

论 著

(基础研究)

澳洲茄碱通过 mTOR 信号通路抑制膀胱癌细胞增殖

刘 容, 方 潇, 高宇文, 林飞飞, 林志杰, 陈榕彬, 翁铭芳, 吴卫真

【摘要】 目的 研究澳洲茄碱对膀胱癌细胞增殖、细胞凋亡、细胞周期的影响及其作用机制。 **方法** 0、5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 澳洲茄碱处理膀胱癌 J82 和 T24 细胞 24 h、48 h、72 h 后,应用 CCK-8 检测细胞生存率。0、10、30 $\mu\text{mol/L}$ 澳洲茄碱处理 J82 细胞 24 h 后,用流式细胞术检测细胞凋亡和细胞周期。0、10、30 $\mu\text{mol/L}$ 澳洲茄碱处理 J82 细胞 24 h 后,应用 Western blot 法检测 mTOR、p-mTOR、p70S6K、p-p70S6K 蛋白的表达。0、10、20、30 $\mu\text{mol/L}$ 澳洲茄碱处理 J82 细胞 24 h 后,RT-qPCR 法检测 mTOR、p70S6K mRNA 表达情况。 **结果** 澳洲茄碱显著抑制膀胱癌 J82 细胞、T24 细胞增殖,相同作用时间、不同浓度组细胞生存率总体差异均有统计学意义($P < 0.01$)。澳洲茄碱诱导 J82 细胞凋亡,0、10、30 $\mu\text{mol/L}$ 澳洲茄碱组凋亡率分别为(0.93 \pm 0.26)%、(8.33 \pm 2.16)%、(29.53 \pm 7.63)%。澳洲茄碱引起 J82 细胞发生 S 期阻滞,0、10、30 $\mu\text{mol/L}$ 澳洲茄碱组 S 期细胞占比分别是(34.51 \pm 3.61)%、(39.34 \pm 3.21)%、(44.50 \pm 4.29)%。澳洲茄碱下调 J82 细胞 p-mTOR 蛋白表达($F = 85.18, P < 0.01$)和 p-p70S6K 蛋白表达($F = 74.96, P < 0.01$)。澳洲茄碱下调 J82 细胞 mTOR mRNA 表达($F = 31.49, P < 0.01$)和 p70S6K mRNA 表达($F = 47.08, P < 0.01$)。 **结论** 澳洲茄碱通过 mTOR 信号通路抑制膀胱癌细胞增殖、促进细胞凋亡、阻滞细胞周期。

【关键词】 澳洲茄碱;膀胱癌;J82 细胞;T24 细胞;细胞凋亡;哺乳动物雷帕霉素靶蛋白

【中图分类号】 R737.14 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-271X(2020)06-0572-06

【DOI】 10.3969/j.issn.1672-271X.2020.06.004

Solasonine inhibits the proliferation of bladder cancer cells through mTOR signaling pathway

LIU Rong¹, FANG Xiao², GAO Yu-wen², LIN Fei-fei², LIN Zhi-jie³, CHEN Rong-bin¹, WENG Ming-fang¹, WU Wei-zhen¹

(1. Department of Urology, the 900th Hospital of Joint Logistics Support Force, PLA, Fuzhou 350025, Fujian, China; 2. Department of Urology, Fuzong Clinical Medical College of Fujian Medical University, Fuzhou 350025, Fujian, China; 3. Department of Urology, Fuzhou Changle District Hospital, Fuzhou 350200, Fujian, China)

【Abstract】 Objective To study the effect of solasonine on the proliferation, apoptosis and cell cycle of bladder cancer cells and its mechanism. **Methods** After the treatment of bladder cancer cells J82 and T24 with 0, 5, 10, 20 and 40 $\mu\text{mol/L}$ solasonine for 24 h, 48 h and 72 h, CCK-8 was used to detect cell proliferation. After the treatment of J82 cells with 0, 10 and 30 $\mu\text{mol/L}$ solasonine for 24 h, FACS was performed to detect cell cycle and apoptosis. After the treatment of J82 cells with 0, 10, 20 and 30 $\mu\text{mol/L}$ solasonine for 24 h, Western blot was undergone to detect the expression of mTOR, p-mTOR, p70S6K and p-p70S6K protein. After the treatment of J82 cells with 0, 10 and 30 $\mu\text{mol/L}$ solasonine for 24 h, RT-qPCR was used to detect the expression of mTOR and p70S6K mRNA. **Results** Solasonine significantly inhibited the proliferation of bladder cancer cell J82 and T24 cells ($P < 0.01$).

