

万寿菊茎叶中 2 种黄酮类化合物的体外抗肿瘤活性

张宇*, 曲佐寅, 刘立新, 李锦莲, 刘世娟

(佳木斯大学药学院 黑龙江省生物药制剂重点实验室, 黑龙江 佳木斯 154007)

[摘要] **目的:** 研究万寿菊茎叶中两种黄酮类化合物 4'-甲氧基-泽兰素-3-O-β-D-葡萄糖苷(化合物 I) 和山柰酚-3,7-O-α-L-双鼠李糖苷(化合物 II) 的抗肿瘤活性。**方法:** 人胃癌细胞 SGC7901 与人肝癌细胞 SMMC7721 经 20, 40, 80, 120, 160 μmol·L⁻¹ 的两种化合物作用 24, 48, 72 h 后, 使用 MTT 法测定抑制率, 并以 5-氟脲嘧啶作为阳性对照。使用吖啶橙/溴化乙锭双荧光染色法观察浓度为 160 μmol·L⁻¹ 的两种化合物作用于细胞密度为 1 × 10⁶ 个/mL 的 2 种肿瘤细胞 48 h 细胞形态学变化及细胞凋亡情况。**结果:** 不同浓度的两种黄酮类化合物均可抑制人胃癌细胞 SGC7901 和人肝癌细胞 SMMC7721 的增殖, 且呈现浓度与时间依赖性。化合物 I 作用这 2 种癌细胞 48 h 的半数抑制浓度(IC₅₀) 分别为 111.7, 330.4 mg·L⁻¹。化合物 II 作用这两种癌细胞 48 h 的 IC₅₀ 分别为 683.8, 464.7 mg·L⁻¹。2 种化合物作用肿瘤细胞后细胞形态发生改变, 并有部分细胞发生凋亡。**结论:** 万寿菊茎叶中分离的 2 种黄酮类化合物具有体外抗肝癌和胃癌活性。

[关键词] 万寿菊; 黄酮; MTT 法; 荧光染色法

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0233-05

[doi] 10.11653/syfy2013130233

Anti-cancer Activity of Two Flavonoids in Leaf and Stem of *Tagetes erecta*

ZHANG Yu*, QU Zuo-yin, LIU Li-xin, LI Jin-lian, LIU Shi-juan

(Heilongjiang Province Key Laboratory of Biological Medicine Formulation,
College of Pharmacy, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China)

[Abstract] **Objective:** To study the anti-cancer activity of two flavonoids 4'-methoxy-eupatolitin-3-O-β-D-glucoside (compound I) and kaempferol-3, 7-O-α-L-di-rhamnoside (compound II) in the leaf and stem of

[收稿日期] 20121130(009)

[通讯作者] *张宇, 硕士, 教授, 从事天然药物活性成分分离及药效毒理学研究, Tel:0454-8610678, E-mail:zhangyu_1964@163.com

[参考文献]

- [1] 张锐. 鸡峰普济方[M]. 影印本. 上海:上海科学技术出版社, 1987:424.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:322.
- [3] 余旭东, 杨季菱. 茜草与茜草炭药理作用比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(9):53.
- [4] 高学敏. 中药学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2007:298, 371.
- [5] 周祯祥. 咳嗽用药举要[J]. 湖北中医杂志, 2002, 24(5):35.
- [6] 柳佳, 商品, 张丽, 等. 基于中医辨证用药特点建立大鼠血热出血模型[J]. 中国药理学通报, 2012, 28

- (9):1319.
- [7] 何希瑞, 樊鹏程, 李茂星, 等. 常用止血中药及其止血机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(15):217.
- [8] 王剑, 徐丹洋, 陈佩东, 等. 黄芩炭对血热出血大鼠止血有效部位研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11):153.
- [9] 李毅, 刘壮志. 临床血液流变学检测与指标变化[J]. 黄石理工学院学报, 2006, 22(1):19.
- [10] 孙朝晖, 李林海, 石玉玲, 等. 血液流变学检测中血浆纤维蛋白原浓度对血浆黏度的影响[J]. 实用医学杂志, 2006, 22(23):2798.

