

基于 CXCR12/CXCR4/CXCR7 轴研究熊果酸诱导人甲状腺乳头状癌细胞线粒体凋亡的作用机制

马丽华¹, 赵爱兵², 吴长明¹, 李子安³

1. 唐山市工人医院 乳腺外科, 河北 唐山 063000

2. 唐山市工人医院 胃肠外二科, 河北 唐山 063000

3. 唐山市工人医院 胃肠外一科, 河北 唐山 063000

摘要:目的 考察熊果酸对人甲状腺乳头状癌 TPC-1 细胞凋亡的影响及其作用机制。方法 TPC-1 细胞分别加入不同浓度 (0.8、1.6、3.2、3.6、4.0 $\mu\text{mol/L}$) 的熊果酸处理, 采用 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖; 采用克隆形成实验检测细胞克隆形成能力; 采用流式细胞术检测细胞凋亡率; 采用 Fura-3/AM、JC-1 探针分别检测细胞内 Ca^{2+} 水平和线粒体膜电位; 采用 Western blotting 和 PCR 检测线粒体凋亡相关蛋白和趋化因子受体 12 (C-X-C chemokine receptor type 12, CXCR12)/CXCR4/CXCR7 轴相关基因表达。结果 熊果酸显著降低 TPC-1 细胞增殖和克隆形成能力 ($P < 0.01$), 显著降低线粒体膜电位 ($P < 0.05$ 、0.01), 显著升高细胞内 Ca^{2+} 水平和细胞凋亡率 ($P < 0.01$), 显著下调 B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 蛋白表达和 CXCR12/CXCR4/CXCR7 轴相关基因表达 ($P < 0.01$), 显著上调细胞色素 C (cytochrome-C, Cyt-C)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9 (cystein-aspartate protease-9, Caspase-9) 和 Caspase-3 蛋白表达 ($P < 0.05$ 、0.01)。结论 熊果酸可能通过抑制 CXCR12/CXCR4/CXCR7 轴活化进而诱导 TPC-1 细胞线粒体凋亡, 从而发挥抗甲状腺乳头状癌的作用。

关键词: 甲状腺乳头状癌; 熊果酸; CXCR12/CXCR4/CXCR7 轴; 线粒体凋亡; 增殖

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)19-6370-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.19.018

Mechanism of ursolic acid on inducing mitochondrial apoptosis of human papillary thyroid carcinoma cells by regulating CXCR12/CXCR4/CXCR7 axis

MA Li-hua¹, ZHAO Ai-bing², WU Chang-ming¹, LI Zi-an³

1. Department of Breast Surgery, Tangshan Workers' Hospital, Tangshan 063000, China

2. Second Department of Gastrointestinal Surgery, Tangshan Workers' Hospital, Tangshan 063000, China

3. First Department of Gastrointestinal Surgery, Tangshan Workers' Hospital, Tangshan 063000, China

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of ursolic acid on apoptosis of human papillary thyroid carcinoma TPC-1 cells. **Methods** TPC-1 cells were treated with different concentrations (0.8, 1.6, 3.2, 3.6, 4.0 $\mu\text{mol/L}$) of ursolic acid, and the cell proliferation was detected by CCK-8 kit. The ability of cell clone formation was detected by clone formation experiment. Apoptosis rate was detected by flow cytometry. Fura-3/AM and JC-1 probes were used to detect intracellular Ca^{2+} level and mitochondrial membrane potential respectively. Western blotting and PCR were used to detect the expressions of mitochondrial apoptosis-related proteins and chemokine receptor type 12 (CXCR12)/CXCR4/CXCR7 axis-related genes. **Results** Ursolic acid significantly reduced the proliferation and clone formation ability of TPC-1 cells ($P < 0.01$), significantly reduced mitochondrial membrane potential ($P < 0.05$, 0.01), significantly increased the intracellular Ca^{2+} level and apoptosis rate ($P < 0.01$), significantly down-regulated expressions of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) protein and CXCR12/CXCR4/CXCR7 axis-related genes ($P < 0.01$), significantly up-regulated expressions of cytochrome-C (Cyt-C), Bcl-2 associated X protein (Bax), cysteine-aspartic protease-9 (Caspase-9) and Caspase-3 proteins ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** Ursolic acid may induce mitochondrial apoptosis in TPC-1 cells by inhibiting the activation of CXCR12/CXCR4/CXCR7 axis, thus playing an anti-thyroid papillary carcinoma role.

