View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Repository of Research and Investigative Information

مقاله تحقیقی

مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره بیستم، شمارهٔ ۶، خرداد ۱۳۹۷، صفحه ۴۰-۳۶

تاثیر ترکیب تریسین استخراج شده از اندام هوایی گیاه *Allium atrovoilaceum* Boiss. بر رشد و آپوپتوز در رده سلولی PC3

زهرا لری گوئینی (PhD)[۱]، ثریا قاسمی (PhD)[۲*]، نرگس عسگریان دهکردی (MSc)[۱]، مریم معتمدی (MSc)[۲]

۱-مرکز تحقیقات گیاهان داروئی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
۲-مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

دریافت: ۹۶/۹/۵، اصلاح: ۹۶/۱۲/۵، پذیرش: ۹۷/۱/۲۸

خلاصه

سابقه و هدف: تریسین به عنوان یک ترکیب فلاوونی در بسیاری منابع غذایی، دارای اثرات ضد التهابی و ضد تکثیری در برخی رده‌های سلولی سرطانی می‌باشد. با توجه به اهمیت استفاده از داروهای طبیعی با خواص ضد سرطانی در سرطان‌های مقاوم به درمان همچون سرطان پروستات، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر تریسین بر رشد و تکثیر سلولی و القای آپوپتوز در رده سلولی سرطان پروستات انسانی PC3 می باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، رده سلولی PC3 از انستیتو پاستور ایران تهیه و کشت شد. استخراج و خالص‌سازی تریسین توسط روش‌های کروماتوگرافی ستونی و کریستالیزاسیون مجدد از عصاره گیاه *Allium atrovoilaceum* انجام شد. اثر سایتوتوکسیک تریسین در غلظت‌های ۱۲۰، ۱۰۰، ۸۰، ۶۰ و ۱۴۰ µM، به روش MTT ارزیابی گردید. اثر آپوپتوتیک در گروه سلول‌های تیمار شده در غلظت IC_{50} تریسین و سلول‌های فاقد تیمار (گروه کنترل)، با استفاده از کیت Annexin-V و فلوسایتومتری بررسی شد.

یافته ها: توان زیستی سلول‌ها در غلظتهای تریسین به ترتیب، ۱/۵۲±۸۵/۶۶، ۳/۶۰±۷۶، ۴/۱۶±۶۶/۳۳ و ۳/۶۰±۴۴ و ۳/۲۱±۳۶/۶۶ بود ($p<0/01$). غلظت IC_{50} تریسین ۴/۴µM±۱۱۷/۵، برای رده سلولی PC3 بود. میزان آپوپتوز در سلول‌های PC3 پس از ۴۸ ساعت تیمار با غلظت IC_{50} تریسین، ۰/۵۸±۲۴/۳٪ بدست آمد که در مقایسه با سلول‌های کنترل (۰/۵۸±۲۳/۳٪) معنی‌دار نبود.

نتیجه گیری: نتایج این بررسی نشان داد که تریسین منجر به مرگ سلولی در رده سلولی PC3 گردید، اما مکانیسم مرگ سلولی، آپوپتوز نبود.

واژه های کلیدی: سرطان پروستات، تریسین، آپوپتوز.

مقدمه

سرطان پروستات، دومین عامل مرگ ناشی از سرطان در مردان است (۱). شیمی‌درمانی از متداول‌ترین روش‌های درمانی سرطان پروستات می‌باشد. با این وجود سمیت داروئی، عوارض جانبی بر بافت‌های سالم و عود بیماری ناشی از مقاومت‌های داروئی، از جمله معایب شیمی‌درمانی می‌باشند (۲و۳). تحقیقات در زمینه سرطان‌ها، حاکی از سمیت و عوارض جانبی کم‌تر ترکیبات دارویی با منشاء گیاهی می‌باشند، بنابراین مطالعه و شناخت ترکیبات گیاهی موثر در درمان سرطان‌ها، اهمیت زیادی دارد (۴). فلاونوئیدها مشتقات بنزو-γ-پیرن متشکل از حلقه‌های فنولی و پیران می‌باشند (۵). فلاونوئیدها با خواص آنتی-اکسیدانی، عامل محافظت در برابر بیماری‌های قلبی و نیز نقش ضد ویروسی دارند. از طرفی، اثر ضد توموری آن‌ها فاقد اثرات زیانبار داروهای شیمی‌درمانی هستند (۶و۷). از جمله مکانیسم‌های ضد سرطانی فلاونوئیدها القای آپوپتوز، غیر فعال‌سازی کارسینوژن‌ها، ممانعت از آنژیوژنز، بازدارندگی رشد سلولی و مقاومت داروئی می-باشند (۸). تریسین (Tricin)، فلاونوئیدی از دسته فلاون‌ها با ساختار 4′,5,7-trihydroxy-3′,5′-dimethoxyflavone، در بسیاری از منابع غذایی انسان مانند خانواده Palmaceae و Poaceae یافت می‌شود و به دلیل دارا بودن اثرات آنتی‌اکسیدانی و مهار تکثیر سلول‌های سرطانی، به عنوان ترکیبی ارزشمند مطرح است (۱۰و۹). در این مطالعه از گیاه *Allium atrovoilaceum* با نام فارسی پیاز بنفش و نام محلی سیردنگ یا سیرنگ جهت استخراج ترکیب تریسین (۱۱) استفاده شد. با توجه به اثرات ضد سرطانی تریسین (۱۳و۱۲) برای اولین بار، اثر آن بر رشد و تکثیر سلولی و القای آپوپتوز در رده PC3، بررسی شد.

