水飞蓟宾诱导肺腺癌 Anip973 细胞凋亡的分子机制研究

李文海[1] 胡运生[2] 周勇安[1] 雷 杰[1] 苏 凯[1] 李小飞△

(1 第四军医大学唐都医院胸腔外科 陕西 西安 710038；2 第四军医大学唐都医院骨科 陕西 西安 710038)

摘要 目的：探讨水飞蓟宾诱导肺腺癌 Anip973 细胞系细胞凋亡的分子机制。方法：采用 MTT 法、倒置显微镜和电子显微镜等形态学检测以及流式细胞仪（FCM）技术检测、DNA Ladder 分析、凋亡分子 PARP 的表达检测细胞凋亡，同时进行凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2、caspase-3 和 caspase-9 表达活性分析。结果：(1) 水飞蓟宾对人肺腺癌 Anip973 细胞系细胞的增殖有显著抑制作用；(2) 水飞蓟宾作用 Anip973 细胞 48h 后，随着浓度的增加，倒置显微镜下可见细胞数目减少，胞体变小、变圆，到高浓度时出现较多的死亡细胞；(3) 扫描电镜观察发现，随着水飞蓟宾作用浓度的增加，Anip973 细胞中出现增多的凋亡细胞，凋亡细胞表现出典型的超微结构特征；(4) 流式细胞仪检测的结果发现，随着药物作用时间的延长，Anip973 细胞的 G1 期细胞比例增多，S 期细胞明显减少，G2 期细胞略有减少，并出现明显的凋亡峰。(5) 水飞蓟宾作用后的 Anip973 细胞出现明显的 DNA Ladder 和 PARP 降解增加等凋亡特征；(6) 水飞蓟宾作用后，Anip973 细胞中的凋亡相关蛋白 Bax 表达增加、caspase-3 和 caspase-9 酶活性增加，而 Bcl-2 表达降低。结论：水飞蓟宾在体外有抑制人肺腺癌细胞 Anip973 的增殖作用，并通过激活线粒体依赖的 caspase 凋亡通路，诱导其凋亡。

关键词 水飞蓟宾；肺癌细胞系 Anip973；细胞凋亡；caspase

中图分类号：R734.2 **文献标识码**：A **文章编号**：1673-6273(2011)09-1670-05

Molecular Mechanism of Sliybinin-induced Apoptosis of Lung Cancer Cell Anip973

LI Wen-hai[1], HU Yun-Sheng[2], ZHOU Yong-An[1], LEI Jie[1], SU Kai[1], LI Xiao-fei△

(1 Department of Thoracic Surgery, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, XI'an 710038, P. R. China;

2 Department of Orthopaedics Surgery, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, XI'an 710038, P. R. China)

ABSTRACT Objective: To investigate the molecular mechanism of Sliybinin-induced apoptosis of Lung Cancer Cell Anip973. Methods: The cancer cell apoptosis was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) colorimetric assay, morphological observations with inverted microscope and electron microscope, flow cytometry, DNA ladder analysis, expression analysis of PARP as well as the expression and activity analysis of some apoptosis-related proteins including Bax, Bcl-2, caspase-3 and caspase-9. Results: (1) Sliybinin had significant inhibiting effect on the cellular proliferation of Anip973 cells; (2) When treated by Sliybinin for 48 hours, with the increasing of the concentrations, the number of Anip973 cells decreased, the cell body became smaller and more circular under light microscope, and the number of dead cells escalated with an increased concentration of silymarin treatment. (3) More Anip973 cells presented apoptosis and these cells appeared typical ultrastructural features with the increasing of Sliybinin concentration; (4) The proportion of Anip973 cells in G1 phase increased, and the number of cells in S phase decreased significantly, which reduced slightly in G2 phase and also presented significant apoptotic peak with the prolongation of drug action; (5) The Anip973 cells treated with Sliybinin presented distinct apoptotic features including DNA ladder, PARP degradation, etc; (6) In Anip973 cells treated with Sliybinin, the expression of Bax and the enzyme activities of caspase-3 and caspase-9 increased, while the expression of Bcl-2 decreased. Conclusions: Sliybinin can inhibit the proliferation of human lung adenocarcinoma cell line Anip973 and induce its apoptosis by activating the mitochondria-dependent caspase cascade pathway.

