可能抗癌作用机制。**方法** DIO (0.25、0.5、1、2、4、6 和 8 $\mu\text{mol/L}$) 干预 HepG2 肝癌细胞, MTT 法检测细胞增殖情况, 并计算半数抑制率(IC_{50}); 划痕实验分析细胞的迁移能力, Western blot 检查细胞中凋亡因子及 Wnt/ β -catenin 通路蛋白表达差异。**结果** 与对照组比较, DIO 组 HepG2 细胞抑制率显著升高($P<0.01$), 并诱导细胞在形态学上出现凋亡特点, 呈时间与剂量依赖性; 划痕实验结果显示 DIO 显著抑制 HepG2 细胞的迁移距离; 与对照组比较, DIO 干预细胞 24 h 后, Caspase-3、cleaved Caspase-3 水平明显上调, 而 Bcl-2、 β -catenin 水平显著下调($P<0.05$ 、 $P<0.01$); 采用 LiCl 激活 Wnt/ β -catenin 信号通路, LiCl 组细胞中 Wnt1、 β -catenin 水平较对照组显著上调($P<0.01$); 与 LiCl 组比较, LiCl+DIO 组 HepG2 细胞 Wnt1、 β -catenin、GSK-3 β 蛋白表达显著下调($P<0.01$)。**结论** DIO 体外能够促进 HepG2 肝癌细胞凋亡, 机制可能是其下调 β -catenin 的蛋白表达, 抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路传导, 进而抑制凋亡因子 Bcl-2 表达, 最终诱导细胞凋亡而发挥抗肝癌作用。

【关键词】 薯蓣皂苷; HepG2; 肝癌; Wnt/ β -catenin 信号通路; 细胞凋亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 08-0072-06

Dioscin promotes apoptosis of HepG2 cells by inhibiting Wnt/ β -catenin signaling pathway

LIANG Yuqiong¹, HUANG Qing^{2*}, HUANG Juanjuan¹, LIANG Fang¹, TENG Lijuan¹, ZHENG Yang¹

(1. Experiment Teaching Center, Faculty of Chinese Medicine Science Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530222, China. 2. Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530023)

【Abstract】 Objective To detect the apoptosis effects of dioscin in HepG2 cells and its possible anti-hepatocellular carcinoma mechanisms. **Methods** HepG2 human hepatocellular carcinoma cells were exposed to 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, or 8 $\mu\text{mol/L}$ dioscin, and cell proliferation was measured via MTT assay. The half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) was calculated with the software. A scratch test was used to analyze cell migration ability. Western blot was employed to evaluate the expression of apoptosis and Wnt/ β -catenin-pathway-related proteins. **Results** Compared

【基金项目】 2022 年度广西高校中青年教師科研基础能力提升项目(2022KY1671); 广西自然科学基金项目(2023GXNSFBA026230); 广西中医药大学赛恩斯新医药学院科研项目(2023MS004)。

【作者简介】 梁玉琼(1988—), 女, 硕士, 副教授, 研究方向: 药物毒性及肿瘤药理。E-mail: 1728252596@qq.com

【通信作者】 黄庆(1989—), 男, 硕士, 主管药师, 研究方向: 中药活性成分及质量控制。E-mail: 185307564@qq.com

with the control group, the dioscin-treated HepG2 cells' proliferation was significantly more inhibited, and the inhibition increased in a time- and dose-dependent manner ($P<0.01$). HepG2 cells showed morphological characteristics of apoptosis after they were treated with 1 $\mu\text{mol/L}$ or 2 $\mu\text{mol/L}$ dioscin. The scratch test indicated that the migration distance of HepG2 cells was remarkably reduced when treated with dioscin. In the Western blot experiment, the expression levels of Caspase-3 and cleaved Caspase-3 were visibility up-regulated, while those of Bcl-2 and β -catenin were significantly down-regulated when the cells were treated with dioscin for 24 h ($P<0.05$, $P<0.01$). When LiCl reagent was added to the HepG cells to activate the Wnt/ β -catenin signaling pathway, the expression levels of Wnt1 and β -catenin were remarkably increased compared with those of the control group ($P<0.01$). Compared with the LiCl group, the LiCl + DIO group's expression of Wnt1, β -catenin, and GSK-3 β was significantly decreased ($P<0.01$). **Conclusions** DIO can promote the apoptosis of HepG2 cells by inhibiting β -catenin protein expression and thereby down-regulating the Wnt/ β -catenin signaling pathway. This inhibits apoptosis-related gene Bcl-2 expression, which leads to the induction of cell apoptosis. Therefore, DIO can have an anti-hepatocellular carcinoma effect.

