

碱韭总黄酮通过调控细胞程序性死亡发挥抗肿瘤作用的机制研究

赵彩权 赵雅茹 赵鹏 白力格*

(包头师范学院, 生态环境学院, 包头 014030)

摘要 黄酮类化合物对多种肿瘤细胞具有抑制作用, 但碱韭总黄酮是否具有抗肿瘤的活性尚不清楚。该研究通过细胞计数、克隆形成、划痕、侵袭、流式细胞术、实时定量PCR和免疫印迹等实验, 发现碱韭总黄酮对HeLa、LLC和Hep G2三种肿瘤细胞有不同程度的抑制作用, IC_{50} 分别为 (90.73 ± 2.20) 、 (78.27 ± 3.24) 和 (333.20 ± 2.15) $\mu\text{g}/\text{mL}$; 且能有效减弱三种细胞的增殖能力、克隆形成能力、迁移能力和侵袭能力; 同时促进HeLa细胞的凋亡和LLC细胞的坏死性凋亡; 分子机制上发现, 经碱韭总黄酮处理后, HeLa细胞中促凋亡蛋白BAX的表达水平和BAX/BCL2值显著上调, 而LLC细胞中坏死性凋亡相关蛋白RIPK3表达水平显著上调; LLC细胞成瘤实验发现碱韭总黄酮在体内也具有抑制肿瘤的活性, 并且可通过促进坏死性凋亡而发挥作用。综上, 该研究揭示了碱韭总黄酮在体内和体外的抗肿瘤活性, 并且其对不同肿瘤细胞的抑制效果和作用机制不同, 对HeLa细胞通过促进凋亡发挥抑制作用, 而对LLC细胞通过促进坏死性凋亡发挥抑制作用。

关键词 碱韭; 总黄酮; 抗肿瘤; 细胞凋亡; 坏死性凋亡

The Mechanism of Total Flavonoids from *Allium polyrhizum* Exerting Anti-Tumor Effects by Regulating Programmed Cell Death

ZHAO Caiquan, ZHAO Yaru, ZHAO Peng, BAI Lige*

(College of Ecology and Environment, Baotou Teachers' College, Baotou 014030, China)

Abstract Flavonoids have inhibitory effects on various tumor cells, but it's not clear whether the total flavonoids of *Allium polyrhizum* have anti-tumor activity. In this study, the total flavonoids from *Allium polyrhizum* were found to inhibit three kinds of tumor cells, HeLa, LLC and Hep G2, which confirmed by cell counting, clone formation, scratch, invasion, flow cytometry, real-time quantitative PCR and immunoblotting, with IC_{50} values of (90.73 ± 2.20) , (78.27 ± 3.24) and (333.20 ± 2.15) $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively; and it could effectively inhibit the proliferative ability, clonogenic ability, migratory ability, and invasive ability of three types of cells; simultaneously promoting apoptosis of HeLa cells and necroptosis of LLC cells; molecular mechanisms revealed that the expression of pro-apoptotic protein BAX and BAX/BCL2 values were significantly up-regulated in HeLa cells, while the expression of necrotic apoptosis-associated protein RIPK3 was significantly up-regulated in LLC cells after treatment with total flavonoids from *Allium polyrhizum*; the LLC cell tumorigenesis experiment found that the total flavonoids

收稿日期: 2024-03-12

接受日期: 2024-06-06

国家自然科学基金(批准号: 32360148)、内蒙古自治区自然科学基金项目(批准号: 2021BS08004、2021BS08017)、国家级大学生创新训练计划(批准号: 202310131004)和包头师范学院高层次人才引进科研启动基金(批准号: BTTTCRCQD2020-004、BTTTCRCQD2020-005)资助的课题

*通信作者。Tel: 15147177804, E-mail: bailige2022@126.com

Received: March 12, 2024

Accepted: June 6, 2024

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.32360148), the Inner Mongolia Autonomous Region Natural Science Foundation (Grant No.2021BS08004, 2021BS08017), the National College Students' Innovation Training Program (Grant No.202310131004), and the High-Level Talents Introduced Scientific Research Startup Fund of Baotou Teacher's College (Grant No.BTTTCRCQD2020-004, BTTTCRCQD2020-005)

*Corresponding author. Tel: +86-15147177804, E-mail: bailige2022@126.com

from *Allium polyrhizum* also had anti-tumor activity *in vivo*, and exerted inhibitory effects by promoting necroptosis pathways. In summary, this study revealed that the total flavonoids from *Allium polyrhizum* had anti-tumor activity both *in vivo* and *in vitro*, and the inhibitory effects and mechanisms on different tumor cells were inconsistent. It exerted inhibitory effects on HeLa cells and LLC cells by promoting apoptosis and necroptosis, respectively.

Keywords *Allium polyrhizum*; total flavonoids; anti-tumor; apoptosis; necroptosis

全球癌症数据统计显示, 2022年新增约2 000万病例, 死亡人数近970万, 癌症已成为危及生命的全球公共卫生事件之一^[1]。目前, 手术治疗、化学治疗和放射治疗是最常见的治疗癌症的方法。手术治疗和放射治疗是治疗局部肿瘤的重要手段。化学治疗是一种全身性的治疗方法, 虽然能够对肿瘤细胞和组织起到杀伤作用, 但也可以对正常机体产生特别严重的损害, 同时会使机体产生耐药性, 并且肿瘤还容易复发^[2]。因此, 寻找一种既能有效杀死肿瘤细胞和组织, 又能将对人体的毒性降到最低程度甚至无毒性作用的抗肿瘤药物已成为人们最关注的事件。

近年来, 黄酮类化合物作为抗肿瘤新药, 因其不良反应小而备受关注^[3]。黄酮类化合物是一种低分子量的天然植物多酚类的代谢物, 广泛存在于水果、蔬菜、谷物等天然产物中, 大量研究表明黄酮类化合物具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎、抗心血管疾病、抗病毒、降血糖等药理活性^[4-8]。碱韭因其生长特性主要分布于我国北部和西北部地区, 因此成为此地区人们日常生活中用的调味品, 也是蒙古族饮食文化中主要的野生蔬菜植物。高雪峰等^[9]成功从碱韭中提取总黄酮成分并且发现黄酮类化合物是碱韭的主要活性物质之一。然而, 碱韭黄酮类物质是否也具有抗肿瘤活性尚不清楚。

为明确碱韭总黄酮是否具有抗肿瘤活性以及作用机制, 本研究以HeLa、LLC和Hep G2三种肿瘤细胞为实验材料, 通过一系列细胞生物学和分子生物学等技术方法验证碱韭总黄酮具有抑制肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭的能力, 并且从体内和体外两个角度进一步揭示了其抗肿瘤的作用机制。这为深入了解碱韭总黄酮在不同癌症中的抗肿瘤效果及其机制提供理论依据, 也为地方特色天然食用植物碱韭的食用、保护与推广奠定科学基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

碱韭总黄酮保存于本实验室^[9]。人宫颈癌细胞

HeLa、小鼠肺癌细胞LLC和人肝癌细胞Hep G2购自中国科学院上海细胞库。人正常宫颈上皮细胞H8购自广州华拓生物科技有限公司。DMEM培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、胰蛋白酶和PBS购自美国Gibco公司。CCK-8试剂盒、4%多聚甲醛、结晶紫染色液、Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒和ECL显影液购自上海碧云天生物技术股份有限公司。DMSO购自美国Sigma公司。Matrigel基质胶和Transwell小室购自美国Corning公司。RNAiso Plus、逆转录试剂盒和荧光PCR试剂盒购自日本TaKaRa公司。BAX、BCL2、RIPK1、RIPK3、 α -Tubulin和GAPDH抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司。顺铂购自上海源叶生物科技有限公司。

SPF级C57BL/6小鼠(4~6周龄)购自斯贝福生物技术有限公司。动物实验由包头师范学院实验动物伦理委员会批准(批准编号: AEWB-BTTC2023004)。

倒置荧光显微镜购自宁波舜宇光学科技有限公司。CO₂细胞培养箱购自上海雅马拓科技贸易有限公司。酶标仪购自美国ThermoFisher Scientific公司。荧光定量PCR仪购自杭州朗基科学仪器有限公司。全自动化学发光图像分析系统购自上海天能生命科学有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 药物配制、细胞培养和动物分组 细胞实验中用的碱韭总黄酮用DMSO配制成150 mg/mL的溶液。小鼠实验中用的韭总黄酮用生理盐水配制成35 mg/mL的溶液。顺铂用生理盐水配成2 mg/mL的溶液。HeLa、LLC、Hep G2和H8均使用含10% FBS的完全培养基培养, 培养条件为37 °C、5% CO₂。将小鼠随机分为对照组、顺铂组、低剂量黄酮组、高剂量黄酮组, 每组4只(雌雄各2只)。

