异戊烯基香豆素类化合物抑制 A549 细胞增殖作用及其构效关系

吴新玉[1]，成蕾[1]，邓艳[1]，王婷婷[1]，刘洪[1]，王森[2]，叶林虎[1,2*]
1. 毕节市第一人民医院 药剂科，贵州 毕节 551700
2. 遵义医科大学，贵州 遵义 563000

摘 要：目的 探讨异戊烯基香豆素类化合物对 A549 肺癌细胞增殖的影响，并对其构效关系及作用机制进行初步探讨。**方法** 将人肺癌细胞 A549 进行体外培养，采用不同浓度异戊烯基香豆素类化合物甘草香豆素（GCM）、甘草酚（GC）、补骨脂定（PSO）、香豆雌酚（COM）、7-去甲基软木花椒素（DE）、7, 2', 4'-trihydroxy-5-methxy-3-penylcoumarin（TMP）和蛇床子素（OST）分别处理肺癌 A549 细胞 36、72 h 后，通过结晶紫染色法检测细胞增殖活性；采用蛋白免疫印迹法（Western blotting）检测细胞中 TOPK、C-PARP、Bcl-2、Bax、p62、LC3B 蛋白表达水平。**结果** 受试化合物对 A549 细胞增殖的抑制作用存在浓度和时间相关性；10 μmol/L 的 GCM、GC、PSO、COM、DE、TMP 组 Bcl-2 表达均下降（$P<0.05$）；A549 细胞经 10 μmol/L GCM、GC、PSO 处理后，TOPK 的表达显著降低，C-PARP、LC3 Ⅱ、p62 的表达显著升高（$P<0.05$）。**结论** 异戊烯基香豆素类化合物 GCM、GC、PSO 可显著抑制 A549 细胞的增殖活性，且其抗增殖活性可能与香豆素母核苯环上的异戊烯基结构取代和母核 C-3 位上苯环的取代及其环上游离的羟基有关；其抗 A549 细胞增殖的作用机制可能与促进细胞凋亡，诱导细胞发生不完全自噬并抑制自噬流有关。

关键词： 异戊烯基香豆素；A549 细胞；细胞增殖；构效关系；甘草香豆素；甘草酚；补骨脂定；香豆雌酚；7-去甲基软木花椒素
中图分类号： R285 **文献标志码：** A **文章编号：** 1674 - 5515(2022)10 - 2190 - 07
DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.10.004

Inhibition of proliferation of A549 cells by prenylated coumarins and their structure-activity relationship

WU Xin-yu[1], CHENG Lei[1], DENG Yan[1], WANG Ting-ting[1], LIU Hong[1], WANG Sen[2], YE Lin-hu[1, 2]
1. Department of Pharmacy, The First People's Hospital of Bijie, Bijie 551700, China
2. Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China

Abstract: Objective To explore the influence of prenylated coumarins on the proliferation of lung cancer cells and preliminary explored on its structure-activity relationship and inhibitory mechanism. **Methods** The human lung cancer cell A549 was cultured *in vitro*, the cells were treated with different concentrations of Glycycoumarin (GCM), Glycyrol (GC), Psoralidin (PSO), Coumestrol (COM), Demethylsuberosin (DE), 7,2',4'-trihydroxy-5-methxy-3-penylcoumarin (TMP), Osthole (OST) for 36 and 72 h. Crystal violet staining was used to detect the activity on the proliferation of A549 cells. Western blotting was used to detect the protein expressions of TOPK, C-PARP, Bcl-2, Bax, p62 and LC3B in the cells. **Results** The test compounds inhibited the proliferation of A549 cells in a concentration and time-dependent manner. Bcl-2 expression in 10 μmol /L GCM, GC, PSO, COM, DE, TMP groups were decreased ($P < 0.05$). After treatment with 10 μmol/L GCM, GC and PSO, the expression of TOPK in A549 lung cancer cells was significantly decreased, while the expression of C-PARP, LC3II and p62 were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Prenylated coumarins compound of GCM, GC, PSO can significantly inhibit proliferation activity of A549 cells, and its anti-proliferative activity may be substituted with isoprene structures on coumarin phenylring and mother core. The substitution of the C-3-bit benzene ring is related to the hydroxyl group across the ring, the mechanism of the anti-A549 cell proliferation may be related to the promotion of apoptosis, inducing cells induced by incomplete autophagy and inhibiting autophagy stream.

