

文章编号:1001-6880(2016)11-1838-07

黄酮抗癌作用研究进展

曾佑炜*

广东轻工职业技术学院环境工程系,广州 510300

摘要:黄酮作为一种多酚化合物,广泛存在于果蔬、花果、茶叶和蜂蜜中。流行病学数据表明,食用黄酮类化合物可以降低癌症发病的风险。黄酮类化合物具有显著的药理作用,如抗氧化、抑制蛋白激酶、抑制拓扑异构酶、抑制血管再生、激活癌细胞DNA反应通路、诱导癌细胞自吞噬、阻断癌细胞分裂周期、诱导癌细胞凋亡等方面。其机理可能与相关蛋白激酶、拓扑异构酶、血管内皮生长因子、5'-腺苷酸活化蛋白激酶、DNA损伤反应途径和细胞凋亡途径等有关。本综述为进一步了解黄酮可能的抗癌功能提供帮助。

关键词:黄酮;抗癌作用;研究进展

中图分类号:R961

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.11.027

Review on Anticancer Effects of Plant-based Flavonoids

ZENG You-wei*

Department of Environmental Engineering, Guangdong Industry Polytechnic, Guangzhou 510300, China

Abstract: Flavonoids, which are polyphenolic phytochemicals generally found in vegetables, fruits, flowers, nuts, seeds, tea, and honey. There is epidemiological data to suggest that consumption of flavonoids can be accompanied by decreased cancer incidence. Flavonoids has therapeutic applications owing to its wide range of pharmacological effects including antioxidant, inhibition of protein kinase, inhibition of topoisomerase, inhibition of angiogenesis, activating the DNA damage response, inducing the autophagy, blocking the cell cycle, and inducing apoptosis. The antitumor effect of flavonoids and its underlying mechanism are related to interactions with protein kinase, topoisomerase, vascular endothelial growth factor, 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase, DNA damage response pathway, apoptotic pathways. This review contributed to clarifying the mechanisms of the actions of flavonoids in anticancer effects.

Key words: flavonoids; anticancer effects; review

癌症作为一种多因素的异质性疾病,是全世界死亡率最高的疾病之一。由于化疗产生相关毒副作用,因此对发展新的抗癌药物提出了更多需求,而以植物天然产物为基础的临床药物成为新的研究方向。黄酮类化合物存在于果蔬、花果、茶和蜂蜜中,有显著的药理作用,如抗氧化、抗突变、抗菌、抗炎、抗血管生成、抗过敏、酶活性调节和抗癌活性,且对正常细胞无任何毒副作用。黄酮类化合物作为一种存在游离昔元或糖昔结合物的植物化学物质,主要包括黄酮、黄酮醇、二氢黄酮、异黄酮、黄烷醇、黄烷酮醇、黄烷酮,以及基于饱和查尔酮、C-环取代模式和中央吡喃开环的化合物(图1),结构模式的多样性使黄酮类化合物被认为是一个丰富的潜在抗癌化合物来源。大量研究表明,黄酮类化合物对癌细胞

具有阻滞细胞周期、诱导细胞凋亡、破坏有丝分裂纺锤体的形成和抑制血管生成的能力,使其可能成为新的抗癌药物^[1,2]。近年来,黄酮类化合物及其合成类似物已在卵巢、乳腺、宫颈癌、胰腺、前列腺癌治疗等方面进行了许多有益的探索^[3]。其中如槲皮素、染料木黄酮等已进入临床试验阶段。在分子水平上,已经报道黄酮类化合物可调节多种在肿瘤病理中起着重要作用的蛋白激酶,如蛋白激酶-C、丝氨酸酪氨酸激酶、细胞周期蛋白依赖性激酶(Cyclin-dependent protein kinases, Cdks),和调节表皮生长因子受体(Epithelial growth factor receptor, EGFR)、血小板衍生的生长因子受体(Platelet-derived growth factor receptor, PDGFR)、血管内皮生长因子受体(Vascular endothelial growth factor, VEGFR)等的活性;也能有效抑制如黄嘌呤氧化酶、环氧合酶(Cyclooxygenase, COX)和脂氧合酶(Lipoxygenase, LOX)等参与炎症和癌症病理的酶的活性^[4]。同时还可

