

冬凌草素诱导非小细胞肺癌细胞凋亡的作用及机制研究

张博达^{1*}, 谢芳², 何亚玲¹, 刘梦¹, 蒲珊珊¹

¹川北医学院附属医院; ²南充市中医医院, 南充 637000

摘要: 研究冬凌草素对非小细胞肺癌 (A549、H1299) 细胞增殖、凋亡及自噬效用, 并明确其潜在的作用机制。使用不同浓度冬凌草素分别干预 A549、H1299 细胞, 采用 CCK8 (cell counting kit-8) 检测细胞活性, 筛选最佳的药效浓度; 以 10、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 冬凌草素及顺铂 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 分别干预 A549、H1299 细胞 24 h, 流式细胞计数观察冬凌草素对 A549、H1299 细胞凋亡的影响, 蛋白质印迹 (Western blot, WB) 检测半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (Caspase3)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 剪切体 (Cleaved-Caspase3)、B 淋巴细胞瘤-2 蛋白 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 9 (Caspase9)、微管相关蛋白轻链 3I (microtubule-associated protein light chain 3 isoform I, LC3I)、微管相关蛋白轻链 3II (microtubule-associated protein light chain 3 isoform II, LC3II)、Bax、p62、Beclin-1 表达; A549 细胞过表达 Beclin-1 并用 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 冬凌草素干预, WB 检测 Beclin-1 相关蛋白。冬凌草素浓度依赖性抑制 A549 及 H1299 细胞增殖 ($P < 0.05$), IC_{50} 值分别为 38.2、46.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 冬凌草素可增强 A549、H1299 细胞中 Bax、Cleaved-Caspase3、Caspase3、Caspase9、p62 蛋白表达 ($P < 0.05$); 抑制 A549、H1299 细胞中 LC3-I、LC3-II、Beclin-1 蛋白表达 ($P < 0.05$); 冬凌草素能减少过表达 Beclin-1 非小细胞肺癌细胞中 Beclin-1、LC3-II、p62 蛋白表达 ($P < 0.05$)。冬凌草素可抑制非小细胞肺癌细胞体外活性, 可能与其抑制 Beclin-1 蛋白表达减少自噬而诱发细胞凋亡有关。

关键词: 冬凌草素; 非小细胞肺癌; 凋亡; 自噬; Beclin-1

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2024)10-1692-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.10.005

Effect and mechanism of oridonin inducing apoptosis in non-small cell lung cancer cells

ZHANG Bo-da^{1*}, XIE Fang², HE Ya-ling¹, LIU Meng¹, PU Shan-shan¹

¹Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College; ²Nanchong Traditional Chinese Medicine Hospital, Nanchong 637000, China

Abstract: This study aims to identify the effect of oridonin on proliferation, apoptosis and autophagy of non-small cell lung cancer (A549, H1299) cells, and to clarify its potential mechanism of action. Different concentrations of oridonin were used to intervene in A549 and H1299 cells, and the cell viability assay cell counting kit-8 (CCK8) was used to detect the cell activity and screen the optimal concentration of the drug; 10 and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ oridonin and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cisplatin were used to intervene in A549 and H1299 cells for 24 h, and the effects of oridonin on the proliferation, apoptosis and autophagy of A549 and H1299 cells were observed by flow cytometric counting. Flow cytometric counting was performed to observe the effect of oridonin on apoptosis of A549 and H1299 cells. Detecting the expression of cysteine aspartate protease 3 (Caspase3), cleaved-cysteine aspartate protease 3 (Cleaved-Caspase3), B-cell lymphoma-2, Bcl-2, cysteine aspartate protease 9 (Caspase9), microtubule-associated protein light chain 3 isoform I/II (LC3I/II), Bax, p62, Beclin-1 protein; A549 cells overexpression of Beclin-1 and addition of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ oridonin, WB detection of Beclin-1-related proteins. oridonin concentration-dependently inhibited the proliferation of A549 and H1299 cells ($P < 0.05$), with IC_{50} values of 38.2 and 46.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively; oridonin enhanced the expression of Bax, Cleaved-Caspase3, Caspase3, Caspase9, and p62 in A549 and H1299 cells ($P < 0.05$) and inhibited LC3-I, LC3-II, and Beclin-1 protein expression in A549 and H1299 cells ($P < 0.05$); and oridonin reduced Beclin-1, LC3-II, and p62 protein expression in overexpressing Beclin-1 non-small cell lung cancer cells ($P < 0.05$). The mech-

