

# 烟管头草粗提物体外抗前列腺增生生活性及机制研究

王坤<sup>1,2,3</sup>, 吴琼<sup>1</sup>, 耿瑞<sup>4</sup>, 王梦玲<sup>1</sup>, 马佑芬<sup>1</sup>, 骆衡<sup>1,4\*</sup>, 晏晨<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup>贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵阳 550002; <sup>2</sup>毕节医学高等专科学校, 毕节 551700;

<sup>3</sup>遵义医学院, 遵义 563006; <sup>4</sup>德江县民族中医院, 德江 565200; <sup>5</sup>安顺市人民医院, 安顺 561000

**摘要:**研究民族药烟管头草粗提物对体外前列腺增生(BPH1)细胞增殖的影响及对前列腺增生细胞生长的调控机制。荧光倒置显微镜观察实验组细胞数量与状态明显改变,且有凋亡小体出现现象;MTT法检测烟管头草粗提物对前列腺增殖细胞增殖作用实验表明,粗提物对BPH1细胞有很好抑制作用;Transwell侵袭实验表明细胞侵袭潜能随药物浓度增大而降低;细胞凋亡-Heston染色试剂检测粗提物对细胞凋亡的影响,表明粗提物与诱导细胞凋亡相关;细胞凋亡-DNA ladder抽提试剂盒检测DNA变化实验证实细胞经药物作用呈现典型的梯状条带;分子生物学实验进一步证明,细胞凋亡可能与Wnt信号通路的基因表达有关。

**关键词:**粗提物;前列腺增生;抑制;凋亡;Wnt信号通路

中图分类号:R96

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)3-0517-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.3.024

## Study on anti-prostatic hyperplasia activity and mechanism of *Carpesium cernuum*

WANG Kun<sup>1,2,3</sup>, WU Qiong<sup>1</sup>, GENG Rui<sup>4</sup>, WANG Meng-ling<sup>1</sup>, MA You-fen<sup>1</sup>, LUO Heng<sup>1,4\*</sup>, YAN Chen<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Natural products Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China;

<sup>2</sup>BiJie Medical college, Bijie 551700, China; <sup>3</sup>Zunyi Medical College, Zunyi 563006, China;

<sup>4</sup>Dejiang County National Hospital of Chinese Medicine, 565200, China;

<sup>5</sup>An Shun City People's Hospital, Anshun 561000, China

**Abstract:** To study the effect of the crude drug *Carpesium cernuum* extract on the proliferation of BPH1 cells *in vitro*, and explore the regulatory mechanism of *Carpesium cernuum* crude extract on the growth of benign prostatic hyperplasia cells. Inverted microscope observation of the number and status of cells in the experimental group significantly changed, and there was a phenomenon of apoptotic bodies; MTT assay detected *Carpesium cernuum* crude extracts on proliferation of prostate proliferative cells experiments showed that the crude extract has a good inhibitory effect on BPH1 cells Transwell invasion assay showed that the invasive potential of the cells decreased with the increase of drug concentration; Apoptosis-Heston staining reagent was used to detect the effect of the crude extract on apoptosis, indicating that the crude extract was involved in apoptosis; apoptosis-DNA The ladder extraction kit was used to detect DNA changes. It was confirmed that the cells exhibited typical ladder-like bands by drug action; molecular biological experiments further demonstrated that apoptosis may be related to the gene expression of the Wnt signaling pathway.

