

去甲基川陈皮素对前列腺癌细胞 PC3 和 DU145 的抗癌活性研究

谷悦^{1,2}

(1. 西南大学园艺园林学院, 重庆 400716; 2. 南方山地园艺学教育部重点实验室, 重庆 400715)

摘要 [目的]研究去甲基川陈皮素(5-demethylnobiletin, 5DN)对前列腺癌细胞活性的影响。[方法]通过 MTT 法检测 5DN 对 PC3 和 DU145 细胞的毒性。运用 DAPI 细胞核染色、实时荧光定量 PCR、蛋白免疫印迹法、细胞划痕试验探究 5DN 对前列腺癌细胞凋亡、迁移的影响。[结果]5DN 对 PC3 和 DU145 细胞增殖有明显的抑制作用, IC_{50} 分别为 49.33、54.14 $\mu\text{mol/L}$ 。5DN 处理后在 2 个细胞系中抑制细胞凋亡基因(*Bcl-2*, *AKT1*, *AKT2*)的 mRNA 的转录水平显著降低, 促进凋亡基因(*caspase-3*, *Bax*)的转录水平显著升高。DU145 中促进凋亡基因 *PTEN* 的 mRNA 的转录水平显著升高, 促凋亡蛋白 caspase 9 的表达量显著升高。同时, 5DN 能有效抑制 PC3 细胞的迁移。

[结论] 5DN 能促进前列腺癌细胞的凋亡并抑制它的增殖和迁移。

关键词 去甲基川陈皮素; 前列腺癌细胞; 抗癌活性

中图分类号 R285 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2019)13-0166-05

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.13.051



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Study on Anticancer Activity of 5-demethylnobiletin against Prostate Cancer Cells PC3 and DU145

GU Yue^{1,2} (1. College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400716; 2. Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions, Ministry of Education, Chongqing 400715)

Abstract [Objective] The aim was to study the effect of 5-demethylnobiletin (5DN) on the activity of prostate cancer cells. [Method] The toxicity of 5DN to PC3 and DU145 cells was detected by MTT assay. DAPI nucleic acid staining, RT-qPCR, Western blotting, Wound healing assay were used to investigate the effects of 5DN on apoptosis, proliferation and migration of prostate cancer cells. [Result] 5DN significantly inhibited the proliferation of PC3 and DU145 cells with IC_{50} of 49.33 and 54.14 $\mu\text{mol/L}$, respectively. After 5DN treatment, the transcriptional levels of genes that inhibit apoptosis, such as *Bcl-2*, *AKT1*, and *AKT2*, were significantly decreased, and the transcriptional levels of apoptosis-promoting genes such as *caspase-3* and *Bax* were significantly increased in two cell lines. In DU145, the transcription level of *PTEN* mRNA was significantly increased, and the expression level of caspase 9 protein was significantly increased. At the same time, 5DN could effectively inhibit the migration of PC3 cells. [Conclusion] 5DN can induce the apoptosis of prostate cancer cells and inhibit its proliferation and migration.

Key words 5-demethylnobiletin; Prostate cancer; Anticancer activity

前列腺癌是中老年男性泌尿生殖系统最常见的恶性肿瘤之一^[1], 发病率在全球呈逐年升高的趋势^[2]。虽然我国前列腺癌的发病率低于西方国家, 但前列腺癌发展速度迅猛、致死率高, 随着我国人口的老齡化前列腺癌患病的人数将不断增多^[3]。目前, 前列腺癌的治疗方法主要有手术治疗、放疗、化疗、内分泌治疗等^[4]。但传统的治疗方法效果不理想, 复发率高, 还会产生肿瘤耐药性, 影响化疗效果^[5]。因此, 寻找副作用小、药效好的抗肿瘤化合物显得更加必要。

多甲氧基黄酮(polymethoxylated flavones, PMFs)是柑橘属植物特有的, 一类高度甲氧基化的黄酮类化合物(flavonoids)^[6]。研究表明, PMFs 具有一系列生物活性, 包括预防糖尿病^[7]、心脑血管疾病^[8]、抗氧化^[9]、抗炎和抗癌作用^[10]。在已经鉴定的 70 多种 PMFs 中^[11], 去甲基多甲氧基黄酮作为 PMFs 的一个独特的亚类, 具有很强的抗癌活性, 包括肺癌^[12]、结肠癌^[13]和乳腺癌^[14]。去甲基川陈皮素(5-demethylnobiletin, 5DN)是柑橘类水果中含量最丰富的去甲基多甲氧基黄酮。研究表明, 5DN 能促进肺癌细胞中聚合微管蛋白的形成, 通过 JNK 活化导致肺癌细胞 G2/M 期阻滞, 从而有效抑制肺癌细胞的增殖^[15]。膳食 5DN 能抑制香烟致癌物 NNK 诱导的小鼠肺肿瘤发生^[16]。但是, 5DN 对人前列腺癌细胞的活性影响还鲜见报道。该研究以人源前列腺

