

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.03.0302

木犀草素对胃癌细胞 MGC803 增殖的抑制作用及其机制

张相强¹, 张 鹏², 黄茂葵¹, 李振华², 代立婷², 刘纪明³, 蒋建伟^{2*}, 王跃春^{1*}

1. 暨南大学医学院生理学教研室, 广州 510632

2. 暨南大学医学院生物化学教研室, 广州 510632

3. 暨南大学附属第一医院普外科, 广州 510632

[摘要] **目的** 研究木犀草素对胃癌细胞 MGC803 的增殖抑制作用及其机制。**方法** 通过 MTT 法、克隆形成抑制实验观察木犀草素对胃癌细胞 MGC803 的增殖抑制作用, 碘化丙啶(PI)单染色法检测细胞周期, Annexin V-PI 双染法测定细胞凋亡, 蛋白质印迹法检测 Bcl-2 家族蛋白、Caspase 蛋白、周期及自噬相关蛋白的表达情况。**结果** MTT 法检测发现, 木犀草素作用于 MGC803 细胞 24、48 和 72 h 后, IC₅₀ 分别为 127.37、76.12、16.84 μmol/L; 木犀草素能抑制胃癌细胞 MGC803 的克隆形成。PI 单染色法发现随着木犀草素浓度的增大, 发生 G₂ 期阻滞的细胞比例增加。蛋白质印迹法的检测结果表明, 随着木犀草素浓度的增加, CDK4、CDK6、CyclinE2 表达减少, CyclinD1、CyclinD3 和 p-Wee1 表达基本不变, CyclinA、CyclinB、Myt1、p-cdc2(Tyr15)表达增高。Annexin V-PI 双染法发现随木犀草素浓度增加, 细胞的早期凋亡率和晚期凋亡率均增加。蛋白质印迹法的检测结果表明, Mcl-1、Bcl-x_L、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 蛋白表达随木犀草素浓度增加而减少, Bcl-2 蛋白表达量变化不大, Bax 蛋白表达量增加, 因而引起 Bcl-2/Bax、Mcl-1/Bax 和 Bcl-x_L/Bax 的比例下降; 同时可见到 Caspase-3 和 PARP 出现了切割的条带; P62 表达下降, Beclin-1、LC3 II 表达增加。**结论** 木犀草素使胃癌细胞 MGC803 发生 G₂ 期阻滞, 诱导细胞自噬的发生并抑制细胞的生长, 还通过线粒体途径诱导胃癌细胞 MGC803 凋亡。

[关键词] 木犀草素; 胃肿瘤; 细胞周期; 细胞凋亡; 自噬**[中图分类号]** R 735.2**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2016)03-0302-07

Inhibitory effects of luteolin against proliferation of gastric cancer cell line MGC803 and the related mechanisms

ZHANG Xiang-qiang¹, ZHANG Peng², HUANG Mao-kui¹, LI Zhen-hua², DAI Li-ting², LIU Ji-ming³, JIANG Jian-wei^{2*}, WANG Yue-chun^{1*}

1. Department of Physiology, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong, China

2. Department of Biochemistry, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong, China

3. Department of General Surgery, First Affiliated Hospital, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong, China

[Abstract] **Objective** To investigate the inhibitory effect of luteolin against proliferation of gastric cancer cell line MGC803 and the related mechanism. **Methods** The inhibitory effect of luteolin against MGC803 cell proliferation was evaluated by MTT assay and clone forming assay. The cell cycle changes were analyzed by the flow cytometry after staining propidium iodide (PI). Annexin V-PI double staining was used to determine the apoptosis ratio of MGC803 cells. Bcl-2 family proteins, Caspase proteins, autophagy-associated and cell cycle-associated proteins were assessed by Western blotting analysis. **Results** MTT assay results showed that the IC₅₀ of luteolin against MGC803 cells for 24 h, 48 h and 72 h treatment were 127.37 μmol/L, 76.12 μmol/L, and 16.84 μmol/L, respectively. Luteolin treatment also inhibited cell colony formation of MGC803 cells. PI single staining flow cytometry found that cells were arrested in G₂ phase with the increase of luteolin concentration. Western blotting results showed that, with the increase of luteolin concentration, CDK4, CDK6 and CyclinE2

[收稿日期] 2015-10-05**[接受日期]** 2016-01-06

[基金项目] 广东省自然科学基金(2014A030313356), 广东省科技计划项目(2012B060300020), 华南肿瘤学国家重点实验室开放课题(HN2015-04), 暨南大学科研培育与创新基金跃升计划项目(116154240)。Supported by Natural Science Foundation of Guangdong Province(2014A030313356), Science and Technology Plan Projects of Guangdong Province(2012B060300020), Project of South China State Key Laboratory of Oncology(HN2015-04), and Jinan University Scientific Research and Cultivating and Innovation Projects(116154240)。