收稿日期: 2023-04-15

基金项目: 河北省卫生健康委员会科研基金资助项目 (20180397)

作者简介: 马丽华, 本科, 副主任医师, 从事甲状腺、乳腺肿瘤的诊断及治疗相关研究。E-mail: mlh2331942@hotmail.com

Key words: papillary thyroid carcinoma; ursolic acid; CXCR12/CXCR4/CXCR7 axis; mitochondrial apoptosis; proliferation

甲状腺癌是一种起源于甲状腺滤泡上皮或滤泡旁上皮细胞的恶性肿瘤,也是头颈部最为常见的恶性肿瘤。甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)约占甲状腺癌的 90%,为最常见类型^[1]。近年来,全球范围内甲状腺癌的发病率增长迅速,据全国肿瘤登记中心的数据显示,我国城市地区女性甲状腺癌发病率位居女性所有恶性肿瘤的第 4 位,且我国甲状腺癌将以每年 20% 的速度持续增长^[1]。虽然通过手术和放射治疗使 PTC 整体预后良好,但仍有 30%~50% 初诊患者伴有淋巴结转移,预后较差,常规疗法效果不佳^[2]。因此有必要进一步研究 PTC 的发病机制并开发相应治疗药物,为临床 PTC 患者的诊断和治疗提供理论依据。

熊果酸是五环三萜类化合物^[3-5],具有抗炎、抗氧化、抗癌、免疫调节等广泛的药理活性^[6-11]。研究显示,熊果酸能抑制蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)、细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)等蛋白活性,阻碍受体酪氨酸激酶与其配体的相互作用,抑制核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路^[12],诱导 B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、细胞色素 C (cytochrome-C, Cyt-C) 和凋亡蛋白酶激活因子 1 (apoptotic protease activating factor 1, APAF1) 表达,激活细胞程序性死亡或细胞线粒体自噬^[13],抑制细胞异常增殖,从而发挥抗肿瘤活性。熊果酸能与许多分子靶标相互作用,抑制肿瘤细胞的增殖或迁移过程,起到减缓肿瘤进展的作用^[14-16]。熊果酸能够通过抑制表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)/丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路上调 Bcl-2 表达,激活半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3/9 (cystein-aspartate protease-3/9, Caspase-3/9) 表达,从而抑制结肠癌细胞生长^[17]。熊果酸能够诱导前列腺癌细胞中趋化因子受体 4 (C-X-C chemokine receptor type 4, CXCR4) 信号传导通路、癌症转移信号转导通路和核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid-2-related factor 2, Nrf2) 介导的氧化应激反应上调以及部分核糖代谢产物甲基化,引起细胞重编程过程,从而发挥抗肿瘤作用^[18]。熊果酸能调控 G₀/G₁ 期细胞比例引起人

宫颈癌 HeLa 细胞凋亡^[19]。熊果酸对 PTC 细胞的增殖、迁移和侵袭也有显著的抑制效果。Cao 等^[20]发现熊果酸能够通过降低癌症相关成纤维细胞中 CXCR4 和 CXCR7 的表达抑制人甲状腺乳头状癌 TPC-1 细胞增殖过程。熊果酸能够通过抑制纤连蛋白 1 (fibronectin 1, FN1) 抑制甲状腺癌细胞活力与增殖^[21]。以上研究表明熊果酸对抑制 TPC-1 细胞增殖有显著疗效,然而其涉及的信号分子机制及其与 CXCR12/CXCR4/CXCR7 轴的关系仍不明确。

为探究熊果酸抗甲状腺癌的机制,本研究通过检测熊果酸对 TPC-1 细胞增殖、凋亡、细胞内 Ca²⁺ 水平、线粒体凋亡信号通路相关蛋白及 CXCR12/CXCR4/CXCR7 轴相关基因表达的影响,探究熊果酸抑制 TPC-1 细胞增殖的作用机制,为熊果酸的临床抗肿瘤应用以及 PTC 的治疗提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞

TPC-1 细胞购自武汉 Procell 公司。

1.2 药品与试剂

熊果酸(质量分数 $\geq 98\%$,批号 SU8082)、细胞裂解液(批号 R0010)、胰蛋白酶消化液(批号 T1300)、ECL 发光液(批号 PE0010)、二甲基亚砜(批号 710N0317) 购自北京索莱宝科技有限公司; DMEM 培养基(批号 C11995500BT) 购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 批号 2025067) 购自上海诺宁生物科技有限公司; CCK-8 试剂盒(批号 C0039)、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(批号 C1062)、Fura-3/AM 荧光探针(批号 S1056)、JC-1 荧光探针(批号 C2005)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 P0012S)、SDS-PAGE 凝胶配制试剂(批号 P0010) 购自碧云天生物技术有限公司; DAB 显色试剂盒(批号 ZLI-9019) 购自背景中杉金桥生物有限公司; PBS 溶液(批号 17H01A30) 购自武汉博士德生物工程公司; 细胞总 RNA 提取试剂盒(批号 636690)、一步法 RNA 反转录 PCR 扩增试剂盒(批号 RR024B) 购自宝日生物技术有限公司; Bcl-2 抗体(批号 15071)、Cyt-C 抗体(批号 11940)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax) 抗体(批号 41162)、Caspase-9 抗体(批号 9502)、Caspase-3 抗体(批号 9662)、生物素化的山羊抗兔 IgG 抗体(批号 7074)

