

# 二氢杨梅素对骨肉瘤细胞增殖的抑制作用

陈庆, 贾强, 王欢, 李佳涵, 严静, 吴蓝洁, 李怡菲

(广州城市职业学院食品系, 广东广州 510405)

**摘要:** 本研究旨在探讨二氢杨梅素对骨肉瘤细胞增殖的抑制作用及其机制。采用 MTT 法检测不同浓度的二氢杨梅素溶液对骨肉瘤细胞增殖的抑制作用; 采用倒置显微镜、Hoechst 33258 荧光染色法和流式细胞术检测不同浓度的二氢杨梅素溶液对骨肉瘤细胞形态、凋亡和周期的影响; 并进一步采用 Western Blot 法分析细胞周期蛋白和凋亡蛋白表达的影响。研究结果表明二氢杨梅素对骨肉瘤细胞增殖具有显著的抑制作用, 细胞形态发生了明显变化, 呈显著的剂量依赖型, 其半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 值为  $24.41 \pm 1.25 \mu\text{M}$ 。细胞周期实验结果表明, 经二氢杨梅素处理后, G0/G1 期细胞数百分比从 60.20% 下降到 21.50%, 而 G2/M 细胞数百分比从 11.60% 增加到 45.30%, 细胞周期蛋白 Cyclin B1 表达下降引起细胞周期阻滞; 此外, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达和促凋亡蛋白 Bax 表达的比例显著下降, 从而诱导细胞发生凋亡。结果表明二氢杨梅素具有显著的抗骨肉瘤增殖活性, 可开发一种潜在的治疗骨肉瘤的功能食品或药物。

**关键词:** 二氢杨梅素; 骨肉瘤细胞; 抗增殖; 细胞周期; 凋亡

文章编号: 1673-9078(2020)11-36-41

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.11.0413

## Inhibitory Effect of Dihydromyricetin on the Proliferation of Osteosarcoma Cells

CHEN Qing, JIA Qiang, WANG Huan, LI Jia-han, YAN Jing, WU Lan-jie, LI Yi-fei

(Department of Food, Guangzhou City Polytechnic, Guangzhou 510405, China)

**Abstract:** In the present study, the inhibitory effect and mechanism of action of dihydromyricetin (DHM) on the proliferation of osteosarcoma cells were investigated. The inhibitory effects of DHM solutions at different concentrations on the proliferation of osteosarcoma cells were examined by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) method. The influences of DHM solutions at different concentrations on the cell morphology, apoptosis and cell cycle of osteosarcoma cells were examined by an inverted microscope, Hoechst 33258 fluorescent staining and flow cytometry. The expression levels of cell cycle- and apoptosis-related proteins were analyzed by Western Blot method. The results showed that DHM exhibited a significant inhibitory effect on the proliferation of osteosarcoma cells and caused changes in the cell morphology of osteosarcoma cells in a dose-dependent manner, with the half inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) value as  $24.41 \pm 1.25 \mu\text{M}$ . The results of cell cycle experiments showed that after the DHM treatment, the percentage of the cells at G0 phase to the cells at G1 phase (G0/G1) decreased significantly from 60.20% to 21.50%, whereas, the percentage of the cells at G2 phase to the cells at M phase increased from 11.60% to 45.30%, and the expression of cell cycle-related protein, Cyclin B1, decreased, causing the cell cycle arrest. In addition, the ratio of the expression of anti-apoptotic protein, Bcl-2, to the expression of pro-apoptotic protein, Bax, decreased, inducing apoptosis. These findings indicate that DHM has significant anti-proliferation activity against osteosarcoma cells, and may be a potential functional food or drug for the treatment of osteosarcoma.

**Key words:** dihydromyricetin; osteosarcoma cell; antiproliferation; cell cycle; apoptosis

引文格式:

陈庆, 贾强, 王欢, 等. 二氢杨梅素对骨肉瘤细胞增殖的抑制作用[J]. 现代食品科技, 2020, 36(11): 36-41

CHEN Qing, JIA Qiang, WANG Huan, et al. Inhibitory effect of dihydromyricetin on the proliferation of osteosarcoma cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(11): 36-41

收稿日期: 2020-05-05

基金项目: 广东大学生科技创新培育 (“攀登计划”) 专项资金项目 (pd.jh2019b0839)