收稿日期： 2022-06-16
基金项目： 贵州省科技计划项目（黔科合支撑[2020]4Y118 号）；毕节市科技局重点实验室项目（毕科合字[2019] 1 号）
作者简介： 吴新玉，女，药师，主要研究方向为临床药学基础研究。E-mail: 1174026219@qq.com
***通信作者：** 叶林虎，男，主任药师，硕士生导师，主要从事医院药学研究。E-mail: yelinhu@126.com

Key words: prenylated coumarins; A549 cells; cell proliferation; structure-activity relationship; glycycoumarin; glycyrol; psoralidin; coumestrol; demethylsuberosin

恶性肿瘤是严重威胁人类健康的一大类疾病，肺癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一。我国肺癌的发病率和死亡率在恶性肿瘤顺位排序中都是位居首位，其中非小细胞肺癌占 80%左右[1]。目前肺癌的主要治疗方法有手术切除、化疗和放疗。目前以表皮生长因子受体（EGFR）和间变性淋巴瘤激酶（ALK）等为靶点的靶向抑制剂如克唑替尼、吉非替尼和厄洛替尼等，在临床已取得明显的治疗效果，但在长期使用后，这些药物也相继出现了耐药现象[2]。因此，新型靶向抗肿瘤药物的开发具有重要的意义。

从天然产物中寻找和筛选抗肿瘤活性物质，或以天然抗肿瘤活性物质作为先导化合物进行结构修饰是目前抗肿瘤小分子药物开发的研究热点[3-4]。据报道，多种中药提取物或其单体成分具有较好的抗肿瘤作用[5]。甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.为药食两用中药，以干燥根及根茎入药，具有健脾益气、清热解毒、祛痰止咳、缓急止痛、调和诸药的功能[6]。甘草富含黄酮、香豆素、萜类及其苷类化合物等[7]，其在保肝、抗炎、抗氧化和抗肿瘤等方面都有较强的药理活性[8]。近年来的研究发现甘草中的部分异戊烯基香豆素具有较好的抗肿瘤和保肝作用[9-10]，然而，目前关于甘草中异戊烯基化合物的抗肺癌作用及其构效关系方面的研究报道仍较少[11]，有待于进一步的深入研究。因此，本研究选取甘草中的 2 个主要异戊烯基香豆素类化合物甘草香豆素（glycycoumarin，GCM）、甘草酚（glycyrol，GC）及其结构类似物补骨脂定（psoralidin，PSO）、香豆雌酚（coumestrol，COM）、蛇床子素（osthol，OST）和 7-去甲基软木花椒素（demethylsuberosin，DE）、7,2',4'-trihydroxy-5-methxy-3-penylcoumarin（TMP）（结构式见图 1），对肺癌 A549 细胞增殖的影响及其构效关系进行初步研究，以期为今后该类化合物的开发提供思路，为研制出高效、低毒，具有我国知识产权的天然抗肿瘤药物提供科学依据和实验基础。