均购自美国 CST 公司。

1.3 仪器

Heracell 150i GP 型 CO₂ 细胞培养箱、Attune NxT 型流式细胞仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Spark®型酶标仪(瑞士 Tecan 公司); DM2500 型荧光显微镜(德国 Leica 公司); Powerpac HC 164-5052 型电泳仪、Trans-Blot Turbo 转膜仪、ChemiDoc 成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

TPC-1 细胞用含 10% FBS 的 DMEM 培养基, 于 37 °C、95%相对湿度、5% CO₂ 的培养箱中贴壁培养^[22]。选择生长状态良好的 TPC-1 细胞进行后续实验。

2.2 CCK-8 检测细胞增殖

TPC-1 细胞以 5×10^3 /孔接种至 96 孔板中, 分别加入 0 (对照)、0.8、1.6、3.2、3.6、4.0 $\mu\text{mol/L}$ 熊果酸处理 48 h, 另设置不接种细胞不含药物的调零孔, 每孔加入 10 μL 的 CCK-8 工作液, 37 °C 培养 2 h, 采酶标仪检测 450 nm 处的吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率^[23]。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{调零}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{调零}})$$

2.3 细胞克隆形成实验

TPC-1 细胞以 1×10^5 /孔接种于 6 孔板中, 分别加入 0、0.8、1.6、3.2、3.6、4.0 $\mu\text{mol/L}$ 熊果酸处理 24 h 后, 将细胞以 1×10^3 /孔接种到 60 mm 的平板中, 加入 DMEM 培养基并置于培养箱中培养 2 周, 然后将细胞用 4%多聚甲醛在 42 °C 下固定 15 min, 用 0.1%结晶紫室温染色 30 min, 于显微镜下对可见菌落进行计数。

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡

TPC-1 细胞以 1×10^5 /孔接种于 6 孔板中, 分别加入 0、0.8、1.6、3.2、3.6 $\mu\text{mol/L}$ 熊果酸处理 48 h 后, 按照细胞凋亡试剂盒说明书操作, 采用流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况^[23]。

2.5 Fura-3/AM 荧光探针检测细胞内 Ca²⁺水平

TPC-1 细胞以 1×10^5 /孔接种于 6 孔板中, 分别加入 0、0.8、1.6、3.2、3.6 $\mu\text{mol/L}$ 熊果酸处理 48 h 后, 收集细胞, 用 PBS 溶液洗涤, 加入 0.02% Fura-3/AM 工作液 10 mL, 37 °C 培养 30 min; 弃去 Fura-3/AM 工作液, 洗涤 3 次; 加入 PBS 溶液于 37 °C 孵育 20 min, 于荧光显微镜下观察并拍照, 采用流式细胞术检测 Ca²⁺水平^[24]。

2.6 JC-1 荧光探针检测细胞线粒体膜电位

TPC-1 细胞以 1×10^5 /孔接种于 6 孔板中, 分别加入 0、0.8、1.6、3.2、3.6 $\mu\text{mol/L}$ 熊果酸处理 48 h 后, 收集细胞, 用 PBS 溶液洗涤, 加入 1 mL 细胞培养液和 1 mL JC-1 染色工作液, 充分混匀, 37 °C 孵育 20 min, 孵育结束后, 吸除上清, 用 JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次, 加入 2 mL 细胞培养液, 采用流式细胞术检测线粒体膜电位。

2.7 Western blotting 检测线粒体凋亡相关蛋白表达

TPC-1 细胞以 5×10^5 /皿接种于 100 mm 培养皿中, 分别加入 0、0.8、1.6、3.2、3.6 $\mu\text{mol/L}$ 熊果酸处理 48 h 后, 收集细胞, 加入裂解液裂解细胞, 收集上清, 用 BCA 试剂盒测定各组蛋白含量, 制备蛋白样品。蛋白样品经 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 封闭后分别孵育一抗与二抗, 显影成像, 采用 Image J 软件分析条带灰度值, 计算各组蛋白相对表达量。

2.8 PCR 检测 CXCR12/CXCR4/CXCR7 轴相关基因表达

TPC-1 细胞以 5×10^5 /皿接种于 100 mm 培养皿中, 分别加入 0、0.8、1.6、3.2、3.6 $\mu\text{mol/L}$ 熊果酸处理 48 h 后, 收集细胞, 按照试剂盒说明书提取细胞总 RNA 并合成 cDNA, 根据电泳条带灰度计算各组基因相对表达量。PCR 引物见表 1。

2.9 统计学分析

实验结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间差异分析采用单因素方差分析法, 使用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。

3 结果

3.1 熊果酸对 TPC-1 细胞增殖和克隆形成的影响

如图 1 所示, 与对照组比较, 1.6、3.2、3.6、4.0 $\mu\text{mol/L}$ 的熊果酸显著抑制 TPC-1 细胞增殖和克隆形成能力 ($P < 0.01$), 呈剂量相关性。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	引物序列 (5'-3')
CXCR4	F: GAGGTCATCAAGCAAGGAT R: GAGGAAGGCGTAGAGGAT
CXCR7	F: GCAAGTAAGTAACGGAC R: GCTGTATAGTCAGGAC
CXCR12	F: GCATCAGTGACGGTAAGC R: CACATCTTGAGCCTCTTGT
β -actin	F: CAACCTTCTTGCAGCTCCTC R: ATACCCACCATCACACCCTG

