

金莲花总黄酮诱导人 HT-29 结肠癌细胞 凋亡机制的研究

宋家乐¹, 李贵节², 赵欣²

(1. 韩国国立釜山大学食品营养系, 釜山 609-735) (2. 重庆第二师范学院生物与化学工程系, 重庆 400067)

摘要: 本文研究了金莲花总黄酮乙醇提取物 (TFETC) 诱导人 HT-29 结肠癌细胞凋亡的作用机制。MTT 法测定 TFETC 对 HT-29 细胞增殖的影响, 200 $\mu\text{g/mL}$ 浓度 TFETC 对癌细胞的抑制率达到 81%。通过 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 法和流式细胞术检测到金莲花总黄酮乙醇提取物可以诱导癌细胞凋亡, 200 $\mu\text{g/mL}$ 浓度 TFETC 处理的癌细胞通过显微镜观察出现凋亡, 亚 G1 期 DNA 含量达到 28.9%。逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 法测定 TFETC 对 HT-29 细胞内 *Bcl-2*, *Bcl-xL*, *Bax*, *caspase-9*, *caspase-3* 和 *COX-2* 等基因表达的影响。TFETC 在 mRNA 水准上下调抗凋亡基因 *Bcl-2* 和 *Bcl-xL*, 上调促凋亡基因 *Bax*, *caspase-9* 和 *caspase-3* 的表达。此外, TFETC 还可抑制 HT-29 细胞内 *COX-2* 基因的表达, 并呈剂量效应关系。本研究结果显示金莲花总黄酮乙醇提取物可以通过内源性线粒体途径诱导人 HT-29 结肠癌细胞的凋亡, 同时金莲花总黄酮乙醇提取物还可通过下调 *COX-2* 基因的表达抑制 HT-29 细胞的增殖。

关键词: 金莲花; 凋亡; 癌细胞; 抑制率

文章编号: 1673-9078(2014)6-7-12

Apoptotic Mechanism in Human HT-29 Colon Cancer Cells Induced by Total Flavones from *Trollius chinensis* Bunge

SONG Jia-le¹, LI Gui-jie², ZHAO Xin²

(1. Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Busan 609-735, South Korea)

(2. Department of Biological and Chemical Engineering, Chongqing University of Education, Chongqing 400067, China)

Abstract: The mechanism of the ethanol extract of the total flavones from *Trollius chinensis* Bunge (TFETC) inducing apoptosis in HT-29 human colon cancer cells was investigated. MTT assay, which is used to determine the anti-proliferation effect to cancer cells, showed that TFETC inhibited the proliferation of HT-29 cells in a dose-dependent manner, and the inhibitory rate was 81% when treated with 200 $\mu\text{g/mL}$ TFETC. 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining. Flow cytometry analysis showed that 200 $\mu\text{g/mL}$ TFETC induced apoptosis of HT-29 cells and the sub-G1 DNA content was 28.9%. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was applied to evaluate the impact of TFETC on mRNA expression levels of *Bcl-2*, *Bcl-xL*, *Bax*, *caspase-9*, *caspase-3* and *COX-2* in HT-29 cells. The results showed that TFETC reduced the mRNA expression levels of anti-apoptosis genes *Bcl-2* and *Bcl-xL*, and up-regulated the mRNA expression of pro-apoptosis genes *Bax*, *caspase-9*, and *caspase-3* in HT-29 cells. Moreover, TFETC down-regulated the mRNA expression of *COX-2* in HT-29 cells in a dose-dependent manner. These results indicated that TFETC could induce the apoptosis through an intrinsic mitochondria pathway in HT-29 cells. Meanwhile, TFETC could reduce cell proliferation through down-regulating the gene expression of *COX-2*.

Key words: *Trollius chinensis* Bunge; apoptosis; cancer cell; inhibition rate

在我国消化道肿瘤,特别是结直肠癌是居民中很常见的癌症之一,其发病多见于40至70岁之间。随

收稿日期: 2014-01-13

基金项目: 重庆高校创新团队建设计划资助项目 (KJTD201325)

