

研究论文

异鼠李素诱导人结肠癌细胞凋亡及其分子机制的初步研究

李小芳*

(西昌学院资源与环境学院, 西昌 615022)

摘要 该文研究异鼠李素(isorhamnetin, ISO)对人结肠癌细胞(LOVO)增殖和凋亡的影响,并初步探讨其分子机制。采用MTT法检测不同浓度异鼠李素作用于LOVO 24、48、72 h后的细胞增殖;采用PI染色法检测不同浓度异鼠李素处理LOVO 48 h后的贴壁细胞数;采用碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色法和DNA电泳的梯状条带(DNA ladder)法检测不同浓度异鼠李素处理LOVO 48 h后细胞形态和DNA片段;采用Western blot法检测磷酸化的表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor phosphorylation, pEGFR)、Bax(Bcl-2 associated X protein)、Bcl-2(B-cell lymphoma-2)、半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)和caspase-3的剪切体(cleaved caspase-3)的蛋白质水平。结果发现,异鼠李素能有效抑制LOVO的增殖,且具有浓度和时间依赖性;处理48 h后,细胞出现了典型的凋亡形态,且出现180~200 bp倍数的DNA片段。进一步研究发现,异鼠李素通过抑制EGFR磷酸化、增加Bax蛋白质水平、减少Bcl-2蛋白质水平进而活化caspase-3,实现诱导细胞凋亡并抑制细胞增殖。因此,异鼠李素通过细胞凋亡抑制结肠癌细胞的增殖,具有开发为人结肠癌临床治疗用药或辅助用药的潜力。

关键词 异鼠李素; 结肠癌; 细胞凋亡; EGFR

Apoptosis of Colon Cancer Cells Induced by Isorhamnetin and Its Mechanism

Li Xiaofang*

(School of Resources and Environment, Xichang College, Xichang 615022, China)

Abstract To investigate the effect of isorhamnetin (ISO) on apoptosis of colon cancer and its mechanism, human colon cancer LOVO cells were treated with the different concentrations of isorhamnetin and growth inhibition was measured by MTT and PI assay. The morphologic change of adherent LOVO cell was tested by propidium iodide (PI) assay. The DNA ladder of LOVO cell was detected by DNA ladder assay. The relative levels of proteins were determined by Western blot. The results showed that isorhamnetin inhibited the proliferation of LOVO cells in dose- and time-dependent manner. And ISO also induced the apoptosis of LOVO cells. Further study revealed that isorhamnetin could up-regulate the level of apoptotic protein Bax and cleaved caspase-3, and down-regulate the level of the anti-apoptotic protein Bcl-2. It was also found that the epidermal growth factor receptor phosphorylation (pEGFR) was inhibited by isorhamnetin. The mechanism might relate to modulation of protein expressions associated cell apoptosis. These results provided a guide for laying down the chemotherapy for colon cancer, when isorhamnetin was

收稿日期: 2016-12-16 接受日期: 2017-03-28

四川省教育厅重点研究项目(批准号: 14ZA0213)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0834-6362873, E-mail: 1564434874@qq.com

Received: December 16, 2016 Accepted: March 28, 2017

This work was supported by the Key Research Project of Sichuan Provincial Education Department (Grant No.14ZA0213)

*Corresponding author. Tel: +86-834-6362873, E-mail: 1564434874@qq.com

网络出版时间: 2017-05-24 17:45:13

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170524.1745.008.html>

used as anti-cancer agent.

Keywords isorhamnetin; colon cancer; apoptosis; EGFR

人结肠癌在各类恶性肿瘤中排位较高,其发病率和死亡率均为第三^[1]。目前,结肠癌以手术治疗为主,而术后辅助化疗能减少复发和转移风险,进一步提高疗效。由于化疗具毒副作用以及肿瘤对现有化疗药物的耐药性增加,使其疗效显著降低。此外,有关癌症发生、发展机制的研究表明,癌症是个多基因、多因素和多步骤的复杂疾病^[2]。因此,寻找具有多靶点、多效应和低毒副作用的植物来源天然小分子化合物逐渐成为当前研究的热点之一。