Solasonine induced apoptosis of J82 cells, the apoptosis rates of 0, 10 and 30 $\mu\text{mol/L}$ solasonine groups were (0.93 \pm 0.26)%, (8.33 \pm 2.16)% and (29.53 \pm 7.63)%, respectively. Solasonine arrested J82 cells at S stage, the proportions of S stage of 0, 10 and 30 $\mu\text{mol/L}$ solasonine groups were (34.51 \pm 3.61)%, (39.34 \pm 3.21)% and (44.50 \pm 4.29)%, respectively. Solasonine downregulated the protein

基金项目:联勤保障部队第九〇〇医院 2019 年度医院科研计划项目 (2019Q01)

作者单位:350025 福州,解放军联勤保障部队第九〇〇医院泌尿外科(刘容、陈榕彬、翁铭芳、吴卫真);350025 福州,福建医科大学福总临床医学院泌尿外科(方潇、高宇文、林飞飞);350200 福州,福州市长乐区医院泌尿外科(林志杰)

通信作者:吴卫真, E-mail: 13905915547@163.com

expression of p-mTOR of J82 cells ($F=85.18$, $P<0.01$). Solasonine downregulated the protein expression of p-p70S6K of J82 cells ($F=74.96$, $P<0.01$). Solasonine downregulated the mRNA expression of mTOR of J82 cells ($F=31.49$, $P<0.01$). Solasonine downregulated the mRNA expression of p70S6K of J82 cells ($F=47.08$, $P<0.01$). **Conclusion** Solasonine can inhibit the proliferation of bladder cancer cells, induce cell apoptosis and arrest cell cycle through mTOR signaling pathway.

[Key words] solasonine; bladder cancer; J82 cells; T24 cells; apoptosis; mammalian target of Rapamycin

0 引言

膀胱癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一,其中约 90% 为尿路上皮癌^[1]。肌层浸润性膀胱癌复发率较高,预后较差,降低膀胱癌的复发率和死亡率是一个亟待解决的问题。龙葵是传统中药的十大抗癌药物之一,澳洲茄碱(solasonine)是龙葵的重要抗癌成分。研究表明,澳洲茄碱在神经胶质瘤、肺癌、肝癌等多种肿瘤中均具有抗肿瘤作用^[2-4]。然而截止到 2020 年 9 月 24 日,检索了 PubMed、CNKI、万方等数据库,澳洲茄碱对膀胱癌的作用尚未见报道。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of Rapamycin, mTOR)是细胞生长、增殖的重要调节因子。本研究旨在观察不同浓度的澳洲茄碱对体外培养的膀胱癌细胞增殖、细胞周期和细胞凋亡的影响,并通过研究澳洲茄碱对 J82 细胞 mTOR 信号通路相关蛋白和 mRNA 表达的影响,初步阐明澳洲茄碱发挥抗肿瘤作用的分子机制,为进一步研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 澳洲茄碱(纯度 95%,中国杨凌慈缘生物技术有限公司)。J82、T24 细胞(中国科学院上海细胞库),胎牛血清、细胞培养基(美国 Hyclone 公司),CCK-8 试剂盒(中国博士德公司),二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO, 美国 Sigma 公司),碘化丙啶(Propidium iodide, PI, 美国 Sigma 公司),Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(美国 BD 公司),EvoScript RNA SYBR Green I Master 试剂盒(瑞士 Roche 公司),总 RNA 提取试剂盒(中国 Bio Flux 公司),抗体 β -actin、mTOR、p70S6K、p-mTOR、p-p70S6K(美国 Cell Signaling Technology 公司),山羊抗鼠二抗、山羊抗兔二抗(美国 Thermo 公司)。

1.2 方法

1.2.1 CCK-8 检测澳洲茄碱作用后膀胱癌 J82、T24 细胞的生存率 将对数期生长的 J82、T24 细胞

种植至 96 孔板中,2000 个/孔,培养 12 h 至细胞贴壁。分别加入含有 0、5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 澳洲茄碱的细胞培养液,0 $\mu\text{mol/L}$ 澳洲茄碱组加入含有 0.3% DMSO 的细胞培养液,每组设 6 个复孔,分别培养 24 h、48 h、72 h,加入 CCK-8,计算细胞生存率。独立重复实验 4 次。