[Keywords] dioscin; HepG2; hepatocellular carcinoma; Wnt/ β -catenin signaling pathway; apoptosis

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC), 最常见的原发性肝癌, 是癌症相关死亡的第三大原因^[1]。肝癌的发病机理尚未明晰, 普遍认为主要出现在与病毒性肝炎感染、酗酒或代谢综合征相关的病变肝中。到目前为止, 肝癌的临床治疗取得了一些进展, 但由于多数患者确诊时已是肝癌晚期, 常规的肝切除术或肝移植术治疗 HCC 已无意义, 需要进行系统且全面的综合抗肿瘤治疗, 包括放疗、化疗及分子免疫治疗等。除此之外, 包括阿霉素、顺铂和 5-氟尿嘧啶 (5-Fu) 在内的药物对 HCC 的生存期也有改善。然而, 临床上使用这些药物的部分患者已出现心脏及神经损害等副作用。因此, 开发新的高效、低毒的抗癌药物对突破 HCC 现有的治疗瓶颈具有重要临床意义。

薯蓣皂苷 (dioscin, DIO) 是一种天然皂苷类化合物, 可从盾叶薯蓣、黄药子等中药中提取, 具有抗肿瘤、抗炎、抗真菌、抗肝纤维化、改善心血管等广泛生物活性。研究表明, DIO 能够抑制肝癌细胞 HepG2^[2]、Huh7^[3] 增殖, 并诱导肝癌细胞凋亡, 但相关机制尚未阐明。细胞凋亡是一种细胞选择主动死亡的过程, 该过程受细胞内外因素的影响。目前研究认为肿瘤诱发的关键因素可能是肿瘤细胞无限增殖与凋亡异常降低^[4], 因此抑制肿瘤细胞增殖, 诱导凋亡成为抗肿瘤的有效治疗手段之一。Wnt/ β -catenin 通路在多种肿瘤中均被过度激活, 能够影响细胞的增殖、凋亡。因此, 本研究拟在体外 HepG2 肝癌模型中, 探讨 DIO 对细胞增殖、凋亡的影响及其可能的抗肝癌机制, 为开发抗肝癌中药新药提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 细胞

HepG2 肝癌细胞购自中国科学院上海细胞库。

1.2 主要试剂与仪器

薯蓣皂苷 (纯度 $\geq 98\%$, 批号: Y04J12Z136341) 购自上海源叶科技有限公司; 胎牛血清 (FBS) (批号: 1347575) 购自美国 GIBCO 公司; DMEM 高糖培养基 (1X), 批号: 319005040 购自维森特生物技术 (南京) 有限公司; Hoechst33258 染色液 (批号: C0003-2) 购自碧云天生物技术研究; 四甲基偶氮唑蓝 (MTT, 批号: M8180)、BCA 蛋白浓度检测试剂盒 (批号: 08E02A46) 购自北京索莱宝科技有限公司; Dimethyl Sulfoxide (DMSO, 批号: 2J242J24) 购自 Sunshine 公司; 兔抗人 β -actin 多克隆抗体 (批号: 60008-1-1g)、兔抗人 β -catenin (批号: 1619501)、Wnt1 (批号: 040319190715)、GSK3 β (批号: 22104-1-AP)、cleaved Caspase-3 (批号: 19677-1) 多克隆抗体及鼠抗人 Caspase-3 (批号: 25546-1-AP)、Bcl-2 (批号: 18654-1-AP) 单克隆抗体购自美国 Proteintech 公司。

