

芒柄花素抗肿瘤作用机制的研究进展

赵玉民, 冯叶雯, 张黎, 余成浩*
(成都中医药大学, 成都 610036)

[摘要] 芒柄花素(FN)是一种从红三叶草、黄芪和鸡血藤等药用草本植物中提取的植物异黄酮。研究表明,芒柄花素具有较强的抗肿瘤生物活性,可作为抗肿瘤药物治疗各种恶性肿瘤。迄今为止的研究表明,芒柄花素通过多种分子机制与途径对肿瘤产生抑制增殖、诱导凋亡、抑制迁移和侵袭、诱导细胞周期停滞等作用,可以在乳腺癌、结直肠癌、前列腺癌、膀胱癌和肺癌等多种肿瘤细胞和动物模型中观察到这些抗肿瘤活性。主要抗肿瘤活性体现在触发活性氧(ROS)生成、调节磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/雷帕霉素靶蛋白(mTOR)和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路;抑制酪氨酸激酶1(JAK1),酪氨酸激酶2(JAK2)和非受体酪氨酸激酶(c-Src)的激活;调节细胞角蛋白19(CK19),基质金属蛋白酶(MMP),微小RNA-21(miR-21),核纤层蛋白A/C抗体(Lamin A/C),细胞周期蛋白D₁(Cyclin D₁)和细胞周期蛋白E₁(Cyclin E₁)的表达。此外,笔者对于芒柄花素衍生物的抗肿瘤作用研究也进行了综述。通过对芒柄花素的化学结构进行修饰,目前已得到多种具有抗肿瘤作用的衍生物。实验结果表明芒柄花素的一些衍生物具有更强的抗肿瘤活性和较低的细胞毒性,分子作用机制研究仍需要进一步深入。综上所述,芒柄花素及其衍生物可能成为抗肿瘤的潜在新药。

[关键词] 芒柄花素; 抗肿瘤; 衍生物; 作用机制

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)10-0193-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211090

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210318.1430.008.html>

[网络出版日期] 2021-3-18 17:25

Research Progress on Anti-tumor Mechanism of Formononetin

ZHAO Yu-min, FENG Ye-wen, ZHANG Li, YU Cheng-hao*

(Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610036, China)

[Abstract] Formononetin is a kind of plant isoflavones extracted from medicinal herbs such as *Trifolium pratense*, *Astragalus membranaceus* and *Spatholobi Caulis* have shown that formononetin has strong anti-tumor biological activity, and can be used as an anti-tumor drug in the treatment of various malignant tumors. Many studies so far have shown that formononetin can inhibit cell proliferation, induce cell apoptosis, inhibit cell migration and invasion, and induce cell cycle arrest on tumors through a variety of molecular mechanisms and pathways. These antitumor activities can be observed in cells of various tumors such as breast cancer, colorectal cancer, prostate cancer, bladder cancer and lung cancer in trials and animal models. Examples of these effects include triggering the generation of reactive oxygen species (ROS), regulating phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) and Mitogen-activated protein kinases (MAPK) signaling pathways, inhibiting the activation of tyrosine kinase (JAK1 and JAK2) and nonreceptor tyrosine kinase (c-Src), and regulating cytokeratin 19(CK19), matrix metalloproteinases(MMP), microRNA-21(miR-21), lamin A/C antibody(Lamin A/C), expression of Cyclin D₁ and Cyclin E₁. In addition, the anti-tumor

[收稿日期] 20210104(023)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81673878);四川省青年科技创新研究团队项目(2020JDTD0022);中医药“杏林学者”学科人才研究促进计划项目(XSGG2019006)

[第一作者] 赵玉民, 硕士, 从事实验方剂学临床与实验研究, E-mail: 920872857@qq.com

[通信作者] *余成浩, 博士, 博士生导师, 从事实验方剂学教学科研、药理毒理等新药开发研究, E-mail: yuholy@126.com

effects of formononetin derivatives were reviewed in this paper. By modifying the chemical structure of formononetin, many related derivatives have been obtained. Experimental results have shown that some derivatives of formononetin have stronger anti-tumor activity and lower cytotoxicity, but the related molecular mechanism of action still needs to be explored further in-depth. In conclusion, formononetin and its derivatives may become potential anti-tumor drugs.

[Key words] formononetin; anti-tumor; derivative; mechanism

芒柄花素(FN)又名刺芒柄花黄素、芒柄花黄素,广泛存在于红三叶草^[1],黄芪^[2],鸡血藤^[3-5]及苦参^[6]等药用草本植物中,是一种植物异黄酮,具有明显的植物雌激素特点。其分子结构为7-羟基-4'-甲氧基异黄酮。外观与性状呈白色结晶粉末,分子式为 $C_{16}H_{12}O_4$,相对分子质量为268.26,密度为 $1.329\text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$,熔点为 $256\sim 260^\circ\text{C}$,沸点为 $(479.4\pm 45)^\circ\text{C}$,易溶于甲醇、乙酸乙酯、乙醚和稀碱溶液,由于分子结构的限制,几乎不溶于水。

随着对芒柄花素药理作用研究的不断深入,其在抗肿瘤方面表现出潜在的生物活性,一些作用机制也成为中药成分抗肿瘤研究的热点之一。研究显示,芒柄花素作为抗肿瘤药物可用于治疗多种类型的肿瘤,包括乳腺癌^[7-8],前列腺癌^[9-10],鼻咽癌^[11-12],宫颈癌^[13]及膀胱癌^[14-15]等。其发挥抗肿瘤作用的机制主要包括通过多种分子途径抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡、抑制细胞迁移和侵袭及诱导细胞周期停滞等。随着对芒柄花素抗肿瘤作用研究的不断深入,研究人员开始对芒柄花素的化学结构进行修饰以降低芒柄花素的细胞毒性并提高芒柄花素的抗肿瘤效力。并且利用网络药理学,继续寻找芒柄花素可能存在的抗肿瘤分子途径。芒柄花素具有良好的抗肿瘤潜力及广阔的应用前景,目前对其抗肿瘤作用的研究较多,但缺乏完整系统的文献综述。本文综述了近年来芒柄花素抗肿瘤作用的研究进展,以期为研究者提供参考信息。

1 芒柄花素抗肿瘤作用机制

多项研究证实,芒柄花素可用于治疗各种类型的肿瘤,具有很强的抗肿瘤作用。可以通过多种分子途径抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡、抑制细胞迁移和侵袭及诱导细胞周期停滞产生抗肿瘤作用机制。

1.1 抑制细胞增殖 抑制肿瘤细胞增殖是芒柄花素抗肿瘤作用的主要机制之一。据研究报告,芒柄花素可从分泌型糖蛋白(Wnt)/ β -连环蛋白(β -catenin)信号通路,微小RNA(miRNA),雌激素受体(ER),胰岛素样生长因子-1(IGF-1)/磷脂酰肌

醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路等途径调节细胞信号传导,抑制肿瘤细胞异常增殖。相关的机制如下。