Key words: Sliybinin; Lung cancer cell Anip973; Apoptosis; Caspase

Chinese Library Classification(CLC): R734.2 Document code: A

Article ID:1673-6273(2011)09-1670-05

前言

水飞蓟素(silymarin，SB)是从菊科植物水飞蓟中提取的黄酮类化合物。在水飞蓟素组分中水飞蓟宾(silibinin，SB)含量最多，生物活性也最强。研究表明 SB 和 SB 是一种很强的抗氧化剂[1,2]。其具有抗脂质过氧化、清除自由基、抑制 5- 脂氧合酶、维持细胞膜稳定性、促进肝细胞再生及降血脂作用。临床主要用于治疗中毒性及酒精相关性肝病，近年研究发现水飞蓟宾具有抗肿瘤作用，对膀胱癌、肺癌、结肠癌、前列腺癌均具有良好的抑制作用[1-4]，但目前对其抗肿瘤的机制尚无统一认识[5-6]。有研究认为水飞蓟宾抑制 NF-KB 的活性[7,8]，亦有研究认为水飞蓟宾是通过影响周期蛋白及相关激酶的活性起作用[9,10]。此外，还

作者简介：李文海(1973)，男，博士，主治医师、讲师，主要研究方向：肺癌的发病机制。Tel:86-29-84777736，E-mail:liwenhai@fmmu.edu.cn

△通讯作者：李小飞，Email:lxfchest@fmmu.edu.cn

(收稿日期：2011-02-23 接受日期：2011-03-18)

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

有研究表明,水飞蓟宾的作用是通过调控 ERK1/2 信号通路完成的[11,12]。为了进一步明确 SB 在肺癌治疗中的应用前景,本文研究了 SB 对人高转移表型肺腺癌 Anip973 的作用,并探讨了其抑制肿瘤细胞的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 高转移表型肺癌细胞系 Anip973 购于中科院生物化学及细胞生物学研究所细胞库。

1.1.2 药品与试剂 SB 购自中国药品生物制品检定所。无菌条件下,DMSO 溶解后,用 RPMI-1640 培养液稀释至所需浓度。溴化乙啶(EB),RNA 酶 A、蛋白酶 K 与噻唑蓝(MTT)为 Sigma 公司产品 (MO ,USA) ;NAD 为上海化学试剂公司购买。半胱天冬酶 -9 和半胱天冬酶 -3 活力检测试剂盒购自 Chemicon International(Temecula, CA, USA)。Bcl-2、Bax 多克隆羊抗兔抗体购于 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz , CA , USA),纯化的鼠抗人抗 PARP 单克隆抗体 Pharmingen 公司产品 ;RPMI1640 培养基、胎牛血清、胰酶购为美国 Gibco 公司产品。DMSO 为 Sigma 公司分装,HRP 标记的羊抗兔、羊抗鼠 IgG 为武汉博士德公司产品 ;ECL 检测试剂盒及 BCA 法蛋白定量试剂盒购自 PIERCE 公司。PMSF 购自 BIB 公司。硝酸纤维素转移膜购自 Amersham 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 肺腺癌细胞系 Anip973 接种于 25ml 培养瓶,培养液为含 10%胎牛血清、1× 10^5 U/L 青霉素和 100mg/L 链霉素的 RPMI 1640,置于 37℃、50ml/L CO_2、饱和湿度细胞培养箱中培养。

1.2.2 MTT 法观察 SB 对 Anip973 细胞增殖的影响 2.5g/L 的胰蛋白酶消化对数期生长的细胞,悬浮于含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液中,调整细胞浓度为 1.5× 10^7/L,接种于 96 孔培养板,每孔 100μL,培养 24h 后,分别加入含有不同浓度 SB 的 RPMI1640 培养液 100μl,使 SB 的终浓度为 5、10、15、20、40mg/L。同时设阴性对照组、空白对照组,阴性对照组为只加含有 DMSO 的 RPMI1640 培养液,空白对照组为不加细胞而只加培养基,每组设三个复孔,培养 24h、48h、72h 后,每孔加入 5g/L MTT20μl,继续培养 4h 后,吸去上清液,加入 150μl 的 DMSO 液,振荡培养板 10min,用酶标仪检测 OD 值,检测波长为 490nm,参考波长 630 nm。

