

小叶莲有效成分对人乳腺癌细胞增殖、细胞周期及线粒体膜电位的影响[△]

孔越^{1,2*}, 王庆辉¹, 尚明英^{1#}, 肖军军³, 孟书聪³, 蔡少青¹(1.北京大学药学院天然药物学系, 北京 100191; 2.国家知识产权局专利局专利审查协作北京中心, 北京 100190; 3.北京大学基础医学院细胞生物学系, 北京 100191)

中图分类号 R931.6 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)10-1368-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.10.19

摘要 目的:探讨小叶莲提取物、有效成分及成分组合对人乳腺癌细胞增殖的影响及机制。方法:采用酸性磷酸酶法测定小叶莲4种提取物[乙醇提取物(X_c)、乙醇提取物石油醚萃取物(X_p)、乙醇提取物乙酸乙酯萃取物(X_e)、乙醇提取物正丁醇萃取物(X_z)],5种有效成分[鬼臼毒素(S_1)、去氧鬼臼毒素(S_2)、4-去甲去氧鬼臼毒素(S_3)、8-异戊烯基山柰酚(S_4)、8,2'-二异戊烯基槲皮素-3-甲醚(S_5)]以及3种有效成分组合{组合1[S_1 - S_2 - S_3 - S_4 - S_5 (2:4:1:4:32), Z_1]、组合2[S_2 - S_4 (1:1), Z_2]、组合3[S_3 - S_4 (1:4), Z_3]}对人乳腺癌MDA-MB-231、MCF-7细胞增殖的影响;流式细胞仪检测上述样品对MDA-MB-231、MCF-7(或T47D)细胞周期和细胞线粒体膜电位的影响。结果:小叶莲有效成分组合 Z_1 对MDA-MB-231、MCF-7细胞具有显著抑制作用,其半数抑制浓度(IC_{50})分别为(0.27±0.2)、(0.11±0.1) μg/mL;提取物 X_c 、 X_p 、 X_e ,有效成分 S_2 、 S_4 以及成分组合 Z_2 、 Z_3 对MDA-MB-231、MCF-7(或T47D)细胞的增殖均有较强抑制作用, IC_{50} 均小于15 μg/mL;各提取物和有效成分均可阻滞MDA-MB-231、MCF-7细胞周期于 G_2/M 期;各有效成分组合均可阻滞MDA-MB-231、T47D细胞周期于 G_0/G_1 期,并能降低MDA-MB-231、T47D细胞线粒体膜电位。结论:小叶莲有效成分及成分组合可通过影响细胞周期和线粒体膜电位,从而抑制乳腺癌细胞的增殖。

关键词 小叶莲;有效成分;有效成分组合;人乳腺癌MDA-MB-231细胞;人乳腺癌MCF-7细胞;人乳腺癌T47D细胞;细胞周期;线粒体膜电位

Effects of Active Constituents of *Sinopodophylli Fructus* on Cell Proliferation, Cell Cycle and Mitochondrial Membrane Potential of Human Breast Cancer Cell

KONG Yue^{1,2}, WANG Qinghui¹, SHANG Mingying¹, XIAO Junjun³, MENG Shucong³, CAI Shaoqing¹(1.Dept. of Natural Medicines, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China; 2.Patent Examination Cooperation Center of State Intellectual Property Office, Beijing 100190, China; 3.Dept. of Cell Biology, School of Basic Medical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To explore the effects and mechanism of extracts, active constituents and constituent combination of *Sinopodophylli Fructus* on cell proliferation of human breast cancer. METHODS: Acid phosphatase method was conducted to determine the effects of 4 extracts [ethanol extract (X_c), petroleum ether extract from ethanol extract (X_p), ethyl acetate extract from ethanol extract (X_e), *n*-butanol extract from ethanol extract (X_z)], 5 active constituents [podophyllotoxin (S_1), deoxypodophyllotoxin (S_2), 4-desmethyl deoxypodophyllotoxin (S_3), 8-isopentenyl kaempferol (S_4), 8,2'-diisoprenyl quercetin-3-methyl ether (S_5)] and 3 active constituent combination [combination 1, S_1 - S_2 - S_3 - S_4 - S_5 (2:4:1:4:32), Z_1 ; combination 2, S_2 - S_4 (1:1), Z_2 ; combination 3, S_3 - S_4 (1:4), Z_3] on the MDA-MB-231, MCF-7 cell proliferation; flow cytometry was adopted to detect the effects of above-mentioned samples on MDA-MB-231, MCF-7 (T47D) cell cycle and mitochondrial membrane potential. RESULTS: The active constituent combination Z_1 showed significant inhibitory effects on MDA-MB-231, MCF-7 cells, the half inhibitory concentrations (IC_{50}) were (0.27±0.2), (0.11±0.1) μg/mL; extracts X_c , X_p , X_e , active constituents S_2 , S_4 and active constituent combination Z_2 , Z_3 showed relatively strong inhibitory effects on MDA-MB-231, MCF-7 (T47D) cell proliferation (IC_{50} <15 μg/mL). Both extracts and active constituents can block MDA-MB-231, MCF-7 cell cycle in G_2/M phase; all active constituents can block MDA-MB-231, T47D cell cycle in G_0/G_1 phase, and can reduce MDA-MB-231, T47D cell mitochondrial membrane potential. CONCLUSIONS: The active constituents and constituent combination of *Sinopodophylli Fructus* can inhibit cell proliferation of