مواد و روش‌ها

کشت سلولی و استخراج تریسین: در این مطالعه تجربی با کد اخلاق IR.SKUMS.REC.1394.135، رده سلولی سرطان پروستات PC3، از

▣ این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۱۹۳۶ دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد می باشد.
* مسئول مقاله: دکتر ثریا قاسمی
آدرس: شهرکرد، دانشگاه علوم پزشکی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، مرکز تحقیقات سلولی-مولکولی. تلفن: ۰۳۸-۳۳۳۳۱۴۷۱
E-mail: sorayya.ghasemi@gmail.com

انستیتو پاستور ایران خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت DMEM با FBS۱۰٪ و ۱٪پنی‌سیلین/استرپتومایسین (Gibco ,USA) و در شرایط دمای ۳۷ºC، CO2٪۵ و ۹۰٪رطوبت در انکوباتور کشت داده شدند. اندام هوایی گیاه *Allium atrovoilaceum* از کوه ریگ شهرستان لردگان استان چهارمحال و بختیاری در بهار ۱۳۹۳ جمع‌آوری و توسط دکتر کرامت الله سعیدی در دانشگاه شهرکرد، تعیین گونه گردید (کد هرباریومی ۸۰۱۳). عصاره گیری به روش پرکولاسیون توسط حلال متانول، انجام شد. بعد از تغلیظ با روتاری به روش مایع–مایع توسط اتیل استات استخراج شد. سپس فراکشن اتیل استاتی با فاز ثابت سیلیکاژل با مش ۰/۰۶۳–۰/۱۰۰ و سیستم حلال هگزان نرمال:اتیل استات، اتیل استات:متانول کروماتوگرافی ستونی گردید. جهت مشاهده لکه‌ها از نور ماورای بنفش در طول موج ۲۵۴ و ۳۶۶ نانومتر و محلول NP/PEG استفاده شد. فراکسیون‌های یکسان با TLC توسط دو سیستم حلال کلروفرم:اتیل استات (۶۰:۴۰) و اتیل استات:اسید استیک گلایسیال:اسید فرمیک:آب (۱۰۰:۱۱:۱۱:۲۷) ردیابی شد و با هم مخلوط گردید.

خالص‌سازی مولکول با کد ZG-G: پس از تغلیظ فراکشن ۸۱(G)، اتانول به عنوان حلال جهت کریستالیزاسیون مجدد استفاده شد. بدنبال سرد نمودن تدریجی، کریستال‌های سوزنی حاصله با اتانول مطلق سرد، خارج و شستشو داده شدند. ماده خالص حاصل با تکنیک‌های (AVANCE-AV-30) ^{1}HNMR، ^{13}CNMR و MS خارج کشور ایران، تعیین ساختار گردید. پودر تریسین پس از استخراج و خالص‌سازی، در محلول ۸۰٪اتانول و DMSO۲۰٪ حل شده و با عبور از فیلتر ۰/۲۲ میکرونی استریل گردید.

بررسی سایتوتوکسیسیتی با آزمون MTT: ۵×۱۰^{۳} سلول در پلیت ۹۶ خانه کشت و در پنج گروه تحت تیمار با تریسین، غلظت‌های ۱۲۰،۱۰۰،۸۰،۶۰ و ۱۴۰ µM (۱۲و۱۳) به مدت ۲۴h در انکوباتور قرار گرفتند.