植物来源的黄酮类药物和其他传统中药一样,具有多靶点、多效应和低毒副作用等特性。异鼠李素(isorhamnetin, ISO)是一种已知的黄酮类化合物,与槲皮素一样,是沙棘中的主要单体之一,广泛存在于水果、蔬菜等食物中。异鼠李素与槲皮素二者结构相似,仅有一个基团的差异。生物体内异鼠李素由槲皮素经甲基化产生的代谢产物^[3]。此外,由于甲基化后异鼠李素较槲皮素更易吸收和代谢,所以前者血药浓度维持更为长久。

近年来,有研究发现,槲皮素具有显著的抗肿瘤作用,包括抗肺癌、肝癌、胃癌、乳腺癌、食管癌、结肠癌、前列腺癌及卵巢癌等^[4]。随后,也有研究发现,异鼠李素对肺癌、肝癌、胃癌、食管癌等肿瘤细胞均具有显著的抑制效果^[5],但异鼠李素对结肠癌的效应如何及相关机制的报道较为少见。因此,本研究旨在探讨异鼠李素是否对人结肠癌细胞(LOVO)增殖有抑制作用,并初步探讨其抗肿瘤作用的分子机制,为异鼠李素单体作为结肠癌临床候选药物提供新的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 细胞系与细胞培养

人结肠癌细胞系(LOVO)购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,培养基为含有10%胎牛血清(FBS)的高糖DMEM,于37℃、5% CO₂及饱和湿度的孵箱中培养。

1.2 试剂处理

异鼠李素为分析纯级标准品(购自Sigma公司),用DMSO溶解,配成100 mmol/L母液,于-20℃储存,临用前再用DMEM完全培养液稀释成不同浓度的使用液。

1.3 MTT检测法

收集对数生长期的LOVO细胞,将其浓度调整为 2×10^4 /mL细胞的悬液,每孔200 μL,加入96孔板中。细胞贴壁过夜生长,细胞长至50%~60%时,分别加入200 μL含有不同浓度(10、30、50、70、90、110、130、170、190 μmol/L)异鼠李素的DMEM完全培养液。以未加入药物处理的孔作为对照孔,设不含细胞且仅有培养基的空白孔。实验独立重复3次,每次设3个重复孔。异鼠李素处理24、48、72 h后,每孔加入20 μL MTT溶液(5 mg/mL),孵育3 h。吸弃上清液,每孔加入150 μL DMSO,摇床震荡0.5 h,充分溶解结晶物。以空白孔调零,酶标测定仪570 nm波长下测定吸光(D)值。细胞存活率= $D_{\text{给药}}/D_{\text{对照}} \times 100\%$ 。

1.4 碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色法

收集对数生长期的LOVO细胞,将其浓度调整为 1×10^5 /mL细胞的悬液,每孔2 mL,加入6孔板中。细胞生长过夜,当细胞长至50%~60%时,分别加入含有不同浓度(30、50、70 μmol/L)异鼠李素的DMEM完全培养液,每孔加入2 mL(对照组加入70 μmol/L等体积的DMSO)。处理48 h后,吸弃上清液,用70%冷乙醇固定1~2 h。吸弃冷乙醇,加入PI溶液染色,显微镜下观察贴壁细胞数和细胞的形态。

1.5 DNA片段化电泳法

不同浓度(30、50、70 μmol/L)异鼠李素处理细胞48 h后,收集漂浮和贴壁细胞,参照文献[6]提取细胞全部DNA,进行琼脂糖凝胶电泳。

1.6 Western blot

用含有不同浓度异鼠李素的完全培养基处理细胞48 h后,参照文献[7]收集细胞,依次进行提取细胞总蛋白、样品处理、SDS-PAGE电泳、转膜、孵育抗体、显色、曝光和图像处理。抗体pEGFR(epidermal growth factor receptor phosphorylation)购自Abcam公司,1:500稀释; Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)、Bcl-2(B-cell lymphoma-2)和半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)购自Cell Signaling Technology公司,1:1 000稀释; GAPDH购自中杉金桥生物技术有限公司,1:500稀释。

1.7 统计学分析

数据采用SPSS 19.0统计学软件分析处理,通过

*t*检验进行组间比较, 数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)来表示, $P<0.05$ 表示差异显著, $P<0.01$ 表示差异极显著。