[△] 基金项目:国家科技重大专项重大新药创制项目(No.2013ZX09103002-006, 2009ZX09308-004);中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室项目(No.2010JZ-W-01)

* 硕士。研究方向:中药活性成分。电话:010-62413792。E-mail:kong.yue@foxmail.com

通信作者:副教授,硕士生导师,博士。研究方向:中药药效物质与质量标准。电话:010-82802534。E-mail:myshang@bjmu.edu.cn

breast cancer by affecting cell cycle and mitochondrial membrane potential.

KEYWORDS *Sinopodophylli Fructus*; Active constituent; Active constituent combination; Human breast cancer MDA-MB-231 cells; Human breast cancer MCF-7 cells; Human breast cancer T47D cells; Cell cycle; Mitochondrial membrane potential

小叶莲为小檗科植物桃儿七 [*Sinopodophyllum hexandrum* (Rolyle) Ying] 的干燥成熟果实, 具有活血调经的功效, 用于血瘀经闭、难产、死胎、胎盘不下等多种妇科病^[1], 被誉为专治妇女病的特效藏药。小叶莲主要含有黄酮类和木脂素类成分, 其中以 8, 2'-二异戊烯基槲皮素-3-甲醚和 8-异戊烯基山柰酚等异戊烯基黄酮以及鬼臼毒素、去氧鬼臼毒素和 4'-去甲去氧鬼臼毒素等芳基四氢萘类木脂素为主要成分^[2-6]。文献报道, 小叶莲乙醇提取物对小鼠移植性肝癌、艾氏腹水癌和裸鼠移植性乳腺癌均具有明显的抑瘤作用^[7-9], 对人乳腺癌、人口腔上皮癌、前列腺癌及大鼠神经胶质细胞具有显著的细胞毒活性^[2, 8-9]。鬼臼毒素类木脂素是公认的具有抗肿瘤活性的一类成分^[10]; 而黄酮类, 特别是异戊烯基黄酮被认为是很有前景的抗肿瘤药物, 具有抗氧化、抗菌、抗炎、雌激素样作用等多种生物活性^[11-14]。

本课题组前期研究发现, 小叶莲乙醇提取物、乙酸乙酯萃取物以及小叶莲主要成分 8, 2'-二异戊烯基槲皮素-3-甲醚和槲皮素对人乳腺癌细胞 MCF-7 裸鼠移植瘤具有明显的抑瘤作用, 对人乳腺癌 T47D、MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞增殖有明显抑制作用^[2, 9]。在前期研究基础上, 本研究采用人乳腺癌 T47D、MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞株, 对小叶莲乙醇提取物及其不同极性萃取部分、从小叶莲抗乳腺癌有效部位乙酸乙酯萃取物中分离得到的各种有效成分以及有效成分组合进行体外乳腺癌细胞增殖抑制试验, 并初步探讨其对乳腺癌细胞周期和细胞线粒体膜电位的影响, 为进一步明确小叶莲抗乳腺癌的有效成分和作用机制提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

680 型 Microplate Reader 酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司); FACS Clibur 型流式细胞仪 (美国 Becton Dickinson 公司)。