1.1.1 Wnt/ β -catenin 信号通路 Wnt/ β -catenin 信号通路,也称为典型Wnt信号通路,是一条极为保守的信号轴,参与多种生理过程,如增殖、分化、凋亡、迁移、侵袭和组织稳态^[16-18]。在Wnt/ β -catenin途径中,转录因子 β -catenin的异常调节是Wnt信号通路的主要组成部分,作为Wnt/ β -catenin信号通路重要的信号分子在细胞内的积聚与肿瘤的发生及转移侵袭密切相关^[19-22]。在人膀胱癌T24细胞中,芒柄花素通过下调 β -catenin信使RNA(mRNA)的表达从而对T24细胞的增殖起显著抑制作用^[14]。有研究表明,在肠道恶变组织中P53表达明显升高,并且通过Wnt/ β -catenin信号通路参与息肉形成及恶变发生^[23-24]。网络药理学工具作为一种新兴的策略,可用于发现临床疾病现有治疗方法潜在的生物学靶标、功能过程和分子途径。在进行深入地实验验证之前,这些预测结果可能是针对疾病的化学疗法的可能的药理生物靶标^[25-26]。ZHANG等^[27]通过网络药理学分析发现芒柄花素最关键的抗结直肠癌靶点是肿瘤蛋白P53(TP53),其他分子标记还有细胞色素P450 3A4(CYP3A4),三磷酸腺苷结合盒G亚家族成员2(ABCG2),肿瘤坏死因子(TNF),表皮生长因子受体(EGFR)和细胞色素P450 1A1(CYP1A1),并表示以上生物学指标可以作为预测和治疗大肠癌的潜在分子标记,提示芒柄花素抗结直肠癌的分子机制可能与抑制细胞增殖和调节肿瘤相关代谢途径有关。

1.1.2 miRNA miRNA是一种内源性、非编码的单链RNA,具有18~24个核苷酸长度,在转录后水平调节基因表达。已经证明miRNA在多个方面影响肿瘤的发生和发展^[28]。在包括恶性肿瘤在内的人类疾病发病机制中,miRNA起着重要作用,可能同时发挥致癌基因和抑癌作用^[29]。miRNA-21(miR-21)是公认的、最显著的与致癌有关的miRNA,参与多种癌症的发病机制^[30]。已有证据表

明 miR-21 的高表达水平与高度侵袭性和膀胱癌的预后不良有关^[31]。WU 等^[15]报道芒柄花素通过下调 miR-21 表达抑制膀胱癌 T24 细胞的增殖,同时使第 10 号染色体同源缺失性磷酸酶-张力蛋白(PTEN)表达增加,磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt)表达下调。这些结果提示,芒柄花素在体外抑制膀胱癌的机制可能与 miR-21 介导的 PTEN/Akt 通路调控有关。

1.1.3 ER ER 和其家族成员甲状腺激素受体、视黄酸受体、维生素 D 受体一样,由 8 个外显子组成基因编码,并具有 4 个主要功能域的模块结构,反映在该基因的外显子/内含子组织中。芒柄花素作为植物雌激素,在结构上与哺乳动物雌激素类似,决定了其具有与 ER α 和 ER β 结合的能力。据报道,循环雌激素的增加是乳腺癌发展的原因,雌激素及其受体之间相互作用的部分促成雌激素介导的肿瘤生长^[32]。在乳腺癌上皮细胞中,雌激素的促有丝分裂作用通过与转录因子 ER α 和 ER β 2 个受体结合来实现,这些受体通过充当配体依赖性转录因子来介导雌激素信号传导,在调节乳腺癌发展中发挥拮抗作用^[33-34]。在皮下注射人骨肉瘤 U2-OS 细胞的荷瘤裸鼠中发现,芒柄花素通过降低 ER1, TP53 和表皮生长因子 2(ERBB2)的表达来抑制细胞增殖^[35],同时经芒柄花素处理的 U2-OS 细胞荷瘤小鼠表现为肿瘤重量减轻。CHEN 等^[36]也报道了芒柄花素通过上调 ER β 的表达从而在乳腺癌 ER 阳性(MCF-7 和 T-47D)细胞中具有抗增殖活性。

1.1.4 IGF-1/PI3K/Akt 信号通路 IGF-1 与 IGF-1R 结合后,激活的 IGF-1 募集并磷酸化胰岛素受体底物蛋白,并激活细胞内癌蛋白(Ras)/丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和 PI3K/Akt 信号通路,参与包括生存、增殖、凋亡和迁移多种细胞活动^[37-38]。Akt 作为 PI3K 信号传导途径的主要组成部分,其表达或过度激活都会导致肿瘤的发展^[39-40]。CHEN 等^[7]报道芒柄花素以剂量依赖的方式使 IGF-1/PI3K/Akt 信号通路失活来抑制乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖,并诱导细胞周期停滞于 G₀/G₁ 期。另一方面,在皮下注射 MCF-7 细胞建立的异种肿瘤 BALB/c 裸鼠模型中,芒柄花素能够明显抑制乳腺癌细胞在裸鼠移植瘤中的生长。

1.2 诱导细胞凋亡 凋亡是从体内清除衰老细胞的自然方法。然而,肿瘤凋亡信号一旦出现失调,特别是抗凋亡系统的激活,会使肿瘤细胞逃避该程序,导致其不受控制的出现增殖,造成肿瘤存活^[41]。许多抗肿瘤疗法通过诱导细胞凋亡及其相关的细

胞死亡途径起作用。芒柄花素也不例外。

1.2.1 PI3K/Akt/雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路 在多种恶性肿瘤中可见 PI3K/Akt/mTOR 途径处于激活状态,对于肿瘤而言是关键的治疗靶点。该途径的活化在抑制细胞凋亡和促进增殖中起关键作用。这是一条相对独立而复杂的途径并与多种途径密切相关,例如缺氧诱导因子途径^[42]。研究表明,芒柄花素作用于多种类型的肿瘤,通过诱导细胞凋亡发挥抗肿瘤作用。而 PI3K/Akt 通路在芒柄花素诱导的细胞凋亡中起重要作用。LIU 等^[12]在研究中发现,人骨肉瘤 U2OS 细胞系经芒柄花素干预后,会显著降低抗凋亡蛋白 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)基因的水平 and 增加凋亡前蛋白裂解的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3),促凋亡 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)的水平来促进细胞凋亡。产生这些作用的潜在分子机制包括降低细胞外信号调节激酶(ERK)磷酸化和造成 Akt 失活,其中 ERK 活化降低导致 Caspase-3 依赖性凋亡^[43]。Bcl-2 家族主要通过控制细胞色素 C 的释放来调节线粒体凋亡的内在途径,被认为是 Caspases 级联的上游调节因子^[44-45]。此外,在人鼻咽癌 HONE1 细胞的研究中发现芒柄花素呈浓度依赖性下调 Akt 磷酸化水平并增大 Bax/Bcl-2,这可能是作用于 PI3K/Akt 信号通路激活线粒体凋亡途径而诱导 HONE1 细胞凋亡^[11]。还有研究发现 PI3K/Akt 信号传导通路在芒柄花素诱导的人宫颈癌 HeLa 细胞凋亡中起到重要作用,芒柄花素通过失活 Akt 和激活 Caspase-3,剂量依赖性诱导 HeLa 细胞凋亡,同时损害 HeLa 细胞的能量代谢^[13]。PARK 等^[46]也证明了 PI3K/Akt 信号通路对于芒柄花素在人卵巢癌(ES2 和 OV90)细胞中的诱导凋亡作用具有重要意义。PARK 等还发现芒柄花素通过诱导基质金属蛋白酶(MMP)断裂和激活 p38 MAPK 诱导卵巢癌细胞细胞凋亡。芒柄花素激活 p38 MAPK 磷酸化后,进而导致 Akt 的失活且从抗凋亡信号 Bcl-2 切换到促凋亡信号 Bax,这可能在芒柄花素诱导的前列腺癌 PC-3 细胞和前列腺上皮 RWPE1 细胞凋亡中起重要作用^[47]。此外,含有芒柄花素的黄芪提取物可以通过升高人乳腺癌(MCF-7, SK-BR-3 和 MDA-MB-231)细胞中总 mTOR 水平,通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 途径抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡^[8]。研究发现芒柄花素处理的膀胱癌 T24 细胞表现出明显的凋亡形态学改变及侵袭力降低的现象,结果显示, T24 细胞中 miR-21 和 p-Akt 表达显著降低, PTEN 表达增加,提示其机