گروه کنترل فاقد تریسین بود. سپس محیط کشت سلول‌ها با محیط تازه حاوی ۲۰µl محلول تترازولیوبرومواید ((۳–(۴،۵)-2,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (MTT: tetrazolium reduction) تعویض گردید. سلول‌ها ۴h در تاریکی انکوبه و سپس محلول رویی برداشته و ۱۵۰ میلی لیتر DMSO افزوده شد. جذب نوری در ۵۷۰nm با خوانشگر الایزا (Stat Fax)، بررسی گردید. بقاء سلولی، به صورت زیر محاسبه شد.

قابلیت زیستی سلول‌ها٪=(جذب نوری نمونه/جذب نوری کنترل)×۱۰۰

آپوپتوز: آزمون آپوپتوز با کیت Annexin-V (BD,US) و بر اساس روش فلوسایتومتری بین دو گروه سلول‌های تیمار شده با غلظت IC_{50} تریسین به مدت ۴۸h و گروه کنترل (فاقد تیمار) انجام شد. سلول‌ها پس از تیمار فیکس شده و براساس دستورالعمل کیت با محلول فوق همزمان با محلول رنگ‌آمیزی Propidium Iodid، توسط دستگاه فلوسایتومتری (Partec) آنالیز شدند.

آنالیز نتایج: کلیه آزمایش‌ها بصورت سه بار تکرار انجام گردید. نتایج رشد و تکثیر سلولی با نرم افزار Prism v5 به روش آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و در صورت معنی‌داری، با پس آزمون توکی و نتایج مربوط به آپوپتوز به روش t-test و پس آزمون من–ویتنی تجزیه–تحلیل گردیدند و $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

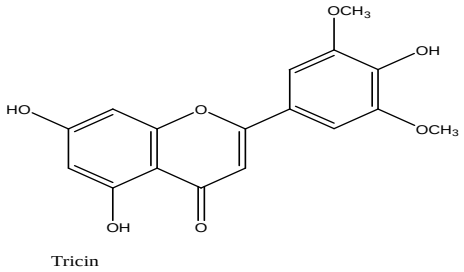
یافته ها

نتایج خالص سازی مولکول با کد ZG-G : نتایج حاصل از مطالعات طیف سنجی، به صورت زیر مشخص شد. ماده حاصله از تفسیر طیف‌ها به عنوان Tricin شناسایی گردید (شکل۱).

^{1}HNMR:(DMSO-*d*6،400MHz) δ7.32(2H،s،H-2′،H-6′)، 6.97(1H،s،H-3), 6.57(1H ،d،*J*= 2.0Hz،H-8), 6.21(1H،d،*J*=2.0Hz،H-6), 3.89(6H،s،OCH3×2)

^{13}CNMR:(DMSO-*d*6،300MHz)δ181.7(C،C-4)،164.2(C،C-2)،163.6(CH،C-7)،161.4(CH،C-9) ،157.3(C،C-5)،148.2(C×2،C-3′،C-5′)،139.8(C،C-4′)،120.3(C،C-1′)،104.3(CH×2،C-2′،C-6′) ، 103.6(C،C-10)، 103.5(CH،C-3)، 98.8(CH،C-6) ،94.2 (CH،C-8)،56.3(-OCH3×2).

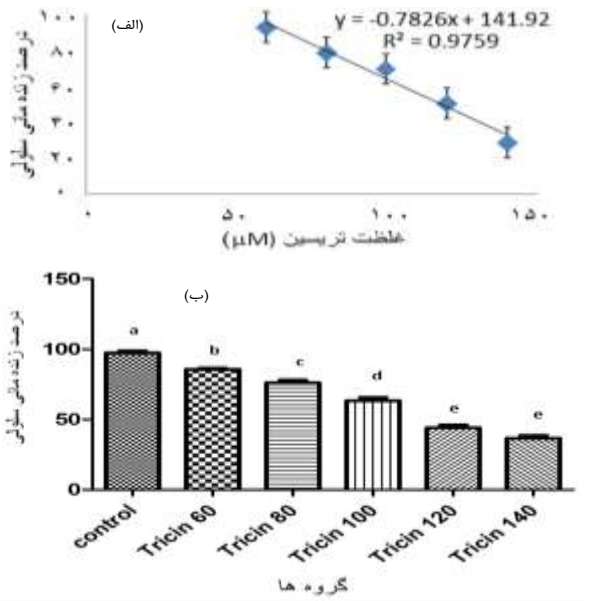
MS:*m/z*330 $[M]^{+}$، 178[M-152]$^{+}$، 153[M-152-26]