癌细胞系 PC3 和 DU145 为细胞模型, 研究 5DN 对前列腺癌细胞的增殖、凋亡、迁移的影响, 寻找一种天然化合物为前列腺癌的治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象。去甲基川陈皮素(5DN)(纯度 $\geq 98\%$)来自 Li 等^[17]对柑橘大红袍的 PMFs 分离纯化研究。

1.1.2 试验细胞系。人源前列腺癌细胞 PC3 和 DU145 系来自重庆文理学院创新靶向药物国际研究院。

1.1.3 试剂。胎牛血清(FBS)购于美国 Sigma Aldrich 公司; 青霉素-链霉素购于美国 Gibco 公司; DMEM 和 F-12K 培养基购于美国 Gibco 公司; MTT(3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐)溶液、DMSO(二甲基亚砷)溶液、DAPI(40,60-二脒基-2-苯基吡啶)细胞核染色液、结晶紫染色液, 均购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 合成引物购于中国华大基因公司; caspase 9 和 β -actin 蛋白抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司; BCA 试剂盒购于中国碧云天公司; PVDF 膜购于美国 Merck Millipore 公司; 试验使用的所有其他化学品均来自美国 Sigma-Aldrich 公司。

1.1.4 仪器。双色红外激光成像系统(Odyssey CLx), 美国 LI-COR 公司; 酶标仪(Cytation 5), 美国 Bio Tek 公司; 小型垂直电泳槽(Mini-PROTEAN Tetra), 美国 Bio-Rad 公司; 倒置荧光显微镜(ix73), 日本 Olympus 公司; 细胞培养箱(BB15), 美国 Thermo Electron 公司; PCR 仪(S1000), 美国

基金项目 国家自然科学基金项目(31772260)。

作者简介 谷悦(1993—), 女, 重庆人, 硕士研究生, 研究方向: 果品营养与质量安全。

收稿日期 2019-02-22

Bio-Rad 公司;超纯水系统 (Milli-Q Advantage A10), 美国 Millipore 公司;实时荧光定量 PCR 仪 (LightCycler® 96), 瑞士 Roche 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养。PC3 和 DU145 人前列腺癌细胞系细胞分别培养在含 10%(V/V)、胎牛血清、1%青霉素-链霉素 (V/V)、DMEM 和 F-12K 培养基中,在 37 ℃、5%CO₂ 的培养箱中连续培养备用。

1.2.2 细胞毒性试验 (MTT)。采用 MTT 法检测 5DN 对人源性前列腺癌 PC3 和 DU145 细胞的体外抗增殖活性。将 PC3 和 DU145 细胞以 4×10³ 个细胞/孔的密度接种在 96 孔微量培养板中孵育 24 h,当孔中细胞贴壁密度在 70%~80% 时,加入不同浓度 (0~150 μmol/L) 的 5DN 处理细胞,设置空白对照,平行设置 6 个复孔。培养 48 h 后,向每个孔中加入 20 μL MTT (5 mg/mL) 溶液,在 37 ℃、5% CO₂ 下继续培养 4 h 后,吸弃上清液,每个孔中加入 150 μL DMSO 溶液,摇床振荡 10 min,使结晶体完全溶解。最后通过酶标仪在 λ_{562nm} 处读数,计算细胞存活率,并采用 Logit 法计算细胞 50%抑制浓度 (IC₅₀)。细胞存活率表示为:细胞存活率 = OD_{检测}/OD_{对照}×100%。

1.2.3 DAPI 细胞核染色。PC3 和 DU145 细胞 (1×10⁴ 个/孔) 分别接种于 24 孔板中,置 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h,当贴壁细胞密度达到 70%~80%,加入不同浓度的 5DN (0、50、75 μmol/L) 处理细胞,继续在培养箱中培养 48 h。然后弃去上清液,用 PBS 洗涤 2 次,并用 4%多聚甲醛固定 15 min。用 PBS 洗涤固定的细胞,并用 DAPI (100 ng/mL) 染色 15 min。最后,除去 DAPI 溶液,用 PBS 洗涤细胞 2 次。通过荧光显微镜观察拍照,最大吸收波长为 364 nm,最大发射波长为 454 nm。