通过抑制 I 相代谢酶(例如细胞色素 P450, 这些代谢酶可代谢激活大量的致癌物质触发癌变)活性、调节 II 相代谢酶, 例如谷胱甘肽 S 转移酶(Glutathione S-transferase, GST)、醌还原酶、葡醛酸转移酶(UDP glucuronosyl transferase, UGT)活性, 发挥一定

的化学预防作用, 消除致癌物的影响。黄酮类化合物的化学预防作用包括清除对肿瘤生长起主要促进作用的活性氧(Reactive oxygen species, ROS)和促氧化剂、消除炎症等, 这些都突出体现了其抗肿瘤的发展潜力^[5]。

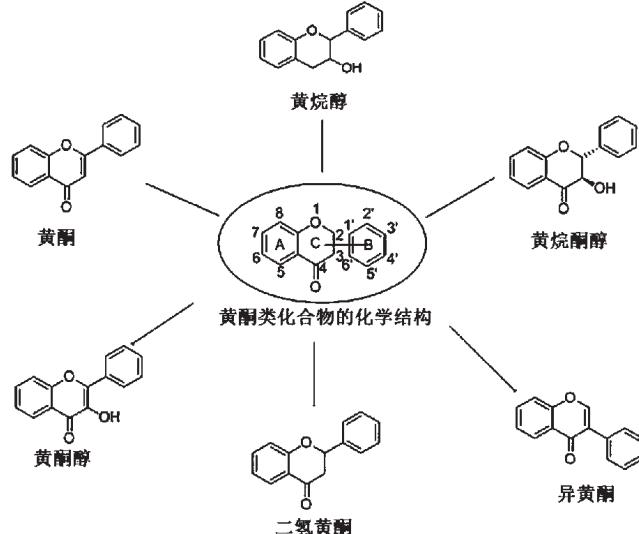


图 1 黄酮类化合物的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of flavonoids

1 黄酮的抗氧化作用

自由基在不同条件下可扮演肿瘤抑制或促进剂的双重角色(图 2)。抗氧化剂是一种延迟、防止或消除对目标分子氧化损伤的物质。

黄酮类化合物在生物系统中的抗氧化保护作用表现在:①直接清除活性氧自由基 ROS;②抑制超氧阴离子氧化酶(如黄嘌呤氧化酶、COX、LOX、微粒体单加氧酶、GST、线粒体琥珀酸氧化酶和 NADH 氧化酶)的活性;③增加包括大部分 II 相解毒酶[例如 NAD(P)H-醌氧化还原酶、GST 和 UGT]等抗氧化酶的活性, 这些防御酶主要防止亲电毒物与氧化应激;④螯合微量元素, 这在氧代谢起着重要的作用, 因为游离铁和铜在活性氧自由基积累形成过程中是潜在的增强子, 其通过高活性的羟基自由基生成过氧化氢, 或形成铜介导的低密度脂蛋白(LDL), 特定的黄酮类化合物能螯合铁和铜等金属离子, 并减少自由基的形成与发展;⑤缓解由一氧化氮(NO)引起的氧化胁迫, NO 在维持血管扩张方面起着重要作用, 但高浓度会导致氧化损伤。

Dajas 等用槲皮素预处理原代培养海马神经元后, 发现槲皮素可显著抑制 β 淀粉样蛋白诱导的细胞毒性、蛋白质氧化、脂质过氧化和细胞凋亡^[6], 证明槲皮素可以对脑神经形成抗氧化保护^[7]; 研究表明橙皮苷和橙皮素可以清除不同自由基引起的细胞毒性^[8], 芹菜素、木犀草素等黄酮类物质能缓解多种脂多糖活化的细胞系中 NO 引起的氧化应激。

2 抑制蛋白激酶

蛋白激酶在病理状态下失去控制, 从而使得磷酸化过程产生变化, 进而导致细胞分裂失去控制、抑制细胞凋亡和其它异常情况, 抑制蛋白激酶被认为是一种抗癌和治疗其它相关疾病的一种有效疗法。研究表明, 黄酮类化合物可以作为蛋白质酪氨酸激酶、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶、磷脂酰肌醇 3-激酶抑制剂。通过槲皮素、芹菜素、漆黄素、刺槐亭、杨梅素、三羟异黄酮和鹰嘴豆芽素-A 等黄酮类化合物对 P40 蛋白质酪氨酸激酶(该激酶参与到细胞生长和分化及肿瘤发生)抑制性的体外研究表明, 多羟基化的黄酮和黄酮醇与 P40 以高度亲和性相连并且抑