2 结果

异鼠李素抑制人结肠癌LOVO细胞的增殖, 具有时间和浓度依赖性。结果显示, 从异鼠李素浓度梯度与细胞存活率的关系可知, 除了10 $\mu\text{mol/L}$ 外, 其他浓度的异鼠李素均能有效降低细胞的活力, 抑制细胞增殖(图1)。异鼠李素处理细胞24 h, 当浓度为30 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞活力为87.58%, 抑制率为12.42%。随着其浓度的增加, 抑制率也增大。当浓度为190 $\mu\text{mol/L}$ 时, 抑制率增加到53.49%。异鼠李素处理细胞48 h、72 h与24 h的结果相似, 随着异鼠李素浓度的增加, 抑制率也增大(30 $\mu\text{mol/L}$ 时, 抑制率为31.21%和36.74%; 190 $\mu\text{mol/L}$ 时, 抑制率为75.28%和91.05%)。此外, 随着异鼠李素作用时间延长, 抑制效率明显增加。当作用时间为24 h时, 异鼠李素的半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC_{50})为169.2 $\mu\text{mol/L}$, 而48 h和72 h的 IC_{50} 分别为57.3 $\mu\text{mol/L}$ 和39.4 $\mu\text{mol/L}$ 。

为了进一步验证异鼠李素抑制LOVO细胞增殖的影响, 我们选择了处理48 h的三个药物浓度行PI染色法对贴壁细胞进行染色、计数和统计分析。实验

结果显示, 小于 IC_{50} 、约等于 IC_{50} 和大于 IC_{50} 的低、中、高三个不同浓度的异鼠李素处理LOVO细胞, 都能显著降低贴壁细胞数量, 与对照组相比, 差异均具有统计学意义($P<0.01$)(图2)。

异鼠李素可诱导人结肠癌细胞凋亡。诱导细胞

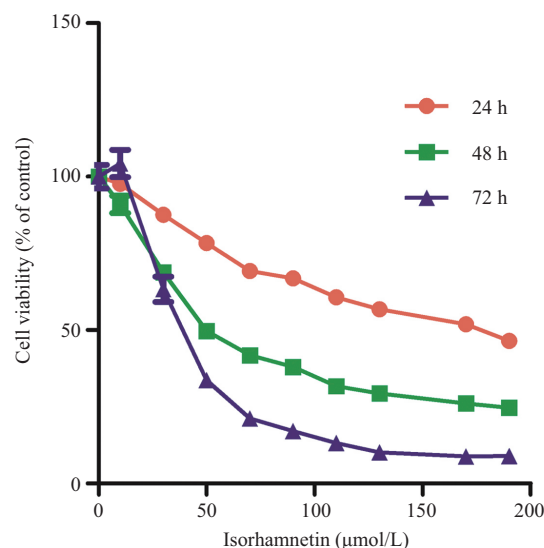
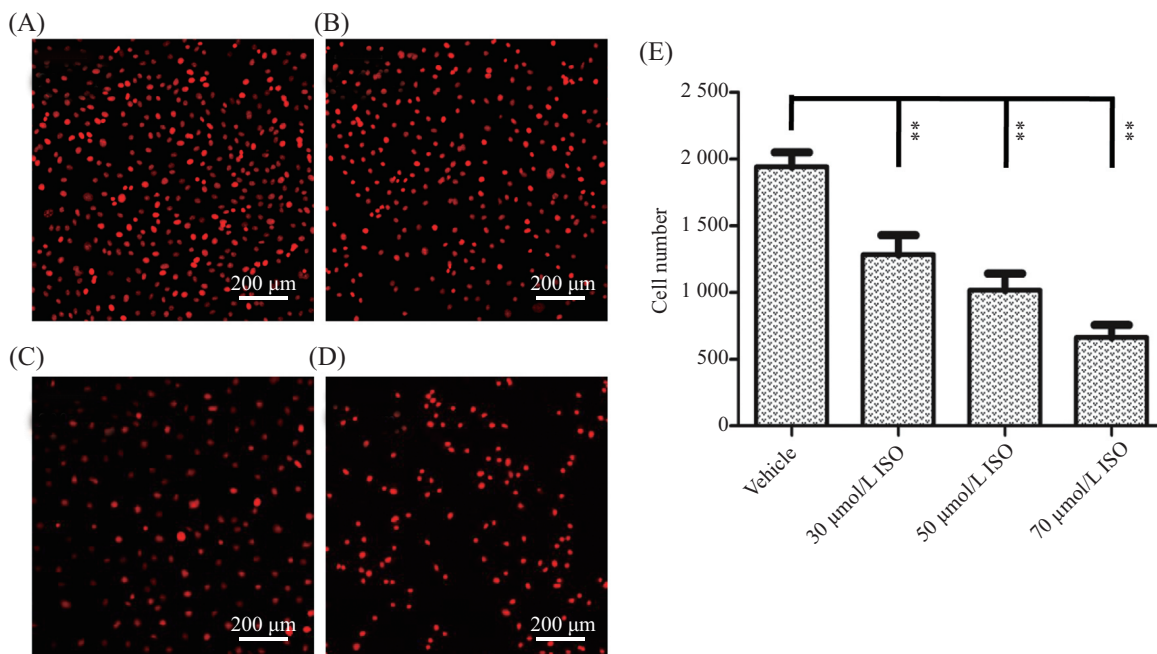