作者简介: 陈庆 (1987-), 女, 硕士, 研究方向: 食品营养与检测

通讯作者: 贾强 (1977-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 药物化学

骨肉瘤 (osteosarcoma) 是目前人类骨科领域最常见的原发性恶性肿瘤, 起源于间充质细胞, 常发病于年龄 10-30 岁青少年, 因其有侵袭力强、早期转移、高度恶性和预后极差等特点, 严重危害了青少年的身体和精神健康<sup>[1]</sup>。一般的治疗方法是联合多种药物的

化疗和手术相结合,然而化疗中需要的药物剂量多、毒副作用大和医疗费用高,并且有相当多患者对化疗药物的不敏感和产生的耐药性,但骨肉瘤患者术后5年的生存率仅有60%~70%<sup>[2]</sup>。因此,寻找天然具有抗骨肉瘤的活性化合物代替传统药物,避免化疗耐药性,并制定新的治疗策略才有可能突破提高骨肉瘤患者生存率的瓶颈。

藤茶又称白茶、莓茶,主要分布在我国长江流域以南,是葡萄科蛇葡萄属植物显齿蛇葡萄的嫩茎叶加工而成,其主要有效成分为黄酮类化合物,并以二氢杨梅素含量为最高,约占藤茶干和叶干重的15%~20%,是目前国内外发现的二氢黄酮类化合物中大体含量最高的植物。现代药理学研究发现二氢杨梅素(dihydromyricetin, DHM)具有显著的抗氧化、抗肿瘤、解酒、消炎、抗血栓等多种药理活性,极具开发和应用潜力<sup>[3-7]</sup>。此外,研究表明二氢杨梅素因其低毒高效、对增强化疗药物敏感性等特性而在抗肿瘤应用方面深受重视<sup>[8]</sup>。当前国内外许多研究表明二氢杨梅素对乳腺癌、胃癌、肝癌、肺癌等多种癌细胞都表现出较强的抑制作用,可开发一种有潜力的抗癌药物<sup>[5,6]</sup>。然而,目前关于二氢杨梅素骨肉瘤的抑制作用及其机制尚不清楚,本文研究了二氢杨梅素对骨肉瘤细胞的抑制作用,并对其机制进行了初步探讨,以期为开发新型的抗骨肉瘤增殖的食品功能因子或药物提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

二氢杨梅素(DHM,纯度大于98%)来自贵州省生物研究所;普通骨肉瘤细胞(U2OS),购自美国模式培养物寄存库(ATCC);噻唑蓝(MTT)、Hoechst 33258 细胞核染色试剂盒、胰蛋白酶-EDTA 和 BCA 蛋白质检测试剂盒,购自美国 Sigma-Aldrich 公司;胎牛血清,购自 Hyclone 公司;DMEM 培养基、PBS、青霉素-链霉素购自美国 Gibco 公司;胰蛋白酶,购自上海生工生物公司;溴化丙啶(PI),购自美国 ICN 公司;Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒,购自 eBioscience 公司。

### 1.2 仪器与设备

微量加样器、细胞培养板,德国 Eppendorf 公司;超净工作台和酶标仪,美国 Holten 公司和 Bio-Rad 公司;细胞培养箱,美国 Thermo 公司;倒置显微镜 BH-2,日本 Olympus 公司;倒置荧光显微镜 Leica DMIRB,

日本 Nikon 公司;多功能酶标仪 Varioskan Flash,美国 Bio Tek 公司;流式细胞仪 Cytomics FC 500,美国 BD Biosciences 公司。

### 1.3 细胞培养

培养在含有10%胎牛血清,100 μg/mL 链霉素和100 U/mL 青霉素的 DMEM 培养液中,于37℃、5% CO<sub>2</sub>、湿度饱和的细胞培养箱里常规培养,每2~3 d 更换1次培养液,到细胞生长到培养瓶80%~90%面积时,用胰蛋白酶-EDTA 溶液消化后,进行传代培养。

### 1.4 细胞活性测定

采用 MTT 法研究 DHM 对骨肉瘤细胞的细胞增殖的影响<sup>[9]</sup>。首先将处于生长对数期的骨肉瘤细胞 U2OS 配成细胞悬液,调整细胞浓度为  $5 \times 10^4$  个/mL,按每孔 100 μL 的细胞悬液接种于 96 孔细胞培养板上,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 24 h,然后弃去培养液,每孔依次加入 100 μL 不同浓度的 DHM 溶液(15、30、60、120 和 240 μM),以不含样品的 DMEM 完全培养基为空白对照,每个浓度有 3 个复孔,置于细胞培养箱中继续孵育 72 h。然后向每孔中加入 50 μL 的 MTT 溶液(1 mg/mL),置于培养箱中继续孵育 4 h 后,小心弃去细胞培养液,并用 100 μL PBS 溶液洗涤 1 次,随后向每孔中加入 150 μL 的 DMSO 溶液,用铝箔片包裹,放在平板摇床上振荡 10 min,置于多功能酶标仪中测定在 490 nm 波长下的吸光度(OD)值。根据样品组的 OD 值与对照组的 OD 值的比值,计算细胞的存活率,并以 Bliss 法计算抑制细胞生长达 50% 时的药物浓度,以 IC<sub>50</sub> 值表示。