制可能与 miR-21 介导的 PTEN/Akt 通路调控有关^[15]。miR-21 的过度表达可显著促进膀胱癌细胞增殖与侵袭,并通过抑制 PTEN 表达来抑制凋亡^[48]。芒柄花素还可以通过影响参与细胞调控的信号分子来抑制致癌级联反应的激活。在不同肿瘤中,芒柄花素可以通过抑制 Akt 活性增强联合用药的抗肿瘤作用,促进细胞凋亡。例如,芒柄花素与依维莫司联合作用于人乳腺癌 MDA-MB-468 细胞,通过抑制 Akt 的活性,增强了依维莫司的作用,细胞凋亡率显著上升^[49]。KIM 等^[50]研究发现芒柄花素联合硼替佐米使用并与蛋白酶体抑制剂一起作用于骨髓瘤细胞,能够促进诱导人多发性骨髓瘤(U266 和 RPMI8226)细胞凋亡,并通过阻断骨髓瘤细胞中核转录因子- κ B(NF- κ B),PI3K/Akt 和激活蛋白-1(AP-1)的持续激活来抑制其增殖。芒柄花素联合 Akt 抑制剂(MK2206)可抑制 4 种不同亚型乳腺癌细胞(人乳腺癌 MCF-7, BT-474, SK-BR-3 及 MDA-MB-2314 细胞)的增殖并诱导凋亡,联合用药呈现出更加显著的药效^[51]。其机制可能与芒柄花素通过抑制 Akt 磷酸化水平及促进 MK2206 对 PI3K/Akt 信号阻断作用有关。总之,芒柄花素通过抑制不同的肿瘤细胞(包括乳腺癌细胞、膀胱癌细胞、人骨肉瘤细胞、人鼻咽癌细胞、人宫颈癌细胞等肿瘤细胞)中的 PI3K/Akt/mTOR 信号传导通路来诱导细胞凋亡。

1.2.2 MAPK MAPK 是激酶家族,可响应各种从细胞膜传递到细胞核的刺激信号,由 3 个成员 ERK, c-Jun 氨基末端激酶(JNK)和 p38 MAPK 组成^[52-53]。MAPK 信号传导通路可根据细胞类型、刺激和 MAPK 激活的潜伏期来保护或增强对凋亡的敏感性。芒柄花素也通过 MAPK 通路和 NF- κ B 通路的分子机制诱导肿瘤细胞凋亡。在人前列腺腺癌(LNCaP 和 PC-3)细胞中,芒柄花素以剂量依赖性方式灭活了 ERK1/2 激活的 MAPK 信号通路,从而导致 Bax mRNA 和蛋白表达水平增加,并诱导 LNCaP 细胞凋亡^[54]。在人前列腺腺癌 DU-145 细胞中,芒柄花素同样以剂量依赖性的方式激活 Ras 相关地塞米松诱导 1(RASD1, Ras 家族成员)和 Bax 蛋白来诱导凋亡,显示芒柄花素对前列腺腺癌细胞增殖的抑制作用与膜受体酪氨酸蛋白激酶(Ras/Raf/MAPK)信号传递途径有关^[9]。在人胃癌 MKN-45 细胞中,芒柄花素的处理明显抑制胃癌 MKN-45 细胞的增殖作用,其机制与激活细胞内 MAPK 信号转导通路而诱导细胞凋亡有关^[55]。芒柄花素在鼻咽癌 CNE2 细胞中降低 Bcl-2, ERK1/2, 核纤层蛋白 A/C 抗体(Lamin

A/C)和细胞角蛋白 19(CK19)表达,并通过上调细胞内促凋亡蛋白 Bax 表达来实现有效的抗肿瘤作用^[56]。在人乳腺癌 MCF-7 细胞中,芒柄花素与二甲双胍联用,通过抑制体外 ERK 磷酸化并协同抑制 MCF-7 细胞的细胞生长从而诱导细胞凋亡^[57]。在人胃癌 MKN-45 细胞中,芒柄花素可以通过激活肿瘤细胞内 NF- κ B 信号通路进而诱导肿瘤细胞凋亡^[58]。

1.2.3 活性氧(ROS) ROS 对肿瘤的发生发展产生的影响是复杂的,在肿瘤生物学中起着两个相反方向的作用。一方面,过量的 ROS 可以诱导肿瘤细胞凋亡、细胞周期停滞与衰老。另一方面,高 ROS 水平通过促进和维持致癌细胞信号传导而促进肿瘤发生发展、进展与扩散,从而导致肿瘤细胞增殖、存活、自噬与转移,而肿瘤细胞能够通过增强抗氧化水平来促进本身的存活,以维持 ROS 水平的微妙平衡^[59-60]。信号传导及转录激活因子(STAT),是一种能与 DNA 结合的独特蛋白质家族。STAT3 通过响应各种细胞因子和生长因子的磷酸化而被激活,通过响应细胞刺激而介导多种基因的表达,在细胞生长和凋亡中起关键作用,是开发新型抗癌剂有希望的目标。在人骨髓瘤(U266 和 RPMI8226)细胞中,芒柄花素可通过增加 ROS 水平,抑制 STAT3 和 STAT5 的信号级联,下调了磷酸 STAT3/STAT5 的表达,同时抑制了骨髓瘤上游酪氨酸激酶 1(JAK1),酪氨酸激酶 2(JAK2)和非受体酪氨酸激酶(c-Src)的激活,抑制骨髓瘤细胞活力的同时诱导细胞凋亡^[61]。LO 等^[62]已证明芒柄花素能够显著增强表阿霉素的细胞毒作用,提高包括过氧化氢和超氧阴离子自由基在内的 ROS 水平,共同作用并触发线粒体凋亡途径、降低线粒体膜电位和显著激活 Caspase-9/3,通过 ROS 介导抑制多药耐药相关蛋白(MRP),同时激活线粒体的内源性和外源性死亡受体凋亡途径而导致宫颈癌细胞死亡。总之,在肿瘤细胞上使用 ROS 需要找到一个平衡点,打破 ROS 与肿瘤细胞之间的平衡。

1.2.4 Bcl-2 和 Bax Bcl-2 蛋白家族可作为细胞的变阻剂,包括促进生命的蛋白质(例如 Bcl-XL)和促进死亡的蛋白质(例如 Bax, Bak)。他们共同调节细胞凋亡,并在人类健康和疾病中发挥重要作用^[63]。据报道,在人非小细胞肺癌 A549 细胞中,芒柄花素通过下调细胞周期蛋白 E₁(Cyclin E₁)表达而影响细胞周期,并下调 Bcl-2 和上调 Bax 表达而加速细胞凋亡发生^[64]。此外,芒柄花素处理后的人非小细胞肺

癌(A549, NCI-H23)细胞上调了P53在Ser15/20的磷酸化水平,并以剂量依赖的方式增强其转录活性,促进Caspase-3的裂解和Bax的表达^[65]。还研究了在人骨肉瘤U2OS细胞中芒柄花素诱导了miR-375的表达上调,结果表明,芒柄花素通过使U2OS细胞中Bcl-2的表达降低而Bax的表达增加来诱导骨肉瘤细胞凋亡,这种促凋亡作用与芒柄花素的浓度直接相关^[66]。据报道,在人黑色素瘤A375细胞中,芒柄花素可通过降低Bcl-XL/Bax蛋白表达的比例,启动Caspase-3途径诱导A375细胞凋亡^[67]。在人卵巢癌(A2780和SKOV3)细胞中,芒柄花素降低了MMP-2/9蛋白表达和ERK的磷酸化水平,而使Bax/Bcl-2比值增加,同时增加了裂解的Caspase-3/9活性,这表明芒柄花素可能通过线粒体相关的凋亡途径诱导卵巢癌细胞凋亡,并具有促进细胞凋亡和抑制卵巢癌细胞迁移和侵袭的作用^[68]。

