

تأثیر ترکیب تریسین استخراج شده از اندام هوایی گیاه *Allium atroviolaceum* 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 دارویی، 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 تکثیر 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 می‌باشد.

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 atroviolaceum* انجام شد. اثر سایتوتوکسیک تریسین در غلظت‌های ۱۲۰، ۱۰۰، ۸۰، ۶۰ و ۴۰ μM ، به روش MTT ارزیابی گردید. اثر آپوپتوتیک در گروه سلول‌های تیمار شده در غلظت IC₅₀ تریسین و سلول‌های فاقد تیمار (گروه کنترل)، با استفاده از کیت Annexin-V و فلوسایتومتری بررسی شد.

یافته‌ها: توان زیستی سلول‌ها در غلظت‌های تریسین به ترتیب، $85/66 \pm 1/52$ ، $76 \pm 3/60$ ، $66/33 \pm 4/16$ و $44 \pm 3/60$ و $36/66 \pm 3/21$ بود ($p < 0/01$). غلظت IC₅₀ تریسین $117/5 \pm 4/4 \mu\text{M}$ ، برای رده سلولی PC3 بود. میزان آپوپتوز در سلول‌های PC3 پس از ۴۸ ساعت تیمار با غلظت IC₅₀ تریسین، $24/3 \pm 0/58$ ٪ بدست آمد که در مقایسه با سلول‌های کنترل ($23/3 \pm 0/58$ ٪) معنی‌دار نبود.

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

واژه‌های 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 دارویی، عوارض جانبی بر بافت‌های سالم و عود بیماری ناشی از مقاومت‌های دارویی، از جمله معایب شیمی‌درمانی می‌باشند (۳و۲). 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-۷-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 کارسینوم‌ها، ممانعت از آنژیوژنز، بازدارندگی رشد سلولی و مقاومت دارویی می‌باشد (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 (۹و۱۰). در این مطالعه از گیاه *Allium atroviolaceum* 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 (۱۲و۱۳) 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 می‌باشد.

* 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

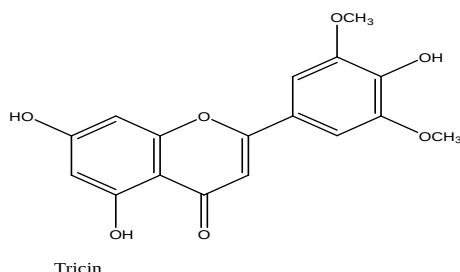
یافته ها

نتایج خالص سازی مولکول با کد ZG-G: نتایج حاصل از مطالعات طیف ستی، به صورت زیر مشخص شد. ماده حاصله از تفسیر طیفها به عنوان Tricin شناسایی گردید (شکل ۱).

$^1\text{H NMR}$: (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 7.32 (2H, s, H-2', H-6'), 6.97 (1H, s, H-3), 6.57 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 6.21 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6), 3.89 (6H, s, OCH $_3$ × 2)

$^{13}\text{C NMR}$: (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 181.7 (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 (-OCH $_3$ × 2).

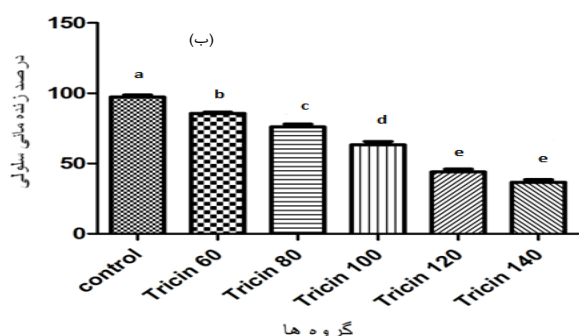
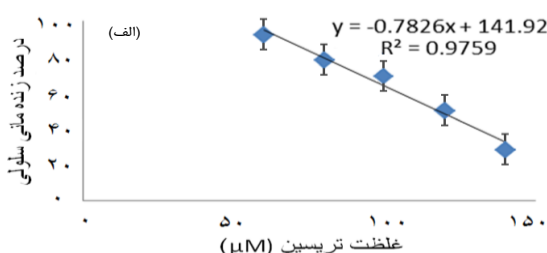
MS: m/z 330 [M] $^+$, 178 [M-152] $^+$, 153 [M-152-26]



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، $117/5 \pm 4/4 \mu\text{M}$ بدست آمد.



نمودار ۱. الف: اثر کشندگی تریسین در غلظت‌های مختلف (IC_{50} تریسین، $117/5 \pm 4/4 \mu\text{M}$); ب: نمودار دوز-پاسخ تریسین بر رده PC3. حروف غیرمشابه نشانه معناداری در سطح $0/05$ می باشد.