1.2.2 流式细胞仪(fluorescence activating cell sorter, FACS)检测 J82 细胞凋亡 J82 细胞经 0、10、30 $\mu\text{mol/L}$ 澳洲茄碱处理 24 h,胰酶消化后收集,PBS 洗涤后加入结合液 100 μL 重悬,每组加入 5 μL FITC Annexin V 进行避光染色 15 min 后加入 5 μL PI 染色 5 min。每组加入 500 μL 结合液重悬后上机检测,得出细胞凋亡率。独立重复实验 4 次。

1.2.3 FACS 检测 J82 细胞周期 取对数期生长 J82 细胞,传代培养 12 h 至贴壁,设 0 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 、30 $\mu\text{mol/L}$ 澳洲茄碱组,其中 0 $\mu\text{mol/L}$ 组加入含有 0.3% DMSO 的培养基,10 $\mu\text{mol/L}$ 澳洲茄碱组和 30 $\mu\text{mol/L}$ 澳洲茄碱组加入对应浓度澳洲茄碱,培养箱内培养 24 h。胰酶消化、洗涤后重悬,用预冷 70%乙醇溶液固定 2 h,用 5 $\mu\text{g/mL}$ 的 PI 溶液进行 DNA 染色,70 $\mu\text{mol/L}$ 滤网过滤后上机检测,所得数据应用 ModFit LT 软件进行分析,得出细胞周期各期细胞百分比。

1.2.4 Western blot 法检测 mTOR、p-mTOR、p70S6K、p-p70S6K 蛋白表达 将 J82 细胞分成 0 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 、30 $\mu\text{mol/L}$ 澳洲茄碱组,加入对应培养液,其中 0 $\mu\text{mol/L}$ 组加入含有 0.3% DMSO 的培养基,培养 24 h 后收取蛋白,双辛酸(BCA)法检测蛋白浓度,取 30 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。用 4% BSA 封闭 1 h,加入 1:1000 稀释的一抗孵育 15 h,洗膜后加入二抗孵育 1 h,加入电化学发光液暗室曝光。

1.2.5 RT-qPCR 法检测 mTOR、p70S6K mRNA 表达 将 0 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 、30 $\mu\text{mol/L}$ 澳洲茄碱组 J82 细胞培养 24 h 后,应用总 RNA 提取试剂

盒提取总 RNA 并测定 RNA 浓度,根据 EvoScript RNA SYBR Green I Master 试剂盒说明书配成反应体系。mTOR 引物序列:F:5'-ATGCTTGGAACCGGAC-CTG-3', R:5'-TCTTGACTCATCTCTCGGAGTT-3'。p70S6K 引物序列: F: 5'-CGGGACGGCTTTTACCCAG-3', R: 5'-TTTCTCACAATGTTCCATGCCA-3'。β-actin 引物序列:F: 5'-GTTGTCGACGACGAGCG-3', R: 5'-GCACAGAGC-CTCGCCTT-3'。每组三复孔,置于荧光定量 PCR 仪内检测。参数设置为:逆转录:60 °C,15 min;预保温:95 °C,10 min;扩增:95 °C,10 s,58 °C,30 s,45 个循环;溶解曲线:95 °C,1 min,25 °C,1 min,95 °C,15 s;冷却:40 °C,30 s。

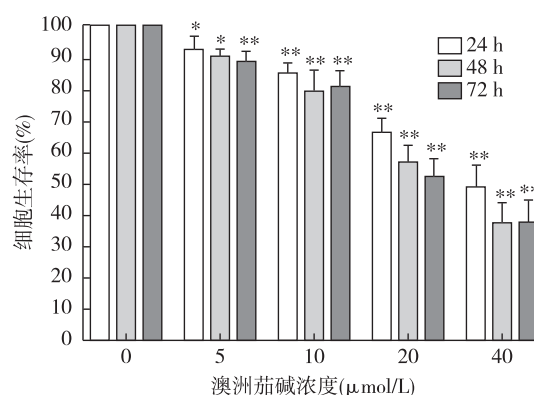
1.3 统计学分析 应用 SPSS 25 软件对实验结果进行统计学分析。CCK-8、细胞凋亡、细胞周期、RT-qPCR 等计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较平均值采用单因素 ANOVA 检验,进一步两两比较应用 LSD-t 检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 澳洲茄碱抑制膀胱癌细胞 J82、T24 细胞增殖