在大鼠神经胶质瘤C6细胞中,替莫唑胺、毛蕊异黄酮和芒柄花素联用使得凋亡蛋白Bax和Caspase-3/9的表达上调,而抗凋亡蛋白Bcl-2和迁移蛋白MMP-2/9的表达下调。观察荷胶质瘤C6细胞的BALB/c小鼠发现,药物联用在体外可以显著抑制C6细胞的生长和迁移,病理检测发现每组药物对小鼠主要脏器的毒性均很小^[69]。

1.3 抑制细胞迁移和侵袭 肿瘤细胞的迁移与侵袭具有不确定性,对于肿瘤发生发展、对抗治疗及患者的后续生存质量而言都是潜在的威胁。因此,研究如何抑制肿瘤细胞的迁移与侵袭具有现实意义。

1.3.1 MMP MMP是内肽酶,需要钙锌离子来激活。MMP能够破坏所有的基底膜(BM)和细胞外基质(ECM)分子^[70]。还参与激活和释放不同的趋化因子、细胞因子、生长因子、黏附分子和细胞骨架蛋白,在肿瘤和基质细胞转移的早期被诱导表达,因此在肿瘤的发展及转移中起着重要作用^[71]。在人结肠癌HCT-116细胞和人结肠癌转移灶LoVo细胞中,芒柄花素通过下调血管内皮生长因子(VEGF),MMP-2/9蛋白等关键促血管生成因子的表达来抑制肿瘤生长,具有抗血管生成和抗侵袭的作用,且不良反应极小^[72]。芒柄花素通过抑制PI3K/Akt和STAT3信号通路,使miR-149介导的肾上腺素B受体3(EphB3)下调来抑制人结肠癌(SW1116和HCT116)细胞的生长和侵袭^[73]。在人类乳腺癌MDA-MB-231细胞中,芒柄花素通过降低PI3K/Akt信号通路中MMP-2/9的表达来抑制乳腺癌细胞的迁移和侵袭能力^[74]。芒柄花素通过降低

MMP-2/9蛋白表达和ERK的磷酸化水平抑制卵巢癌(A2780和SKOV3)细胞增殖、迁移和侵袭^[68]。在大鼠神经胶质瘤C6细胞中,芒柄花素与替莫唑胺联合使用可下调MMP-2/9的表达和抑制C6细胞的迁移,并降低耐药性产生^[75]。此外,芒柄花素、替莫唑胺和毛蕊异黄酮共同施用可使神经胶质瘤C6细胞中凋亡蛋白Bax和Caspase-3/9的表达上调,而迁移蛋白MMP-2/9和抗凋亡蛋白Bcl-2的表达和活性下调,从而抑制胶质瘤细胞的增殖和迁移并促进细胞凋亡来增强药物疗效^[69]。上述2个报道中均显示,与单独使用替莫唑胺相比,协同使用显示出更好的治疗效果并降低了耐药性。

1.3.2 Lamin A/C Lamin A/C是为核膜提供骨架结构和维持核的稳定的重要功能蛋白,在多种恶性肿瘤中可见异常表达,可能是监测和管理转移性鼻咽癌的潜在生物标志物之一。CK19属细胞角蛋白家族成员,主要存于上皮细胞胞浆中,是构成细胞骨架的一类中间丝状物,在恶性肿瘤诊断中十分关键。细胞癌变时CK19释放增加,其特点呈现为愈合过程降低,细胞迁移能力降低。Lamin A/C和CK19在肿瘤的发生和发展中起着关键作用。YING等^[56]评估了芒柄花素对鼻咽癌的抗肿瘤作用,在体外实验研究中芒柄花素处理的人鼻咽癌CNE2细胞表现出抑制细胞增殖、促进细胞凋亡、抑制细胞愈合进程、降低细胞迁移的作用。其产生作用的机制主要表现为细胞内Bcl-2, ERK1/2, Lamin A/C和CK19的表达水平降低,而促凋亡蛋白Bax的表达水平上调。

1.3.3 缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)/趋化因子受体4(CXCR4)轴 CXCR4属于G蛋白偶联受体(GPCR)超家族。HIF-1 α 受多种药物、放射线、细胞因子和激素调节^[76-77]。HIF-1 α 表达增加可增加CXCR4荧光素酶的活性。已发现HIF-1 α /CXCR4轴与各种肿瘤发生机制有关,特别是与肿瘤转移有关^[78-80]。芒柄花素通过抑制人乳腺癌MDA-MB-231细胞中HIF-1 α 和CXCR4的表达,对HIF-1 α /CXCR4轴进行负调控从而抑制细胞的增殖与迁移,而过表达HIF-1 α 可抵消芒柄花素对CXCR4的表达调控以及对肿瘤细胞增殖和迁移的抑制作用,预示着HIF-1 α 可能是芒柄花素的重要调控靶基因^[81]。尽管目前在HIF-1 α /CXCR4轴上的研究进展为芒柄花素抑制肿瘤细胞迁移和侵袭的研究提供了新的方向,但具体机制仍需要进行进一步研究。

1.4 诱导细胞周期停滞 近年来关于芒柄花素在

诱导细胞周期停滞中的作用也有报道。芒柄花素通过抑制 Akt 介导的信号通路^[10,73,82]在诱导多种肿瘤细胞停滞中非常有效,包括乳腺癌(MDA-MB-468, MCF-7, SK-BR-3 和 MDAMB-231)细胞^[83-84],前列腺癌(PC-3 和 DU145)细胞^[10,82]和结肠癌(SW1116 和 HCT116)细胞^[73]。芒柄花素通过降低前列腺癌 PC-3 细胞 Akt 磷酸化,同时下调细胞周期相关蛋白 D₁(Cyclin D₁)和周期蛋白依赖性激酶 4(CDK4)的表达水平并呈剂量依赖性,最终诱导前列腺癌 PC-3 细胞周期阻滞于 G₀/G₁期^[10]。此外,研究表明芒柄花素可通过降低 Cyclin D₁ 和 Cyclin E 的基因和蛋白表达同时负调控 P21 和 P27 的表达,由此来调控细胞周期并诱导乳腺癌 MCF-7, SK-BR-3

和 MDAMB-231 细胞阻滞于 G₁期^[84]。在人结肠癌(SW1116 和 HCT116)细胞中,芒柄花素通过下调 Cyclin D₁ 的表达,将细胞周期阻滞在 G₀/G₁点,从而抑制结肠癌细胞的生长^[73]。细胞的增殖与其增殖细胞核抗原(PCNA)有着重要的关系,而 PCNA 的表达与乳腺癌的恶性程度和预后明显相关。芒柄花素通过减少 PCNA 蛋白的表达将乳腺癌 MDA-MB-468, MCF-7 和 SK-BR-3 细胞细胞周期阻滞于 G₁期,从而抑制乳腺癌细胞增殖^[83]。总体而言,芒柄花素作用于不同途径调节关键细胞周期调节因子的表达水平,因此诱导细胞周期停滞在 G₁期并导致各种肿瘤细胞系停止增殖。芒柄花素抗肿瘤作用机制具体涉及的分子途径见表 1。