[作者简介] 张相强, 硕士生。E-mail: 907510787@qq.com

* 通信作者 (Corresponding authors). Tel: 020-85220260, E-mail: 329255726@qq.com; Tel: 020-85220256, E-mail: 893689214@qq.com

protein expression was decreased; CyclinD1, CyclinD3 and p-Wee1 protein kept unchanged; and CyclinA, CyclinB, Myt1 and p-cdc2 (Tyr15) protein expression was decreased. Flow cytometry Annexin V-FITC/PI revealed increase of early and late apoptosis with the increase of luteolin concentration. Western blotting analysis showed that Mcl-1, Bcl-x_L, Caspase-3, Caspase-8 and Caspase-9 protein expression was decreased with the increase of luteolin concentration, with slightly changed Bcl-2 expression and increased Bax expression, which led to decreased Bcl-2/Bax, Mcl-1/Bax and Bcl-x_L/Bax ratios. At the same time, Caspase-3 and PARP also appeared in the strip cutting. The expression of P62 was decreased and expression of Beclin-1 and LC3 II was increased. **Conclusion** Luteolin can arrest gastric cancer MGC803 cells at G₂ phase, inducing autophagy and inhibiting cell growth. Luteolin can also induce apoptosis of MGC803 cells via the mitochondrial pathway.

[Key words] luteolin; stomach neoplasms; cell cycle; apoptosis; autophagy

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(3): 302-308]

胃癌起源于胃黏膜上皮, 病因复杂、发病率高, 是消化道最常见的恶性肿瘤, 病死率在所有恶性肿瘤中居第2位^[1]。化学药物治疗是肿瘤治疗的重要手段之一, 但是由于化学药物存在细胞毒性大及易产生肿瘤耐药性的缺点, 因此天然药物的开发成为抗肿瘤药物研究的热点之一。随着中药研究逐步深入, 人们发现并证实了许多对肿瘤有治疗作用的中药, 如槐耳^[2]、康莱特注射液^[3]、华蟾素片^[4]等, 这些中草药制剂已在临床上取得了让人欣喜的治疗效果。黄酮类化合物已经被证实具有广泛的药理学作用, 包括抗菌、保护心血管、解痉、祛痰、抑制酶活性、免疫调节、抗氧化、抗辐射、利尿等^[5-6]。木犀草素作为一种天然黄酮类化合物, 具有上述各种药理学作用, 而且有大量关于木犀草素抑制恶性肿瘤增殖的文献报道^[7-10], 发现其主要通过诱导凋亡和使细胞发生周期阻滞等方式来抑制恶性肿瘤细胞。为了解木犀草素对胃癌细胞生长的影响并初步探索其作用机制, 本实验探讨了木犀草素对胃癌 MGC803 细胞的生长抑制、细胞周期阻滞、致凋亡及致自噬作用, 为研究开发抗癌新药提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料 胃癌细胞株 MGC803 由暨南大学生物化学教研室刘誉教授惠赠。木犀草素(含量 98%)购自西安飞达生物有限公司, 用 DMSO 溶解成 100 mmol/L, 分装, 贮存于 -20℃。RPMI 1640 培养液、新生牛血清购自 Gibco 公司; Annexin V-PI 双染试剂盒购自美国 BD 公司; GAPDH、Bax、CDK4、CDK6、CyclinD1、CyclinD3、CyclinE2、CyclinA、CyclinB、Myt1、p-cdc2 (Tyr15)、LC3、Beclin-1 抗体及细胞裂解液购自美国 Cell Signaling Technology (CST) 公司; PARP、p62、Bcl-2、Bcl-x_L、

Mcl-1、cleaved-Caspase-3 的抗体购于美国 Epitomics 公司; pro-Caspase-8、pro-Caspase-3、pro-Caspase-9、p-Wee1 抗体购自 SAB (Signalway Antibody) 公司; 自噬阻断剂 BafilomycinA1 购自 Santa Cruz 公司。

1.2 细胞培养 胃癌细胞 MGC803 用含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养液培养, 置 37℃、5% CO₂ 培养箱中, 每 2~3 d 用 0.25% 胰蛋白酶消化传代培养, 实验选用对数生长期细胞。