**Key words:** crude extract; hyperplasia of prostate; inhibition; apoptosis; Wnt signaling pathway

烟管头草为菊科(Asteraceae)天名精属一或两年生草本,高40~90 cm。茎直立,多分枝,全株密

被白毛,单叶互生,全缘或波状齿,根粗叶大而狭长,柄短,下部叶长椭圆形,上部较小,广被针形。头状花序单生在小枝顶端,初直立,开花时多下垂;总苞片淡绿色,外层总苞片叶状,内层干膜质;花黄色片,全为管状花。瘦果线形有条纹<sup>[1]</sup>。烟管头草具有清热解毒、消肿止痛的功效,主治感冒发热、高热惊风、咽喉肿痛、疔腮、牙痛、尿路感染、淋巴结核、疮

收稿日期:2018-04-16 接受日期:2018-06-08

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金(81702914);贵州省卫生计生委科学技术基金(GZWKJ2016-1-010, QZYY2017-024, QZYY2017-123)

\*通信作者 Tel: 86-851-83804492; E-mail: luohengzz@sina.com, nazhi3647@sina.com

疡疔肿、乳腺炎等,贵州苗族地区将其作为民族药野烟叶使用<sup>[2]</sup>。烟管头草的化学成分主要有倍半萜、黄酮、苯酚、甾体、木脂素、三萜、香豆素等<sup>[3]</sup>。研究表明导致前列腺增生主要因素有生长因子通路及激素变化,治疗前列腺增生目前有药物治疗与手术治疗,并且近年来,药物治疗成为学者治疗前列腺增生研究热点,但烟管头草治疗前列腺增生的研究及活性成分鲜有报道,并且本研究预实验表明,烟管头草粗提物对前列腺增生细胞(BPH1)增殖有抑制作用,有凋亡现象。因此,本研究就烟管头草粗提物对前列腺增生细胞的增殖、侵袭、凋亡进行初步探究,确定其是否可诱导前列腺增生细胞(BPH1)凋亡,并从调控前列腺增生细胞凋亡 Wnt 信号通路中关键基因的表达的角度探讨其可能的抗前列腺增生分子机制<sup>[4]</sup>,以期望为进一步研究烟管头草的抗前列腺增生活性成分及其机制奠定基础。

## 1 实验材料

### 1.1 实验试剂

DEME 高糖培养基(HyClone, 美国, AC10254368); 0.25% Trypsin 胰酶(HyClone, 美国, T1320); 胎牛血清(杭州四季青公司, 中国, 20171221); 四甲基偶氮唑蓝(3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)-tetrazolium bromide; MTT)(Sigma 公司, 美国, G1724034); 二甲基亚砜(北京索莱宝科技有限公司产品, 中国, D8370); 青链霉素混合液(北京索莱宝科技有限公司产品, 中国, 20171222); Gold view I 型核酸染料(北京索莱宝科技有限公司产品, 中国, G8140); Wnt 通路基因( $\beta$ -catenin、C-myc、SFRPS2、CyclinD1、*ddk1*、*fzd2*、GAPDH)引物(上海生工科技有限公司, 中国); 琼脂糖(BIOWEST 公司, 中国, 111860); DNA Ladder 抽提试剂盒(碧云天生物技术公司, 中国, C0007); Hoechst 染色试剂盒(碧云天生物技术公司, 中国, C0003); Matrigel® Matrix(Corning 公司, 美国, 356234); 50 × TAE(康为世纪生物科技有限公司, 中国, CW06635); Super DNA Marker(康为世纪生物科技有限公司, 中国, CW25835)。其它相关试剂为分析纯级别的国产试剂。

### 1.2 实验仪器

荧光倒置显微镜(卡尔·蔡司股份公司, 德国); 倒置显微镜(ECLIPSE TS100-F)(日本尼康有限公司产品, 日本, ECLIPSE TS100-F); NANODROP 2000(赛默飞世尔科技公司, 中国); 超净台(赛默飞

世尔科技公司, 中国, 1384); 培养箱(赛默飞世尔科技公司, 中国 3111); 高速离心机(BECKMAN COULTER 公司, 美国); 凝胶成像仪(Gene Company Limited, 中国香港); 电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司, JY300HE); PCR 仪(Applied Biosystems (ABI), 美国, 9902)。