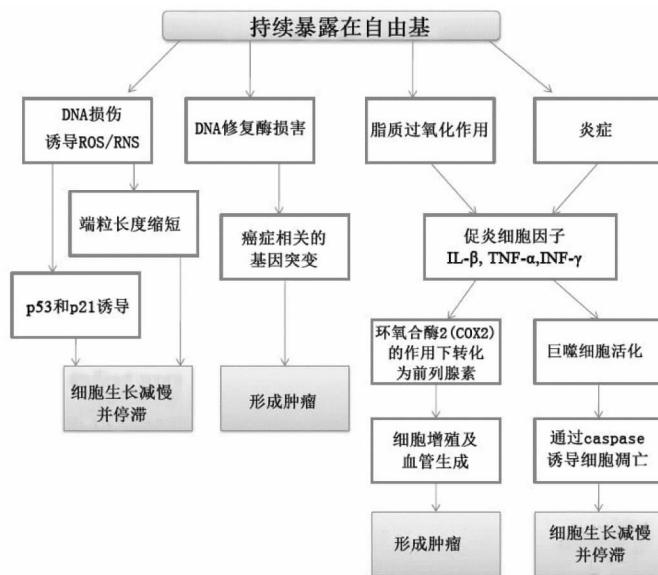


图 2 不同条件下自由基扮演肿瘤抑制或促进剂的双重角色

Fig. 2 Free radical acts as a dual role of tumor suppressor or promoter in different conditions

制蛋白质酪氨酸激酶活性^[9]。黄酮类化合物的生物信息学分析(通过化合物的活性光谱预测工具 PASS)显示了大豆苷元是一种高效的蛋白激酶抑制剂。木犀草素呈现出极高的蛋白激酶 C 抑制活性, 其以一种 ATP 竞争方式结合蛋白激酶 C 并且抑制蛋白激酶 C 和 Src 激酶的活性^[10,11]。Agullo 等研究认为黄酮醇是最有效的磷脂酰肌醇 3-激酶(PI 3-激酶)抑制剂^[12]。

3 抑制拓扑异构酶

拓扑异构酶是在 DNA 复制、转录和重组过程中为维持 DNA 拓扑结构起着必不可少作用的一种酶。大量的研究报道了黄酮类化合物和其它多酚类化合物能够抑制和破坏哺乳动物的拓扑异构酶 I 和酶 II。人类的拓扑异构酶 I 和人类白血病 HL60 细胞系的重组研究显示, 槲皮素、合金欢素、芹菜苷元、山奈酚、桑色素和木犀草素等黄酮类化合物发现有抑制拓扑异构酶 I 催化的 DNA 连接过程。根据取代基的模式不同, 黄酮或黄酮醇通过稳定接触反应中的拓扑异构酶 I-DNA 中间体或者抑制 DNA 结合游离酶而起作用^[13]。使用 TARDIS(琼脂糖凝胶 DNA 免疫染色)实验检测拓扑异构酶抑制活性显示, 在 K562 细胞中, 槲皮素和芹菜苷元起充当拓扑异构酶 II 毒物作用, 但是对拓扑异构酶 I 没有作用^[14,15]。

黄酮类化合物上取代基的模式决定着它们的功能, 或作为拓扑异构酶抑制剂/拮抗剂, 或作为拓扑

异构酶的毒物。C-5 上羟基的出现对拓扑异构酶 I 毒性是必需的, 缺乏 C-5 上羟基则对于拓扑异构酶 I 和酶 II 催化活性呈现产生至关重要的影响。C-3 位置上酚环的位置(就像异黄酮)似乎能增加黄酮类化合物作为拓扑异构酶 II 毒物的毒性。一般来说, C-3、C-7 位置上的羟基和 C = O、C-2 和 C-3 之间的双键使得化合物形成一个共平面的共轭 A-C-环系统被认为对抑制拓扑异构酶是必需的。B-环上的临位二羟基取代基模式一般呈现出增加黄酮类化合物的抑制活性^[16](图 3)。

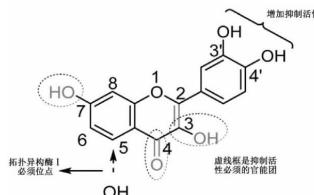


图 3 影响拓扑异构酶抑制活性结构

Fig. 3 Key structural features required for the topoisomerase inhibitory activity