[责任编辑] 聂淑琴]

Tagetes erecta. **Method:** SGC7901 and SMMC7721 cells were treated by 20, 40, 80, 120, 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ two flavonoids for 24, 48, 72 h, MTT assay was used to determine the inhibition rates, and 5-FU was used as positive control. AO/EB double fluorescent staining was used to observe the changes of cell morphology and the apoptosis of tumor cells at the concentration of $1\times 10^6/\text{mL}$ after treated with 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of two flavonoids for 48 h. **Result:** The different concentrations of two flavonoids could both inhibit the proliferation of SGC7901 and SMMC7721 in the time-and dose-dependent manner. The IC_{50} of compound I was 111.7 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and 330.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. The IC_{50} of compound II was 683.8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and 464.7 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. The morphology of two tumor cancer cells was changed after treated by two compounds, and part of them emerged apoptosis. **Conclusion:** Two flavonoids separated from the leaf and stem of *T. erecta* have the activity of anti-liver cancer and anti-gastric cancer *in vitro*.

[**Key words**] *Tagetes erecta*; flavonoid; MTT; fluorescence staining

恶性肿瘤是当前严重影响人类健康,威胁人类生命最常见的疾病之一。临床中常用的化学药物因其毒副作用大使其在临床应用中受到一定的限制。因此,开发出毒副作用小的抗肿瘤药物一直是医药界科研工作者不懈追求的目标。黄酮类化合物(flavonoids)是广泛存在于自然界中的一类多酚类化合物,其广泛分布于天然药物、蔬菜和水果中,具有保护心血管系统、抗菌及抗病毒、抗肿瘤^[1]、抗氧化自由基^[2]、抗炎、镇痛活性、保肝等多种生物活性^[3]。其中黄酮类化合物的抗肿瘤作用是近年来的一个研究热点,多种黄酮类化合物都显示出显著的抗癌活性^[4-5]。万寿菊 *Tagetes erecta* 为菊科万寿菊属植物,一年生草本,俗称臭芙蓉、金盏花、蜂窝菊,产自美洲墨西哥等地,在我国有丰富的资源,南北均有栽培^[6]。研究发现:万寿菊中含有多种黄酮类化合物^[7-8]。目前国内外主要研究万寿菊花中的有效成分及其生物活性进行了研究^[9],但关于万寿菊茎叶中黄酮类化合物的抗肿瘤活性研究鲜有报道。本研究使用首次从万寿菊茎叶中分离得到的两种黄酮类化合物:4'-甲氧基-泽兰素-3-O- β -D-葡萄糖苷和山柰酚-3,7-O- α -L-双鼠李糖苷^[10]对人胃癌细胞 SGC7901 与人肝癌细胞 SMMC7721 进行体外抗肿瘤研究,研究其对肿瘤细胞增殖的抑制作用以及对肿瘤细胞凋亡的影响。

1 材料

1.1 试剂 4'-甲氧基-泽兰素-3-O- β -D-葡萄糖苷(化合物 I)和山柰酚-3,7-O- α -L-双鼠李糖苷(化合物 II)由佳木斯大学药学院天然药物化学教研室提供,是从万寿菊茎叶中分离得到的两种黄酮类化合物,纯度分别为 98.3% 与 98.0%。四甲基偶氮唑蓝-MTT(Sigma 公司),1640 培养液(Hyclone 公司),无支原体胎牛血清(杭州四季青有限公司),5-氟脲

嘧啶注射液(天津金耀氨基酸有限公司),吡啶橙(Amresco 公司),溴化乙锭(Amresco 公司)。

1.2 仪器 Thermo Forma 310 型 CO_2 培养箱(Thermoscientific 公司),96 孔培养板(Costar 公司),Sunrise 酶标仪(Tecan 公司),SW-CJ-1F(D)型生物洁净工作台(苏州市华宇净化设备有限公司),湘仪 TD5A-WS 型台式低速离心机(济南博鑫生物技术有限公司),CKX41-A32PH 型 Olympus 倒置荧光显微镜(上海赖氏电子科技有限公司)。