1.2.4 细胞划痕试验。PC3 细胞 (5×10⁴ 个/孔) 接种于 6 孔板中,置 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h,当贴壁细胞密度达到 90%,第 2 天换低浓度血清培养基,使用 1 mL 枪头垂直对准 6 孔板的下端中央部位,向上轻推形成划痕,划十字。用 PBS 清洗掉悬浮的细胞后加入 5DN (75 μmol/L) 处理细胞,设置空白对照组,平行设置 3 个复孔。倒置荧光显微镜,0 h 拍照,放入培养箱继续培养 72 h 后再拍照。用软件 ImageJ 计算分析迁移面积。迁移面积 = 72 h 的细胞面积 - 0 h 的细胞面积。

1.2.5 实时荧光定量 PCR。PC3 和 DU145 细胞经不同浓度 5DN 处理后,收获细胞,采用试剂盒提取细胞中的总 RNA,检测 RNA 的浓度和纯度。逆转录合成 cDNA,反转录产物置于 -20 ℃ 保存备用。将制备好的 cDNA 进行 PCR 扩增,设计引物序列 (表 1),反应条件:95 ℃ 1 min,95 ℃ 20 s,45 个循环;60 ℃ 60 s。β-actin 基因作为内参。完成后采用 PCR 仪自带软件 qbase plus 进行分析。

1.2.6 蛋白免疫印迹法。PC3 和 DU145 细胞经不同浓度 5DN 处理后,收获细胞,使用 BCA 试剂盒测定浓度。制备 SDS-PAGE 分离胶,将配好的 PAGE 胶放入电泳槽中,加入

适量电泳缓冲液,通过 SDS-PAGE 凝胶电泳分离等量的蛋白样品 (120 V、90 min)。电泳后在 4 ℃ 下 100 V 转 120 min 进行转膜。室温下,将膜在含 5%脱脂奶粉 PBS 溶液中封闭 1 h,并在 4 ℃ 下孵育一抗 (caspase 9 1:1 000, β-actin 1:1 000) 过夜。在室温下孵育二抗 1 h。各抗体均用 TBST 溶液洗涤 3 次,6 min/次。然后将膜置于双色红外激光成像系统中检测。使用 ImageJ 读取相关条带灰度值。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

序号 No.	基因 Genes	引物序列 Primer sequences
1	Bcl-2	上游:5'-ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA-3' 下游:5'-ACAGTCCACAAAGGCATCC-3'
2	BAX	上游:5'-TTGCTTCAGCGTTTCATCCA-3' 下游:5'-CAGCCTTGAGCACCAGTTTG-3'
3	Caspase-3	上游:5'-GGCATTGAGACAGACAGTGG-3' 下游:5'-CATGGAATCTGTTTCTTTGC-3'
4	PTEN	上游:5'-GACGGAAGACAAGTTCAT-3' 下游:5'-GGTTCTCTGTGCTCTGGT-3'
5	Akt 1	上游:5'-ATGAGCGACGTGGCTATTGT-3' 下游:5'-GAGGCCGTCAGCCACAGTCT-3'
6	Akt 2	上游:5'-AACCTGTGCTCCATGACCTC-3' 下游:5'-CCCTTCTACAACCAGGACCA-3'
7	β-actin	上游:5'-TGCCCATCTACGAGGGGTATG-3' 下游:5'-CTCCTTAATGTCACGCAGGATTTC-3'
8	c-Myc	上游:5'-AGCGACTCTGAGGAGGAACAAG-3' 下游:5'-CCTGCCTCTTTTCACAGAAA-3'