4 抑制血管再生

黄酮类化合物通过调节参与血管生成过程中各种蛋白质中的血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)、基质金属蛋白酶(Matrix metalloproteinase, MMPs) 和 EGFR 的表达和通过抑制 NF κ B、PI3-K/Akt、ERK 1/2 信号途径从而引起抗

血管再生效果^[17,18]。Pratheeshkumar 等报道称槲皮素和木犀草素都抑制 VEGF, 诱导 VEGF 受体 2 和他们下游蛋白激酶 AKT、mTOR 及 HUVEC(人静脉血管内皮细胞)中核糖体蛋白 S6 蛋白激酶的磷酸化^[19]。

5 激活癌细胞 DNA 损伤反应通路

黄酮类物质在癌细胞中通过 ROS 激活 DNA 损伤反应途径(DNA damage response pathway, DDR 途径), 产生外源性 DNA 损伤, 可进一步诱导癌细胞凋亡^[20,21], 降低 DNA 修复基因如 Ku70、Ku86、RAD51、BRCA1 和 BRCA2 的表达^[22]。已发现木犀草素可以诱导肿瘤细胞产生明显的 DNA 断裂, 增大人马特同源(Human MutT homolog, MTH)、8 羟基鸟嘌呤 DNA 糖苷酶(8-oxoguanine-glycosylase, OGG)、嘌呤核酸内切酶的表达^[23]。

6 诱导癌细胞自噬作用

Rikiishi 等认为, 黄酮类物质可诱导癌细胞中的自噬作用^[24]。Cao 等通过自噬体和酸性自噬泡的外观显示, 观察到用芹菜素处理的肿瘤细胞表现出的自噬作用, 并认为芹菜素介导的自噬机制与诱

导 AMP 依赖的蛋白激酶(5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)信号传导通路有关^[25]。Park 等同样也观察到了木犀草素可使肿瘤细胞产生广泛的内空泡化、P62 蛋白降解从而增强自噬通量的现象^[26]。

7 阻断癌细胞分裂周期

黄酮类物质对正常与癌细胞有较高的选择性, 通过上调细胞周期蛋白激酶抑制因子 p21 或下调细胞周期蛋白 D, 使癌细胞分裂周期停留在 G1/S 和 G2/M 阶段, 从而抑制肿瘤细胞生长^[27,28]。Casagrande 等认为, 槲皮素、大豆昔元、山奈酚、芹黄素和染料木素等, 都可以抵制人类 OCM-1 黑素瘤细胞 CDK2 或 CDK1 的活性, 从而诱发 G1 期细胞周期停止或引起 G2/M 期细胞大量积累^[29]。McVean 等和 Chen 等也证明芹菜素可诱导癌细胞产生 G1/S 和 G2/M 周期阶段的阻滞^[30,31], 木犀草素可阻滞癌细胞从 G1 期进入 S 期, 其机制可能为: 黄酮类物质→抑制 Akt 蛋白激酶(蛋白激酶 B)→激活 GSK-3β(糖原合成酶激酶-3)→下调细胞周期蛋白 D1 的表达→阻滞细胞周期^[32]。