倒置相差荧光显微镜 (Olympus, 日本 Nikon 公司); CO₂ 培养箱 (Thermo Scientific, 美国); 酶标仪 (TECAN, 瑞士); 电泳仪、半干转膜仪及凝胶成像系统 (Bio-Rad, 美国); -80 °C 冰箱 (海尔, 中国)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

将对数生长期的 HepG2 肝癌细胞培养在含 10% FBS 的 DMEM 培养基中, 并放入培养箱 (37 °C、5% CO₂) 中孵育, 每天 1 次的频率更换培养液,

待细胞长至对数期时,加入 0.25%胰蛋白酶消化并传代。取一部分细胞于培养箱中继续培养,其余细胞进行后续实验。

1.3.2 MTT 法检测 HepG2 细胞增殖

将对数生长期的 HepG2 细胞消化,以 2×10^4 /孔接种在 96 孔板,24 h 后吸弃细胞上清液,加入不同浓度(0.25、0.5、1、2、4、6 和 8 $\mu\text{mol/L}$)DIO,并设对照组(不加 DIO)和空白孔(无细胞),每组设 6 个复孔。24 h、48 h 后,各孔分别加入 10 μL MTT(5 mg/mL)继续培养 4 h。吸去孔内培养液,加入 DMSO(每孔 200 μL),采用酶标仪 490 nm 检测各孔吸光值,计算细胞抑制率。

1.3.3 Hoechst33258 染色观察细胞凋亡

HepG2 细胞接种在 6 孔板(1×10^4 /孔),培养 24 h 后,细胞分为 3 组:对照组,常规培养(不加药物);1 $\mu\text{mol/L}$ DIO 组和 2 $\mu\text{mol/L}$ DIO 组,每组 3 个复孔。各组分别加入 DMSO 和不同浓度的 DIO 24 h 后,按照试剂盒说明书染色细胞,拍照记录细胞凋亡情况。

1.3.4 划痕实验检测细胞体外迁移能力

取 2 mL HepG2 细胞(密度为 5×10^5 /mL)种于 6 孔板 24 h,等细胞长至 80%~90%时,各孔使用枪头进行划痕并清洗细胞,按照“1.3.3”项下方法进行分组与给药,每组设 3 个复孔。分别于 0、24 h 观察划痕内的 HepG2 细胞,拍照。

1.3.5 Western blot 法检测 HepG2 细胞中凋亡相关基因及 β -catenin 蛋白表达

按照“1.3.2”项下方法对 HepG2 细胞进行处理,调整细胞密度为 1×10^6 /mL,并放入培养箱中孵育过夜后,细胞分为对照组和 1 $\mu\text{mol/L}$ DIO 组、2 $\mu\text{mol/L}$ DIO 组。培养 24 h 后,每个培养皿的细胞加入 300 μL RIPA 裂解液,10 min 后冰上快速刮取细胞,离心并收集细胞总蛋白。根据说明书进行各组蛋白浓度检测。制胶,SDS-PAGE 凝胶电泳分离后转到 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉封闭 1 h 后,分别加入一抗(Caspase-3、cleaved Caspase-3、Bcl-2 和 β -catenin)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,TBST 洗膜,加入二抗常温孵育 2 h,将 PVDF 膜置于 Bio-Rad 凝胶成像系统显影。结果采用 Image J 软件分析条带灰度值。

1.3.6 Western blot 法检测 DIO 对 Wnt/ β -catenin 通路相关蛋白表达的影响

取对数生长期的 HepG2 细胞接种到 6 孔板中,分为对照组、LiCl 组(20 mmol/L)、LiCl+DIO 组(2

$\mu\text{mol/L}$),每组设 6 个复孔。药物处理 24 h 后,同“1.3.5”项下提取细胞并测定蛋白浓度。Western blot 法检测 Wnt/ β -catenin 通路相关蛋白的表达水平。