1.3 统计分析 采用 SPSS 19.0 进行差异显著性分析 (P<0.05),采用 GraphPad Prism 5 绘图。

2 结果与分析

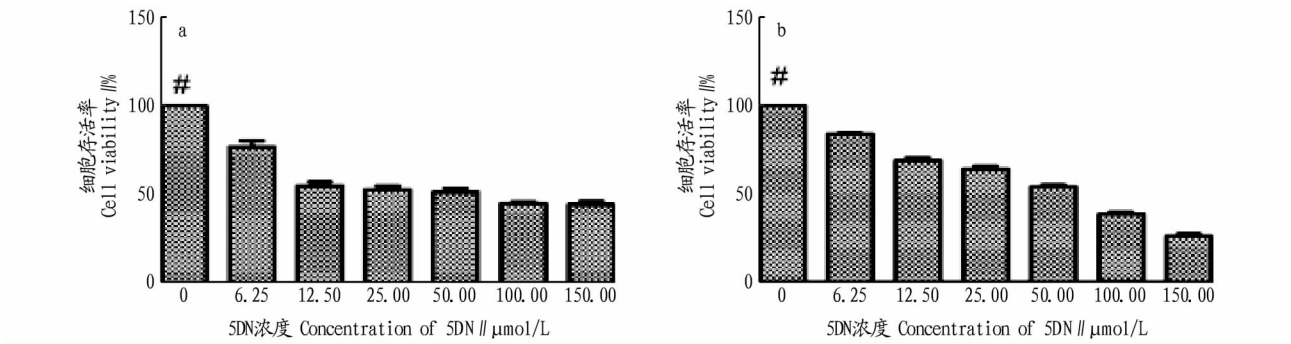
2.1 5DN 对 PC3 和 DU145 的细胞毒性 采用 MTT 法检测 5DN 对人源性前列腺癌 PC3 和 DU145 细胞的体外抗增殖活性。用一定浓度范围的 5DN (0~150 μmol/L) 处理 PC3 和 DU145 细胞 48 h 后,PC3 和 DU145 细胞的 IC₅₀ 分别为 49.33、54.14 μmol/L (图 1),PC3 细胞对 5DN 可能更敏感。结果显示,5DN 对 PC3 和 DU145 细胞增殖有明显的抑制作用。PC3 和 DU145 细胞在一定的浓度范围内都存在剂量依赖性 (图 1),PC3 细胞的剂量依赖性较明显。

2.2 5DN 诱导 PC3 和 DU145 产生凋亡小体 为了研究 5DN 对癌细胞的抑制增殖活性是否与细胞的凋亡有关,采用 DAPI 细胞核酸染色液对经过不同浓度 5DN (0、50、75 μmol/L) 处理 48 h 的 PC3 和 DU145 细胞进行染色。结果如图 2 所示,DU145 细胞在 75 μmol/L 5DN 后出现了核收缩,染色质浓缩并形成凋亡小体 (红色箭头);PC3 细胞在 50 和 75 μmol/L 都出现了凋亡小体,75 μmol/L 处理组凋亡小体明显增多。说明 5DN 对 PC3 和 DU145 的细胞毒性可能与凋亡相关。

2.3 5DN 诱导 PC3 和 DU145 细胞的凋亡 为了研究 5DN 引起 PC3 和 DU145 细胞凋亡的机制,对与凋亡相关的一些重要基因的 mRNA 的转录水平和蛋白表达量进行了研究。PC3 和 DU145 细胞经 5DN 处理后,75 μmol/L 5DN 处理组的

caspase-3 的 mRNA 的转录水平显著增加,*Bax* 的 mRNA 的转录水平随着 5DN 的浓度增加显著升高,75 $\mu\text{mol/L}$ 处理组的 mRNA 的转录水平为对照的 2 倍(图 3)。由于 PC3 细胞 *PTEN* 基因缺失,检测不到 *PTEN* 基因的 mRNA 转录。但是在 DU145 细胞中 *PTEN* 基因的转录水平随着 5DN 的浓度增

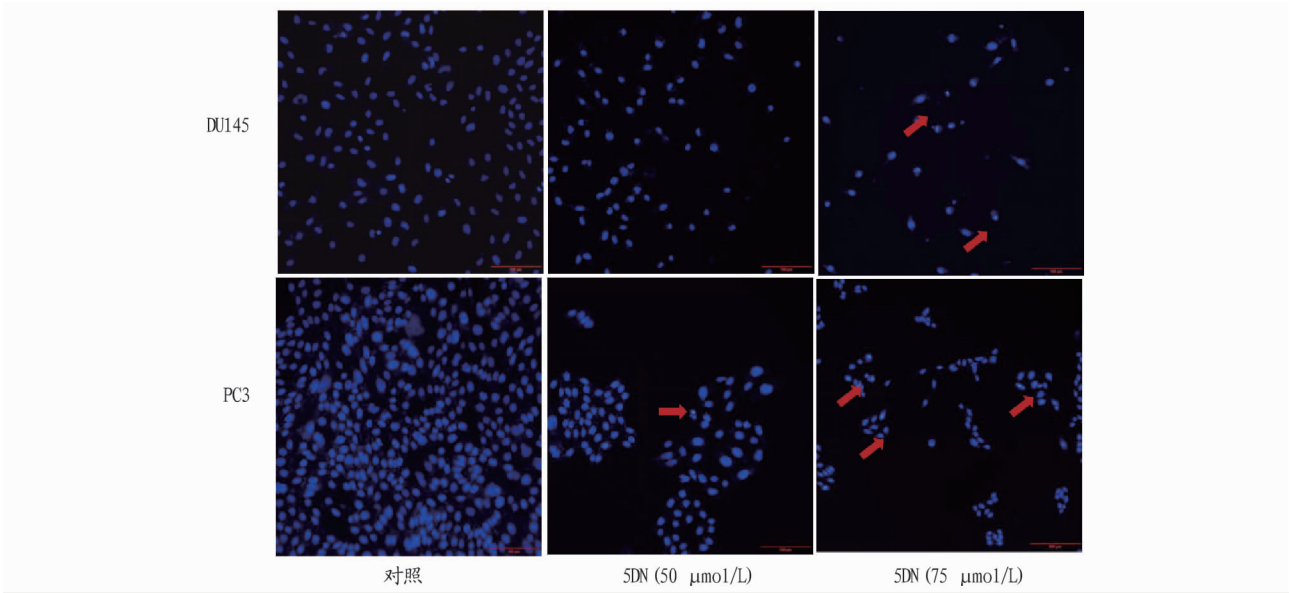
加显著升高(图 3)。在 2 个细胞系中抑制细胞凋亡的基因如 *Bcl-2*、*AKT1*、*AKT2* 的 mRNA 的转录水平随着 5DN 的浓度增加都显著降低(图 3)。DU145 经 5DN 处理后 *caspase 9* 蛋白的表达量随着 5DN 的浓度增加显著升高(图 4)。结果表明 5DN 可能通过线粒体信号转导途径诱导细胞的凋亡。



