

姜黄素超分子包合物抑制 HepG2 肝癌细胞的增殖

庞芝萌, 彭莞仪, 赵浩, 荣利远, 陈建平

(广东海洋大学食品科技学院, 广东省亚热带果蔬加工现代农业科技创新中心, 广东湛江 524088)

摘要: 对姜黄素超分子包合物抑制 HepG2 肝癌细胞增殖的作用进行研究。采用 MTT 法考察不同浓度的姜黄素超分子包合物 (40~640 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理 HepG2 细胞不同时间 (24 h、48 h 和 72 h) 后对其细胞存活率的影响。然后, 采用流式细胞术和测定 Caspase 3/8/9 酶活来探讨姜黄素超分子包合物抑制 HepG2 细胞增殖的作用机理。实验结果表明, 随着姜黄素超分子包合物处理时间和浓度的增加, HepG2 细胞的存活率呈现出逐渐下降的趋势, 当处理时间为 72 h, 姜黄素超分子包合物浓度为 640 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 细胞的存活率达到最低为 $9.81\% \pm 1.00\%$ 。进一步的流式细胞术分析得知, HepG2 细胞内的凋亡细胞数目随着姜黄素超分子包合物浓度的增加而增加, 当细胞经 640 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 姜黄素超分子包合物处理 72 h 后, 其细胞内凋亡细胞的数目 (Sub-G1) 达到最高为 93.43%。通过对 Caspase 3/8/9 的酶活进行检测发现, Caspase 3/8/9 的酶活也是随着姜黄素超分子包合物浓度的增加而增加, 当 640 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 姜黄素超分子包合物处理细胞 72 h 后, Caspase 3/8/9 的酶活达到最大。进一步地 Western blot 实验结果也表明, 随着姜黄素超分子包合物浓度的增加, Caspase 3/8/9 的蛋白表达水平呈升高趋势。上述实验结果表明, 姜黄素超分子包合物是通过线粒体途径和死亡受体途径来诱导细胞发生凋亡从而抑制 HepG2 细胞增殖。

关键词: 姜黄素超分子包合物; HepG2 细胞; 细胞增殖

文章编号: 1673-9078(2019)03-21-25

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.3.004

Inhibition Effect of Curcumin / β -cyclodextrin Polymer Inclusion Complex on the Proliferation of HepG2 Hepatocellular Carcinoma Cells

PANG Yi-meng, PENG Guan-yi, ZHAO Hao, RONG Li-yuan, CHEN Jian-ping

(College of Food and Technology, Guangdong Ocean University, Guangdong Provincial Modern Agricultural Science and Technology Innovation Center for Subtropical Fruit and Vegetable Processing, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: In this paper, the inhibition effect of curcumin/ β -cyclodextrin polymer inclusion complex on the proliferation of HepG2 hepatocellular carcinoma cells was studied. MTT assay was used to investigate the effects of curcumin/ β -cyclodextrin polymer inclusion complex with the different concentrations (40~640 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and different periods of times (24 h, 48 h, and 72 h) on the cell viability of HepG2 cells. Then, the flow cytometry and measuring Caspase 3/8/9 activity were used to investigate the inhibiting mechanism of curcumin/ β -cyclodextrin polymer inclusion complex on the proliferation of HepG2 cells. The results showed that with the increase in the treatment times and concentrations of curcumin/ β -cyclodextrin polymer inclusion complex, the cell activity of HepG2 cells was gradually decreased. When the HepG2 cells were exposed to curcumin/ β -cyclodextrin polymer inclusion complex (640 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 72 h, the cell activity reached the lowest as $9.81\% \pm 1.00\%$. Further flow cytometry analysis revealed that with the increase in the concentration of curcumin/ β -cyclodextrin polymer inclusion complex, the number of apoptotic cells in HepG2 cells was gradually increased. When the cells were exposed to inclusion complex (640 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 72 h, the number of apoptotic cells (sub-G1) in HepG2 cells reached a maximum of 93.43%. The activity of Caspase 3/8/9 was also increased with the increasing concentration of curcumin/ β -cyclodextrin polymer inclusion complex. The activity of caspase3/8/9 reached the maximum after the cells was exposed to inclusion complex (640 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 72 h. The results of western blot also showed that the protein expression level of Caspase 3/8/9 increased with the increase of the curcumin/ β -cyclodextrin polymer inclusion complex concentration. The above results indicated that curcumin/ β -cyclodextrin polymer inclusion complex inhibited HepG2 cells proliferation