### 1.5 细胞形态分析

将细胞悬液按  $5 \times 10^3$  个/孔的细胞密度接种于 6 孔细胞培养板上,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养 24 h,待细胞贴壁后弃去培养液,每孔加入 1 mL 不同浓度的 DHM 溶液(30、60 和 120 μM),继续孵育 48 h,然后置于倒置光学显微镜下,观察细胞形态变化并采集图像,放大倍数为 200 倍。

### 1.6 Hoechst 33258 染色分析

采用 Hoechst 33258 染色法观察凋亡细胞核的形态变化<sup>[10]</sup>。将骨肉瘤细胞以  $2 \times 10^5$  个/孔的密度接种于带玻片的 6 孔细胞板中,培养 24 h。细胞贴壁后弃去培养液,加入不同浓度的 DHM 溶液(30、60 和 120 μM),继续培养 24 h 后,弃去细胞上清液,加入 1 mL 甲醇固定液,在 4℃ 下固定 10 min,用 1 mL PBS 溶

液清洗 2 次, 再加一滴 Hoechst 33258 染色液 (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 染色, 室温暗处染色 5 min, 用 PBS 漂洗 2 次, 每次 3~5 min, 在紫外光的激发下, 用荧光显微镜进行细胞核形态观察, 并摄片。

### 1.7 细胞周期分析

采用流式细胞术分析 DHM 对骨肉瘤细胞的细胞周期的影响<sup>[11]</sup>。将骨肉瘤细胞以  $2 \times 10^5$  个/孔的密度接种于带玻片的 6 孔细胞板中培养 24 h, 待细胞贴壁后弃去培养液, 分别加入 3 mL 不同浓度的 DHM 溶液 (15、30 和 60  $\mu\text{M}$ ), 对照组加入 3 mL 新鲜培养基, 置于细胞培养箱中培养 24 h。然后经 0.25% 胰蛋白酶消化后, 转入离心管中, 于 1200 r/min 条件下离心 5 min, 弃去上清液, 用 4 mL PBS 溶液洗涤 2 次, 于 1500 r/min 下离心 5 min 后, 弃去 PBS 溶液, 加入 700  $\mu\text{L}$  冰冷的 80% 乙醇进行固定细胞, 置于 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下存放一夜; 用 4 mL 的 PBS 溶液重悬细胞 5 min, 离心后, 去掉 PBS 上清液, 用 1 mL 溴化丙啶 (PI) 染色 5 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  避光条件下放置 30 min 后, 经流式细胞仪检测细胞中的 DNA 含量, 设置波长为 488 nm, 最后, 用 LYSIS 软件进行数据处理和分析。

### 1.8 Western Blot 分析

采用 Western Blot 法检测 DHM 对细胞相关蛋白表达的影响<sup>[12]</sup>。采用不同浓度的 DHM 溶液 (15、30 和 60  $\mu\text{M}$ ) 处理骨肉瘤细胞 12 h 后, 胰酶消化收集适量细胞, 细胞在裂解液的作用下提取蛋白, 离心收集上清液, 用 BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度; 将等量的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳、转膜到 PVDF 膜上, 5% 的 BSA 封闭 2 h 后, 再通过 I 抗、II 抗反应, 使用增强的化学发光系统可视化蛋白质, 并采用化学发光试剂盒定量分析蛋白相对表达水平。

### 1.9 数据处理

所以结果数据都以平均值 (mean)  $\pm$  标准差 (SD) 表示, 组间差异并采用 SPSS 13.0 软件进行方差分析 (one-way ANOVA) 和 Duncan 检验进行差异显著性分析 ( $p < 0.05$ )。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同浓度 DHM 对骨肉瘤细胞存活率的影响