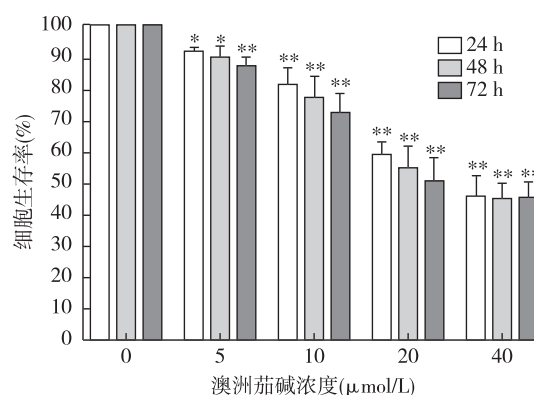
2.1.1 澳洲茄碱抑制膀胱癌 J82 细胞增殖 不同浓度的澳洲茄碱作用后,相同作用时间各组 J82 细胞生存率在整体上差异均有统计学意义($P < 0.01$)。相同作用时间下,不同浓度的澳洲茄碱各组间两两比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。相同作用浓度下,不同培养时间的各组进行 ANOVA 检验,仅 20 μmol/L 澳洲茄碱组差异有统计学意义($P = 0.01$),其余各组差异均无统计学意义($P > 0.05$)。虽然 24 h 各浓度组细胞生存率均高于 48 h,但相同浓度不同作用时间比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。CCK-8 检测结果见图 1。

2.1.2 澳洲茄碱抑制膀胱癌 T24 细胞增殖 不同浓度的澳洲茄碱处理后,相同作用时间各组 T24 细胞生存率差异均有统计学意义($P < 0.01$)。相同作用时间下,不同浓度的澳洲茄碱各组 T24 细胞间两两比较,除 72 h 20 μmol/L 和 72 h 40 μmol/L 组间差异无统计学意义($P = 0.17$),其余各组间差异均有统计学意义($P < 0.05$)。相同作用浓度下,不同培养时间的各组进行 ANOVA 检验,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见图 2。