收稿日期: 2018-11-02

基金项目: 国家级大学生创新创业项目 (CXXL2017007); 国家自然科学基金青年科学基金项目 (21602034); 广东省自然科学基金博士启动项目 (2016A030310332); 广东海洋大学科研启动项目 (R17034)

作者简介: 庞芝萌 (1997-), 女, 本科, 研究方向: 天然产物活性物质及其生物利用

通讯作者: 陈建平 (1986-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 天然产物活性物质及其生物利用

through mitochondrial pathways and death receptor pathways to induce HepG2 apoptosis.

Key words: Curcumin/ β -cyclodextrin polymer inclusion complex; HepG2 cells; Cell proliferation

姜黄素是一种从姜黄植物的根茎部位提取出来的多酚类物质^[1]。研究表明,姜黄素是一种治疗癌症化学预防剂和化学治疗剂^[2,3]。体内外的实验也表明,姜黄素可以抑制多种肿瘤细胞的生长,包括人类急性粒细胞白血病细胞^[4],骨肉瘤细胞^[5],人肝癌细胞^[6],人肺腺癌的细胞^[7-9],前列腺癌细胞^[10,11]。然而,姜黄素存在不易溶于水、体内吸收差等缺点^[12],导致姜黄素难以发挥应有的生物活性,这也进一步地限制了姜黄素在食品、医药方面的应用。

为了解决姜黄素存在的问题,可以运用多种方法来提高姜黄素的水溶性和生物利用率,比如,将姜黄素制备成纳米粒子、脂质体、和各种环糊精包合物等^[13]。其中,最常用的是利用环糊精对姜黄素进行包埋制备得到姜黄素的包合物从而提高姜黄素的生物利用率。Zhang 等人研究发现采用环糊精包合姜黄素后可以显著提高姜黄素的抗肿瘤活性^[14]。同时,Yallapu 等人也发现,相比单独的姜黄素, β -环糊精与姜黄素形成的包合物具有更好的抗肿瘤效果^[15]。此外,Yadav 等人报道,采用环糊精包合姜黄素可以使其水溶性提高约 100 倍并且其抗炎和抗血管生成的活性都得到了显著提高^[16]。然而,考虑到环糊精本身水溶性低,因此本课题组前期将环糊精合成为水溶性高的环糊精聚合物,然后以环糊精聚合物作为药物载体对姜黄素进行负载制备得到姜黄素超分子包合物,发现姜黄素超分子包合物保留了姜黄素的抗氧化活性^[17]。然而,经过环糊精聚合物负载之后,姜黄素超分子包合物的抗肿瘤性能如何还并未可知,因此,本文选择 HepG2 细胞作为研究对象,考察姜黄素超分子包合物对 HepG2 细胞生长状态的影响,并进一步对其抑制细胞生长的作用机理进行探究。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

姜黄素超分子包合物,实验室自制;DMEM 培养基和 0.25%胰酶,购于美国 Gibco 公司;胎牛血清(FBS)购于美国 Hyclone 公司;四甲基偶氮唑盐(MTT)和二甲基亚砷(DMSO)购于美国 Sigma 公司;碘化丙啶(PI)染料,北京索莱宝科技有限公司;Caspase 3、Caspase 8 和 Caspase 9 试剂盒购于英国 Abcam 公司;BCA 试剂盒,购于南京凯基生物科技发展有限公司。

1.2 仪器与设备

MC0715 CO₂ 培养箱,日本 Sanyo 公司;SW-CJ-2FD 双人单面超净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;Varioskan flash 酶标仪,美国 Thermo 公司;FACSAria 流式细胞仪,美国 Waters 公司。