### 1.3 烟管头草粗提物的制备

样品采自贵州省安顺市镇宁县, 经贵阳中医学院孙庆文教授鉴定为菊科(Asteraceae)天名精属(*Carpesium* L.)植物烟管头草(*Carpesium cernuum*)。黔产药用烟管头草的提取: 黔产药用烟管头草(*Carpesium cernuum*)的全草干重 20.0 kg, 用 95% 的工业乙醇将粉碎后的药材加热回流提取, 每次 3 h, 共提取 3 次, 将提取液合并, 回收 CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH。然后加水使浓缩液呈悬浮状态, 用乙酸乙酯萃取, 得乙酸乙酯萃取液与水层, 乙酸乙酯萃取物 616 g, -4 °C 保存备用。

## 2 实验方法

### 2.1 细胞培养

所用的细胞株由贵州省中国科学院天然产物重点实验室肿瘤药理课题组保存。将保存的人前列腺增生 BPH1 细胞于 37 °C 水浴中迅速解冻, 离心收集细胞后, 用含 10% 胎牛血清及 1% 青霉素、1% 链霉素的 DMEM 高糖培养基, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 恒温饱和湿度培养箱中培养。当细胞 80% 汇合时进行传代及接种, 选取对数生长期细胞进行实验。

### 2.2 MTT 检测

取对数生长期细胞, 离心收集细胞, 加入新的培养液调整细胞浓度至  $1 \times 10^4$  个/mL, 接种于 96 孔培养板中, 每孔加入 190  $\mu$ L 细胞液, 分别设置 3 个复孔, 设置空白组与对照组, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 恒温饱和湿度下培养至细胞贴壁, 吸干培养液, 加入用新鲜培养液配好的各浓度的提取物, 对照组为同比例稀释的 DMSO, 空白组加入同体积培养液, 分别继续培养 24、48、72 h 后, 3200 rpm 离心 15 min, 加入 20  $\mu$ L MTT, 继续培养 4 h 后, 1500 rpm 离心 8 min, 吸出培养液, 每孔加 150  $\mu$ L DMSO 溶解结晶物, 摇床低速震荡 10 min, 采用多功能酶标仪于 490 nm 处检测其 OD 值, 并计算其细胞增殖抑制率<sup>[5,6]</sup>。

### 2.3 Tanswell 检测

4 °C 解冻 Matrigel 胶, 使其成为液体; 用无血清的 DMEM 培养基将 Matrigel 胶按照 7:1 比例稀释; 每孔加入 50  $\mu$ L 稀释的 Matrigel 于 Tanswell 小室滤

膜上层。37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 孵育 30 min。将对数期的细胞离心收集,用培养基将收集的细胞稀释成 1 × 10<sup>4</sup> 个/mL,将细胞与不同浓度提取物混匀接种于上层无血清的培养液中,下层为含血清的培养液。培养 24 h;取出小室,用生理盐水冲洗 3 次,用棉签小心擦去小室 Matrigel 胶,加入无水甲醇浸泡 10 min;室温静置 15 min,每孔加入 300 μL 0.1% 的结晶紫染色 30 min,生理盐水冲洗 3 次,晾干,取染色的小室显微镜拍照,分别取上下左右及中间五个视野计数,多次重复求平均值,并作统计学分析<sup>[7]</sup>。

## 2.4 HE 染色

取洁净的盖玻片在 75% 乙醇中浸泡 5 min,无菌超净台内用 0.9% 生理盐水冲洗三次,再用培养液冲洗一次,将洗净灭菌的盖玻片平置于六孔板内。将对数期收集并稀释为 1 × 10<sup>4</sup> 个/mL 的细胞悬液 2 mL 接种于上述的六孔板中,37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养待其贴壁后,加入不同浓度的提取物继续培养 24 h 后,离心后吸去大部分液体保留 50 μL 液体,再缓缓悬起细胞,滴加至载玻片上尽量使细胞分布均匀;加入 0.5 mL 固定液,固定 10 min;去固定液,用 0.9%