影响

不同浓度的 DHM 对骨肉瘤细胞 U2OS 的抑制作

用从图 1 所示, 在实验浓度范围内, 不同浓度的 DHM 对骨肉瘤细胞作用 72 h 后均产生了抑制作用, 其细胞存活率随药物浓度的增高而降低, 呈明显的剂量依赖关系, 当 DHM 处理浓度为 240  $\mu\text{M}$ , 细胞存活率迅速下降到 5% 左右, 其半数抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$ ) 值为 24.41  $\mu\text{M}$ 。尹梅梅等<sup>[13]</sup>研究报道了二氢杨梅素对人肺腺癌 AGZY-83-a 的增殖有明显的抑制作用, 并呈剂量和时间依赖关系, 当样品处理浓度为 200  $\mu\text{M}$ , 其抑制率为 39.10%。陈恩就等<sup>[14]</sup>研究发现二氢杨梅素 (25~200 mM) 可有效抑制体外肺癌细胞 PC9 和 H1299 活力, 呈浓度以来关系, 当处理浓度为 200 mM, 其抑制率约 50%。因此, 相比其它癌细胞, DHM 表现出较显著的抗骨肉瘤增殖活性。

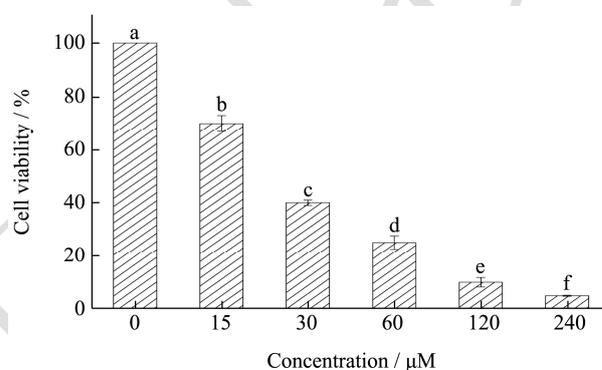


图 1 不同浓度的 DHM 对骨肉瘤细胞增殖的抑制活性

Fig.1 Inhibitory activity of different concentrations of DHM on the proliferation of osteosarcoma cells

### 2.2 不同浓度 DHM 对骨肉瘤细胞形态学的影响

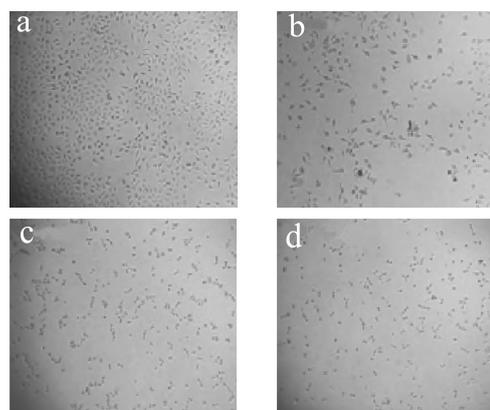


图 2 不同浓度的 DHM 对骨肉瘤细胞形态的影响

Fig.2 Effect of different concentrations of DHM on the morphology of osteosarcoma cells

注: a: 对照组; b: 30  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ; c: 60  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ; d: 120  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。

采用光学显微镜观测 DHM 对骨肉瘤细胞 U2OS 形态学变化的影响, 结果如图 2 所示。可以看出, 空

白对照组中骨肉瘤细胞的贴壁生长良好，细胞之间的间隙比较小，形态比较均一，生长形态呈胖三角团簇状，具有良好的增殖能力。随着处理骨肉瘤细胞的二氢杨梅素浓度的逐渐增大，细胞逐渐固缩变圆，细胞之间的间隙也显著地增大，细胞的贴壁生长能力降低，同时其增殖能力也有明显的下降趋势，样品处理组的细胞密度同空白对照组相比之下，亦明显的减少，出现典型的凋亡小体，在 120  $\mu\text{M}$  处理组，培养基中出现大量的细胞死亡碎片，这与上述细胞存活率的实验结果一致。

### 2.3 不同浓度 DHM 对骨肉瘤细胞核形态的影响

Hoechst 33258 染色剂是一种特异性 DNA 荧光染料，通过显微镜观察，经染色处理后的细胞，由于染色质的凝聚而导致了凋亡细胞被深层染色，可较清晰地看见有高强度的蓝色颗粒状荧光亮点，以及一些细胞核碎裂而出现的凋亡小体，属于骨肉瘤细胞凋亡过程中的典型特征，而在一般的细胞核形态里，其核显现出均匀而离散状的荧光<sup>[9]</sup>。如图 3 所示，骨肉瘤细胞经 DHM 溶液处理后，Hoechst 33258 染色可见骨肉瘤细胞的染色质显现出集聚皱缩，由于凝块而出现细胞凋亡现象，当 DHM 处理浓度为 120  $\mu\text{M}$ ，细胞出现核裂解、皱缩变圆、深度染色的凋亡细胞核，出现明显的凋亡小体，这些现象表明 DHM 能够有效地诱导骨肉瘤细胞发生凋亡。