1.3 姜黄素超分子包合物的抗肿瘤活性测定

1.3.1 姜黄素超分子包合物的制备

参考陈建平^[17]等人的方法制备姜黄素超分子包合物。

1.3.2 细胞培养

HepG2 细胞复苏后培养在含 10%胎牛血清,100 U/mL 青霉素和 50 U/mL 链霉素的 DMEM 完全培养液中。细胞置于培养箱中培养(37 °C, 5% CO₂),根据细胞的生长状态传代,取对数生长期细胞用于以下实验。

1.3.3 MTT 法测定细胞存活率

参考 Zhao^[18]等人的方法进行实验。将 HepG2 细胞以密度为 2×10^4 个细胞/孔接种于 96 孔培养板,置于培养箱中(37 °C, 5% CO₂)培养 24 h。取不同浓度(40、80、160、320、640 $\mu\text{g/mL}$)姜黄素超分子包合物溶液 100 μL 作用于 HepG2 肝癌细胞,分别培养 24 h、48 h 和 72 h 后,往每个处理过的细胞培养孔中加入 5 mg/mL 20 μL MTT,放入 37 °C 培养箱中孵育 4 h,取出并去除上层清液,再给每孔加入 150 μL DMSO,摇床上震荡 10 min,待紫色结晶物充分溶解后,用酶标仪在 570 nm 处测定各孔 OD 值,将空白对照组的 OD 值设为 100%,计算不同处理组中的细胞存活率。

其中细胞存活率计算公式:

$$\text{细胞存活率}(\%) = A_i / A_0 \times 100\%$$

其中, A_i 表示不同处理组的 OD 值; A_0 表示空白对照组的 OD 值。

1.3.4 流式细胞术检测细胞周期

参考 Chen^[19]等人的方法进行实验。将细胞密度为 2×10^4 细胞/孔接种于 6 cm² 的培养皿中,培养 24 h 后,进行加药操作。其中对照组不加药,处理组加入不同浓度(20、40、80、160、320、640 $\mu\text{g/mL}$)的姜黄素超分子包合物溶液,培养箱培养 72 h 后,用 PBS 洗两次,加入 1 mL 75%的冰乙醇固定,置于 -20 °C 冰箱中。次日离心,加入 500 μL PI 工作液,置于 4 °C 冰箱中避光 20 min 后上机待测。

1.3.5 Caspase 酶活的检测

根据 Caspase 3/8/9 试剂盒说明书上的方法进行实验。取对数生长期的 HepG2 细胞,经胰酶消化、计数后,以 10×10^4 个细胞/孔接种于 10 cm 皿中,置于培养箱中 (37°C , $5\% \text{CO}_2$) 培养 24 h 后,分别按如下方式进行加药处理。其中,对照组不加药;姜黄素超分子包合物组加入不同浓度的姜黄素超分子包合物。放入培养箱培养 72 h 后,收集细胞,加入一定量的 RIPA 细胞裂解液,冰上孵育 1 h 后,在 11000 g 下离心 30 min,取上清液转移到新的 EP 管中。采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。分别向 96 孔荧光板中加入 Caspase 3/8/9 底物,每孔 $4 \mu\text{L}$,然后加入 $100 \mu\text{g}$ 蛋白样品,用 PBS 补至总体积 $160 \mu\text{L}$ /孔,置于 37°C 避光培养 1 h,用荧光酶标仪检测其荧光强度(激发波长为 380 nm ,发射波长为 460 nm),每个样品平行三次。

