

漆黄素抗卵巢癌的体内外作用研究*

孟宜波¹, 肖超², 陈新莲³, 白鹏⁴, 姚远¹, 王和^{1,3}, 肖雪^{1△}

1. 四川大学华西第二医院 妇产科 出生缺陷与相关妇科疾病教育部重点实验室(成都 610041);

2. 自贡市妇幼保健院 妇产科(自贡 643015); 3. 四川大学华西第二医院 遗传实验室(成都 610041);

4. 四川大学华西基础医学与法医学院 法医物证学教研室(成都 610041)

【摘要】 目的 观察漆黄素对人卵巢癌细胞株 SKOV3 及其移植瘤的抑制作用,探索漆黄素的抗卵巢癌作用。**方法** 电镜直接观察漆黄素干预人卵巢癌细胞 SKOV3 前后的形态学变化。不同浓度梯度的漆黄素处理人卵巢癌细胞 SKOV3 细胞株不同时间后,采用 MTT 法观察肿瘤细胞存活率,流式细胞术检测凋亡。建立人卵巢癌细胞株 SKOV3 的裸鼠移植瘤模型,观察漆黄素对移植瘤的生长抑制作用,通过 Western blot 测定 Bcl-2、Bax、聚腺苷二磷酸核糖多聚酶(PARP)等蛋白的表达,探讨漆黄素抑制肿瘤生长的信号通路。**结果** 电镜下可见漆黄素作用人卵巢癌细胞 SKOV3 细胞后,细胞染色质聚集和凋亡小体产生。MTT 实验显示漆黄素对人卵巢癌细胞 SKOV3 细胞增殖的抑制作用具有浓度依赖性。流式细胞术显示漆黄素可诱导人卵巢癌细胞 SKOV3 细胞的凋亡。裸鼠移植瘤模型显示,漆黄素干预后移植瘤体积和质量均明显下降;Western blot 结果显示漆黄素作用后,移植瘤内凋亡因子 Bax 的表达明显增加,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达明显下降,凋亡蛋白 PARP 被明显剪切;上述变化尤以高浓度(400 mg/kg)漆黄素干预组明显。**结论** 漆黄素可通过抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡,发挥抗卵巢癌作用,其有望成为一种预防和治疗卵巢癌的安全有效的天然药物。

【关键词】 卵巢癌 漆黄素 细胞凋亡 抗癌药物

The Antitumor Effects of Fisetin on Ovarian Cancer *in vitro* and *in vivo* MENG Yi-bo¹, XIAO Chao², CHEN Xin-lian³, BAI Peng⁴, YAO Yuan¹, WANG He^{1,3}, XIAO Xue^{1△}. 1. Department of Gynaecology and Obstetrics, West China Second University Hospital, Sichuan University, Key Laboratory of Birth Defects and Related Disease of Women and Children (Sichuan University), Ministry of Education, Chengdu 610041, China; 2. Department of Gynaecology and Obstetrics, Zigong City Maternal and Child Care Service Center, Zigong 643015, China; 3. Laboratory of Genetics, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 4. Department of Forensic Biology, West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: 19811454@qq.com

【Abstract】 Objective We attempted to survey the inhibit effect of fisetin with human ovarian cancer cell line SKOV3 and the xenograft and the mechanism of the effect. **Methods** The ovarian cancer cell line SKOV3 treated by fisetin were observed directly under the transmission electronmicroscope (TEM); MTT assay was used to determine cell viability. Flow cytometry was used to analyze the apoptosis in ovarian cancer cell line SKOV3. In addition, we established an ovarian cancer athymicnude rat model. We observed the neoplasia and progression after fisetin treatment. The proliferation and apoptosis of athymic nude rat model were evaluated by testing Bcl-2, Bax and poly-ADP-ribose polymerase (PARP) expression through Western blot. **Results** The chromatin were brought together and the apoptotic bodies were detected in SKOV3 cells under transmission electron microscope after the treatment by fisetin. MTT assay indicated that fisetin inhibited ovarian cancer cell proliferation in a dose-dependent manner. The flow cytometry data demonstrated that the apoptosis might induct in SKOV3 cells after treatment by fisetin. In athymic rude rat model, under the influence of fisetin, tumor volume and tumor mass were significantly decreased. Western blot demonstrated that treatment with higher concentration of fisetin resulted in a significant decrease of Bcl-2 and a significant increase of Bax. The apoptosis proteins PARP was cut apparently. **Conclusion** The results provided the first insight into antitumor anti-proliferative and the induction of apoptosis efficacy of fisetin against ovarian cancer *in vitro* and *in vivo*. All data suggested a safe promising therapeutic potential of fisetin in ovarian cancer treatment.