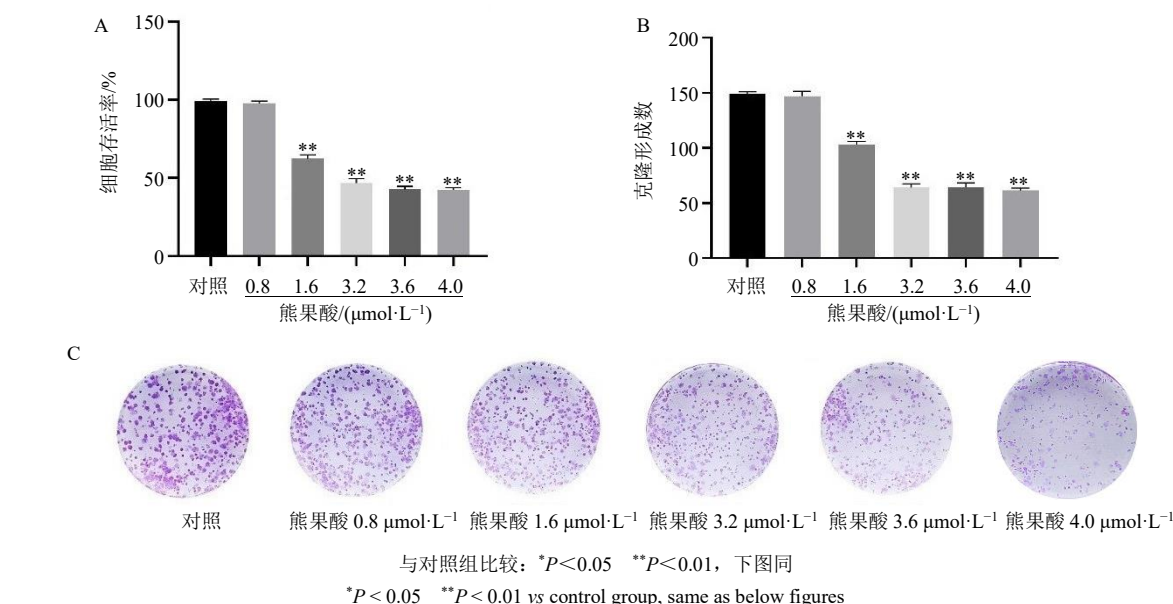


图 1 熊果酸对 TPC-1 细胞增殖 (A) 和克隆形成 (B、C) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 Effect of ursolic acid on proliferation (A) and colony formation (B, C) of TPC-1 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.2 熊果酸对 TPC-1 细胞凋亡的影响

如图 2 所示,与对照组比较,1.6、3.2、3.6 $\mu\text{mol/L}$ 的熊果酸显著促进 TPC-1 细胞凋亡 ($P<0.01$),呈剂量相关性。

3.3 熊果酸对 TPC-1 细胞 Ca^{2+} 水平的影响

如图 3 所示,与对照组比较,1.6、3.2、3.6 $\mu\text{mol/L}$ 的熊果酸显著升高 TPC-1 细胞内 Ca^{2+} 水平 ($P<0.01$),呈剂量相关性。

3.4 熊果酸对 TPC-1 细胞线粒体膜电位的影响

如图 4 所示,与对照组比较,0.8、1.6、3.2、3.6 $\mu\text{mol/L}$ 的熊果酸显著降低 TPC-1 细胞线粒体膜

电位 ($P<0.05$ 、0.01),呈剂量相关性。

3.5 熊果酸对 TPC-1 细胞线粒体凋亡相关蛋白表达的影响

如图 5 所示,与对照组比较,0.8、1.6、3.2、3.6 $\mu\text{mol/L}$ 的熊果酸显著降低 Bcl-2 蛋白表达水平 ($P<0.01$),呈剂量相关性;1.6、3.2、3.6 $\mu\text{mol/L}$ 的熊果酸显著升高 Bax、Cyt-C、Caspase-9、Caspase-3 蛋白表达水平 ($P<0.05$ 、0.01),呈剂量相关性。