Tricin

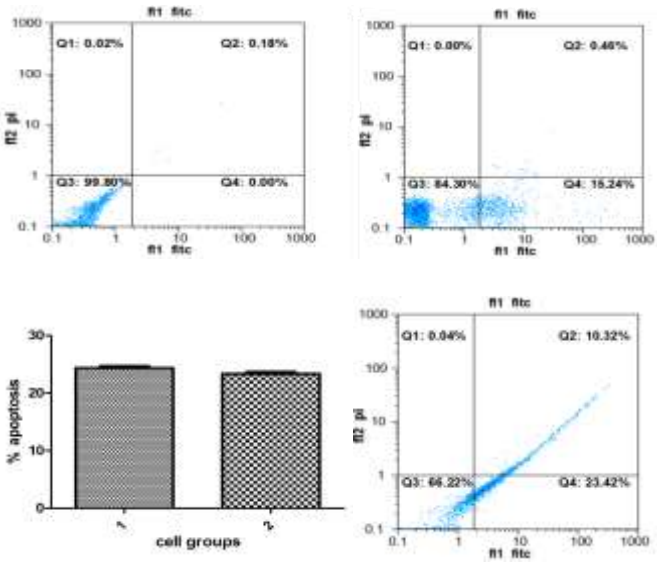
شکل ۱. ساختار مولکولی Tricin

رشد و تکثیر سلولی: با افزایش غلظت تریسین، میزان مرگ سلول‌های PC3 به صورت وابسته به دوز افزایش یافت (نمودار ۱). غلظت IC_{50} تریسین در سلول‌های PC3، پس از ۴۸h تیمار سلولی، ۱۱۷/۵±۴/۴µM بدست آمد.



نمودار ۱. الف: اثر کشندگی تریسین در غلظت‌های مختلف (IC_{50} تریسین، ۱۱۷/۵±۴/۴µM) ب: نمودار دوز–پاسخ تریسین بر رده PC3. حروف غیرمشابه نشانه معناداری در سطح ۰/۰۵ می باشد.

آپوپتوز: میزان آپوپتوز در سلول‌های PC3 تیمار شده به مدت ۴۸h با غلظت IC_{50} تریسین برابر با ۰/۵۸±۲۴/۳٪ و در گروه کنترل (سلول‌های تیمار نشده با تریسین)، ۰/۵۸±۲۳/۳٪ بود و تفاوت معنی‌داری بین دو گروه نشان نداد (نمودار ۲).



نمودار ۲. آپوپتوز سلولی در غلظت ۱۱۷/۵µM (IC_{50}) تریسین. نتایج نشان داد مکانیسم مرگ سلول‌های PC3 تیمار شده با غلظت IC_{50} تریسین بعد از ۴۸h، از مسیر آپوپتوز نبوده و احتمالا مرگ سلولی از طریق مکانیسم دیگری رخ می‌دهد (P=۰/۱۵۷).

بحث و نتیجه گیری

پژوهش حاضر نشان داد، تریسین استخراج شده از عصاره گیاه *Allium atrovoilaceum* در رده سلولی سرطان پروستاتPC3 اثر کشندگی و مهار تکثیر وابسته به دوز، دارد. این یافته با مطالعات پیشین در این زمینه هم‌سو می‌باشد. Cia و همکاران نشان دادند، تریسین بر رده سرطان سینه MDA-MB-468 اثر مهار کنندگی رشد و توقف چرخه سلولی دارد (۱۲). یافته‌های Oyama و همکاران حاکی از تاثیر مصرف تریسین بر مهار التهاب و کارسینوژنز کولون ناشی از آن و نیز کاهش معنی‌دار رشد و تکثیر سلول‌های آدنوکارسینوما در موش‌های نر CD-1 بود (۱۳).

با این وجود، میزان آپوپتوز القا شده در سلول‌های PC3 تیمار شده با غلظت IC_{50} تریسین (۱۱۷/۵µM) طی ۴۸h، در مقایسه با سلول‌های کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت($p>۰/۰۵$). این یافته با یافته Cia و همکاران که نشان دادند تریسین (≤۵µM) منجر به توقف سلول‌های MDA-MB-468 سرطان سینه در فاز G2/M گردید بدون اینکه منجر به القای آپوپتوز گردد، هم‌سو می‌باشد (۱۲). بر اساس مطالعات پیشین مشخص شد، ساختار فلاونوئیدها در فعالیت آنها تاثیر دارد و فلاوونوئیدها بسته به ساختار مولکولی، می‌توانند به عنوان مهار کننده‌های کیناز در انتقال سیگنال نقش داشته باشند. مطالعات نشان داده، موقعیت و تعداد گروه‌های هیدروکسیل حلقه‌ی ۲–فنیل (حلقهB)، تاثیر قدرتمندی بر اثر مهاری این مولکول‌ها دارد (۱۵و۱۴).