1.4 统计学方法

数据采用 SPSS 19.0 软件统计分析,计量资料以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。两组间比较 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DIO 对 HepG2 肝癌细胞增殖的抑制作用

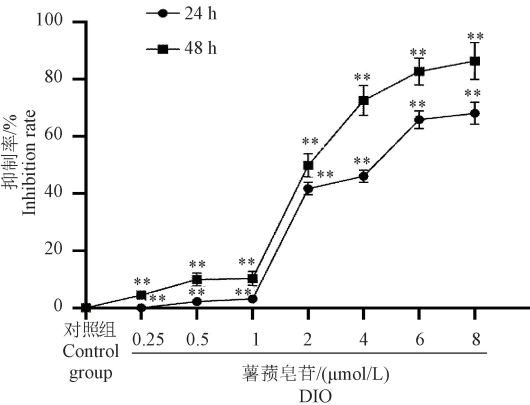
与对照组(0 $\mu\text{mol/L}$)比较,HepG2 细胞经 DIO(0.25、0.5、1、2、4、6 和 8 $\mu\text{mol/L}$)刺激 24 h、48 h 后,其可显著抑制细胞增殖($P<0.01$),且随着给药时间的延长及浓度的增加其抑制作用增强。经计算 IC_{50} (24 h、48 h)值分别为 4.19、2.32 $\mu\text{mol/L}$,因此后续实验选择 1、2 $\mu\text{mol/L}$ DIO 干预 HepG2 细胞,观察其抗肝癌作用及相关机制,见图 1。

2.2 DIO 对 HepG2 肝癌细胞凋亡形态学的影响

Hoechst 荧光染色结果显示,对照组细胞未出现凋亡特征。然而,相较于对照组,1、2 $\mu\text{mol/L}$ DIO 组细胞出现了典型的凋亡形态学特征,主要表现为核染色质浓缩聚集及碎块状致密浓染,并发出蓝白色荧光等;同时,HepG2 细胞 DIO 刺激后凋亡程度随 DIO 浓度的提高呈逐渐增强的趋势。提示 DIO 能够诱导 HepG2 细胞出现凋亡细胞核形态,诱导细胞凋亡,见图 2。

2.3 DIO 对 HepG2 肝癌细胞迁移能力的影响

如图 3 所示,划痕实验结果显示,给药 24 h 后,



注:与对照组比较, ** $P<0.01$

图 1 DIO 对 HepG2 细胞增殖的抑制作用($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Note. Compared with the control group, ** $P<0.01$.

Figure 1 Inhibition of DIO on proliferation of HepG2 cells

对照组 HepG2 细胞几乎长满划痕。与对照组比较, 1、2 $\mu\text{mol/L}$ DIO 组的划痕仍有间隙, 细胞迁移距离明显缩短。可知, DIO 长时间干预 HepG2 肝癌细胞可导致细胞的迁移能力减弱。

2.4 DIO 对 HepG2 肝癌细胞凋亡相关表达的影响

如图 4 所示, 与对照组比较, 1、2 $\mu\text{mol/L}$ DIO 组细胞 Caspase-3、cleaved Caspase-3 蛋白表达水平均