1.2.3 倒置显微镜观察细胞形态学的变化 0.25%的胰蛋白酶消化对数期生长的 Anip973 细胞,悬浮于含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液中,调整细胞浓度为 1.5× 10^7/L,接种于 96 孔培养板中,每孔 100μl,培养 24h 后,分别加入含有不同浓度的 SBRPMI1640 培养液 100μl,使 SB 的终浓度分别为 0、10、20、40mg/L,培养 48h 后在倒置显微镜下观察、照相。

1.2.4 扫描电镜观察细胞超微结构 20mg/LSB 作用 Anip973 细胞 48h 后,0.25%胰蛋白酶溶液消化,用含 10%血清的 RPMI 1640 培养液悬浮细胞,将细胞悬液移入 10ml 玻璃离心管中,1000rpm 离心 5 min,弃上清液,再用 1mL 新鲜培养液重新悬浮细胞,然后将细胞悬液移入 1.5mL 的 EP 管中,1500rpm 离心 15min 后,吸去上清液,沿管壁缓慢加入 4℃预冷的 0.25ml/L 戊二醛固定细胞沉淀,送电镜室,包埋切片后,观察照相。

1.2.5 流式细胞术 (FCM) 测定细胞周期 20mg/LSB 分别作用 Anip973 细胞 24、48h 后,0.25%胰蛋白酶溶液消化,500rpm 离心 5min 收集细胞,弃去上清,用 PBS 洗涤细胞 2 次。用 0.9ml PBS 悬浮细胞制成单细胞悬液,缓慢加入 2.1ml 纯乙醇,使乙醇终浓度达 70%以固定细胞,置 4℃过夜。离心弃乙醇,用 PBS 洗涤细胞 2 次。用 100μl PBS 悬浮细胞,加碘化丙啶染色液 300μl,作用 15min。流式细胞仪测定细胞周期,观察 G1 期、G2 期、S 期各期细胞所占的百分比,观察是否存在凋亡峰。

1.2.6 FCM 检测细胞凋亡 分别用终浓度为 10、20、40mg/LSB 作用 Anip973 细胞 48h 后,0.25%胰蛋白酶溶液消化,500rpm 离心 5min 收集细胞,吸弃上清,用 PBS 洗涤细胞 2 次。后续步骤按照 Annexin Ⅴ-FITC 试剂盒说明书进行操作,用流式细胞仪定量分析细胞凋亡水平。

1.2.7 DNA Ladder 检测细胞凋亡 分别离心收集经过 40mg/LSB 处理 0、6h、24h、48h 后的 Anip973 细胞后,加细胞裂解液 (10mmol/LTris.Cl,pH7.6; 10mmol/LEDTA,pH8.0;0.5% Triton x-100) 13000rpm 离心 5min,收集上清 ;1% SDS 和 RnaseA (5g/L) 56℃孵育 2h ;加入蛋白酶 K (2.5g/L) 37℃孵育 2h ;1/10 体积 3M 醋酸钠和 2.5 倍体积的冷无水乙醇沉淀 DNA,4℃过夜。14000rpm 离心 15min,最后将沉淀溶解在 50μl TE buffer 中,加 DNA Loading Buffer,1.8%琼脂糖凝胶电泳,EB 染色并照相。

1.2.8 Western blot 检测凋亡分子 PARP 的表达 不同浓度(0、5、10、15、20、40mg/L)、不同时间点 (0、6h、12h、18h、24h、48h) SB 作用 Anip973 细胞后,PBS 洗涤,加入适量的 RIPA 裂解液在冰浴中裂解细胞,收集蛋白 BCA 法蛋白定量,取总蛋白相等的样品行 9%SDS-PAGE 电泳,然后电转移至 NC 膜上,用鼠抗人抗 PARP 单克隆抗体作为抗体,HRP 标记的羊抗鼠 IgG 作为抗体,ECL 发光法检测。

1.2.9 Western blot 检测 SB 对 Anip973 细胞中 Bax 及 Bcl-2 蛋白表达的影响 不同浓度 (0、5、10、15、20、40mg/L)SB 作用 Anip973 细胞 24h 后,收获细胞,检测细胞内 Bax 及 Bcl-2 的蛋白表达水平。分别用兔抗人 Bax 多抗和鼠抗人 Bcl-2 单抗分别作第一抗体,HRP 标记的羊抗兔和羊抗鼠的 IgG 作第二抗体,余操作同前。