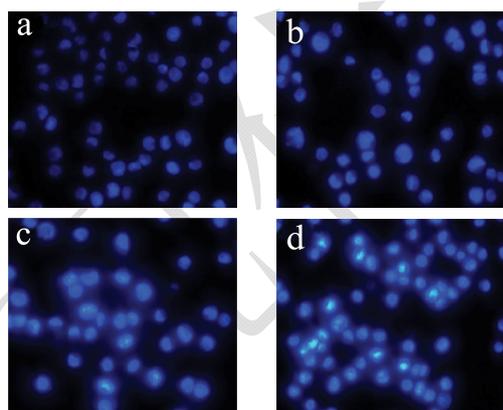


图 3 不同浓度的 DHM 对骨肉瘤细胞核形态的影响

Fig.3 Effect of different concentrations of DHM on the nuclear morphology of osteosarcoma cells

注：a: Control; b: 30  $\mu\text{M}$ ; c: 60  $\mu\text{M}$ ; d: 120  $\mu\text{M}$ 。

### 2.4 不同浓度 DHM 对骨肉瘤细胞周期分布的影响

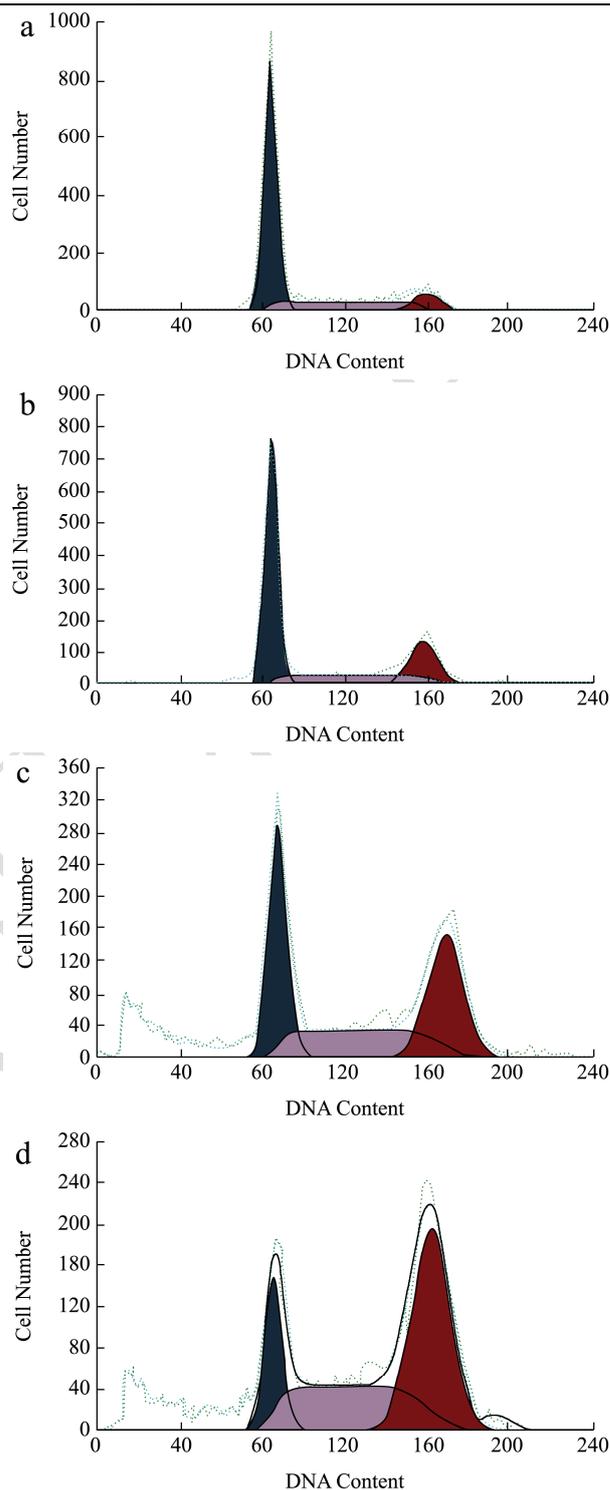


图 4 不同浓度的 DHM 对骨肉瘤细胞周期阻滞的影响

Fig.4 Effect of different concentrations of DHM on the cell cycle arrest of osteosarcoma cells