1.3.6 Western blot 检测 Caspase 3/8/9 的表达水平

用不同浓度的姜黄素超分子包合物处理 HepG2 细胞 72 h 后,收集细胞并用 RIPA 裂解液来裂解细胞,裂解后的细胞放入离心管内,12000 转离心 20 min,取上清液,用 BCA 蛋白定量试剂盒检测对照组和不同浓度姜黄素超分子包合物组的蛋白浓度。将定量裂解后的样品取 $100 \mu\text{L}$ 加入 5X 蛋白上样缓冲液 $25 \mu\text{L}$ 混匀,经电磁炉煮沸处理 15 min 后冷却待用。样品经 SDS-PAGE 电泳分离,电转至硝酸纤维素膜(110 V , 1 h),膜在室温下用 5% 脱脂牛奶孵育 2 h,用 TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。然后,加入 Caspase 3/8/9 一抗孵育 2 h, TBST 洗膜 5 次,每次 5 min。加入 HRP 标记的二抗,孵育 1 h, TBST 洗膜 5 次,每次 5 min。用 ECL 试剂盒进行化学发光,在 X 光片上显影 3 min,放入洗片机中洗片,观察结果,以 β -actin 作为内参。

1.3.7 统计分析

运用 Origin 8.0 软件对数据结果进行统计分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,其中 \bar{x} 为平均值, s 为标准差。

2 结果与分析

2.1 姜黄素超分子包合物对 HepG2 肝癌细胞生长的影响

首先,采取 MTT 方法来评价姜黄素超分子包合物对 HepG2 肝癌细胞存活率的影响,从而筛选出对 HepG2 细胞存活率影响最大的姜黄素超分子包合物浓度和作用时间。MTT,商品名为噻唑蓝,是一种还原显色剂,它与活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶反应后,自身被还原成不溶于水的紫色甲瓖^[20]。通过酶标

仪测定甲瓖溶液的吸光度,可以间接反映出活细胞的数量。实验结果如图 1 所示。由图 1 可知,当姜黄素超分子包合物处理 HepG2 细胞 24 h 后,随着姜黄素超分子包合物浓度 ($40 \sim 640 \mu\text{g/mL}$) 的升高,细胞存活率从 $95.30\% \pm 4.76\%$ 降低到 $33.70\% \pm 2.25\%$ 。当处理时间从 24 h 增加到 72 h 时,随着姜黄素超分子包合物浓度 ($40 \sim 640 \mu\text{g/mL}$) 的升高,细胞存活率从 $92.06\% \pm 2.01\%$ 降低到 $9.81\% \pm 1.00\%$ 。实验结果表明, HepG2 细胞存活率均随姜黄素超分子包合物浓度的升高和处理时间的增加呈下降趋势。当姜黄素超分子包合物的浓度为 $640 \mu\text{g/mL}$ 处理 HepG2 细胞 72 h 后,其细胞存活率达到最低为 $9.81\% \pm 1.00\%$ 。

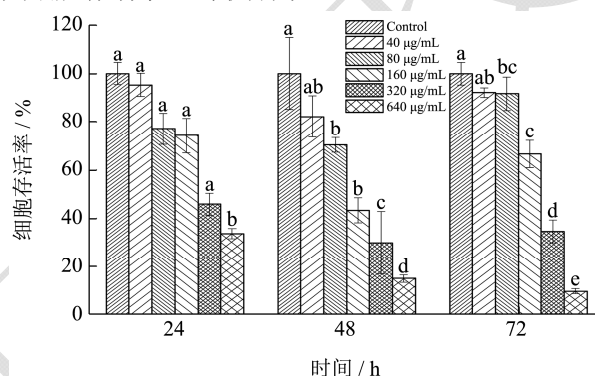


图 1 不同浓度的姜黄素超分子包合物处理 Hep G2 细胞不同时间对其细胞存活率的影响

Fig.1 Effects of curcumin/ β -cyclodextrin polymer inclusion complex with different concentrations and different periods of time on cell viability of HepG2 cells

