

# 熊果酸通过下调 MyD88 抑制结肠癌细胞侵袭转移的作用机制研究

刘巧丽<sup>1,2</sup>, 陈自喜<sup>1</sup>, 相芬芬<sup>1</sup>, 范嫣<sup>1</sup>, 朱兆伟<sup>1</sup>, 张孟哲<sup>1</sup>, 吴蓉<sup>1</sup>, 康向东<sup>1\*</sup>

1.上海中医药大学附属普陀医院 检验科, 上海 200062

2.上海交通大学附属上海市第一人民医院 中医科, 上海 200080

**【摘要】 目的** 探讨熊果酸通过下调 MyD88 抑制结肠癌细胞侵袭转移的作用及可能的机制。**方法** 在细胞增殖实验中以人结肠癌 HCT-116 细胞和人结肠癌 Lovo 细胞作为本次研究对象, 分为对照组、熊果酸组, 熊果酸组给予不同的熊果酸药物浓度处理, 继续培养 48 h 后再应用 CCK-8 法检测其增殖曲线; 细胞凋亡实验则将人结肠癌 HCT-116 细胞分为对照组、熊果酸组, 熊果酸组予以 20  $\mu\text{mol/L}$  的浓度处理 48 h, 收集细胞后应用流式细胞术检测其凋亡水平。后期的侵袭转移及机制研究包括 2 部分, 一部分为 HCT-116 细胞为研究对象, 分组及处理方法同前; 另一部分以 MyD88 稳转人结肠癌 HCT-116 细胞为研究对象进行实验, 分为 MyD88-NC 组、MyD88-KD 组、MyD88-OE 组。划痕实验则分别于 0、48 h 观察各组 HCT-116 细胞的迁移情况, 比较细胞迁移能力; Transwell 实验分别观察 0、24 h 各组 HCT-116 细胞的迁移情况, 比较细胞迁移能力; 蛋白质印迹法检测上述各组细胞的 MyD88、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)蛋白的表达水平差异。**结果** 熊果酸可以显著抑制结肠癌细胞的增殖, 且呈明显的剂量依赖性; 熊果酸可以显著促进结肠癌细胞的凋亡, 对照组相比差异有统计学意义( $P=0.02$ )。MyD88-KD 组的迁移率(划痕实验、Transwell 实验)明显低于对照组( $P=0.04$ ,  $P=0.03$ ), 而 MyD88-OE 组的迁移率(划痕实验、Transwell 实验)则显著高于对照组, 两者差异均有统计学意义( $P=0.004$ ,  $P=0.002$ ); 熊果酸组的迁移率也显著低于对照组, 两者差异有统计学意义( $P=0.009$ ); MyD88-KD 组及熊果酸组 MMP-2、MMP-9 的蛋白表达均明显降低, 而 MyD88-OE 组则明显升高, 与对照组比较差异均有统计学意义( $P<0.01$ )。**结论** 熊果酸可显著降低 MyD88 蛋白的表达, 并通过下调 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达实现对人结肠癌细胞侵袭转移能力的抑制作用。

**【关键词】** 髓样分化因子 88; 结肠癌; 自噬; 凋亡

## Mechanism of ursolic acid inhibiting invasion and metastasis of colon cancer cells by down regulating MyD88

Liu Qiaoli<sup>1,2</sup>, Chen Zixi<sup>1</sup>, Xiang Fenfen<sup>1</sup>, Fan Yan<sup>1</sup>, Zhu Zhaowei<sup>1</sup>, Zhang Mengzhe<sup>1</sup>, Wu Rong<sup>1</sup>, Kang Xiangdong<sup>1\*</sup>

1. Clinical Laboratory, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China

2. Department of Traditional Chinese Medicine, Shanghai General Hospital, Shanghai 200080, China

Corresponding author: Kang Xiangdong, E-mail: xd\_kang@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect and the possible mechanism of ursolic acid on inhibiting the invasion and metastasis of colon cancer cells by down regulating MyD88. **Methods** In the cell proliferation experiment, human colon cancer HCT-116 cells and human colon cancer Lovo cells were divided into control group and ursolic acid group. The ursolic acid group were treated with different concentrations of ursolic acid. When cultured 48 hours, the proliferation curve were detected by CCK-8 method. In the apoptosis experiment, human colon cancer HCT-116 cells were divided into control group and ursolic acid group.