3.6 熊果酸对 TPC-1 细胞 CXCR12/CXCR4/CXCR7 轴相关基因表达的影响

如图 6 所示,与对照组比较,1.6、3.2、3.6 $\mu\text{mol/L}$

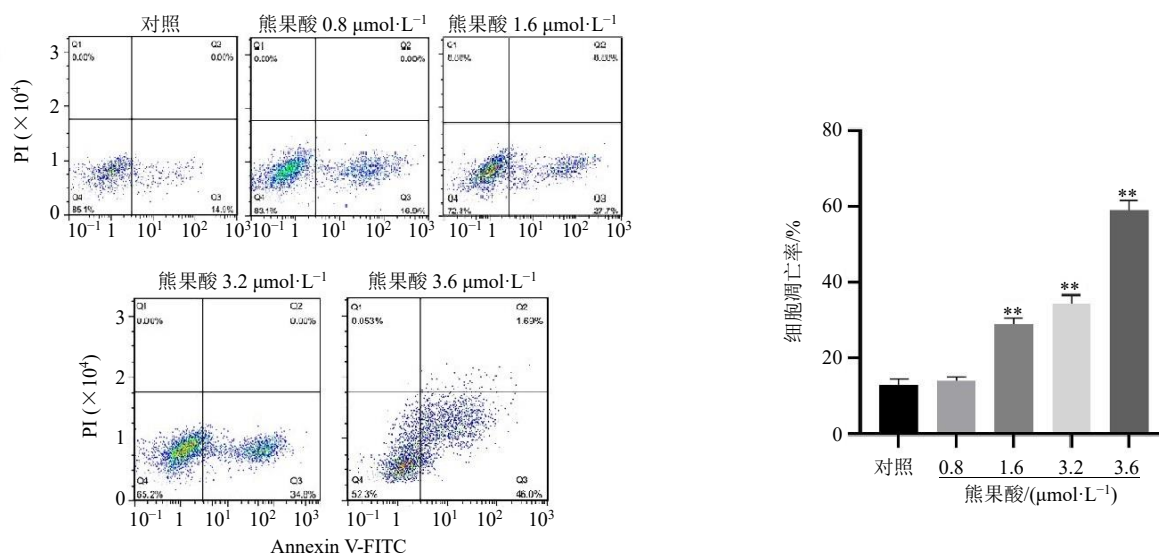
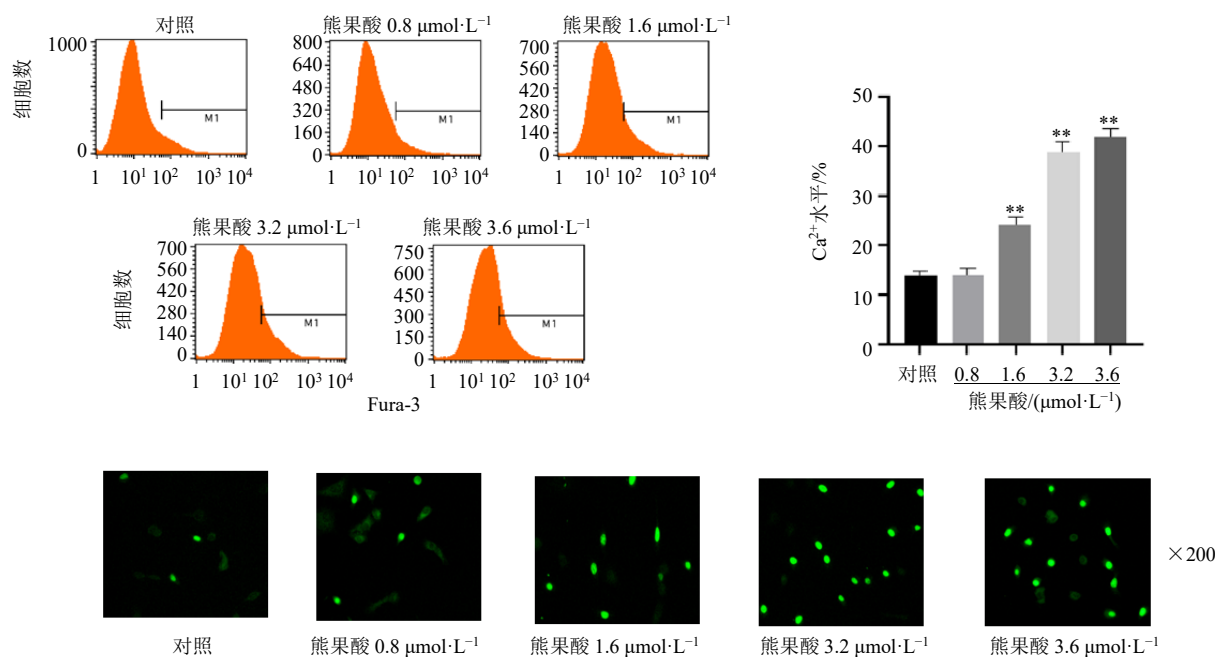
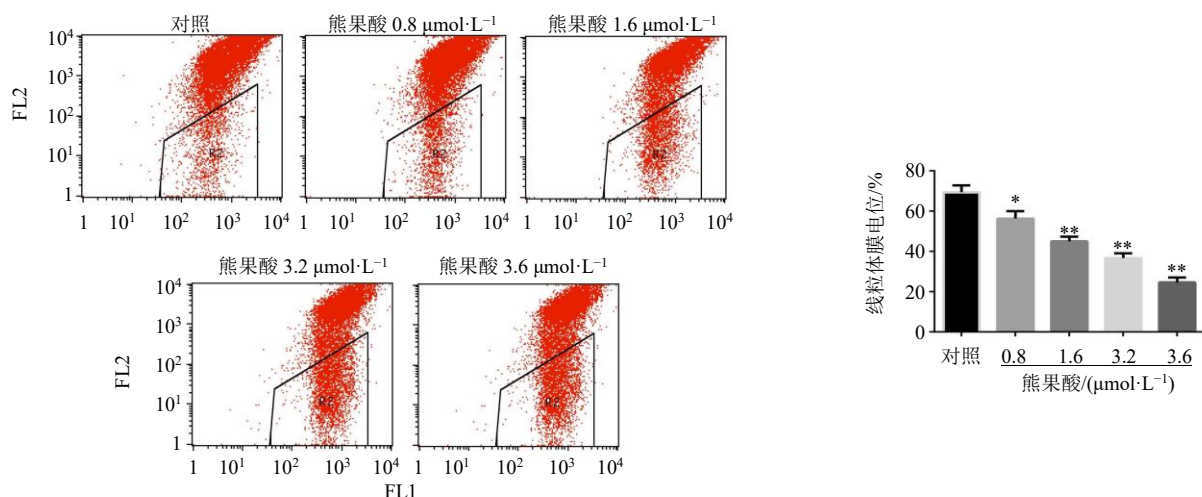
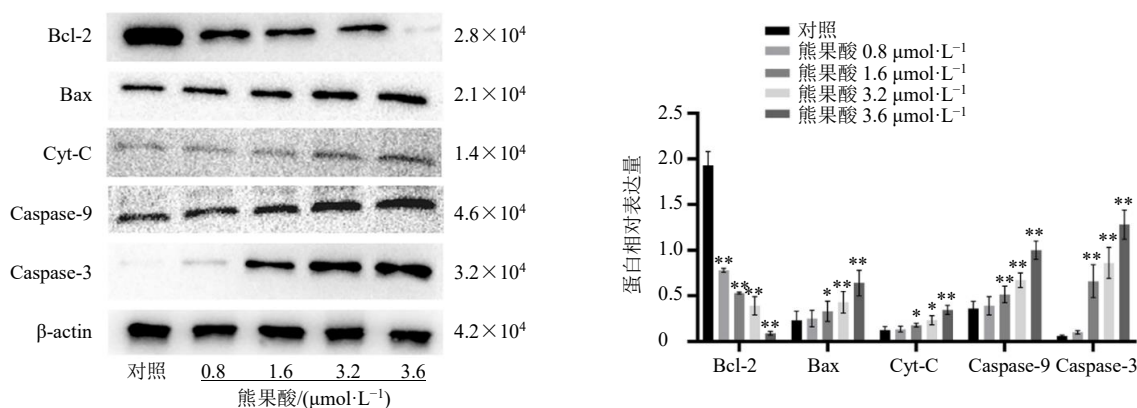