【Key words】 Ovarian cancer Fisetin Apoptosis Antitumor

在妇科恶性肿瘤中卵巢恶性肿瘤发病率居第三位,其病死率居女性生殖系统肿瘤的首位^[1]。由于其早期起病隐匿,缺乏明显临床症状,很难被及时发

* 国家自然科学基金(No. 81001159)资助

△ 通信作者, E-mail: 19811454@qq.com

现和诊断,故约 60%~70%的患者初诊时已是中晚期^[2]。目前,国内外对于中晚期卵巢癌的临床处理是行肿瘤细胞减灭术,术后辅以铂类联合紫杉类药物的化学治疗。但最终仍有超过 70%的卵巢癌复发患者死亡。因此,目前对于卵巢癌的治疗迫切需要寻找一种副作用少且有效的新型药,以提高卵巢癌患者的生存率、生存质量等。漆黄素(3,3',4',7-四羟基黄酮)是黄酮类化合物的一种,属于多酚类化合物,是从黄芩等植物茎叶中提炼出来的食用性黄酮成分,广泛存在于各种水果蔬菜中如苹果、草莓、柿子、葡萄、洋葱和黄瓜等^[3]。目前,国内外研究发现漆黄素在各类癌症中表现出抗氧化^[4]、抗炎^[5]、抗细胞增殖^[6]、防肿瘤转移^[7]、抗血管生成^[8-9]、抗过敏^[9]、抗血小板^[10]等多种作用。本实验以不同浓度梯度的漆黄素作用卵巢癌细胞株,同时建立裸鼠卵巢癌移植瘤模型,观察肿瘤细胞的增殖、凋亡和移植瘤的生长情况,旨在探索漆黄素对卵巢癌生长抑制、促凋亡的可能机制,为漆黄素应用于卵巢癌的治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

漆黄素〔纯度>98%〕,四川大学华西药学院;人卵巢癌细胞株 SKOV3(四川大学华西第二医院妇科肿瘤生物治疗实验室);15只4~6周龄无胸腺雌性裸鼠(四川大学实验动物中心);DMEM培养基、胎牛血清和胰酶(Gibico BRL公司);噻唑兰(MTT,Sigma公司);流式细胞分析仪(Beckman Coulter公司)。日立 H-600IV 型透射电镜(四川大学华西基础医学与法医学院);酶标仪(美国 BIO-RAD 公司,型号 680);倒置生物显微镜(重庆光电仪器有限公司,型号 XDS-1B);细胞培养箱〔日本 SANYO 公司,型号 MCO-18M(UV)〕;标准超净化工作台(美国 AIRTECH 公司,型号 SW-CJ-2FD)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基在 37℃、体积分数 5%CO₂ 细胞培养箱中培养人卵巢癌细胞株 SKOV3,细胞长满培养瓶底 70%~80%后,用胰酶消化、收集、离心、传代。取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 透射电镜(TEM)观察卵巢癌细胞内的超微结构 在生长状态良好的人卵巢癌细胞株 SKOV3 中加入漆黄素 100 μmol/L 作用细胞 48 h,然后将细胞用胰酶消化后收集于 2 mL 离心管,2 000 r/

min 离心 15 min,弃去上清液。用吸管沿离心管壁缓慢加入 0.5%戊二醛固定液 2 mL,在 4℃环境中静置 10 min。13 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液。沿离心管壁缓慢加入 3%戊二醛固定液 2 mL 固定。最后经 1%四氧化锇固定,丙酮逐级脱水,Epon812 包埋,半薄切片光学定位,超薄切片,醋酸铀及枸橼酸铅双重染色。日立 H-600IV 型透射电镜将细胞放大 8 000 倍观察。

1.2.3 MTT 法检测卵巢癌细胞的增殖情况 将生长状态良好的人卵巢癌细胞株 SKOV3 用胰酶消化后,用含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基将细胞配制成单细胞悬液,按每孔 200 μL 的体积接种于 96 孔板,细胞密度为每孔 5×10^3 个。每组设 6 个复孔,同时设立只加培养基的空白组。在 37℃、体积分数 5%CO₂ 孵箱中培养,孵育 24 h 贴壁后,更换培养基,并分别以漆黄素不同浓度梯度〔0(对照组)、25、50、100、200 和 400 μmol/L〕进行干预。混合孵育 24~72 h,待测孔内加入事先配制好的 MTT 溶液(5 mg/mL) 20 μL,在培养箱(37℃,体积分数 5%CO₂)中继续培养 4 h,终止培养后,小心吸取孔内培养上清液,每孔再加入二甲基亚砷(DMSO)150 μL,避光室温低速震荡 10 min,使结晶颗粒充分溶解。最后选择 490 nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度(A)值,记录结果,并计算细胞抑制率,抑制率(%)=(1-加药组 A 值/对照组 A 值)×100%。然后经改良寇式法^[11]计算 50%生长抑制浓度(IC₅₀)。

1.2.4 流式细胞术检测卵巢癌细胞的凋亡 当卵巢癌细胞铺满瓶底 70%~80%时,予以 25、50、100、200 和 400 μmol/L 漆黄素处理 48 h。用不含 EDTA 的胰酶消化 3 min,离心(2 000 r/min,5 min)收集。用含 10%胎牛血清的 PBS 洗涤细胞 2 次(2 000 r/min,离心 5 min),收集 5×10^5 细胞,加入 500 μL Binding Buffer 悬浮细胞。然后加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀后,再加入 5 μL Propidium Iodide(PI)混匀。室温、避光、反应 5~15 min 后,样本通过流式细胞仪计数 1.5×10^4 细胞进行分类分析。