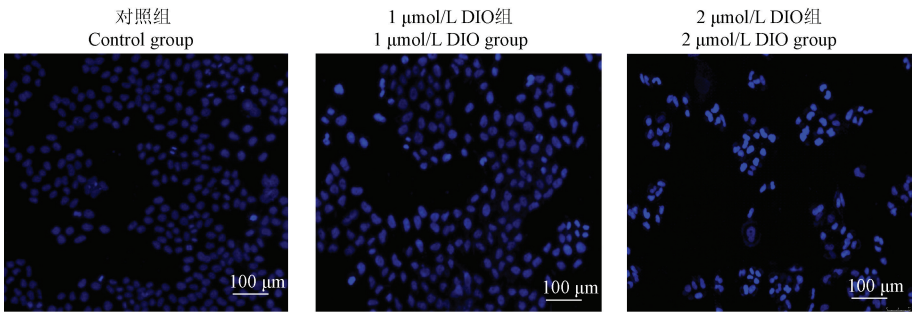


图 2 DIO 对 HepG2 细胞凋亡形态的影响

Figure 2 Effect of DIO on apoptosis features of HepG2 cells

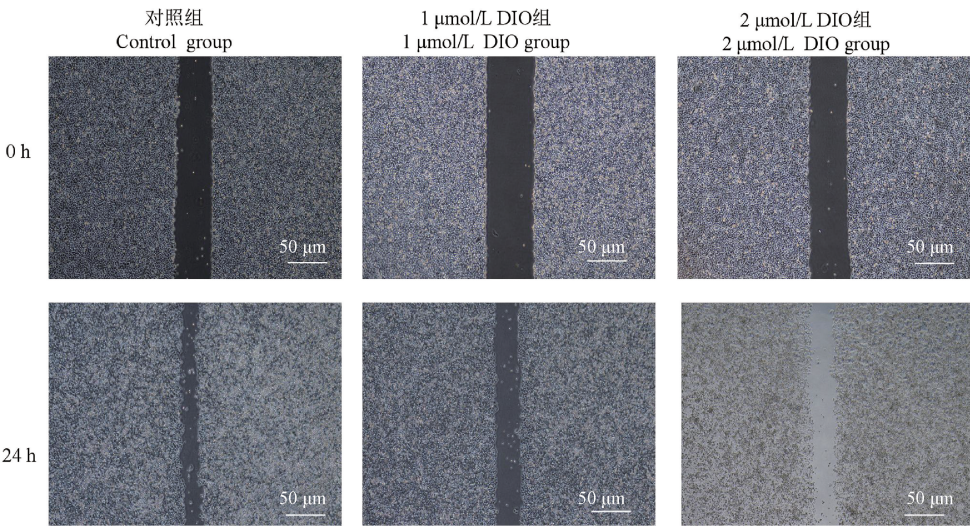
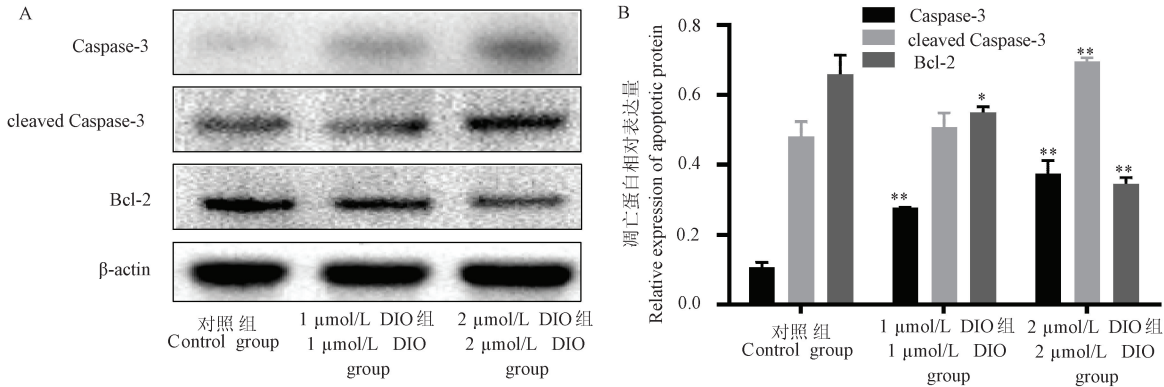


图 3 划痕实验

Figure 3 Changes of migration in HepG2 cells



注: A: HepG2 细胞内凋亡蛋白表达条带; B: HepG2 细胞内凋亡蛋白相对表达量。与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 4 DIO 对凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Note. A, Protein expression band of Caspase-3, cleaved Caspase-3 and Bcl-2 in HepG2 cells. B, Relative protein expression of Caspase-3, cleaved Caspase-3 and Bcl-2 in HepG2 cells. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 4 Expression of DIO on apoptosis-related proteins of HepG2 cells