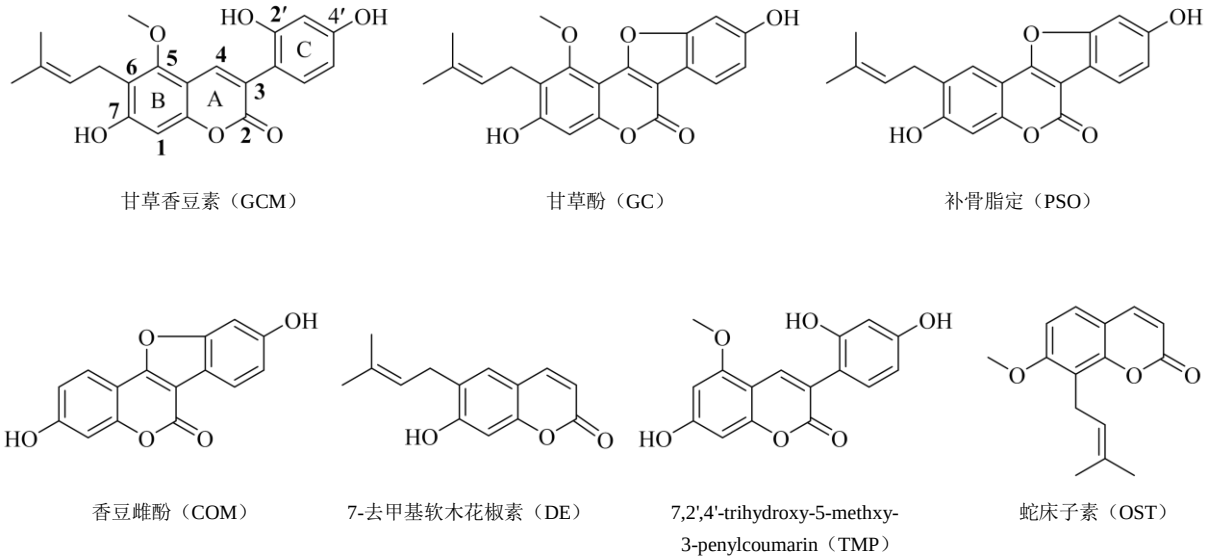


图 1　异戊烯基香豆素类结构式

Fig. 1　Prenylated coumarins structural formula

1　材料

1.1　细胞株

人肺癌细胞株 A549（美国模式培养物保藏中心 ATCC）。

1.2　药品与试剂

GCM（质量分数 99.0%，批号 DSTDG010801）购自成都德思特生物技术有限公司；GC、COM、TMP（质量分数 99.0%，批号 BBP03379、BBP02765、BBP02706）购自云南西力生物技术有限公司；PSO、DE、OST（质量分数 99.0%，批号 170503、200613、484128）购于上海融禾医药科技发展有限公司；BI 胎牛血清（批号 2128196）购自上海逍鹏生物科技

有限公司；Han’s F-12k 培养基（批号 WH0021k251）购自武汉普诺赛生命科技有限公司；高效 RIPA 裂解液（批号 20210908），BCA 蛋白浓度测定试剂盒（批号 20211013），SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒（批号 202111113）均购自北京索莱宝科技有限公司；彩虹 180 广谱蛋白 Marker（批号 01042490），ECL Plus 超敏发光液（批号 MA0186-Sep-17G）购自大连美仑生物科技有限公司；抗体源自胸腺－淋巴细胞的蛋白激酶（TOPK，批号 4942）、聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶（C-PARP，批号 5625）、微管相关蛋白 1 轻链 3B（LC3B，批号 3868）均购自美国 CST 公司；抗体 p62（批号 A7558）、Bcl-2 相关 X 蛋白（Bax，批号 A0207 均购自 abclonal 公司）；抗体 B 淋巴细胞瘤 2（Bcl-2，批号 12789-1-AP）、甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH，批号 10494-1-AP）、β-actin（批号 20536-1-AP）；β-微管蛋白基因（β-tubulin，批号 100068-1-AP）购自 Proteintech 公司；山羊抗兔（批号 SA00001-2）购自 Proteintech 公司；聚偏二氟乙烯膜（PVDF）（批号 R1CB71161）购自德国 Merck 公司。

1.3 仪器

Multiskan FC 型酶标仪、BB150 型二氧化碳培养箱、ST16R 型高速冷冻离心机（赛默飞世尔上海仪器有限公司）；HFsafe-1200LCB2 型生物安全柜（上海力申科学仪器有限公司）；XP305AS 型电子天平（上海析平科学仪器有限公司）；BDS400 型倒置光学显微镜（重庆奥特光学仪器有限责任公司）；GZX-9140MBE 型电热鼓风干燥箱（上海博讯实业有限公司医疗设备厂）；LDZF-50KB 型立式压力蒸汽灭菌锅（上海申安医疗器械厂）；TS-1000 型脱色摇床（海门其林贝尔仪器制造有限公司）；DYY-6C 型电泳仪（北京六一生物科技有限公司）。

2 方法

2.1 细胞培养

人肺癌 A549 细胞用含 10% FBS 的 Han’s F-12k 完全培养基，在 37 ℃、5% CO_2 饱和湿度条件下培养。细胞密度达 80%～90%时，对细胞进行传代培养，实验时取对数生长期细胞。

2.2 结晶紫法检测细胞增殖

取对数生长期的 A549 细胞，调整细胞密度为 8×10^4/mL，接种到 6 孔板，每孔 2 mL，实验分为 6 组，每组 3 个复孔，置于 37 ℃、5% CO_2 的培养箱中培养。待细胞融合度达 50%～60%（依照实验目的选择细胞融合度）时进行药物处理，分别加入 0.00、1.25、2.50、5.00、10.00、20.00 μmol/L 的 GC、GCM、PSO 及 5、10、20、40、80 μmol/L 的 COM、DE、TMP、OST；对照组给予含 0.08% DMSO 的 Han’s F-12k 培养基，将 6 孔板置于 37 ℃、5% CO_2 的培养箱中孵育 36、72 h 后，吸除细胞废液，用 PBS 润洗 2 次，吸干，每孔加入 2 mL 1%戊二醛溶液，放置于摇床，室温下固定 15 min，去除戊二醛，PBS 润洗 2 次，吸干，每孔加入 2 mL 0.02%的结晶紫溶液染色 30 min，去离子水冲洗去掉残留的结晶紫染液至接近无色，吸干至干燥，每孔加 8 mL 75%乙醇，置于脱色摇床上 4～6 h 摇动至细胞中结晶紫全部溶出，最后用酶标仪在 570 nm 波长下测定吸光度（*A*）值。