注:不同字母表示统计学上显著性差异 ($p < 0.05$),相同字母表示统计学上没有显著性差异。图 2 同。

2.2 流式细胞术检测细胞凋亡

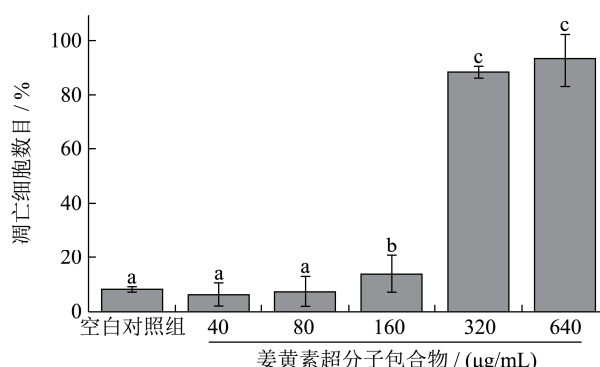


图 2 不同浓度的姜黄素超分子包合物对 HepG2 细胞凋亡数目的影响

Fig.2 Effects of different concentration of curcumin/ β -cyclodextrin polymer inclusion complex on population of apoptotic HepG2 cells

在肿瘤细胞中抑制肿瘤细胞增殖常常是通过诱导

细胞凋亡和/或诱导细胞周期阻滞来实现的^[21,22]。为了进一步阐明姜黄素超分子包合物抑制 HepG2 肿瘤细胞增殖的机理,采用流式细胞仪来考察不同浓度姜黄素超分子包合物对 Hep G2 细胞周期分布的影响。实验结果如图 2 所示。由图 2 可知,细胞凋亡的数目随着姜黄素超分子包合物浓度的增加呈现出增加的趋势,当 40 $\mu\text{g/mL}$ 姜黄素超分子包合物处理 HepG2 细胞 72 h 后,细胞凋亡数量(SubG1 峰)为 6.07%。当姜黄素超分子包合物的浓度提高到 640 $\mu\text{g/mL}$ 时,其细胞凋亡总数(SubG1 峰)从 6.07%提高到 93.43%。上述结果表明,姜黄素超分子包合物通过诱导细胞凋亡来抑制 HepG2 细胞增殖。

2.3 Caspase 酶活的测定

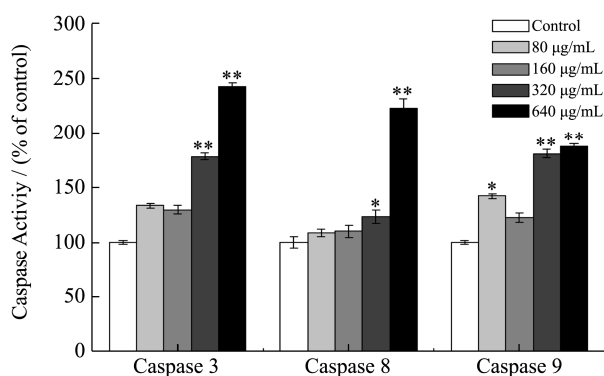


图3 不同浓度的姜黄素超分子包合物对 Caspase 家族蛋白活性的影响

Fig.3 Effects of different concentrations of curcumin/ β -cyclodextrin polymer inclusion complex on activity of Caspase family proteins

注:与对照组相比,差异显著用 $p < 0.05$ (*) 或 $p < 0.01$ (**) 表示。

研究表明,在引发细胞凋亡的过程中,外源性的线粒体途径和内源性的死亡受体途径参与了细胞凋亡的过程,共同调节细胞凋亡。而在这两条通路当中,Caspase 家族蛋白(一类半胱氨酸蛋白酶)都发挥了重要的作用,其中 Caspase 3 是这两条通路最后执行细胞凋亡的执行因子,而 Caspase 8 和 Caspase 9 分别是死亡受体通路和线粒体通路中的启动因子^[23,24]。因此,为了验证这一结论,进一步采用荧光光谱法对这两条通路中的关键性蛋白 Caspase 3/8/9 的活性进行检测,实验结果如下图 3 所示。由图 3 可知,Caspase 3/8/9 的活性随着姜黄素超分子包合物浓度的增加呈现出增加的趋势,呈现出良好的浓度依赖性。当姜黄素超分子包合物的浓度为 640 $\mu\text{g/mL}$ 时,Caspase 3/8/9 的活性均达到最高。上述结果表明,姜黄素超分子包合物诱导 HepG2 细胞凋亡是通过线粒体途径和死亡受体