基金项目: 国家自然科学基金(81703878); 中医优势病种及特色诊疗技术(zyjx-2017022); 上海市海派中医流派传承人才培养项目(张氏内科流派继承人)(沪卫计中发 201725)

\* 通信作者: 康向东, E-mail: xd\_kang@163.com

The concentration of the ursolic acid group was 20  $\mu\text{mol}$ , cells were collected after 48 h and the apoptosis level were detected by flow cytometry. The mechanism research of invasion and metastasis includes two parts. One part is HCT-116 cells, the grouping and treatment methods are the same as before. The other part took MyD88 stably transformed human colon cancer HCT-116 cells as the research objects. And they were divided into MyD88-NC group, MyD88-KD group and myd88-OE group. The migration of HCT-116 cells in each group was observed at 0 h and 48 h respectively. Transwell experiment was used to observe the migration of HCT-116 cells in each group at 0 h and 24 h, then compare the cell migration ability. The protein expression levels of MyD88, matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) were detected by Western blot. **Results** ursolic acid could significantly inhibit the proliferation of colon cancer cells in a dose-dependent manner. Meanwhile, ursolic acid could significantly promote the apoptosis of colon cancer cells, and the difference was statistically significant compared with the control group ( $P=0.02$ ). The mobility of MyD88-KD group (scratch test and Transwell test) was significantly lower than the control group ( $P=0.04$ ,  $P=0.03$ ), while the mobility of MyD88-OE group (scratch test and Transwell test) was significantly higher than the control group ( $P=0.004$ ,  $P=0.002$ ); The mobility of ursolic acid group was also significantly lower than the control group ( $P=0.009$ ); The protein expressions of MMP-2 and MMP-9 in MyD88-KD group and ursolic acid group decreased significantly, while those in MyD88-OE group increased significantly, which was statistically significant compared with the control group ( $P<0.01$ ). **Conclusion** ursolic acid can significantly reduce the expression of MyD88 protein and inhibit the invasion and metastasis of human colon cancer cells by down regulating the expression of MMP-2 and MMP-9 protein.

**【Key words】** Myeloid differentiation factor 88; Colon cancer; Autophagy; Apoptosis

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)在世界范围内是排名第三的常见多发恶性肿瘤,严重地影响着全人类的生命及健康<sup>[1]</sup>。临床上常用的治疗方法依次为手术、放化疗、新型免疫检查点及靶向疗法,但仍然难以改善其持续处于较高水平的肿瘤复发率、远处转移率以及死亡率<sup>[1,2]</sup>。髓样分化因子(myeloid differentiation factor 88, MyD88)是处于信号通路 Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR)中的一个极其重要的关键衔接分子,研究证实了 TLR/MyD88 信号传导在 CRC 发展中具有举足轻重的作用,更有学者提出通过抑制 TLR/MyD88 调节炎症微环境的途径,将可能成为针对胃肠癌症发生及其恶性进展的一种有效的预防或治疗策略<sup>[3-5]</sup>。

课题组的前期研究证实熊果酸可显著降低结肠癌细胞 MyD88 的 mRNA 及蛋白的表达,本研究旨在通过科学探索,为临床应用熊果酸减少结肠癌转移并改善其预后提供一定的实验依据。