细胞存活率＝$A_{给药}/A_{对照}$

2.3 Western blotting 法检测 A549 细胞中 TOPK、C-PARP、Bax、Bcl-2、p62、LC3B 蛋白表达水平

按 2.2 项下进行细胞培养和整理，A549 细胞加入浓度为 10 μmol/L 的 GC、GCM、PSO、COM、DE、TMP 及 10、20、40 μmol/L 的 OST，对照组给予含 0.08% DMSO 的 Han’s F-12k 培养基，置于细胞培养箱孵育 36 h 后，吸除细胞废液，用预冷的 PBS 清洗 2 次，每孔（6 孔板）加入 60～80 μL 的 RIPA 裂解液（含蛋白酶抑制剂），于冰上裂解 15～30 min，用细胞刮刀将细胞刮下，转移至预冷的 EP 管中（整个过程在冰袋上操作），12 000 r/min、4 ℃下离心 20 min，收集上清液即为蛋白样品。用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白定量（样品调至浓度一致），沸水浴中加热 10 min 变性处理。配制分离胶和浓缩胶，加入蛋白样品和蛋白 Marker 进行垂直电泳的跑胶，80 V 电压电泳，样品进入分离胶中后，电压调整至 120 V，溴酚蓝指示剂至分离胶底端，终止电泳，采用湿转法将蛋白转到聚偏二氟乙烯（PVDF）膜上，用 5%脱脂奶粉将膜封闭 2 h，TBST 缓冲液清洗 3 次，每次 10 min，分别加入 TOPK、C-PARP、Bax、Bcl-2、p62、LC3B 抗体，4 ℃孵育过夜，PVDF 膜室温孵育 30 min 后，用 TBST 缓冲液清洗膜 3 次，每次 10 min，加入二抗室温孵育 2 h，用 TBST 缓冲液洗 PVDF 3 次，每次 10 min，加 ECL 显色剂，于暗室中利用 X 胶片曝光鉴别蛋白含量及位置。用 Image 分析目标蛋白灰度值与内参灰度值的比值评价蛋白的相对表达量。

2.4　统计学分析

数据采用 Prism 8.0.2 统计软件进行分析，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析。

3　结果

3.1　香豆素类化合物对 A549 细胞增殖的影响

如图 2 所示，经不同浓度的 GCM、GC、PSO、COM、DE、TMP、OST 处理 A549 细胞 36、72 h 后，结果显示，在一定浓度范围内，细胞存活率随着处理时间和浓度的增加而降低。GCM、GC、PSO 对 A549 细胞增殖抑制作用最为显著，36 h 时 IC_{50} 值分别为 9.187、17.300、12.540 μmol/L；72 h 时 IC_{50} 值分别为 6.890、6.702、7.787 μmol/L；COM、DE、TMP、OST 的 IC_{50} 值均大于 80.000 μmol/L。