途径来实现的。

2.4 姜黄素超分子包合物对 Caspase3/8/9 蛋白表达量的影响

为了验证上述结论,进一步采用 Western blot 方法来检测 Caspase 3/8/9 的蛋白表达量,实验结果如下图 4 所示。由图 4 可知,Caspase 3/8/9 的蛋白条带在经过姜黄素超分子包合物处理后明显变淡,说明 Caspase 3/8/9 被切割,切割后的 Caspase 3/8/9 活性增强。而且,从图 4 中可以看到 Caspase 3 的底物 PARP (分子量为 116 ku) 的蛋白条带随着姜黄素超分子包合物浓度的升高其条带逐渐变淡,说明其底物蛋白量在逐渐减少,而产物 Cleaved-PARP (分子量为 89 ku) 随着姜黄素超分子包合物浓度的升高其条带逐渐增强,表明其蛋白量逐渐增加,从而进一步验证了 Caspase 3 的活性在经过姜黄素超分子包合物处理后得到了明显的增强。上述结果表明,死亡受体通路和/或外源性的线粒体通路均参与了姜黄素超分子包合物诱导 HepG2 细胞凋亡。

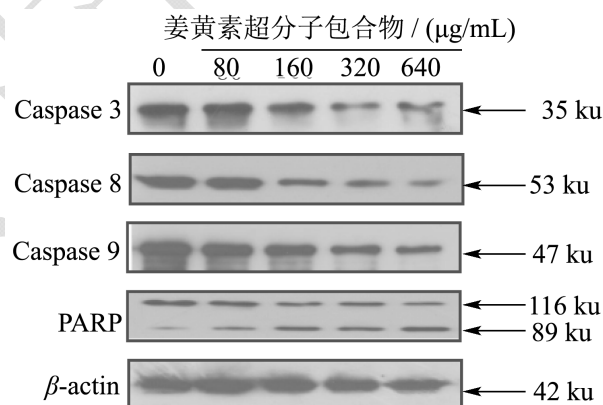


图4 不同浓度的姜黄素超分子包合物对 Caspase 3/8/9 蛋白表达量的影响

Fig.4 Effects of different concentrations of curcumin/ β -cyclodextrin polymer inclusion complex on the expression level of Caspase 3/8/9 proteins

3 结论

本实验采用 MTT 法测定了姜黄素超分子包合物对 HepG2 肝癌细胞存活率的影响,并运用流式细胞术和荧光酶标仪检测 Caspase 酶活来探究姜黄素超分子包合物抑制 HepG2 肝癌细胞增殖的机理。实验结果表明,经姜黄素超分子包合物处理 HepG2 细胞 72 h 后,能显著降低 HepG2 肝癌细胞的存活率,存活率仅为 $9.81\% \pm 1.00\%$,表明姜黄素超分子包合物具有较强的抗肿瘤活性效果。进一步的机理研究发现,姜黄素超