1.3 MTT 法检测细胞增殖抑制 取对数生长期的细胞, 用含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养液调细胞密度为 5×10⁴/mL, 每孔 100 μL 接种到 96 孔板, 即每孔细胞数为 5 000。孔板周边空孔加少许 PBS, 以防培养孔内培养液蒸发, 置 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 24 h。每孔加入木犀草素至其终浓度分别为 0、12.5、25、50、100 μmol/L, DMSO 对照组浓度 ≤ 0.1%, 高浓度药物组含有 DMSO 浓度为 0.8%。继续于培养箱中培养 24、48、72 h 后, 取出 96 孔板, 培养孔每孔加入 20 μL MTT 试剂, 放入培养箱中继续培养 4~6 h; 取出孔板清除孔内液体, 然后每孔加入 150 μL DMSO, 再置于微板振荡器振荡 10 min 左右, 立即于酶标仪检测光密度值 (D₅₇₀)。根据公式计算各组细胞增殖抑制率: 增殖抑制率(%) = (1 - D_{实验组}/D_{对照组}) × 100%。利用 CalcuSyn 软件计算药物的 IC₅₀。

1.4 克隆形成抑制实验 取对数生长期的胃癌细胞 MGC803, 制成细胞悬液后调节细胞密度为 500/mL, 然后接种于 12 孔板, 每孔 1 mL 细胞悬液。每组设 2 个复孔, 置于培养箱培养 24 h 后加木犀草素, 每孔加入木犀草素后终体积为 2 mL (不足体积以含血清 RPMI 1640 培养液补齐), 使木犀草素终浓度分别为 0、1.25、2.5、5、10 μg/mL, DMSO 组浓

度为 0.1%。继续于 CO₂ 培养箱中培养 7 d,取出孔板,去除培养液,PBS 洗涤 2 次,加入固定液甲醇:冰醋酸(3:1),10 min 后晾干,然后结晶紫染色 15 min,接着流水冲洗,以洗净染色液,晾干后记细胞克隆数并拍照。

1.5 PI 单染法检测细胞周期的改变 取对数生长期的 MGC803 细胞,调制密度为 4.0×10⁵/mL 的细胞悬液。取 6 孔培养板一块,每孔加入 1 mL 新鲜的培养液,再加入细胞悬液 500 μL,使每孔的细胞数为 2.0×10⁵,置于 CO₂ 培养箱中培养 24 h,然后加木犀草素至其终浓度为 0、12.5、25、50 μmol/L, DMSO 组浓度≤0.1%。此时每孔终体积为 1.6 mL (不足体积以含血清 RPMI 1640 培养液补齐)。继续培养 48 h 后消化收集细胞,用预冷的 PBS 液洗涤细胞 3 次后,70%乙醇固定,保存于 4℃ 冰箱过夜。次日再用 4℃ 预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次,加入 PI 染色液,使 PI 作用的终浓度为 40 mg/L,避光染色 30 min。流式细胞仪检测细胞 DNA 含量,不同木犀草素作用浓度组都随机分析 10 000 个细胞。

1.6 Annexin V-PI 双染法测定细胞凋亡 取对数生长期的 MGC803 细胞,调制密度为 4.0×10⁵/mL 的细胞悬液。取 6 孔培养板一块,每孔加入 1 mL 新鲜的培养液,再加入细胞悬液 500 μL,使每孔的细胞数为 2.0×10⁵,置于 CO₂ 培养箱培养 24 h。24 h 后加入不同浓度的木犀草素,使每孔终体积为 1.6 mL,木犀草素的作用浓度为 12.5、25、50 μmol/L,继续培养 48 h。用预冷的 PBS 洗涤细胞 3 次,再加入 200 μL 的结合缓冲液重悬细胞,然后分别加入 5 μL PI 和 10 μL Annexin V-FITC,避光染色后立即将标本置于冰上处理,将处理好的细胞置于流式细胞仪中检测,观察其凋亡情况。

1.7 蛋白质印迹法检测蛋白表达变化 木犀草素处理 48 h 后收集悬浮及贴壁的细胞,950×g 离心 10 min,用 PBS 洗 2 次,吸尽 PBS;加入细胞裂解液于冰上裂解 15 min,1 200×g 离心 15 min,收集上清液。经 BCA 法测蛋白浓度后,等量样品以体积分数为 10%~15%的十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白质。电泳后将蛋白转印至 PVDF 膜上。用体积分数 5%的脱脂奶粉封闭后,一抗封闭过夜,再以二抗封闭液常温封闭 2 h, ECL 发光液孵育后置于 CCD 成像系统显影,保存