与 0 μmol/L 比较, * $P < 0.05$ 、* * $P < 0.01$

图 1 澳洲茄碱对 J82 细胞生存率的影响

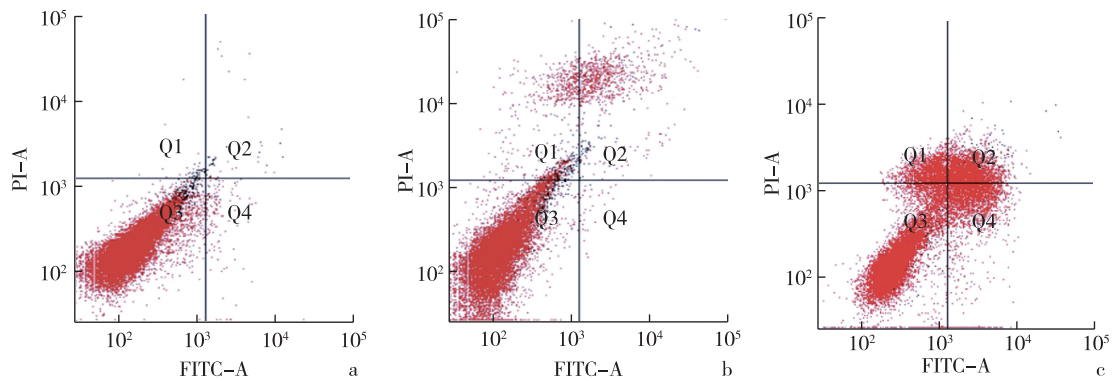


与 0 μmol/L 比较, * $P < 0.05$ 、* * $P < 0.01$

图 2 澳洲茄碱对 T24 细胞生存率的影响

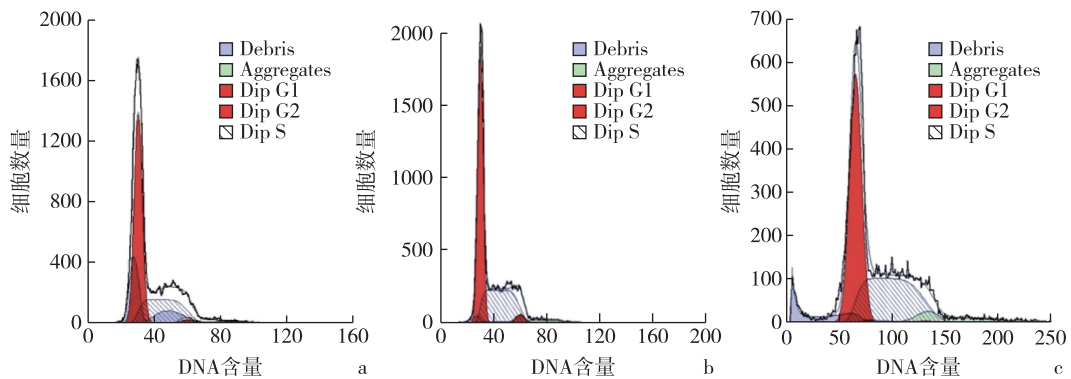
2.2 澳洲茄碱诱导 J82 细胞凋亡 随着澳洲茄碱浓度增高,J82 细胞的凋亡率显著增高,其中 0、10 和 30 μmol/L 澳洲茄碱组凋亡率分别为 $(0.93 \pm 0.26)\%$ 、 $(8.33 \pm 2.16)\%$ 、 $(29.53 \pm 7.63)\%$,各组间差异有统计学意义($P < 0.01$)。两两比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。表明澳洲茄碱能诱导 J82 细胞凋亡,这种诱导作用具有浓度依赖性。见图 3。

2.3 澳洲茄碱阻滞 J82 细胞周期 S 期 澳洲茄碱作用后,J82 细胞 S 期细胞增多,0、10、30 μmol/L 澳洲茄碱组 S 期细胞百分比分别是 $(34.51 \pm 3.61)\%$ 、 $(39.34 \pm 3.21)\%$ 、 $(44.50 \pm 4.29)\%$,差异有统计学意义($P = 0.01$)。G0/G1 期细胞比例相应减少,0、10、30 μmol/L 澳洲茄碱组 G0/G1 期细胞百分比分别是 $(62.65 \pm 4.73)\%$ 、 $(57.51 \pm 3.37)\%$ 、 $(52.69 \pm 4.00)\%$,差异有统计学意义($P = 0.02$)。而 G2/M 期细胞百分比无明显变化。提示澳洲茄碱可引起 J82 细胞发生细胞周期阻滞,这种阻滞作用发生在 S 期。见图 4。



a: 0 $\mu\text{mol/L}$; b: 10 $\mu\text{mol/L}$; c: 30 $\mu\text{mol/L}$

图 3 澳洲茄碱对 J82 细胞凋亡的影响



a: 0 $\mu\text{mol/L}$; b: 10 $\mu\text{mol/L}$; c: 30 $\mu\text{mol/L}$

图 4 澳洲茄碱对 J82 细胞周期的影响

2.4 澳洲茄碱抑制 J82 细胞 mTOR、p70S6K 蛋白的磷酸化 各组细胞 mTOR、p70S6K 蛋白表达未见明显差异。随着澳洲茄碱浓度增高, p-mTOR 表达量逐渐减少, 差异有统计学意义 ($F=85.18, P<0.01$); p-p70S6K 表达量逐渐减少, 差异有统计学意义 ($F=74.96, P<0.01$)。表明澳洲茄碱能抑制 mTOR 蛋白的磷酸化、抑制 p70S6K 蛋白的磷酸化, 从而抑制 mTOR/p70S6K 信号通路的激活。见图 5、图 6。

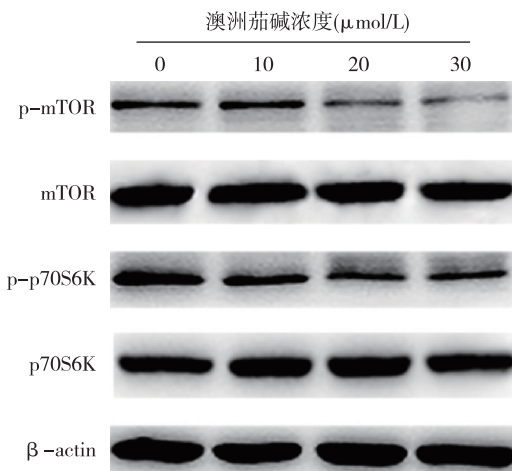
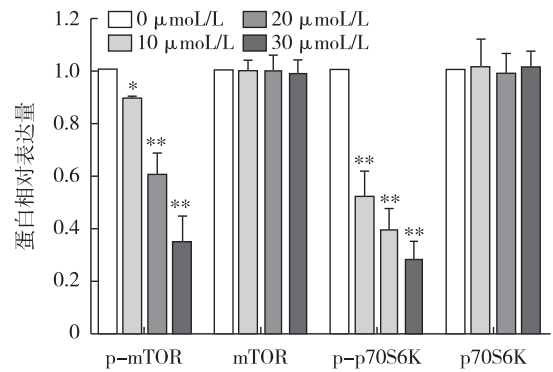