1.2.5 漆黄素对卵巢癌移植瘤的抑制作用

1.2.5.1 试剂配制 将漆黄素溶解于聚乙二醇 400(PEG400):DMSO=7:3 的混合溶剂中^[9],配制质量浓度 80 mg/mL,使用 Millipore 0.22 μm 滤器过滤除菌,实验前 1 h 制备好。

1.2.5.2 实验分组及处理 将生长状态良好的人卵

巢癌 SKOV3 细胞消化、收集、离心,用 PBS 缓冲溶液重悬细胞后计数,调节细胞浓度为 $5 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$,以 0.1 mL 注射于无胸腺雌性裸鼠的双侧背部皮下。将 15 只无胸腺雌性裸鼠随机分为 3 组($n=5$):A 组(对照组),注射 PEG400+DMSO;B 组,注射 PEG400+DMSO+漆黄素(200 mg/kg);C 组,注射 PEG400+DMSO+漆黄素(400 mg/kg)。于注射人卵巢癌细胞 SKOV3 一周后开始漆黄素干预,漆黄素给药方式为瘤体周围皮下注射,每周连续给药 5 d,休息 2 d,每次注射药物体积 0.1 mL,共持续 2 周。对照组注射相同体积的 PEG400+DMSO 混合液,给药方式相同。所有实验步骤均遵守中国科学院上海实验动物研究中心制定的实验动物指南。

1.2.5.3 移植瘤体积和质量的测量 裸鼠接种人卵巢癌 SKOV3 细胞后,从第 1 周周末开始,每周测量两次肿瘤组织体积^[12]。3 周后用 CO₂ 处死裸鼠,解剖并取下瘤体组织,测量离体肿瘤组织的体积^[13]和质量,拍照记录。取下的肿瘤组织消化并裂解细胞,用以检测蛋白表达改变。

1.2.5.4 Western blot 检测移植瘤中 Bcl-2、Bax 及聚腺苷二磷酸核糖多聚酶(PARP)蛋白的表达 液氮条件下将移植瘤组织研磨成粉末,加入细胞裂解液(7 mol/L 尿素,2 mol/L 硫脲,40 g/L CHAPS,65 mmol/L DTT,体积分数 0.002 Bio-

lyte)并超声,室温下静置 20 min,然后在 4 ℃ 下以 13 000 r/min 离心 1 h,取上清液用蛋白定量分析试剂盒(Pierce BCA Protein Assay Kit)定量,余下样品-70 ℃ 保存。次日用 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,PVDF 膜转膜,经封闭、敷育抗体,洗膜,暗室显色等步骤。

1.3 统计学方法

百分率的比较用卡方检验;多组间的比较,先进行方差齐性检验,再进行单因素方差分析,组间两两比较采用 Student's *t* 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 漆黄素对 SKOV3 细胞超微结构的影响

100 $\mu\text{mol/L}$ 漆黄素处理人卵巢癌 SKOV3 细胞株 48 h 后,电镜下细胞超微结构见图 1。未处理的卵巢癌细胞具有较大的细胞核(图 1A)。经漆黄素处理后,在核膜下染色质形成界限清楚、均匀致密的团块(图 1B);核仁的改变包括核仁周围散在的染色质凝结成异源性颗粒,位于核的中心(图 1C);此时,胞浆的改变包括细胞骨架细丝的密集、核蛋白体颗粒成群,而在分泌细胞中,则有粗面内质网的再排列而形成同心圆状;在胞膜下可见较多光面内质网形成的透亮空泡(图 1D),并可与浆膜融合。

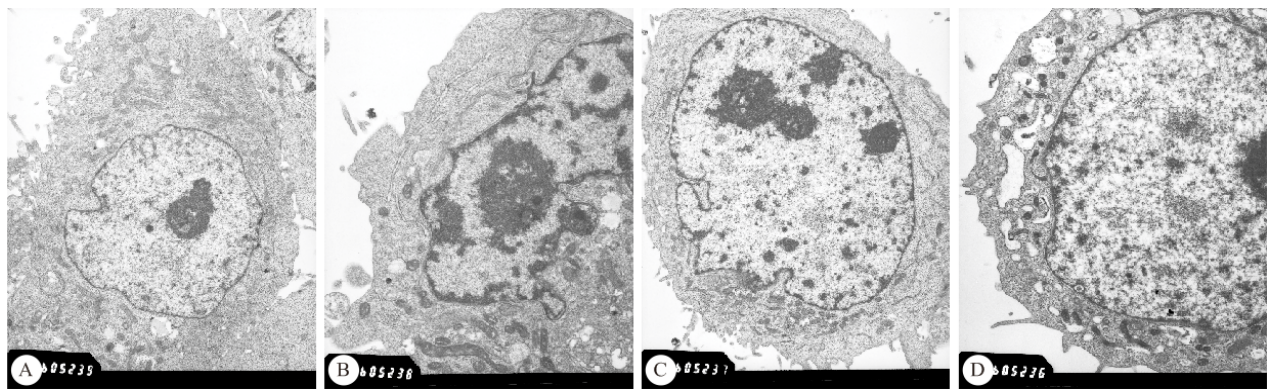


图 1 电镜下人卵巢癌细胞株 SKOV3 的变化。×8 000

Fig 1 TEM image changes of human ovarian cancer cell line SKOV3. ×8 000

A: The normol cancer cell with the large nucleus; B, C, D: After treatment by fisetin, chromatin brought together (B), abundant nuclei chromatin (C), dilation of rough endoplasmic reticulum (D)