## 1 材料与方法

1.1 细胞 本课题所用的人结肠癌细胞株均购自中国科学院细胞库处,分别为人结肠癌 HCT-116 细胞、人结肠癌 Lovo 细胞。

1.2 主要试剂和仪器 熊果酸购自 Sigma-Aldrich 公司, McCoy 5A 培养基、RPMI-1640 培养基、二甲

基亚砷(DMSO)、胎牛血清(FBS)、双抗(青霉素/链霉素)选购于 Gibco 公司, DMEM 培养基购自 Hyclone 公司, CCK-8 试剂盒选购于同仁化学研究所(Dojindo), PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I 选购于 BD 公司, MyD88-shRNA 的慢病毒构建质粒及空白对照质粒均由上海吉玛生物公司设计合成,蛋白质印迹法显影液选购于 Millipore 公司, MyD88 单克隆抗体选购于 CST 公司,羊抗兔二抗选购于美国圣克鲁斯生物技术有限公司,莱卡公司选购倒置荧光显微镜, CO<sub>2</sub> 恒温培养箱购自三洋(SANYO)公司, MK-3 自动酶标仪购自 Labsystems 公司,实时荧光定量 PCR 仪选购于 Life Technologies 公司, SDS-PAGE 凝胶电泳及转膜设备选购于 Bio Rad 公司,显影仪购自上海培清科技有限公司,流式细胞仪选购于 BD 公司。

## 1.3 方法

1.3.1 细胞培养及 MyD88 稳转株的建立 HCT-116 细胞按照常规方法培养于加入 0.1% 双抗的含有 10% 胎牛血清的 McCoy 5A 培养基,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱,均取对数生长期的细胞用于实验。编码 MyD88-siRNA 的慢病毒构建质粒及空白对照质粒均由上海吉玛生物公司设计合成,用 PCR 扩增 MyD88 基因并进行亚克隆转染 EF1a-GFP/puro 慢病毒质粒载体,用于完成 MyD88 过

表达细胞系的构建, MyD88 基因干扰序列为并进行亚克隆转染 pGLV-h1-GFP/puro 慢病毒质粒载体, 空白对照序列为 5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3'(NC)。常规用嘌呤霉素的高浓度筛选细胞、低浓度培养稳定细胞株。

1.3.2 CCK-8 法检测细胞增殖抑制率 使用胰蛋白酶消化后收集结肠癌细胞, 调整其密度后均匀接种在 96 孔培养板, 每组均设置复孔。细胞培养过夜使之贴壁后, 第 2 天各组依次加入不同浓度梯度的熊果酸, 再次置入恒温培养箱 48 h, 吸弃培养上清, 加入含有 10% CCK-8 的无血清 RPMI-1640 培养基 100  $\mu$ l/孔。置于 37 $^{\circ}$ C 恒温孵育箱中进行避光孵育 2 h, 使用全自动酶标仪于 450 nm 单波长处检测吸光度(OD 值), 设置第一列为空白列, 根据所测 OD 值计算细胞生长抑制率。计算公式:

$$\text{生长抑制率} = \frac{1 - \text{各药物组平均 OD 值}}{\text{空白对照组的平均 OD 值}} \times 100\%;$$

根据各生长抑制率推算出 IC<sub>50</sub> 的函数式。

1.3.3 细胞凋亡检测 细胞处理方法如前所述, 应用熊果酸处理 6 孔板中的结肠癌细胞 48 h 后, 收集细胞并进行流式细胞术检测, 比较各组细胞的凋亡百分比。首先使用预冷的磷酸盐缓冲液非常轻柔地冲洗培养板 1 次; 用胰酶(不含 EDTA 配方)将细胞消化后进行收集, 并轻柔地吹打混匀, 即制备成功单细胞悬液; 低温低速离心弃上清后, 按照试剂说明书中的操作步骤进行染色, 随后室温下进行避光孵育, 并立即用流式细胞仪进行检测、分析和作图。

1.3.4 划痕实验及 Transwell 实验 常规使用无菌胰酶消化重悬后计数, 使用含胎牛、双抗的完全培养基将细胞密度调整为  $4 \times 10^5$ /孔(24 孔板); 培养过夜, 待细胞贴壁; 第 2 天晨使用 200  $\mu$ l 进口黄枪头在超净台内配合直尺完成划痕, 使用无菌磷酸盐缓冲液轻柔冲洗 2 次, 加入无血清培养基配制的熊果酸溶液, 于电子显微镜 100 倍下完成划痕后 0 h 的拍照; 继续培养 48 h 后再次完成拍照; 通过愈合面积比较各组之间的迁移率

$$\left( \frac{0 \text{ h 划痕表面积} - 48 \text{ h 划痕表面积}}{0 \text{ h 划痕表面积}} \right) \times 100\%;$$

