

# 桔皮素对人肝癌HepG2细胞体外增殖和侵袭的影响及机制研究

孙志欣\*, 张莹(天津中医药大学第一附属医院急诊病房, 天津 300193)

中图分类号 R966 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)34-4800-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.34.15

**摘要** 目的:考察桔皮素对人肝癌HepG2细胞体外增殖和侵袭的影响,并探讨其作用机制。方法:以0(空白对照组)、10、20、40、60、80  $\mu\text{mol/L}$  桔皮素分别作用于细胞24、48 h后,采用CCK-8法检测细胞增殖率,并计算其半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ )。以0、20、30  $\mu\text{mol/L}$  桔皮素作用细胞48 h后,采用Transwell侵袭实验考察其对细胞侵袭的影响;并分别采用实时荧光定量聚合酶链式反应法和Western blot法考察其对细胞中E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、Notch-1、免疫细胞表面抗原44(CD44)、基质金属蛋白酶9(MMP-9) mRNA及其蛋白表达的影响;采用Western blot法考察蛋白激酶B(Akt)、糖原合成酶激酶3 $\beta$ (GSK-3 $\beta$ )的磷酸化水平。结果:10~80  $\mu\text{mol/L}$  桔皮素对人肝癌HepG2细胞的体外增殖均具有明显的抑制作用,且呈时间和剂量依赖性,增殖率较空白对照组显著降低( $P<0.05$ ),作用24、48 h后的 $\text{IC}_{50}$ 分别为55.7、23.4  $\mu\text{mol/L}$ 。20、30  $\mu\text{mol/L}$  桔皮素作用48 h后,细胞侵袭能力明显受到抑制;细胞中N-cadherin、Vimentin、Notch-1、CD44和MMP-9 mRNA及其蛋白水平表达明显降低,E-cadherin mRNA及其蛋白表达水平明显升高,且Akt、GSK-3 $\beta$ 磷酸化水平升高,较空白对照组差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。结论:桔皮素可抑制人肝癌HepG2细胞的体外增殖和侵袭;其机制可能与下调细胞中Notch-1表达、抑制细胞的上皮-间质转化而抑制CD44和MMP-9的表达,以及抑制其上游Akt-GSK-3 $\beta$ 信号途径有关。

**关键词** 桔皮素;人肝癌HepG2细胞;增殖;侵袭;上皮-间质转化

## Effects of Tangeretin on *in vitro* Proliferation and Invasion of Human Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells and Its Mechanism Study

SUN Zhixin, ZHANG Ying (Dept. of Emergency Ward, the First Affiliated Hospital of Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To investigate the effects of tangeretin on *in vitro* proliferation and invasion of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells, and to investigate its mechanism. METHODS: After treated with 0 (blank control group), 10, 20, 40, 60, 80  $\mu\text{mol/L}$  tangeretin for 24, 48 h, the rate of cell proliferation was detected by CCK-8 assay, and  $\text{IC}_{50}$  was calculated. After treated with 0, 20, 30  $\mu\text{mol/L}$  tangeretin for 48 h, Transwell invasion test was used to investigate the effects of tangeretin on cell invasion. The effects of tangeretin on mRNA and protein expression of E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, Notch-1, CD44 and MMP-9 were determined by RT-PCR and Western blot assay. The phosphorylation of Akt and GSK-3 $\beta$  were investigated by Western blot assay. RESULTS: 10-80  $\mu\text{mol/L}$  tangeretin significantly inhibited *in vitro* proliferation of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells in time and dose-dependent manner; proliferation rates of them were significantly lowered, compared to blank control group ( $P<0.05$ );  $\text{IC}_{50}$  were 55.7, 23.4  $\mu\text{mol/L}$  after treated for 24, 48 h. After treated with 20, 30  $\mu\text{mol/L}$  tangeretin for 48 h, cell invasion was inhibited in HepG2 cells; mRNA and protein expression of N-cadherin, Vimentin, Notch-1, CD44 and MMP-9 decreased significantly, while those of E-cadherin increased significantly; the phosphorylated levels of Akt and GSK-3 $\beta$  increased; there was statistical significance between them and blank control group ( $P<0.05$ ). CONCLUSIONS: Tangeretin can inhibit *in vitro* proliferation and invasion of human hepatocellular carcinoma HepG2 cell, which may be associated with inhibiting the expression of CK44 and MMP-9 and signal pathway of upstream Akt-GSK-3 $\beta$  through up-regulating the expression of Notch-1 and inhibiting epithelial-mesenchymal transition.