生理盐水冲洗两次,每次 3 min;加入 0.5 mL Hoechst 33258 染色液振动染色 5 min;去染色液,用 0.9% 生理盐水洗两次,每次 3 min,吸尽液体,加入一滴抗荧光淬灭封片液于载玻片上,盖上贴有细胞的盖玻片,荧光显微镜检测其细胞核的变化<sup>[8]</sup>。

## 2.5 DNA Ladder 检测

取对数期生长的细胞,制成细胞悬液,调整细胞浓度为 1 × 10<sup>5</sup> 个/mL;将细胞接种于培养瓶中,继续培养,待细胞生长贴壁后,加入不同浓度的提取物,DMSO 处理为空白对照,培养 48 h 后用胰酶消化,用生理盐水冲洗 1 次,1 500 g 离心 2 min,弃上清,收集细胞;用 DNA Ladder 抽提试剂盒抽提 DNA,1% 琼脂糖凝胶电泳检测其 DNA 损伤程度<sup>[9]</sup>。

## 2.6 RT-PCR 检测细胞基因表达

收集不同浓度提取物处理 48 h 的细胞,按照文献<sup>[10]</sup>报道方法去取总 RNA,1% 的琼脂糖电泳液检测 RNA 的完整性。利用逆转录试剂盒将其逆转录成 cDNA。以 GAPDH 为内参,按照文献<sup>[10]</sup>,利用 1% 的琼脂糖电泳液检测不同基因(引物序列见表 1)的 PCR 产物,凝胶成像分析差异表达结果<sup>[11]</sup>。

表 1 本研究中检测的相关基因的引物序列

Table 1 Primer sequences of related genes detected in this study

Gene(基因)		引物序列 Primer sequence
<i>β-catenin</i>	Forward	5'-GGCTCTGTGCGTACTGTCC-3'
	Reverse	5'-GGCCATCTCTGCTTCTTGGT-3'
<i>C-myc</i>	Forward	5'-GCCAGAGGAGGAACGAGCTA-3'
	Reverse	5'-TGGACGGACAGGATGTATGC-3'
<i>SFRPS2</i>	Forward	5'-TTCTCCTACAAGCGCAGCAA-3'
	Reverse	5'-GCACCTCG-3'/CCTTCATGGTCT
<i>ddk1</i>	Forward	5'GCCTCAGGATTGTGTTGTGC3'
	Reverse	5'TCCACAGTAACAACGCTGGAA3'
<i>fzd2</i>	Forward	5'CATCGCCTACAACCAGACCA3'
	Reverse	5'GAGCACTGCACCCTCACCA3'
<i>CyclinD1</i>	Forward	5'CAGAAGTCCGAGGAGGAGCT3'
	Reverse	5'TAGAGGCCACGAACATGCAA3'
<i>GAPDH</i>	Forward	5'-AAGCTCGGTGTGAACGGATT-3'
	Reverse	5'ATGACCTTGCCACAGCCT-3'

## 2.7 统计学分析

所有的数据处理采用 SPSS 22.0 软件(IBM SPSS Statistics 22.0, USA)做统计学分析,所有结果以均值表示。采用 F-检验进行差异性分析,显著差异表示为(\**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01)。

## 3 结果

### 3.1 烟管头草粗提物对前列腺增生(BPH1)细胞增殖活性的影响

倒置显微(×100)观察不同浓度处理对 BPH1 细胞生长及形态的影响(图 1 A),正常(Control)细

细胞贴壁生长,呈带状或条状,胞质饱满,细胞融合成群落;而实验组细胞数量减少,间隙增大,体积减小,染色质凝聚、有凋亡小体出现等特点,并且作用效果成浓度依赖性,即浓度越大,药物对 BPH1 细胞作用越明显。MTT 检测烟管头草粗提物对 BPH1 细胞增殖的影响(图 1 B)实验表明,粗提物对细胞作用呈现浓度和时间依赖性,也即作用效果与浓度