作者简介: 宋家乐 (1983-), 男, 博士后, 研究方向为分子营养学和植物化学

通讯作者: 赵欣 (1981-), 男, 博士, 教授, 研究方向为食品营养学和食品化学

随着我国老龄化人口的日益增加,居民膳食结构调整和生活习惯的改变,以及结直肠癌发病年轻化,预计到2030年,我国的结直肠癌患者将大幅度提高,死亡人数也将随之增加^[1]。目前,临床通行以外科手术为主,辅以放化疗治疗结直肠癌。术后放化疗会引起各种不良反应,且患者复发合并转移率高;对于中晚期,高龄及难手术患者仍缺少有效的治疗方法。近年来的临床研究表明,我国传统中医药利用药食同源在结直

肠癌综合治疗中对预防结直肠癌术后复发,提高患者生存质量,延长患者生存期等方面都有着重要的作用^[2]。药食同源植物还有助于改善放化疗所引起的炎症损伤、骨髓抑制、免疫低下、胃肠道症状等不良反应^[2]。同时结直肠癌患者在术后恢复过程中的营养补充和食疗协助作用也是十分重要的,有效的将食品运用在术后恢复中可以加快机体恢复,减轻病患的痛苦,所以充分利用药食同源资源的两面性,既可以作为药物辅助治疗,又可以作为食品补充营养和增强机体免疫力,可以作为一个新的手段在结直肠癌患者治疗中起到有效的作用。

金莲花 (*Trollius chinensis* Bunge) 系多年生草本植物毛茛科 (*Ranunculaceae*) 金莲花属 (*Trollius*) 短瓣金莲花的干燥花及花蕾,广泛分布于我国陕西、山西、河北、内蒙古、东北、四川、云南以及台湾地区,是一味传统中药材,具有清热解毒的功效^[1],在现今已经被应用于保健食品行业。有研究已表明金莲花具有抗菌^[4]、抗流感病毒^[5]、抗炎^[6]、抗氧化^[7]、抗人 MCF-7, MDA-MB-231 乳腺癌细胞,人 AGS 胃癌,人 A375SM 黑色素瘤细胞增殖^[7]和治疗呼吸道及泌尿系统疾患等功能性作用^[1]。同时通过现代研究进一步证明荜苳苳、牡荊苳、槲皮素是金莲花总黄酮类化合物的主要活性成分^[3,6]。本文旨在对金莲花总黄酮乙醇提取物诱发 HT-29 人结肠癌细胞凋亡的机制进行研究。

1 材料与方法

1.1 样品

金莲花:市售河北省承德围场县产金莲花。取适量金莲花冻干粉碎样品,按 1:10 比例加入 80% 乙醇溶液,超声 1 h 提取后,过滤,所得滤渣照前述比例继续加入适量 80% 乙醇溶液,重复提取两次,合并滤液。滤液经 3600 r/min 离心 15 min 后,收集上清液,经 50 °C 真空减压旋转蒸发后,制备得金莲花总黄酮乙醇提取物并用二甲亚砜配成浓度为 20 mg/mL 的储备液, -20 °C 保管待用。

1.2 癌细胞株

HT-29 人结肠癌细胞, LLC-PK1 猪肾近曲小管细胞购自美国典型微生物菌种保藏中心(ATCC)。

1.3 试剂

DMEM 细胞培养液、胎牛血清和四甲基偶氮唑蓝 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT), 美国 Sigma 公司; Trizol 试剂、oligodT18、RNase、dNTP 和 MLV,

美国 Invitrogen 公司; CycleTEST™ PLUS DNA 染色试剂盒, 德国 Becton Dickinson 公司; 其余试剂均为国产分析纯。

1.4 仪器与设备

EYELAN-1001S 旋转蒸发仪, 日本东京理化器械株式会社; Thermo 3110 二氧化碳细胞培养箱, 美国 Thermo 公司; Combi-514R 冷冻离心机, 韩国 Hanil 株式会社; Bio-Rad 680 酶标仪、Bio-Rad 小型水平电泳槽, 美国 Bio-Rad 公司; ABI 2720 PCR 仪, 美国 Applied Biosystems 公司; BXSO 型荧光显微镜, 日本奥林巴斯公司; EPICS XL-MCL 流式细胞仪, 日本 Beckman Coulter 株式会社。

1.5 方法

1.5.1 细胞培养

HT-29 结肠癌细胞和 LLC-PK1 细胞以 DMEM 细胞培养基 (含 10% 胎牛血清) 置于 37 °C, 5% CO₂ 环境下湿化培养, 每 2~3 d 换液。细胞分别接种于 96 孔细胞培养板中。待细胞贴壁后用于后续实验。