注：a: Control; b: 15  $\mu\text{M}$ ; c: 30  $\mu\text{M}$ ; d: 60  $\mu\text{M}$ 。

通过 PI 染色法对骨肉瘤细胞 U2OS 进行染色后，采用流式细胞术分析不同浓度的 DHM 处理对骨肉瘤细胞周期的细胞数量及相对百分含量的影响，结果如图 4 和表 1 所示。可以看出，随着 DHM 浓度的增加，G0/G1 期细胞数百分比从对照组 60.20%降低到

21.50%，而 G<sub>2</sub>/M 细胞数百分比从 11.60%增加到 45.30%，且呈剂量依赖型。在乳腺癌细胞、结肠癌细胞等其它类型癌细胞研究中，发现二氢杨梅素可以诱导其周期阻滞在 G<sub>2</sub>/M 期，并表现明显的细胞凋亡现象<sup>[15]</sup>。这结果表明 DHM 处理骨肉瘤细胞，可诱导其周期阻滞在 G<sub>2</sub>/M 期，阻止细胞有丝分裂的进程从而抑制细胞的增殖<sup>[16]</sup>。

表 1 不同浓度的 DHM 影响骨肉瘤细胞周期分布结果

Table 1 Effect of different concentrations of DHM on the cell cycle phase distribution of osteosarcoma cells

DHM/ $\mu$ M	G0/G1	G2/M	S
Control	60.20 $\pm$ 5.40 <sup>a</sup>	11.60 $\pm$ 2.30 <sup>a</sup>	28.20 $\pm$ 4.10 <sup>a</sup>
15	58.70 $\pm$ 5.70 <sup>a</sup>	20.50 $\pm$ 3.10 <sup>b</sup>	20.80 $\pm$ 6.40 <sup>b</sup>
30	39.30 $\pm$ 1.10 <sup>b</sup>	36.40 $\pm$ 4.10 <sup>c</sup>	24.30 $\pm$ 4.20 <sup>c</sup>
60	21.50 $\pm$ 3.70 <sup>c</sup>	45.30 $\pm$ 7.20 <sup>d</sup>	33.20 $\pm$ 4.40 <sup>d</sup>

注：同列数值上标注不同小写字母表示显著性差异 ( $p < 0.05$ )。

## 2.5 不同浓度 DHM 对骨肉瘤细胞周期相关蛋白 Cyclin B1 和 p34cdc-2 表达的影响

### 白 Cyclin B1 和 p34cdc-2 表达的影响

采用 Western Blot 进一步检测细胞周期相关蛋白 cyclin B1 和 p34<sup>cdc-2</sup> 的表达。如图 5 所示，不同浓度 DHM 作用于骨肉瘤细胞 12 h 后，随着浓度的增加，cyclin B1 的表达量显著降低，呈良好的量效关系，当处理样品浓度增加到 60  $\mu$ M 时，与对照组相比，cyclin B1 蛋白相对表达量下降了 1.40 倍，而 p34<sup>cdc-2</sup> 的表达量没有明显改变。细胞周期蛋白 B (cyclin B1) 是调节细胞周期活性的重要蛋白，能够促进 G<sub>2</sub>/M 期转换的分裂期周期蛋白，且能调控 p34<sup>cdc-2</sup> 蛋白活性<sup>[17]</sup>。因此，结果表明 DHM 通过降低 Cyclin B1 的表达量，并阻止 p34<sup>cdc-2</sup> 蛋白的激活，从而抑制骨肉瘤细胞 G<sub>2</sub>/M 期阻滞，从而促进细胞凋亡。

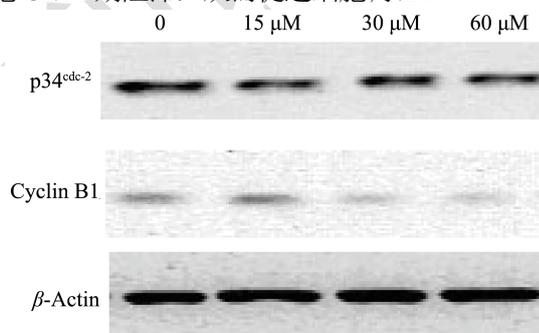


图 5 不同浓度的 DHM 对细胞周期蛋白 Cyclin B1、p34cdc-2 的表达影响

Fig.5 Effect of different concentrations of DHM on the expression of cell cycle proteins