1.2.2 细胞增殖活性实验 将细胞以 2.0×10^4 /mL密度铺于96孔板中过夜, 加入含不同浓度黄酮的培养基。48 h后, 用CCK-8试剂盒测定D值。细胞增殖率(%)=[(实验组D值-阴性对照组D值)/(对照组D值-阴性对照组D值)] $\times 100\%$ 。通过获得细胞抑制率(%)=1-

细胞增殖率(%), 计算半抑制浓度 IC_{50} 。

1.2.3 细胞克隆形成实验 将细胞以 2.0×10^2 /mL密度接种至6孔板中过夜, 加入黄酮处理48 h后, 换成完全培养基, 培养至可以观察到肉眼可见的细胞克隆为止。用4%多聚甲醛室温固定细胞30 min, 结晶紫染色20 min, 对细胞集落拍照和计数。

1.2.4 划痕实验 将细胞以 2.0×10^5 /mL密度接种至6孔板中, 培养至细胞密度为90%以上。用100 μ L枪头划痕, PBS清洗2次, 拍照保存0 h划痕图片。加入黄酮处理48 h后, 采集和保存上次取样点照片。通过ImageJ(x64)软件测算划痕面积, 计算愈合率(%)=[1-(48 h划痕面积/0 h划痕面积)] \times 100%。

1.2.5 Transwell实验 向用基质胶预包被的Transwell上室中加入含黄酮的无血清培养基, 并接种 1.5×10^4 /mL密度的细胞, 下室加入完全培养基。48 h后, 4%多聚甲醛室温固定30 min, 结晶紫染色20 min,

拍照和统计穿膜细胞数。

1.2.6 流式细胞术 黄酮处理48 h后, 收集50 000~100 000个细胞, 加入195 μ L Annexin V-FITC结合液以及5 μ L Annexin V-FITC和10 μ L碘化丙啶染色液。室温避光孵育20 min, 随后置于冰浴中立即上机检测。

1.2.7 实时定量PCR RNAiso Plus提取总RNA, 用逆转录试剂盒制备cDNA。以*gapdh*为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法来计算目的基因的相对表达量。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表1)。

1.2.8 免疫印迹 将细胞裂解后提取蛋白, 用BCA法测定浓度。SDS-PAGE胶分离蛋白, 转膜至硝酸纤维素膜上。用5%脱脂奶粉室温封闭1 h, 加入一抗(1:5 000) 4 $^{\circ}$ C过夜孵育。TBST洗若干次后孵育二抗(1:10 000)。洗涤后避光加入ECL显影液, 曝光拍照。用ImageJ(x64)软件进行蛋白量化分析。

表1 实时定量PCR引物

Table 1 The primers of real-time quantitative PCR

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')
Human bax	F: TGG CAG CTG ACA TGT TTT CTG AC R: TCA CCC AAC CAC CCT GGT CTT
Mouse bax	F: TGG CAG CTG ACA TGT TTG CTG AT R: CTT CCC AGC CAC CCT GGT CTT
Human bcl2	F: TCG CCG AGA TGT CCA GC R: CCA CCG AAC TCA AAG AAG G
Mouse bcl2	F: TCG CCC TGT GGA TGA CTG R: CAG AGA CAG CCA GGA GAA ATC A
Human ripk1	F: TAT GGA GAT TGG TGG GAC GAG R: CCA GTT TAC GGG CAC AGT TTT
Mouse ripk1	F: GAA GAC AGA CCT AGA CAG CGG R: CCA GTA GCT TCA CCA CTC GAC
Human ripk3	F: CAG ATG CCC AGC CCT ACC T R: GCC TTC TTG CGA ACC TAC T
Mouse ripk3	F: GAA GCA GCG GCA GAA ACT R: AAA GAC TGG CCC AGG TGT
Human N-cadherin	F: TCC TAC TGG ACG GTT CG R: GTT GAC TGA GGC GGG TG
Mouse N-cadherin	F: CAG TCT TAC CGA AGG ATG TG R: AGG AAC TTT GCC TGC TCT G
Human E-cadherin	F: AGT GAA CAA CGA TGG CAT TT R: GCT GTG GAG GTG GTG AGA
Mouse E-cadherin	F: CAG TGA AGC GGC ATC TAA R: GCT GGG AAA CAT GAG CAG
Human gapdh	F: AAT CCC ATC ACC ATC TTC CAG R: AAA TGA GCC CCA GCC TTC
Mouse gapdh	F: GTG GCA AAG TGG AGA TTG TTG R: CTC CTG GAA GAT GGT GAT GG

1.2.9 LLC细胞成瘤实验 细胞制成 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 的悬液,于小鼠右腋皮下接种 $200 \mu\text{L}$ 。7天后,造模小鼠右腋下均形成瘤块。顺铂组按照 6 mg/kg 腹腔注射,1次/周。黄酮组分别按照 100 mg/kg 和 150 mg/kg 剂量灌胃,对照组灌胃等量生理盐水。连续灌胃28天后,剥取肿瘤称重和拍照,提取蛋白用于免疫印迹实验,同时计算抑瘤率($\text{\%})=1-(\text{实验组平均瘤重}/\text{对照组平均瘤重}) \times 100\text{\%}$ 。

1.3 统计学方法

所有数据经SPSS 27.0统计学软件分析处理。分析后的数据均以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果和分析

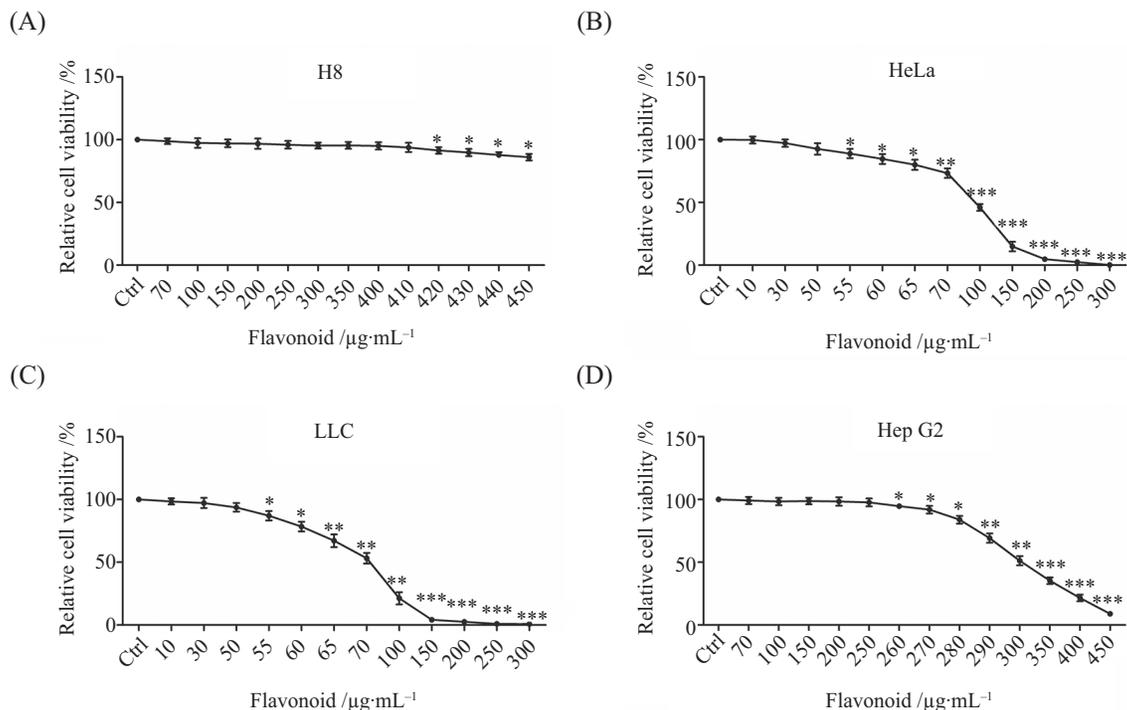
2.1 碱韭总黄酮对肿瘤细胞增殖的影响

细胞增殖活性实验结果显示, H8、HeLa、LLC和Hep G2细胞增殖活性分别从作用浓度为 420 、 55 、 55 和 $260 \mu\text{g/mL}$ 时开始显著降低($P < 0.05$; $P < 0.05$; $P < 0.05$),且呈剂量依赖性(图1A~图1D)。通过换算抑制率,碱韭总黄酮作用HeLa、LLC和Hep G2的 IC_{50} 分别为(90.73 ± 2.20)、(78.27 ± 3.24)和