收稿日期: 2024-03-25 接受日期: 2024-09-04

基金项目: 教育部产学研合作育人项目 (220904439083508); 四川省中医药管理局专项研发项目 (2020JC0057)

* 通信作者 Tel: 86-013330767690; E-mail: zhangboda@nsmc.edu.cn

anism by which oridonin could inhibit the activity of NSCLC cells *in vitro* may be related to the inhibition of Beclin-1 protein expression to reduce autophagy and induce apoptosis.

Key words: oridonin; non-small cell lung; apoptosis; autophagy; Beclin-1

肺癌是全世界癌症相关死亡的主要疾病,其中以非小细胞肺癌(non-small-cell lung cancer, NSCLC)最为常见,约占所有肺癌病例的85%^[1]。手术、放疗和化疗是目前主要的治疗手段,但即使是采取积极治疗,NSCLC患者5年综合生存率仅在5%~31%^[2];新兴的靶向治疗需要有特殊靶点,且通常药物会在一段时间后失效^[3];免疫治疗药物响应率低,且可能引起自身免疫系统疾病^[4]。因此,寻找一种新的高效低毒的NSCLC治疗药物迫在眉睫。

冬凌草又名冰凌草,是一种传统中草药,据记载^[5]其性味苦、甘,微寒,具有良好的清热解毒,化瘀止痛的作用。原植物常被用作抗炎、抗菌和抗癌剂,有悠久的历史^[6],用于治疗咽喉肿痛、症瘕痞块、蛇虫咬伤等疾病。冬凌草素是冬凌草中的主体有效成分,据报道^[7],冬凌草素对多种癌细胞具有细胞毒作用,包括乳腺癌、肝癌、胃癌等。前期研究发现冬凌草素通过P53通路诱导造血干细胞的凋亡和细胞周期阻滞^[8],并可通过激活内质网应激诱导人喉癌细胞凋亡^[9]。而冬凌草素对肿瘤细胞引起凋亡的具体作用机制尚缺欠相关研究。本课题组以冬凌草素为研究对象,探索其对NSCLC细胞A549、H1299凋亡的影响及其作用机制,挖掘冬凌草素在治疗NSCLC中的潜在价值,以期在未来防治NSCLC提供新的途径与方法。

1 材料与方法

1.1 仪器

CKX-31倒置生物显微镜(日本奥林巴斯公司);SFT-1000超临界萃取仪(美国SFT公司);Multiskan Mk3酶标仪(赛默飞世尔仪器有限公司);7180全自动生化分析仪(HITACHI);UV-3000型微量核酸蛋白检测仪(Nano);SCI-100HCM-Pro恒温金属浴(美国赛洛捷克);BioTek μ Quant光谱仪(美国伯腾);ChemiScope6100化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司);ChemiScopeCapture图像采集软件(上海勤翔科学仪器有限公司)。