2.2 细胞增殖抑制率

结果见附表。不同浓度梯度的漆黄素作用人卵巢癌细胞株 SKOV3 24~72 h,结果均显示漆黄素对 SKOV3 细胞的生长呈现抑制作用。随漆黄素浓度的增加,漆黄素对细胞的增殖抑制率增大,即漆黄素对

细胞的抑制作用呈浓度依赖性。漆黄素 IC₅₀ 值为 132 $\mu\text{mol/L}$ 。随漆黄素作用时间延长,同等浓度下细胞抑制率趋于稳定,3 个时点间差异无统计学意义。

2.3 细胞凋亡结果

结果见图 2。在流式细胞术双参数散点图中,

附表 不同浓度漆黄素处理不同时间后人卵巢癌 SKOV3 细胞的增殖抑制率/%

Time	Concentration of fisetin				
	400 $\mu\text{mol/L}$	200 $\mu\text{mol/L}$	100 $\mu\text{mol/L}$	50 $\mu\text{mol/L}$	25 $\mu\text{mol/L}$
24 h	73.0 $\pm$ 1.9	45.0 $\pm$ 2.2 *	34.0 $\pm$ 4.5 *	27.0 $\pm$ 5.7 *	22.0 $\pm$ 6.3 *
48 h	63.0 $\pm$ 1.6	51.0 $\pm$ 6.6 *	43.0 $\pm$ 3.7 *	25.0 $\pm$ 2.8 *	18.0 $\pm$ 4.5 *
72 h	70.0 $\pm$ 3.2	58.0 $\pm$ 4.4 *	33.0 $\pm$ 5.3 *	18.0 $\pm$ 2.3 *	9.0 $\pm$ 2.1 *

* $P<0.05$, vs. former concentration

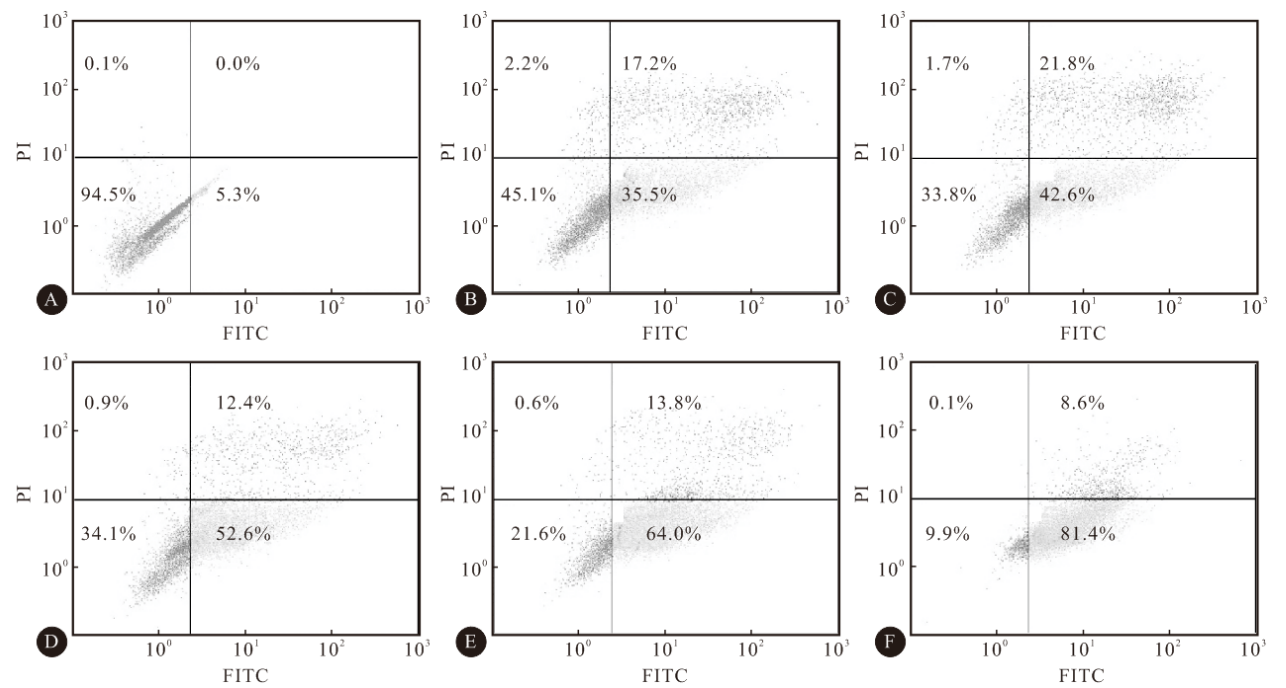


图 2 不同浓度漆黄素作用人卵巢癌细胞株 SKOV3 的流式结果

Fig 2 The flow cytometry results of different concentration fisetin acted on the human ovarian cancer cell line SKOV3