1.2.10 caspase3 和 caspase9 活性检测 取 2× 10^5 个 Anip973 细胞,接种于 RPMI l640 培养液 (含 10%胎牛血清、青霉素 100U / ml、链霉素 100μg/ml)中,在 37℃、5% CO_2 及饱和湿度下培养,加 SB 致终浓度为 40mg/L,分别在 6、12、18、24、48h 终止培养。将收获的细胞在 500ul 细胞裂解液中冰浴 10min,10000× g 离心 1 min(4℃),取上清加入 2 倍反应缓冲液 50ul (含 10mmol/LDTF),再加入 5ml 4mmol/L LEHT-0NA 底物,37℃下孵育 2h,最后用 EL312 酶标仪 (BIO-TEK) 波长 400-405nm 扫描并统计结果。

2 结果

2.1 SB 对人高转移表型肺癌细胞系 Anip973 细胞增殖的抑制作用

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

SB 对人高转移肺腺癌 Anip973 细胞的增殖有显著地抑制作用，同一时间随着浓度的增加或者同一种浓度随着时间的延长其抑制作用增强(P<0.01，图 1)。其作用 48h 的半数抑制浓度(IC_{50})为 19.60mg/L。

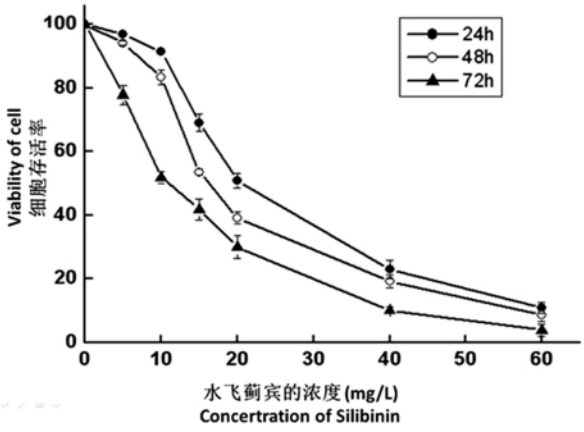


图 1 MTT 法检测 SB 对 Anip973 细胞增殖的抑制作用

Fig 1 Inhibitory effect of SB on Anip973 cell proliferation by MTT assay

2.2 倒置显微镜观察 SB 作用人高转移肺腺癌 Anip973 后形态学的变化

用终浓度分别为 0、10、20、40mg/L 的 SB 作用人高转移肺腺癌 Anip97348h 后，可见随着浓度的增加，细胞数目减少，有些细胞变小、变圆，有些细胞变大、到高浓度时出现较多的死亡细胞，特别是 40mg/LSB 作用 Anip973 细胞 48h 后，细胞大部分死亡。而未加药只加等量溶剂用 RPMI 1640 进行培养的 Anip973 细胞则生长良好，随着时间的延长，细胞数目增多，细胞密度加大。

2.3 扫描电镜观察 SB 作用 Anip973 细胞后细胞超微结构的变化

通过扫描电镜观察到：未经过 SB 处理的 Anip973 肿瘤细胞贴壁，并且生长旺盛，细胞表面的微绒毛多并且呈伸展状态；当 20mg/LSB 作用 Anip973 细胞 48h 后镜下可见细胞隆起，微绒毛减少消失，表面光滑，并可见凋亡小体形成，晚期凋亡小体脱离胞体形成团块状散落在周围。

2.4 FCM 检测 SB 对 Anip973 细胞的细胞周期的影响

流式细胞仪检测的结果发现，终浓度 20mg/L 的 SB 作用 Anip973 细胞 24hr，48hr 后，随着药物作用时间的延长，与阴性对照相比，细胞的 G1 期细胞比例增多，S 期细胞明显减少，G2 期细胞略有减少，出现了 G1 期阻滞 (图 2)。其中作用 24h、48h 后可在细胞周期图上出现明显的凋亡峰。