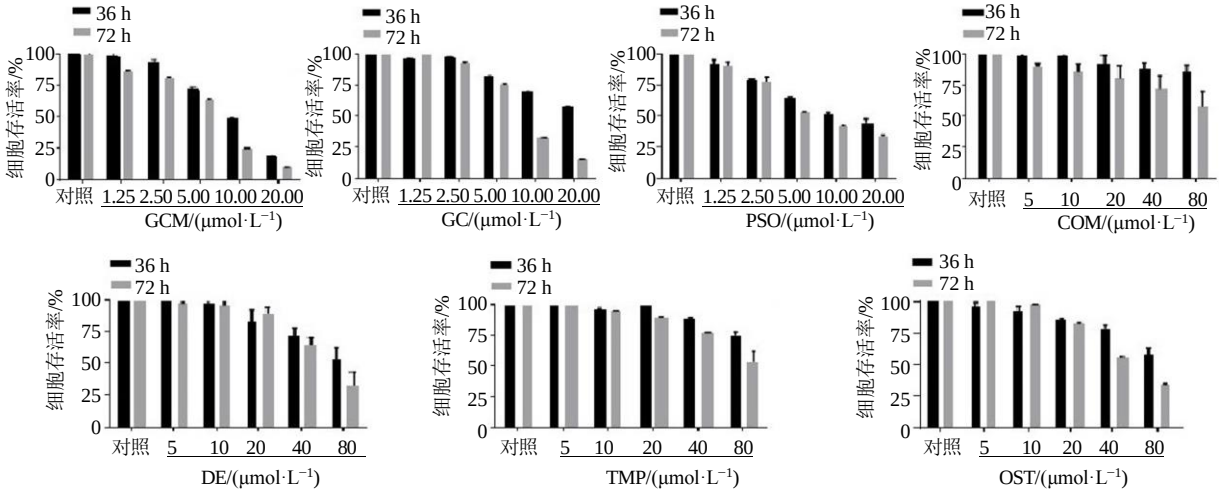


图 2　A549 细胞存活率比较

Fig. 2　Comparison on A549 Cell viability

3.2　香豆素化合物对 A549 细胞中 TOPK、C-PARP、Bcl-2、Bax、p62、LC3 蛋白表达的影响

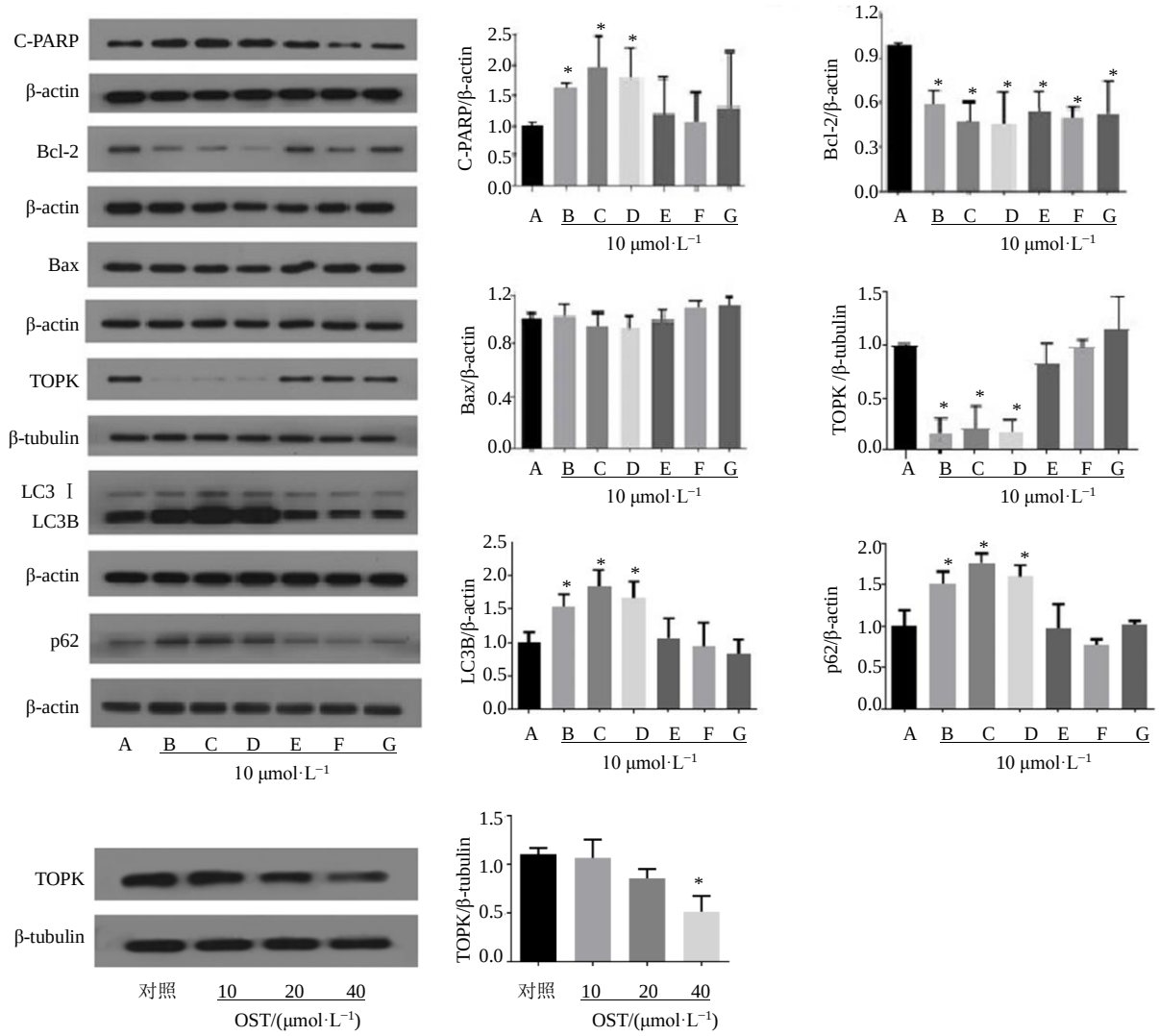
结果如图 3 所示，A549 细胞经浓度为 10 μmol/L 的 GCM、GC、PSO、COM、DE、TMP 处理 36 h 后，与对照组比较，GCM、GC、PSO、COM、DE、TMP 组 Bcl-2 表达显著下降（P＜0.05）；GCM、GC、PSO 组处理后，细胞中的 C-PARP、p62、LC3B 表达显著升高，TOPK 表达均显著下降（P＜0.05）；OST 40 μmol/L 组 TOPK 表达显著降低（P＜0.05）。而 COM、DE、TMP 组的 TOPK、C-PARP、p62、LC3B 表达未发生明显变化。此外，各组细胞中的 Bax 表达均未发生明显变化。