注:“#”表示与其他处理组差异显著($P<0.05$)
Note:“#” indicates significant differences with other treatment groups($P<0.05$)

图 1 DU145 细胞(a)和 PC3 细胞(b)在不同浓度的 5DN 处理下的细胞存活率

Fig.1 Cell survival rates of DU145 cells(a)and PC3 cells(b)in different concentrations of 5DN treatments



注:红色箭头表示凋亡小体
Note:Red arrow indicates apoptotic bodies

图 2 PC3 和 DU145 细胞经不同浓度 5DN 处理后 DAPI 细胞核酸染色结果

Fig.2 DAPI cell nucleic acid staining results of PC3 and DU145 cells treated with different concentrations of 5DN

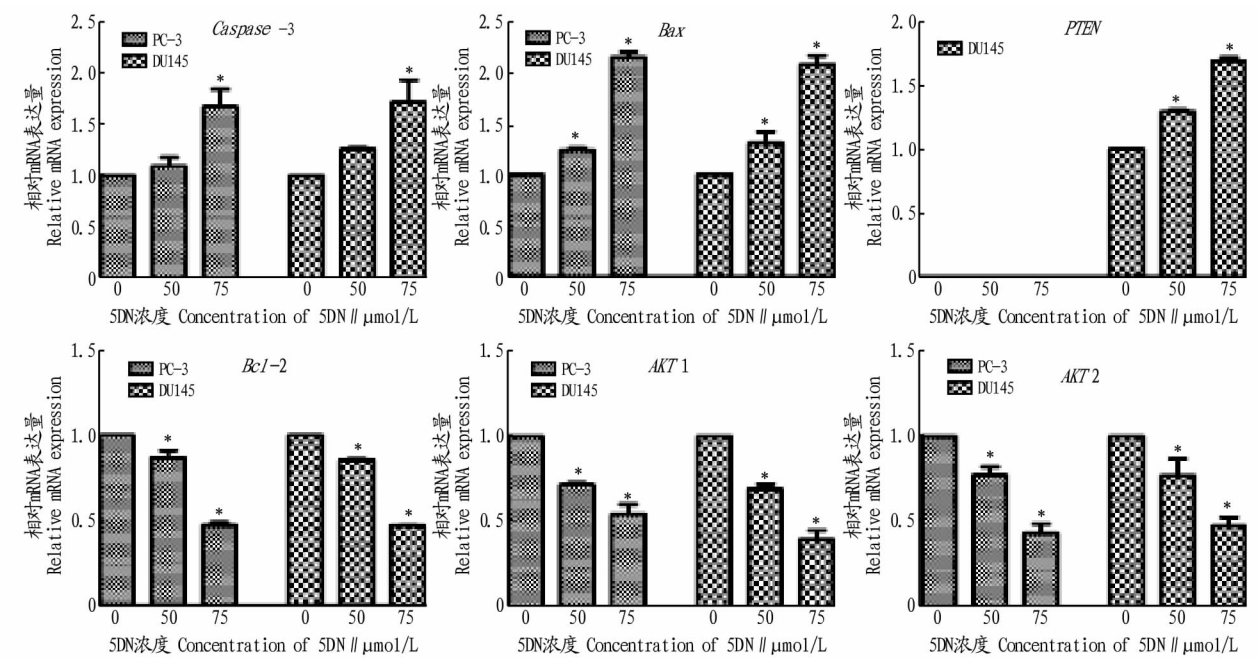
2.4 5DN 抑制 PC3 细胞的迁移 通过细胞划痕试验研究 5DN 对 PC3 细胞迁移的影响。72 h 后 75 $\mu\text{mol/L}$ 5DN 处理组的迁移率为 7.82%,对照组细胞迁移率为 52.58%。5DN 处理组与对照组细胞相比,迁移率减少 44.76%。同时对促进细胞迁移基因 *c-Myc* 的 mRNA 的转录水平进行了研究。结果表明,随着 5DN 浓度的增加,*c-Myc* 的 mRNA 的转录水平显著降低。进一步说明,5DN 能够抑制 PC3 细胞的迁移(图 5~6)。