(333.20 ± 2.15) $\mu\text{g/mL}$,说明碱韭总黄酮具有良好的抑制肿瘤细胞增殖的能力;与Hep G2相比,碱韭总黄酮对HeLa和LLC的抑制效果最明显,且对正常细胞的毒性最小。

2.2 碱韭总黄酮对肿瘤细胞克隆形成的影响

根据 IC_{50} 和实际药物对细胞的影响,设置低、中和高浓度组(HeLa: 50 、 100 、 $150 \mu\text{g/mL}$; LLC: 50 、 70 、 $100 \mu\text{g/mL}$; Hep G2: 250 、 300 、 $350 \mu\text{g/mL}$),进行后续实验。克隆形成结果显示, HeLa细胞在三组中的克隆数分别为(99.67 ± 4.51 、 80.33 ± 6.51 、 18.00 ± 6.24)个,显著少于对照组(115.00 ± 6.00)个($P < 0.05$; $P < 0.01$; $P < 0.001$)(图2A)。LLC的克隆数分别为(55.33 ± 6.11 、 41.00 ± 5.57 、 11.00 ± 3.61)个,和对照组(84.67 ± 5.03)个相比显著减少($P < 0.05$; $P < 0.01$; $P < 0.01$)(图2B)。而Hep G2在三组中的克隆数均为零,同样在 $160 \sim 240 \mu\text{g/mL}$ 范围内也没有形成克隆,当 $150 \mu\text{g/mL}$ 时有细胞克隆出现。因此,对Hep G2进行了另外三种浓度(70 、 100 、 $150 \mu\text{g/mL}$)的处理,形成的克隆数为(42.33 ± 4.04 、 20.33 ± 5.51 、 17.33 ± 5.13)个,显著少于对照组(136.33 ± 6.03)个($P < 0.01$; $P < 0.01$; $P < 0.01$)(图2C),以上结果说明碱韭总黄酮能够有效



A~D: H8、HeLa、LLC和Hep G2的增殖活性。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$,与Ctrl组比较。

A~D: the proliferation activity of H8, HeLa, LLC and Hep G2. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with Ctrl group.

图1 碱韭总黄酮对细胞增殖活性的影响

Fig.1 The effect of total flavonoids from *Allium polyrhizum* on the proliferation activity of cells

抑制肿瘤细胞的克隆形成。

2.3 碱韭总黄酮对肿瘤细胞迁移的影响

划痕实验结果显示, HeLa在三组中的愈合率分别为(33.14±2.64)%、(23.78±8.11)%、(15.06±3.55)%, 显著低于对照组(56.78±2.83)%($P<0.05$; $P<0.05$; $P<0.01$)(图3A); LLC的愈合率分别为(13.56±9.26, 0.86±0.74, 1.11±1.34)%, 与对照组(41.55±5.28)%相比显著降低($P<0.05$; $P<0.01$; $P<0.01$)(图3B); Hep G2的愈合率分别为(60.97±2.22)%、(19.82±6.77)%、(15.47±6.22)%, 与对照组(62.97±1.65)%相比, 低浓度组没有显著差异, 而中和高浓度组的愈合率显著下降($P<0.01$; $P<0.01$)(图3C); 表明碱韭总黄酮能有效抑制肿瘤细胞迁移。

2.4 碱韭总黄酮对肿瘤细胞侵袭的影响

侵袭实验结果显示, HeLa在三组中的穿膜细胞数为(300.00±26.46)、(72.00±8.00)、(4.67±2.08)个, 与对照组(391.00±64.13)个相比, 低浓度组没有显著差异, 而中和高浓度组显著减少($P<0.05$; $P<0.01$)(图4A); LLC在三组中的穿膜细胞数为(11.67±3.51)、(4.00±1.00)、(1.00±1.00)个, 显著少于对照组(42.00±11.14)个($P<0.05$; $P<0.05$; $P<0.05$)(图4B)。Hep G2经三组(250、300、350 $\mu\text{g}/\text{mL}$)黄酮处理后,

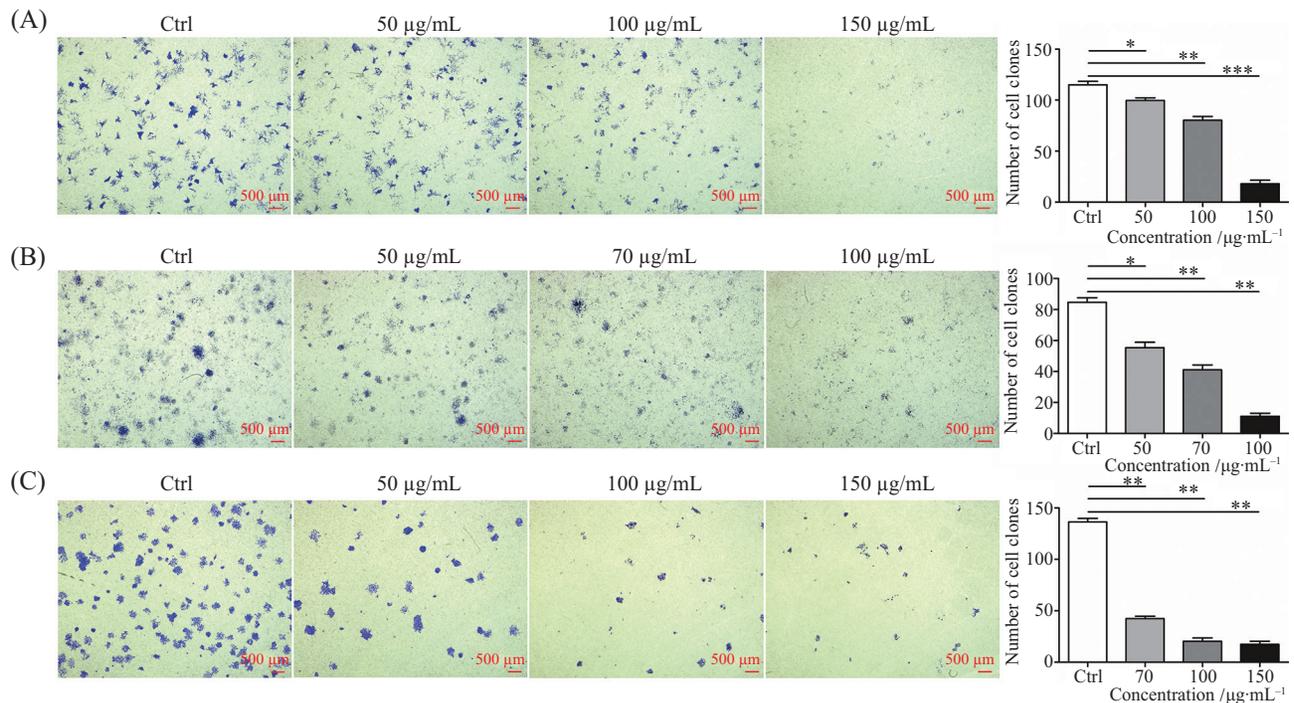
只有250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组有个位数的穿膜细胞, 而经Hep G2克隆形成检测实验浓度(70、100、150 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理后穿膜细胞数没有显著变化。因此, 对Hep G2采取了另三种浓度(100、200、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的碱韭总黄酮处理, 结果显示穿膜细胞数为(856.67±45.09)、(7.00±2.65)、(3.00±2.00)个, 其中200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理组显著少于对照组(910.00±75.50)个($P<0.01$; $P<0.01$)(图4C); 说明碱韭总黄酮具有抑制肿瘤细胞侵袭的能力。

2.5 碱韭总黄酮对肿瘤细胞死亡的影响

HeLa、LLC和Hep G2的增殖、迁移和侵袭能力均呈现出碱韭总黄酮剂量依赖性。为保证黄酮的有效性和低毒性, 选取中浓度组黄酮进行后续细胞实验。流式细胞术检测结果显示, 经黄酮处理后, HeLa细胞早期凋亡细胞比例显著增加($P<0.001$)(图5A); 而LLC和Hep G2细胞是坏死细胞或晚期凋亡细胞比例显著增加($P<0.01$; $P<0.05$)(图5B和图5C); 说明碱韭总黄酮可能通过促进凋亡或坏死的途径导致细胞死亡。