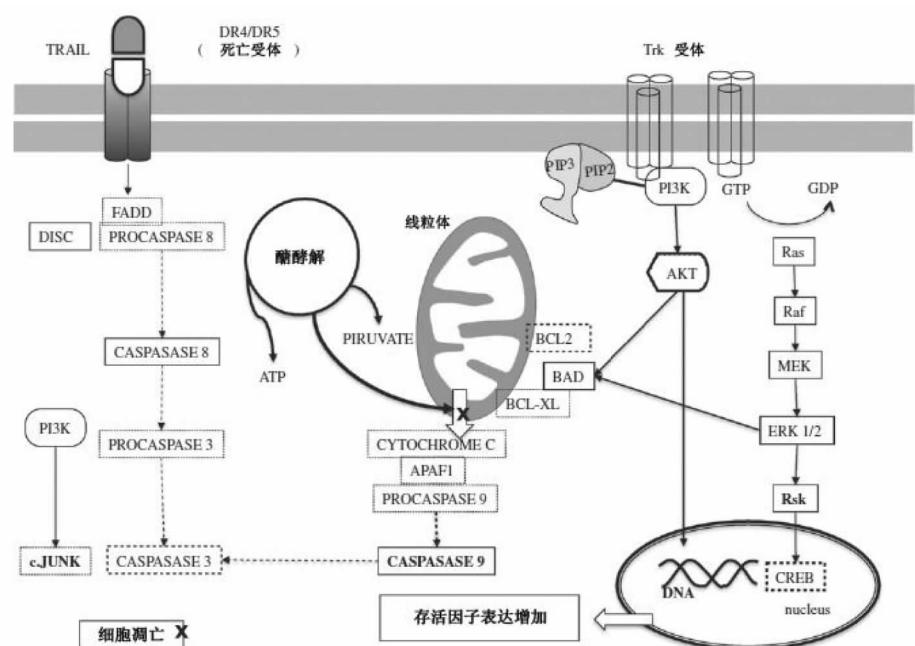


图 4 肿瘤细胞中主要的信号转导通路的激活及其与线粒体之间的关系

Fig. 4 Schematic view of the main signaling cascades activated in cancer and their relationship with the mitochondria
注:PI3K/Akt 信号传导通路:激活的 PI3K 诱导 Akt 活化;从 PI3K/Akt 通路存留的信号主要通过磷酸化和促凋亡蛋白失活转导, 如 BAD(BCL-XL/BCL-2 相关死亡启动子) 和 caspase-9; Akt 磷酸化激活 CREB(cAMP 反应元件结合蛋白) 导致抗凋亡 Bcl-2 家族蛋白基因的编码转录(×:抑制作用)。

8 诱导癌细胞凋亡

胞外存活信号通过激活 IP3K/Akt 信号通路抑制细胞凋亡, Akt 磷酸化激活 CREB, 导致抗凋亡蛋白编码基因的转录, 如 BCL-2 和 BCL-XL。通过控制这个和其他生存通路的活化, 如大鼠肉瘤/快速加速纤维肉瘤/ ERK 激酶/ ERK (Ras/Raf/MEK/ERK) 途径, 激活同样是 BAD (BCL-XL/BCL-2 相关死亡启动子) 和 CREB 受体的 P90 核糖体 S6 激酶 (Rsk), 癌细胞中的分子突变可产生协同作用, 从而维持癌细胞生存(图 4)。

槲皮素已被认为是一个广泛的激酶抑制剂, 对磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt)/蛋白

激酶 B (Akt/PKB), 酪氨酸激酶, 蛋白激酶 C (PKC), 和丝裂原活化蛋白激酶 (MAP 激酶) 信号传导通路具有抑制作用^[33], 从而促进癌细胞凋亡。槲皮素诱导癌细胞的促凋亡基因 Bax 的表达的同时, 增加了抗凋亡基因 BCL-2 和 ERK 的磷酸化^[34,35]。在肿瘤细胞, 槲皮素、杨梅素等可以与不同的蛋白 (BCL-2 蛋白、caspases 脱门蛋白酶) 相互作用, 直接或间接抑制肿瘤中的存活信号传导通路 (包括 PI3K/Akt、MAPKs、ERK 和 PKC), 促进细胞色素 C 的释放和脱门蛋白酶的激活; 抑制丙酮酸激酶同工酶 M2 (Pyruvate kinase M2, PKM2) 的活性, 阻滞肿瘤细胞的糖酵解^[36], 从而触发细胞凋亡(图 5)。