انستیتو پاستور ایران خریداری شد. سلولها در محیط کشت DMEM با ۱۰٪ FBS و ۱٪ پنی‌سیلین/استرپتومایسین (Gibco, USA) و در شرایط دمای 37°C و ۵٪ CO_2 و ۹۰٪ رطوبت در انکوباتور کشت داده شدند. اندام هوایی گیاه *Allium atroviolaceum* 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 ۶۳-۱۰۰-۰/۱ 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 (۴۰:۶۰) و اتیل استات: اسید استیک: گلیسیال: اسید فرمیک: آب (۱۰۰:۱۱:۱۱:۲۷) ردیابی شد و با هم مخلوط گردید.

خالص‌سازی مولکول با کد ZG-G: پس از تغلیظ فراکشن (G)۸۱، 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) $^1\text{H NMR}$ ، $^{13}\text{C NMR}$ و MS خارج کشور ایران، تعیین ساختار گردید. پودر تریسین پس از استخراج و خالص‌سازی، در محلول ۸۰٪ اتانول و ۲۰٪ DMSO حل شده و با عبور از فیلتر ۰/۲۲ میکرونی استریل گردید.

بررسی سایتوتوکسیسیته با آزمون MTT: 5×10^3 سلول در پلیت ۹۶ خانه کشت و در پنج گروه تحت تیمار با تریسین، غلظت‌های ۱۲۰، ۱۰۰، ۸۰، ۶۰ و ۴۰ μM (۱۲ و ۱۳) به مدت ۲۴h در انکوباتور قرار گرفتند.

گروه کنترل فاقد تریسین بود. سپس محیط کشت سلولها با محیط تازه حاوی ۲۰ μL محلول تترازولیوبروماید ((dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dimethyltetrazolium bromide) (MTT: diphenyltetrazolium bromide) 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.

$$100 \times (\text{جذب نوری کنترل} / \text{جذب نوری نمونه}) = \text{قابلیت زیستی سلولها} \%$$

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 $p < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

تاثیر دارد و فلاونوئیدها بسته به ساختار مولکولی، می‌توانند به عنوان مهار کننده‌های کیناز در انتقال سیگنال نقش داشته باشند. مطالعات نشان داده، موقعیت و تعداد گروه‌های هیدروکسیل حلقه ۲-فنیل (حلقه B)، تاثیر قدرتمندی بر اثر مهاری این مولکول‌ها دارد (۱۴ و ۱۵).

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 B، منجر به افزایش چشمگیر تولید رادیکال‌های هیدروکسیل در سیستم فتون میشوند که این فعالیت پرواکسیدانی، مسئول اثرات سایتوتوکسیک و پروآپتوزی فلاونوئیدهای استخراج شده از بسیاری از گیاهان دارویی است. متیلاسیون گروه‌های هیدروکسیل، می‌تواند منجر به کاهش رفتار پرواکسیدانی فلاونوئیدها گردد (۵).

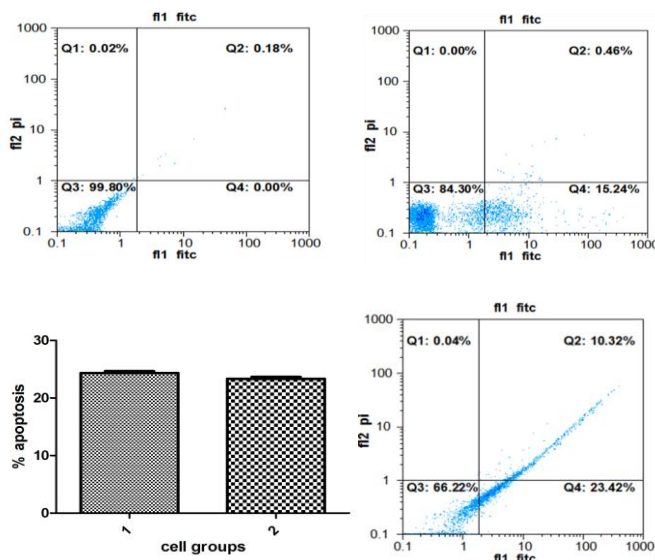
Wang و همکاران گزارش دادند احتمالاً فعال شدن کاسپاز ۳ و القای آپتوز توسط فلاونوئیدها، به تعداد گروه‌های هیدروکسیل در حلقه ۲-فنیل و عدم وجود گروه ۳-هیدروکسیل بستگی داشته و حضور گروه ۳-هیدروکسیل موجب مهار القای آپتوز سلولی می‌گردد. از سویی هرچه تعداد گروه‌های هیدروکسیل در حلقه ۲-فنیل بیشتر باشد، قدرت بازایی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

پیشنهادهای: از آنجا که رده سلولی PC3 رده‌ای متاستازی است، احتمالاً بتوان با تحقیقات در زمینه درمان‌های مکمل با فلاونوئیدهایی همچون ترپسین، اقدامی کمک‌کننده در درمان و یا کنترل پیشرفت سرطان پروستات انجام داد. پیشنهاد می‌شود مطالعاتی با هدف تأثیر ترپسین 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 می‌گردد.