结果。同时检测自噬的发生,用木犀草素处理 48 h,除在收蛋白 6 h 前加 BafilomycinA1 外,其他操作和蛋白印迹法检测蛋白表达变化的步骤一致。

1.8 统计学处理 用 SPSS 13.0 统计软件处理数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用完全随机设计的单因素方差分析(One-way ANOVA)比较组间差异。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 木犀草素对胃癌细胞 MGC803 的增殖抑制作用 不同浓度的木犀草素作用于 MGC803 细胞 24、48 和 72 h 后,与对照组(DMSO 和 0 μmol/L 木犀草素为双重对照)相比均有增殖抑制作用($P < 0.05$),IC₅₀ 分别为 127.37、76.12、16.84 μmol/L。随着时间的增加,木犀草素对胃癌 MGC803 细胞的增殖抑制作用更加明显,表明木犀草素以剂量-时间依赖的方式抑制 MGC803 细胞的增殖(图 1)。

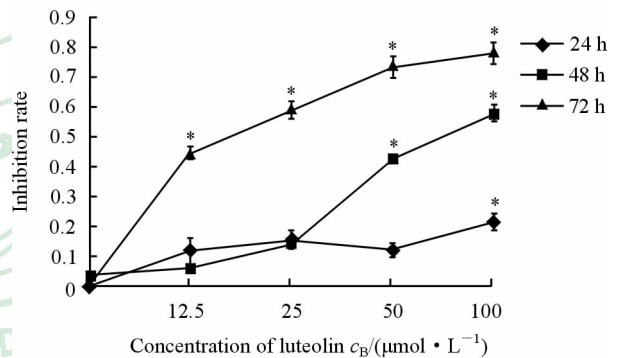


图 1 木犀草素对胃癌细胞 MGC803 增殖的抑制作用

Fig 1 Proliferation inhibition of MGC803 cells by luteolin

Various concentrations of luteolin were added, and the cells were incubated for 24, 48 and 72 h. * $P < 0.05$ vs 0 μmol/L luteolin at same time. $n=3, \bar{x} \pm s$

2.2 木犀草素对胃癌细胞 MGC803 的克隆形成抑制作用 不同浓度的木犀草素作用于 MGC803 细胞 7 d 后,细胞的克隆形成数逐渐减少,尤其浓度为 10 μmol/L 的实验组,与对照组(DMSO 和 0 μmol/L 木犀草素为双重对照)相比有明显的差异(图 2)。

2.3 木犀草素作用于胃癌细胞 MGC803 后对细胞周期的影响 不同浓度的木犀草素作用于 MGC803 细胞 48 h 后,与 DMSO 组和 0 μmol/L 组两个对照组相比,随着药物浓度的增加,G₁ 期细胞比例逐渐减少,S 期比例基本不变,G₂/M 期比例逐渐增加;其中 G₂ 期由 DMSO 组的 9.1%和 0 μmol/L 组的 8.3% 增加到 25 μmol/L 的 19.7%(图 3)。

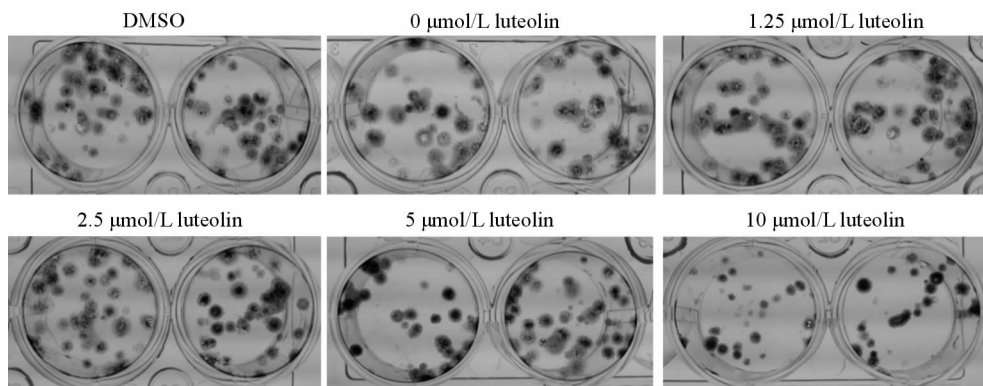


图 2 木犀草素对 MGC803 细胞克隆形成的影响

Fig 2 Effects of luteolin at different concentrations on MGC803 cell colony formation