图1 不同浓度异鼠李素作用于LOVO细胞24、48、72 h后细胞活力

Fig.1 The viability of LOVO cells treated with different concentrations of isorhamnetin for 24, 48, 72 h



A: 对照组; B: 30 $\mu\text{mol/L}$ ISO; C: 50 $\mu\text{mol/L}$ ISO; D: 70 $\mu\text{mol/L}$ ISO; E: 为贴壁细胞数的定量分析, 每一组随机选取5个视野, $**P<0.01$, 与对照组相比较。

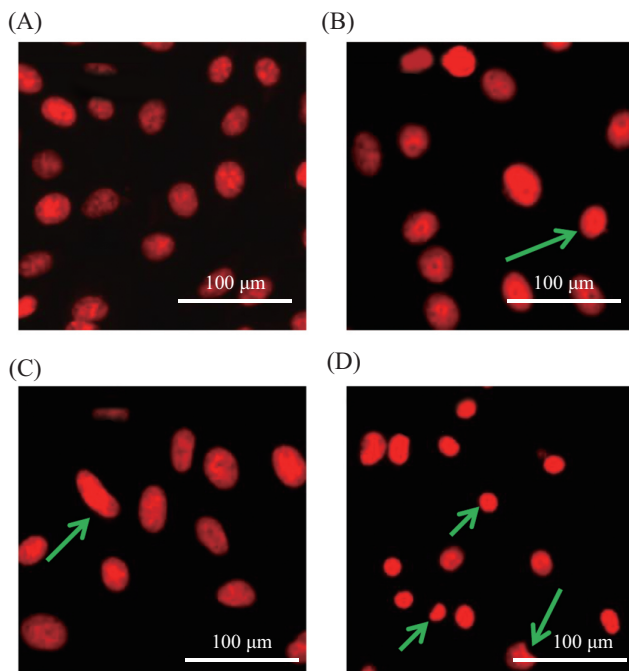
A: vehicle; B: 30 $\mu\text{mol/L}$ ISO; C: 50 $\mu\text{mol/L}$ ISO; D: 70 $\mu\text{mol/L}$ ISO; E: the quantitative analysis of the adherent cell number. Five microscopic fields were randomly selected in each group. $**P<0.01$ vs vehicle.

图2 不同浓度异鼠李素作用于LOVO细胞48 h后的贴壁细胞数

Fig.2 The image of adherent LOVO cell number after treatment with different concentrations of isorhamnetin for 48 h

凋亡是抗肿瘤药物抑制细胞增殖的主要方式之一。因此,我们观察了细胞的形态变化和DNA片段化的情况。三个不同浓度的异鼠李素作用于LOVO细胞48 h后,通过PI荧光染色法发现,未经药物处理细胞核表面光滑,荧光均匀(图3A);而药物处理后出现细胞核固缩、染色质浓集、新月形等细胞凋亡特征变化(图3B~图3D)。