2.6 碱韭总黄酮对上皮-间质转化、凋亡和坏死性凋亡相关基因表达的影响

碱韭总黄酮对Hep G2的作用浓度较高, 且抑制

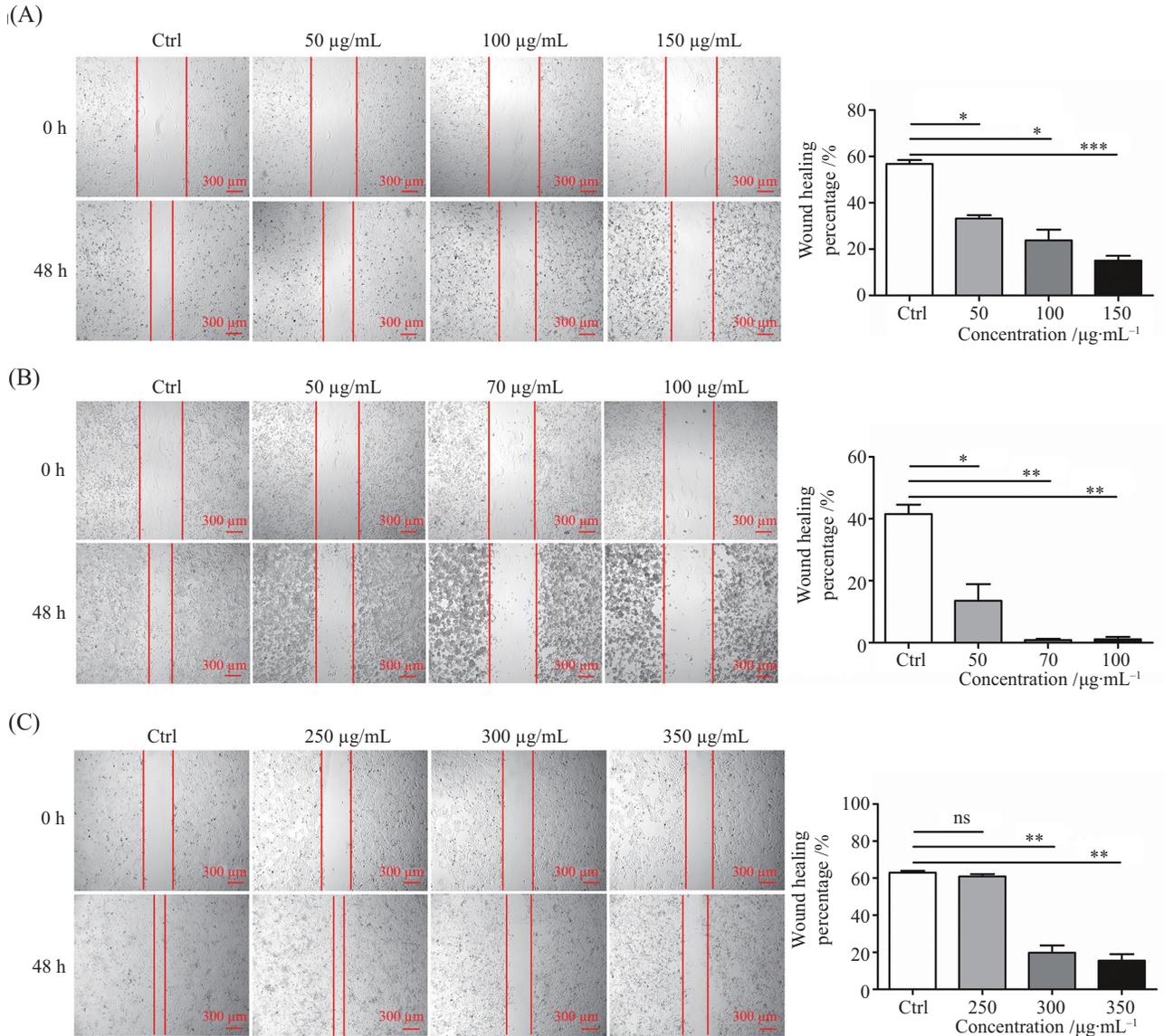


A~C: HeLa、LLC和Hep G2的克隆形成能力。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

A~C: the clonogenic ability of HeLa, LLC and Hep G2. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图2 碱韭总黄酮对细胞克隆形成能力的影响

Fig.2 The effect of total flavonoids from *Allium polyrhizum* on the clonogenic ability of cells



A~C: HeLa、LLC和Hep G2的迁移能力。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, ^{ns} $P>0.05$ 。

A-C: the migratory ability of HeLa, LLC and Hep G2. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, ^{ns} $P>0.05$ 。

图3 碱韭总黄酮对细胞迁移能力的影响

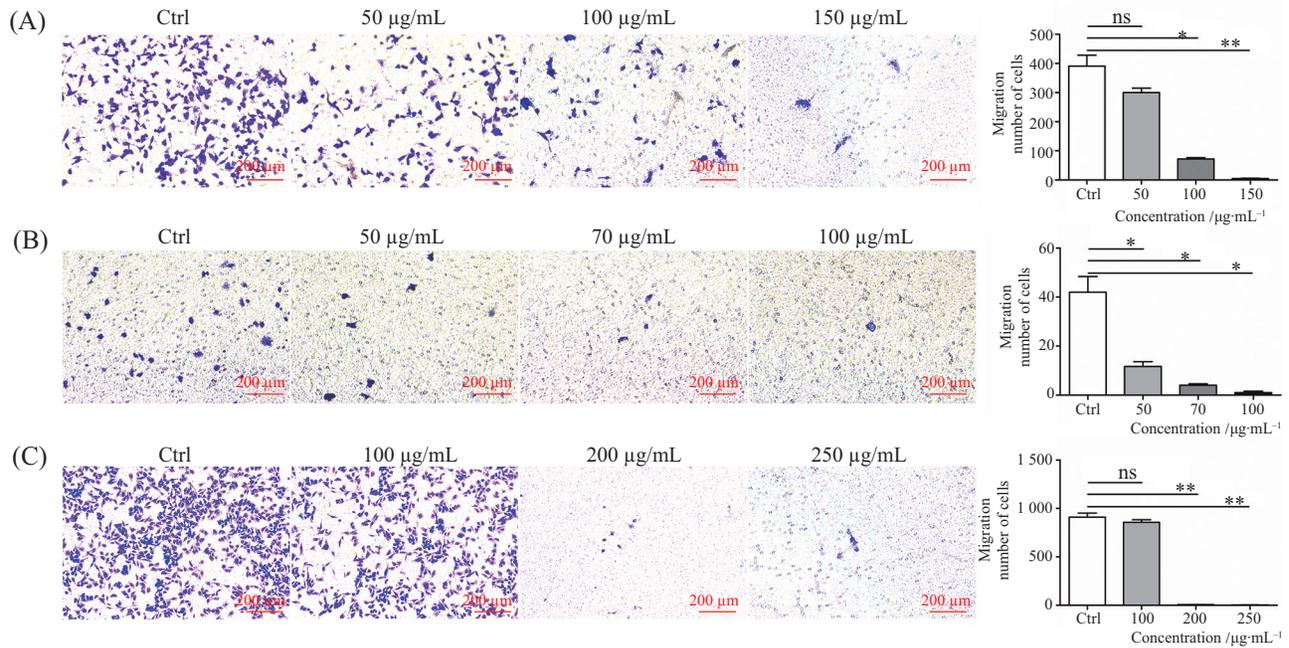
Fig.3 The effect of total flavonoids from *Allium polyrhizum* on the migratory ability of cells

效果不稳定,因此探究细胞水平的分子机制时选用了HeLa和LLC细胞。HeLa经碱韭总黄酮处理后,促凋亡基因**bax**的表达水平显著上升($P<0.05$),而间质细胞标志物**N-cadherin**、上皮细胞标志物**E-cadherin**、抗凋亡基因**bcl2**、坏死性凋亡相关基因**ripk1**和**ripk3**表达水平没有显著差异(图6A)。LLC细胞坏死性凋亡相关基因**ripk3**的表达水平显著上调($P<0.01$),而**N-cadherin**、**E-cadherin**、**ripk1**、**bax**和**bcl2**表达水平没有显著变化(图6B)。蛋白水平上,HeLa细胞中BAX的表达水平显著升高($P<0.05$),BCL2表达水平没有显著变化,BAX/BCL2值显著高于对照组

($P<0.05$)(图6C~图6E); LLC细胞中RIPK3的表达水平显著升高($P<0.05$),RIPK1表达水平没有显著变化(图6F和图6G);说明碱韭总黄酮对HeLa细胞可能通过促进细胞凋亡发挥抑制作用,对LLC细胞可能通过促进坏死性凋亡来发挥抑制作用。

2.7 碱韭总黄酮对LLC细胞成瘤的影响

为明确碱韭总黄酮体内的抑瘤效果,选取对碱韭总黄酮最敏感的LLC细胞进行成瘤实验。结果显示,灌胃量100 mg/kg、150 mg/kg的实验组和顺铂组的肿瘤质量均显著小于对照组($P<0.01$; $P<0.001$; $P<0.001$),其中对照组肿瘤质量最大,顺铂组肿瘤质



A~C: HeLa、LLC和Hep G2的侵袭能力。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ^{ns} $P > 0.05$ 。