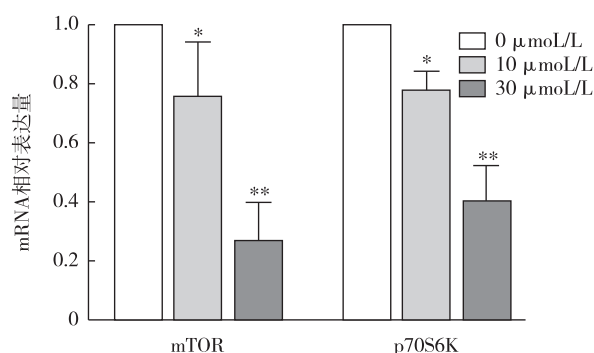
图 5 澳洲茄碱对 J82 细胞蛋白表达的影响



与 0 $\mu\text{mol/L}$ 比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

图 6 澳洲茄碱作用后 J82 细胞蛋白的相对表达量

2.5 澳洲茄碱下调 J82 细胞 mTOR、p70S6K mRNA 表达 随着澳洲茄碱浓度增高, J82 细胞 mTOR mRNA 表达量逐渐降低, 差异有统计学意义 ($F=31.49, P<0.01$); p70S6K mRNA 表达量逐渐降低, 差异有统计学意义 ($F=47.08, P<0.01$)。各组进行两两比较, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 7。



与 0 $\mu\text{mol/L}$ 比较, * $P < 0.05$ 、* * $P < 0.01$

图 7 澳洲茄碱作用后 J82 细胞 mTOR、p70S6K mRNA 的相对表达量

3 讨 论

2015 年全世界新发膀胱癌病例超过 450 000 例,膀胱癌在最常见的肿瘤中排名第 9 位^[5]。膀胱癌的危险因素包括:年龄、性别、吸烟、饮水中砷的暴露史、职业性芳香胺接触史、血吸虫病、含非那西丁的止痛药以及膀胱癌家族史^[6]。与发达国家相比,发展中国家和不发达国家的膀胱癌患者生存率较低^[7]。膀胱癌目前的主要治疗手段是手术和化疗,然而因肿瘤转移导致其治疗效果并不理想,患者预后较差^[8]。即使应用了最佳的治疗方案,超过 50% 的膀胱癌患者出现复发,高达 20% 的患者可能进展为肌层浸润性膀胱癌^[9]。根治性膀胱切除术是肌层浸润性膀胱癌的主要治疗方法,但患者术后各种并发症的发生率较高^[10]。因此寻找对膀胱癌有效的新药物是提高膀胱癌患者生存率的关键。

从天然药物中发现低毒、高效的抗癌成分是新药研发的重要途径之一^[11]。传统中药治疗恶性肿瘤具有独特的优势,可以通过提高自身免疫力、增强机体抗病能力达到驱除癌瘤的目的^[12]。中药龙葵具有清热、解毒、消肿等功效,在临床中广泛应用于肺癌、肉瘤、宫颈癌、乳腺癌等恶性肿瘤的治疗中^[13]。澳洲茄碱,分子式: $\text{C}_{45}\text{H}_{73}\text{NO}_{16}$, 是龙葵发挥抗癌作用的主要活性成分。研究表明,澳洲茄碱可以显著抑制结肠癌、乳腺癌、宫颈癌、肝癌、胶质母细胞瘤等细胞的增殖,其半数抑制浓度波动于 6.01~26.21 $\mu\text{g/mL}$ ^[14]。Liu 等^[4]发现,澳洲茄碱可以通过对 miR-375-3p 和 lncRNA CCAT1 的相互调解,导致转录因子 SP1 介导的 IRF5 表达减少,从而抑制肝癌 HepG2 细胞的增殖。Smo 基因突变和 Gli