**KEYWORDS** Tangeretin; Human hepatocellular carcinoma HepG2 cells; Proliferation; Invasion; Epithelial-mesenchymal transition

肝癌是我国发病率最高的恶性肿瘤之一,且近年其发病率和病死率均有上升的趋势<sup>[1]</sup>。即使采取以手术为主、化疗和放疗为辅的方法进行综合治疗,其预后仍不理想<sup>[2]</sup>。目前,肿瘤转移仍然是肝癌患者死亡的最主要原因,也是困扰临床医师的主要问题之一<sup>[3]</sup>。天然黄酮类物质桔皮素(Tangeretin)广泛存在于芸香科植物川橘果皮、酸橙果皮和柑橘茎叶中,具有

化痰消痞、理气和胃、抗真菌等功效<sup>[4-5]</sup>。近年来,大量体外研究证实了其可有效地抑制肝癌、乳腺癌、结肠癌等多种肿瘤细胞的生长、增殖,并具有毒副作用较低的特点<sup>[6-9]</sup>,是一种具有潜在肝癌治疗开发价值的天然药物,但其作用机制尚不清楚。基于此,本研究旨在探究桔皮素对人肝癌HepG2细胞增殖和侵袭的影响并探讨其作用机制,为将桔皮素开发用于肝癌的治疗提供实验依据。

\* 副主任医师,硕士。研究方向:天然产物对肿瘤的抑制作用和机制研究。E-mail:zhix74@163.com

## 1 材料

## 1.1 仪器

Multiskan FC 酶标仪(美国 Thermo 公司); IX73 倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司); 7500 实时荧光定量聚合酶链式(RT-PCR)分析仪(美国 ABI 公司); 高速离心机(美国 Beckman 公司)。

## 1.2 药品与试剂

桔皮素(南京科朗医药化工有限公司,批号:CS80005,纯度:98%); CCK-8 试剂盒(碧云天生物技术研究所,批号:C0038); Trizol 总 RNA 提取试剂盒(武汉科昊佳生物科技有限公司,批号:15596026); 染料法荧光 PCR 定量(SYBR Premix Ex Taq)试剂盒(批号:RR820A)均购自大连宝生物公司; 细胞侵袭试剂盒(美国 Corning 公司); 抗 E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、基质金属蛋白酶 9(MMP-9)和内参  $\beta$ -actin 抗体(美国 Santa Cruz 公司); Notch-1、免疫细胞表面抗原(CD)44、蛋白激酶 B(Akt)、磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt)、糖原合成酶激酶 3 $\beta$ (GSK-3 $\beta$ )和磷酸化糖原合成酶激酶 3 $\beta$ (p-GSK-3 $\beta$ )抗体和辣根过氧化物酶标记兔抗人免疫球蛋白 G(IgG)二抗(美国 Cell Signaling Technology 公司); 胎牛血清(FBS)和 RPMI 1640 细胞培养基(美国 Hyclone 公司); PCR 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

## 1.3 细胞

人肝癌 HepG2 细胞系购于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

## 2 方法

### 2.1 细胞的维持

将人肝癌 HepG2 细胞维持于含 10% FBS 及 100 u/ml 青霉素、100 mg/L 链霉素培养液的 RPMI 1640 培养基,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。待细胞长满后,常规更换培养液,0.25% 胰酶溶液消化,以 1:2 的比例传代。