A~C: the invasive ability of HeLa, LLC and Hep G2. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ^{ns} $P > 0.05$ 。

图4 碱韭总黄酮对细胞侵袭能力的影响

Fig.4 The effect of total flavonoids from *Allium polyrhizum* on the invasive ability of cells

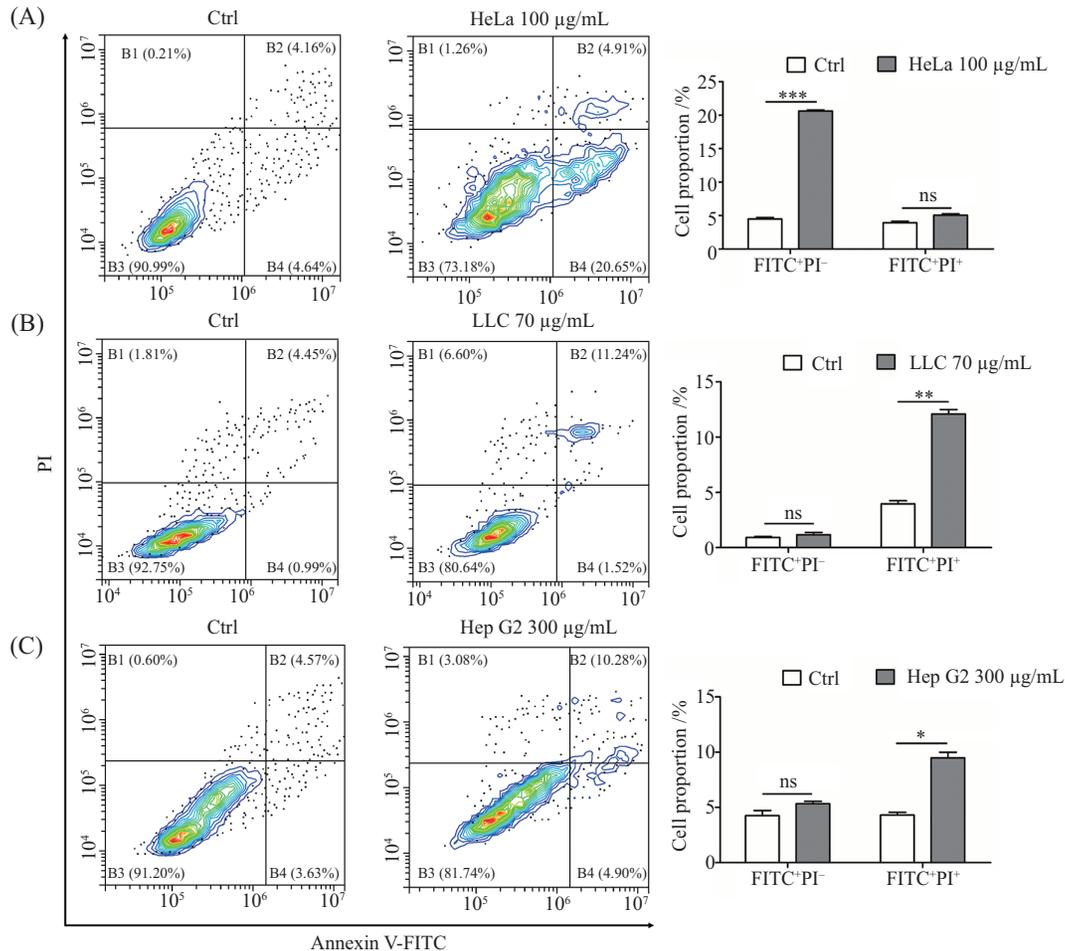
量最小,并且瘤重具有黄酮的浓度依赖性(图7A和表2)。比较各组抑瘤率发现,抑瘤率从对照组、灌胃量100 mg/kg组、灌胃量150 mg/kg组到顺铂组依次升高,顺铂组肿瘤生长最慢,并且抑瘤率也具有黄酮的浓度依赖性(表2)。免疫印迹实验结果表明,灌胃量150 mg/kg的实验组中RIPK3的表达水平显著上调($P < 0.05$),RIPK1表达水平没有变化(图7B和图7C)。这说明碱韭总黄酮具有体内的抗肿瘤活性,机制上可能是通过促进坏死性凋亡而发挥抗肿瘤作用的。

3 讨论

目前大部分抗癌药物都是来自或由天然产物合成,自然界中的各种资源为抗癌药物的合成提供了多种选择^[10-11]。天然产物黄酮具有广泛的药理活性和低毒特性,被用于治疗多种疾病,随着不断研究发现黄酮类化合物在多种肿瘤中具有一定的抗肿瘤作用^[12-18]。最近研究发现碱韭的主要活性物质是黄酮类化合物,并且这种黄酮类化合物具备良好的抗氧化活性和还原能力^[9],但是否具有抑制肿瘤的作用还未见报道。本研究通过细胞计数实验发现碱韭总黄酮能够抑制不同细胞的增殖能力。与HeLa、LLC和Hep G2相比,碱韭总黄酮对人正常宫颈上皮细胞H8的毒性最低,而对HeLa和LLC的增殖抑制效

果最明显,表明碱韭总黄酮具有干预肿瘤的潜在特性。同样有研究表明,苦艾总黄酮对HeLa、SiHa和H8细胞均有增殖抑制作用,其中对H8细胞毒性最低,而对HeLa和SiHa具有较高的抑制作用,同时呈现出剂量依赖性^[19]。与HeLa和LLC相比,本研究发现Hep G2对碱韭总黄酮的敏感性最差,这可能是由于在不同肿瘤细胞中碱韭总黄酮发挥抑制作用的有效成分不同或所靶向的蛋白与信号通路不同导致的。另外,克隆形成、划痕和侵袭实验结果显示,碱韭总黄酮能够抑制三种肿瘤细胞的迁移及侵袭,且呈剂量依赖性,进一步证实了碱韭总黄酮的抗肿瘤作用。研究表明,黄酮类化合物潜在的抗肿瘤作用机制包括诱导细胞凋亡、阻滞肿瘤细胞周期、抑制肿瘤迁移和侵袭、抑制肿瘤血管生成和克服耐药性^[20]。本研究流式细胞术结果显示,经碱韭总黄酮处理后三种肿瘤细胞的死亡比例显著上升,暗示其抗肿瘤的机制可能与促进肿瘤细胞死亡相关,这与龙海洮等^[21]的研究结果相一致。

抑制肿瘤细胞的迁移与侵袭以及诱导肿瘤细胞程序性死亡是治疗癌症的常见策略^[22-25]。上皮-间质转化是肿瘤恶性进展与转移的重要过程,上皮-间质转化的激活导致上皮标志物E-cadherin表达水平降低,间质细胞的标志物N-cadherin表达水平增加^[26-27]。本



A~C: HeLa、LLC和Hep G2流式结果。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ^{ns} $P > 0.05$ 。B1: 死细胞(FITC⁻/PI⁺), B2: 坏死细胞或晚期凋亡细胞(FITC⁺/PI⁺), B3: 正常细胞(FITC⁻/PI⁻), B4: 早期凋亡细胞(FITC⁺/PI⁻)。