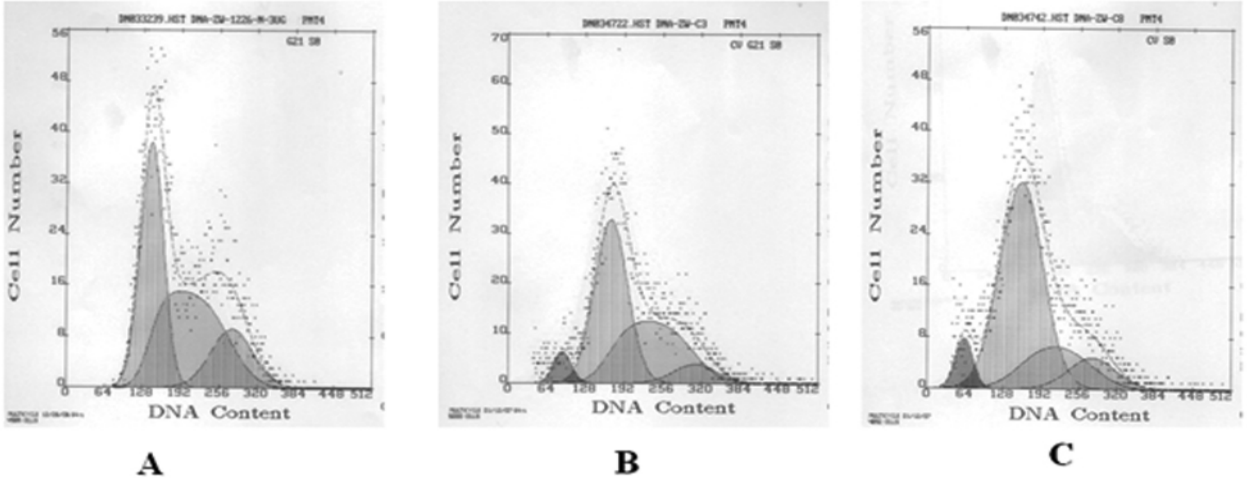


图 2 流式细胞仪检测 SB 对 Anip973 细胞的细胞周期影响结果：A：阴性对照组 B：20mg/L 的 SB 作用 24h 组 C：20mg/L 的 SB 作用 48h 组

Fig 2 SB affects cell cycle distribution of Anip973 detected by flow cytometry. A: Negative control. B: 20mg/L SB treatment after 24 h. C: 20mg/L SB treatment after 48 h.

2.5 FCM 检测 SB 诱导 Anip973 细胞凋亡率

终浓度为 10、20、40mg/LSB 作用 Anip973 细胞 24h 后，凋亡细胞的百分比依次为 11.6%、23.5%、38.2%，与阴性对照组 1.9%相比，各实验组的凋亡率具有显著差异性。(图 3)

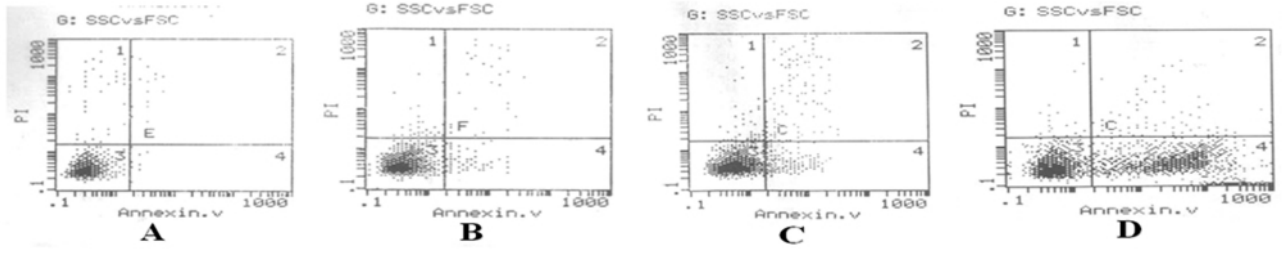


图 3 流式细胞仪检测 SB 对 Anip973 细胞凋亡的结果：A：阴性对照组 B：10mg/LSB 作用组 C：20mg/LSB 作用组 D：40mg/LSB 作用组

Fig 3 Anip973 cell apoptosis detected by flow cytometry after SB treatmentA: Negative control. B: 10mg/L SB. C: 20mg/L SB. D: 40mg/L SB

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.6 DNA Ladder 检测 SB 诱导 Anip973 细胞凋亡

Anip973 在经过 SB 处理 24 和 48 小时后都发生明显的凋亡，琼脂糖凝胶电泳出现间隔 180-200bp 的阶梯状条带，作用 24 与 48 小时后的条带更为明显 (图 4) 。