تعداد کلی گروه‌های هیدروکسیل نه تنها فعالیت آنتی–اکسیدانی، بلکه فعالیت پرواکسیدانی برخی فلاونوئیدها را تحت تاثیر قرار می‌دهد. فلاونوئیدهایی با بیش از ۲ گروه هیدروکسیل مخصوصا بر حلقه Bمنجر به افزایش چشمگیر تولید رادیکال‌های هیدروکسیل در سیستم فنتون میشوند که این فعالیت پرواکسیدانی، مسئول اثرات سایتوتوکسیته و پروآپوپتوزی فلاونوئیدهای استخراج شده از بسیاری از گیاهان دارویی است. متیلاسیون گروه‌های هیدروکسیل، می‌تواند منجر به کاهش رفتار پرواکسیدانی فلاونوئیدها گردد (۵).

Wang و همکاران گزارش دادند احتمالا فعال‌شدن کاسپاز۳ و القای آپوپتوز توسط فلاونوئیدها، به تعداد گروه‌های هیدروکسیل در حلقه ۲–فنیل و عدم وجود گروه ۳–هیدروکسیل بستگی داشته و حضور گروه ۳–هیدروکسیل موجب مهار القای آپوپتوز سلولی می‌گردد. از سویی هرچه تعداد گروه‌های هیدروکسیل در حلقه ۲–فنیل بیشتر باشد، قدرت بازیابی توانایی القای مرگ سلولی مهار شده با گروه ۳–هیدروکسیل بیشتر خواهد بود (۱۵). بنابراین به نظر می‌رسد در مطالعه حاضر عدم القای آپوپتوز مربوط به حضور گروه‌های متوکسی ´۳ و ´۵ در مولکول تریسین بوده که مانع از برقراری پیوند هیدروژنی لازم می‌شوند و از سویی حضور تعداد کمی از گروه‌های هیدروکسیل روی حلقهB تریسین نیز می‌تواند در این زمینه نقش داشته باشد. به طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد، علی رغم اثر معنی دار تریسین بر کاهش رشد و تکثیر سلول‌های رده PC3، مکانیسم مرگ سلولی القا شده توسط تریسین، از نوع آپوپتوز نبوده و در این غلظت و زمان استفاده از تریسین، منجر به آپوپتوز معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل نگردید. از آنجا که ساختار مولکولی در عملکرد فلاونوئیدها نقش دارد، بررسی‌های بیشتری در این زمینه ضروری می‌باشد.

پیشنهادات: از آنجا که رده سلولی PC3 رده ای متاستازی است، احتمالا بتوان با تحقیقات در زمینه درمان‌های مکمل با فلاونوئیدهایی همچون تریسین، اقدامی کمک کننده در درمان و یا کنترل پیشرفت سرطان پروستات انجام داد. پیشنهاد می‌شود مطالعاتی با هدف تأثیر تریسین در غلظت‌های متفاوت در سایر رده‌های سلولی سرطانی، مدل‌های حیوانی و به روش مداخله‌ای در انسان در حجم نمونه‌ی بالا انجام شود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد به دلیل تامین بودجه مالی و از همکاری کلیه پرسنل مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، تشکر و قدردانی می گردد.

The Effect of Tricine Compound Extracted from Allium atroviolaceum Boiss. On growth and apoptosis in PC3 cell line

Z. Lorigooini (PhD)[1], S. Ghasemi (PhD)[*2], N. Asgarian Dehkordi (MSc)[1], M. Motamedi (MSc)[2]

1.Medical Plants Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R.Iran

2.Cellular and Molecular Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 20(6); June 2018; PP: 36-40

Received: Nov 26th 2017, Revised: Feb 24th 2018, Accepted: Apr 17th 2018.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Tricine, as a flavonoid compound in many food sources, has anti-inflammatory and anti-proliferative effects in some cancer cell lines. Considering the importance of using natural anti-cancer drugs in therapy-resistant cancers such as prostate cancer, the aim of this study is to investigate the effect of tricine on cell growth and proliferation and induction of apoptosis in PC3 human prostate cancer cell line.