明显升高, Bcl-2 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$ 、 $P<0.01$), 其中 $2\text{ }\mu\text{mol/L}$ DIO 对 Bcl-2 的抑制作用最强。提示 DIO 可促进 HepG2 细胞发生凋亡作用, 且呈浓度依赖的特点。

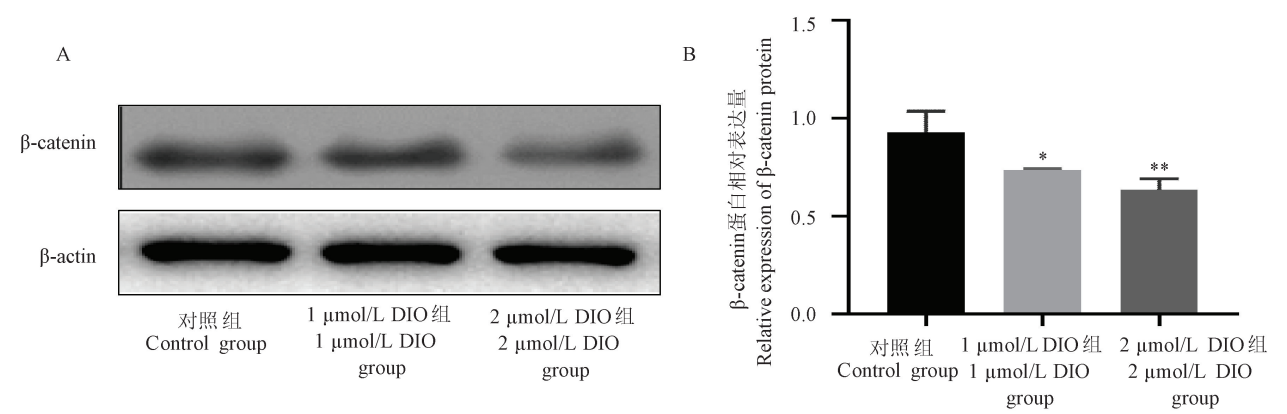
2.5 DIO 对 HepG2 细胞 β -catenin 蛋白表达的影响

与对照组比较, DIO 处理组的细胞中 β -catenin 蛋白表达随干预浓度的增加而逐渐降低 ($P<0.05$ 、 $P<0.01$), 提示 DIO 可以使 HepG2 细胞中的 Wnt/ β -

catenin 信号通路呈抑制状态, 发挥抗 HCC 作用, 见图 5。

2.6 DIO 对 HepG2 细胞 Wnt/ β -catenin 通路相关蛋白表达的影响

如图 6 所示, 与对照组比较, LiCl 组 HepG2 细胞 Wnt1、 β -catenin 的蛋白表达水平显著上调 ($P<0.01$); 与 LiCl 组比较, LiCl+DIO 组 HepG2 细胞 Wnt1、 β -catenin、GSK-3 β 的蛋白表达显著下调 ($P<0.01$)。