A: Control group; B: 25 $\mu\text{mol/L}$ fisetin treatment group; C: 50 $\mu\text{mol/L}$ fisetin treatment group; D: 100 $\mu\text{mol/L}$ fisetin treatment group; E: 200 $\mu\text{mol/L}$ fisetin treatment group; F: 400 $\mu\text{mol/L}$ fisetin treatment group. PI: Propidium iodide

左上象限为坏死细胞;左下象限显示活细胞,为 Annexin V -/PI-;右上象限是凋亡晚期细胞或凋亡继发性坏死细胞,为 Annexin V +/PI+;而右下象限为早期凋亡细胞,为 Annexin V +/PI-。流式细胞术 Annexin V/PI 染色结果显示,与对照组相比,各漆黄素浓度组细胞总凋亡率(早期凋亡率+晚期凋亡率)均升高(P 均 <0.05),且 400 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组 $>$ 200 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组 $>$ 100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组($P<0.05$)。而漆黄素浓度 25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组间的细胞凋亡率则无明显变化($P>0.05$)。

2.4 动物实验结果

2.4.1 裸鼠的基本情况 全部裸鼠在接种人卵巢癌细胞株 SKOV3 后,均在接种部位皮下出现约麦粒般大小的肿瘤;药物干预期间裸鼠未出现死亡。

2.4.2 移植瘤体积和质量的变化 见图 3,图 4。结果显示,药物干预组随着时间的延长,肿瘤体

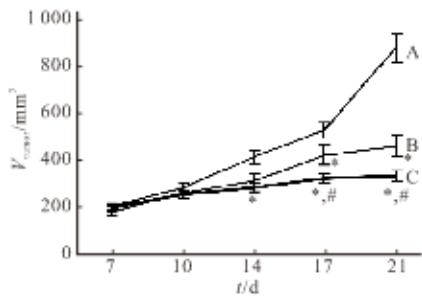


图 3 漆黄素对裸鼠 SKOV3 移植瘤体积的影响

Fig 3 The volume effect of fisetin on the human ovarian cancer cell line SKOV3 in athymic nude mice

A: Control group; B: 200 mg/kg fisetin treatment group; C: 400 mg/kg fisetin treatment group. * $P<0.05$, vs. A; # $P<0.05$, vs. B