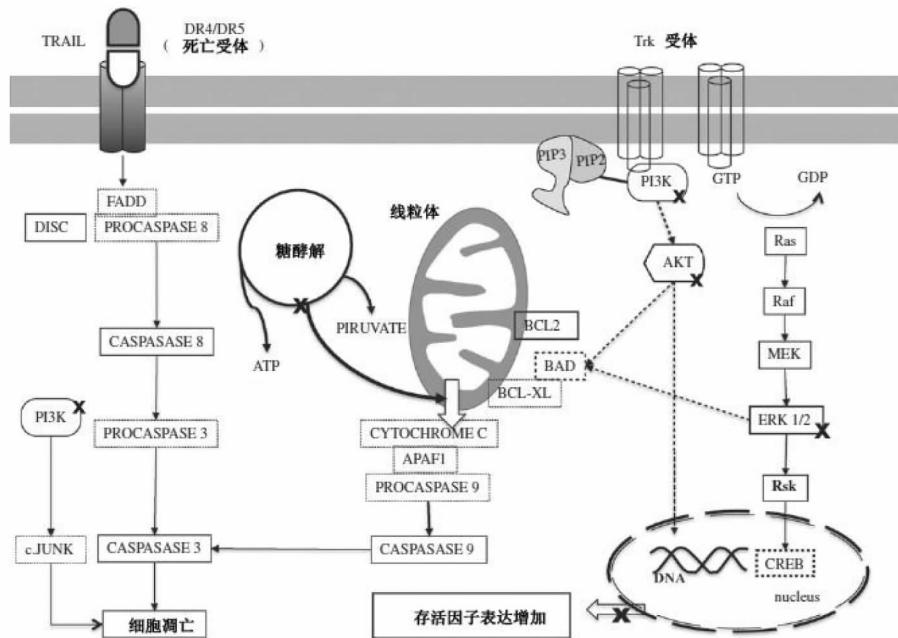


图 5 肿瘤细胞中主要的信号转导通路的激活及其与线粒体和细胞凋亡之间的关系

Fig. 5 Schematic view of the main signaling cascades activated in cancer and their relationship with the mitochondria and apoptosis
注:RAS/ RAF/ MEK/ERK(大鼠肉瘤/快速加速纤维肉瘤/ ERK 激酶/胞外信号调节激酶)通路的激活,产生 RSK (P90 核糖体 S6 激酶)活化。Bad 和 CREB 同样也是 Rsk 的目标,它们可能与 Akt 一起相互协同激活存活通路。(缩写:TRAIL:肿瘤坏死因子 α -TNF 相关凋亡诱导因子;Trk:酪氨酸激酶受体; \times :抑制作用)。

9 结论

总之, 黄酮类物质对癌细胞的作用主要包括抗氧化、抑制蛋白激酶、抑制拓扑异构酶、抑制血管再生、激活癌细胞 DNA 损伤反应通路、诱导癌细胞自吞噬、阻断癌细胞分裂周期、诱导癌细胞凋亡等几个方面(图 6)。

黄酮类物质具有广泛的抗氧化活性及蛋白激酶

调节的功能, 其抗氧化活性、促进细胞凋亡和肿瘤抑制活性是其抗癌作用的基础, 同时可与相关蛋白相互作用, 如蛋白激酶 B (Akt) (Akt)、Fyn、MEK1、JAK1-STAT3 (JAK 激酶 - 信号转导与转录激活因子 3), 抑制癌细胞的恶性转化, 抑制有丝分裂作用的靶向细胞周期素依赖性激酶 1 (CDK1) 在癌细胞中的表达。此外, 它还针对线粒体, 促使不同类型的癌细胞死亡。然而, 许多黄酮类物质的抗癌作用研究目前还只限于体外研究, 活性分子的低生物利用度

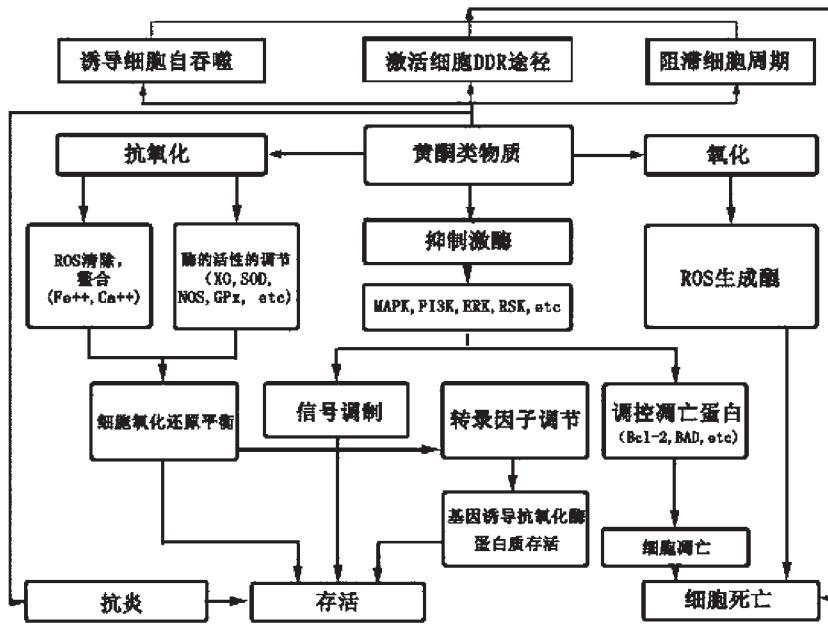


图 6 黄酮类化合物抗癌作用总结

Fig. 6 Summary of the anticancer effects of flavonoids

和不确定性影响了体外实验结果对于解释体内变化的准确性。因此,有必要从体内进一步对黄酮类物质在肿瘤细胞内抗氧化活性的条件,及其对基因表达的细胞核效应的关系、活性分子的识别和如何利用载体(如脂质体)来改善其生物利用度,作进一步研究。