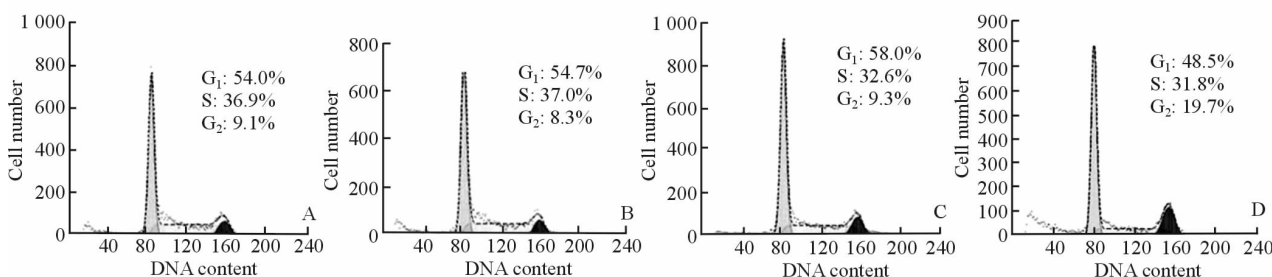


图 3 木犀草素对 MGC803 细胞周期的影响

Fig 3 Effect of luteolin at different concentrations on cell cycle arrest in MGC803 cells

A: DMSO; B: 0 μmol/L luteolin; C: 12.5 μmol/L luteolin; D: 25 μmol/L luteolin

2.4 蛋白质印迹法检测细胞周期相关蛋白表达 木犀草素作用于 MGC803 细胞 48 h 后,随着药物浓度的增加,CDK4、CDK6、CyclinE2 表达减少,CyclinD1、CyclinD3 和 p-Wee1 表达基本不变,CyclinA、CyclinB、Myt1、p-cdc2 (Tyr15) 表达增高(图 4)。

2.5 木犀草素诱导胃癌细胞 MGC803 凋亡 不同浓度的木犀草素作用于 MGC803 细胞 48 h 后,细胞的早期凋亡率和晚期凋亡率会随着药物浓度的增加而增多;50 μmol/L 组变化最明显,由 DMSO 组的 16.31%和 0 μmol/L 组的 13.54%增加到 41.79%(图 5)。

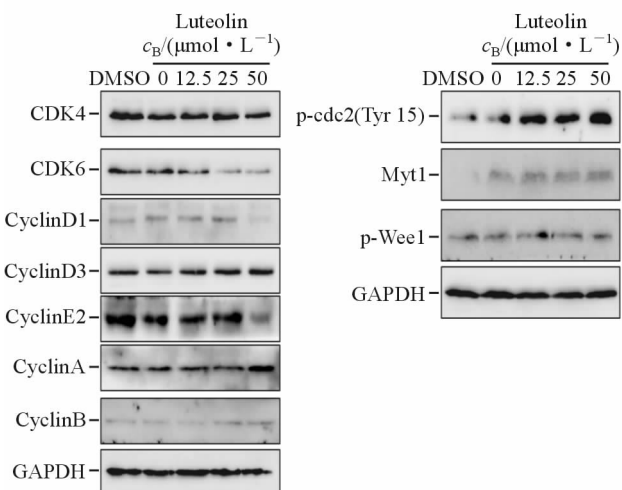


图 4 蛋白质印迹法检测周期相关蛋白的表达

Fig 4 Expression of cell cycle-associated proteins was analyzed by Western blotting after exposure to different concentrations of luteolin

2.6 蛋白质印迹法检测凋亡相关蛋白的表达 不同浓度木犀草素作用 MGC803 细胞 48 h 后,抗凋亡蛋白 Mcl-1 及 Bcl-x_L、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 蛋白表达随药物浓度增加而减少,而抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达量变化不大,促凋亡蛋白 Bax 表达量增加,因而引起 Bcl-2/Bax、Mcl-1/Bax 和 Bcl-x_L/Bax 的比例下降;同时还可见到 Caspase-3 和 PARP 出现了切割的条带(图 6)。

2.7 蛋白质印迹法检测自噬相关蛋白的表达情况 不同浓度的木犀草素作用于 MGC803 细胞后,随着药物浓度的增加,P62 表达下降,而 LC3 II 和 Beclin-1 的表达增加(图 7A、7B)。而用木犀草素处理 48 h 时在收蛋白 6 h 前加 BafilomycinA1,结果出现 LC3 II 和 P62 的累积,表明木犀草素诱导 MGC803 细胞发生自噬(图 7C)。