### 2.2 细胞增殖试验

按照“2.1”项下条件进行细胞培养,待细胞长满后更换培养液,0.25% 胰酶溶液消化后进行试验。将细胞分为空白对照组(即 0  $\mu$ mol/L 组)和药物处理组(10、20、40、60、80  $\mu$ mol/L 桔皮素),每组设 6 个复孔,分别培养 24、48 h 后,每孔加入 CCK-8 溶液 10  $\mu$ l,于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中继续孵育 2 h 后,酶标仪测定其在 450 nm 波长处的吸光度(A)。试验重复 3 次,取 A 平均值计算细胞的增殖率[增殖率(%)=(药物处理组平均 A 值/空白对照组平均 A 值)×100%]; 采用 GraphPad Prism 6.0 软件计算半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)。

### 2.3 细胞侵袭试验

按照“2.1”项下条件进行细胞培养,待细胞长满后更换培养液,0.25% 胰酶溶液消化后进行试验。将细胞分为空白对照组(0  $\mu$ mol/L)和药物处理组(20、30  $\mu$ mol/L 桔皮素),培养 48 h 后,0.25% 胰酶溶液消化,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤后,以无血清 RPMI 1640 培养基混悬细胞密度为  $5 \times 10^5$  个/ml。取 200  $\mu$ l 细胞混悬液(相当于  $1 \times 10^5$  个细胞)加至 Transwell 小室,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 24 h。取出 Transwell 小室用棉签小心拭去基质胶及上室细胞,4% 多聚甲醛固定 10 min,结晶紫室温染色 25 min。显微镜下随机选 5 个视野进行拍照计数,计

算平均每个视野的细胞数,以穿过滤膜进入下室的细胞数来表示细胞的侵袭能力,侵袭抑制率(%)=(药物处理组下室细胞数/空白对照组下室细胞数)×100%。试验重复 3 次取平均值。

## 2.4 蛋白印迹试验

细胞的培养、分组情况同“2.3”项下。培养 48 h 后,RIPA 裂解液裂解细胞,以  $12\,000 \times g$ 、4 °C 离心 10 min 收集总蛋白。取 40  $\mu$ g 总蛋白上样,经 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳后转移至聚偏二氟乙烯膜(PVDF)膜上,分别加入稀释比例为 1:2 000 的抗 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、MMP-9 抗体和稀释比例为 1:1 500 的抗 Notch-1、CD44、Akt、p-Akt、GSK-3 $\beta$ 、p-GSK-3 $\beta$  抗体以及稀释比例为 1:2 500 的抗  $\beta$ -actin(内参)抗体,4 °C 孵育过夜。以辣根过氧化物酶标记兔抗人 IgG 二抗室温孵育 1 h,化学发光剂发光、显影,采用 Quantity One 软件进行各蛋白灰度值的测定。以目的蛋白条带灰度值与内参  $\beta$ -actin 蛋白条带灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达量,以 p-Akt、p-GSK-3 $\beta$  蛋白条带灰度值与 Akt、GSK-3 $\beta$  蛋白条带灰度值的比值表示 Akt、GSK-3 $\beta$  的磷酸化水平。

## 2.5 RT-PCR 试验

细胞的培养、分组情况同“2.3”项下。培养 48 h 后,采用 Trizol 法提取细胞总 RNA,紫外分光光度仪测定其浓度,并取 2  $\mu$ g 总 RNA 反转录合成 cDNA。反应程序:94 °C 预变性 3 min;95 °C 变性 50 s,退火 30 s,72 °C 延伸 95 s,35 个循环;72 °C 最后延伸 5 min,结束反应。以 GAPDH 作为内参基因,采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 法<sup>[10]</sup> 计算目的基因的相对表达量。引物序列、退火温度及产物大小见表 1。