基因扩增可以使肿瘤细胞发生原发性和获得性的耐药,澳洲茄碱可以通过抑制 Hh 信号通路,降低 Gli 的表达从而对抗肿瘤细胞的耐药性^[15]。

J82 细胞、T24 细胞均为膀胱移行癌细胞,属于浸润性膀胱癌细胞^[16-17]。CCK-8 结果表明澳洲茄碱作用后, J82、T24 细胞的存活率降低。并且随着澳洲茄碱的浓度增加,这种抑制作用增强,说明澳洲茄碱能显著抑制 J82、T24 细胞的增殖,并且这种抑制作用具有浓度依赖性。然而延长澳洲茄碱的作用时间,并不能显著增强这种抑制作用,提示这种抑制作用无明显时间依赖性。

细胞凋亡和细胞周期结果表明,澳洲茄碱可诱导 J82 细胞凋亡并且引起 J82 细胞发生细胞周期阻滞,阻滞发生在 S 期。不同浓度组进行两两比较,差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$),提示澳洲茄碱诱导 J82 细胞凋亡和引起 J82 细胞阻滞的作用均具有浓度依赖性。

mTOR/p70S6K 信号通路是一条复杂的信号通路,包含许多下游分子,广泛参与许多细胞进程,包括细胞生长和存活、细胞周期、细胞凋亡、细胞自噬、蛋白合成、血管再生、细胞迁移和膜运输等^[18-22]。mTOR 蛋白经过磷酸化后活化,进一步引起下游靶蛋白 p70S6K 磷酸化,进而激活 mTOR 信号通路,促进细胞生长,抑制细胞自噬和凋亡,有利于细胞周期进展,加速细胞的增殖^[23-24]。因此,抑制 mTOR、p70S6K 蛋白的磷酸化的药物可以通过抑制 mTOR 信号通路的传导发挥抗肿瘤作用。

为了进一步研究澳洲茄碱抑制膀胱癌细胞增殖、诱导细胞凋亡、阻滞细胞周期的分子机制,本研究分析了澳洲茄碱对 J82 细胞 mTOR、p-mTOR、p70S6K、p-p70S6K 蛋白表达的影响和对 mTOR、p70S6K 的 mRNA 表达的影响。结果显示各组细胞 mTOR 和 p70S6K 蛋白的表达量无明显差异, p-mTOR、p-p70S6K 表达量显著减少, mTOR、p70S6K 的 mRNA 表达下调,提示澳洲茄碱可能同时通过抑制 mTOR 和 p70S6K 蛋白的磷酸化、下调 mTOR 和 p70S6K 的 mRNA 表达,从而抑制 mTOR 信号通路的激活,发挥抗肿瘤作用。

综上所述,本研究发现澳洲茄碱在体外能显著抑制 J82、T24 细胞增殖、诱导 J82 细胞凋亡、阻滞 J82 细胞周期,这种作用呈浓度依赖性。其分子机制可能是通过抑制 mTOR 和 p70S6K 蛋白的磷酸化、下调 mTOR 和 p70S6K 的 mRNA 表达。澳洲

茄碱有望解开肌层浸润性膀胱癌治疗的难题,成为新的膀胱癌治疗药物。本研究仅在体外初步探索了澳洲茄碱对膀胱癌细胞的抗肿瘤作用,澳洲茄碱对 mTOR 通路其他分子的表达和磷酸化是否有影响以及在动物体内是否仍有抑制膀胱癌细胞生长的作用,尚有待进一步验证。