1.2 材料与试剂

冬凌草素(批号:20190507,纯度98%,西安开来生物科技有限公司);顺铂(批号:H20040812,江

苏豪森药业集团有限公司);磷酸盐缓冲液(PBS,批号:20211124,上海碧云天生物技术有限公司);CCK-8试剂盒(批号:20220816,上海碧云天生物技术有限公司);凝胶配制试剂盒(SDS-PAGE,批号:20230507,北京百奥莱柏科技有限公司);10×RIPA裂解液(批号23186978,北京兰杰柯科技有限公司);Caspase3(批号BST12C131,武汉博士德生物科技公司);Cleaved-Caspase3(批号:BST10D156,武汉博士德生物科技公司);Caspase9(批号:55000045339521,爱博泰克生物公司);LC3I\LC3II(批号:20230115,上海碧云天生物技术有限公司);Bax(批号:20220908,上海碧云天生物技术有限公司);Bcl-2(批号:1109905,亲科生物有限公司);Beclin-1(批号:20210522,上海碧云天生物技术有限公司);p62(批号:20221209,南京建成生物);羊抗兔二抗(批号:20220546,Proteintech公司)、GAPDH抗体(批号:96152,美国CST公司);人非小细胞肺癌细胞(A549、H1299,批号:CL-0016,中国科学院昆明细胞库);过表达Beclin-1基因慢病毒(批号:16,上海Genechem公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养

A549、H1299于含10%FBS、1%青链霉素溶液的RPMI1640培养基中,置于37℃、5%CO₂饱和湿度的细胞培养箱中培养,每天更换培养液。细胞融合度达70%~80%时传代用于实验。

1.3.2 细胞增殖实验

取处于对数生长期,生长状态良好的细胞,接种于6个96孔板中。用0.1 μ g/mL起始,每增大10倍为一浓度梯度,至10 000 μ g/mL止,观察其IC₅₀;分别于12、24、48 h每孔加入10 μ L CCK-8,37℃培养0.5~4 h;酶标仪450 nm测定各孔吸光值。将1 \times 10⁵个/mL的NSCLC细胞接种于96孔板中,每孔100 μ L,实验分组及处理见“1.4”项下。每个培养孔中加入10 μ L的CCK-8液,37℃孵育2 h后,用多功能酶标仪检测450 nm吸光度值(A),按照公式计算存活率:存活率=(实验组A值/空白对照组A值) \times 100%。

1.3.3 细胞分组及给药

取对数生长期的A549及H1299细胞以每孔2

$\times 10^5$ 的密度接种于 6 孔板,待细胞贴壁后开始用药,按照冬凌草素 IC_{50} 分为空白对照组、冬凌草素低剂量($10 \mu\text{g/mL}$)组(Ori-10)、高剂量($50 \mu\text{g/mL}$)组(Ori-50)及 $5 \mu\text{g/mL}$ 顺铂组(DDP)。

1.3.4 Beclin-1 过表达细胞系建立

A549 和 H1299 细胞接种于 12 孔板上,用慢病毒完全培养液孵育。播种后 24 h,抽取所含培养基,用 1 mL 新鲜培养基替换。用含有 $2 \mu\text{g/mL}$ 嘌呤霉素的培养基培养筛选慢病毒感染细胞,持续 2 周。

1.3.5 Western blot 检测

细胞用药处理后,收集各组细胞,加入 RIPA 裂解液(含 1% 的蛋白酶抑制剂和 1% 的磷酸酶抑制剂),12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,用 PBS 清洗 2 遍,随后以 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、1 000 r/min(离心半径 10 cm)离心 5 min。上清液舍弃,向每个试管添加 $80 \mu\text{L}$ 细胞裂解液,涡旋仪上剧烈震荡,于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、12 000 r/min(离心半径 10 cm)离心 5 min 后,取上清液,将样本加入 PBS 和 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液体积 4:1 比例加入相应量缓冲液,旋涡混匀至同一浓度,在金属浴中 $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 蛋白变性 10 min 行恒压电泳,电泳结束后 0.30 A 恒流将蛋白转至 PVDF 膜上,PBST 洗膜三次(5 min/次)使用快速封闭液封闭 15 min,加入一抗(Caspase3、Cleaved-Caspase3、Caspase9、Bax、Bcl-2、Beclin-1、LC-3I/LC-3II、p62), $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜。次日 PBST 洗膜三次,加入二抗,孵育 1.5 h,以 GAPDH 为内参,采用 Image J 软件进行图像分析,计算上述蛋白的变化。