1.2 药品与试剂

注射用顺铂 (无菌分装粉针剂, 齐鲁制药有限公司, 批号: 1060171DB, 规格: 10 mg); 紫杉醇注射液 (扬子江药业集团有限公司, 批号: 10031812, 规格: 16.7 mL: 100 mg); 鬼臼毒素 (S_1)、去氧鬼臼毒素 (S_2)、4'-去甲去氧鬼臼毒素 (S_3)、8-异戊烯基山柰酚 (S_4) 和 8, 2'-二异戊烯基槲皮素-3-甲醚 (S_5) 为笔者从小叶莲中分离得到, 通过 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱等方法鉴定其化学结构, 经高效液相色谱 (HPLC)-二级管阵列检测 (DAD) 面积归一化法测定各化合物纯度均高于 98%; 小叶莲有效成分组合 1 [S_1 - S_2 - S_3 - S_4 - S_5 (2:4:1:4:32), $m/m/m/m$, Z_1]、组合 2 [S_2 - S_4 (1:1), m/m , Z_2]、组合 3 [S_3 - S_4 (1:4), m/m , Z_3]; 小叶莲乙醇提取物 (X_e)、乙醇提取物石油醚萃取物 (X_p)、乙醇提取物乙酸乙酯萃取物 (X_c)、乙醇提取物正丁醇萃取物 (X_d) 按文献[8]方法制备, 单体化合物和有效成分组合以二甲

基亚砷 (DMSO) 制备成浓度均为 10 $\mu\text{mol/mL}$ 的贮备液, 即 S_1 、 S_2 、 S_3 、 S_4 的质量浓度分别为 4.14、3.98、3.84、3.54、4.52 mg/mL , Z_1 、 Z_2 、 Z_3 的质量浓度分别为 4.34、3.76、3.60 mg/mL ; 将小叶莲提取物以 DMSO 制备成质量浓度均为 10 mg/mL 的贮备液; DMEM 培养基、新生小牛血清 (美国 Gibco 公司); 硝基苯磷酸盐 (美国 Fluka 公司); 其余试剂均为国产分析纯, 均由北京化工厂生产。

1.3 细胞株

人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株、人乳腺癌 MCF-7 细胞株和人乳腺癌 T47D 细胞株由北京大学医学部肿瘤生物中心杜晓娟副教授提供。

2 方法

2.1 细胞培养

人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株、人乳腺癌 MCF-7 细胞株和人乳腺癌 T47D 细胞株均用含 10% 新生小牛血清、100 u/mL 青霉素和 100 u/mL 链霉素的 DMEM 培养基于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、95% 湿度、5% CO_2 的孵箱中培养, 细胞接近融合时用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化传代, 同时接种细胞进行试验。

2.2 酸性磷酸酶法检测细胞增殖及增殖抑制率

按照文献[15]方法, 取对数生长期细胞消化后制成细胞悬液, 按 1.5×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔培养板中, 培养 24 h 待细胞完全贴壁后, 实验组分别加入 1、5、25、50、100 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度的小叶莲提取物或者浓度为 1、5、10、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 的单体化合物和有效成分组合; 阴性对照组加入 DMEM 培养液; 顺铂组 (阳性对照) 分别加入 1、2、4、6、8、10 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度的顺铂溶液。每个浓度设 6 个复孔, 分别于作用 24、48、72 h 后弃去培养基, 各孔用磷酸盐缓冲液 (PBS) 100 μL 洗 2 遍, 弃 PBS, 加入 10 mmol/L 的硝基苯磷酸盐溶液 100 μL (0.1 mol/L 醋酸缓冲液制备, 含 0.1% Triton X-100), 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h 后, 每孔加入 1 mol/L 氢氧化钠溶液 10 μL 终止反应。用酶标仪检测 405 nm 波长处吸光度 (A), 重复试验 3 次。计算细胞的增殖抑制率 [增殖抑制率 (%) = (1 - 实验组平均 A 值 / 阴性对照组平均 A 值) $\times 100\%$]。采用 SPSS 21.0 软件计算半数抑制浓度 (IC_{50})。