MyD88-NC 组与 MyD88-KE 组及 MyD88-OE 组的比较不需熊果酸处理环节, 余方法相同。

1.3.5 蛋白质印迹法检测蛋白表达 分组与干预方法同前, 药物作用 48 h 后, 用预冷的磷酸盐缓

冲液轻柔地冲洗 2 遍后置于冰上操作, 加入冷藏细胞裂解液, 再使用冰上摇床充分裂解 30 min, 离心后提取细胞总蛋白, 应用 BCA 法进行蛋白定量, 上样缓冲液定容至 30  $\mu$ g/10  $\mu$ l 后, 各孔取 10  $\mu$ l 上样电泳(5%浓缩胶, 电压 80 V, 20 min; 10%分离胶, 设置电压为 120 V, 80 min), 然后进行电转移至 PVDF 膜(工作条件为电流设置为 200 mA, 工作持续 2 h), 封闭液应用牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA), 使用摇床于室温下封闭, 持续 2 h, 先后以 TTBS 洗膜 10 min 共 3 次; 分别加入 MMP-9、MMP-2、MyD88 单克隆抗体(与 BSA 的稀释比例均为 1:1000), GAPDH 单克隆抗体的稀释比例均为 1:10 000), 使用摇床于 4 $^{\circ}$ C 冰箱内孵育过夜。第 2 天再次使用 TTBS 清洗 10 min $\times$ 3 次, 继之加入辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔的 IgG 溶液(与 BSA 的稀释比例为 1:5000), 于室温下摇床孵育 2 h; 再用 TTBS 清洗 10 min $\times$ 3 次, 按照 Millipore 的 ECL 试剂盒说明书进行显影, 置于上海培清化学发光成像仪中进行曝光和采集图像, 应用 ImageJ 软件对所得蛋白条带进行灰度值测定用于分析比较。

1.5 统计学方法 采用 Graphpad7.0 软件进行分析及处理, 计量资料按照惯例采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 组间均数首先进行方差齐性检验, 仅 2 个组别的比较选用 *t* 检验, 2 个组以上的单因素处理组采用单因素方差分析, 如有 2 个组以上且有 2 个处理因素如组别及时间则使用双因素方差分析, 组间差异统一采用 Tukey 法进行差异性比较, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 熊果酸对结肠癌细胞系增殖及凋亡的影响 CCK8 法显示, 熊果酸对结肠癌细胞系 HCT-116、Lovo 细胞均有明显的增殖抑制作用, 其抑制作用表现为明显的剂量依赖性。熊果酸对 HCT-116 的凋亡具有明显的促进作用, 与对照组相比, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 1。

2.2 MyD88 及熊果酸对 HCT-116 细胞迁移力的影响 HCT-116 细胞系的 MyD88 稳转细胞株在细胞划痕实验中, 可以看出 MyD88-OE 组的划痕愈合面积明显多于对照组, 而 MyD88-KD 组则明显低于对照组; Transwell 实验中, MyD88-OE 组的细胞迁移数量明显高于对照组, MyD88-KD 组则

低于对照组。普通 HCT-116 细胞系的熊果酸组在细胞划痕实验中呈现出与 MyD88-KD 组相似的结果,划痕愈合面积明显低于对照组。见图2。

HCT-116 细胞系的 MyD88 稳转细胞株在细胞划痕、Transwell 实验中表明, MyD88-OE 组 48 h 时迁移率明显升高,与对照组相比有统计学差异

( $P < 0.01$ ); MyD88-KD 组的 48 h 时迁移率明显降低( $P < 0.05$ );普通 HCT-116 细胞系的熊果酸组在细胞划痕实验中呈现出与 MyD88-KD 组相似的结果,与对照组比较有统计学差异( $P < 0.01$ )。见图3。