和时间成正相关。经 IBM SPSS Statistics 22.0 软件分析,作出  $IC_{50}$  值图(图 1 C),实验组 24 h、48 h、72 h 的  $IC_{50}$  值分别为 72.76  $\mu\text{g/L}$ 、30.42  $\mu\text{g/L}$ 、25.69  $\mu\text{g/L}$ ,表明实验组  $IC_{50}$  值与时间成负相关,即时间越长,浓度越小,并且与 24 h 组比较,48 h 与 72 h 差异性显著(\* $P < 0.05$ )。因此,烟管头草粗提物对前列腺增生细胞增殖活性有显著影响。

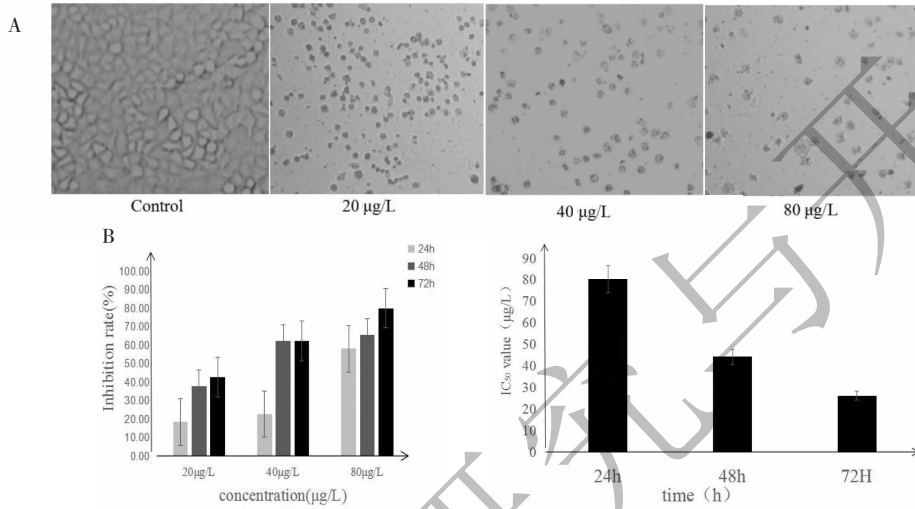


图 1 烟管头草粗提物对前列腺增生细胞增殖活性的影响

Fig. 1 Effect of *Carpesium cernuum* crude extract on proliferative activity of benign prostatic hyperplasia  
注:与空白对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。A.倒置显微镜观察提取物对 BPH1 细胞形态变化的影响;  
B.烟管头草粗提物对前列腺增生细胞生长的影响;C.粗提物对 BPH1 细胞作用的  $IC_{50}$  值\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。

Note:Compared with control group,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ . A. Inverted microscope to observe the effect of extracts on the morphological changes of BPH1 cells;B. Effect of *Carpesium cernuum* crude extract on the growth of benign prostatic hyperplasia cells;C.  $IC_{50}$  value of crude extracts on BPH1 cells.

### 3.2 Transwell 实验

体外侵袭能力检测实验:倒置显微镜( $\times 100$ )观察(图 2A)表明随着药物浓度的增大,视野数目逐渐减少,呈现浓度依赖性。统计学处理(图 2B)表明,对照组(0  $\mu\text{g/L}$ ),实验组(20、40、80  $\mu\text{g/L}$ )其过滤膜平均数分别为 123、34、18、10 个,与对照组(0  $\mu\text{g/L}$ )比较,实验组 20、40、80  $\mu\text{g/L}$  差异性显著( $P < 0.01$ ),进一步验证了药物对细胞侵袭力的影响呈现浓度依赖性。因此,侵袭实验表明:药物能显著降低细胞的侵袭潜能。

### 3.3 粗提物诱导细胞凋亡研究

细胞凋亡染色实验(图 3)表明正常细胞(Control)呈现淡蓝色,偶尔有带苍白色;而加入药物后的细胞大多呈现苍白色,并且浓缩成圆形。染色质断裂是细胞凋亡时主要的生化特征,在凝胶电泳上表现为梯形电泳图(图 4)谱(DNA ladder),本研究用