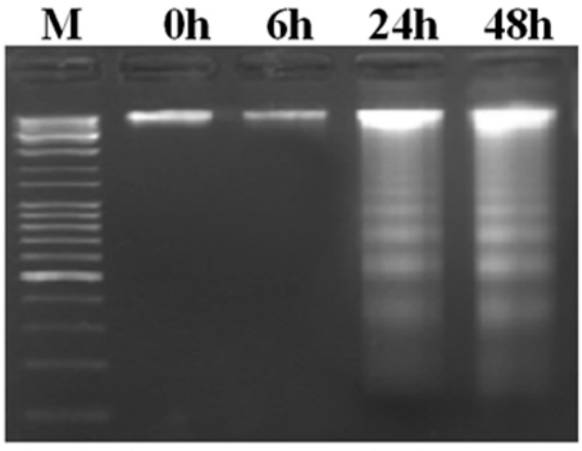


图 4 DNA Ladder 检测 SB 诱导 Anip973 细胞的凋亡:M: DNA Marker ladder MW10000

Fig 4 Bax and Bcl-2 expression detected by Western blotting in Anio973 cells treated with SB

2.7 Western blot 检测凋亡分子 PARP 的表达

用 Western blot 检测发现用不同浓度的 SB 作用 Anip973 细胞 12 小时后，10mg/L 开始就出现了 89KD 的降解片段；当用 10mg/LSB 作用 Anip973 细胞 6 小时后即出现了 PARP 片段的断裂。(图 5)

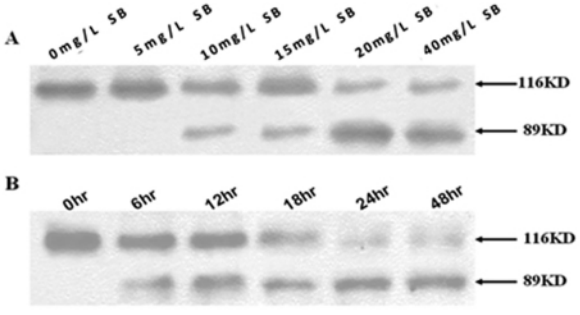


图 5 Western blot 检测凋亡分子 PARP 的表达结果:A :不同浓度的 SB 作用 Anip973 细胞 12h 的检测结果

B :10mg/L 的 SB 作用 Anip973 细胞不同时间点的检测结果

Fig 5 PARP expression detected by western blot A: Various concentration of SB treatment on Anip973 cells at 12 h post-administration. B: PARP degradation of 10 mg/L SB treatment on Anip973 cells at various time of post-administration.

2.8 Western blot 检测 SB 对 Anip973 细胞中 Bax 及 Bcl-2 蛋白表达的影响

Western-Blot 实验结果显示：SB 作用 Anip973 细胞 24h 后，随着药物作用浓度的增加，SB 可上调 Bax 的表达而下调 Bcl-2 的表达。该实验结果提示 SB 可通过降低 Bcl-2/Bax 的比例，促进细胞的凋亡 (图 6) 。

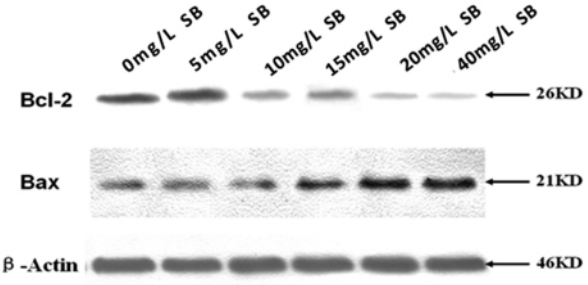


图 6 Western blot 检测 SB 对 Anip973 细胞中 Bax 及 Bcl-2 蛋白的表达

Fig 6 Caspase activity alteration in Anip973 cells after 40mg/L SB treatment

2.9 caspase3 和 caspase9 活性检测

检测结果显示 (图 7) ：随着作用时间的延长，高浓度的 SB 激活了 caspase9 和 caspase3 的活性，从而进一步证实 SB 促进 Anip973 细胞的凋亡依赖线粒体通路。