【参考文献】

- [1] 徐 锋,韩从辉,刘有黄,等.miRNA-625* 在膀胱尿路上皮癌中的表达[J].东南国防医药,2014,16(2):121-123.
- [2] Wang X, Zou S, Lan YL, *et al.* Solasonine inhibits glioma growth through anti-inflammatory pathways[J]. *Am J Transl Res*, 2017,9(9):3977-3989.
- [3] 黄文斯,王 颖,朱海涛,等.澳洲茄碱诱导肺癌细胞株 H446 凋亡及其机制探讨[J].中国肺癌杂志,2015,18(7):416-421.
- [4] Liu Z, Ma C, Tang X, *et al.* The Reciprocal Interaction Between LncRNA CCAT1 and miR-375-3p Contribute to the Downregulation of IRF5 Gene Expression by Solasonine in HepG2 Human Hepatocellular Carcinoma Cells[J]. *Front Oncol*, 2019, 18(9):1081.
- [5] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018,68(6):394-424.
- [6] Rezaei F, Tabatabaee HR, Rahmanian V, *et al.* The Correlation Between Bladder Cancer and Obesity, Overweight, Physical Inactivity, and Tobacco Use: An Ecological Study in Asian Countries[J]. *Ann Glob Health*, 2019,85(1):102.
- [7] Pakzad R, Mohammadian-Hafshejani A, Mohammadian M, *et al.* Incidence and Mortality of Bladder Cancer and their Relationship with Development in Asia[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015,16(16):7365-7374.
- [8] 石昌龙,宋永胜.染料木素抑制趋化因子受体 4 表达对膀胱癌 T24 细胞迁移和侵袭的影响机制[J].东南国防医药,2019,21(3):229-233.
- [9] Wallerand H, Bernhard JC, Culine S, *et al.* Targeted therapies in non-muscle-invasive bladder cancer according to the signaling pathways[J]. *Urol Onco*, 2011,29(1):4-11.
- [10] Tully KH, Krimphove MJ, Reese SW, *et al.* Trends in Adherence to Thromboprophylaxis Guideline in Patients Undergoing Radical Cystectomy[J]. *Urology*, 2020,135:44-49.
- [11] 陈书尚,翁铭芳,王水良,等.补骨脂素对前列腺癌 LNCap-AD 细胞增殖的影响及其分子机制研究[J].中华细胞与干细胞杂志(电子版),2017,7(4):219-223.
- [12] 王新星,张 璐,于正洪,等.中药治疗原发性肝癌的研究现状[J].医学研究生学报,2012,25(12):1341-1344.
- [13] Papadopoulos EI, Petraki C, Gregorakis A, *et al.* Clinical evaluation of microRNA-145 expression in renal cell carcinoma: a promising molecular marker for discriminating and staging the clear cell histological subtype[J]. *Biol Chem*, 2016,397(6):529-539.
- [14] Munari CC, de Oliveira PF, Campos JC, *et al.* Antiproliferative activity of Solanum lycocarpum alkaloidic extract and their constituents, solamargine and solasonine, in tumor cell lines[J]. *J Nat Med*, 2014,68(1):236-241.
- [15] Yang J, Huang W, Tan W. Solasonine, A Natural Glycoalkaloid Compound, Inhibits Gli-Mediated Transcriptional Activity[J]. *Molecules*, 2016,21(10):1364.
- [16] Huang P, Watanabe M, Kaku H, *et al.* Cancer stem cell-like characteristics of a CD133(+) subpopulation in the J82 human bladder cancer cell line[J]. *Mol Clin Onco*, 2013,1(1):180-184.
- [17] 孙 明,赵文嫣,詹运洪,等.沉默 S100A4 基因对人膀胱癌 T-24 细胞生物学特性的影响[J].现代肿瘤医学,2015,23(22):3232-3236.
- [18] 丁 可,王汉东.自噬在创伤性脑损伤中作用的研究进展[J].东南国防医药,2014,16(2):181-183.
- [19] Wanigasooriya K, Tyler R, Barros-Silva JD, *et al.* Radiosensitizing Cancer Using Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), Protein Kinase B (AKT) or Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Inhibitors[J]. *Cancers*, 2020,12(5):1278.
- [20] Huang YY, Jiang HX, Shi QY, *et al.* miR-145 Inhibits Th9 Cell Differentiation by Suppressing Activation of the PI3K/Akt/mTOR/p70S6K/HIF-1alpha Pathway in Malignant Ascites from Liver Cancer[J]. *OncoTargets and therapy*, 2020,5(13):3789-3800.
- [21] Li Z, Li Y, Jia Y, *et al.* Rab1A knockdown represses proliferation and promotes apoptosis in gastric cancer cells by inhibition of mTOR/p70S6K pathway[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2020,30(685):108352.
- [22] 彭 婷,裴 华.自噬相关基因 mTOR 信号通路在系统性红斑狼疮发病机制中的作用[J].医学研究生学报,2020,33(1):62-66.
- [23] Litchfield LM, Boehnke K, Brahmachary M, *et al.* Combined inhibition of PIM and CDK4/6 suppresses both mTOR signaling and Rb phosphorylation and potentiates PI3K inhibition in cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2020,11(17):1478-1492.
- [24] 国 斌,易 斌,鲁开智.哺乳动物雷帕霉素靶蛋白的研究进展[J].医学研究生学报,2010,23(8):876-879.

(收稿日期:2020-06-03; 修回日期:2020-07-16)

(责任编辑:叶华珍; 英文编辑:朱一超)