1.3 细胞株 人胃癌细胞 SGC7901 与人肝癌细胞 SMMC7721 由佳木斯大学药学院提供。按照常规方法传代培养^[11]。

2 方法

2.1 黄酮溶液的配制 分别使用 DMSO 配制浓度为 320 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的两种黄酮类化合物溶液,使用时用含 10% 胎牛血清的 1640 培养液按比例稀释至 20,40,80,120,160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,使 DMSO 不超过 0.1%,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.2 对肿瘤细胞生长抑制的实验 本实验使用 MTT 法检测两种黄酮类化合物对两种肿瘤细胞的抑制作用^[12]。取处于对数生长期的 SGC7901 与 SMMC7721 细胞,经 PBS 清洗,加入适量 0.25% 的胰蛋白酶适度消化,弃去胰蛋白酶,加入含 10% 胎牛血清的 1640 培养液吹打细胞,使贴壁细胞脱落,1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 8 min,弃上清。加入含 10% 胎牛血清的 1640 培养液吹打细胞,制成细胞悬液。调整细胞密度至 5×10^4 个/mL。向 96 孔培养板中每孔加细胞悬液 100 μL ,调零孔加等量完全培养基。将培养板移入 CO_2 培养箱中,在 37 $^{\circ}\text{C}$,饱和湿度,5% 二氧化碳条件下培养过夜。待细胞贴壁后,将两种黄酮类化合物溶液按照以下浓度 20,40,80,120,160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,每孔 100 μL 依次加入 96 孔板,

同时设立阴性对照(0.1% DMSO),阳性对照(5-氟脲嘧啶)以及空白调零孔(只加培养基,酶标仪调零用),每个浓度设5个复孔,重复3次,继续孵育24,48,72 h。待到达预定培养时间后,向96孔板内每孔加入20 μL 的MTT($5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)溶液,避光继续培养4 h后,小心吸弃培养孔内的上清液,每孔加入DMSO 150 μL ,轻轻振荡,使紫色结晶完全溶解,10 min之内在492 nm波长处用酶标仪测其吸光度 A_{492} 值。并按下式计算抑制率:细胞生长抑制率(IR) = $[A_{492}\text{ 阴性对照}-A_{492}\text{ 实验组}]/A_{492}\text{ 阴性对照}\times 100\%$ 。

2.3 细胞凋亡检测 按2.1方法配制黄酮类化合物溶液,使用2.2方法制备胃癌细胞SGC7901和肝癌细胞SMMC7721浓度为 1×10^6 个/mL的细胞悬液,分别向12孔板中每孔加入1 mL细胞悬液,放入 CO_2 培养箱中,在 $37\text{ }^\circ\text{C}$,饱和湿度,5%二氧化碳条件下培养24 h。根据MTT实验所得结果,每孔加入含 $320\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 两种黄酮类化合物的培养液1 mL。放入培养箱,继续培养48 h。每孔加入40 μL 吖啶橙与溴化乙锭染液($100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,PBS配制),放入暗处染色20 min,使用倒置荧光显微镜观察并拍照^[14]。

2.4 统计学方法 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,使用SPSS 11.2统计软件,采用 t 检验, $P<0.05$ 为差异显著。按照赵斌^[13]等的方法计算 IC_{50} 值。

3 结果

3.1 对SGC7901细胞的抑制率 2种化合物作用效果具有时效性与剂量性。在同一药物浓度下,随着时间的延长,2种化合物对细胞的抑制作用增强,差异具有统计学意义($P<0.05$)。在相同的时间下,作用不同浓度2种化合物各组与0.1% DMSO对照相比差异显著($P<0.05$)。化合物II在相同的作用时间与浓度下对SGC7901细胞抑制作用没有化合物I明显。见表1。2种化合物作用胃癌细胞SGC7901 48 h的 IC_{50} 分别为 $214\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($111.7\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), $1\ 183\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($683.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$),5-氟脲嘧啶对照组的 IC_{50} 为 $143\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($18.6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。

3.2 对SMMC7721细胞的抑制率 不同浓度2种化合物对SMMC7721细胞均体现出抑制作用,且呈现浓度与时间依赖性,2种化合物随着浓度的升高抑制效果均增加缓慢,见表2。各浓度与0.1% DMSO对照相比差异显著($P<0.05$)。2种化合物作用肝癌细胞SMMC7721 48 h的 IC_{50} 分别为

表1 2种黄酮类化合物不同作用浓度及作用时间对SGC7901细胞的抑制率($\bar{x}\pm s,n=3$)