两种浓度处理 BPH1 细胞后发现,与对照组 DNA ladder 有明显不同,药物处理后细胞出现典型的 DNA ladder,说明细胞已经凋亡。因此,凋亡染色试验和 DNA ladder 实验表明:药物能够诱导 BPH1 细胞凋亡。

### 3.4 RT-PCR 检测

RT-PCR 实验(图 5)结果表明:GAPDH 基因在 BPH1 正常表达,实验组与 GAPDH 相比,实验组 *SFRPS2*、*C-myc*、 $\beta$ -*catenin* 基因组表达均高于内参组,*ddk1*、*fzd2*、*cyclinD1* 表达均低于内参组。与 control 组相比,*SFRPS2*、*C-myc*、 $\beta$ -*catenin* 是随着浓度的增大而增加;*ddk1*、*fzd2* 表达是随浓度的增大,表达能力增强,但显著低于内参组,*cyclinD1* 组表达能力是随着浓度的增大而降低。因此,粗提物诱导 BPH1 细胞凋亡是与 Wnt 信号通路关键基因的表达有关。

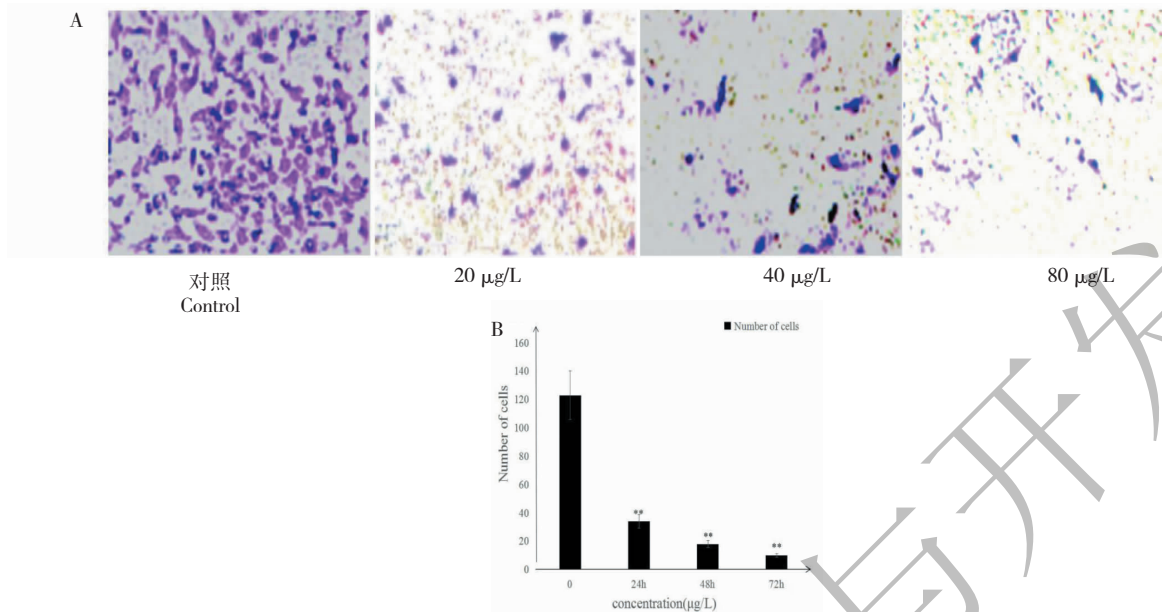


图2 烟管头草粗提物对前列腺增生细胞体外侵袭能力的影响

Fig. 2 Effect of crude extract of *Carpesium cernuum* in vitro invasive ability of benign prostatic hyperplasia cells

注:与空白对照组比较, \*\*  $P < 0.01$ 。A. 显微( $\times 100$ )观察图;B. 透过滤膜平均值。

Note: Compare with control, \*\*  $P < 0.01$ . A. microscopic ( $\times 100$ ) observations; B. Average of filtration membranes.