1.5.2 MTT 法测定细胞生长抑制率

HT-29 和 LLC-PK1 细胞分别按 1×10^4 细胞/孔, 每孔 100 μ L 接种于 96 孔板, 细胞贴壁后, 以不同浓度金莲花总黄酮提取物 (10、50、100 和 200 μ g/mL) 培养 24 h 后, 弃孔内培养基并加入 100 μ L MTT 溶液 (终浓度 0.5 mg/mL) 继续培养 4 h。培养结束后弃上清液, 每孔加 100 μ L 二甲亚砜避光振荡 30 min, 测定 OD_{490 nm} 值后按公式计算细胞生存率。

$$\text{细胞生长抑制率} = 1 - \text{OD}_{\text{对照}} / \text{OD}_{\text{空白}} \times 100\%$$

1.5.3 DAPI 荧光染色法观察癌细胞凋亡情况

HT-29 癌细胞在 6 孔板中培养 24 h 贴壁后, 加入 10~200 μ g/mL 浓度金莲花提取物后再继续培养 48 h 后用 0.05% 的胰蛋白酶和 0.02% 的乙二胺四乙酸消化处理后, 然后用 PBS 漂洗后使用 3.7% 的多聚甲醇在常温下 10 min 固定细胞。对固定后的癌细胞用浓度为 1 μ g/mL 的 DAPI 溶液进行 10 min 染色。最后用 PBS 漂洗染色后的细胞 2 次, 在荧光显微镜下进行拍照并进行形态学分析。

1.5.4 流式细胞术检测癌细胞凋亡情况

按 MMT 法测定细胞生长抑制率方法相同培养癌细胞后, 将金莲花总黄酮提取物处理后的癌细胞通过胰蛋白酶消化收集, 并用 PBS 试剂漂洗, 将细胞悬浮于 PBS 试剂中。细胞的 DNA 含量用 DNA 染色试剂盒进行处理后用碘化丙啶染色, 处理染色后的癌细胞的荧光强度使用 FACScan 流式细胞仪测定后再

CellQuest 软件进行分析。

1.5.5 RT-PCR 法检测金莲花总黄酮提取物对 HT-29 细胞相关基因的表达

HT-29 细胞接种于 10cm 细胞培养皿中, 依 1.5.2 所述处理 24 h 后, 使用 Trizol 试剂照说明书提取细胞内总 RNA, 紫外法检测纯度后, 将各样品组的总 RNA 浓度调整至同一水准。各组取等量 RNA (2 μg) 分别加入 oligodT18, RNase, dNTP 和 MLV 酶各 1 μL , 5 \times buffer 10 μL , 在 20 μL 体积下, 37 $^{\circ}\text{C}$ 120 min, 99 $^{\circ}\text{C}$ 4 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 3 min 的条件下合成 cDNA。基因序列逆转录后, 进行聚合酶链式反应。Bcl-2, Bcl-xL, Bax, caspase-9, 3 和 COX-2 序列分别按方法扩增目标基因^[9]。反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 50 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s, 循环 40 次, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。2% 琼脂糖凝胶电泳检查最终产物的表达程度, 并用 ImageJ 软件定量分析表达强度^[8]。

1.5.6 数据分析

所有实验均重复 3 次, 结果以平均值 \pm 标准偏差表示, 并经 SAS 9.2 统计分析, 多重比较采用 Duncan's 检验, $p < 0.05$ 为具有显著性。

2 结果与讨论

2.1 金莲花总黄酮乙醇提取物对 HT-29 细胞

增殖的影响

采用 MTT 法测定细胞生长率, 如图 1a 所示, 金莲花总黄酮乙醇提取物处理 LLC-PK1 猪肾近曲小管细胞时, 处理浓度从 0~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时 LLC-PK1 猪肾近曲小管细胞并未出现细胞生长被抑制的状况, 可见金莲花总黄酮乙醇提取物对正常组织细胞未有毒性作用。当用金莲花总黄酮乙醇提取物处理 HT-29 癌细胞, 随着处理浓度从 0~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 逐渐增大时, 癌细胞生长抑制率程梯度增加 ($p < 0.05$), 浓度超过 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时癌细几乎全部死亡, 所以浓度在 0~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内提取物对细胞没有毒性作用下对细胞产生诱导凋亡效果, 按梯度由小到大选择 10、50、100 和 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度进行实验, 可以有效的验证金莲花总黄酮乙醇提取物的体外抗癌效果。用 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度提取物处理癌细胞时, HT-29 癌细胞的生长抑制率达到 81% (图 1b)。由此可见, 金莲花总黄酮乙醇提取物对正常细胞的生长未见明显作用, 但是对 HT-29 癌细胞生长具有明显的抑制作用, 其对癌细胞可能具有特定的作用。