为了进一步验证ISO处理后发生细胞凋亡,采用了细胞凋亡研究金标准——DNA片段化电泳法。细胞发生凋亡时主要的生化标志:染色质DNA被核酸内切酶在核小体之间降解,断裂为180~200 bp或其倍数的片段,在凝胶电泳时出现梯状DNA条带。结果显示,50 $\mu\text{mol/L}$ (图4,泳道3)和70 $\mu\text{mol/L}$ (图4,泳道4)异鼠李素作用于细胞48 h后,出现了非常明显的梯状DNA条带,说明中浓度和高浓度异鼠李素作用细胞48 h时,大量的LOVO细胞发生凋亡。而低浓度30 $\mu\text{mol/L}$ (图4,泳道2)没有出现明显的梯状DNA条带,可能原因是DNA片段化电泳法灵敏度不高,凋亡细胞所占比例不够而无法检测其变化。未处理的

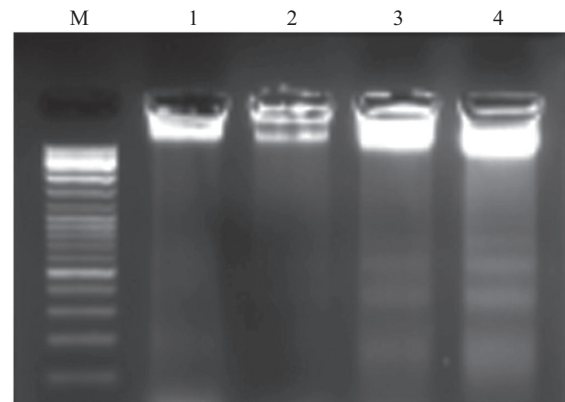


A: 对照组; B: 30 $\mu\text{mol/L}$ ISO; C: 50 $\mu\text{mol/L}$ ISO; D: 70 $\mu\text{mol/L}$ ISO。绿色箭头所示细胞为核固缩的细胞。

A: vehicle; B: 30 $\mu\text{mol/L}$ ISO; C: 50 $\mu\text{mol/L}$ ISO; D: 70 $\mu\text{mol/L}$ ISO。Green arrows indicated the karyopyknosis.

图3 不同浓度异鼠李素作用于LOVO细胞48 h后的细胞形态变化

Fig.3 The morphologic change of adherent LOVO cell after treating with different concentrations of isorhamnetin for 48 h



M: DNA marker; 1: 对照组; 2: 30 $\mu\text{mol/L}$ ISO; 3: 50 $\mu\text{mol/L}$ ISO; 4: 70 $\mu\text{mol/L}$ ISO。

M: DNA marker; 1: vehicle; 2: 30 $\mu\text{mol/L}$ ISO; 3: 50 $\mu\text{mol/L}$ ISO; 4: 70 $\mu\text{mol/L}$ ISO。

图4 不同浓度异鼠李素作用于LOVO细胞48 h后DNA电泳的梯状条带

Fig.4 The DNA ladder of LOVO cell after treatment with different concentrations of isorhamnetin for 48 h

细胞状态良好,未见梯状DNA条带(图4,泳道1)。

异鼠李素依赖表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、Bcl-2/Bax和caspase-3蛋白质诱导人结肠癌细胞凋亡。我们利用Western blot检测了细胞凋亡相关蛋白。我们发现,药物处理后,与对照组相比,细胞凋亡促进蛋白Bax水平明显升高,而抗凋亡蛋白Bcl-2水平显著下调;执行激活核酸内切酶活性的caspase家族蛋白caspase-3变体(cleaved caspase-3)显著增加(图5)。实验结果证明,异鼠李素处理后,促进细胞凋亡相关蛋白Bax的表达和caspase-3被激活,而抗凋亡蛋白Bcl-2表达被抑制,从而启动了细胞凋亡程序,使结肠癌细胞发生凋亡。此外,我们还检测了磷酸化表皮生长因子受体(pEGFR),发现异鼠李素能显著降低pEGFR水平,并具有浓度依赖性。

3 讨论

细胞凋亡指为维持内环境稳定,由基因控制的细胞自主有序的死亡。细胞凋亡相关基因表达变化导致细胞无限增殖是肿瘤发生的一个重要原因^[8]。因此,利用各种措施启动肿瘤细胞的凋亡途径是治疗肿瘤常用的重要手段。目前,各种临床运用的抗癌药物,如直接影响DNA结构和功能的铂类药物^[9]、干扰核酸生物合成的5-氟尿嘧啶^[10]、干扰转录过程和阻止RNA合成的放线菌素D^[11]以及抑制蛋白质合