2.3 熊果酸、MyD88 对结肠癌细胞系 HCT-116 侵袭转移相关蛋白表达的影响 蛋白质印迹法结果

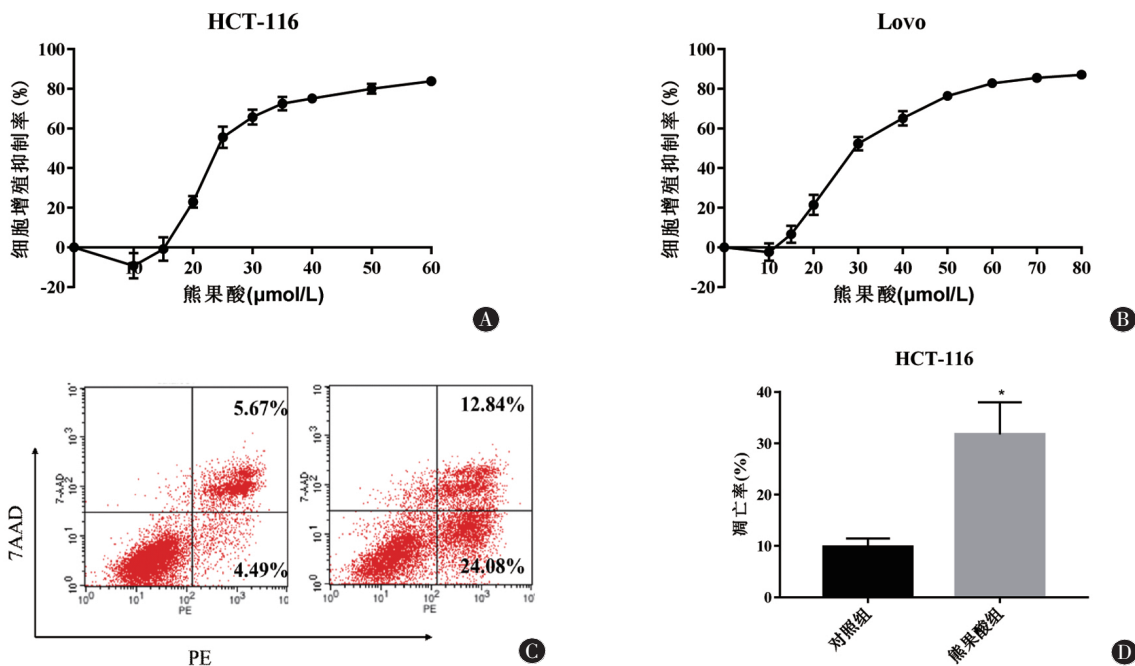


图1 熊果酸对结肠癌细胞系增殖及凋亡的影响

注:A、B,CCK8 法检测不同浓度的熊果酸对结肠癌细胞系 HCT-116、Lovo 细胞增殖的抑制;C、D 流式细胞术检测熊果酸促进 HCT-116 的细胞凋亡;\*与对照组相比, $P < 0.05$ 。