2.3 流式细胞术检测细胞周期

小叶莲提取物和单体化合物的实验组采用人乳腺癌 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞, X_e 和 X_c 加入的质量浓度均为 25 $\mu\text{g/mL}$, S_2 、 S_3 、 S_4 加入的质量浓度分别为 3.98、3.84、17.7 $\mu\text{g/mL}$; 有效成分组合的实验组采用人乳腺癌 MDA-MB-231 和 T47D 细胞, Z_1 、 Z_2 、 Z_3 加入的质量浓度分别为 0.217、0.94、51.8 $\mu\text{g/mL}$; 阴性对照组加入 DMEM 培养液; 紫杉醇组 (阳性对照) 加入紫杉醇 2 $\mu\text{g/mL}$ 。上述各组分别于作用 24、48 h 后, 用胰蛋白酶溶液消化细胞, PBS 洗涤, 加入冰预冷的 70% 乙醇 3 mL, 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 1 h, PBS 洗涤 2 次, 加入 0.2 mg/mL RNA 酶室温保温 30

min,加入终质量浓度为20 mg/L的碘化丙啶,温育30 min。应用流式细胞仪检测样品对乳腺癌细胞周期的影响,不同分期细胞所占比例采用ModFit LT细胞周期分析软件进行分析。

2.4 流式细胞术检测细胞线粒体膜电位

人乳腺癌MDA-MB-231和T47D细胞株在DMEM培养液中培养。小叶莲有效成分组合实验组Z₁、Z₂、Z₃加入质量浓度分别为0.217、0.94、1.8 μg/mL,阴性对照组加入DMEM培养液,紫杉醇组(阳性对照)加入紫杉醇2 μg/mL。作用24 h后,经胰蛋白酶溶液消化细胞,冷PBS洗涤,500 μL PBS重悬细胞,再加入500 μL Rhodamine 123(10 mg/L)用以标记活细胞,终浓度为0.14 μmol/L。37 ℃孵育30 min后,PBS洗涤细胞3次,PBS重悬细胞,流式细胞仪检测细胞线粒体膜电位(激发波长为488 nm,发射波长为525 nm)。

3 结果

3.1 小叶莲提取物、有效成分和成分组合对人乳腺癌细胞增殖的影响

3种小叶莲提取物X_c、X_p、X_e均可较好地抑制MDA-MB-231细胞的增殖,X_e作用不明显;5种单体化合物对MDA-MB-231细胞的增殖均有一定抑制作用,以S₃作用最强;在高浓度(100 μmol/L)时2种异戊烯基黄酮类成分S₄、S₅表现出较强的抑制作用,其抑制率分别为94.8%、98.6%,其作用强于3种木脂素类成分S₁、S₂、S₃(抑制率分别为50.0%、60.2%、69.9%);3种有效成分组合中以Z₁作用最强。

各样品对MCF-7细胞的增殖均有一定的抑制作用,4种不同极性小叶莲提取物中以X_c的作用最强;5种单体化合物中以S₂作用最强,S₄、S₅则在高浓度(100 μmol/L)下表现出较强的抑制活性(抑制率分别为81.2%、92.1%);3种有效成分组合中以Z₁作用最强。IC₅₀测定结果见表1。

3.2 小叶莲提取物、有效成分和成分组合对细胞周期的影响

3.2.1 小叶莲提取物及有效成分对MDA-MB-231和MCF-7细胞周期的影响 小叶莲各提取物和单体化合物与MDA-MB-231细胞分别作用24 h后,与阴性对照组比较,各实验组G₀/G₁期细胞比例明显降低,G₂/M期细胞比例明显升高;小叶莲各提取物和单体化合物与MCF-7细胞分别作用24 h后,与阴性对照组比较,各实验组G₀/G₁期细胞比例显著升高、S期细胞比例明显降低;紫杉醇组也表现出同样的抑制作用,结果见表2。

3.2.2 小叶莲有效成分组合对MDA-MB-231、T47D细胞周期的影响 小叶莲有效成分组合与MDA-MB-231、T47D细胞分别作用24 h后,与阴性对照组比较,各实验组G₀/G₁期细胞比例明显降低,G₂/M期细胞比例明显升高;紫杉醇组也表现出同样的抑制作用,结果见表3。

表1 小叶莲提取物、有效成分和成分组合作用48 h后对细胞的IC₅₀测定结果($\bar{x} \pm s, \mu\text{g/mL}, n=6$)

Tab 1 Determination results of IC₅₀ of Sinopodophylli Fructus extracts, active constituents, constituent combination on cell after 48 h ($\bar{x} \pm s, \mu\text{g/mL}, n=6$)