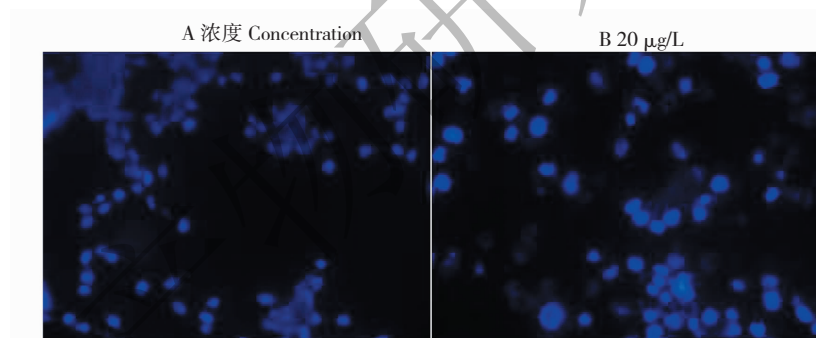


图3 HE染色检测烟管头草粗提物诱导前列腺增生细胞凋亡

Fig. 3 HE staining was used to detect the apoptosis of prostate hyperplasia cells induced by crude extract of *Carpesium cernuum*

注:A. 对照组;B. 图为20 µg/L粗提物处理。

Note: A. Control group; B. 20 µg/L crude extract treatment.

#### 4 结论

前列腺增生症即良性前列腺增生(Benign prostatic hyperplasia, BPH),是中老年男性常见疾病。随着老龄化人口日益增加,BPH的发病率逐年上升,50岁以上男性,约90%有不同程度的前列腺增生,已严重威胁中老年男性的健康。国际良性前列腺增生咨询委员会定义BPH为存在良性前列腺长大,或前列腺移行区长大的客观证据,有下尿路症状(LUTS),或下尿路症状加重及上尿路受损,存在膀胱出口梗阻<sup>[12]</sup>。主要临床表现:进行性尿频、尿线

变细、排尿费力、尿潴留等,重症患者可导致肾积水、肾功能衰竭等病症<sup>[12]</sup>。有研究表明,生长因子通路是调控前列腺增生直接主要因素;雌雄激素紊乱,是前列腺增生源头;凋亡紊乱,由生长因子及激素变化诱导,也是前列腺增生的病理表现,而在前列腺增生发生发展中,激素内分泌学说和生长因子学说也具有重要地位和作用<sup>[12]</sup>。有研究中药及其活性成分可从多方面、多靶点治疗BPH,现有研究多为调节雌激素、雄激素,改善微循环及增强免疫,并且也有研究证实、牵牛子、川芎、当归、白芥子、王不留行、水蔓

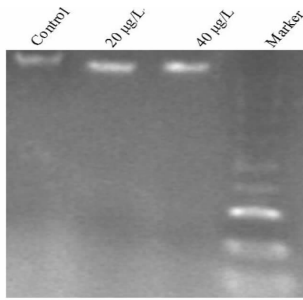


图4 DNA Ladder 检测烟管头草粗提物诱导前列腺增生细胞凋亡

Fig. 4 DNA Ladder detection of *Carpesium cernuum* crude extract induces apoptosis of benign prostatic hyperplasia

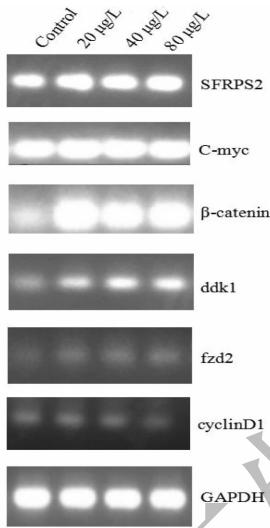


图5 转录水平检测烟管头草粗提物对前列腺增生细胞中 Wnt 信号通路的关键基因表达的影响

Fig. 5 The effect of expression of key gene transcription level detection of *Carpesium cernuum* extract on Wnt signaling pathway in the cells of the prostate hyperplasia