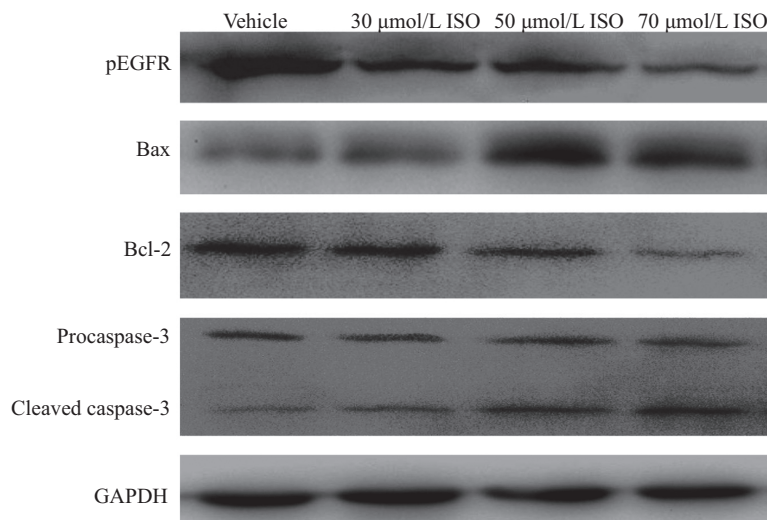


图5 不同浓度异鼠李素作用于LOVO细胞48 h后pEGFR、Bax、Bcl-2、caspase-3水平变化

Fig.5 The levels of pEGFR, Bax, Bcl-2 and caspase-3 isolated from LOVO cell after treatment with different concentrations of isorhamnetin for 48 h

成与功能的长春碱类^[12]和紫杉醇^[13]等都具有诱导细胞凋亡的能力。据文献报道, 异鼠李素能诱导肺癌、肝癌、胃癌、食管癌等肿瘤细胞发生凋亡, 抑制肿瘤细胞增殖^[4-5]。本研究发现, 异鼠李素能显著抑制人结肠癌细胞增殖(图1和图2)。在实验过程中, 我们发现, 异鼠李素作用于结肠癌细胞后, 贴壁细胞收缩变圆, 亮度增加, 最后漂浮。因此, 我们推测, 异鼠李素抑制细胞增殖与细胞凋亡有关。我们的结果证实, ISO处理后LOVO细胞出现典型的凋亡形态特征的变化(图3), 且细胞的DNA片段化(图4)。该结果进一步说明, ISO作用后, LOVO细胞发生了细胞凋亡。此外, 我们还检测了与细胞凋亡相关蛋白水平的变化, 结果证实, ISO通过增加Bax水平和降低Bcl-2水平, 解除对caspase-3蛋白酶活性的抑制作用^[14], 激活caspase-3蛋白原, 使其自动剪切为分子量更小的激活性caspase-3, 使LOVO细胞走向凋亡(图5)。该发现与异鼠李素能诱导肺癌、肝癌、胃癌、食管癌等细胞凋亡的结果一致^[15-18]。因此, 本文结果证明, 异鼠李素能诱导结肠癌细胞凋亡并抑制细胞增殖。

近年来的研究发现, 异鼠李素可通过以下信号转导通路诱导细胞凋亡、抑制细胞增殖。Lee等^[19]研究发现, 异鼠李素通过线粒体通路诱导肺癌细胞凋亡。Manu等^[20]发现, 异鼠李素通过NF- κ B(nuclear factor-kappa B)信号通路诱导胃癌细胞凋亡、抑制细胞增殖(NF- κ B是重要的免疫调节关键分子)。Saud等^[21]发现, 异鼠李素通过Wnt/ β -catenin信号通

路调节大肠癌HT-29细胞的增殖。Jong-Eun等^[22]发现, 异鼠李素通过丝裂原活化蛋白激酶激酶1(mitogen-activated protein kinase kinase 1, MEK1/磷脂酰肌醇3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3-K)信号转导通路抑制皮肤癌细胞增殖。本研究结果发现, 异鼠李素能抑制表皮生长因子受体(EGFR)的磷酸化(图5), 而EGFR是MEK1/PI3-K重要的上游分子。由此可知, 异鼠李素可能作用于多个靶点, 通过多条信号转导通路, 从而诱导细胞凋亡, 抑制其增殖。

