

桑黄水提物中小分子化合物对小鼠肝癌细胞 Hepa 1-6 的抑制活性分析

耿涛¹, 周庆祥², 韦红显², 卢芙萍¹, 武华周¹, 娄德钊¹, 王树昌^{1*}

1. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 海南海口 571101; 2. 海南大学生态与环境学院, 海南海口 570228

摘要: 桑黄 (*Sanghuangporus* spp.) 水提物中多糖、萜烯类化合物等生物大分子具有抑制肿瘤细胞的作用, 但桑黄水提物中小分子化合物的功能尚不明确。本研究通过 3000 D 超滤法获得桑黄小分子化合物, 通过双荧光标记法研究其对小鼠肝癌细胞 Hepa 1-6 的抑制活性, 通过代谢组分析法解析其抑癌活性成分。结果表明: 桑树桑黄 (*Sanghuangporus sanghuang* Sheng H. Wu, L. W. Zhou & Y. C. Dai) 和杨树桑黄 (*Phellinus baumii*) 小分子化合物均能诱导小鼠肝癌细胞 Hepa 1-6 的损伤和凋亡, 其抑制率分别为(38.64±4.35)%和(32.52±3.57)%; 桑黄小分子化合物与桑黄粗多糖共同处理 Hepa 1-6 细胞, 其抑制率则分别达到(77.27±6.21)%和(76.92±5.45)%; 代谢组分析表明桑黄小分子化合物中包括玫瑰树碱、左旋水苏碱、脑苷-B 等已知明确具有抑癌功能的化合物, 同时鉴定出杂环类(6-氟吡啶、2,4,6-三甲基吡啶、1'-萘酰基-2-甲基吡啶等)、核苷-碱基类(1-甲基腺苷、N6-甲基腺苷、2'-O-甲基腺苷等)、二肽类(如亮氨酸+*、异亮氨酸+*和 γ -谷氨酰+*)、糖醇类(木糖醇、核糖醇、甘露醇、赤藓糖醇等)等可能参与肿瘤抑制作用的活性物质。研究表明桑黄水提物含有多种抑制肿瘤细胞的小分子化合物, 且与桑黄粗多糖等生物大分子起到协同抑癌作用。研究结果为解析桑黄抑制肿瘤作用机制和功能物质开发应用提供科学依据。

关键词: 桑黄; 水提物; 小分子化合物; 小鼠肝癌细胞 Hepa 1-6; 抑癌活性

中图分类号: R285.5 文献标志码: A

Analysis of Anticancer Activity on Mouse Hepatocarcinoma Cells Hepa 1-6 of Small Molecule Compounds in *Sanghuangporus* spp. Aqueous Extract

GENG Tao¹, ZHOU Qingxiang², WEI Hongxian³, LU Fuping¹, WU Huazhou¹, LOU Dezha¹, WANG Shuchang^{1*}

1. Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China;
2. College of Ecology and Environment, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China

Abstract: The biological macromolecules such as polysaccharides and terpenes in *Sanghuangporus* spp. aqueous extract have inhibitory effects on tumor cells, but the function was not yet clear. This study obtained small molecule compounds of *Sanghuangporus sanghuang* Sheng H. Wu, L. W. Zhou & Y. C. Dai and *Phellinus baumii* aqueous extracts through 3000 D ultrafiltration, and studied the inhibitory activities on mouse hepatocarcinoma cells Hepa 1-6 using dual fluorescence labeling. The anticancer active ingredients were analyzed using metabolomics analysis. The results showed that the small molecule compounds of *S. sanghuang* Sheng H. Wu and *P. baumii* could induce injury and apoptosis of Hepa 1-6, with inhibition rates of (38.64±4.35)% and (32.52±3.57)%, respectively. Meanwhile, the inhibition rates of small molecule compounds reached (77.27±6.21)% and (76.92±5.45)%, respectively, after mixing with crude polysaccharides. Me-

收稿日期 2024-04-03; 修回日期 2024-08-01

基金项目 海南省自然科学基金高层次人才项目 (No. 321RC622); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (No. 1630042023009); 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系项目 (No. CARS-18)。

作者简介 耿涛 (1984—), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 蚕桑资源多元利用。*通信作者 (Corresponding author): 王树昌 (WANG Shuchang), E-mail: wangshuchang2001@163.com。

tabolomic analysis showed that anti-cancer small molecular agents such as ellipticine, betonicine, cerebroside-B etc., were identified in the aqueous extract of *Sanghuangporus* spp. Antitumor related substances such as heterocyclic compounds (6-fluoroindole, 2,4,6-trimethylpyridine, 1'-naphthoyl-2-methylindole, etc.), nucleoside and bases (1-methyladenosine, N6-methyladenosine, 2'-O-methyladenosine, etc.), dipeptides (leucine+*, isoleucine+*, γ -glutamine+*, etc.), sugar alcohols (xylitol, ribose, mannitol, erythritol, etc.), were identified too. The results indicate that the aqueous extract of *Sanghuangporus* spp. contains multiple small molecular agents against tumor cells, which have a synergistic anti-cancer effect with biological macromolecules such as polysaccharides. This would provide a scientific basis for understanding the mechanism of anti-tumor of *Sanghuangporus* spp. and the development and application of functional substances.