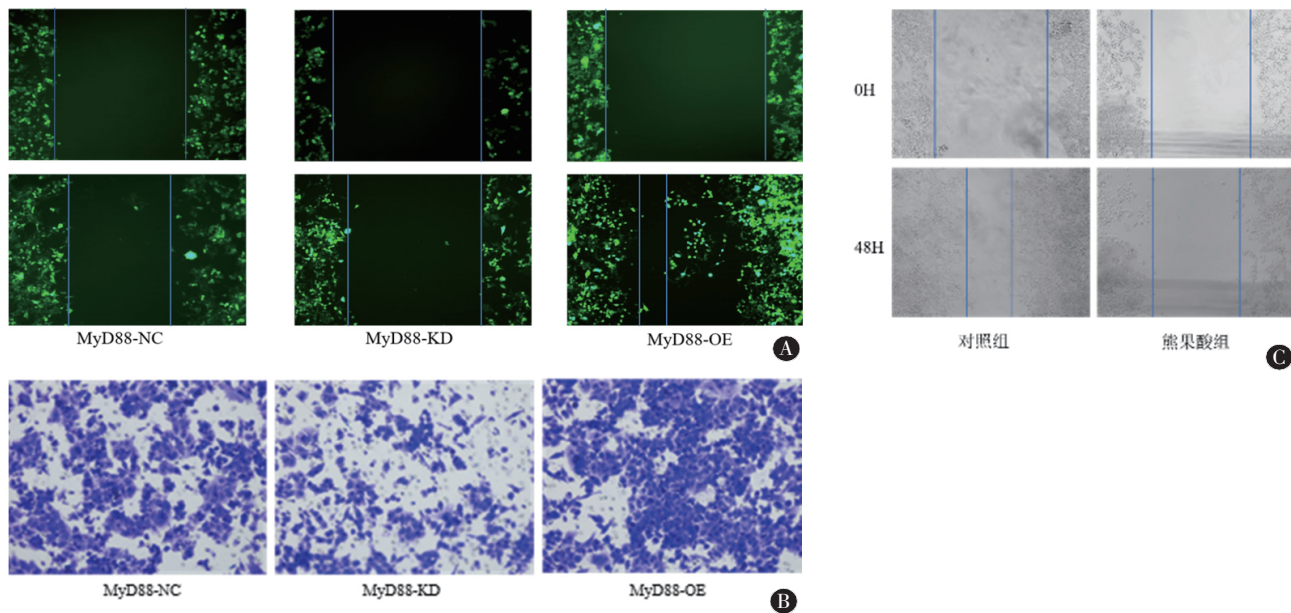


图2 各组细胞迁移情况

注:A, MyD88 基因编辑后结肠癌细胞的划痕实验图像( $\times 200$ 倍);B, MyD88 基因编辑后结肠癌细胞的 Transwell 实验图像( $\times 200$ 倍);C,熊果酸处理后的划痕实验图像( $\times 200$ 倍)。

表明,在普通 HCT-116 细胞系试验中,与对照组相比较,熊果酸组中 MyD88 的蛋白表达被显著地降低了( $P<0.001$ ),同时 MMP-2、MMP-9 蛋白表达也被显著地下调(均  $P<0.01$ )。HCT116 细胞系的 MyD88 稳转细胞株实验中,与 MyD88-NC 组相比,MyD88-KD 组的 MyD88 被显著下调( $P<0.01$ ),同时 MMP-2、MMP-9 蛋白表达显著下调(均  $P<0.05$ ),MyD88-OE 组中的 MyD88 明显地被过表达( $P<0.001$ ),同时 MMP-2、MMP-9 蛋白的表达也被明显地上调(均  $P<0.05$ )。见图 4。

### 3 讨论

结直肠癌作为影响人类健康的常见肿瘤,手术是其首选的临床治疗方法,但患者(尤其是中晚期患者)的术后转移率持续处于较高的水平,最新

研究结果显示,即使 III 期结直肠癌患者均于术后完成了标准化疗,临床上仍有接近 25% 的患者在根治术后 3 年内发生了远处转移,而一旦患者出现了转移,则其术后 5 年的生存率降至 10% 左右<sup>[6]</sup>。转移是结直肠癌患者远期不良预后的最主要原因,故而减少结直肠癌中晚期患者的转移是目前临床上亟需解决的重要难题。

大肠癌在传统中医学中虽无直接著述,但可归属于各种症候范畴,如“肠风”“脏毒”“下痢”“锁肛痔”“积聚”“肠覃”等。而对其发病的认识则可归结为正气不足,癌毒阻滞,大肠失于传化,通降失司,积聚成形<sup>[7]</sup>。熊果酸又被称为乌索酸,归属为五环三萜类的化合物,其被发现在多种医食同源性植物中广泛存在,如熊果、乌梅、女贞子、山楂等,除此之外,还多存在于具有清热解毒作用的中