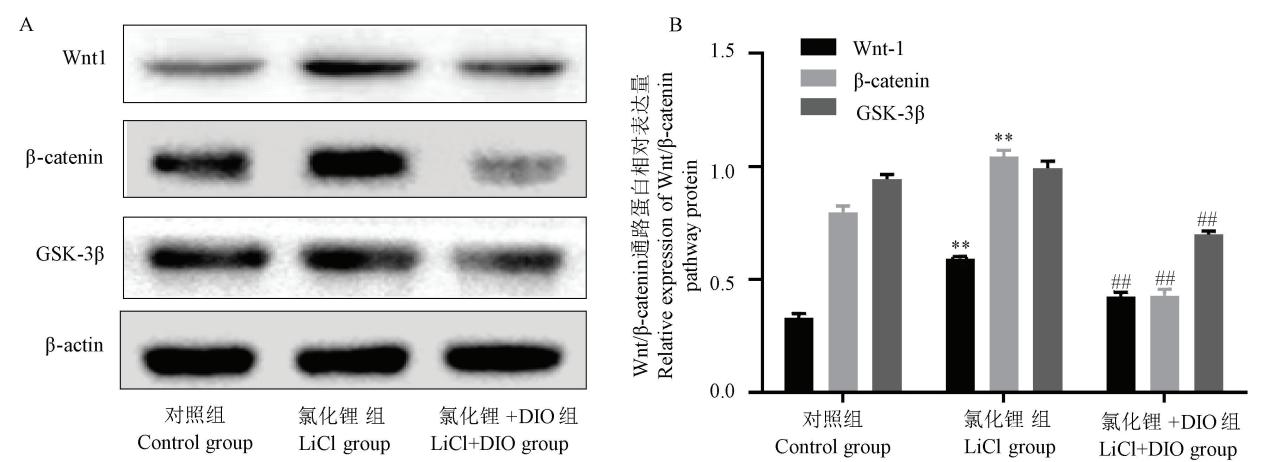


注: A: HepG2 细胞内 β -catenin 蛋白表达条带; B: HepG2 细胞内 β -catenin 蛋白相对表达量。与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 5 DIO 对 HepG2 细胞 β -catenin 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Note. A, Protein expression band of β -catenin in HepG2 cells. B, Relative protein expression of β -catenin in HepG2 cells. Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 5 Expression of DIO on β -catenin proteins of HepG2 cells



注: A: HepG2 细胞内 Wnt/ β -catenin 通路蛋白表达条带; B: HepG2 细胞内 Wnt/ β -catenin 通路蛋白相对表达量。与对照组比较, ** $P<0.01$; 与 LiCl 组比较, ### $P<0.01$ 。

图 6 DIO 对 HepG2 细胞 Wnt/ β -catenin 通路蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Note. A, Protein expression band of Wnt1, β -catenin and GSK-3 β in HepG2 cells. B, Relative protein expression of Wnt1, β -catenin and GSK-3 β in HepG2 cells. Compared with the control group, ** $P<0.01$. Compared with the LiCl group, ### $P<0.01$.

Figure 6 Differential expression of DIO on Wnt/ β -catenin singal pathway related proteins of HepG2 cells

3 讨论

肝癌是常见的恶性肿瘤之一,发病率、死亡率呈逐年上升趋势,据数据统计显示,2040 年将新增 140 万例肝癌病例,且肝癌死亡人数比 2020 年增加 56.4%^[5]。这些结果表明,加强对现有的肝癌预防措施,并针对肝癌高危人群进行早期筛查,对提高 HCC 患者的生存周期具有关键作用。

近年来,中药天然产物 DIO 已被证实具有抗 HCC 作用。Chen 等^[6]发现 DIO 能诱导 HepG2 肝癌细胞凋亡,并且细胞中 Caspase-3 表达增加和 Bcl-2 表达下调,并减弱细胞迁移与侵袭能力。与此同时,课题组前期研究同样也发现 DIO 能够抑制 HepG2 细胞增殖并促进细胞凋亡^[7],并且对正常人肝细胞的毒性作用较小^[8]。但 DIO 调节 HepG2 细胞凋亡的机制研究尚处于空白阶段。Wnt/ β -catenin 信号通路参与 HCC 的生长与发展,但该通路是否被 DIO 调控,目前尚不清楚。因此,本研究拟通过研究 DIO 对 HepG2 细胞增殖、凋亡的影响,探讨其是否通过调节 Wnt/ β -catenin 信号通路影响细胞凋亡。

本研究首先采用 MTT 实验检测 DIO 对 HepG2 细胞增殖的影响,结果显示 DIO 对细胞的增殖呈显著抑制趋势,提示 DIO 可直接抑制 HepG2 细胞的生长,具有抗 HCC 效应。划痕实验结果显示,1、2 $\mu\text{mol/L}$ DIO 组细胞迁移距离明显缩短,且以 2 $\mu\text{mol/L}$ DIO 组较为显著,表明 DIO 对细胞的迁移能力有抑制作用。Hoechst 染色检测结果显示,DIO 处理组细胞出现凋亡的形态学变化,核染色质聚集且亮度增高。以上结果说明 DIO 能够抑制细胞增殖并促进凋亡,提示该药物可作为治疗肝癌的潜在候选药物。