参考文献

- Orfali GCO, et al. Review of anticancer mechanisms of isoquercitin. *World J Clin Oncol*, 2016, 7:189-199.
- Lea MA. Flavonol regulation in tumor cells. *J Cellular Biochem*, 2015, 116:1190-1194.
- Lall1 RK, et al. Dietary flavonoid fisetin for cancer prevention and treatment. *Molecul Nutr Food Res*, 2016, 60:1396-1405.
- Devi KP, et al. Molecular mechanisms underlying anticancer effects of myricetin. *Life Sci*, 2015, 142:19-25.
- Ahmad A, et al. Therapeutic potential of flavonoids and their mechanism of action against microbial and viral infections—A review. *Food Res Int*, 2015, 77:221-235.
- Dajas F, et al. Flavonoids and the brain: evidences and putative mechanisms for a protective capacity. *Current Neuropharmacol*, 2005, 3:193-205.
- Ossola B, et al. The multiple faces of quercetin in neuroprotection. *Expert Opinon Drug Safety*, 2009, 8:397-409.
- Iranshahi M, et al. Protective effects of flavonoids against microbes and toxins: The cases of hesperidin and hesperetin. *Life Sci*, 2015, 137:125-132.
- Geahlen RL, et al. Inhibition of protein-tyrosinase kinase activity by flavonoids and related compounds. *J Nat Prod*, 1989, 52:982-986.
- Byun S, et al. Luteolin inhibits protein kinase C (epsilon) and c-Src activities and UVB-induced skin cancer. *Cancer Res*, 2010, 70:2415-2423.
- Gyémánt N, et al. *In vitro* search for synergy between flavonoids and epirubicin on multidrug-resistant cancer cells. *Vivo*, 2005, 19:367-374.
- Agullo G, et al. Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. *Biochem Pharmacol*, 1997, 53:1649-1657.
- Boege F, et al. Selected novel flavones inhibit the DNA binding or the DNA reagation step of eukaryotic topoisomerase. *J Biol Chem*, 1996, 271:2262-2270.
- Willmore E, et al. Etoposide targets topoisome-rase II alpha and II beta in leukemic cells: isoform-specific cleavable complex esvisualized and quantified in situ by a novel immunofluorescence technique. *Molecul Pharmacol*, 1998, 54:78-85.
- Padget K, et al. Camptothecin-stabilised topoiso-merase I - DNA complexes in leukemia cells visualised and quantified in situ by the TARDIS assay (trapped in agarose DNA immunostaining). *Biochem Pharmacol*, 2000, 59:629-638.
- Ciszak E, et al. Flavonoid conformational analysis: comparison of the molecular structures of (Z)-4,4',6-triacetoxyaurone