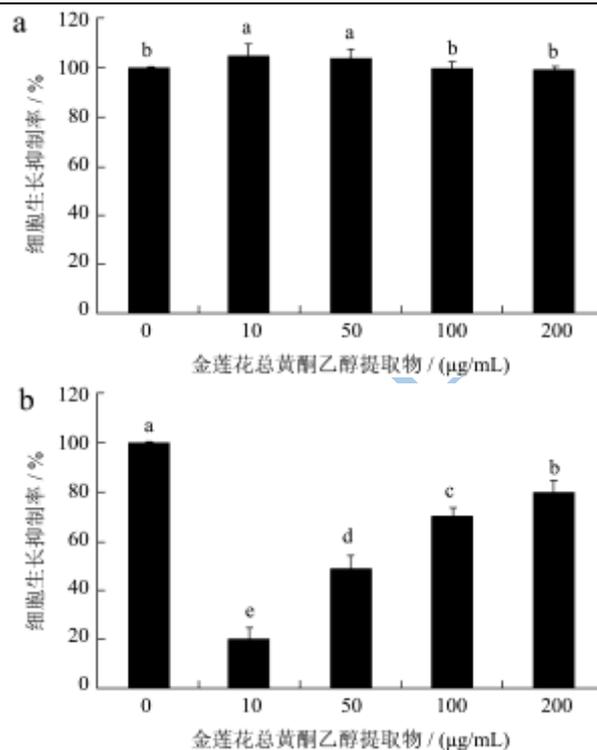


图1 金莲花总黄酮乙醇提取物对 LLC-PK1 猪肾近曲小管细胞 (a) 和 HT-29 人结肠癌细胞 (b) 的生长抑制效果

Fig.1 Inhibition effect of total flavones extracts from *Trollius chinensis* Bunge in LLC-PK1 renal proximal tubule cells (a) and HT-29 human colon cancer cells (b)

注: a~e 不同字母表示差各组数据平均值差异显著 ($p < 0.05$)。

2.2 金莲花总黄酮乙醇提取物对 HT-29 细胞

的凋亡诱导作用

凋亡细胞核经 DAPI 试剂染色后, 会发出蓝色荧光, 通过蓝色荧光的状态可以检测细胞的凋亡情况^[11]。未经过样品处理的 HT-29 对照组癌症细胞的细胞核边缘清晰、荧光显示均匀, 未出现凋亡引起的荧光变化。经 0~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 金莲花总黄酮乙醇提取物处理后的癌细胞, 随着样品浓度的增加癌细胞出现的细胞边缘不规则越明显, 细胞核染色也越为明显, 并且随浓度的增加, 在显微镜可视范围内的凋亡小体数也明显增加 (图 2a)。

通过流式细胞术检测癌细胞亚 G1 期 DNA 含量的比例可以判断细胞的凋亡细胞数量^[11], 金莲花总黄酮乙醇提取物处理后的癌细胞经过流式分析后可以看出对照组癌细胞未出现明显的凋亡, 经过样品处理的癌细胞随着处理金莲花总黄酮乙醇提取物浓度的增加, 凋亡细胞的比例也逐渐增大; 0、10、50、100 和 200

μg/mL 金莲花总黄酮乙醇提取物处理后的 HT-29 癌细胞的凋亡比例分别为 3.6、4.7、13.9、21.8 和 28.9% (图 2b), 且各浓度之间的凋亡细胞比例具有统计学意义 ($p < 0.05$)。通过 DAPI 和流式细胞术结果可以看出金莲花总黄酮乙醇提取物可以明显的诱导 HT-29 癌细胞凋亡, 且浓度越高诱导凋亡的效果越明显。