组别	MDA-MB-231	MCF-7
阴性对照组		
顺铂组	21.27 ± 0.3	25.96 ± 0.4
X _c 组	14.01 ± 0.1	2.67 ± 0.2
X _p 组	1.00 ± 0.4	2.08 ± 0.3
X _e 组	0.62 ± 0.1	1.26 ± 0.1
X _c 组	-	16.59 ± 0.5
S ₁ 组	2.68 ± 0.2	9.08 ± 0.4
S ₂ 组	2.10 ± 0.3	1.00 ± 0.1
S ₃ 组	0.28 ± 0.1	16.55 ± 0.4
S ₄ 组	10.20 ± 0.5	10.24 ± 0.6
S ₅ 组	11.50 ± 0.4	24.40 ± 0.5
Z ₁ 组	0.27 ± 0.2	0.11 ± 0.1
Z ₂ 组	2.72 ± 0.3	5.43 ± 0.4
Z ₃ 组	1.27 ± 0.2	0.74 ± 0.1

注:“-”表示IC₅₀>100 μg/mL

Note:“-”means IC₅₀>100 μg/mL

表2 小叶莲提取物及有效成分作用24 h后对MDA-MB-231、MCF-7细胞周期的影响(%)

Tab 2 Effects of Sinopodophylli Fructus extracts and active constituents on MDA-MB-231, MCF-7 cell cycle after 24 h (%)

组别	MDA-MB-231细胞周期分布			MCF-7细胞周期分布		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
阴性对照组	56.07	40.24	3.69	65.55	19.24	15.22
紫杉醇组	6.01	37.01	56.98	89.09	3.41	7.50
X _c 组	7.58	48.12	44.29	90.10	2.48	7.42
X _p 组	9.57	37.40	53.02	89.62	3.84	6.54
S ₂ 组	9.44	49.95	40.61	90.18	3.79	6.03
S ₃ 组	8.39	46.98	44.62	90.19	1.71	8.10
S ₄ 组	7.94	49.96	42.10	90.24	6.07	3.68

表3 小叶莲有效成分组合作用24 h后对MDA-MB-231、T47D细胞周期的影响(%)

Tab 3 Effects of Sinopodophylli Fructus active constituents on MDA-MB-231 and T47D cell cycle after 24 h (%)

组别	MDA-MB-231细胞周期分布			T47D细胞周期分布		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
阴性对照组	45.72	39.25	15.03	71.29	19.17	9.54
紫杉醇组	3.07	14.53	82.40	6.86	17.15	75.99
Z ₁ 组	2.86	23.70	73.44	5.05	22.56	72.39
Z ₂ 组	2.34	20.90	76.76	4.53	18.05	77.42
Z ₃ 组	1.82	20.21	77.97	3.97	17.43	78.10

3.3 小叶莲有效成分组合对细胞线粒体膜电位的影响

小叶莲有效成分组合Z₁、Z₂、Z₃作用MDA-MB-231、T47D细胞24 h后,弱荧光细胞(M1)与阴性对照组比较开始增多,常荧光细胞(M2)相应地减少,提示MDA-MB-231和T47D细胞在不同的小叶莲有效成分组

合作用下,线粒体跨膜电位受到影响而下降,使得进入细胞内的荧光染料减少、M1 百分比增高。

表4 小叶莲有效成分组合对人乳腺癌MDA-MB-231和T47D细胞线粒体膜电位的影响(%)

Tab 4 Effects of Sinopodophylli Fructus active constituents on mitochondrial membrane potential in MDA-MB-231, T47D cell after 24 h (%)

组别	MDA-MB-231 细胞比例		T47D 细胞比例	
	M1	M2	M1	M2
阴性对照组	6.62	93.38	2.43	97.57
紫杉醇组	14.91	85.09	30.26	69.74
Z ₁ 组	42.37	57.63	35.92	64.08
Z ₂ 组	38.32	61.68	34.66	65.34
Z ₃ 组	39.25	60.75	35.90	64.10

4 讨论

本研究在前期研究工作的基础上通过细胞试验进一步证明了小叶莲提取物乙酸乙酯部位为小叶莲抑制乳腺癌的有效部位。从小叶莲乙酸乙酯萃取物中分离得到的5种单体化合物,其中3种鬼臼毒素类木脂素S₁、S₂和S₃对2种类型乳腺癌细胞均表现出了较强的抑制作用,S₃对MDA-MB-231细胞的抑制作用最强,S₂则对MCF-7细胞的抑制作用最强;异戊烯基黄酮类化合物S₄和S₅在高浓度(100 μmol/L)下对人乳腺癌细胞MDA-MB-231和MCF-7的增殖表现出较强的抑制作用。3种有效成分组合分别为根据各单体化合物在小叶莲药材中的含量比例配合而成,其中Z₁为3种鬼臼毒素类木脂素和2种异戊烯基黄酮类成分按一定比例组合而成,其对乳腺癌细胞的抑制作用强于各单体化合物。结果提示,小叶莲中所含的木脂素类和异戊烯基黄酮类化合物可能通过不同的作用途径发挥抗乳腺癌活性,各有效成分组合会产生叠加作用。