细胞凋亡的发生由一系列蛋白表达所调控,其中 Bcl-2、Bax 是凋亡代表性因子,Caspase-3 是凋亡执行蛋白^[9]。当 Bcl-2 表达上调时,Bcl-2 可以阻止 Bax 外移,进而抑制线粒体释放相关因子,最终导致抗凋亡作用;反之,当 Bcl-2 表达下调时,促进细胞凋亡。本研究在 DIO 处理组细胞出现凋亡形态的基础上进一步检测了凋亡相关蛋白的表达,发现 DIO 各剂量组 HepG2 细胞 Caspase-3、cleaved Caspase-3 蛋白表达增加,Bcl-2 蛋白表达减少,提示 DIO 确实通过诱导细胞凋亡发挥其抗 HCC 作用。

研究表明 Wnt/ β -catenin 信号通路在 HCC 中异常活化,且该通路对肿瘤细胞的凋亡呈负性调控作

用^[10]。 β -catenin 是调控 Wnt/ β -catenin 通路开启的关键影响因子。当 β -catenin 呈高表达时,通路启动,从而影响 Wnt1、GSK-3 β 等相关特异基因的表达;反之,通路关闭。为验证 DIO 是否通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路发挥抗 HCC 作用,本研究首先检测 β -catenin 的表达差异。结果显示,DIO 作用 24 h 后,HepG2 细胞中 β -catenin 蛋白表达显著下调,表明 DIO 可以通过影响 Wnt/ β -catenin 通路发挥抗 HCC 作用。此外,为明确 DIO 抗肿瘤与 Wnt/ β -catenin 信号通路间的关系,本研究还进一步使用 Wnt/ β -catenin 信号通路激动剂 LiCl 干预肝癌细胞,结果显示,与对照组比较,LiCl 组 HepG2 细胞 Wnt1、 β -catenin 蛋白表达显著上调;与 LiCl 组比较,LiCl+DIO 2 $\mu\text{mol/L}$ 组 HepG2 细胞 Wnt1、 β -catenin、GSK-3 β 蛋白表达显著下调。以上研究结果表明,DIO 能够通过下调 β -catenin 蛋白表达,阻抑 Wnt/ β -catenin 信号通路传导,最后抑制肝癌进程。也有报道表明,Wnt/ β -catenin 信号通路中 Wnt 因子可通过上调 Bcl-2 的表达,进而发挥抗凋亡作用^[11]。因此,结合本研究结果推测,DIO 通过下调 β -catenin 蛋白表达进而抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路传导,然后抑制下游相关基因 Bcl-2 表达,最终诱导肝癌细胞凋亡。

综上所述,DIO 体外具有促进 HepG2 肝癌细胞凋亡作用,其机制可能是其通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路传导,进而活化 Caspase-3,抑制下游相关基因 Bcl-2 表达,最终诱导肝癌细胞凋亡。本研究从体外实验进一步证实 DIO 抗 HCC 疗效及机制,为 DIO 在抗肝癌开发应用中提供了实验理论依据。

参考文献:

- [1] CHAKRABORTY E, SARKAR D. Emerging therapies for hepatocellular carcinoma (HCC) [J]. Cancers, 2022, 14 (11): 2798.
- [2] OKUBO S, OHTA T, SHOYAMA Y, et al. Steroidal saponins isolated from the rhizome of *Dioscorea tokoro* inhibit cell growth and autophagy in hepatocellular carcinoma cells [J]. Life, 2021, 11(8): 749.
- [3] HSIEH M J, YANG S F, HSIEH Y S, et al. Autophagy inhibition enhances apoptosis induced by dioscin in Huh7 cells [J]. Evid Based Complementary Altern Med, 2012, 2012: 134512.
- [4] REN Y, WANG R, WENG S, et al. Multifaceted role of redox pattern in the tumor immune microenvironment regarding autophagy and apoptosis [J]. Mol Cancer, 2023, 22(1): 130.