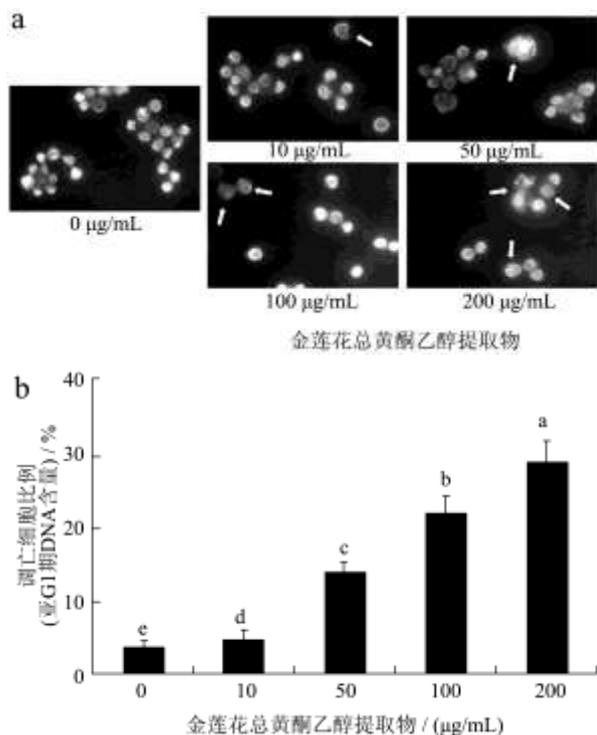


图2 金莲花总黄酮乙醇提取物诱导 HT-29 人结肠癌细胞凋亡的 (a) DAPI 和 (b) 流式细胞术观察

Fig.2 Observation of HT-29 human colon cancer cells to *Trollius chinensis* Bunge induced apoptosis by (a) DAPI and (b) flow cytometry assay

2.3 金莲花总黄酮乙醇提取物对 HT-29 细胞

内 *Bcl-2*, *Bcl-xL* 和 *Bax* 基因表达的影响

一般认为, 肿瘤是由于细胞过度增殖和凋亡失衡所致, 诱发肿瘤细胞自身凋亡有助于肿瘤的防治。*Bcl-2*, *Bcl-xL* 和 *Bax* 共属于 *Bcl* 家族, 其中 *Bcl-2*, *Bcl-xL* 属抗凋亡基因, *Bax* 属促凋亡基因, 这两类基因的表达比率与肿瘤细胞自身凋亡的发生有着密切关系。随着处理浓度的增加, 金莲花总黄酮乙醇提取物可明显抑制 HT-29 细胞内 *Bcl-2*, *Bcl-xL* 基因的表达, 并诱导 *Bax* 基因的表达 (图 3), 并且通过定量分析可以看出随浓度的增加, 各基因的表达具有明显的差异 ($p < 0.05$)。严等^[10]的研究显示作为金莲花总黄酮提取物主成份之一的槲皮素可通过降低 HT-29 细胞内