3 结论与讨论

由于 PMFs 独特的多甲氧基结构,很多 PMFs 类物质对前列腺癌细胞都存在一定的抗癌活性^[18]。据文献报道,橘

皮素通过靶向 PI3K/Akt/mTOR 信号通路诱导 PC3 细胞上皮-间质转化的重编程,从而抑制前列腺癌细胞的增殖^[19-20]。川陈皮素通过 AKT 通路抑制前列腺癌 PC-3 和 DU-145 细胞的活性^[21]。

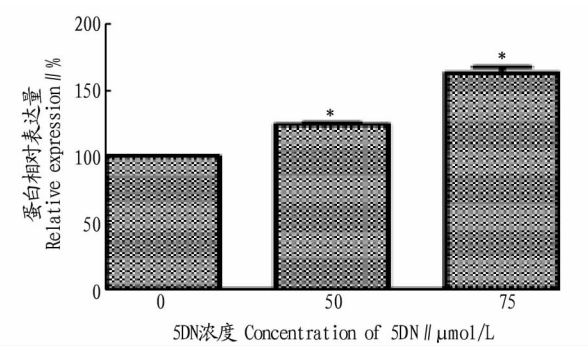
该研究通过细胞毒性检测发现 5DN 对人源前列腺癌 PC3 和 DU145 细胞的活性具有显著的抑制作用,这种抑制作用可能与细胞的凋亡相关。细胞凋亡是基因控制的细胞自主性死亡过程,许多抗肿瘤药物都通过启动细胞凋亡机制来杀死肿瘤细胞^[22]。其中线粒体信号转导途径诱导细胞凋亡极为重要。线粒体介导的凋亡中包括很多与细胞凋亡相关的基因如 *caspase* 家族基因和 *Bcl-2* 家族基因^[23]。该研究显



注: * 表示在 0.05 水平差异显著
Note: * indicates significant differences at the 0.05 level

图 3 不同浓度 5DN 处理 PC3 和 DU145 细胞的凋亡相关基因的 mRNA 的转录

Fig. 3 Transcription of mRNA of apoptosis-related genes in PC3 and DU145 cells treated with different concentrations of 5DN

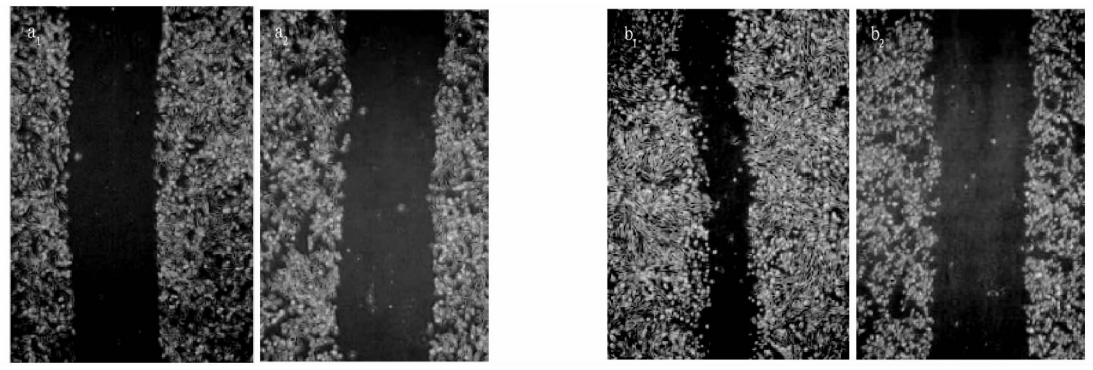


注: * 表示在 0.05 水平差异显著
Note: * indicates significant differences at the 0.05 level

图 4 不同浓度 5DN 处理 DU145 细胞的 caspase 9 蛋白的表达量
Fig. 4 Expression of caspase 9 protein in DU145 cells treated with different concentrations of 5DN