青等可通过改善 BPH 动物模型的各种指标<sup>[12]</sup>。近年来,国内对 BPH1 研究取得较大进展,现已证实药物干预防治前列腺增生症与多种因素密切相关。有学者拟通过虚拟筛选、分子水平筛选、细胞水平筛选和整体动物筛选,进行药物的筛选<sup>[13]</sup>研究。烟管头草常以全草入药,其化学成分和药理作用报道较多,含有倍半萜、黄酮、醇、酯、苯酚、甾体、木脂素、三萜、香豆素等,如天名精内酯酮(Carab-rone),天名精内酯醇(Carabrol)与特勒内酯(Telekin)<sup>[14]</sup>,鹤大叶土木香内酯(Granilin),11(13)-去氢腋生依瓦菊素[11

(13)-dehydroivaxillin]<sup>[15]</sup>等,药理活性报道有清热泻火、凉血解毒、抗病毒抗菌杀虫<sup>[16-19]</sup>作用,但是在利用烟管头草粗提物诱导细胞凋亡发挥抗前列腺细胞作用方面的研究较少涉及。因此,本研究就其抗前列腺细胞增殖活性及其机制进行初步探究。实验表明:烟管头草粗提物对前列腺增生细胞(BPH1)的增殖抑制作用具有选择性,可显著抑制前列腺增生细胞(BPH1)的增殖,并且呈现显著的时间和浓度依赖性;荧光倒置显微镜观察发现细胞数量与状态显著改变,且有凋亡小体出现;Transwell 实验表明烟管头草粗提物可降低 BPH1 细胞侵袭潜能;Heston 染色实验及 DNA ladder 表明提取物可显著诱导细胞凋亡;分子生物学实验结果表明粗提物可在转录水平显著调控 Wnt 信号通路中  $\beta$ -catenin、SFRPS2、cyclinD1、ddk1、fzd2、C-myc 基因表达。烟管头草作为民族药,资源丰富,医用前景大,而本研究为分离烟管头草的抑制人前列腺增生(BPH1)活性成分及综合利用提供了实验依据。

#### 参考文献

- 1 Teng CD, Li JZ, Yang MC, et al. Heat-clearing and detoxifying medicine[J]. Shanxi Med J(山西医学杂志), 1976, S1:25.
- 2 Zhang YM, Mu ZJ, Zhang PZ, et al. Characteristics and microscopic identification of *Seedling medicinal Thunb*[J]. Anhui Agric Sci(安徽农业科学), 2017, 45(28): 141-143.
- 3 Yang YX. Studies on sesquiterpene lactones from *Carpesium faberi*[J]. J Chin mater Med(中国中药杂志), 2016, 41: 2105-2111.
- 4 Dai WB, Ren ZP, Chen WL, et al. Expression of APC,  $\beta$ -catenin, C-myc and Cyclin D1 in colorectal cancer and its significance[J]. Chin Oncol(中国癌症杂志), 2007, 26: 212-215.
- 5 Yang AL, Hu ZD, Tu PF. Study on effect and mechanism of Huaier aqueous extract on growth and invasion of human prostatic cancer PC3 cells[J]. Chin Mater Med(中国中药杂志), 2016, 41: 2701-2705.
- 6 Yan C, Zhang YD, Wang XH, et al. *Phellodendron chinense* Schneid. Chemical constituents and antitumor activity in fruits[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2017, 29: 1270-1276.
- 7 Liu KP, Zhang BY, Lu Y, et al. Transwell invasion assay to determine M receptor on the invasion of cholangiocarcinoma cells[J]. Int J Surg(国际外科学杂志), 2011, 38: 298-301.

(下转第 445 页)