3.3　异戊烯基香豆素抗肺癌构效关系

为了评价香豆素母核上的异戊烯基及其他取代基团对其抗癌活性的影响，将 7 个香豆素化合物进行了比较。虽然 GCM、GC、PSO、COM、DE、OST 和 TMP 都具有相同的香豆素母核，但其抗肿瘤活性却有明显差异，其活性强弱为 GCM＞GC＞PSO＞DE≈OST＞COM≈TMP。其中 GCM、GC、PSO、OST、DE 在香豆素母核的 B 环上均有相同的异戊烯基取代，抗肿瘤活性也均比其他非异戊烯基取代的强，初步推测 B 环上异戊烯基的取代可能与活性有关。通过 GC 与 COM 及 GCM 和 TMP 的比较，进一步表明 B 环上异戊烯基的取代对活性的贡献具有重要的作用，可能是其活性中心。与 GC、GCM 和 PSO 相比较，DE 在香豆素母核上的 C-3 位没有苯环取代，表明在活性中心存在的前提下，C-3 位苯环的取代能增加抗肿瘤活性。通过 PSO 与 GC 和 GCM 的比较，显示 C-5 位上甲氧基的取代有助于增强活性。通过 GC 与 GCM 的比较，显示 2′-羟基的存在也有助于增强活性。同样，A549 细胞经 GC、GCM、PSO 处理后，通过 C-PARP、p62、LC3B、和 Bcl-2 表达的变化情况，也显示出与抗增殖活性相似的趋势。

4　讨论

参与细胞凋亡的主要有蛋白 Bcl-2、Bax、C-PARP 等。其中 Bcl-2 和 Bax 它们分别是抗凋亡蛋白和促凋亡蛋白[12-13]。PARP 是 Caspase3 的切割底物，Caspase3 被激活后可通过裂解 PARP，使得总的 PARP 减少，C-PARP 增加，导致 PARP 失去正



与对照组比较：$^{*}P<0.05$

$^{*}P < 0.05$ *vs* control group

A-对照　B-甘草香豆素　C-甘草酚　D-补骨脂定　E-香豆雌酚　F-7-去甲基软木花椒素　G-7,2',4'-trihydroxy-5-methxy-3-penylcoumarin

A-control　B-GCM　C-GC　D-PSO　E-COM　F-DE　G-TMP

图 3　Western blotting 检测 A549 细胞中 TOPK、C-PARP、Bax、Bcl-2、p62、LC3B 蛋白表达

Fig. 3　Protein expression of TOPK、C-PARP、Bcl-2、Bax、p62、LC3B in A549 cells were detected by Western blotting

常功能，最终使得核小体间 DNA 降解，细胞发生凋亡[14]。本研究结果显示，细胞经 10 μmol/L 的 GC、GCM、PSO、COM、DE、TMP 处理后均诱导了 Bcl-2 表达下降，Bax 表达均未发生明显变化；C-PARP 的蛋白表达水平显著升高，表明其能够通过调控 Bcl-2、C-PARP 蛋白的表达诱导人肺癌 A549 细胞发生凋亡。

LC3B 为经典的自噬标志性蛋白分子[15]；p62 是一种泛素结合蛋白，是自噬的标志性底物，可以反映自噬活性，当过度自噬时 p62 被降解，当发生不完全自噬时则不断累积[16]。本研究结果显示，细胞经 10 μmol/L 的 GCM、GC、PSO 处理后，LC3B 与 p62 的蛋白表达水平均显著升高，COM、DE、TMP 均无明显变化。以上结果表明了 10 μmol/L 的 GCM、GC、PSO 可诱导自噬发生的同时诱发 p62 的上调，这可能是通过其对细胞诱发不完全自噬，抑制自噬流，而非经典的自噬通路。