1.3.6 流式细胞计数

将细胞用 PBS 洗涤一次,轻轻重悬并计数,300 g 离心 5 min,弃上清。细胞悬液中加入 $2.5 \mu\text{L}$ 的 Annexin V-FITC 和 $2.5 \mu\text{L}$ 的 PI 染色液,轻轻涡旋后混匀,室温避光孵育 15~20 min,上机检测。

1.3.7 统计分析

采用 SPSS 24.0 统计学软件分析数据,使用 Graphpad Prism 8 软件生成统计图形。计量数据符

合正态分布时用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组之间的比较应用非配对 t 检验或非参数检验,多组间比较使用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 冬凌草素对 NSCLC 细胞活性的影响

A549、H1299 细胞经不同浓度冬凌草素处理 48 h 后,细胞存活率呈浓度依赖性降低, IC_{50} 分别为 $38.2、46.6 \mu\text{g/mL}$ 。与对照组比较 Ori-10 组增殖细胞数减少($P < 0.05$),Ori-50 组增殖细胞数有显著减少($P < 0.01$)(见图 1)。

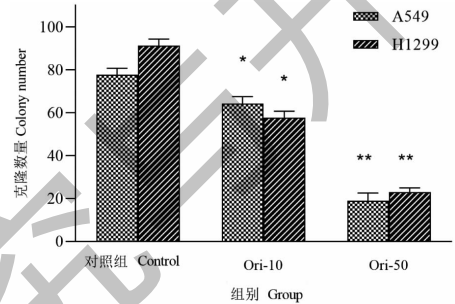


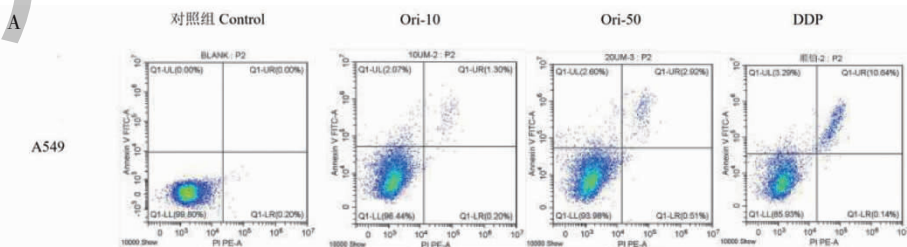
图 1 冬凌草素对 NSCLC 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Effect of Oridonin on proliferation of NSCLC cells($\bar{x} \pm s, n = 6$)

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,下同。Note:Compared with control,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,the same below.

2.2 冬凌草素对 NSCLC 细胞凋亡的影响

如图 2 所示,冬凌草素 $10、50 \mu\text{g/mL}$ 及顺铂 $5 \mu\text{g/mL}$ 处理的 NSCLC 细胞凋亡指数较空白组均升高($P < 0.05$)。如图 3 所示,冬凌草素 $10 \mu\text{g/mL}$ 、 $50 \mu\text{g/mL}$ 及顺铂 $5 \mu\text{g/mL}$ 干预后与空白组比较可增加 A549 及 H1299 组 Bax、Caspase3、Cleaved-Caspase3、Caspase9 表达($P < 0.05$);其中 A549 细胞冬凌草素 $10、50 \mu\text{g/mL}$ 及顺铂 $5 \mu\text{g/mL}$ 干预后较空白组 Bcl-2 表达降低($P < 0.05$),H1299 细胞冬凌草素 $10、50 \mu\text{g/mL}$ 及顺铂 $5 \mu\text{g/mL}$ 干预后较空白组 Bcl-2 的表达升高($P < 0.05$)。



续图 2(Continued Fig.2)