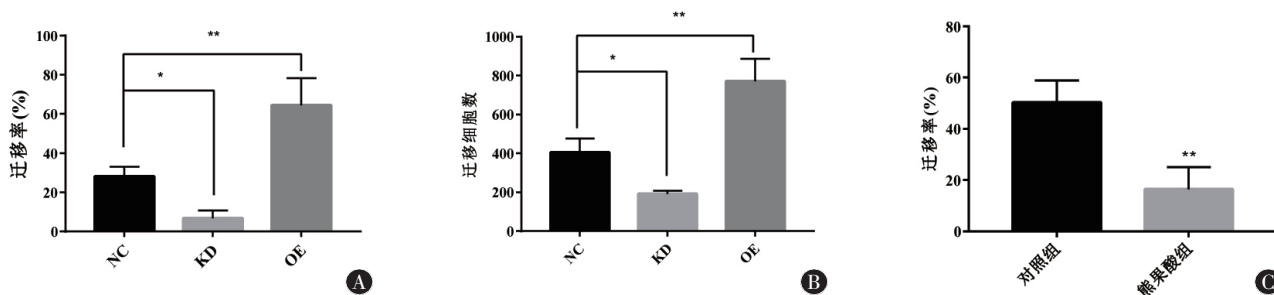


图 3 各组细胞迁移率的比较

注:A,划痕实验中 MyD88 基因编辑后结肠癌细胞的迁移力比较,\* $P<0.05$ ;B,Transwell 实验中 MyD88 基因编辑后结肠癌细胞的迁移力比较,\*\* $P<0.01$ ;C,熊果酸处理后结肠癌细胞的迁移力比较,\*\* $P<0.01$ 。

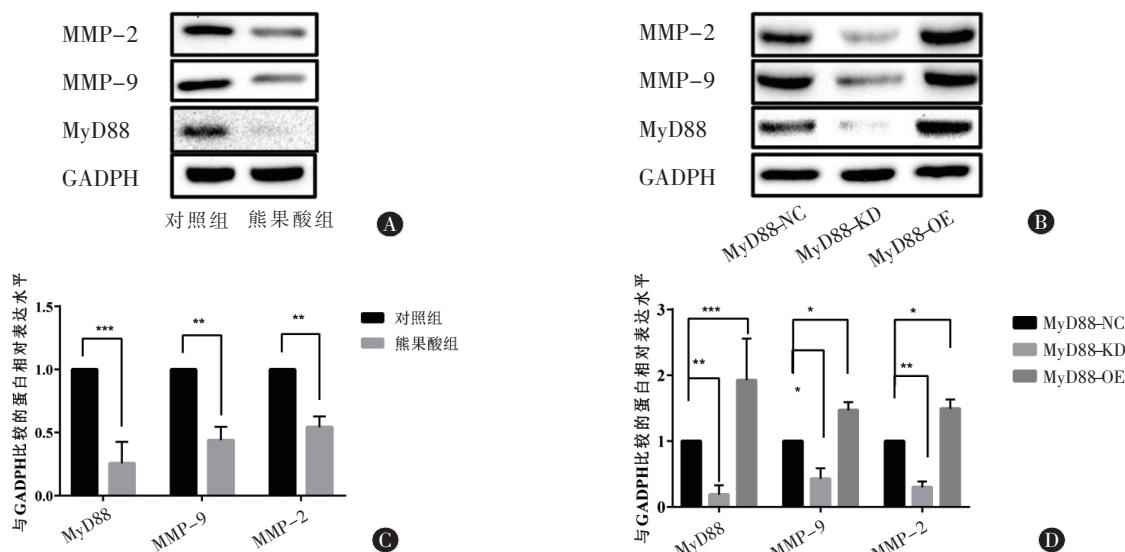


图 3 熊果酸下调 MyD88 并影响侵袭转移的蛋白质印迹法结果

注:A,熊果酸处理后各蛋白的相对表达水平;B,MyD88 基因编辑组各蛋白的相对表达水平;C,熊果酸处理后各蛋白的相对表达水平的统计学结果,与对照组相比,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ,\*\*\* $P<0.001$ ;D,MyD88 基因编辑组各蛋白的相对表达水平的统计学结果,与对照组相比,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ,\*\*\* $P<0.001$ 。

药,如蛇舌草、毛叶长春花、枇杷叶、藤梨根等,具有较高的生物活性,易提取和分离。中医药理论认为,清热解毒类中药多具有显著的抗炎、抗肿瘤等的疗效。现有多项研究均表明熊果酸具有良好的抗肿瘤效应,对多种实体瘤包括结肠癌细胞系具有抑制其增殖、诱导其凋亡等作用<sup>[8-13]</sup>,被普遍认为是一种具有重要开发价值的抗肿瘤中药单体提纯药物,但对其在结肠癌转移方面的作用方面还少有报道。