积与对照组的差异增大,高浓度(400 mg/kg)漆黄素干预组肿瘤体积抑制最为明显。裸鼠处死后,高

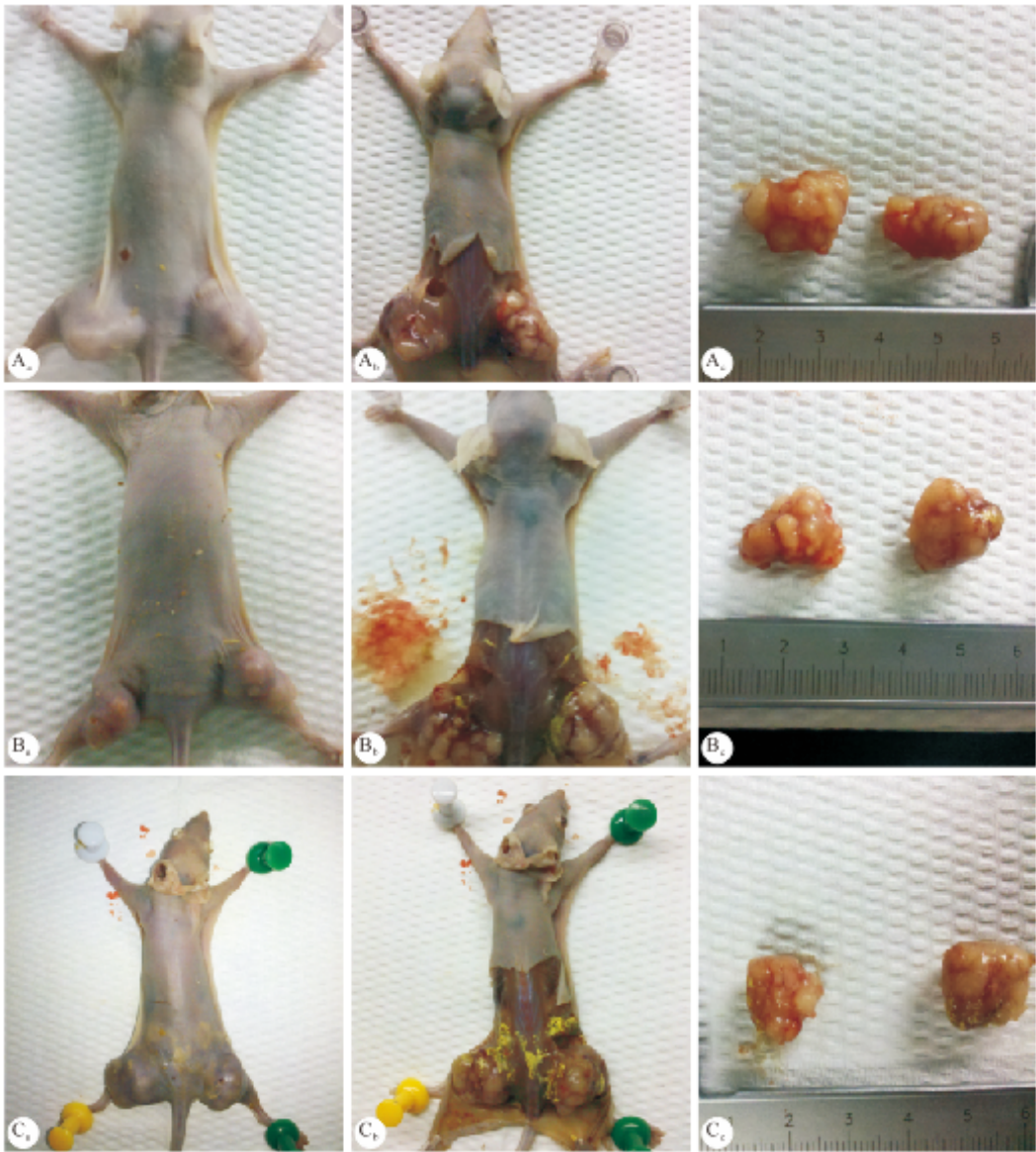


图 4 漆黄素对裸鼠 SKOV3 移植瘤的抑制作用

Fig 4 The inhibition of fisetin on the human ovarian cancer cell line SKOV3 in nude mice

A-C; Denotes the same as those in fig 3; a; Tumor shape; b; Tumor dissection; c; Tumor size

浓度(400 mg/kg)漆黄素干预组肿瘤的平均质量为(525±24) mg,而低浓度(200 mg/kg)漆黄素干预组肿瘤的平均质量为(878±37) mg,均小于对照组[(1 086±42) mg, $P<0.05$],并且高浓度(400 mg/kg)漆黄素干预组肿瘤质量低于低浓度(200 mg/kg)漆黄素干预组($P<0.05$)。

2.4.3 移植瘤中 Bcl-2、Bax 等凋亡相关因子的表达 结果见图 5。与对照组相比,经漆黄素治疗后的裸鼠移植瘤组织中 Bcl-2 的表达有所降低,而 Bax 蛋白的表达有所升高,PARP 蛋白出现明显剪切,特别是高浓度(400 mg/kg)漆黄素干预组变化较明显。

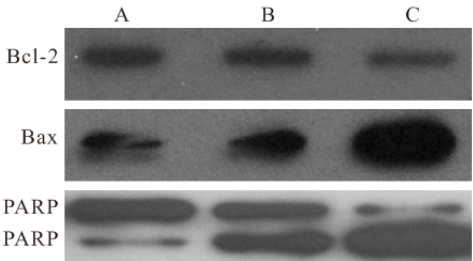


图 5 各组裸鼠移植瘤组织中 Bcl-2、Bax、PARP 蛋白表达情况
Fig 5 Expression of Bcl-2、Bax and PARP proteins in cancer tissues of athymic nude mice

A-C; Denotes the same as those in fig 2

3 讨论

手术辅以术后化疗可使卵巢癌的复发率下降28%,死亡率下降34%^[14]。尽管如此,卵巢癌的治疗结局依然不尽如人意,为提高卵巢癌尤其是中晚期卵巢癌患者的生存率及生存质量,寻找有效、安全、无毒或低毒性的新型药显得尤为重要^[15-16]。黄酮类化合物广泛存在于各种植物色素中,且被人类大量食用。目前,国内外研究发现漆黄素在各类癌症中均表现出抗癌作用,漆黄素对结肠癌细胞的研究^[17]发现,其可通过抑制环氧化酶-2(COX-2)和Wnt/表皮生长因子受体/核因子- κ B(Wnt/EGFR/NF- κ B)信号通路,诱导细胞凋亡和抑制癌细胞的生长。漆黄素对前列腺癌的研究^[18]发现漆黄素呈时间-剂量依赖性的抑制细胞生长并抑制DNA合成,同时,漆黄素通过调节线粒体凋亡通路,诱导细胞凋亡^[3,6,12]。在一项对宫颈癌的研究^[19]中显示漆黄素调控凋亡酶激活因子-1(Apaf-1)、细胞外信号调节激酶(ERK)和COX-2的分子机制来诱导宫颈癌HeLa细胞的凋亡及抑制细胞生长。漆黄素对人肺癌细胞株A549的研究^[20]发现,漆黄素可降低肿瘤细胞存活率和克隆形成率,增加人第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白酶同源的基因(*PTEN*)表达,抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)的表达。漆黄素在胰腺癌^[21]中抑制死亡受体(DR3)介导的NF- κ B活化,降低基质金属蛋白酶9(MMP-9)表达,抑制细胞生长,诱导凋亡。漆黄素是否具有抗卵巢癌作用,国内外文献报道均较少。本研究通过设计体内、体外两部分实验,应用现有成熟生物效应检测技术,观察漆黄素对卵巢癌细胞的作用,探究其作用机制,为寻找防治卵巢癌的有效低毒药物及临床探索提供有效的实验依据。