药物	浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	抑制率/%		
		24 h	48 h	72 h
0.1% DMSO		0.0	0.0	0.0
化合物 I	20	10.2 \pm 2.1	13.4 \pm 1.1	15.4 \pm 3.5
	40	17.4 \pm 1.8	23.6 \pm 2.3	28.2 \pm 3.6
	80	30.0 \pm 2.4	35.8 \pm 3.2	36.1 \pm 4.2
	120	35.3 \pm 1.6	40.4 \pm 1.2	43.5 \pm 2.8
	160	36.1 \pm 1.4	42.3 \pm 0.6	48.5 \pm 0.7
化合物 II	20	6.1 \pm 0.9	5.4 \pm 3.8	9.3 \pm 0.5
	40	9.0 \pm 1.2	8.2 \pm 2.4	13.5 \pm 2.8
	80	10.6 \pm 1.6	11.3 \pm 0.7	14.6 \pm 2.1
	120	14.6 \pm 1.7	16.7 \pm 0.8	17.9 \pm 0.2
	160	15.4 \pm 2.1	18.5 \pm 3.4	20.7 \pm 1.7
5-氟脲嘧啶	20	10.2 \pm 1.6	14.9 \pm 1.9	20.7 \pm 1.9
	40	19.5 \pm 2.4	31.8 \pm 0.6	38.5 \pm 1.3
	80	24.3 \pm 2.0	37.4 \pm 1.0	45.7 \pm 5.0
	120	38.8 \pm 3.2	41.5 \pm 2.1	53.2 \pm 4.1
	160	47.9 \pm 2.3	66.4 \pm 2.6	76.5 \pm 0.8

$633\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($330.4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), $804\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($464.7\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$),5-氟脲嘧啶对照组的 IC_{50} 为 $164\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($21.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。

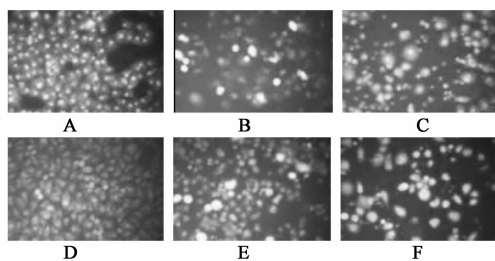
3.3 细胞凋亡的荧光显微镜观察 2种黄酮类化合物诱导SMMC7721和SGC7901细胞凋亡,双重荧光染色结果见图1。0.1% DMSO培养液对照组SMMC7721和SGC7901细胞数量很多,细胞形态没有发生改变,贴壁生长,轮廓清晰,细胞之间连接紧密,细胞呈现出亮绿色荧光。加入 $160\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 化合物I的SGC7901和SMMC7721细胞数量明显减少,生长状态差,形状与正常细胞相比有变化。细胞体积缩小,细胞核固缩,早期凋亡细胞出现凋亡小体。细胞碎片增多,细胞膜受损的晚期凋亡细胞被溴化乙锭染色,呈现出大量橘红色小颗粒。加入 $160\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 化合物II的SGC7901和SMMC7721细胞同样出现上述凋亡现象,见图1。

4 讨论

抗肿瘤作用是黄酮类化合物的一个研究热点。多种黄酮类化合物显示出抗癌作用^[15-17]。针对万寿菊花中提取物抗肿瘤研究已经有很多报道,但是目前国内外对其茎叶中分离得到的黄酮类化合物I(4'-甲氧基-泽兰素-3-O- β -D-葡萄糖苷)和II(山柰酚-3,7-O- α -L-双鼠李糖苷)的抗肿瘤活性鲜见报

表 2 2 种黄酮类化合物不同作用浓度及作用时间
对 SMMC7721 细胞的抑制率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