表 1 RT-PCR 引物、退火温度及产物大小

Tab 1 RT-PCR primer, annealing temperature and product length

基因	引物序列	退火温度,°C	产物大小,bp
E-cadherin	上游:5'-GTCATCCAACGGGAATGCA-3'	58	60
	下游:5'-TGATCGGTTA CCGTGATCAAAA-3'		
N-cadherin	上游:5'-GGCATAACCCATGCCATCTT-3'	59	123
	下游:5'-GTGCATGAAGGACAGCCTCT-3'		
Vimentin	上游:5'-GCAAAGATTCACCTTTGCGT-3'	57	122
	下游:5'-GAAA TTGCAGGAGGAGATGC-3'		
Notch-1	上游:5'-ATAGTCTGCCACGCTCTG-3'	58	149
	下游:5'-AGTGT GAAGCGCCAATG-3'		
CD44	上游:5'-CCGTCCGAGAGATGCTGTAG-3'	60	150
	下游:5'-CGGACACCATGGACAAGTTT-3'		
MMP-9	上游:5'-TTGGTCCACCTGGTTCAACT-3'	60	95
	下游:5'-ACGACGCTTCCAGTACCGA-3'		
GAPDH	上游:5'-GAAATCCCATCACCATCTTCCAGG-3'	60	120
	下游:5'-GAGCCCCAGCCTTCTCCATG-3'		

## 2.6 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计学软件进行分析。试验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,各组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间两两比较采用 *t* 检验。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 桔皮素对人肝癌 HepG2 细胞增殖的抑制作用

10~80  $\mu$ mol/L 桔皮素培养细胞 24、48 h 后,细胞增殖明显受到抑制,并具有剂量和时间依赖性,细胞增殖率较空白对照

组明显降低( $P<0.05$ );且培养48 h后细胞增殖率较培养24 h后明显降低( $P<0.05$ ),结果见图1。培养24、48 h后的 $IC_{50}$ 分别为55.7、23.4  $\mu\text{mol/L}$ 。

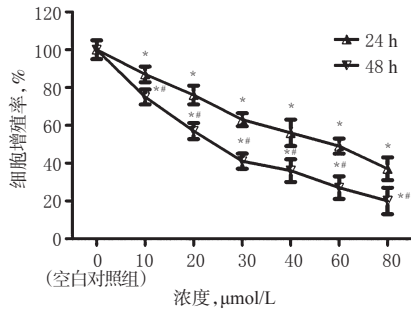


图1 不同浓度桔皮素作用不同时间后对人肝癌 HepG2 细胞体外增殖的影响

注:与空白对照组比较,\* $P<0.05$ ;与作用24 h比较,# $P<0.05$

Fig 1 Effects of different concentrations of tangeretin on *in vitro* proliferation of human hepatocellular carcinoma HepG2 cell after different periods

Note: vs. blank control group, \* $P<0.05$ ; vs. 24 h group, # $P<0.05$

### 3.2 桔皮素对人肝癌 HepG2 细胞体外侵袭的抑制作用

20、30  $\mu\text{mol/L}$  桔皮素培养细胞48 h后,对细胞的体外侵袭有明显的抑制作用,并具有量效关系,细胞的体外侵袭能力分别下降至45.2%和22.1%,较空白对照组明显降低( $P<0.05$ ),结果见图2。

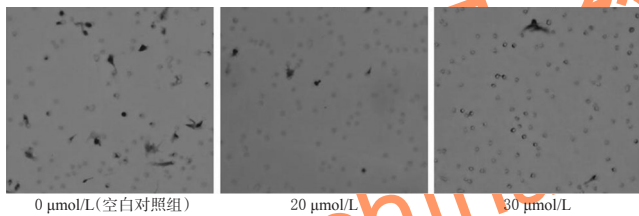


图2 不同浓度桔皮素作用48 h后对人肝癌 HepG2 细胞侵袭能力的影响( $\times 200$ )

Fig 2 Effects of different concentrations of tangeretin on invasion ability of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells after 48 h( $\times 200$ )

### 3.3 桔皮素对人肝癌 HepG2 细胞中肿瘤相关基因 mRNA 及其蛋白表达的影响

20、30  $\mu\text{mol/L}$  桔皮素培养细胞48 h后,细胞中 *N-cadherin*、*Vimentin*、*Notch-1*、*CD44*、*MMP-9* mRNA 及其蛋白表达均显著下调,*E-cadherin* mRNA 及其蛋白表达均显著上调,细胞中 Akt、GSK-3 $\beta$ 磷酸化水平降低,与空白对照组比较差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。这提示 Akt/GSK-3 $\beta$ 信号途径在桔皮素抑制肝癌细胞侵袭中发挥着重要作用,结果见图3、表2、表3。