## 2.6 不同浓度 DHM 对骨肉瘤细胞凋亡蛋白

### Bax 和 Bcl-2 的影响

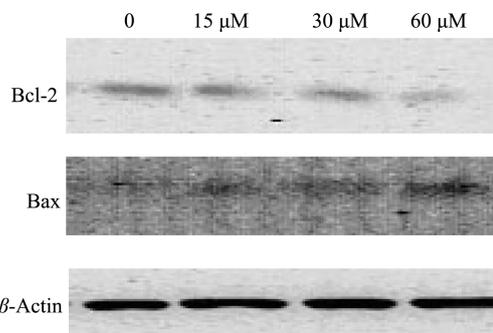


图 6 不同浓度 DHM 对凋亡蛋白 Bax、Bcl-2 表达水平的影响

Fig.6 Effect of different concentrations of DHM on the expression levels of apoptotic proteins

采用 Western Blot 分析 DHM 处理对骨肉瘤细胞凋亡蛋白 Bax、Bcl-2 表达的影响。Bcl-2 家族蛋白是调控细胞凋亡最常见的蛋白之一，包括抗凋亡蛋白 Bcl-2、Bcl-X<sub>L</sub>、Mcl-1 和促凋亡蛋白 Bax、Bak、Bad 和 Bim。因此，抑制促凋亡蛋白 Bcl-2 的表达和促进凋亡蛋白 Bax 的表达，可使肿瘤细胞发生凋亡<sup>[18]</sup>。如图 6 所示，不同剂量的 DHM 作用于骨肉瘤细胞 12 h 后，Bcl-2 蛋白的表达量显著降低，而 Bax 蛋白的表达量显著增加，并呈剂量依赖型，当处理样品浓度增加到 60  $\mu$ M 时，与对照组相比，Bax 蛋白的相对表达量增加了 1.70 倍，而 Bcl-2 蛋白的相对表达量降低了 1.50 倍。因此，DHM 通过降低了 Bcl-2/Bax 的比例，使得促凋亡蛋白发挥了主要作用，从而诱导骨肉瘤细胞凋亡。

## 3 结果

DHM 可显著抑制骨肉瘤细胞增殖，呈剂量依赖型，其 IC<sub>50</sub> 值为 24.41 $\pm$ 1.25  $\mu$ M；流式细胞术和 Western Blot 分析结果表明 DHM 能够降低细胞周期蛋白 Cyclin B1 的表达量，并阻止 p34cdc-2 蛋白的激活，从而抑制骨肉瘤细胞 G<sub>2</sub>/M 期阻滞；此外，DHM 能显著抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达和增加促凋亡蛋白 Bax 表达。这些结果表明 DHM 通过诱导细胞 G<sub>2</sub>/M 期阻滞，抑制 Bcl-2 表达和促进 Bax 蛋白表达，从而诱导细胞凋亡。总之，这些结果表明 DHM 对骨肉瘤细胞有显著的抑制作用，可能是骨肉瘤患者潜在的功能性食品或临床药物，未来可进一步研究其在体内对骨肉瘤的影响。