表 1 芒柄花素的抗肿瘤活性涉及的分子机制

Table 1 Involved molecular mechanisms in anti-tumor activity of formononetin

药理作用	细胞/动物模型	给药剂量	分子机制
抑制细胞增殖	T24 细胞	20, 40, 80 μmol·L ⁻¹	下调 β-catenin mRNA 的表达并抑制 T24 细胞增殖 ^[14]
	T24 细胞	50, 100, 200 μmol·L ⁻¹	下调 miR-21 表达并抑制 T24 细胞增殖,使 PTEN 表达增加和 p-Akt 表达下调 ^[15]
	BALB/c 小鼠	25, 50, 100 mg·kg ⁻¹	降低 ER1, P53 和 ERBB2 的表达抑制细胞增殖,荷瘤小鼠肿瘤重量减轻 ^[30]
	ER ⁺ MCF-7 和 T-47D 细胞	25, 50, 100 μmol·L ⁻¹	上调 ERβ 的表达抑制细胞增殖 ^[31]
诱导细胞凋亡	MCF-7 细胞; BALB/c 小鼠	10, 20, 30, 40, 60, 80, 100 μmol·L ⁻¹ ; 20, 40, 80 μmol·L ⁻¹	使 IGF-1/PI3K/Akt 信号通路失活并抑制细胞增殖和诱导细胞周期停滞于 G ₀ /G ₁ 期;抑制裸鼠体内移植瘤生长 ^[7]
	U2OS 细胞	20, 40, 80 μmol·L ⁻¹	降低 Bcl-2 表达,增加 Caspase-3, Bax 的表达水平;降低 ERK 磷酸化和造成 Akt 失活 ^[12]
	HONE1 细胞	5, 10, 20, 40 μmol·L ⁻¹	下调 Akt 磷酸化水平并增大 Bax/Bcl-2 比值 ^[11]
	HeLa 细胞; BALB/c 裸鼠	1, 5, 10, 25, 50 μmol·L ⁻¹ ; 20, 40 mg·kg ⁻¹	Akt 失活和 Caspase-3 激活同时损害细胞能量代谢 ^[13]
	PC-3 细胞	25, 50, 100 μmol·L ⁻¹	激活 p38 MAPK 磷酸化水平后导致 Akt 的失活,上调 Bcl-2 水平和下调 Bax 表达 ^[45]
	T24 细胞	50, 100, 200 μmol·L ⁻¹	调控 miR-21 介导的 PTEN/Akt 通路 ^[15]
	MDA-MB-468 细胞; nu/nu 小鼠	150 μmol·L ⁻¹ ; 50 mg·kg ⁻¹	抑制 Akt 的活性 ^[47]
	U266 和 RPMI 8226 细胞; nu/nu 小鼠	50, 75, 100 μmol·L ⁻¹ ; 20 mg·kg ⁻¹	阻断 NF-κB 通路, PI3K/Akt 通路和 AP-1 蛋白的激活抑制细胞增殖 ^[48]
	MCF-7, BT-474, SK-BR-3 和 MDA-MB-2314 细胞	10, 20, 40, 80 μmol·L ⁻¹	抑制 Akt 磷酸化水平,促进 MK2206 对 PI3K/Akt 通路阻断作用 ^[49]
	LNCaP 和 PC-3 细胞	20, 40, 80 μmol·L ⁻¹	灭活 ERK1/2 介导的 MAPK 信号通路,导致 Bax mRNA 和蛋白表达水平增加 ^[52]
	DU-145 细胞	25, 50, 100 μmol·L ⁻¹	激活 RASD1 和 Bax 蛋白诱导凋亡 ^[9]
	BALB/c 裸鼠	10, 20, 40 mg·kg ⁻¹	激活 MAPK 信号转导途径 ^[53]
	CNE2 细胞	10, 20, 40 μmol·L ⁻¹	降低 Bcl-2, ERK1/2, Lamin A/C 和 CK19 表达,上调细胞内促凋亡蛋白 Bax 表达 ^[54]
MCF-7 细胞	40, 80 μmol·L ⁻¹	抑制 ERK 磷酸化并诱导细胞凋亡 ^[55]	
MKN-45 细胞	20, 40, 80 μg·mL ⁻¹	激活 NF-κB 信号通路进行诱导细胞凋亡 ^[56]	

续表 1

药理作用	细胞/动物模型	给药剂量	分子机制
	U266 和 RPMI 8226 细胞; nu/nu 裸鼠	100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	增加 ROS 水平,抑制 STAT3 和 STAT5 的信号级联,下调 STAT3/STAT5 的表达,同时抑制 JAK-1, JAK-2 和非 c-Src 的激活 ^[59]
	HeLa 细胞	25, 50, 75, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	提高 ROS 水平,触发线粒体凋亡途径、线粒体膜电位降低和 Caspase-9/3 激活,通过 ROS 介导抑制 MRP,同时激活线粒体的内源性和外源性死亡受体凋亡途径 ^[60]
	A549 细胞	40, 80, 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	下调 Cyclin E ₁ 表达而影响细胞周期,并下调 Bcl-2 和上调 Bax 表达而加速细胞凋亡 ^[62]
	A549 和 NCI-H23 细胞	50, 100, 150, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	上调 P53 在 Ser15/20 的磷酸化水平,并增强其转录活性,促进 Caspase-3 的裂解和 Bax 的表达 ^[63]
	U2OS 细胞;裸鼠	20, 40, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 80 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	诱导 miR-375 表达上调,使 Bcl-2 的表达降低而 Bax 的表达增加 ^[64]
	A375 细胞	25, 50, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	减小 Bcl-XL/Bax 蛋白表达的比例,从而启动 Caspase-3 途径诱导细胞凋亡 ^[65]
抑制迁移/侵袭	HCT-116 和 LoVo 细胞; BALB/c 小鼠	200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	下调 VEGF, MMP-2/9 蛋白等关键促血管生成因子的表达,具有抗血管生成和抗侵袭的作用 ^[70]
	MDA-MB-231 细胞; BALB/c 裸鼠	2.5, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 10, 20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	降低 PI3K/Akt 信号通路中 MMP-2/9 的表达 ^[72]
	A2780 和 SKOV3 细胞	80, 160, 240 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	降低 MMP-2/9 蛋白表达和 ERK 的磷酸化水平 ^[66]
	C6 细胞	80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	下调 MMP-2/9 的表达和抑制 C6 细胞的迁移 ^[73]
	C6 细胞;BALB/c 小鼠	18 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	凋亡蛋白(Bax 和 Caspase-3/9)的表达上调,而迁移蛋白(MMP-2/9)和抗凋亡蛋白(Bcl-2)的表达和活性下调 ^[67]
	CNE2 细胞	10, 20, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞内 Bcl-2, ERK1/2, Lamin A/C 和 CK19 的表达水平降低,而促凋亡蛋白 Bax 的表达水平上调 ^[54]
	MDA-MB-231 细胞	5, 10, 15, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	调控乳腺癌细胞中 HIF-1 α /CXCR4 信号转导影响癌细胞增殖和迁移 ^[79]
诱导细胞周期停滞	PC-3 细胞	25, 50, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	抑制 Akt 磷酸化,下调 Cyclin D ₁ 和 CDK4 的表达水平 ^[10]
	MCF-7, SK-BR-3 和 MD-AMB-231 细胞	40, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	降低 Cyclin D ₁ 和 Cyclin E ₁ 基因和蛋白表达同时负调控 P21 和 P27 表达 ^[84]
	SW1116 和 HCT116 细胞	20, 50, 100, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	下调 Cyclin D ₁ 的表达,将细胞周期阻滞在 G ₀ /G ₁ 点 ^[73]
	MDA-MB-468, MCF-7 和 SK-BR-3 细胞	40, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	减少 PCNA 蛋白的表达将细胞周期阻滞于 G ₁ 期 ^[83]