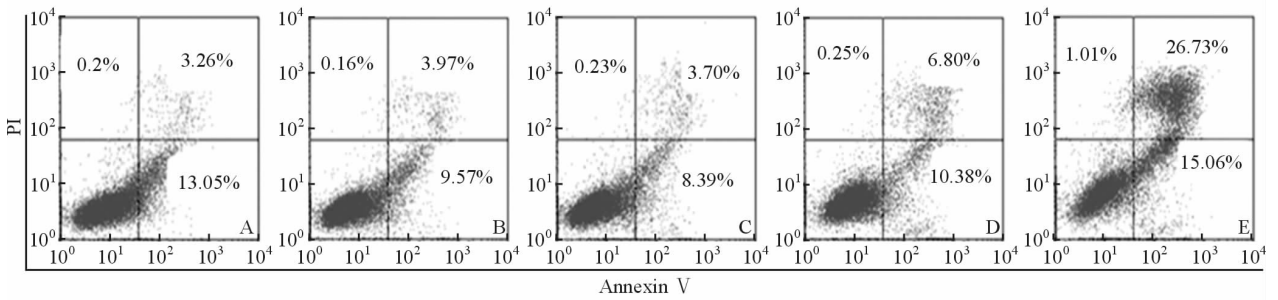


图5 Annexin V-PI 双染法检测木犀草素对细胞凋亡的影响

Fig 5 Effect of luteolin on apoptosis in MGC803 cells after exposure to different concentrations of luteolin

A: DMSO; B: 0 μmol/L luteolin; C: 12.5 μmol/L luteolin; D: 25 μmol/L luteolin; E: 50 μmol/L luteolin

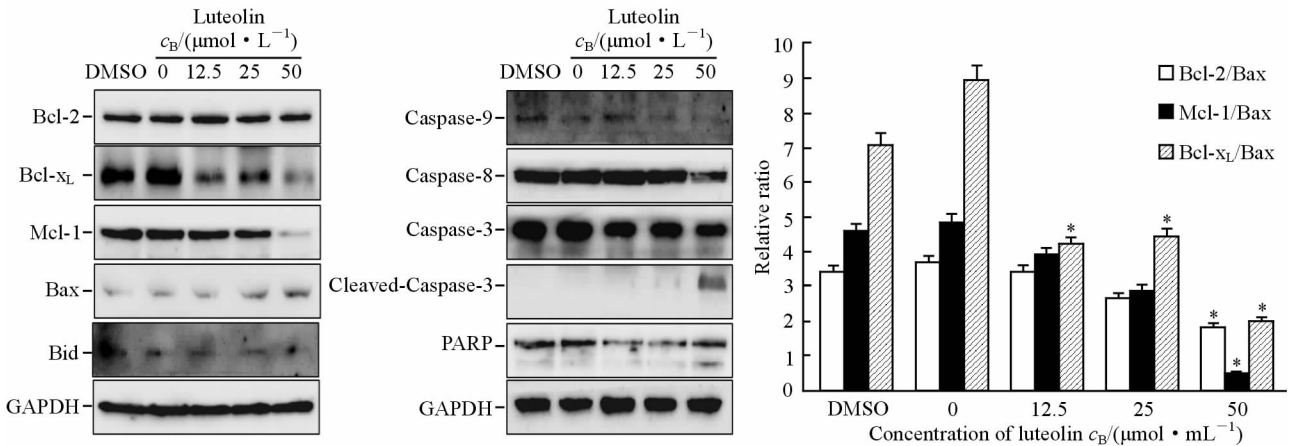


图6 蛋白印迹法检测凋亡相关蛋白的表达

Fig 6 Expression of apoptosis associated protein in MGC803 cells after exposure to different concentrations of luteolin

* $P < 0.05$ vs DMSO or 0 μmol/L luteolin. $n = 3, \bar{x} \pm s$

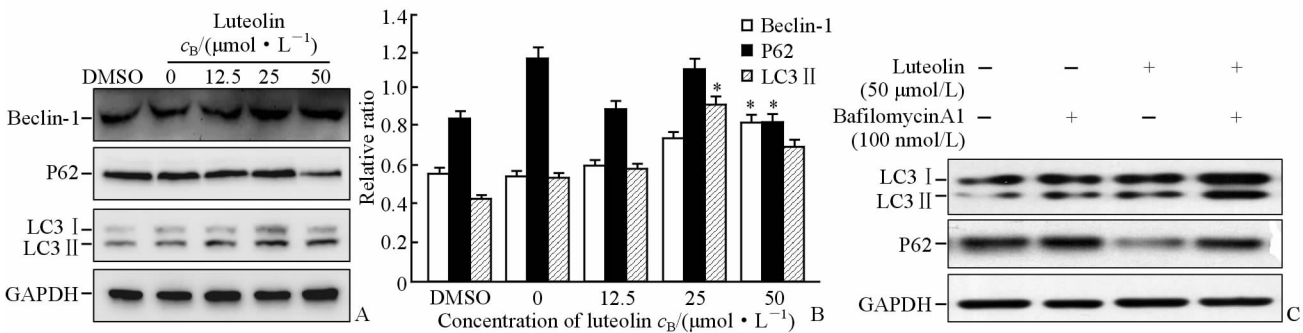


图7 蛋白印迹法检测自噬相关蛋白的表达

Fig 7 Expression of cell autophagy proteins was analyzed by Western blotting analysis after exposure to different concentrations of luteolin