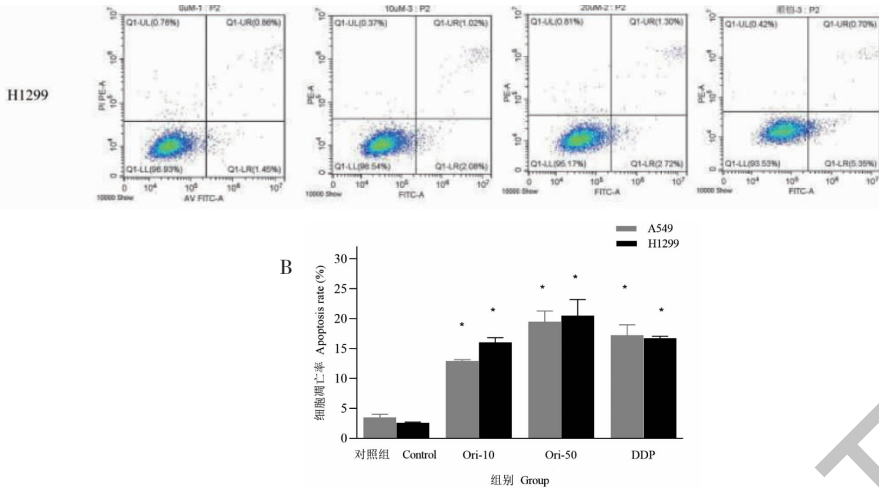


图2 冬凌草素对 NSCLC 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
 Fig.2 Effect of oridonin on apoptosis of NSCLC cells($\bar{x} \pm s, n = 6$)

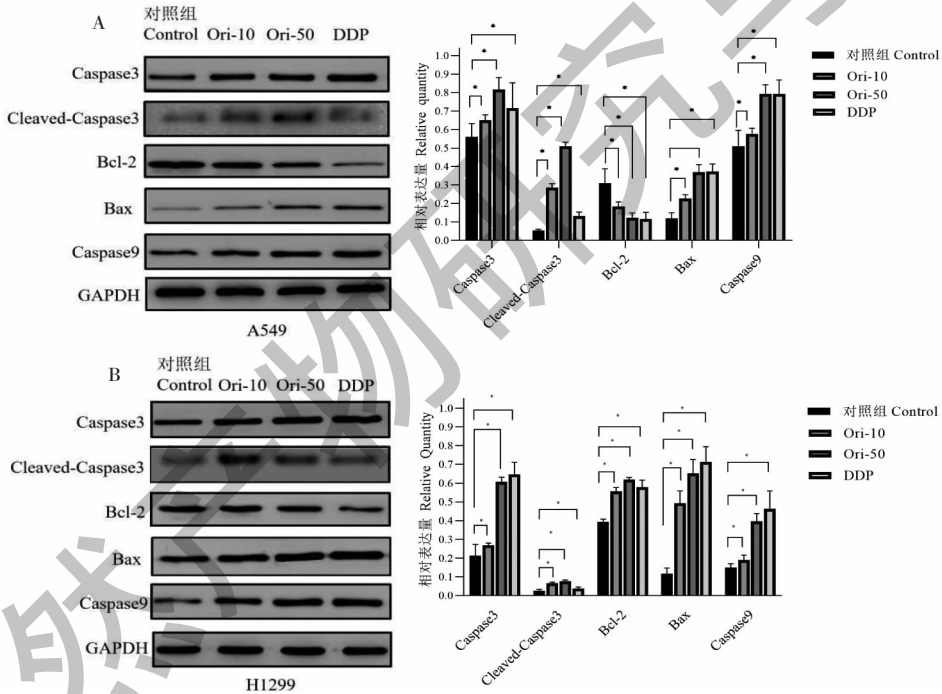


图3 冬凌草素对 NSCLC 细胞凋亡相关蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
 Fig.3 Effect of oridonin on protein relative to apoptosis in NSCLC cells($\bar{x} \pm s, n = 6$)

2.3 冬凌草素对 NSCLC 细胞自噬相关蛋白的影响

图4显示与空白组比较冬凌草素 10、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 干预后 A549 细胞后较空白组 LC3-I、LC3-II、Beclin-1 表达降低($P < 0.05$) ;p62 较空白组表达增加($P < 0.05$)。