- and (Z)-3',5'-dibromo-2',4,4'6-tetrahydroxyaurone monohydrate by crystallographic and molecular orbital methods. *J Molecul Structure*, 1991, 251:345-57.
- 17 Mojzisa J, et al. Antiangiogenic effects of flavonoids and chalcones. *Pharmacol Res*, 2008, 57:259-265.
- 18 Pratheeshkumar P, et al. Luteolin inhibits human prostate tumor growth by suppressing vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis. *PLoS One*, 2012b, 7:12.
- 19 Pratheeshkumar P, et al. Quercetin inhibits angiogenesis mediated human prostate tumor growth by targeting VEGFR-2 regulated AKT/mTOR/P70S6K signaling pathways. *PLoS One*, 2012a, 7:10.
- 20 Petruccelli LA, et al. Vorinostat induces reactive oxygen species and DNA damage in acute myeloid Leukemia cells. *PLoS One*, 2011, 6:1733-1735.
- 21 Panat NA, et al. Troxerutin, a natural flavonoid binds to DNA minor groove and enhances cancer cell killing in response to radiation. *Chemico-Biol Interactions*, 2016, 251:34-44.
- 22 Eot-Houllier G, et al. Histone deacetylase inhibitors and genomic instability. *Cancer Lett*, 2009, 274:169-176.
- 23 Leung HW, et al. Luteolin induced DNA damage leading to human lung squamous carcinoma CH27 cell apoptosis. *Eu J Pharmacol*, 2005, 508(1-3):77-83.
- 24 Rikiishi H. Autophagic and apoptotic effects of HDAC inhibitors on cancer cells. *Biomed Res Int*, 2011, 2011 (4): 830260.
- 25 Cao X, et al. Autophagy inhibition enhances apigenin-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Chin J Cancer Res*, 2013, 25:212-222.
- 26 Park SH, et al. Induction of endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis and non-canonical autophagy by luteolin in NCI-H460 lung carcinoma cells. *Food Chem Toxicol*, 2013, 56:100-109.
- 27 Khan O, et al. HDAC inhibitors in cancer biology: emerging mechanisms and clinical applications. *Immunol Cell Biol*, 2012, 90:85-94.
- 28 Pal-Bhadra M, et al. Plant HDAC inhibitor chrysins arrest cell growth and induce p21WAF1 by altering chromatin of STAT response element in A375 cells. *BMC Cancer*, 2012, 12(1): 1-17.
- 29 Casagrande F, et al. Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells; regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochem Pharmacol*, 2001, 61:1205-1215.
- 30 McVean M, et al. A p21(waf1)-independent pathway for inhibitory phosphorylation of cyclin-dependent kinase p34(cdc2) and concomitant G(2)/M arrest by the chemopreventive flavonoid apigenin. *Molecul Carcinogenesis*, 2002, 33(1):36-43.
- 31 Chen Q, et al. Luteolin induces mitochondria-dependent apoptosis in human lung adenocarcinoma cell. *Nat Prod Commun*, 2012, 7(1):29-32.
- 32 Verschooten L, et al. Autophagy inhibitor chloroquine enhanced the cell death inducing effect of the flavonoid luteolin in metastatic squamous cell carcinoma cells. *PLoS One*, 2012, 7(10):e48264.
- 33 Williams RJ, et al. Flavonoids: antioxidants or signaling molecules? *Free Radicals Biol Med*, 2004, 36:838-849.
- 34 Choi E, et al. Antiproliferative effects of quercetin through cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MDA-MB-453 cells. *Arch Pharm Res*, 2008, 31:1281-1285.
- 35 Xie X, et al. Quercetin induces apoptosis in the methotrexate-resistant osteosarcoma cell line U2-OS/MTX300 via mitochondrial dysfunction and dephosphorylation of Akt. *Oncology Reports*, 2010, 26:687-693.
- 36 Aslan E, et al. In vitro effects of some flavonoids and phenolic acids on human pyruvate kinase isoenzyme M2. *J Enzyme Inhibit Med Chem*, 2016, 31:314-317.

(上接第 1792 页)

- 5 Lei DQ(雷丹青), Li XX(李肖肖), Liao GS(廖共山). Study of fibrinolytic enzyme from *Sipunculus nudus* Linnaeus in Guangxi coastal area. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2013, 25:897-902.
- 6 Astrup T, Mullertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch Biochem Biophysics*, 1952, 40:346-351.
- 7 Hahn BS, Chang IM, Kim YS. Purification and characterization of piscivorase I and II, the fibrinolytic enzymes from eastern cottonmouth moccasin venom (*Agkistrodon piscivorus*). *Toxicon*, 1995, 33:929-941.
- 8 Zhu Z, Wu S. Purification and properties of a fibrinogenase from *Naja naja atra* venom. *Chin J Biochem Molecul Biol*, 1999, 15:782-786.
- 9 Popov SG, Popova TG, Hopkins S, et al. Effective antiprotease-antibiotic treatment of experimental anthrax. *BMC Infect Dis*, 2005, 5:1-14.
- 10 Born GVR, Cross MJ. The aggregation of blood platelets. *J Physiol*, 1963, 168:178-195.
- 11 Lv Y(吕莹), Zhang L(张露), Feng L(冯雷), et al. Purification and characterization of nattokinase from *Bacillus subtilis*. *Food Ferment Ind*(食品与发酵工业), 2004, 30:122-124.