A, B: MGC803 cells were incubated with different concentrations of luteolin for 48 h; C: MGC803 cells were incubated with luteolin at 50 μmol/L for 48 h and BafilomycinA1 for 6 h. * $P < 0.05$ vs DMSO or 0 μmol/L luteolin. $n = 3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

中药抗肿瘤研究由来已久,许多体外抗肿瘤研究的实验均采用从中草药中提取单体成分,如去氢骆驼蓬碱、水飞蓟宾等^[11],这些研究中草药应用于临床抗肿瘤治疗提供了理论基础。木犀草素是一

种多靶点的抗肿瘤药物^[7-10],陈庆等^[12]的研究发现,木犀草素对于正常的肝细胞 L02 毒副作用小。有证据表明木犀草素可以像喜树碱类抗癌药物一样,能够诱导拓扑异构酶 II 相关的 DNA 损伤从而诱导 HeLa-60 细胞发生凋亡^[13],可以通过周期阻滞诱导肝癌细胞发生凋亡^[8]等。但是在胃癌细胞中相关研

究甚少,更没有确切的机制报道。本实验显示木犀草素对胃癌 MGC803 细胞有较强的增殖抑制作用,且表现出明显的剂量-时间依赖性。

Wu 等^[14]发现木犀草素能够使胃癌细胞 AGS 阻滞在 G₂ 期。细胞周期阻滞包括 G₁ 期阻滞和 G₂/M 期阻滞,其中 G₂/M 期阻滞更具普遍性。研究表明细胞周期中 G₂/M 检查点是细胞存活和死亡的主要决定点^[15]。在 G₂/M 期检查点,一方面 Cip/Kip 家族成员通过抑制 CDK1 (cdc2) 的活性发挥其作用^[16-17],另一方面 Wee1 可以通过磷酸化 CDKs 的活性位点酪氨酸残基(大部分 CDKs 为 Tyr15)而起抑制作用。除此以外,Myt1 可以磷酸化 Tyr15 和 Thr14 这 2 个邻近的位点,起到抑制作用^[17]。本实验中随木犀草素浓度增加,G₁ 期细胞比例减少,S 期比例基本不变,而 G₂ 期比例增加。我们对周期相关蛋白检测发现 CyclinD1、CyclinD3 和 p-Wee1 表达基本不变,CyclinE2 表达减少,CyclinA、CyclinB 和 Myt1、p-cdc2(Tyr15)表达增高,表明木犀草素能够使胃癌细胞 MGC803 抑制在 G₂ 期。

PARP 是 DNA 修复酶,也是 Caspase-3 的作用底物,所以 PARP 又被称为死亡底物。PARP 蛋白的剪切是细胞凋亡的标志,线粒体凋亡途径是重要的凋亡途径,Bcl-2 家族蛋白在线粒体扮演着非常关键的角色,其中的促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白的比例决定着细胞是走向凋亡还是继续存活。抗凋亡蛋白表达的增加会抑制 CytoC 等促凋亡因子从线粒体释放,而促凋亡蛋白的表达增加则导致 CytoC 等促凋亡因子大量释放^[18];这些促凋亡因子将会激活细胞质中的 Caspase,继而发生级联反应,导致凋亡的发生。在 Bcl-2 蛋白家族中,Bax 通过促进线粒体 PTP 孔的开放,使线粒体内促凋亡因子释放而导致凋亡的发生,而 Bcl-2、Bcl-xL 则抑制 PTP 孔的开放而抵抗细胞凋亡的发生^[19-20]。在本实验中随着木犀草素浓度的增加,PARP 的剪切增加,同时 Caspase-3 的活化量也逐渐增加;Mcl-1、Bcl-xL 的表达减少,Bcl-2 表达量变化不大,Bax 表达增加,引起 Bcl-2/Bax、Mcl-1/Bax 和 Bcl-xL/Bax 比例下降,表明木犀草素作用于 MGC803 细胞后通过线粒体途径使其发生凋亡。