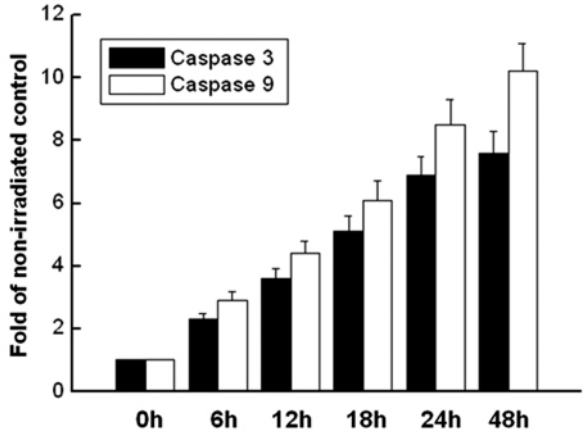


图 7 40mg/L 的 SB 对 Anip973 细胞内半胱天冬酶活性的影响

Fig 7 Caspase activity alteration in Anip973 cells after 40 mg/L SB treatment

3 讨论

水飞蓟素是菊科植物水飞蓟、乳蓟、朝鲜蓟等的提取物，对正常组织器官无明显毒副作用。近年来其抗肿瘤作用日益引起人们的关注，SB 是其主要成分，多项实验表明 SB 能够抑制肿瘤细胞的增殖及诱导肿瘤细胞凋亡[13-15]，其抗肿瘤作用机制与下列因素有关：(1) 诱导肿瘤细胞凋亡；(2) 诱导肿瘤细胞分化；(3) 抑制凋亡抑制因子的 Survivin 蛋白的表达；(4) 抑制蛋白激酶 ERK1/2 和 JNK1/2 的磷酸化；(5) 抑制肿瘤血管生成；(6) 抑制 TNF 所诱导的 NF-κ B 激活，促进 TNF-α 诱导细胞凋亡；(7) 促进 Caspase-9 及 Caspase-3 的激活和多聚 (ADP- 核糖) 聚合酶 (PARP) 的裂解。但是其在肺癌中的抗肿瘤机制目前尚未见相关报道。

本实验以肺腺癌 Anip973 为研究对象，通过形态学及流式细胞仪观察到 SB 可诱导肺腺癌 Anip973 产生凋亡，且具有时间和浓度依赖性。在凋亡发生过程中，半胱天冬酶(caspase)家族和 Bcl-2 家族发挥重要作用[16]。在半胱天冬酶家族成员中，半

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

胱天冬酶 -3 发挥重要的作用。半胱天冬酶 -3 以无活性的前体形式(procaspase-3)存在于细胞胞浆中,需要上游半胱天冬酶的激活才能行使功能。例如,procaspas-3 的活化被一种凋亡活化复合物调节,该复合物包括半胱天冬酶 -9 的活化形式。半胱天冬酶 -3 一旦被激活,它将发挥一系列的效应功能,包括切断 I-CAD 和 PARP 蛋白。其中切断 ICAD (inhibitor of caspase-3-activated DNase) 将导致 CAD (caspase-activated DNase),一种核酸内切酶的活化,从而引起 DNA 的片段化,导致细胞凋亡。本文研究发现 SB 能激活半胱天冬酶 -9 和半胱天冬酶 -3 活性并导致多聚 (ADP- 核糖) 聚合酶 (PARP) 的裂解从而促进细胞凋亡。另外,半胱天冬酶 -9 参与了线粒体相关的细胞信号转导通路。半胱天冬酶 -9 的活化与细胞色素 C (一种线粒体蛋白) 的释放有关,而 Bcl-2 家族成员调节细胞色素 C 从线粒体的释放[17]。通过免疫印记法检测发现 SB 作用于人高转移肺腺癌 Anip973 后,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达明显降低,而凋亡蛋白 Bax 的表达明显增加,说明 SB 的促凋亡机制与降低 Bcl-2/Bax 的比例有关。

本研究表明 SB 诱导肺癌细胞的凋亡主要通过线粒体途径,该结果不仅为 SB 的肺癌临床治疗提供了实验依据,而且也进一步拓展了其药理用途及研究价值。相信随着 SB 的机制研究和相关生物材料辅助技术的发展,将进一步促进 SB 在临床应用的潜力。

参 考 文 献 (References)

[1] Tsai MJ, Liao JF, Lin DY, et al. Silymarin protects spinal cord and cortical cells against oxidative stress and lipopolysaccharide stimulation [J]. Neurochem Int, 2010,57(8):867-875