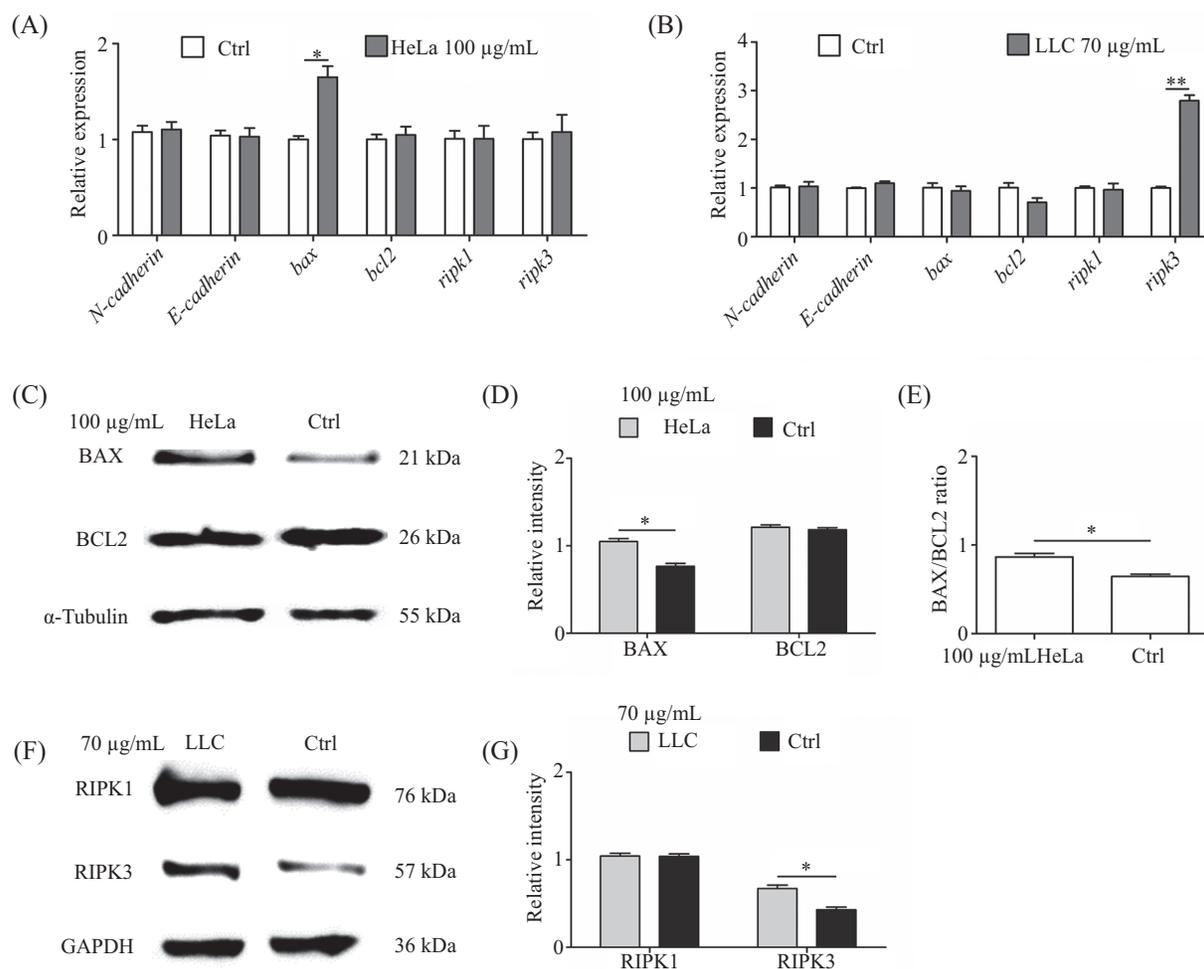
A~C: the flow cytometry results of HeLa, LLC and Hep G2. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ^{ns} $P > 0.05$. B1: dead cells (FITC⁻/PI⁺), B2: necrotic cells or late apoptotic cells (FITC⁺/PI⁺), B3: normal cells (FITC⁻/PI⁻), B4: early apoptotic cells (FITC⁺/PI⁻).

图5 碱韭总黄酮对细胞死亡的影响

Fig.5 The effect of total flavonoids from *Allium polyrhizum* on cell death

研究发现, 经碱韭总黄酮处理后HeLa和LLC细胞中 *N-cadherin* 和 *E-cadherin* 在转录水平上的表达没有显著变化, 提示碱韭总黄酮不影响上皮-间质转化过程, 其被抑制迁移和侵袭可能另有原因。程序性细胞死亡是由基因控制的死亡方式, 可分为细胞凋亡和包括坏死性凋亡的程序性细胞坏死^[24]。细胞凋亡是一种主动的细胞死亡方式, *BCL2* 蛋白家族中的促凋亡蛋白 *BAX* 和抗凋亡蛋白 *BCL2* 的表达失衡可导致细胞凋亡, 这是因为 *BAX* 向线粒体的易位改变了线粒体外膜的通透性, 同时释放细胞色素 C 和上调 p53, 进而激活胱天蛋白酶 (Caspases) 级联反应导致细胞凋亡^[28]。坏死性凋亡由受体相互作用的丝氨酸/苏氨酸激酶蛋白 (RIPK1、RIPK3) 介导, RIPK1 的激活导致 RIPK1/RIPK3 通过形成异源二聚体, 进而促进 RIPK3

的磷酸化; 或一些坏死诱导因子可能绕过 RIPK1 直接激活 RIPK3, 从而导致细胞坏死^[29]。本研究流式细胞术检测结果显示, 碱韭总黄酮可能通过促进 HeLa 细胞凋亡和 LLC 细胞坏死引起细胞死亡。同时, 机制上也发现经碱韭总黄酮处理后 HeLa 细胞中 *BAX* 的表达水平和 *BAX/BCL2* 值均显著高于对照组; LLC 细胞中 RIPK3 的表达水平显著升高, 提示碱韭总黄酮对 HeLa 和 LLC 细胞分别通过促进细胞凋亡和坏死性凋亡来发挥抑制作用。此外, LLC 细胞体内成瘤实验也进一步验证了碱韭总黄酮的抗肿瘤作用及分子机制, 相较于对照组碱韭总黄酮能够显著抑制肿瘤生长速度, 并且是通过上调 RIPK3 表达来启动坏死性凋亡而发挥作用的, 但总体抑瘤效果不如顺铂组。这可能是碱韭总黄酮中发挥抑瘤作用的有效成



A、B: HeLa和LLC细胞实时定量PCR结果。C、D: HeLa细胞免疫印迹结果和量化分析。E: HeLa细胞中BAX/BCL2表达量的比值。F、G: LLC细胞免疫印迹结果和量化分析。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

A,B: the real-time quantitative PCR results of HeLa and LLC. C, D: the Western blot results and quantitative analysis of HeLa. E: the ratio of BAX/BCL2 in HeLa. F,G: the Western blot results and quantitative analysis of LLC. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

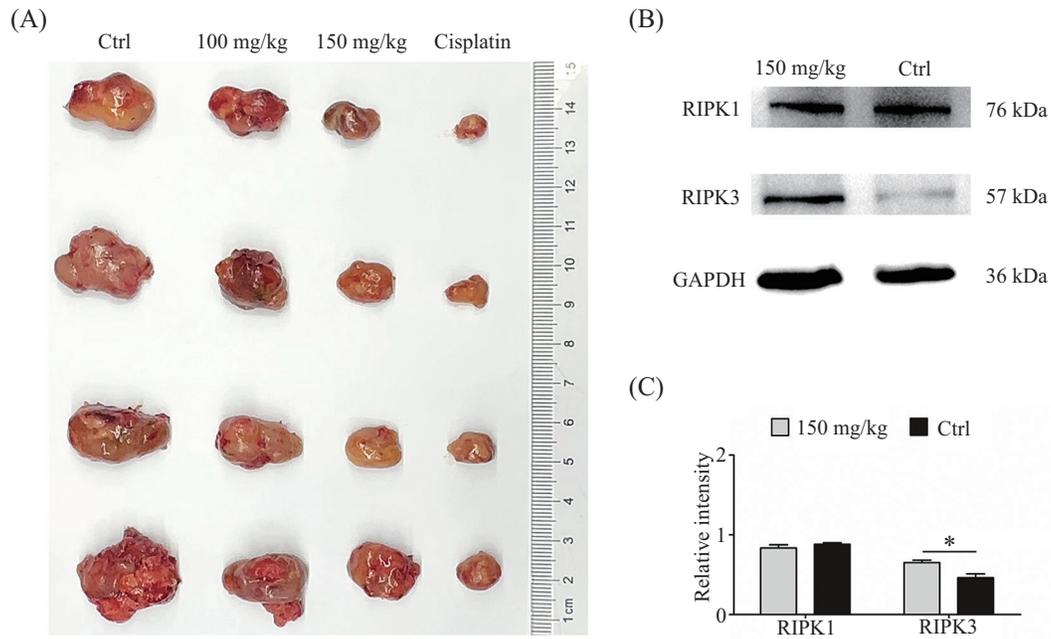
图6 碱韭总黄酮对相关基因表达的影响

Fig.6 The effect of total flavonoids from *Allium polyrhizum* on the expression of related genes

分占比太低或在不同肿瘤细胞中发挥功能的有效成分不一而导致的。

现阶段尚缺乏碱韭总黄酮抑制肿瘤活性和机制的研究,但部分植物源性黄酮类化合物的研究显示,多种植物性黄酮提取物具有一定的抗肿瘤作用。苦艾总黄酮通过诱导活性氧(reactive oxygen species, ROS)的积累来介导HeLa细胞凋亡^[19]。黄酮类化合物黄芩苷通过JAK2/STAT3信号通路的失活上调miR-183,抑制细胞活力和上皮-间质转化,并诱导HeLa细胞凋亡^[30]。与此相同,本研究中碱韭总黄酮也会促进HeLa细胞凋亡,但在机制上是通过激活BCL-2/BAX蛋白完成的,这与上述苦艾总黄酮和黄芩苷的机制不同,其原因可能是总黄酮组分有较大的差异。另外,荷叶黄酮提取物增加人肺癌细胞的

ROS和过氧化脂质水平,降低超氧化物歧化酶活性,并通过上调BAX/BCL2值来促进细胞凋亡^[31];夏枯草总黄酮通过升高细胞ROS水平和激活BCL-2/BAX蛋白,促进肝癌细胞凋亡^[32];淫羊藿总黄酮通过靶向IL6/STAT3途径激活BCL-2/BAX蛋白,诱导乳腺癌细胞凋亡^[33];提示碱韭总黄酮可能含有与荷叶、夏枯草和淫羊藿总黄酮相同的有效成分。值得注意的是,毛蕊异黄酮能够诱导HeLa细胞凋亡,其中Caspase 3和Caspase 9蛋白表达随着毛蕊异黄酮浓度的升高而上调^[34],而BAX/BCL2值的上升也会激活下游Caspase 3和Caspase 9的表达,最终导致HeLa细胞凋亡^[35]。此外,毛蕊异黄酮还通过促进BAX和抑制BCL-2的表达来诱导大肠癌细胞、胃癌干细胞样细胞和乳腺癌细胞的凋亡^[36-38]。因此,碱韭总黄酮中



A: 各组肿瘤组织。B、C: 肿瘤组织免疫印迹结果和量化分析。* $P < 0.05$ 。

A: tumor tissues in different groups. B,C: the Western blot results and quantitative analysis of tumor tissues. * $P < 0.05$.