图 2 熊果酸对 TPC-1 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Effect of ursolic acid on apoptosis of TPC-1 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

图 3 熊果酸对 TPC-1 细胞内 Ca^{2+} 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 3 Effect of ursolic acid on Ca^{2+} level of TPC-1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)图 4 熊果酸对 TPC-1 细胞线粒体膜电位的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 4 Effect of ursolic acid on mitochondrial membrane potential of TPC-1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)图 5 熊果酸对 TPC-1 细胞线粒体凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 5 Effect of ursolic acid on expressions of mitochondrial apoptosis related proteins in TPC-1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

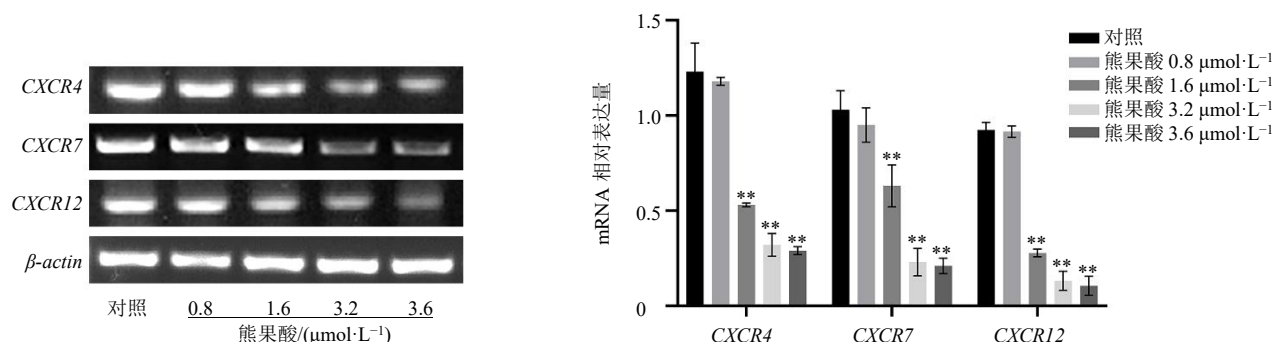


图 6 熊果酸对 TPC-1 细胞 CXCR12/CXCR4/CXCR7 轴相关基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of ursolic acid on expressions of CXCR12/CXCR4/CXCR7 axis related genes in TPC-1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