2.4 冬凌草素对过表达 Beclin-1 NSCLC 细胞凋亡、自噬相关蛋白的影响

图5所示,用 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 冬凌草素干预 A549 细

胞(Ori-50组)及 A549 过表达 Beclin-1(Over-1组)细胞 48 h,Over-1组与 A549 细胞过表达 Beclin-1 不加药组(Over-2组)比较 LC3-I\LC3-II、Beclin-1 和 Caspase3、Cleaved-Caspase3 表达降低($P < 0.05$) , p62 表达升高($P < 0.05$)。

3 讨论与结论

近年来,肿瘤自噬成为研究热点。自噬的调控与多种因素有关,如基因突变,环境变化等,自噬异

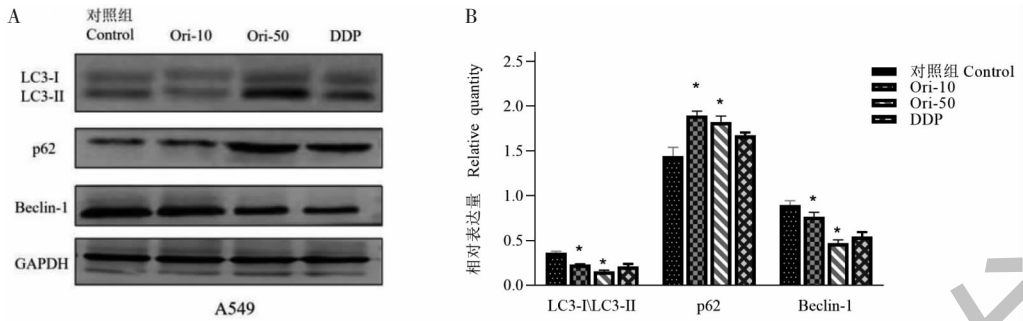


图4 冬凌草素对 NSCLC 细胞自噬相关蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 4 Effect of oridonin on protein relative to autophagy in NSCLC cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

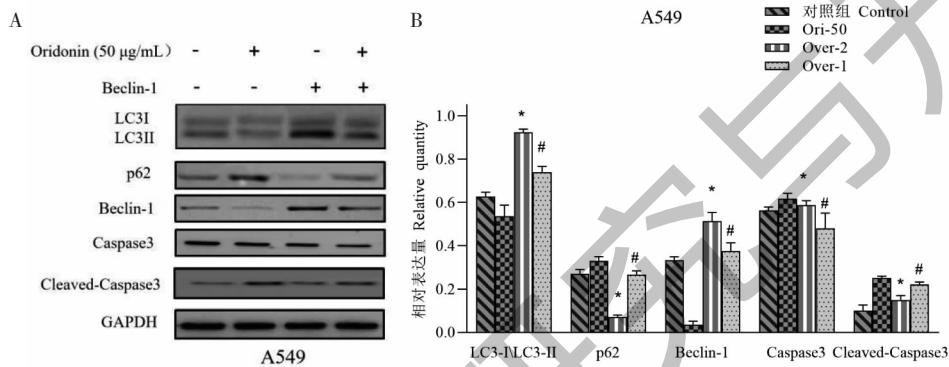


图5 冬凌草素对过表达 Beclin-1 NSCLC 细胞凋亡、自噬相关蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 5 Effect of oridonin on protein relative to apoptosis and autophagy in overexpressed Beclin-1 NSCLC cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与 Over-2 比较,# $P < 0.05$ 。Note:Compared with control,* $P < 0.05$;Compared with Over-2,# $P < 0.05$ 。

常引起的细胞活性改变与肿瘤发生、发展密切相关^[10]。自噬在肿瘤中的作用较为复杂,不同肿瘤组织中表现出不同的生理效应,具有促进和抑制肿瘤的双重作用^[11]。乳腺癌早期自噬可抑制肿瘤进展,而随着肿瘤发展,自噬又可使肿瘤细胞适应微环境,促进肿瘤进展^[12,13]。有研究显示 NSCLC 早期细胞自噬活性呈下降趋势,另有研究表明,在晚期 NSCLC 中,自噬活性增强,促进肺癌的进展,同时介导耐药^[14-16]。