TOPK 是肿瘤细胞重要的激酶，在多种恶性肿瘤中高表达，其过表达与不良预后密切相关[17-21]。在临床非小细胞肺癌病例研究中发现，TOPK 在淋

巴结转移中的表达高于原发肿瘤和正常肺组织，过表达的 TOPK 具有促进非小细胞肺癌细胞存活、增殖及迁移的能力，与非小细胞肺癌的不良预后密切相关[22]；在 I 期肺癌的临床研究中也得到了相同的结论[7]。在肺癌的迁移和侵袭过程中，TOPK 通过调节磷脂酰肌醇 3-激酶（PI3K）/同源性磷酸酶-张力蛋白（PTEN）/蛋白激酶 B（Akt）通路或与 PTEN 结合促进这个进程的发展[19, 23]。TOPK 也可直接与 c-Jun 结合并磷酸化 c-Jun，从而激活包括 CCND1 和 CDC2 在内的 AP-1 靶基因的转录，对 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂产生耐药[24]。沉默 TOPK 后可增加对 EGFR-TKI 耐药的肺癌细胞对吉非替尼的敏感性，提示 TOPK 可能在肺癌靶向治疗发挥重要作用。A549 细胞经 10 μmol/L 的 GCM、GC、PSO 处理后，TOPK 表达均显著下降。

运用三维定量构效关系模型研究中发现，GCM 和 GC 能嵌合于 TOPK 蛋白的 ATP 结合位点，其主要通过结构中的异戊烯基与 TOPK 蛋白 ATP 结合位点上的蛋氨酸和缬氨酸等产生疏水相互作用并形成疏水补丁；同时，其结构中的羟基能与 TOPK 蛋白的 ATP 结合位点上赖氨酸和天门冬氨酸等形成氢键[10-11]。通过疏水相互作用力及氢键的形成，从而与 TOPK 蛋白直接发生作用。进一步研究发现 GCM 和 GC 不但可直接下调 TOPK 的表达，而且还可以抑制活化 TOPK 的激酶的活性，提示 TOPK 可能是 GCM 和 GC 抗肿瘤的直接靶点[10-11]。

为了进一步比较甘草中香豆素类化合物对 A549 细胞增殖活性的影响，本实验通过研究甘草中主要香豆素化合物 GC 和 GCM 对 A549 肺癌细胞增殖、蛋白表达的影响及其可能的构效关系。从对 A549 细胞增殖影响的结果和其结构方面来分析，发现这些受试物中，B 环上具有异戊烯基结构的都具有一定的抗 A549 细胞增殖活性，而没有异戊烯基结构的化合物的活性却相对较低。为了验证非 C-6 取代的异戊烯基香豆素是否会影响 TOPK 蛋白的表达，本研究进一步研究了 OST 对 A549 细胞 TOPK 蛋白表达的影响。结果发现 OST 处理 A549 细胞 36 h 后，细胞中 TOPK 的表达随着 OST 浓度的增加而降低。因此，推测香豆素母核与其 B 环上异戊烯基团形成的这个特殊结构可能是其抗肿瘤的活性中心。GC 与 GCM 相比较，仅是 GC 在 C 环上酚羟基与 A 环的 C-4 通过 C-O 键闭环形成呋喃环，而 GCM 在 C 环上有 2 个游离的羟基，提示 C 环上游离羟基的存在可能有助于增加抗肿瘤活性；PSO 与 GC 相比较，在 A 环上少了一个甲氧基，活性也相对降低。虽然仅从 GCM 和 GC 2 个化合物不能完全确定甘草中异戊烯基香豆素类的构效关系。初步推测，异戊烯基香豆素类化合物的抗肿瘤活性需满足以下必要条件：（1）在它们的分子中，有一个异戊烯基苯并呋喃酮作为活性中心；（2）某些羟基存在于适合的与含有特定酶结合的位置（B 环 7 位羟基和 C 环上 2′位羟基）。

本研究通过 Western blotting 分析了受试化合物对 TOPK、C-PARP、Bcl-2、Bax、p62、LC3B 蛋白表达水平，结果显示 10 μmol/L 的 GC、GCM、PSO 能上调 C-PARP 蛋白水平，下调 Bcl-2 和 TOPK 蛋白的表达水平；诱导 LC3 Ⅰ向 LC3B 的转化和增加 p62 的堆积。异戊烯基和 C 环及其环上羟基的缺失，可影响 C-PARP、TOPK、Bcl-2、LC3 II 和 p62 蛋白表达，这与这些化合物的抗 A549 细胞增殖活性一致。以上研究结果提示，上述香豆素化合物抑制 A549 细胞增殖的作用与这些香豆素母核上的异戊烯基团的取代和母核 C-3 位上苯环的取代及其环上的羟基有关；其作用机制可能与调控细胞凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2、C-PARP，自噬相关蛋白 LC3B、p62 及 TOPK 蛋白表达有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 郑荣寿, 孙可欣, 张思维, 等. 2015 年中国恶性肿瘤流行情况分析 [J]. 中华肿瘤杂志, 2019, 41(1): 19-28.