药物	浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	抑制率/%		
		24 h	48 h	72 h
0.1% DMSO	-	0.0	0.0	0.0
化合物 I	20	2.7 ± 0.7	5.0 ± 1.4	12.5 ± 0.6
	40	6.2 ± 0.9	17.1 ± 6.6	19.2 ± 0.4
	80	8.0 ± 1.0	22.3 ± 2.4	27.1 ± 0.5
	120	13.4 ± 0.8	23.1 ± 2.8	28.0 ± 1.7
	160	15.8 ± 1.6	27.2 ± 0.5	33.7 ± 4.1
化合物 II	20	3.7 ± 0.5	8.0 ± 0.4	13.4 ± 2.1
	40	4.2 ± 0.2	13.6 ± 1.5	16.3 ± 1.1
	80	17.1 ± 1.3	20.6 ± 4.7	26.4 ± 1.7
	120	19.5 ± 0.6	22.9 ± 2.4	33.2 ± 2.8
	160	20.1 ± 0.5	27.4 ± 2.5	36.5 ± 4.4
5-氟脲嘧啶	20	7.8 ± 0.9	11.7 ± 1.0	16.7 ± 2.5
	40	13.5 ± 0.9	18.8 ± 2.4	25.3 ± 0.8
	80	24.1 ± 1.8	30.1 ± 0.4	37.4 ± 2.8
	120	35.6 ± 2.5	39.6 ± 0.5	43.2 ± 3.3
	160	52.7 ± 3.1	57.9 ± 0.5	78.6 ± 1.6



A, D. 0.1% DMSO 对照组; B, E. 化合物 I 组; C, F. 化合物 II 组
(AO/EB 染色照片; A, B, C. 胃癌细胞; D, E, F. 肝癌细胞)

图 1 2 种黄酮类化合物 $160 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作用细胞 48 h

道, 因此对其进行体外抗肿瘤活性研究, 为合理利用万寿菊资源提供理论基础。

通过 MTT 实验可以看出这两种化合物对胃癌细胞 SGC7901 和肝癌细胞 SMMC7721 的生长均具有明显的抑制作用, 当浓度大于 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 各给药组与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$), 且呈现明显的时间与剂量依赖性, 说明这两种化合物的浓度与作用时间对其抗肿瘤细胞活性的大小起决定性作用。在相同的作用浓度与作用时间下, 化合物 I 对两种肿瘤细胞的抑制作用要大于化合物 II。原因可能是化合物 II 的糖基比化合物 I 多一个, 而糖基数与位置的不同会影响到黄酮类化合物抗肿瘤的活性^[15]。

吡啶橙 (AO) 能透过胞膜完整的细胞, 嵌入细胞核 DNA, 使之发出明亮的绿色荧光。溴乙锭 (EB) 仅能透过胞膜受损的细胞, 嵌入核 DNA, 发橘红色荧光。凋亡的细胞呈现为染色增强, 荧光更为明亮, 均匀一致的圆状或固缩状、团块状结构。非凋亡细胞核呈现荧光深浅不一的结构样特征。二者形态迥然相异, 很易判别。经两种化合物作用后的细胞, 产生典型的凋亡现象, 比如细胞缩小, 细胞质浓缩, 产生凋亡小体以及细胞碎片。与其他文献报道的结果类似^[14], 说明主要以诱导细胞凋亡为主。2 种化合物对 SGC7901 和 SMMC7721 细胞的增殖抑制活性和诱导细胞凋亡活性各不相同, 与 MTT 法实验结果基本一致。每种化合物的肿瘤细胞增殖抑制活性, 均与其诱导细胞凋亡活性相关。因此说明, 这两种化合物抑制细胞增殖的过程与它们诱导 SMMC7721 和 SGC7901 细胞凋亡的过程直接相关。

恶性肿瘤的发生发展与细胞增殖和凋亡的调控失衡密切相关, 细胞凋亡在肿瘤发展中起着负向调控作用, 可以抑制肿瘤生长。目前, 通过诱导凋亡来治疗肿瘤已成为肿瘤研究的热点。许多黄酮类化合物都是通过阻滞细胞周期来诱导凋亡的^[18]。在细胞凋亡的机制研究中提出了两条主要信号途径, 即线粒体途径和死亡受体途径^[19]。Caspases 是凋亡信号转导的共同通路, 许多调控细胞凋亡的因素都通过 Caspases 酶系起作用, 其中 Caspase-3 为凋亡的效应因子, 负责对凋亡途径最后执行阶段的全部或部分关键性蛋白的酶切, 被称为凋亡的“执行者” Caspase-8 和 Caspase-9 位于凋亡途径的上游, 分别介导外源性死亡受体通路和内源性线粒体通路, 活化后作为始动 Caspase 进一步活化下游的效应性 Caspase-3, 从而剪切其死亡底物如 PARP 等, 导致蛋白酶级联切割放大, 使细胞走向凋亡^[20]。植物黄酮类化合物发挥抗肿瘤作用的基础在于其分子结构, 但天然药物抗肿瘤活性往往是多个因素协同作用的结果。因此有必要对这两种万寿菊黄酮的体内外抗肿瘤活性机理做进一步的研究, 为万寿菊茎叶的开发提供更为可靠的理论依据。

[参考文献]

[1] Christian Billard, Faouzia Menasria, Claire Quiney, et al. Flavopiridol induced iNOS down-regulation during apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells is caspase-dependent[J]. Leukemia Research, 2008, 32 (5): 755.