METHODS: In this experimental study, the PC3 cell line was prepared and cultured from the Pasteur Institute of Iran. Extraction and purification of tricine were done by column chromatography and recrystallization of *Allium atroviolaceum* extract. The apoptotic effect of tricine at concentrations of 60, 80, 100, 120 and 140 µM was evaluated by MTT method. The apoptotic effect was evaluated in the cell group treated with IC_{50} concentration of tricine and untreated cells (control group) using Annexin-V kit and flow cytometry.

FINDINGS: The viability of cells at different tricine concentrations were 85.66±1.52, 76±3.60, 66.33±4.16, 44±3.60, and 36.66±3.21, respectively ($p<0.01$). The IC_{50} concentration of tricine was 117.5±4.4 µM for PC3 cell line. The apoptosis rate in PC3 cells after 48 hours of treatment with IC_{50} concentration of tricine was 24.3±0.58%, which was not significant in comparison with control cells (23.3±0.58%).

CONCLUSION: The results of this study showed that tricine resulted in cell death in the PC3 cell line, but the cell death mechanism was not apoptotic.

KEY WORD: *Prostate Cancer, Tricine, Apoptosis.*

Please cite this article as follows:

Lorigooini Z, Ghasemi S, Asgarian Dehkordi N, Motamedi M. The Effect of Tricine Compound Extracted from Allium atroviolaceum Boiss. On growth and apoptosis in PC3 cell line. J Babol Univ Med Sci. 2018;20(6):36-40.

•Corresponding Author: S. Ghasemi (PhD)

Address: Cellular-Molecular Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.

Tel:+98 38 33331471

E-mail: sorayya.ghasemi@gmail.com

References

1.Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin. 2011;61(2):69-90.

2.Ting HJ1, Hsu J, Bao BY, Lee YF. Docetaxel-induced growth inhibition and apoptosis in androgen independent prostate cancer cells are enhanced by 1α،25-dihydroxyvitaminD3. Cancer Lett. 2007;247(1):122-9.

3.Easton JB, Houghton PJ. mTOR and cancer therapy. Oncogene. 2006;25(48):6436-46.

4.Androutsopoulos VP, Papakyriakou A, Vourloumis D, Tsatsakis AM, Spandidos DA. Dietary flavonoids in cancer therapy and prevention:substrates and inhibitors of cytochrome P450CYP1 enzymes. Pharmacol Ther. 2010;126(1):9-20.

5.Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants:chemistry،metabolism and structure-activity relationships. J Nutr Biochem. 2002;13(10):572-84.

6.Harborne JB. The flavonoids:advances in research since 1980. Springer. 2013;23(2):56-76.

7.Middleton E Jr1, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. Pharmacol Rev. 2000;52(4):673-751.

8.Batra P, Sharma AK. Anti-cancer potential of flavonoids:recent trends and future perspectives. Bio Tech. 2013;3(6):439-59.

9.Wu Lan, Fachuang Lu, Regner M, Zhu Y, Rencoret J, Sally A, et al. Tricin،a flavonoid monomer in monocot lignification. Plant Physiol. 2015;167(4):1284-95.

10.Jiao J, Zhang Y, Liu C, Liu J, Wu X, Zhang Y. Separation and purification of tricin from an antioxidant product derived from bamboo leaves. J Agric Food Chem. 2007;55(25):10086-92.

11.Agroatlas. Interactive agricultural ecological atlas of Russia and neighbouring countries،Economic Plants and their. Dis Pests Weed. 2003-2009. project.

12.Cai H, Hudson EA, Mann P, Verschoyle RD, Greaves P, Manson MM, et al. Growth-inhibitory and cell cycle-arresting properties of the rice bran constituent tricin in human-derived breast cancer cells in vitro and in nude mice in vivo. Br J Cancer. 2004;91(7):1364-71.

13.Oyama T, Yasui Y, Sugie S, Koketsu M, Watanabe K, Tanaka T. Dietary tricin suppresses inflammation-related colon carcinogenesis in male crj:cd-1mice. Cancer Prev Res. 2009;2(12):1031-40.

14.Agullo G, Gamet-Payrastre L, Manenti S, Viala C, Rémésy C, Chap H, et al. Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase:a comparison with tyrosine kinase and protein kinaseC inhibition. Biochem Pharmacol. 1997;53(11):1649-57.

15.Wang I-K، Lin-Shiau S-Y، Lin J-K. Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. Eur J Cancer. 1999;35(10):1517-25.