示 5DN 能抑制抗凋亡基因 *Bcl-2*、*AKT1*、*AKT2* 的 mRNA 的转录,促进凋亡基因 *caspase-3*、*PTEN* 和 *Bax* 的转录。*caspase-9* 作为一种促凋亡因子,是线粒体介导的细胞凋亡中的关键生物标志物,也是 *caspase* 家族中引起细胞凋亡的最关键成分之一^[24]。DU145 细胞经 5DN 处理后能上调 *caspase 9* 蛋白的表达。综上所述,表明 5DN 可能通过线粒体信号转导途径诱导细胞的凋亡。癌细胞的转移通常是由于癌细胞具有很强的迁移能力。试验发现,5DN 能有效抑制前列腺癌细胞的迁移。该研究虽然发现 5DN 能诱导前列腺癌细胞的凋亡,但是其具体的作用信号通路尚不明确,还有待进一步研究。

该研究首次研究了 5DN 对前列腺癌细胞的抗癌活性,发现 5DN 通过促进前列腺癌细胞的凋亡和抑制它的增殖和迁移,抑制 PC3 和 DU145 细胞的活性。上述体

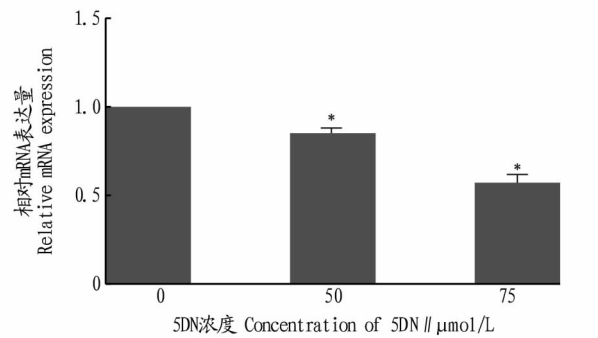


注: a₁、b₁ 为对照组; a₂、b₂ 为 75 $\mu\text{mol/L}$ 5DN 处理组
Note: a₁ and b₁ are the control group; a₂ and b₂ are 75 $\mu\text{mol/L}$ 5DN treated group

图 5 PC3 细胞经 75 $\mu\text{mol/L}$ 5DN 处理后在 0 h (a) 和 72 h (b) 的细胞图像

Fig. 5 Cell images of PC3 cells treated with 75 $\mu\text{mol/L}$ 5DN at 0 h (a) and 72 h (b)

外试验结果为 5DN 的体内抗肿瘤活性研究以及进一步应用于临床治疗奠定了试验基础,也为寻找有效治疗前列腺癌的药物提供了新思路。



注: * 表示在 0.05 水平差异显著
Note: * indicates significant differences at the 0.05 level

图 6 PC3 细胞经 5DN 处理后的基因 *c-Myc* 的 mRNA 的转录
Fig. 6 Transcription of the mRNA of the gene *c-Myc* after treatment with 5DN in PC3 cells

参考文献

[1] TANEJA S S. Urological oncology: Prostate cancer[J]. Journal of urology, 2014, 191(3): 656.
[2] GILES G G. Prostate cancer[M]//QUAH S R. International encyclopedia of public health. 2nd edition. Oxford: Academic Press, 2017: 51-59.
[3] ZHANG K, BANGMA C H, ROOBOL M J. Prostate cancer screening in Europe and Asia[J]. Asian J Urol, 2017, 4(2): 86-95.
[4] LOU D Y, FONG L. Neoadjuvant therapy for localized prostate cancer: Examining mechanism of action and efficacy within the tumor[J]. Urologic oncology, 2016, 34(4): 182-192.
[5] FARHAT A, JIANG D, CUI D, et al. An integrative model of prostate cancer interaction with the bone microenvironment[J]. Mathematical biosciences, 2017, 294: 1-14.
[6] ZHANG H, XI W P, ZHOU Z Q, et al. Bioactivities and structure of polymethoxylated flavones in citrus[J]. Journal of food agriculture & environment, 2013, 11(2): 237-242.
[7] 张元梅, 周志钦. 柑橘生物活性物质及其心血管疾病防治作用研究进展[J]. 中药材, 2011, 34(11): 1799-1804.
[8] 靖丽, 周志钦. 柑橘果实生物活性物质与糖尿病防治研究进展[J]. 果树学报, 2011, 28(2): 313-320.
[9] ZOU Z, XI W P, HU Y, et al. Antioxidant activity of Citrus fruits[J]. Food chemistry, 2016, 196: 885-896.
[10] MANTHEY J A, GUTHRIE N, GROHMANN K. Biological properties of

citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation[J]. Current medicinal chemistry, 2001, 8(2): 135-153.
[11] ZHANG J Y, LI N, CHE Y Y, et al. Characterization of seventy polymethoxylated flavonoids(PMFs) in the leaves of *Murraya paniculata* by on-line high-performance liquid chromatography coupled to photodiode array detection and electrospray tandem mass spectrometry[J]. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2011, 56(5): 950-961.
[12] XIAO H, YANG C S, LI S M, et al. Monomethylated polymethoxyflavones from sweet orange (*Citrus sinensis*) peel inhibit growth of human lung cancer cells by apoptosis[J]. Molecular nutrition & food research, 2009, 53(3): 398-406.
[13] QIU P S, DONG P, GUAN H S, et al. Inhibitory effects of 5-hydroxy polymethoxyflavones on colon cancer cells[J]. Molecular nutrition & food research, 2010, 542(S1): 244-252.
[14] SERGEEV I N, HO C, LI S, et al. Apoptosis-inducing activity of hydroxylated polymethoxyflavones and polymethoxyflavones from orange peel in human breast cancer cells[J]. Molecular nutrition & food research, 2007, 51(12): 1478-1484.
[15] CHEN Y K, WANG H C, HO C T, et al. 5-Demethylnobiletin promotes the formation of polymerized tubulin, leads to G2/M phase arrest and induces autophagy via JNK activation in human lung cancer cells[J]. Journal of nutritional biochemistry, 2015, 26(5): 484-504.
[16] SONG M Y, WU X, CHAROENSINPHON N, et al. Dietary 5-demethylnobiletin inhibits cigarette carcinogen NNK-induced lung tumorigenesis in mice[J]. Food & function, 2017, 8(3): 954-963.
[17] LI Z Q, ZHAO Z Y, ZHOU Z Q. Simultaneous separation and purification of five polymethoxylated flavones from "Dahongpao" tangerine (*Citrus tangerina* Tanaka) using macroporous adsorptive resins combined with prep-HPLC[J]. Molecules, 2018, 23: 1-17.
[18] GAO Z, GAO W, ZENG S L, et al. Chemical structures, bioactivities and molecular mechanisms of citrus polymethoxyflavones[J]. Journal of functional foods, 2018, 40: 498-509.
[19] ZHU W B, XIAO N, LIU X J. Dietary flavonoid tangeretin induces reprogramming of epithelial to mesenchymal transition in prostate cancer cells by targeting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. Oncology letters, 2018, 15(1): 433-440.
[20] CHANG L, GRAHAM P H, NI J, et al. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in the treatment of prostate cancer radioresistance[J]. Critical reviews in oncology hematology, 2015, 96(3): 507-517.
[21] CHEN J C, CREED A, CHEN A Y, et al. Nobiletin suppresses cell viability through AKT Pathways in PC-3 and DU-145 prostate cancer cells[J]. BMC pharmacology & toxicology, 2014, 15: 1-10.
[22] 张永亮, 陈修煦, 来茂德. 化疗药物诱导的肿瘤细胞凋亡和相关因子的调控[J]. 国外医学(遗传学分册), 2002, 25(3): 121-126.
[23] 王德成, 高洪. 细胞凋亡信号转导途径及调控的研究进展[J]. 动物医学进展, 2003, 24(6): 4-7.
[24] 赵岩, 孙健, 吴影, 等. 结直肠癌中 Survivin、Caspase 9 和 Ki-67 表达的相关性及临床意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2017, 33(4): 435-438.

(上接第 165 页)

[11] 祁永琼, 王丽莉, 罗瑞芳, 等. 金线莲不同外植体组织培养成苗技术探讨[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(8): 57-59.
[12] 张卫芳, 高疆生, 欧勇慧, 等. 抑制核桃组培中的褐化现象初探[J]. 落叶果树, 2003, 35(3): 4-7.

[13] 梅兴国, 董妍玲, 潘学武. 红豆杉细胞继代培养防褐变措施的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(4): 8-11.
[14] 罗虹, 陈汝民. 墨兰的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 1997, 33(6): 436-437.
[15] 韩俊, 杨生超, 王自林, 等. SAS 正交设计筛选通关藤组培诱导培养基的研究[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(17): 98-99. 149.