2 芒柄花素的衍生物

已有证据表明,与芒柄花素相比,几种新的芒柄花素生物活性衍生物在抗肿瘤活性方面更为有效,或者至少具有相当的效力,同时降低了药物毒性。胡昆等^[85]的研究显示,通过在芒柄花素的 3'位引入氮芥可以增强刺芒柄花素的体外抗肿瘤活性,而当 7 位上出现环烷基取代基时,化合物的抗肿瘤活性变化趋势最明显。REN 等^[86]研究显示芒柄花素氮芥子衍生物 6d 和 6n [半抑制浓度 (IC₅₀) 3.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]通过阻滞细胞周期于 G₂/M 期和诱导细胞凋亡,对结肠癌 HCT-116 细胞表现出相对于芒柄花素更强的抗肿瘤活性。在另一项研究中,芒柄花素-二硫代氨基甲酸酯衍生物 8i (IC₅₀ 1.97 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)通过调节 MAPK 和 Wnt 信号通路抑

制前列腺癌 PC-3 细胞的生长并诱导细胞凋亡^[87]。LIN 等^[88]合成了一系列新的芒柄花素衍生物,在这些衍生物中,4v (1/4 IC₅₀ 14.5 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞表现出更为有效的抗增殖活性,通过下调 EGFR/PI3K/Akt/Bcl-2 相关死亡启动子 (Bad) 和 EGFR/ERK 来有效诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡、抑制其增殖和迁移。在 YANG 等^[89]的研究中芒柄花素衍生物 10a (IC₅₀ 0.277 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)可抑制肝癌细胞 HepG2 的生长、侵袭和迁移,主要通过 Caspase 途径诱导肺癌 A549 细胞死亡并抑制该细胞中 Caspase-8 的表达。总体而言,芒柄花素衍生物在不同的人类肿瘤细胞系中显示出强大的抗肿瘤活性,并且对正常细胞显示出低毒性,表明芒柄花素的衍生物可以作为潜在的新药用治各类肿瘤。

3 小结与展望

芒柄花素的抗肿瘤活性在呼吸系统、消化系统、泌尿系统及生殖系统等各种系统的肿瘤中被广泛研究。越来越多的证据表明,芒柄花素通过抑制肿瘤细胞增殖、诱导凋亡和发展周期停滞以及抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭发挥抗肿瘤作用。关于抑制增殖的分子机制包括 WNT/ β -catenin 信号通路, miRNA, PTEN/Akt 通路, ERs, PI3K/Akt 信号通路及 P53 信号通路。芒柄花素诱导的肿瘤细胞凋亡与 ROS 水平增加, 线粒体介导的凋亡途径, MAPK 途径的调节和抑制 PI3K/Akt 途径有关。这些途径的调节导致促凋亡蛋白 Bax 的增加, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 的下调, 增加凋亡相关蛋白 Caspase-3/7 裂解水平并最终导致多种肿瘤细胞凋亡。众多途径之间存在交联, 例如, 芒柄花素诱导的线粒体凋亡途径激活与 Akt 失活有关。此外, 芒柄花素灭活 MAPK 信号通路可以导致促凋亡蛋白的表达水平增加。芒柄花素还通过发挥抑制细胞迁移和侵袭能力发挥抗肿瘤作用。主要取决于对 STAT3 信号通路的抑制和下调 VEGF, MMP-2/9 蛋白的表达。还发现 PI3K/Akt 途径, Lamin A/C 信号传导, CK19, ERK1/2 途径和 HIF-1 α /CXCR4 轴在芒柄花素对肿瘤细胞迁移和侵袭的抑制作用中起着重要作用。这些途径共同作用以抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡、诱导细胞周期停滞以及抑制细胞迁移和侵袭。此外, 一些新衍生物显示出比芒柄花素本身更强的抗肿瘤活性和更低的毒性。然而, 所有这些研究工作都是在肿瘤细胞系或异种移植动物模型中进行的, 因此需要具体的临床研究进一步评估芒柄花素在预防和治疗各种肿瘤中的有效性和安全性。芒柄花素的衍生物具有不同的特性与活性, 需要充分阐明和深入研究以确保这种植物化合物的生物活性对临床用药是安全的。芒柄花素显著的抗肿瘤活性使其成为开发抗肿瘤药物和协同抗肿瘤的新候选药物。

[参考文献]

- [1] 王伟群, 韩正康. 三叶草中芒柄花素的分离和含量测定[J]. 草业科学, 1989(1):20-22.
- [2] 宋肖炜, 李清, 叶静, 等. 黄芪不同炮制品中黄酮类成分的含量比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(9):85-88.
- [3] 梁永枢, 安冉, 刘军民, 等. 不同产地鸡血藤药材中染料木素及芒柄花素的含量测定[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(7):1655-1657.
- [4] 冯雪娇, 任虹, 曹学丽, 等. 鸡血藤中黄酮成分的高速

- 逆流色谱分离及其抗肿瘤活性研究[J]. 中草药, 2011, 42(11):2244-2247.
- [5] 程悦, 王志宇, 王冬梅, 等. 不同溶剂对鸡血藤提取物总黄酮含量及抗肿瘤活性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(9):142-145.
- [6] 李丹, 左海军, 高慧媛, 等. 苦参的化学成分[J]. 沈阳药科大学学报, 2004, 21(5):346-348.
- [7] CHEN J, ZENG J, XIN M, et al. Formononetin induces cell cycle arrest of human breast cancer cells via IGF1/PI3K/Akt pathways *in vitro* and *in vivo* [J]. Horm Metab Res, 2011, 43(10):681-686.
- [8] ZHOU R, CHEN H, CHEN J, et al. Extract from *Astragalus membranaceus* inhibit breast cancer cells proliferation via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. BMC Complement Altern Med, 2018, 18(1):83.
- [9] LIU X J, LI Y Q, CHEN Q Y, et al. Up-regulating of RASD1 and apoptosis of DU-145 human prostate cancer cells induced by formononetin *in vitro* [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(6):2835-2839.
- [10] LI T, ZHAO X, MO Z, et al. Formononetin promotes cell cycle arrest via downregulation of Akt/Cyclin D₁/CDK4 in human prostate cancer cells [J]. Cell Physiol Biochem, 2014, 34(4):1351-1358.
- [11] 祁承林, 梁娟, 李恒, 等. 芒柄花黄素对人鼻咽癌细胞株 HONE1 凋亡的诱导作用及其机制探讨[J]. 山东医药, 2016, 56(11):5-7.
- [12] LIU Y, HE J, CHEN X, et al. The proapoptotic effect of formononetin in human osteosarcoma cells: involvement of inactivation of ERK and Akt pathways [J]. Cell Physiol Biochem, 2014, 34(3):637-645.
- [13] JIN Y M, XU T M, ZHAO Y H, et al. *In vitro* and *in vivo* anti-cancer activity of formononetin on human cervical cancer cell line HeLa [J]. Tumour Biol, 2014, 35(3):2279-2284.
- [14] 曹峻, 张幸, 梁梅花, 等. 芒柄花黄素对膀胱癌细胞凋亡作用及对 β -catenin 通路的影响[J]. 广东医学, 2016, 37(21):3189-3192.
- [15] WU Y, ZHANG X, LI Z, et al. Formononetin inhibits human bladder cancer cell proliferation and invasiveness via regulation of miR-21 and PTEN [J]. Food Funct, 2017, 8(3):1061-1066.
- [16] SALIK B, YI H, HASSAN N, et al. Targeting RSPO3-LGR4 signaling for leukemia stem cell eradication in acute myeloid leukemia [J]. Cancer Cell, 2020, 38(2):263-278.
- [17] SOLEAS J P, D'ARCANGELO E, HUANG L, et al. Assembly of lung progenitors into developmentally-inspired geometry drives differentiation via cellular