- [2] Rebai Ben Ammar, Wissem Bhourri, Mohamed Ben Sghaier, et al. Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): A structure activity relationship study [J]. *Food Chemistry*, 2009, 116(1):258.
- [3] 覃仁辉, 张梦军, 吴世容, 等. 银杏中黄酮类化合物的提取及其医药学应用[J]. *长沙大学学报*, 2004, 18(2):37.
- [4] Min Li-Weber. New therapeutic aspects of flavones: The anticancer properties of *Scutellaria* and its main active constituents Wogonin, Baicalein and Baicalin [J]. *Cancer Treatment Reviews*, 2009, 35(1):57.
- [5] 李荣, 李俊. 黄酮类化合物药理活性及其构效关系研究进展[J]. *安徽医药*, 2005, 9(7):481.
- [6] 邹瑜, 王继涛. 色素万寿菊栽培技术[J]. *北方园艺*, 2004(5):46.
- [7] Roberta Piccaglia, Mauro Marotti, Silvia Grandi. Lutein and lutein ester content in different types of *Tagetes patula* and *T. erecta* [J]. *Industrial Crops and Products*, 1998, 8(1):45.
- [8] 黄帅. 万寿菊花中生物活性成分的研究[D]. 成都: 西南交通大学, 2007:14.
- [9] Onanong Kaisoona, Sirithon Siriamornpuna, Natthida Weerapreeyakul, et al. Phenolic compounds and antioxidant activities of edible flowers from Thailand [J]. *J Functional Foods*, 2011, 3(2):88.
- [10] Zhang Yu, Zhang Ting-ting. Studies on the Chemical Constituents from the Stem and Leaves of *Tagetes erecta* [J]. *J Chinese Medicinal Materials*, 2009, 33(9):1412.
- [11] 许金鹏, 张慧慧, 李朝品, 等. 原卟啉钠体外对人肝癌细胞株 SMMC-7721 细胞的抑制作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(18):173
- [12] Tommy Brown, Elin Sigurdson, Andre Rogatko, et al. Telomerase inhibition using azidothymidine in the HT-29 colon cancer cell line [J]. *Ann Surg Oncol*, 2010(8):910.
- [13] 赵斌, 葛金芳, 朱娟娟, 等. 小议在 MTT 法测细胞增殖抑制率中 IC₅₀ 的计算方法[J]. *安徽医药*, 2007, 11(9):834.
- [14] Yun-Jun Liu, Zhen-Hua Liang, Zheng-Zheng Li, et al. Cellular uptake, cytotoxicity, apoptosis, antioxidant activity and DNA binding of polypyridyl ruthenium (II) complexes [J]. *Journal of Organometallic Chemistry*, 2011, 696(14):2728.
- [15] 王辉, 李药兰, 沈伟哉, 等. 瑶药黄酮化合物体外抗肿瘤活性研究[J]. *中药材*. 2007, 30(8):980.
- [16] 甄汉深, 周燕园, 袁叶飞, 等. 青天葵中黄酮类化合物的体外抗肿瘤实验研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2008, 14(3):36.
- [17] 李洪亮, 徐仙赞, 孙立波, 等. 山绿茶中 Ilexgenin A 对 HepG2 肿瘤细胞抑制作用的研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(15):238.
- [18] 孙健, 张扬, 温庆辉, 等. 汉黄芩素对人肺腺癌 SPC-A-1 细胞增殖和周期的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(18):169.
- [19] Hengartner M O. The biochemistry of apoptosis [J]. *Nature*, 2000, 407(12):770.
- [20] 李玉芳, 仲宁, 沈文香, 等. 姜黄素诱导人胃癌 SGC-7901 细胞凋亡[J]. *江苏医药*, 2010, 36(11):1278.

[责任编辑 聂淑琴]