Bcl-2 的 mRNA 表达水准, 促进细胞的凋亡。这一结果提示金莲花总黄酮乙醇提取物可通过调节凋亡相关基因的表达, 诱发 HT-29 结肠癌细胞的凋亡。

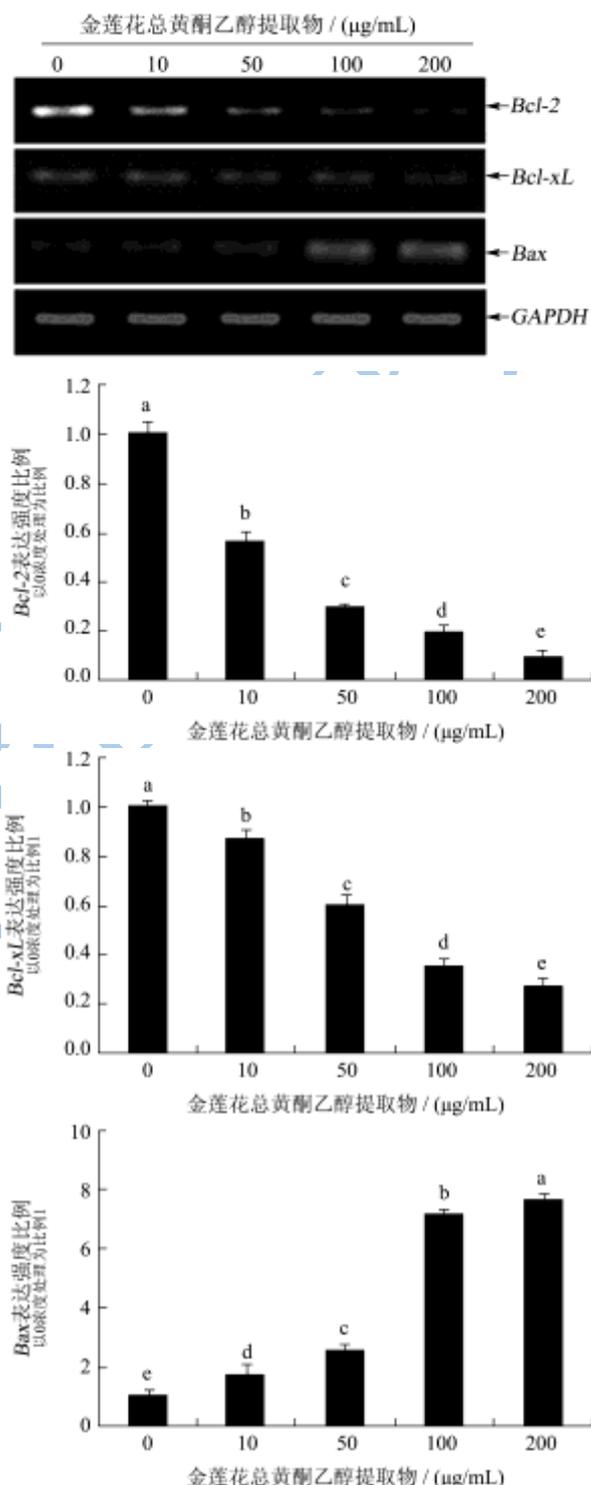


图3 金莲花总黄酮乙醇提取物对 HT-29 人结肠癌细胞内 *Bcl-2*, *Bcl-xL* 和 *Bax* 基因表达的影响

Fig.3 Effect of total flavones extracts from *Trollius chinensis* Bunge on the gene expressions of *Bcl-2*, *Bcl-xL* and *Bax* in HT-29 human colon cancer cells

注: a-e不同字母表示差各组数据平均值差异显著 ($p < 0.05$)。

2.4 金莲花总黄酮乙醇提取物对 HT-29 细胞

内 *caspase-9* 和 *caspase-3* 基因表达的影响

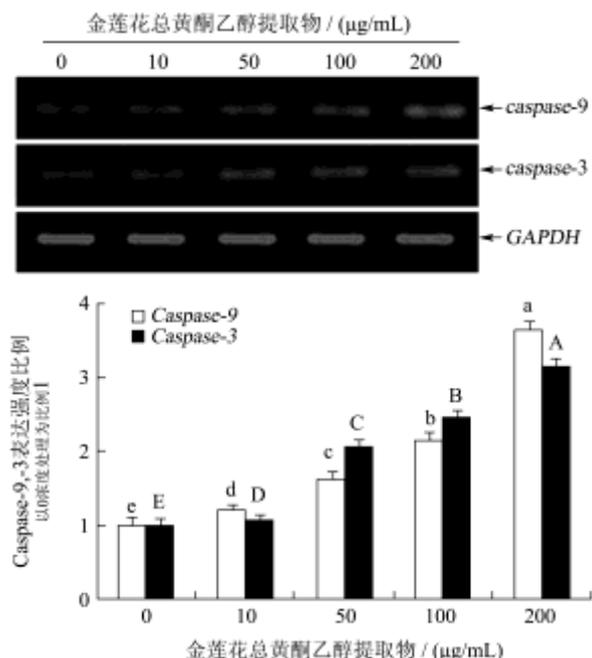


图4 金莲花总黄酮乙醇提取物对 HT-29 人结肠癌细胞内 *caspase-9* 和 *caspase-3* 基因表达的影响

Fig.4 Effect of total flavones extracts from *Trollius chinensis* Bunge on the gene expressions of *caspase-9* and *caspase-3* in HT-29 human colon cancer cells

注: a-e, A-E不同字母表示差各组数据平均值差异显著 ($p < 0.05$)。

Caspase 是一类天冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白酶家族,也是内源性线粒体凋亡途径中重要的凋亡效应分子。凋亡信号通过激活细胞内 *pro-caspase-9*, 上调 *caspase-9* 的表达, 诱发执行细胞凋亡的最终效应蛋白 *caspase-3* 的表达, 通过剪切细胞及细胞核内骨架蛋白, 介导细胞核片段化, 参与凋亡小体的形成, 最终诱发 *caspase* 瀑布式级联放大反应引起细胞凋亡^[12]。在 mRNA 水平上, 随着金莲花总黄酮乙醇提取物处理浓度的增加, HT-29 细胞内 *caspase-9* 和 *caspase-3* 基因的表达显著提高 (图 4, $p < 0.05$)。这一结果说明金莲花总黄酮乙醇提取物可以通过激活 *caspase* 途径促进细胞的凋亡。此外, 孙等^[11]研究结果也指出槲皮素可以通过上调 *caspase-3* 的表达促进 HT-29 细胞的凋亡。