表皮生长因子受体(EGFR)是一种受体型酪氨酸激酶, 在许多肿瘤中过表达或突变, 通过信号转导控制肿瘤生长, 与新生血管生成、肿瘤的侵袭及转移等有密切的关系。研究发现, EGFR过表达与许多肿瘤的发生发展密切相关。例如, 与结肠癌的发生、发展有很大关系, 在结肠癌中其阳性表达率高达60%~75%^[23-24]。因此, 靶向作用于EGFR是治疗EGFR高表达肿瘤(包括直结肠癌)的新途径和研究热点之一。到目前为止, 已有几种靶向EGFR的单抗药物, 如西妥昔单抗、帕尼单抗、尼妥珠单抗, 在临床应用中取得了较好的疗效。该类药物的作用机制是结合EGFR的胞外或胞内激酶区域, 阻止酪氨酸残基磷酸化, 从而阻止EGFR信号通路的转导, 最终达到抑制肿瘤增殖、转移、血管生成等一系列肿瘤细胞生命活动。因此, 能抑制EGFR磷酸化的植物类小分子药物应同样具有作用于EGFR而抑制肿瘤增殖、转移、血管生成等活性。我们的实验结果表明, 异鼠李素作

用于结肠癌细胞后,能显著降低EGFR的磷酸化,抑制细胞增殖(图5)。据报道,异鼠李素能抑制人胃癌细胞表皮生长因子受体途径,与我们的结果一致^[25]。

综上所述,异鼠李素通过细胞凋亡途径诱导人结肠癌细胞凋亡,抑制其增殖;而且,异鼠李素诱导人结肠癌细胞凋亡可能与抑制EGFR的磷酸化的信号转导通路相关。因此,异鼠李素在人结肠癌,尤其是EGFR高表达的结肠癌治疗中可能具有较好的应用前景。本研究为体内研究、临床应用研究及异鼠李素是如何通过EGFR信号通路抑制细胞增殖的分子机制研究提供了基础。

参考文献 (References)

- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015; 65(2): 87-108.
- 陈慧,詹俊.结直肠癌发生机制研究进展. *胃肠病学*(Chen Hui, Zhan Jun. Research progress on the mechanism of colorectal cancer. *Gastroenterology*) 2013; 18(3): 188-90.
- 李素云,李峥,李敬来,高蔚娜,张振清,郭长江.槲皮素及其甲基化产物的高压液相-质谱测定方法. *营养学报*(Li Suyun, Li Zheng, Li Jinglai, Gao Weina, Zhang Zhenqing, Guo Changjiang. The simultaneous determination of quercitrin, quercetin and its methylated metabolites by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Acta Nutrimenta Sinica*) 2010; 32(6): 603-7.
- 林增海,孟勇,马涛.槲皮素对肿瘤作用的研究现状. *实用医学杂志*(Lin Zenghai, Meng Yong, Ma Tao. Research status of quercetin on tumor. *The Journal of Practical Medicine*) 2010; 26(18): 3446-7.
- 李炯,王刚,杜士明,曾南.异鼠李素抗肿瘤的作用及机制研究进展. *山西医药杂志*(Li Jiong, Wang Gang, Du Shiming, Zeng Nan. Review about the effect and mechanisms of anti-cancer of isorhamnetin. *Shanxi Medical Journal*) 2011; 40(23): 1215-7.
- 顾伟,范昕建,吴疆,张莉敏,李晓芳,牛智强.和厚朴酚对肝癌HepG2细胞生长抑制及凋亡的作用. *细胞与分子免疫学杂志*(Gu Wei, Fan Xinjian, Wu Jiang, Zhang Limin, Li Xiaofang, Niu Zhiqiang. Proliferation-inhibited and apoptosis-induced effects of honokiol on human hepatoma cell line HepG2. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*) 2008; 24(6): 620-2.
- <http://www.biomart.cn/experiment/87.htm>.
- 李娜,高俊岩,刘敏.细胞凋亡和肿瘤的关系研究进展. *当代医学*(Li Na, Gao Junyan, Liu Min. Research progress in the relationship between cell apoptosis and tumor. *Contemporary Medicine*) 2009; 15(16): 13-4.
- Peng XH, Wang Y, Huang D, Wang Y, Shin HJ, Chen Z, *et al*. Targeted delivery of cisplatin to lung cancer using ScFvEGFR-heparin-cisplatin nanoparticles. *ACS Nano* 2011; 5(12): 9480-93.
- Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(5): 330-8.
- Bowen D, Goldman ID. The relationship among transport, intracellular binding, and inhibition of RNA synthesis by actinomycin D in Ehrlich ascites tumor cells *in vitro*. *Cancer Res* 1975; 35(11 Pt 1): 3054-60.
- Zhou XJ, Ranmani R. Preclinical pharmacology of vinca alkaloids alkaloids. *Drugs* 1992; 44 Suppl 4: 1-16.
- Diergarten K, Dreps A. Taxol: A new antineoplastic agent. *Onkologic* 1993; 16(5): 329-37.
- Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Matsuda H, Tsujimoto Y. Bcl-2 expression prevents activation of the ICE protease cascade. *Oncogene* 2006; 12: 2251-7.
- Li Q, Ren FQ, Yang CL, Zhou LM, Liu YY, Xiao J, *et al*. Anti-proliferation effects of isorhamnetin on lung cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015; 16(7): 3035-42.
- Teng BS, Lu YH, Wang ZT, Tao XY, Wei DZ. *In vitro* anti-tumor activity of isorhamnetin isolated from *Hippophae rhamnoides* L. against BEL-7402 cells. *Pharmacol Res* 2006; 54(3): 186-94.
- Ramachandran L, Manu KA, Shanmugam MK, Li F, Siveen KS, Vali S, *et al*. Isorhamnetin inhibits proliferation and invasion and induces apoptosis through the modulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ activation pathway in gastric cancer. *J Biol Chem* 2012; 287(45): 38028-40.
- Ma G, Yang C, Qu Y, Wei H, Zhang T, Zhang N. The flavonoid component isorhamnetin *in vitro* inhibits proliferation and induces apoptosis in Eca-109 cells. *Chem Biol Interact* 2007; 167(2): 153-60.
- Lee HJ, Lee HJ, Lee EO, Ko SG, Bae HS, Kim CH, *et al*. Mitochondria-cytochrome C-caspase-9 cascade mediates isorhamnetin-induced apoptosis. *Cancer Lett* 2008; 270(2): 342-53.
- Manu KA, Shanmugam MK, Ramachandran L, Li F, Siveen KS, Chinnathambi A, *et al*. Isorhamnetin augments the anti-tumor effect of capecitabine through the negative regulation of NF- κ B signaling cascade in gastric cancer. *Cancer Lett* 2015; 363(1): 28-36.
- Saud SM, Young MR, Jones-Hall YL, Lleva L, Evbuomwan MO, Wise J, *et al*. Chemopreventive activity of plant flavonoid isorhamnetin in colorectal cancer is mediated by oncogenic Src and β -catenin. *Cancer Res* 2013; 73(17): 5473-84.
- Kim JE, Lee DE, Lee KW, Son JE, Seo SK, Li J, *et al*. Isorhamnetin suppresses skin cancer through direct inhibition of MEK1 and PI3-K. *Cancer Prev Res* 2011; 4(4): 582-91.
- Zhang Z, Stiegler AL, Boggon TJ, Kobayashi S, Halmos B. EGFR-mutated lung cancer: A paradigm of molecular oncology. *Oncotarget* 2010; 1(7): 497-514.
- 吕洋,陈薇,赵坡.结直肠癌组织EGFR基因表达及其与临床意义的研究. *中华肿瘤防治杂志*(Lü Yang, Chen Wei, Zhao Po. Clinicopathological correlative analysis of epidermal growth factor receptor gene in colorectal carcinoma. *Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment*) 2008; 15(3): 206-10.
- 李垚,王鹏祖,张慧颖.异鼠李素抑制人胃癌细胞表皮生长因子受体途径. *中国公共卫生*(Li Yao, Wang Pengzu, Zhang Huiying. Inhibitive effect of isorhamnetin on epidermal growth factor receptor signal pathway of human gastric carcinoma cells. *Chinese Journal of Public Health*) 2008; 24(10): 1208-9.