Beclin-1 是由 BECN1 基因编码的一种蛋白,是第一个被克隆的自噬相关基因^[17]。BECN1 基因位于人类染色体 17q21,在人类多种正常组织中广泛表达,是自噬过程的关键调节者。自噬异常是目前 NSCLC 研究热点,Beclin-1 是其主要调控蛋白^[18],在自噬过程中,Beclin-1 是参与自噬启动及调控过程的关键蛋白,通过与多种不同蛋白形成复合物,使得其在不同的水平上实现对自噬的调节,常将其作为自噬启动的重要标志^[19,20]。Yao 等^[21]报道,在人乳腺癌组织中 Beclin-1 蛋白表达增强,同时电镜显

示自噬小体增多。另有报道显示,人前列腺癌组织中的 Beclin-1 表达及自噬小体数量均远低于正常组织,提示 Beclin-1 能较好的预测组织中自噬状态^[22]。

本研究中,显示冬凌草素对 A549 和 H1299 细胞具有细胞毒性,两种细胞株 IC_{50} 分别为 38.2、46.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 且呈现出浓度依赖性,具体表现为冬凌草素浓度依赖性抑制 A549 及 H1299 细胞增殖。为了确定冬凌草素诱导的细胞毒性是否由诱导凋亡细胞死亡引起,我们通过流式细胞术研究冬凌草素 10、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及顺铂 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 干预后 A549 和 H1299 细胞的凋亡状态,并用 WB 法检测细胞中 Bax、Caspase3、Cleaved-Caspase3、Caspase9 相关蛋白的表达,表明冬凌草素 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 可促进细胞凋亡而抑制增殖。我们实验中发现 Bcl-2 在 A549 细胞中表现为低于对照组,而 H1299 中为高于对照组,分析这可能和 A549 细胞中形成 Bcl-2 与 Beclin-1 复合体有关。

通过自噬相关标志物检测,发现冬凌草素 10、

50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 可抑制 Beclin-1 的表达从而抑制自噬。为了明确冬凌草素的具体作用靶点,我们构建了 Beclin-1 过表达细胞株,过表达株活性较对照组增强,提示转染成功,这种状态能被 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的冬凌草素所逆转,从而说明冬凌草素是通过作用于 Beclin-1 蛋白而调节自噬。

冬凌草素可通过抑制黏附斑激酶-细胞外调节蛋白激酶(FAK-ERK)、基质金属蛋白酶 9(MMP-9)、信号传导及转录激活因子 3(STAT3)、丝氨酸/苏氨酸激酶(Akt)等信号通路抑制胃癌^[23]、小细胞肺癌^[24]、乳腺癌^[25]等癌细胞增殖。在前列腺癌中,冬凌草素能够上调 p53、Bax 和下调 Bcl-2,进而诱导人前列腺癌细胞系 DU-145 发生凋亡^[26]。另外,冬凌草素能够诱导自噬相关信号通路,包括 ROS 和 NF- κ B 介导的信号通路,从而促使 L929 细胞发生自噬,以达到杀伤肿瘤细胞的目的^[27]。结合本实验结果,冬凌草素可被视为 NSCLC 的潜在治疗剂。