## 4 讨论

本研究通过 CCK-8 试验证实,10~80  $\mu\text{mol/L}$  桔皮素能明显抑制人肝癌 HepG2 细胞的增殖,且其抑制作用呈时间和浓度依赖性,培养24、48 h后的 $IC_{50}$ 为别为55.7、23.4  $\mu\text{mol/L}$ 。为了体现桔皮素作用肿瘤细胞的浓度依赖性,并显示出较好的抑制效果以便于观察,本研究选取桔皮素培养48 h后 $IC_{50}$ 上、下两个浓度(20、30  $\mu\text{mol/L}$ )进行后续试验。Transwell 小室模型在体外进行肿瘤细胞侵袭能力的检测,结果发现桔皮素显

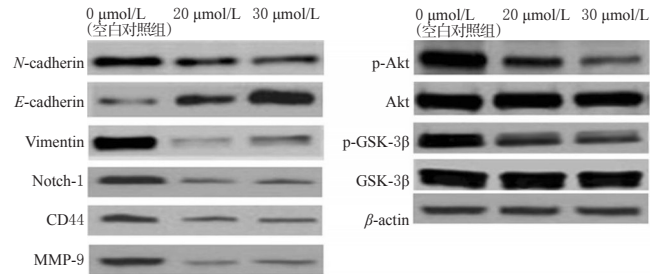


图3 不同浓度桔皮素作用48 h后人肝癌 HepG2 细胞中肿瘤相关基因蛋白表达的电泳图

Fig 3 Electrophoretogram of protein expression of tumor related gene in HepG2 cells after treated with different concentrations of tangeretin for 48 h

表2 不同浓度桔皮素作用48 h后对人肝癌 HepG2 细胞中肿瘤相关基因蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 2 Effects of different concentrations of tangeretin on protein expression of tumor related gene in HepG2 cells after 48 h( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

基因	0 $\mu\text{mol/L}$ (空白对照组)	20 $\mu\text{mol/L}$	30 $\mu\text{mol/L}$
<i>E-cadherin</i>	1.00 $\pm$ 0.15	1.52 $\pm$ 0.35*	1.72 $\pm$ 0.24*
<i>N-cadherin</i>	1.00 $\pm$ 0.18	0.54 $\pm$ 0.14*	0.47 $\pm$ 0.09*
<i>Vimentin</i>	1.00 $\pm$ 0.17	0.56 $\pm$ 0.18*	0.41 $\pm$ 0.16*
<i>Notch-1</i>	1.00 $\pm$ 0.15	0.49 $\pm$ 0.11	0.40 $\pm$ 0.11*
<i>CD44</i>	1.00 $\pm$ 0.11	0.52 $\pm$ 0.08*	0.36 $\pm$ 0.12*
<i>MMP-9</i>	1.00 $\pm$ 0.16	0.45 $\pm$ 0.08*	0.35 $\pm$ 0.13*
p-Akt/Akt	1.00 $\pm$ 0.12	0.72 $\pm$ 0.22*	0.62 $\pm$ 0.15*
p-GSK-3 $\beta$ /GSK-3 $\beta$	1.00 $\pm$ 0.11	0.68 $\pm$ 0.16*	0.58 $\pm$ 0.18*

注:与空白对照组比较,\* $P<0.05$

Note: vs. blank control group, \* $P<0.05$

表3 不同浓度桔皮素作用48 h后对人肝癌 HepG2 细胞中肿瘤相关基因 mRNA 表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 3 Effects of different concentrations of tangeretin on mRNA expression of tumor related gene in HepG2 cells after 48 h( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