2.5 金莲花总黄酮乙醇提取物对 HT-29 细胞

内 COX-2 基因表达的影响

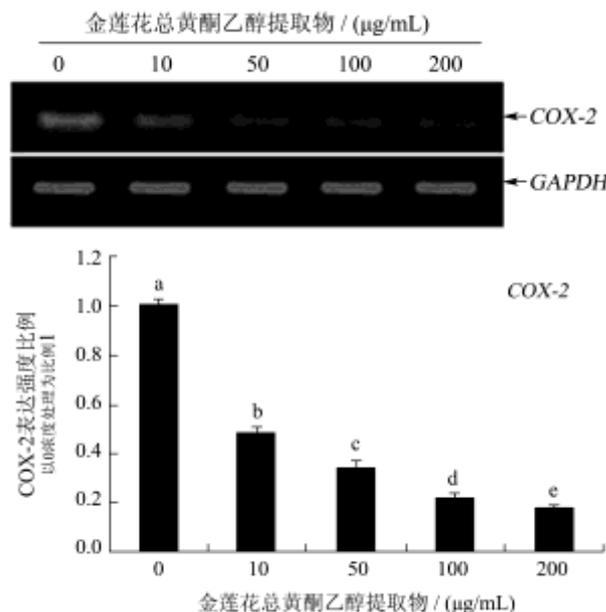


图5 金莲花总黄酮乙醇提取物对 HT-29 人结肠癌细胞内 *COX-2* 基因表达的影响

Fig.5 Effect of total flavones extracts from *Trollius chinensis* Bunge on the gene expressions of *COX-2* in HT-29 human colon cancer cells

注: a-e不同字母表示差各组数据平均值差异显著 ($p < 0.05$)。

近年研究发现, 环氧合酶-2 (*COX-2*) 与消化道肿瘤, 特别是结直肠癌的发生有着非常密切的联系^[13]。抑制 *COX-2* 的表达有助于预防结直肠癌的发生, 缓解病程, 提高患者的生存质量和术后生存率^[14]。本研究中, 10 到 200 µg/mL 的金莲花总黄酮乙醇提取物可有效的抑制 *COX-2* 在 HT-29 结肠癌细胞中的表达, 各浓度表达之间具有统计学意义(图 5, $p < 0.05$), 结果显示, 金莲花总黄酮提取物可通过下调 *COX-2* 的 mRNA 表达抑制结肠癌细胞的增殖。此外, 孙等^[9]也报告了翠云草总黄酮通过有效抑制 mRNA 水平上 *COX-2* 的表达, 从而有效抑制 HT-29 结肠癌细胞的增殖。该结果也说明 *COX-2* 可能是金莲花总黄酮抗癌作用的一个重要靶点。

3 结论

本文通过 MTT 法、DAPI、流式细胞术和 RT-PCR 法对金莲花总黄酮乙醇提取物诱发人 HT-29 结肠癌细胞的凋亡机制研究发现, 金莲花总黄酮乙醇提取物可有效的抑制 HT-29 细胞的体外增殖和诱导癌细胞凋亡, 并通过抑制 HT-29 结肠癌细胞内抗凋亡基因 *Bcl-2*, *Bcl-xL* 的表达, 上调促凋亡基因 *Bax*, *caspase-9* 和 *caspase-3* 的表达诱导 HT-29 细胞自发产生细胞凋亡, 且效果呈浓度依存度效应。该结果表明金莲花总黄酮可能通过内源性线粒体凋亡途径诱导 HT-29 结肠