آپتوز: میزان آپتوز در سلول‌های PC3 تیمار شده به مدت ۴۸h با غلظت IC₅₀ ترپسین برابر با ۲۴/۳±۰/۵۸٪ و در گروه کنترل (سلول‌های تیمار نشده با ترپسین)، ۲۳/۳±۰/۵۸٪ بود و تفاوت معنی‌داری بین دو گروه نشان نداد (نمودار ۲).



نمودار ۲. آپتوز سلولی در غلظت ۱۱۷/۵μM (IC₅₀) ترپسین. نتایج نشان داد مکانیسم مرگ سلول‌های PC3 تیمار شده با غلظت IC₅₀ ترپسین بعد از ۴۸h از مسیر آپتوز نبوده و احتمالاً مرگ سلولی از طریق مکانیسم دیگری رخ می‌دهد (P=۰/۱۵۷).

بحث و نتیجه گیری

پژوهش حاضر نشان داد، ترپسین استخراج شده از عصاره گیاه *Allium atroviolaceum* در رده سلولی سرطان پروستات PC3 اثر کشندگی و مهار تکثیر وابسته به دوز، دارد. این یافته با مطالعات پیشین در این زمینه هم‌سو می‌باشد. Cia و همکاران نشان دادند، ترپسین بر رده سرطان سینه MDA-MB-468 اثر مهارکنندگی رشد و توقف چرخه سلولی دارد (۱۲). یافته‌های Oyama و همکاران حاکی از تأثیر مصرف ترپسین بر مهار التهاب و کارسینوماز کولون ناشی از آن و نیز کاهش معنی‌دار رشد و تکثیر سلول‌های آدنوکارسینوما در موش‌های نر CD-1 بود (۱۳).

با این وجود، میزان آپتوز القا شده در سلول‌های PC3 تیمار شده با غلظت IC₅₀ ترپسین (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 ترپسین (۵μM) منجر به توقف سلول‌های MDA-MB-468 سرطان سینه در فاز G2/M گردید بدون اینکه منجر به القای آپتوز گردد، هم‌سو می‌باشد (۱۲). بر اساس مطالعات پیشین مشخص شد، ساختار فلاونوئیدها در فعالیت آنها

Effect of Isolated Tricin from Aerial Part of *Allium atrovillosum* Boiss. on Proliferation 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: Tricin as a flavone compound, in many food sources, has anti-inflammatory and anti-proliferative effects in several cancer cell lines. Considering the importance of using natural anti-cancer drugs in treatment-resistant cancers such as prostate cancer, the aim of this study was to investigate the effect of tricin on cell growth and proliferation and induction of apoptosis in human PC3 prostate cancer cell line.

METHODS: In this experimental study, the PC3 cell line was prepared from the Pasteur Institute of Iran and cultivated. Extraction and purification of Tricin were performed using column chromatography and re-crystallization of *Allium atrovillosum* extract. The cytotoxic effect of Tricin in concentrations of 60, 80, 100, 120, and 140 μ M was evaluated by MTT method. Apoptotic effect was evaluated in the treated cell group with the IC₅₀ concentration of Tricin and untreated cells (control group), using an Annexin-V kit and flow cytometry.

FINDINGS: The viability of cells at different tricin 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 IC₅₀ concentration of tricin was 117.5 ± 4.4 μ M for PC3 cell line. The apoptosis rate in PC3 cells after 48 hours of treatment with IC₅₀ concentration of tricin was $24.3 \pm 0.58\%$, which was not significant in comparison with control cells ($23.3 \pm 0.58\%$).

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

KEY WORD: Prostate cancer, Tricin, Apoptosis

Please cite this article as follows:

Lorigooini Z, Ghasemi S, Asgarian Dehkordi N, Motamedi M. Effect of Isolated Tricin from Aerial Part of *Allium atrovillosum* Boiss. on Proliferation 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 1 α -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-Payraastre 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.