综上所述,冬凌草素可抑制 NSCLC 细胞 A549、H1299 体外活性,这种机制可能与抑制 Beclin-1 蛋白表达减少自噬而诱发细胞凋亡有关。

参考文献

- Duma N, Santana-Davila R, Molina JR. Non-small cell lung cancer: epidemiology, screening, diagnosis, and treatment [J]. *Mayo Clin Proc*, 2019, 8: 1623-1640.
- Wang M, Herbst RS, Boshoff C. Toward personalized treatment approaches for non-small-cell lung cancer [J]. *Nat Med*, 2021, 8: 1345-1356.
- Imyanitov EN, Iyevleva AG, Levchenko EV. Molecular testing and targeted therapy for non-small cell lung cancer: current status and perspectives [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2021, 157: 103194.
- Reck M, Remon J, Hellmann MD. First-line immunotherapy for non-small-cell lung cancer [J]. *Clin Oncol*. 2022, 6: 586-597.
- Henan Academy of Innovations in Medical Science, et al. A new antitumor substance-oridonin [J]. *Chin Sci Bull (科学通报)*, 1978, 1: 53-56.
- Sun HD, Pan LT, Lin ZW, et al. Structure of rabdosin from Guizhou [J]. *Acta Bot Yunnan (云南植物研究)*, 1988, 3: 325-330.
- Jin J, Liu X. Research progress on antitumor mechanism of rabdosin [J]. *Prog Mod Biome (现代生物医学进展)*, 2009, 16: 3182-3184.
- Kou B, Yang Y, Bai YE, et al. Oridonin induces apoptosis of laryngeal carcinoma via endoplasmic reticulum stress [J].

- Cancer Manag Res*, 2020, 12: 8387-8396.
- Kong R, Pan YP, Liang GJ. Research progress on pharmacological action and mechanism of rabdosin [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med (中华中医药学刊)*, 2021, 39: 70-72.
- Mizushima N, Levine B. Autophagy in mammalian development and differentiation [J]. *Nat Cell Bio*, 2010, 9: 823-830.
- Jiao YH, Xin M, Xu JJ, et al. Polyphyllin II induced apoptosis of NSCLC cells by inhibiting autophagy through the mTOR pathway [J]. *Pharm Biol*, 2022, 60: 1781-1789.
- Chen L, Liu Q, Huang Z, et al. Tripchlorolide induces cell death in lung cancer cells by autophagy [J]. *Int J Oncol*, 2012, 40: 1066-1070.
- Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E, et al. Role of autophagy in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 12: 961-967.
- Liu J, Lin Y, Yang H, et al. The expression of p33(ING1), p53, and utophagy-related gene Beclin1 in patients with non-small cell lung cancer [J]. *Tumour Biol*, 2011, 32: 1113-1121.
- Moreira-Leite FF, Harrison LR, Mironov A, et al. EGFR T790M-mediated gefitinib resistance in non-small cell lung cancer cells does not modulate sensitivity to PI103 provoked autophagy [J]. *J Thorac Oncol* 2010, 6: 765-777.
- Newman AC, Scholefield CL, Kemp AJ, et al. TBK1 Kinase addiction in lung cancer cells is mediated via autophagy of Tax1bp1/Ndp52 and non-canonical NF-kappaB signalling [J]. *Plos one*, 2012, 11: e50672.
- Wan Y, Qian Y, Wang Y, et al. Prognostic value of Beclin 1, EGFR and ALK in non-squamous non-small cell lung cancer [J]. *Discov Oncol*, 2022, 13: 127.
- Chen J, Zhang X, Gao S, et al. Share A Beclin 1-targeting stapled peptide synergizes with erlotinib to potently inhibit proliferation of non-small-cell lung cancer cells [J]. *Autophagy*, 2023, 19: 1533-1550.
- Aita VM, Liang XH, Murty VV, et al. Cloning nad genomic orgnaization of beclin 1, acandidate tumor suppressor geneon chromosome 17q21 [J]. *Genomic*, 1999, 59: 59-65.
- Wang RC, Wei Y, An Z, et al. Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin-1 phosphorylation [J]. *Science*, 2012, 338: 956-959.
- Yao Q, Chen JH, Lv YJ, et al. The significance of expression of autophagy-related gene Beclin, Bcl-2, and Bax in breast cancer tissues [J]. *Tumor Biol*, 2011, 32: 1163-1171.
- Giatromanolaki A, Sivridis E, Mendrinou S, et al. Autophagy proteins in prostate cancer: relation with anaerobic metabolism and Gleason score 1 [J]. *Urol Oncol-Semin Ori*, 2013, 30: 1-8.