分子包合物是通过线粒体途径和死亡受体途径引发 HepG2 细胞凋亡来抑制 HepG2 增殖的。

参考文献

- [1] Ammon H P, Wahl M A. Pharmacology of *Curcuma longa* [J]. *Planta Med* 57: 1-7
- [2] Madden K, Flowers L, Salani R, et al. Proteomics-based approach to elucidate the mechanism of antitumor effect of curcumin in cervical cancer [J]. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 2009, 80(1): 9-18
- [3] Liu H, Liu Y Z, Zhang F, et al. Identification of potential pathways involved in the induction of cell cycle arrest and apoptosis by a new 4-arylidene curcumin analogue T63 in lung cancer cells: A comparative proteomic analysis [J]. *Molecular Biosystems*, 2014, 10(6): 1320-1331
- [4] Anto R J, Mukhopadhyay A, Denning K, et al. Curcumin (diferuloylmethane) induces apoptosis through activation of caspase-8, BID cleavage and cytochrome c release: Its suppression by ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xl [J]. *Carcinogenesis*, 2002, 23(1): 143-150
- [5] Chang Z, Xing J, Yu X. Curcumin induces osteosarcoma MG63 cells apoptosis via ROS/Cyto-C/Caspase-3 pathway [J]. *Tumour Biol.*, 2014, 35: 753-758
- [6] Chan W H, Wu H J, Hsuuw Y D. Curcumin inhibits ROS formation and apoptosis in methylglyoxal-treated human hepatoma G2 cells [J]. *Role of the Mitochondria in Human Aging and Disease: From Genes to Cell Signaling*, 2005, 1042: 372-378
- [7] Chen Q, Lu G, Wang Y, et al. Cytoskeleton disorganization during apoptosis induced by curcumin in A549 lung adenocarcinoma cells [J]. *Planta Medica*, 2009, 75(8): 808-813
- [8] Chen Q, Wang Y, Xu K, et al. Curcumin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma A₅₄₉ cells through a reactive oxygen species dependent mitochondrial signaling pathway [J]. *Oncology Reports*, 2010, 23(2): 397-403
- [9] Chen Q Y, Lu G H, Wu Y Q, et al. Curcumin induces mitochondria pathway mediated cell apoptosis in A₅₄₉ lung adenocarcinoma cells [J]. *Oncology Reports*, 2010, 23(5): 1285-1292
- [10] Deeb D, Jiang H, Gao X, et al. Curcumin sensitizes prostate cancer cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo2L by inhibiting nuclear factor-kappaB through suppression of ikappabalpha phosphorylation [J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2004, 3(7): 803-812
- [11] Deeb D D, Jiang H, Gao X, et al. Chemosensitization of hormone-refractory prostate cancer cells by curcumin to TRAIL-induced apoptosis [J]. *Journal of Experimental Therapeutics & Oncology*, 2005, 5(2): 81-91
- [12] Li M, Ma Y, Ngadi M O. Binding of curcumin to β -lactoglobulin and its effect on antioxidant characteristics of curcumin [J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(2): 1504-1511
- [13] 陈建平,余苗,秦小明,等.环糊精功能化修饰纳米银负载姜黄素的制备及其抗肿瘤活性[J].*食品科学*,2017, 38(21):38-42
- CHEN Jian-ping, YU Miao, QIN Xiao-ming, et al. Preparation and anticancer activity of cyclodextrin-functionalized curcumin-loaded silver nanoparticles [J]. *Food Science*, 2017, 38(21): 38-42
- [14] Zhang L L, Man S L, Qiu H N, et al. Curcumin-cyclodextrin complexes enhanced the anti-cancer effects of curcumin [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2016, 48: 31-38
- [15] Yallapu M M, Jaggi M, Chauhan S C. beta-Cyclodextrin-curcumin self-assembly enhances curcumin delivery in prostate cancer cells [J]. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2010, 79(1): 113-125
- [16] Yadav V R, Suresh S, Devi K, et al. Effect of cyclodextrin complexation of curcumin on its solubility and antiangiogenic and anti-inflammatory activity in rat colitis model [J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2009, 10(3): 752-762
- [17] 陈建平,彭莞仪,秦小明,等.姜黄素超分子包合物的结构鉴定及其抗氧化活性研究[J].*食品工业科技*,2017,38(21):1-10
- CHEN Jian-ping, PENG Guan-yi, QIN Xiao-ming, et al. Structural identification of curcumin/ β -cyclodextrin polymer inclusion complex and its antioxidant activity [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(21): 1-10
- [18] Zhao L, Chen J P, Su J Y, et al. *In vitro* antioxidant and antiproliferative activities of 5-Hydroxymethylfurfural [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(44): 10604-10611
- [19] Chen J P, Li L, Su J Y, et al. Synergistic apoptosis-inducing effects on A₃₇₅ human melanoma cells of natural borneol and curcumin [J]. *Plos one*, 2014, 9(6): e101277
- [20] Boncler M, Rozalski M, Krajewska U, et al. Comparison of prestoblu and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells [J]. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 2014, 69(1): 9-16

现代食品科技