图7 碱韭总黄酮对LLC细胞成瘤的影响

Fig.7 The effect of total flavonoids from *Allium polyrhizum* on the tumorigenesis of LLC cells

表2 各组瘤重和抑瘤率的比较

Table 2 Comparison of tumor weight and inhibition rate among different groups

组别 Group	肿瘤质量/g Tumor mass /g	抑瘤率/% Tumor inhibition rate /%
Ctrl	2.54±0.32	0
100 mg/kg total flavonoids from <i>Allium polyrhizum</i>	1.99±0.31**	21.55
150 mg/kg total flavonoids from <i>Allium polyrhizum</i>	0.78±0.36***	69.18
Cisplatin	0.51±0.24***	79.99

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与Ctrl组比较。

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with Ctrl group.

促进HeLa细胞凋亡的有效成分很有可能与毛蕊异黄酮——7-羟基-3-(3-羟基-4-甲氧基苯基)-色烯-4-酮^[39]的结构高度相似。

本研究流式结果显示,经碱韭总黄酮处理后Hep G2细胞中的坏死细胞比例明显增加。同样,碱韭总黄酮在LLC细胞体外和体内实验中均会通过上调RIPK3引起细胞和组织的坏死性凋亡。然而,这种促进坏死性凋亡的结果与部分植物源性黄酮类化合物抑制Hep G2和LLC的机制截然不同。研究报道,柿叶黄酮类化合物对Hep G2的抗增殖活性与诱导细胞凋亡和氧化应激有关^[40]。雪松总黄酮通过增加G₀/G₁期细胞的数量和促进细胞凋亡,抑制Hep G2细胞的增殖^[41]。柘木总黄酮能够有效抑制肿瘤生长,

且对机体免疫器官组织伤害较小,其机制上与提高机体免疫功能和诱导LLC细胞自噬有关^[42]。这就说明,除了类似于毛蕊异黄酮结构的成分之外,碱韭总黄酮中可能还存在不同于柿叶、雪松和柘木总黄酮的其他抑制肿瘤的有效成分。研究表明,黄酮类化合物槲皮素和紫草素通过上调RIPK1/RIPK3的表达,分别诱导乳腺癌细胞和鼻咽癌细胞进入坏死性凋亡阶段^[43-44],提示碱韭总黄酮中可能还存在类似于槲皮素——3,3',4',5,7-五羟基黄酮^[45]或紫草素——5,8-二羟基-2-[(1R)-1-羟基-4-甲基-3-戊烯基]-1,4-萘醌^[46]结构的成分。碱韭总黄酮对HeLa、LLC和Hep G2的抑制效果和机制不一,其原因可能是由于碱韭总黄酮包含多种黄酮类组分,而这些黄酮类组分结构有差

异, 所以抗肿瘤的效果及机制也明显不同^[47-48]。

综上所述, 碱韭总黄酮可通过调控细胞程序性死亡抑制不同肿瘤的增殖、迁移和侵袭, 细胞凋亡和坏死性凋亡途经在其抗肿瘤过程中发挥关键作用, 而作用机制分别与BAX和RIPK3表达升高有关。后续对碱韭总黄酮诱导肿瘤细胞死亡及其联合化疗药物的抗肿瘤效果与分子机制有待进一步研究。

参考文献 (References)

- [1] WORLD HEALTH O. Global cancer burden growing, amidst mounting need for services [R]. Geneva: World Health Organization, 2024.
- [2] LI G, DING K, QIAO Y, et al. Flavonoids regulate inflammation and oxidative stress in cancer [J]. *Molecules*, 2020, 25(23): 5628.
- [3] YANG C, WANG T, ZHAO Y, et al. Flavonoid 4,4'-dimethoxychalcone induced ferroptosis in cancer cells by synergistically activating Keap1/Nrf2/HMOX1 pathway and inhibiting FECH [J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 188: 14-23.
- [4] HAZAFA A, REHMAN K U, JAHAN N, et al. The role of polyphenol (flavonoids) compounds in the treatment of cancer cells [J]. *Nutr Cancer*, 2020, 72(3): 386-97.
- [5] MALEKI S J, CRESPO J F, CABANILLAS B. Anti-inflammatory effects of flavonoids [J]. *Food Chem*, 2019, 299: 125124.
- [6] SIAH M, FARZAEI M H, ASHRAFI-KOOSHK M R, et al. Inhibition of guinea pig aldehyde oxidase activity by different flavonoid compounds: an *in vitro* study [J]. *Bioorg Chem*, 2016, 64: 74-84.
- [7] CIUMARNEAN L, MILACIU M V, RUNCAN O, et al. The effects of flavonoids in cardiovascular diseases [J]. *Molecules*, 2020, 25(18): 4320.
- [8] 凌晓颖, 丁雅荔, 陶嘉磊, 等. 清肺口服液黄酮类成分对呼吸道合胞病毒感染小鼠坏死性凋亡的影响[J]. *中草药(LING X Y, DING Y L, TAO J L, et al. Effect of flavonoids in qingfei oral liquid on necroptosis in RSV-infected mice [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs*), 2022, 53(13): 4019-27.
- [9] 高雪峰, 高健, 门中华, 等. 超声提取碱韭总黄酮及其抗氧化活性研究[J]. *食品与发酵工业(GAO X F, GAO J, MEN Z H, et al. Study on extraction of total flavonoids from *Allium polyrhizum* Turcz. ex Regel by ultrasonic-assisted extraction method and the antioxidant activity [J]. Food and Fermentation Industries*), 2024, 50(3): 197-206.
- [10] 陈策, 孙小龙, 谢琦琦, 等. 诱导类凋亡的抗肿瘤化合物的研究进展[J]. *中国药学杂志(CHEN C, SUN X L, XIE Q Q, et al. Advance in research on compounds with paraptosis induction effect [J]. Chinese Pharmaceutical Journal*), 2022, 57(18): 1512-7.
- [11] 和生, 包海鹰, 魏颖, 等. 栽培杨黄不同提取物对H₂₂荷瘤小鼠的抗肿瘤作用及机理[J]. *生物工程学报(HE S, BAO H Y, WEI Y, et al. Antitumor effect and mechanism of different extracts of cultivated *Phellinus vaninii* on H22 tumor bearing mice [J]. Chinese Journal of Biotechnology*), 2022, 38(3): 1025-38.
- [12] LU X, XUE B, ZHANG T, et al. Down-regulation of microRNA-10a mediates the anti-tumor effect of icaritin in A549 cells via the PTEN/AKT and ERK pathway [J]. *Gen Physiol Biophys*, 2019, 38(6): 525-33.
- [13] AHMED H, MOAWAD A, OWIS A, et al. Flavonoids of *Calligonum polygonoides* and their cytotoxicity [J]. *Pharm Biol*, 2016, 54(10): 2119-26.
- [14] HAN B, ZHAI Y, LI X, et al. Total flavonoids of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg inhibits colorectal tumor growth by modulating gut microbiota and metabolites [J]. *Food Chem*, 2023, 410: 135361.
- [15] KANG L, MIAO M, SONG Y, et al. Total flavonoids of *Taraxacum mongolicum* inhibit non-small cell lung cancer by regulating immune function [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 281: 114514.
- [16] LI B, XU N, WAN Z, et al. Isobavachalcone exerts anti-proliferative and pro-apoptotic effects on human liver cancer cells by targeting the ERKs/RSK2 signaling pathway [J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(6): 3355-66.
- [17] SUNDARAM M K, RAINA R, AFROZE N, et al. Quercetin modulates signaling pathways and induces apoptosis in cervical cancer cells [J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(8): BSR20190720.
- [18] LIAO Y, LUO Z, LIU Y, et al. Total flavonoids of Litchi seed attenuate stem cell-like properties in breast cancer by regulating Notch3 signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 305: 116133.
- [19] HE M, YASIN K, YU S, et al. Total flavonoids in *Artemisia absinthium* L. and evaluation of its anticancer activity [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(22): 16348.
- [20] GU Y, ZHENG Q, FAN G, et al. Advances in anti-cancer activities of flavonoids in *Scutellariae radix*: perspectives on mechanism [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(19): 11042.
- [21] 龙海洮, 雷雪, 陈佳宜, 等. 新型茛菪酰胺衍生物C12阻滞A549细胞周期、诱导细胞凋亡和自噬[J]. *中国细胞生物学学报(LONG H T, LEI X, CHEN J Y, et al. Novel Piperlongumine derivative C12 induces cell cycle arrest, apoptosis, and autophagy in A549 cells [J]. Chinese Journal of Cell Biology*), 2024, 46(5): 901-12.
- [22] LIU J, HONG M, LI Y, et al. Programmed cell death tunes tumor immunity [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 847345.
- [23] YAN J, WAN P, CHOKSI S, et al. Necroptosis and tumor progression [J]. *Trends Cancer*, 2022, 8(1): 21-7.
- [24] 王芳, 李开颖, 蔡振宇. 程序性细胞死亡与肿瘤[J]. *中国细胞生物学学报(WANG F, LI K Y, CAI Z Y. Programmed cell death and tumor [J]. Chinese Journal of Cell Biology*), 2022, 44(4): 539-50.
- [25] 肖旭, 李泽濛, 刘佩, 等. miR-106b-5p靶向调控SIRT7/SMAD4信号通路对口腔鳞状细胞癌侵袭和迁移的影响机制探究[J]. *中国细胞生物学学报(XIAO X, LI Z M, LIU P, et al. Mechanism of miR-106b-5p on invasion and migration of oral squamous cell carcinoma through targeted regulation of SIRT7/SMAD4 signaling pathway [J]. Chinese Journal of Cell Biology*), 2024, 46(2): 256-67.
- [26] DAI Y, ZHU Y, XU H. circ_0004872 inhibits proliferation, invasion, and glycolysis of oral squamous cell carcinoma by sponged miR-424-5p [J]. *J Clin Lab Anal*, 2022, 36(7): e24486.
- [27] KISODA S, MOURI Y, KITAMURA N, et al. The role of partial-EMT in the progression of head and neck squamous cell carcinoma [J]. *J Oral Biosci*, 2022, 64(2): 176-82.
- [28] ZHENG J, ZENG L, TANG M, et al. Novel ferrocene derivatives induce G₀/G₁ cell cycle arrest and apoptosis through the mitochondrial pathway in human hepatocellular carcinoma [J]. *Int J*