[2] Remon J, Moran T, Reguart N, *et al*. Beyond EGFR TKI in EGFR-mutant non-small cell lung cancer patients: Main challenges still to be overcome [J]. *Cancer Treat Rev*, 2014, 40(6): 723-729.

[3] Man S, Gao W, Wei C, *et al*. Anticancer drugs from traditional toxic Chinese medicines [J]. *Phytother Res*, 2012, 26(10): 1449-1465.

[4] Ye J, Zhang R, Wu F, *et al*. Non-apoptotic cell death in malignant tumor cells and natural compounds [J]. *Cancer Lett*, 2018, 420: 210-227.

[5] Wang C Y, Bai X Y, Wang C H. Traditional Chinese medicine: A treasured natural resource of anticancer drug research and development [J]. *Am J Chin Med*, 2014, 42(3): 543-559.

[6] 中国药典 [S]. 一部. 2020.

[7] Ji S, Li Z, Song W, *et al*. Bioactive constituents of *Glycyrrhiza uralensis* (Licorice): Discovery of the

effective components of a traditional herbal medicine [J]. *J Nat Prod*, 2016, 79(2): 281-292.

[8] Asl M N, Hosseinzadeh H. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza* sp. and its bioactive compounds [J]. *Phytother Res*, 2008, 22(6): 709-724.

[9] Zhang E, Yin S, Lu X, *et al*. Glycycoumarin sensitizes liver cancer cells to ABT-737 by targeting de novo lipogenesis and TOPK-survivin axis [J]. *Nutrients*, 2018, 10(3): 353.

[10] Song X, Yin S, Zhang E, *et al*. Glycycoumarin exerts anti-liver cancer activity by directly targeting T-LAK cell-originated protein kinase [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(40): 65732-65743.

[11] Lu S, Ye L, Yin S, *et al*. Glycyrol exerts potent therapeutic effect on lung cancer via directly inactivating T-LAK cell-originated protein kinase [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 147: 104366.

[12] Bruckheimer E M, Cho S H, Sarkiss M, *et al*. The Bcl-2 gene family and apoptosis [J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 1998, 62: 75-105.

[13] Dietrich J B. Apoptosis and anti-apoptosis genes in the Bcl-2 family [J]. *Arch Physiol Biochem*, 1997, 105(2): 125-135.

[14] Bressenot A, Marchal S, Bezdetnaya L, *et al*. Assessment of apoptosis by immunohistochemistry to active caspase-3, active caspase-7, or cleaved PARP in monolayer cells and spheroid and subcutaneous xenografts of human carcinoma [J]. *J Histochem Cytochem*, 2009, 57(4): 289-300.

[15] Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and Autophagy [J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 445: 77-88.

[16] Fan L, Yin S, Zhang E, *et al*. Role of p62 in the regulation of cell death induction [J]. *Apoptosis*, 2018, 23(3-4): 187-193.

[17] Ikeda Y, Park J H, Miyamoto T, *et al*. T-LAK cell-originated protein kinase (TOPK) as a prognostic factor and a potential therapeutic target in ovarian cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(24): 6110-6117.

[18] Herbert K J, Ashton T M, Prevo R, *et al*. T-LAK cell-originated protein kinase (TOPK): An emerging target for cancer-specific therapeutics [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(11): 1089.

[19] Wei D C, Yeh Y C, Hung J J, *et al*. Overexpression of T-LAK cell-originated protein kinase predicts poor prognosis in patients with stage I lung adenocarcinoma [J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(4): 731-738.

[20] Ohashi T, Komatsu S, Ichikawa D, *et al*. Overexpression of PBK/TOPK relates to tumour malignant potential and poor outcome of gastric carcinoma [J]. *Br J Cancer*, 2017, 116(2): 218-226.

[21] Ohashi T, Komatsu S, Ichikawa D, *et al*. Overexpression of PBK/TOPK contributes to tumor development and poor outcome of esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Anticancer Res*, 2016, 36(12): 6457-6466.

[22] Lei B, Liu S, Qi W, *et al*. PBK/TOPK expression in non-small-cell lung cancer: Its correlation and prognostic significance with Ki67 and p53 expression [J]. *Histopathology*, 2013, 63(5): 696-703.

[23] Shih M C, Chen J Y, Wu Y C, *et al*. TOPK/PBK promotes cell migration via modulation of the PI3K/PTEN/AKT pathway and is associated with poor prognosis in lung cancer [J]. *Oncogene*, 2012, 31(19): 2389-2400.

[24] Li Y, Yang Z, Li W, *et al*. TOPK promotes lung cancer resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors by phosphorylating and activating c-Jun [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(6): 6748-6764.

[责任编辑 高源]