肿瘤的发生主要是由于细胞增殖的调节失控,恶性肿瘤的发生及发展还与肿瘤细胞凋亡失控密切相关。目前,细胞凋亡对肿瘤治疗作用的研究已成为肿瘤研究的热点之一。本研究首先通过电镜观察漆黄素作用后的人卵巢癌细胞株SKOV3,发现细胞结构发生了凋亡的变化,进而选择MTT实验,证实漆黄素明显抑制卵巢癌细胞的增殖,且增殖抑制作用呈浓度依赖性。这一结果与文献报道的漆黄素对其它肿瘤的抑制作用结果相一致^[8,10,22]。研究^[22]表明漆黄素能诱导各种肿瘤细胞凋亡,从而发挥对肿瘤的抑制作用,本研究通过流式细胞术也证实漆黄素能够诱导卵巢癌细胞的凋亡。

本研究还建立了卵巢癌裸鼠移植瘤模型,探索漆黄素对裸鼠移植瘤的抑制作用。结果显示,漆黄素干预组移植瘤的体积和质量均低于对照组,且高浓度(400 mg/kg)漆黄素干预组较低浓度(200 mg/kg)组更明显。这与漆黄素对前列腺癌移植瘤的抑制作用一致^[3]。此外,另有研究表明漆黄素在对卵巢癌的治疗中是有效且安全的^[23]。

细胞凋亡是细胞的程序性死亡,它是由一类基因介导的细胞自主性死亡过程,表现为细胞膜完整,细胞体积变小,细胞核固缩,晚期可见凋亡小体。恢复和激发肿瘤细胞的凋亡能力并诱导细胞凋亡是肿瘤防治的有效方法。为进一步探讨漆黄素诱导裸鼠卵巢癌细胞的凋亡作用,本研究检测肿瘤组织中Bcl-2和Bax蛋白的表达水平,结果显示,漆黄素干预组Bax蛋白表达高于对照组,Bcl-2表达明显低于对照组,且高浓度漆黄素干预组的表达水平变化更明显。作为保护因子的Bcl-2活性的降低和凋亡前蛋白Bax的激活使细胞更易损伤,从而促进细胞凋亡。而PARP被剪切则被认为是细胞凋亡的一个重要指标。动物实验进一步证实了漆黄素作为潜在抗癌药物的有效性和可行性。这与近期的研究^[8,24-26]发现漆黄素对前列腺癌、结直肠癌、膀胱癌等各种肿瘤均有抗细胞增殖、诱导细胞凋亡的作用一致。

综上,本研究发现漆黄素在体内外均发挥了人对卵巢癌SKOV3细胞的抗肿瘤作用,抑制了卵巢癌的发生发展,因此,漆黄素有望成为一种预防和治疗卵巢癌的安全有效的天然药物。本课题组下一步拟扩大并细化检测漆黄素在诱导卵巢癌细胞凋亡信号通路中各蛋白表达水平改变,增加体内实验给药方式如血管内、腹腔内给药,探究药物体内作用机制及其安全性评估,为准备开展漆黄素临床药理学实验积累更多数据。

参 考 文 献

- [1] IEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer Clin*, 2015, 65(1): 5-29.
- [2] LI W, CAI JH, ZHANG J, *et al.* Effects of cyclooxygenase inhibitors in combination with taxol on expression of cyclin D1 and Ki-67 in a xenograft model of ovarian carcinoma. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(8): 9741-9753.
- [3] KHAN N, ASIM M, AFAQ F, *et al.* A novel dietary flavonoid fisetin inhibits androgen receptor signaling and tumor growth in athymic nude mice. *Cancer Res*, 2008, 68(20): 8555-8563.
- [4] HANNEKEN A, LIN FF, JOHNSON J, *et al.* Flavonoids