- Mol Sci, 2021, 22(6): 3097.
- [29] SU Z, YANG Z, XU Y, et al. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis [J]. Mol Cancer, 2015, 14: 48.
- [30] LEI H, SHI J, TENG Y, et al. Baicalein modulates the radiosensitivity of cervical cancer cells *in vitro* via miR-183 and the JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. Adv Clin Exp Med, 2021, 30(7): 727-36.
- [31] JIA X, ZHANG Q, XU L, et al. Lotus leaf flavonoids induce apoptosis of human lung cancer A549 cells through the ROS/p38 MAPK pathway [J]. Biol Res, 2021, 54(1): 7.
- [32] 宋亚刚, 方晓艳, 白明, 等. 夏枯草总黄酮通过抑制氧化磷酸化和糖酵解诱导肝癌细胞SMC-7721凋亡[J]. 中药药理与临床(SONG Y G, FANG X Y, BAI M, et al. Total flavonoids from *Prunella Vulgaris* L. induce apoptosis in liver cancer cell line SMMC-7721 by inhibiting oxidative phosphorylation and glycolysis [J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica), 2020, 36(6): 109-13.
- [33] HOU M, LI H, HE T, et al. Icariside I reduces breast cancer proliferation, apoptosis, invasion, and metastasis probably through inhibiting IL-6/STAT3 signaling pathway [J]. J Pharm Pharmacol, 2024, 76(5): 499-513.
- [34] 黄莉莉, 张智勤, 黄琦, 等. 毛蕊异黄酮对宫颈癌HeLa细胞增殖及凋亡的影响[J]. 实用临床医药杂志(HUANG L L, ZHANG Z Q, HUANG Q, et al. Effects of calycosin on proliferation and apoptosis of HeLa cells of cervical cancer [J]. Journal of Clinical Medicine in Practice), 2023, 27(18): 5-10.
- [35] ZHANG S, FENG N, HUANG J, et al. Incorporation of amino moiety to alepterolic acid improve activity against cancer cell lines: synthesis and biological evaluation [J]. Bioorg Chem, 2020, 98: 103756.
- [36] ZHU L, LIU S, LIAO Y, et al. Calycosin suppresses colorectal cancer progression by targeting ER β , upregulating PTEN, and inhibiting PI3K/Akt signal pathway [J]. Cell Biol Int, 2022, 46(9): 1367-77.
- [37] 杜亚青, 李向英, 张丽晓, 等. 毛蕊异黄酮抑制胃癌干细胞样细胞的增殖、迁移与侵袭并诱导凋亡[J]. 中国病理生理杂志(DU Y Q, LI X Y, ZHANG L X, et al. Calycosin inhibits proliferation, migration and invasion of gastric cancer stem cell-like cells [J]. Chinese Journal of Pathophysiology), 2023, 39(1): 37-44.
- [38] 刘佳芹, 周立霞, 陈文现, 等. 毛蕊异黄酮对肺腺癌SPC-A1细胞生长及凋亡的影响[J]. 海南医学(LIU J Q, ZHOU L X, CHEN W X, et al. Effect of calycosin on proliferation and apoptosis of lung adenocarcinoma cell line SPC-A1 in nude mice [J]. Hainan Medical Journal), 2023, 34(7): 913-8.
- [39] SOHEL M, SHOVA F T Z, SHUVO S, et al. Unveiling the potential anti-cancer activity of calycosin against multivarious cancers with molecular insights: a promising frontier in cancer research [J]. Cancer Med, 2024, 13(3): e6924.
- [40] CHEN L, GUO Y, ALSAIF G, et al. Total Flavonoids isolated from *Diospyros kaki* L. f. leaves induced apoptosis and oxidative stress in human cancer cells [J]. Anticancer Res, 2020, 40(9): 5201-10.
- [41] SHI X, LIU D, ZHANG J, et al. Extraction and purification of total flavonoids from pine needles of *Cedrus deodara* contribute to anti-tumor *in vitro* [J]. BMC Complement Altern Med, 2016, 16: 245.
- [42] 阎力君, 邹少钧, 龚爱芳, 等. 柘木总黄酮对Lewis肺癌的抑制作用及其组分配伍对LLC细胞自噬的影响[J]. 中国药学杂志(YAN L J, ZOU S J, GONG A F, et al. Inhibition of total flavonoids from *Cudrania tricuspidata* Bun on Lewis lung cancer and the effect of its component compatibility on autophagy of LLC cells [J]. Chinese Pharmaceutical Journal), 2019, 54(21): 1773-80.
- [43] KHORSANDI L, ORAZIZADEH M, NIAZVAND F, et al. Quercetin induces apoptosis and necroptosis in MCF-7 breast cancer cells [J]. Bratisl Lek Listy, 2017, 118(2): 123-8.
- [44] ZHANG Z, ZHANG Z, LI Q, et al. Shikonin induces necroptosis by reactive oxygen species activation in nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-2Z [J]. J Bioenerg Biomembr, 2017, 49(3): 265-72.
- [45] ABHARZANJANI F, HEMMATI M. Protective effects of Quercetin and Resveratrol on aging markers in kidney under high glucose condition: *in vivo* and *in vitro* analysis [J]. Mol Biol Rep, 2021, 48(7): 5435-42.
- [46] YADAV S, SHARMA A, NAYIK G A, et al. Review of shikonin and derivatives: isolation, chemistry, biosynthesis, pharmacology and toxicology [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 905755.
- [47] WEN K, FANG X, YANG J, et al. Recent research on flavonoids and their biomedical applications [J]. Curr Med Chem, 2021, 28(5): 1042-66.
- [48] SHAH U, PATEL A, PATEL S, et al. Role of natural and synthetic flavonoids as potential aromatase inhibitors in breast cancer: Structure-activity relationship perspective [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2022, 22(11): 2063-79.