本研究用实验样品对3种乳腺癌细胞周期的影响不同(因不同实验阶段实验室内细胞生长等原因,小叶莲提取物和单体化合物选择MDA-MB-231和MCF-7细胞株,化合物组合样品选择MDA-MB-231和T47D细胞株)。对于乳腺癌细胞株MDA-MB-231,X_c、X_e及S₂、S₃、S₄及成分组合Z₁、Z₂、Z₃均将细胞阻滞在G₂/M期;对于乳腺癌细胞株T47D,各有效成分组合Z₁、Z₂、Z₃均将细胞阻滞在G₂/M期;而对于乳腺癌细胞株MCF-7,提取物及各单体化合物将细胞阻滞在G₀/G₁期。小叶莲提取物、有效成分及成分组合对不同的乳腺癌细胞周期产生的影响不同,各有效成分组合均能降低MDA-MB-231细胞和T47D细胞线粒体膜电位,具体作用机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 46.
- [2] Kong Y, Xiao JJ, Meng SC, *et al.* A new cytotoxic flavonoid from the fruits of *Sinopodophyllum hexandrum* [J]. *Fitoterapia*, 2010, 81(5): 367-370.
- [3] 尚明英, 李萍, 李军, 等. 藏药小叶莲的化学成分研究[J]. *中草药*, 2000, 31(8): 569-571.
- [4] 尚明英, 徐国钧, 徐珞珊, 等. HPLC法测定鬼臼类生药中鬼臼木脂素的含量[J]. *中国药科大学学报*, 1996, 27(4): 219-222.
- [5] 王蔼华, 刘广学, 徐风, 等. 小叶莲化学指纹图谱研究[J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(20): 3528-3533.
- [6] Wang AH, Kong Y, Shang MY, *et al.* Simultaneous quantification of eight active compounds in *Sinopodophyllum hexandrum* by HPLC-DAD[J]. *J Chin Pharmaceu Sci*, 2015, 24(6): 376-382.
- [7] 尚明英, 蔡少青, 徐珞珊, 等. 鬼臼类中药及其木脂素类成分的药效学研究[J]. *中草药*, 2002, 32(8): 722-724.
- [8] 郭帅, 王璐, 苏丹, 等. 小叶莲提取物抗乳腺肿瘤活性研究[J]. *中国药房*, 2014, 25(7): 577-580.
- [9] 宗玉英, 党合群, 骆桂法, 等. 110种藏药抗肿瘤体外筛选实验研究[J]. *药学实践杂志*, 2000, 18(5): 290-291.
- [10] Gordaliza M, Castro MA, Del Corral JM, *et al.* Antitumor properties of podophyllotoxin and related compounds [J]. *Curr Pharm Des*, 2000, 6(18): 1811-1839.
- [11] Ren W, Qiao Z, Wang H, *et al.* Flavonoids: promising anticancer agents[J]. *Med Res Rev*, 2003, 23(4): 519-534.
- [12] 李文魁, 林新, 罗崇念, 等. 异戊烯基黄酮在植物界的分布及其生理活性[J]. *国外医药植物药分册*, 1995, 10(5): 211-213.
- [13] 孙彦君, 纪宝玉, 冯卫生, 等. 8-异戊烯基山柰酚研究进展[J]. *中药材*, 2013, 36(9): 1537-1541.
- [14] Ma LM, Xu F, Li FC, *et al.* The profiling and identification of the metabolites of 8-prenylkaempferol and a study on their distribution in rats by high-performance liquid chromatography with diode array detector and combined with electrospray ionization ion trap time-of-flight multi-stage mass spectrometry[J]. *Biomed Chromatogr*, 2016, 30(2): 175-190.
- [15] Yang TT, Sinai P, Kain SR. An acid phosphatase assay for quantifying the growth of adherent and nonadherent cells[J]. *Anal Biochem*, 1996, 241(1): 103-108.

(收稿日期:2016-05-14 修回日期:2016-12-23)

(编辑:林 静)