- protect human retinal pigment epi-thelial cells from oxidative-stress-induced death. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47(7):3164-3177.
- [5] HIGA S, HIRANO T, KOTANI M, *et al.* Fisetin, a flavonol, inhibits TH2-type cytokine production by activated human basophils. *J Allergy Clin Immunol*, 2003, 111(6): 1299-1306.
- [6] CHEN YC, SHEN SC, LEE WR, *et al.* Wogonin and fisetin induction of apoptosis through activation of caspase 3 cascade and alternative expression of p21 protein in hepatocellular carcinoma cells SK-HEP-1. *Arch Toxicol*, 2002, 76(5): 351-359.
- [7] CHIEN CS, SHEN KH, HUANG JS, *et al.* Antimetastatic potential of fisetin involves inactivation of the PI3K/Akt and JNK signaling pathways with downregulation of MMP-2/9 expressions in prostate cancer PC-3 cells. *Mol Cell Biochem*, 2010, 333(1/2): 169-180.
- [8] SUH Y, AFAQ F, KHAN N, *et al.* Fisetin induces autophagic cell death through suppression of mTOR signaling pathway in prostate cancer cells. *Carcinogenesis*, 2010, 31(8): 1424-1433.
- [9] TOUIL YS, AUZEIL N, BOULINGUEZ F, *et al.* Fisetin disposition and metabolism in mice; identification of geraldol as an active metabolite. *Biochem Pharmacol*, 2011, 82(11): 1731-1739.
- [10] KIM JY, JEON YK, JEON W, *et al.* Fisetin induces apoptosis in Huh-7 cells via downregulation of BIRC8 and Bcl2L2. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48(8/9): 2259-2264.
- [11] 赵 斌, 葛金芳, 朱娟娟, 等. 小议在 MTT 法测细胞增殖抑制率中 IC₅₀ 的计算方法. *安徽医药*, 2007, 11(9): 834-836.
- [12] TRIPATHI R, SAMADDER T, GUPTA S, *et al.* Anticancer activity of a combination of cisplatin and fisetin in embryonal carcinoma cells and xenograft tumors. *Mol Cancer Ther*, 2011, 10(2): 255-268.
- [13] 何志军, 陈先详, 蔡庆和, 等. 移植瘤体积不同计算方法的比较. *中国比较医学杂志*, 2009, 19(9): 49-51.
- [14] MEGUIDE WP, HOSKINS WJ, BRADY MF, *et al.* Cyclophosphamide compared with paclitaxel and cisplatin inpatients with stage III and IV ovarian cancer. *N Engl J Med*, 1996, 334(1): 1-6.
- [15] ECHARRI GONZALEZ MJ, GREEN R, MUGGIA FM. Intraperitoneal drug delivery for ovarian cancer: why, how, who, what, and when? *Oncology*, 2011, 25(2): 156-165.
- [16] LI QQ, LEE RX, LIANG H, *et al.* Enhancement of cisplatin-induced apoptosis by β -elemene in resistant human ovarian cancer cells. *Med Oncol*, 2013, 30(1): 424.
- [17] SUH Y, AFAQ F, JOHNSON JJ, *et al.* A plant flavonoid fisetin induces apoptosis in colon cancer cells by inhibition of COX2 and Wnt/EGFR/NF- κ B-signaling pathways. *Carcinogenesis*, 2009, 30(2): 300-307.
- [18] HADDAD AQ, VENKATESWARAN V, VISWANATHAN L, *et al.* Novel antiproliferative flavonoids induce cell cycle arrest in human prostate cancer cell lines. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2006, 9(1): 68-76.
- [19] YING TH, YANG SF, TSAI SJ, *et al.* Fisetin induces apoptosis in human cervical cancer HeLa cells through ERK1/2-mediated activation of caspase-8-/caspase-3-dependent pathway. *Arch Toxicol*, 2012, 86(2): 263-273.
- [20] KHAN N, AFAQ F, KHUSRO FH, *et al.* Dual inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mammalian target of rapamycin signaling in human nonsmall cell lung cancer cells by a dietary flavonoid flsetin. *Int J Cancer*, 2012, 130(7): 1695-1705.
- [21] MURTAZA I, ADHAMI VM, HAFRRZ BB, *et al.* Fisetin, a natural flavonoid, targets chemoresistant human pancreatic cancer AsPC-1 cells through DR3- mediated inhibition of NF-kappa B. *Int J Cancer*, 2009, 125(10): 2465-2473.
- [22] ANSÓ E, ZUAZO A, IRIGOYEN M, *et al.* Flavonoids inhibit hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression by a HIF-1 independent mechanism. *Biochem Pharmacol*, 2010, 79(11): 1600-1609.
- [23] CROZIER A, BURNS J, AZIZ AA, *et al.* Antioxidant flavonols from fruits, vegetables and beverages: measurements and bioavailability. *Biol Res*, 2000, 33(2): 79-88.
- [24] HADDAD AQ, FLESHNER N, NELSON C, *et al.* Antiproliferative mechanisms of the flavonoids 2, 2'-dihydroxychalcone and fisetin in human prostate cancer cells. *Nutr Cancer*, 2010, 62(5): 668-681.
- [25] CHEN WS, LEE YJ, YU YC, *et al.* Enhancement of P53-mutant human colorectal cancer cells radiosensitivity by flavonoid fisetin. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2010, 77(5): 1527-1535.
- [26] LI J, CHENG Y, QU W, *et al.* Fisetin, a dietary flavonoid, induces cell cycle arrest and apoptosis through activation of p53 and inhibition of NF-Kappa B pathways in bladder cancer cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2011, 108(2): 84-93.

(2016 - 07 - 08 收稿, 2016 - 10 - 09 修回)

编辑 余 琳