的熊果酸显著降低 CXCR12、CXCR4、CXCR7 基因表达水平 ($P < 0.01$), 且呈剂量相关性。

4 讨论

趋化因子配体 12 (C-X-C chemokine ligand 12, CXCL12) 可与 G 蛋白偶联受体 CXCR4、CXCR7 结合, 进而升高细胞 Ca^{2+} 水平, 促进细胞黏附、存活、增殖和基因转录等, 有助于肿瘤生长、侵袭、血管生成、转移、复发和治疗耐药^[25-26]。研究表明 CXCR4 可调节 TPC-1 细胞的增殖、迁移和侵袭能力^[27]。本研究考察了熊果酸对 TPC-1 细胞增殖和凋亡的影响及其作用机制。

与正常细胞中增殖与凋亡的动态平衡不同, 恶性肿瘤细胞表现出增殖异常、凋亡抑制的特性, 因此诱导肿瘤细胞凋亡是多种抗肿瘤药物开发的基本策略之一。熊果酸能诱导多种肿瘤细胞凋亡, 但其作用机制尚不完全清楚。本研究结果表明, 熊果酸作用于线粒体凋亡途径显著诱导 TPC-1 细胞凋亡。在熊果酸的作用下, TPC-1 细胞内 Ca^{2+} 水平升高, 这一信号降低了抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达, 升高了促凋亡蛋白 Bax 表达, 进一步导致细胞膜电位下降膜通透性增高, 释放出凋亡诱导因子 Cyt-C, 进一步活化 Caspase-3 引发 Caspase 级联反应, 最终引起细胞凋亡^[12-21]。表明熊果酸能显著抑制 TPC-1 细胞的增殖, 同时也能通过线粒体凋亡途径显著诱导该细胞的凋亡, 从而具有良好的抗肿瘤作用。CXCR4、CXCR7 与趋化因子结合后引起细胞内 Ca^{2+} 信号迅速上升而激活下游信号通路, 参与多种肿瘤细胞的血管生成、远端转移、浸润以及肿瘤细胞的分化与增殖等过程, 被认为是抗肿瘤治疗的又一靶点。本研究结果显示, 熊果酸处理的 TPC-1 细胞 CXCR12/CXCR4/CXCR7 轴相关基因表达水平显著降低, 表明熊果酸可以抑制 CXCR12/CXCR4/CXCR7 信号轴

的活性, 进一步阻断该信号轴与下游信号通路的关联, 这一结果与 Liu 等^[27]研究一致, CXCR12/CXCR4/CXCR7 轴的表达水平可作为肿瘤预后评估的指标之一^[25]。因此, 熊果酸作为 CXCR12/CXCR4/CXCR7 轴的抑制剂, 是抗 PTC 药物开发的候选化合物。

综上, 本研究发现熊果酸可能通过抑制 CXCR12/CXCR4/CXCR7 轴活化进而诱导 TPC-1 细胞线粒体凋亡发挥抗 PTC 的作用, 为熊果酸应用于 PTC 的基础研究和临床应用提供了实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Lam A K. Papillary thyroid carcinoma: Current position in epidemiology, genomics, and classification [J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2534: 1-15.
- [2] Coca-Pelaz A, Shah J P, Hernandez-Prera J C, et al. Papillary thyroid cancer-aggressive variants and impact on management: A narrative review [J]. *Adv Ther*, 2020, 37(7): 3112-3128.
- [3] Sharifiyan F, Mirjalili S A, Fazilati M, et al. Variation of ursolic acid content in flowers of ten Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars [J]. *BMC Chem*, 2019, 13(1): 1-7.
- [4] Ali S A, Ibrahim N A, Mohammed M M D, et al. The potential chemo preventive effect of ursolic acid isolated from *Paulownia tomentosa*, against *N*-diethylnitrosamine: Initiated and promoted hepatocarcinogenesis [J]. *Heliyon*, 2019, 5(5): e01769.
- [5] Shimada A, Ueno H, Inagaki M. Glutaminase inhibitory activities of pentacyclic triterpenes isolated from *Thymus vulgaris* L. [J]. *Nat Prod Res*, 2022, 36(11): 2864-2868.
- [6] Navabharath M, Srivastava V, Gupta S, et al. Ursolic acid and solasodine as potent anti-mycobacterial agents for combating paratuberculosis: An anti-inflammatory and in