[2] Payer BA, Reiberger T, Rutter K, et al. Successful HCV eradication and inhibition of HIV replication by intravenous silibinin in an HIV-HCV coinfected patient[J]. J Clin Virol, 2010,49(2):131-133

[3] Shanna G, Singh RP, Chan DC, et a1. Silibinin induces growth inhibition and apoptotic cell death in human lung carcinoma cells [J]. Anticancer Res, 2003,23(3B):2649-2655

[4] Yin F, Liu J, Ji X, Wang Y, et al. Silibinin: A novel inhibitor of Aβ aggregation[J]. Neurochemistry International, 2011,58(3): 399-403

[5] Zeng J, Sun Y, Wu K, et al. Chemopreventive and chemotherapeutic effects of intravesical silibinin against bladder cancer by acting on mitochondria[J]. Mol Cancer Ther, 2011,10(1):104-116

[6] Tiwari P, Kumar A, Balakrishnan S, et al. Silibinin-induced apoptosis in MCF7 and T47D human breast carcinoma cells involves caspase-8 activation and mitochondrial pathway[J]. Cancer Invest, 2011, 29(1): 12-20

[7] Manna SK, Mukhopadhyay A, Van NT, et a1. Silymarin suppresses TNF-induced activation of NF-kappa B. c-JunN-terminal kinase,and apoptosis[J]. J Immunol, 1999, 163(12):6800-6809

[8] Li LH, Wu LJ, Tashiro SI, et al. The roles of Akt and MAPK family members in silymarin's protection against UV-induced A375-S2 cell apoptosis[J]. Int Immunopharmacol, 2006 Feb;6(2):190-197

[9] Zi X, Feyes DK, Agarwal R. Anticarcinogenic efect of a flavonoid antioxidant, silymarin, in human breast cancer cells MDA-MB 468: Induction of Gl arrest through all increase in Cipl/p21 concomitant with a decrease in kinase activity of cyclin-dependent kinases and associated cyclins [J]. Clin Cancer Res, 1998, 4(4):1055-1064

[10] Bhatia N, Agarwal C, Agarwal R. Differential responses of skin cancer-chemopreventive agents silibinin, quercetin, and epigallocatechin 3-gallate on mitogenic signaling and cell cycle regulators in human epidermoid carcinoma A431 cells. Nutr Cancer, 2001,39(2):292-299

[11] Zi X, Grasso AW, Kung HJ, Agarwal R. A flavonoid antioxidant, silymarin, inhibits activation of erbB1 signaling and induces cyclin-dependent kinase inhibitors, G1 arrest, and anticarcinogenic effects in human prostate carcinoma DU145 cells [J]. Cancer Res, 1998 May 1; 58(9):1920-1929

[12] Agarwal R, Cell signaling and regulators of cell cycle as moecular targets for prostate cancer prevention by dietary agents [J]. Biochem Pharmaeol, 2000, 60(8):1051-1059

[13] Deep G, Agarwal R. Antimetastatic efficacy of silibinin: molecular mechanisms and therapeutic potential against cancer [J]. Cancer Metastasis Rev, 2010,29(3):447-463

[14] Zi X, Zhang J, Agarwal R, et a1. Silibinin up-regulates insulin-like growth factor-binding protein 3 expression and inhibits proliferation of androgen-independent prostate cancer cells [J]. Cancer Res, 2000, 60(20): 5617-5620

[15] Zhao J, Lahiri CM, Sharma Y, et a1. Inhibitory effect of a flavonoid antioxidant silymarin on benzoyl perox ide-induced tumor promotion, oxidative stress and inflammatory responses in SENCAR mouse skin [J]. Carcinogenesis, 2000,21(4):811-816

[16] Tyagi A, Agarwal C, Harrison G, et a1. Silibinin causes cell cycle arrest and apoptosis in human bladder transitional cell carcinoma cells by regulating CDKI-CDK-cyclin cascade,and caspase 3 and PARP cleavages [J]. Carcinogenesis, 2004,25(9):1711-1720

[17] Tsai WC, Rao YK, Lin SS, et al. Methylantcinate A induces tumor specific growth inhibition in oral cancer cells via Bax-mediated mitochondrial apoptotic pathway [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2010, 20 (20):6145-6148

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net