- tension[J]. *Biomaterials*, 2020, 254: 120128.
- [18] CHOI B R, CAVE C, NA C H, et al. GDE2-dependent activation of canonical wnt signaling in neurons regulates oligodendrocyte maturation [J]. *Cell Rep*, 2020, 31(5): 107540.
- [19] ZHANG X, WANG L, QU Y. Targeting the β -catenin signaling for cancer therapy[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 160: 104794.
- [20] WEI C Y, ZHU M X, YANG Y W, et al. Downregulation of RNF128 activates Wnt/ β -catenin signaling to induce cellular EMT and stemness via CD44 and CTTN ubiquitination in melanoma [J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 21.
- [21] ZHOU J, TOH S H, CHAN Z L, et al. A loss-of-function genetic screening reveals synergistic targeting of Akt/mTOR and WTN/ β -catenin pathways for treatment of AML with high PRL-3 phosphatase[J]. *J Hematol Oncol*, 2018, 11(1): 36.
- [22] LIM Z F, MA P C. Emerging insights of tumor heterogeneity and drug resistance mechanisms in lung cancer targeted therapy[J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 134.
- [23] SIKORSKA A, FLISIKOWSKA T, STACHOWIAK M, et al. Elevated expression of P53 in early colon polyps in a pig model of human familial adenomatous polyposis[J]. *J Appl Genet*, 2018, 59(4): 485-491.
- [24] RASHID M, FISCHER A, WILSON C H, et al. Adenoma development in familial adenomatous polyposis and MUTYH-associated polyposis: somatic landscape and driver genes [J]. *J Pathol*, 2016, 238(1): 98-108.
- [25] ZHOU R, WU K, SU M, et al. Bioinformatic and experimental data decipher the pharmacological targets and mechanisms of plumbagin against hepatocellular carcinoma[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2019, 70: 103200.
- [26] WU K, WEI P, LIU M, et al. To reveal pharmacological targets and molecular mechanisms of curcumol against interstitial cystitis [J]. *J Adv Res*, 2019, 20: 43-50.
- [27] ZHANG L, GONG Y, WANG S, et al. Anti-colorectal cancer mechanisms of Formononetin identified by network pharmacological approach [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 7709-7714.
- [28] LI M, FU W, WO L, et al. miR-128 and its target genes in tumorigenesis and metastasis [J]. *Exp Cell Res*, 2013, 319(20): 3059-3064.
- [29] JANSSON M D, LUND A H. MicroRNA and cancer [J]. *Mol Oncol*, 2012, 6(6): 590-610.
- [30] HUANG Y, YANG Y B, ZHANG X H, et al. MicroRNA-21 gene and cancer [J]. *Med Oncol*, 2013, 30(1): 376.
- [31] ZARAVINOS A, RADOJICIC J, LAMBROU G I, et al. Expression of miRNAs involved in angiogenesis, tumor cell proliferation, tumor suppressor inhibition, epithelial-mesenchymal transition and activation of metastasis in bladder cancer [J]. *J Urol*, 2012, 188(2): 615-623.
- [32] KANG N H, HWANG K A, LEE H R, et al. Resveratrol regulates the cell viability promoted by 17 β -estradiol or bisphenol A via down-regulation of the cross-talk between estrogen receptor α and insulin growth factor-1 receptor in BG-1 ovarian cancer cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 59: 373-379.
- [33] GROBER O M, MUTARELLI M, GIURATO G, et al. Global analysis of estrogen receptor beta binding to breast cancer cell genome reveals an extensive interplay with estrogen receptor alpha for target gene regulation [J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 36.
- [34] RENOIR J M, MARSAUD V, LAZENNEC G. Estrogen receptor signaling as a target for novel breast cancer therapeutics [J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 85(4): 449-465.
- [35] HU W, WU X, TANG J, et al. Anti-cancer targets of formononetin and molecular mechanisms in osteosarcoma: findings of bioinformatic and experimental assays [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(5): 3505-3511.
- [36] CHEN J, ZHAO X, YE Y, et al. Estrogen receptor beta-mediated proliferative inhibition and apoptosis in human breast cancer by calycosin and formononetin [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2013, 32(6): 1790-1797.
- [37] CHEN L H, FANG J, SUN Z, et al. Enterolactone inhibits insulin-like growth factor-1 receptor signaling in human prostatic carcinoma PC-3 cells [J]. *J Nutr*, 2009, 139(4): 653-659.
- [38] IKUBO M, IKEDA H, KOBAYASHI A, et al. Insulin-like growth factor- I stimulates acromegaly-like specific mandibular enlargement in rats [J]. *Horm Metab Res*, 2004, 36(10): 696-701.
- [39] NICHOLSON K M, ANDERSON N G. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy [J]. *Cell Signal*, 2002, 14(5): 381-395.
- [40] SERRANO M L, SÁNCHEZ-GÓMEZ M, BRAVO M M, et al. Differential expression of IGF- I and insulin receptor isoforms in HPV positive and negative human cervical cancer cell lines [J]. *Horm Metab Res*, 2008,

- 40(10):661-667.
- [41] MOHAMMAD R M, MUQBIL I, LOWE L, et al. Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer [J]. *Semin Cancer Biol*, 2015, 35(Suppl):S78-S103.
- [42] AOKI M, FUJISHITA T. Oncogenic roles of the PI3K/Akt/mTOR axis [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2017, 407:153-189.
- [43] DIAB S, KUMARASIRI M, YU M, et al. MAP kinase-interacting kinases-emerging targets against cancer[J]. *Chem Biol*, 2014, 21(4):441-452.
- [44] MONIAN P, JIANG X. Clearing the final hurdles to mitochondrial apoptosis: regulation post cytochrome C release[J]. *Exp Oncol*, 2012, 34(3):185-191.
- [45] MARTINOU J C, YOULE R J. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics[J]. *Dev Cell*, 2011, 21(1):92-101.
- [46] PARK S, BAZER F, LIM W, et al. The *O*-methylated isoflavone, formononetin, inhibits human ovarian cancer cell proliferation by sub G₀/G₁ cell phase arrest through PI3K/Akt and ERK1/2 inactivation[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(9):7377-7387.
- [47] ZHANG X, BI L, YE Y, et al. Formononetin induces apoptosis in PC-3 prostate cancer cells through enhancing the Bax/Bcl-2 ratios and regulating the p38/Akt pathway[J]. *Nutr Cancer*, 2014, 66(4):656-661.
- [48] TAO J, LU Q, WU D, et al. MicroRNA-21 modulates cell proliferation and sensitivity to doxorubicin in bladder cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2011, 25 (6) : 1721-1729.
- [49] ZHOU Q, ZHANG W, LI T, et al. Formononetin enhances the tumoricidal effect of everolimus in breast cancer MDA-MB-468 cells by suppressing the mTOR pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, doi: 10.1155/2019/9610629.
- [50] KIM C, LEE J H, KO J H, et al. Formononetin regulates multiple oncogenic signaling cascades and enhances sensitivity to bortezomib in a multiple myeloma mouse model [J]. *Biomolecules*, 2019, 9 (7):262.
- [51] 盛佳钰, 陈红凤. 芒柄花素联合MK2206对不同亚型乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2015, 22(13):998-1003.
- [52] KIM E K, CHOI E J. Compromised MAPK signaling in human diseases: an update[J]. *Arch Toxicol*, 2015, 89(6):867-882.
- [53] XU J, KOIZUMI K, LIU M, et al. Shikonin induces an anti-tumor effect on murine mammary cancer via p38-dependent apoptosis[J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(3): 2020-2026.
- [54] YE Y, HOU R, CHEN J, et al. Formononetin-induced apoptosis of human prostate cancer cells through ERK1/2 mitogen-activated protein kinase inactivation [J]. *Horm Metab Res*, 2012, 44(4):263-267.
- [55] 董陈诚, 钟漓, 张广钰, 等. 芒柄花黄素对人胃癌细胞MKN-45荷瘤裸鼠模型的抑制作用及机制研究[J]. *重庆医学*, 2016, 45(32):4482-4483, 4486.
- [56] YING K, LIU Y, ZHANG C, et al. Medical findings of nasopharyngeal carcinoma patients and anti-tumor benefits of formononetin[J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 861:172619.
- [57] XIN M, WANG Y, REN Q, et al. Formononetin and metformin act synergistically to inhibit growth of MCF-7 breast cancer cells *in vitro* [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109:2084-2089.
- [58] 董陈诚, 钟漓, 张广钰, 等. 芒柄花黄素对人胃癌细胞株MKN-45增殖、凋亡的影响及其机制[J]. *山东医药*, 2017, 57(7):5-8.
- [59] SCHUMACKER P T. Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword[J]. *Cancer Cell*, 2006, 10(3):175-6.
- [60] GALADARI S, RAHMAN A, PALLICHANKANDY S, et al. Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress?[J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 104:144-164.
- [61] KIM C, LEE S G, YANG W M, et al. Formononetin-induced oxidative stress abrogates the activation of STAT3/5 signaling axis and suppresses the tumor growth in multiple myeloma preclinical model [J]. *Cancer Lett*, 2018, 431:123-141.
- [62] LO Y L, WANG W. Formononetin potentiates epirubicin-induced apoptosis via ROS production in HeLa cells *in vitro* [J]. *Chem Biol Interact*, 2013, 205 (3):188-197.
- [63] VOLKMANN N, MARASSI F M, NEWMAYER D D, et al. The rheostat in the membrane: BCL-2 family proteins and apoptosis[J]. *Cell Death Differ*, 2014, 21 (2):206-215.
- [64] 李自全, 孟祥娇. 芒柄花素对人非小细胞肺癌细胞增殖、凋亡的影响及相关机制探讨[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(20):138-142.
- [65] YANG Y, ZHAO Y, AI X, et al. Formononetin suppresses the proliferation of human non-small cell lung cancer through induction of cell cycle arrest and apoptosis [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7 (12) : 8453-8461.
- [66] HU W, XIAO Z. Formononetin induces apoptosis of