细胞自噬是一个复杂的过程,许多蛋白参与其中,这提示我们可以通过检测一些重要蛋白的表达

变化来明确细胞是否发生了自噬。Beclin-1、LC3、P62 是自噬过程中 3 个比较重要的蛋白^[21-23]。在本次实验中可以看到 P62 表达下降,而 LC3 II 表达增加,表明木犀草素也可以使细胞发生自噬。总之木犀草素引起胃癌细胞 MGC803 的凋亡是通过线粒体通路实现的,同时伴有细胞自噬性死亡,但是木犀草素通过哪种具体的信号途径发挥作用有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Hofmann M, Stoss O, Shi D, Büttner R, van de Vijver M, Kim W, et al. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study[J]. *Histopathology*, 2008, 52: 797-805.
- [2] 吴志慧,蒋建伟,曹明溶,陈涛,张小鹰,吴风云. 槐耳清膏诱导胃癌 SGC7901 细胞凋亡的实验研究[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2009, 29: 370-373.
- [3] 陈军,马岩,李榆,秦龙,姚莉. 康莱特注射液对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖和凋亡的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2014, 21: 48-51.
- [4] 郝春蕾. 华蟾素治疗恶性肿瘤及其不良反应[J]. *中国药师*, 2007, 10: 704-706.
- [5] Horváthová K, Chalupa I, Šebová L, Tóthová D, Vachálková A. Protective effect of quercetin and luteolin in human melanoma HMB-2 cells[J]. *Mutat Res-Fund Mol M*, 2005, 565: 105-112.
- [6] Zhang X, Guo Q, Chen J, Chen Z. Quercetin enhances cisplatin sensitivity of human osteosarcoma cells by modulating microRNA-217-KRAS Axis[J]. *Mol Cells*, 2015, 38: 638-642.
- [7] Lee H J, Wang C J, Kuo H C, Chou F P, Jean L F, Tseng T H. Induction apoptosis of luteolin in human hepatoma HepG2 cells involving mitochondria translocation of Bax/Bak and activation of JNK[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005, 203: 124-131.
- [8] Leung H W, Wu C H, Lin C H, Lee H Z. Luteolin induced DNA damage leading to human lung squamous carcinoma CH27 cell apoptosis[J]. *Eur J Pharmacol*, 2005, 508: 77-83.
- [9] Ong C S, Zhou J, Ong C N, Shen H M. Luteolin induces G₁ arrest in human nasopharyngeal carcinoma cells via the Akt-GSK-3 β -Cyclin D1 pathway [J]. *Cancer Lett*, 2010, 298: 167-175.

- [10] Yu D, Li M, Tian Y, Liu J, Shang J. Luteolin inhibits ROS-activated MAPK pathway in myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *Life Sci*, 2015, 122: 15-25.
- [11] 杨传标,徐克成. 中药的抗肿瘤作用[J]. *国际医药卫生导报*, 2004, 10: 9-12.
- [12] Chen Q, Liu S, Chen J, Zhang Q, Lin S, Chen Z, et al. Luteolin induces mitochondria-dependent apoptosis in human lung adenocarcinoma cell [J]. *Nat Prod Commun*, 2012, 7: 29-32.
- [13] Yamashita N, Kawanishi S. Distinct mechanisms of DNA damage in apoptosis induced by quercetin and luteolin[J]. *Free Radic Res*, 2000, 33: 623-633.
- [14] Wu B, Zhang Q, Shen W, Zhu J. Anti-proliferative and chemosensitizing effects of luteolin on human gastric cancer AGS cell line[J]. *Mol Cell Biochem*, 2008, 313: 125-132.
- [15] 邹向阳,李连宏. 细胞周期调控与肿瘤[J]. *国际遗传学杂志*, 2006, 29: 70-73.
- [16] Schwermer M, Lee S, Köster J, van Maerken T, Stephan H, Eggert A, et al. Sensitivity to cdk1-inhibition is modulated by p53 status in preclinical models of embryonal tumors[J]. *Oncotarget*, 2015, 6: 15425-15435.
- [17] Wang Z, Slipicevic A, Førsund M, Trope C G, Nesland J M, Holm R. Expression of CDK1 Tyr15, pCDK1 Thr161, Cyclin B1 (total) and pCyclin B1 Ser126 in vulvar squamous cell carcinoma and their relations with clinicopathological features and prognosis [J]. *PLoS One*, 2015, 10: e0121398.
- [18] Adams J M, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy[J]. *Oncogene*, 2007, 26: 1324-1337.
- [19] 孟祥东. BCL-2 家族与线粒体对细胞凋亡的调控[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2005, 21(S1): 77-79.
- [20] 施勤,刘继明,张学光. 细胞凋亡的线粒体调控与 Bcl-2 基因家族[J]. *现代免疫学*, 2000, 20: 59-61.
- [21] Jin S, White E. Role of autophagy in cancer: management of metabolic stress[J]. *Autophagy*, 2007, 3: 28-31.
- [22] Klionsky DJ, Abdalla F C, Abeliovich H, Abraham R T, Acevedo-Arozena A, Adeli K, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy[J]. *Autophagy*, 2012, 8: 445-544.
- [23] Pankiv S, Clausen T H, Lamark T, Brech A, Bruun J A, Outzen H, et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282: 24131-24145.

[本文编辑] 尹 荼