### 参考文献

- [1] Lindsey B A, Markel J E, Kleinerman E S. Osteosarcoma overview [J]. *Rheumatology and Therapy*, 2017, 4(1): 25-43
- [2] 刘江川, 黄海汛, 江洋, 等. 大黄酸通过抑制 STAT3 基因的表达调控骨肉瘤细胞的增殖和凋亡[J]. *现代肿瘤医学*, 2020, 28(10): 1624-1629
- LIU Jiang-chuan, HUANG Hai-xun, JIANG Yang, et al. Rhein regulates proliferation and apoptosis of osteosarcoma cells by inhibiting the expression of STAT3 gene [J]. *Modern Oncology*, 2020, 28(10): 1624-1629
- [3] 陈亚丽, 尹跃霏, 李赞, 等. 二氢杨梅素药理作用研究进展[J]. *中国新药杂志*, 2019, 28(2): 173-178
- CHEN Ya-li, YIN Yue-fei, LI Yun, et al. Advances in pharmacological study of dihydromyricetin [J]. *Chinese Journal of New Drugs*, 2019, 28(2): 173-178
- [4] 谢蓉蓉, 孙福强. 天然产物二氢杨梅素的研究进展[J]. *广东药科大学学报*, 2019, 35(3): 470-474
- XIE Rong-rong, SUN Fu-qiang. Progress in research and utilization of natural product dihydromyricetin [J]. *Journal of Guangdong Pharmaceutical University*, 2019, 35(3): 470-474
- [5] Ji F J, Tian X F, Liu X W, et al. Dihydromyricetin induces cell apoptosis via a p53-related pathway in AGS human gastric cancer cells [J]. *Genetics and Molecular Research*, 2015, 14(4): 15564-15571
- [6] HUANG Xiao-jie, LIAN Tian-ming, GUAN Xiao-qian, et al. Dihydromyricetin reduces TGF-beta via P53 activation-dependent mechanism in hepatocellular carcinoma HepG2 cells [J]. *Protein and Peptide Letters*, 2017, 24(5): 419-424
- [7] LIAO Wen-zhen, NING Zheng-xiang, MA Ling, et al. Recrystallization of dihydromyricetin from *Ampelopsis grossedentata* and its anti-oxidant activity evaluation [J]. *Rejuvenation Research*, 2014, 17(5): 422-429
- [8] ZHU Hong, LUO Pei-hua, FU Ying-ying, et al. Dihydromyricetin prevents cardiotoxicity and enhances anticancer activity induced by adriamycin [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(5): 3254-3267
- [9] LI Chao, HUANG Qiang, XIAO Jie, et al. Preparation of *Prunella vulgaris* polysaccharide-zinc complex and its antiproliferative activity in HepG2 cell [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 91: 671-679
- [10] MA Lei, XU Guanying-bianca, TANG Xin-yu, et al. Anti-cancer potential of polysaccharide extracted from hawthorn (*Crataegus*) on human colon cancer cell line HCT116 via cell cycle arrest and apoptosis [J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 64: 103677
- [11] WEN Ling-rong, YOU Li-jun, YANG Xiao-man, et al. Identification of phenolics in litchi and evaluation of anticancer cell proliferation activity and intracellular antioxidant activity [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2015, 84: 171-184
- [12] ZHAO Zhi-qiang. Downregulation of MCT1 inhibits tumor growth. metastasis and enhances chemotherapeutic efficacy in osteosarcoma through regulation of the NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Cancer Letters*, 2014, 342(1): 150-158
- [13] 尹梅梅, 潘振伟, 蔡本志, 等. 二氢杨梅素诱导人肺腺癌细胞系 AGZY-83-a 凋亡的实验研究[J]. *中国药理学通报*, 2008, 24(5): 626-630
- YIN Mei-mei, PAN Zhen-wei, CAI Ben-zhi, et al. Dihydromyricetin induce apoptosis in AGZY-83-a tumor cells [J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2008, 24(5): 626-630
- [14] 陈恩就, 周方联, 陈胜, 等. 二氢杨梅素通过 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路抑制肺癌干细胞的研究[J]. *浙江中西医结合杂志*, 2020, 30(4): 291-297
- CHEN En-jiu, ZHOU Fang-lian, CHEN Sheng, et al. Dihydromyricetin inhibits lung cancer stem cells via Wnt/ $\beta$ -catenin pathway [J]. *Zhejiang Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine*, 2020, 30(4): 291-297
- [15] 李明, 张卫星, 袁璐. 二氢杨梅素对乳腺癌细胞 MCF-7 增殖、凋亡的影响[J]. *国际检验医学杂志*, 2017, 38(13): 1762-1764
- LI Ming, ZHANG Wei-xing, YUAN Lu. Effect of dihydromyricetin on proliferation and apoptosis of breast cancer MCF-7 cells [J]. *International Journal of Laboratory Medicine*, 2017, 38(13): 1762-1764
- [16] BAI Yang, QU Xiao-yuan, YIN Jun-qiang, et al. Methyl protodioscin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in A549 human lung cancer cells [J]. *Pharmacognosy Magazine*, 2014, 10(39): 318-324
- [17] Moon S J, Kim J H, Kong S H, et al. Protein expression of Cyclin B1, transferrin receptor, and fibronectin is correlated with the prognosis of adrenal cortical carcinoma [J]. *Endocrinology and Metabolism*, 2020, 35(1): 132-141
- [18] CHEN Hui-chen, Kanai M, Inoue-Yamauchi A, et al. An interconnected hierarchical model of cell death regulation by the BCL-2 family [J]. *Nature Cell Biology*, 2015, 17(10): 1270-1281