癌细胞的凋亡并发挥抗癌作用。此外,金莲花总黄酮提取物还可有效的抑制 HT-29 细胞内 COX-2 基因的表达,进而抑制 HT-29 癌细胞的增殖。本研究为金莲花总黄酮提取物作为保健食品对消化道肿瘤的抑制作用提供了一定的理论依据,但实验结果是基于细胞水平的体外实验,其抗癌分子机制和体内抑制癌症作用有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] 任建松,李倩,关鹏,等.中国2008年消化道常见恶性肿瘤发病、死亡和患病情况的估计及预测[J].中华流行病学杂志,2012,33(10):1052-1055
REN Jian-song, LI Qian, GUAN Peng, et al. Estimation and prediction for incidence, mortality and prevalence of common gastrointestinal tract cancers in China, 2008 [J]. Chinese Journal of Epidemiology, 2012, 33(10): 1052-1055
- [2] 王小宁,崔介格.中医治疗大肠癌的思路与方法探讨[J].中国中医基础医学杂志,2007,9(4):681-682
WANG Xiao-ning, CUI Jie-ge. Thoughts and methods for treatment of large intestine cancers with traditional Chinese medicine [J]. Chinese Journal of Basic Medicine in Traditional Chinese Medicine, 2007, 9(4): 681-682
- [3] 宋冬梅,孙启时.金莲花属植物研究进展[J].沈阳药科大学学报,2005,22(3):231-234
SONG Dong-mei, SUN Qi-shi. Advances on Trollis [J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2005, 22(3): 231-234
- [4] 刘平,陈光辉,邓淑华,等.金莲花总黄酮抗菌作用的实验研究[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(6):207-210
LIU Ping, CHEN Guang-hui, DENG Shu-hua, et al. Study on antibacterial activity of flavonoids from Trollius ledebouri [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2013, 19(6): 207-210
- [5] 苏连杰,田鹤,马英丽.金莲花醇提物体内抗病毒作用的实验研究[J].中草药,2007,38(7):1062-1064
SU Lian-jie, TIAN He, MA Ying-li. Antiviral actions of the extracts of Trollius chinensis [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2007, 38(7): 1062-1064
- [6] 王如峰,糜迪,吴秀稳,等.金莲花中四种主要成分的抗炎活性研究[J].时珍国医国药,2012,23(9):2115-2116
WANG Ru-feng, MENG Di, WU Xiu-wen, et al. Anti-inflammatory activity of four major compounds from flowers of Trollius chinensis [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2012, 23(9): 2115-2116
- [7] Song J L, Zhao X, Yu Q, et al. Antioxidant and anticancer activities of methanolic extract of *Trollius chinensis* Bunge [J]. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2013, 7(17): 1015-1019
- [8] 邹晓蕾,刘礼崔,罗立新.细菌总RNA提取方法的比较[J].现代食品科技,2013,29(8):1948-1954
ZOU Xiao-lei, LIU Li-cui, LUO Li-xin. Comparison of different methods for total bacteria RNA extraction [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(8): 1948-1954
- [9] 孙颖桢,陈科力,刘震.翠云草总黄酮对结肠癌HT-29细胞COX-2 mRNA表达的抑制作用[J].中国药师,2010,23(2):163-164,168
SUN Ying-zhen, CHEN Ke-li, LIU Zhen. Inhibiting action of total flavones from *Selaginella uncinata* on COX-2 mRNA expression in HT-29 cells [J]. China Pharmacist, 2010, 23(2): 163-164, 168
- [10] 严兴耘,彭俊华,张华欣,等.槲皮素对结肠癌HT-29细胞增殖及周期的影响[J].世界华人消化杂志,2006,14(11):1071-1076
YAN Xing-yun, PENG Jun-hua, ZHANG Hua-xin, et al. Effects of quercetin on proliferation and cell cycle of colon carcinoma cell line HT-29 [J]. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi, 2006, 14(11): 1071-1076
- [11] 冯霞,罗敏,赵欣.虫茶对癌细胞生长和肿瘤转移抑制作用的研究[J].现代食品科技,2013,29(8):1898-1901,1905
FENG Xia, LUO Min, ZHAO Xin. Inhibitional effect of sandy tea on the carcinoma cells growth and tumor metastasis [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(8): 1898-1901, 1905
- [12] 丘振宇,王亚琴,许喜林.细胞凋亡的研究[J].现代食品科技,2007,23(2):101-105
QIU Zhen-yu, WANG Ya-qin, XU Xi-lin. The research of apoptosis [J]. Modern Food Science and Technology, 2007, 23(2): 101-105
- [13] Kraus S, Naumov I, Arber N. COX-2 active agents in the chemoprevention of colorectal cancer [M]. Recent Results in Cancer Research, 2013, 191: 95-103
- [14] Dixon D A, Blanco F F, Bruno A, et al. Mechanistic aspects of COX-2 expression in colorectal neoplasia [M]. Recent Results in Cancer Research, 2013, 191: 7-37