MyD88 是信号通路 TLR 中的一个极其重要的关键衔接分子,在 CRC 发展中具有非常重要的影响<sup>[3-5]</sup>。课题组前期实验研究证实熊果酸可显著降低结肠癌细胞 MyD88 的 mRNA 及蛋白的表达<sup>[14]</sup>,并证实熊果酸可通过靶向 miRNA-149-5p/MyD88 逆转乳腺癌紫杉醇耐药<sup>[15]</sup>,课题组进一步在结肠癌转移研究方面做了进一步探索。本研究提示熊果酸可显著抑制结肠癌细胞的迁移,与 MyD88 敲减后的结肠癌细胞表型相似,同时其可显著下调 MyD88 的蛋白表达,熊果酸处理组及 MyD88 敲减组中肿瘤侵袭转移 MMP-2、MMP-9 的蛋白表达同样被明显下调,而过表达 MyD88 的 MyD88-OE 组中 MMP-2、MMP-9 的蛋白表达却显著增加,故推测熊果酸能够抑制结肠癌细胞进行迁移的作用机制可能是通过下调 MyD88 蛋白表达,进而抑制 MMP-2、MMP-9 蛋白表达最终实现抑制人结肠癌细胞发生侵袭转移的作用。此研究结果或为熊果酸的临床转化应用提供部分理论基础。

#### 参考文献

[1] SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A, et al. Cancer statistics, 2018[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1):7-30.  
 [2] ZOU W, WOLCHOK JD, CHEN L, et al. PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations[J]. Sci Transl Med, 2016, 8(328):

328-334.  
 [3] URONIS JM, MÜHLBAUER M, HERFARTH HH, ET AL. Modulation of the intestinal microbiota alters colitis-associated colorectal cancer susceptibility[J]. PLoS One, 2009, 4(6): e6026.  
 [4] XIE L, JIANG FC, ZHANG LM, et al. Targeting of MyD88 homodimerization by novel synthetic inhibitor TJ-M2010-5 in preventing colitis-associated colorectal cancer[J]. J Natl Cancer Inst, 2015, 108(4): 364.  
 [5] ECHIZEN K, OSHIMA H, NAKAYAMA M, et al. The inflammatory microenvironment that promotes gastrointestinal cancer development and invasion[J]. Adv Biol Regul, 2018, 2(18): 30072-30081.  
 [6] GROTHEY A, SOBRERO A F, SHIELDS A F, et al. Duration of Adjuvant Chemotherapy for Stage III Colon Cancer [J]. N Engl J Med, 2018, 378(13): 1177-1188.  
 [7] 王小宁, 霍介格. 中医治疗大肠癌的思路与方法探讨[J]. 中国中医基础医学杂志, 2007, 13(9): 681-682.  
 [8] LI J, GUO WJ, YANG QY. Effects of Ursolic Acid and oleanolic acid on human colon carcinoma cellline HCT15 [J]. World J Gastroenterol, 2002, 8(3): 493-495.  
 [9] 文荣, 周成江, 王翠峰, 等. 熊果酸对 HepG2 细胞 AMPK 和 LPIN1 表达的影响[J]. 中国新药杂志, 2019, 28, (2): 208-213.  
 [10] 谭洁, 沈志祥, 耿伟. 熊果酸诱导结肠癌 HT-29 细胞凋亡的实验研究[J]. 中华肿瘤杂志, 2006, 28(2): 99-102.  
 [11] 李爱霞, 赵玉林, 张军辉, 等. 熊果酸诱导人舌鳞状细胞癌 Tea8113 细胞凋亡的作用 [J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2010, 17(9): 491-492.  
 [12] 王静, 王尉平, 顾振纶, 等. 熊果酸诱导肺腺癌 SPC-A. 1 细胞凋亡及其机制 [J]. 苏州大学学报: 医学版, 2008, 28(2): 207-210.  
 [13] 陈波, 盛文玉. 熊果酸对膀胱癌 5637 细胞的作用研究[J]. 中国医学工程, 2011, 19(5): 44-46.  
 [14] XIANG F, PAN C, KONG Q, et al. Ursolic Acid Inhibits the Proliferation of Gastric Cancer Cells by Targeting miR-133a [J]. Oncol Res, 2015, 22:267-273.  
 [15] XIANG F, FAN Y, NI Z, et al. Ursolic Acid Reverses the Chemoresistance of Breast Cancer Cells to Paclitaxel by Targeting MiRNA-149-5p/MyD88 [J]. Front Oncol, 2019 (9): 501.