基因	0 $\mu\text{mol/L}$ (空白对照组)	20 $\mu\text{mol/L}$	30 $\mu\text{mol/L}$
<i>E-cadherin</i>	1.00 $\pm$ 0.11	1.52 $\pm$ 0.11*	1.72 $\pm$ 0.14*
<i>N-cadherin</i>	1.00 $\pm$ 0.08	0.54 $\pm$ 0.20*	0.47 $\pm$ 0.12*
<i>Vimentin</i>	1.00 $\pm$ 0.07	0.56 $\pm$ 0.13*	0.41 $\pm$ 0.12*
<i>Notch-1</i>	1.00 $\pm$ 0.01	0.49 $\pm$ 0.20*	0.40 $\pm$ 0.02*
<i>CD44</i>	1.00 $\pm$ 0.10	0.52 $\pm$ 0.12*	0.36 $\pm$ 0.11*
<i>MMP-9</i>	1.00 $\pm$ 0.04	0.45 $\pm$ 0.05*	0.35 $\pm$ 0.03*

注:与空白对照组比较,\* $P<0.05$

Note: vs. blank control group, \* $P<0.05$

著抑制 HepG2 细胞的体外侵袭能力。

上皮-间质转化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)在细胞侵袭过程中扮演着重要角色,其在 EMT 过程中使有极性的上皮细胞失去极性,转换成具有活动能力、能够在细胞基质间自由移动的间质细胞,使没有侵袭能力的细胞获得浸润能力并最终转移到其他组织和器官,从而使肿瘤形成局部浸润和远端转移。*E-cadherin*、*N-cadherin* 和 *Vimentin* 是最主要的 EMT 标志物。细胞中 *E-cadherin* 表达减少可导致细胞间连接解体以及细胞分散;*N-cadherin* 以及细胞角蛋白细胞骨架转化为 *Vimentin* 后,细胞骨架重排,形成细胞-基质黏附,引起细胞

表型的改变以及细胞运动能力增强。因此,阻断或逆转 EMT 过程有可能会成为肿瘤抗侵袭治疗的新途径。为了探讨 EMT 在桔皮素抑制人肝癌 HepG2 细胞侵袭的作用,笔者检测了 EMT 标志物的表达变化。本研究结果显示桔皮素可抑制 N-cadherin 和 Vimentin 的表达,而使 E-cadherin 表达量明显上升,这提示桔皮素可能通过抑制人肝癌 HepG2 细胞的 EMT 过程而抑制细胞的侵袭。

Notch 信号通路广泛存在于多种生物体组织细胞中,是一种在进化过程中十分保守的信号转导系统,该通路对细胞生长、发育、凋亡等生物学行为有着重要作用<sup>[1]</sup>。跨膜受体蛋白 Notch-1 是 Notch 信号通路的关键蛋白。大量研究表明,Notch-1 蛋白在多种肿瘤中异常表达,其与肿瘤的发生、发展以及肿瘤耐药过程关系密切<sup>[2]</sup>。MMPs 是一组能够降解 ECM 的锌离子( $Zn^{2+}$ )依赖性内肽酶,是能够降解 IV 型胶原的重要基质蛋白酶之一。MMP-9 已被证明在 ECM 降解、新血管生成、肿瘤细胞的生长和凋亡等重要过程,以及在肿瘤侵袭、转移的复杂过程中起了关键性的作用<sup>[3]</sup>。Notch-1 可通过影响 Akt-GSK-3 $\beta$  以及下游转录因子活性而调节 MMP-9 的表达。本研究结果显示,桔皮素可抑制人肝癌 HepG2 细胞中 Notch-1 的表达,而且 Notch-1 作用下游基因 MMP-9 的表达也明显受抑制,这提示桔皮素可能通过调控 Notch-1 的表达而抑制肝癌细胞的侵袭。

GSK-3 $\beta$  是一种多功能的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是 Akt 最早发现的直接底物之一。 $\beta$ -链蛋白( $\beta$ -catenin)作为一种细胞骨架蛋白可在胞膜处与 E-cadherin 形成复合体,对维持细胞间黏附、防止肿瘤转移而发挥重要作用。Akt-GSK-3 $\beta$  信号途径参与细胞的生长分化、凋亡调控以及肿瘤发生发展过程。活化的 Akt 可以磷酸化 GSK,从而拮抗  $\beta$ -catenin 的降解,胞浆中  $\beta$ -catenin 积聚使其浓度增高,下调 E-cadherin 表达,进而促进肿瘤细胞运动<sup>[4]</sup>,最终诱导了 EMT,并促进肿瘤的侵袭和转移。本研究发现,桔皮素能抑制 Akt 和 GSK-3 $\beta$  的活性,这提示桔皮素可通过调节 Akt-GSK-3 $\beta$  信号途径抑制肝癌 HepG2 细胞的增殖和侵袭过程。