- human osteosarcoma cell line U2OS by regulating the expression of Bcl-2, Bax and MiR-375 *in vitro* and *in vivo*[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 37(3):933-939.
- [67] 刘彬,符秀琼,刘慰华,等. 芒柄花黄素对人黑色素瘤细胞株 A375 凋亡的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2014, 23(15):1603-1605.
- [68] ZHANG J, LIU L, WANG J, et al. Formononetin, an isoflavone from *Astragalus membranaceus* inhibits proliferation and metastasis of ovarian cancer cells[J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 221:91-99.
- [69] NI Q, FAN Y, ZHANG X, et al. *In vitro* and *in vivo* study on glioma treatment enhancement by combining temozolomide with calycosin and formononetin[J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 242:111699.
- [70] MURPHY G, NAGASE H. Progress in matrix metalloproteinase research [J]. *Mol Aspects Med*, 2008, 29(5):290-308.
- [71] GONZALEZ-AVILA G, SOMMER B, MENDOZA-POSADA D A, et al. Matrix metalloproteinases participation in the metastatic process and their diagnostic and therapeutic applications in cancer [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2019, 137:57-83.
- [72] AUYEUNG K K, LAW P C, KO J K. Novel anti-angiogenic effects of formononetin in human colon cancer cells and tumor xenograft [J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(6):2188-2194.
- [73] WANG A L, LI Y, ZHAO Q, et al. Formononetin inhibits colon carcinoma cell growth and invasion by microRNA-149-mediated EphB3 downregulation and inhibition of PI3K/Akt and STAT3 signaling pathways [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(6):7721-7729.
- [74] ZHOU R, XU L, YE M, et al. Formononetin inhibits migration and invasion of MDA-MB-231 and 4T1 breast cancer cells by suppressing MMP-2 and MMP-9 through PI3K/Akt signaling pathways [J]. *Horm Metab Res*, 2014, 46(11):753-760.
- [75] ZHANG X, NI Q, WANG Y, et al. Synergistic anticancer effects of formononetin and temozolomide on Glioma C6 cells[J]. *Biol Pharm Bull*, 2018, 41(8):1194-1202.
- [76] ZHOU J, BRUNE B. Cytokines and hormones in the regulation of hypoxia inducible factor-1alpha (HIF- α) [J]. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2006, 4(3):189-197.
- [77] MIRZAMOHAMMADI S, AALI E, NAJAFI R, et al. Effect of 17 β -estradiol on mediators involved in mesenchymal stromal cell trafficking in cell therapy of diabetes[J]. *Cytotherapy*, 2015, 17(1):46-57.
- [78] DING X, HUANG R, ZHONG Y, et al. CTHRC1 promotes gastric cancer metastasis via HIF-1 α /CXCR4 signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 123:109742.
- [79] SUN W, ZHANG L, HOU L, et al. Isatin inhibits SH-SY5Y neuroblastoma cell invasion and metastasis through MAO/HIF-1 α /CXCR4 signaling [J]. *Anticancer Drugs*, 2017, 28(6):645-653.
- [80] GUAN G, ZHANG Y, LU Y, et al. The HIF-1 α /CXCR4 pathway supports hypoxia-induced metastasis of human osteosarcoma cells[J]. *Cancer Lett*, 2015, 357(1):254-264.
- [81] 葛新,李林,王芳,等. 芒柄花素抑制乳腺癌细胞 HIF-1 α /CXCR4 信号以及细胞增殖和迁移[J]. *河南医学研究*, 2016, 25(9):1542-1545.
- [82] 赵新阁. 芒柄花黄素对前列腺癌 PC-3 细胞增殖的影响及其作用机制的探讨[D]. 桂林:桂林医学院, 2016.
- [83] 周瑞娟,陈红风,叶媚娜,等. 芒柄花素对不同亚型乳腺癌细胞增殖及细胞周期的影响[J]. *肿瘤防治研究*, 2012, 39(9):1051-1055.
- [84] 周瑞娟,陈红风,叶媚娜,等. 芒柄花素对不同亚型乳腺癌细胞周期基因和蛋白表达的影响[J]. *药物评价研究* 2016, 39(3):362-366.
- [85] 胡昆,徐华金,辛文群,等. 刺芒柄花素氮芥衍生物的合成及抗肿瘤活性[J]. *中国药科大学学报*, 2012, 43(2):113-119.
- [86] REN J, XU H J, CHENG H, et al. Synthesis and antitumor activity of formononetin nitrogen mustard derivatives[J]. *Eur J Med Chem*, 2012, 54:175-187.
- [87] FU D J, ZHANG L, SONG J, et al. Design and synthesis of formononetin-dithiocarbamate hybrids that inhibit growth and migration of PC-3 cells via MAPK/Wnt signaling pathways[J]. *Eur J Med Chem*, 2017, 127:87-99.
- [88] LIN H Y, SUN W X, ZHENG C S, et al. Synthesis, characterization and biological evaluation of formononetin derivatives as novel EGFR inhibitors via inhibiting growth, migration and inducing apoptosis in breast cancer cell line [J]. *Rsc Advances*, 2017, 7(76):48404-48419.
- [89] YANG C, XIE Q, ZENG X, et al. Novel hybrids of podophyllotoxin and formononetin inhibit the growth, migration and invasion of lung cancer cells[J]. *Bioorg Chem*, 2019, 85:445-454.

[责任编辑 王鑫]