- silico analysis [J]. *Molecules*, 2022, 28(1): 274.
- [7] Liu K M, Huang Y, Wan P P, *et al.* Ursolic acid protects neurons in temporal lobe epilepsy and cognitive impairment by repressing inflammation and oxidation [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 877898.
- [8] Zheng H Y, Feng H T, Zhang W Z, *et al.* Targeting autophagy by natural product ursolic acid for prevention and treatment of osteoporosis [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2020, 409: 115271.
- [9] Khwaza V, Oyedebi O O, Aderibigbe B A. Ursolic acid-based derivatives as potential anti-cancer agents: An update [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(16): 5920.
- [10] Li H, Yu Y, Liu Y, *et al.* Ursolic acid enhances the antitumor effects of sorafenib associated with Mcl-1-related apoptosis and SLC7A11-dependent ferroptosis in human cancer [J]. *Pharmacol Res*, 2022, 182: 106306.
- [11] 张梦, 何曼, 孙强, 等. 基于 Hedgehog 信号通路的熊果酸诱导结直肠癌 SW480 细胞凋亡的机制研究 [J]. *中草药*, 2021, 52(8): 2365-2373.
- [12] Bian Z, Liu H, Xu F, *et al.* Ursolic acid protects against anoxic injury in cardiac microvascular endothelial cells by regulating intercellular adhesion molecule-1 and toll-like receptor 4/MyD88/NF- κ B pathway [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2022, 41: 9603271221093626.
- [13] Lin W, Ye H Y. Anticancer activity of ursolic acid on human ovarian cancer cells via ROS and MMP mediated apoptosis, cell cycle arrest and downregulation of PI3K/AKT pathway [J]. *J Buon*, 2020, 25(2): 750-756.
- [14] Singh D, Verma R, Tripathi S, *et al.* Breast cancer transcriptional regulatory network reprogramming by using the CRISPR/Cas9 system: An oncogenetics perspective [J]. *Curr Top Med Chem*, 2021, 21(31): 2800-2813.
- [15] Zong L, Cheng G R, Zhao J W, *et al.* Inhibitory effect of ursolic acid on the migration and invasion of doxorubicin-resistant breast cancer [J]. *Molecules*, 2022, 27(4): 1282.
- [16] Gou W F, Luo N, Yu B, *et al.* Ursolic acid derivative UA232 promotes tumor cell apoptosis by inducing endoplasmic reticulum stress and lysosomal dysfunction [J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(6): 2639-2651.
- [17] Alam M, Ali S, Ahmed S, *et al.* Therapeutic potential of ursolic acid in cancer and diabetic neuropathy diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(22): 12162.
- [18] Li S Y, Wu R Y, Wang L J, *et al.* Triterpenoid ursolic acid drives metabolic rewiring and epigenetic reprogramming in treatment/prevention of human prostate cancer [J]. *Mol Carcinog*, 2022, 61(1): 111-121.
- [19] Jin X Y, Chen H, Li D D, *et al.* Design, synthesis, and anticancer evaluation of novel quinoline derivatives of ursolic acid with hydrazide, oxadiazole, and thiadiazole moieties as potent MEK inhibitors [J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2019, 34(1): 955-972.
- [20] Cao X J, He Q Q. Ursolic acid inhibits proliferation, migration and invasion of human papillary thyroid carcinoma cells via CXCL12/CXCR4/CXCR7 axis through cancer-associated fibroblasts [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2022, doi: 10.1177/09603271221111333.
- [21] Cao M X, Xiao D, Ding X B. The anti-tumor effect of ursolic acid on papillary thyroid carcinoma via suppressing Fibronectin-1 [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2020, 84(12): 2415-2424.
- [22] Liu J E, Cai H, Yi H Q, *et al.* Influence of dehydroxymethylepoxyquinomicin on radiosensitivity of thyroid carcinoma TPC-1 cells [J]. *J Oncol*, 2022, 2022: 5026308.
- [23] Wang S B, Li Z G, Liu W, *et al.* Neohesperidin induces cell cycle arrest, apoptosis, and autophagy via the ROS/JNK signaling pathway in human osteosarcoma cells [J]. *Am J Chin Med*, 2021, 49(5): 1251-1274.
- [24] Tralbalza S, Buonauro R, Del Pino A, *et al.* A spectrofluorophotometrical method based on fura-2-AM probe to determine cytosolic Ca^{2+} level in *Pseudomonas syringae* complex bacterial cells [J]. *Bio Protoc*, 2021, 11(6): e3949.
- [25] Chatterjee S, Behnam Azad B, Nimmagadda S. The intricate role of CXCR4 in cancer [J]. *Adv Cancer Res*, 2014, 124: 31-82.
- [26] Mezzapelle R, Leo M, Caprioglio F, *et al.* CXCR4/CXCL12 activities in the tumor microenvironment and implications for tumor immunotherapy [J]. *Cancers*, 2022, 14(9): 2314.
- [27] Liu Y, Zhang H, Wang H, *et al.* Long non-coding RNA DUXAP8 promotes the cell proliferation, migration, and invasion of papillary thyroid carcinoma via miR-223-3p mediated regulation of CXCR4 [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 496-506.

[责任编辑 李亚楠]