综上所述,本研究证明了桔皮素具有抑制肝癌 HepG2 细胞增殖和体外侵袭的能力,其机制可能为下调 Notch-1 表达、抑制细胞 Akt-GSK-3 $\beta$  信号途径和上皮-间质转化而抑制 CD44 和 MMP-9 的表达。可见,桔皮素具有较好的抗肝癌细胞增殖和侵袭作用。本研究为桔皮素作为潜在的抗肿瘤药物应用于临床提供了实验基础和依据。

## 参考文献

[1] Xiang ZW, Sun L, Li GH, *et al.* Progress in the treatment of pulmonary metastases after liver transplantation for hepatocellular carcinoma[J]. *World J Hepatol*, 2015, 7(20):2309.

[2] Huang J, Yang J, Lei Y, *et al.* An ANCCA/PRO2000-miR-520a-E2F2 regulatory loop as a driving force for the development of hepatocellular carcinoma[J]. *Oncogenesis*, 2016, 5(5):e229.

[3] Colecchia A, Schiumerini R, Cucchetti A, *et al.* Prognostic factors for hepatocellular carcinoma recurrence[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(20):5935.

[4] Omar HA, Mohamed WR, Arab HH, *et al.* Tangeretin alleviates cisplatin-induced acute hepatic injury in rats: targeting MAPKs and apoptosis[J]. *PLoS One*, 2016, 11(3):e0151649.

[5] Lee YY, Lee EJ, Park JS, *et al.* Anti-inflammatory and antioxidant mechanism of tangeretin in activated microglia[J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2016, 11(2):294.

[6] He YF, Liu FY, Zhang WX. Tangeritin inhibits adipogenesis by down-regulating C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , and PPAR $\gamma$  expression in 3T3-L1 fat cells[J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(4):13642.

[7] 石歆.桔皮素对人非小细胞肺癌细胞生长及侵袭的影响[J].*中国病理生理杂志*, 2015, 31(3):452.

[8] Lakshmi A, Subramanian SP. Tangeretin ameliorates oxidative stress in the renal tissues of rats with experimental breast cancer induced by 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene[J]. *Toxicol Lett*, 2014, 229(2):333.

[9] Xu JJ, Liu Z, Tang W, *et al.* Tangeretin from citrus reticulate inhibits respiratory syncytial virus replication and associated inflammation in vivo[J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63(43):9520.

[10] Zhang X, Zheng L, Sun Y, *et al.* Tangeretin enhances radiosensitivity and inhibits the radiation-induced epithelial-mesenchymal transition of gastric cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2015, 34(1):302.

[11] Sun L, Liu M, Sun GC, *et al.* Notch signaling activation in cervical cancer cells induces cell growth arrest with the involvement of the nuclear receptor NR4A2[J]. *J Cancer*, 2016, 7(11):1388.

[12] Yoon HS, Ko HC, Kim SS, *et al.* Tangeretin triggers melanogenesis through the activation of melanogenic signaling proteins and sustained extracellular signal-regulated kinase in B16/F10 murine melanoma cells[J]. *Nat Prod Commun*, 2015, 10(3):389.

[13] Wang YH, Sui XM, Sui YN, *et al.* BRD4 induces cell migration and invasion in HCC cells through MMP-2 and MMP-9 activation mediated by the Sonic hedgehog signaling pathway[J]. *Oncol Lett*, 10(4):2227.

[14] Liu ZC, Wang HS, Zhang G, *et al.* AKT/GSK-3 $\beta$  regulates stability and transcription of snail which is crucial for bFGF-induced epithelial-mesenchymal transition of prostate cancer cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840(10):3096.

(收稿日期:2016-02-15 修回日期:2016-07-18)  
(编辑:林 静)