Keywords: *Sanghuangporus* spp.; aqueous extract; small molecule compounds; mouse hepatocarcinoma cells Hepa 1-6; anti-cancer activity

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.12.022

中药桑黄含有丰富的生物活性成分,具有抗肿瘤^[1-2]、增强免疫力^[3]、抗氧化、抗菌消炎^[4]等功效。研究认为,桑黄主要利用多糖类和萜烯类物质,协同黄酮类、甾醇类等活性物质^[5-7],通过诱导细胞凋亡、抑制细胞增殖和迁移、提升机体免疫力等多种途径抑制肿瘤细胞^[7-8],已在日本、韩国和中国台湾等地成为抗癌辅助保健品或药物使用^[9-10]。

桑黄多糖的主要成分为 β -1,3-葡聚糖,能够抑制 B 淋巴细胞瘤-2 的表达,激活 caspase-3、caspase-9,而诱导白血病细胞 THP-1 和鼻咽癌细胞 HONE-1 凋亡^[1-2];协同桑黄素(glucoobovatine),诱导人结肠癌细胞 HT-29、人肝癌细胞 HepG-2 S 期阻滞^[8];提高血淋巴白细胞介素-2、白细胞介素-18 水平而增强机体免疫力^[3];通过降低血管内皮生长因子而降低人肝癌细胞 H22、肺癌细胞 S-180 的黏附和迁移^[6-7]。木三烯酮、 β -乳香酸、呋喃类三萜等桑黄三萜物质以游离形式或三萜糖苷形式存在时,发挥抑癌、护肝、溶血、抗 HIV 病毒等多种药理活性^[2-4,9]。

现代分析技术表明,桑黄水提液中除多糖等生物大分子外,还含有氨基酸类、生物碱类、有机酸类、可溶性糖以及无机盐等小分子化合物^[11-13],但其抑癌功能尚不明确。本研究通过 3000 D 超滤法获得桑树桑黄(*Sanghuangporus sanghuang* Sheng H. Wu, L. W. Zhou & Y. C. Dai)和杨树桑黄(*Phellinus baumii*)小分子化合物,通过双荧光标记法检测其对肿瘤细胞的抑制作用,然后通过代谢组学和多重比较分析其化合物组成,以明确桑黄水提物中小分子化合物的抑癌机制。

1 材料与方法

1.1 材料

桑树桑黄(*Sanghuangporus sanghuang* Sheng

H. Wu, L. W. Zhou & Y. C. Dai)和杨树桑黄(*Phellinus baumii* strain XZ-01)子实体均购自山东古桑农副产品股份有限公司;菌株均经过 ITS 序列鉴定为中药桑黄标准菌株。小鼠肝癌细胞 Hepa 1-6 为本实验室保存。

总还原糖检测试剂盒(6304)、1×PBS(P1020)购自北京索莱宝生物科技有限公司。Gibco DMEM(高糖,21068028)购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 桑黄子实体水提物的提取 称取桑黄子实体粉末 15.0 g,倒入锥形瓶中,按料液比 1:40(g/mL)加入 600 mL 蒸馏水;于 80~100 °C,超声波振荡提取 4 h;12 000 r/min 离心 10 min,取上清;真空泵抽滤,滤液旋转蒸发浓缩至原体积 1/30,即 20.0 mL。于-20 °C 保存,备用。

1.2.2 桑黄粗多糖的提取和桑黄水提物的超滤 桑黄水提液浓缩液加 5 倍体积无水乙醇,室温下放置过夜,离心收集沉淀,真空冷冻干燥,用 20.0 mL 蒸馏水复溶,即为粗多糖溶液。

桑黄水提浓缩液用 15.0 mL 3000 D 超滤管(MerckMillipore,UF900396),12 000 r/min 离心 30 min,用无菌水分别补足截留液和超滤液体积至 20.0 mL。

1.2.3 桑黄总糖含量测定 参照总还原糖检测试剂盒(6304)说明书,采用 DNS 法测定桑黄粗多糖溶液和桑黄水提物超滤液在 620 nm 处的吸光值,通过葡萄糖标准曲线方程计算样品中总糖含量。

1.2.4 小鼠肝癌细胞 Hepa 1-6 活性分析和抑制率计算 小鼠肝癌细胞 Hepa 1-6 用 DMEM 稀释至 1×10^6 个/mL,按每孔 2.0 mL 接种到 6 孔板中。设置 2 组处理:A 组各孔分别加入桑树桑黄水提物 20.0 μ L,桑黄粗多糖 20.0 μ L,桑黄水提物超滤液

(即小分子化合物) 20.0 μL , 桑黄粗多糖 10.0 μL + 桑黄水提物超滤液 10.0 μL , 以加入 20.0 μL 1 $\times$ PBS 为对照孔, 每孔 3 个重复; B 组各孔分别加入杨树桑黄水提物 20.0 μL , 桑黄粗多糖 20.0 μL , 桑黄水提物超滤液 (即小分子化合物) 20.0 μL , 桑黄粗多糖 10.0 μL + 桑黄水提物超滤液 10.0 μL , 以加入 20.0 μL 1 $\times$ PBS 为对照孔, 每孔 3 个重复。于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养 48 h, 观察细胞状态。用 Hoechst 33258/EthD-III 双荧光标记, 激光共聚焦扫描显微镜 (Olympus FV1000 IX81) 观察细胞损伤及凋亡情况。

参照 SUN 等^[12]的 MTT 法检测肿瘤细胞抑制率。每孔小鼠肝癌细胞 Hepa 1-6 加入 100 μL 含 5.0 mg/mL MTT 的新鲜培养基, 继续培养 4 h; 每孔加入 150 μL 二甲基亚砜 (DMSO), 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min。利用 Multiskan GO 酶标仪 (Thermo) 检测 OD_{570} 。按以下公式计算抑制率: 抑制率 = (对照组 OD_{570} - 实验组 OD_{570}) / 对照组 OD_{570} $\times$ 100%。用独立样本 t 检验 (差值 ≥ 10), 检测抑制率下降 (或提高) 10% 及以上的显著性 ($P \leq 0.05$)。

1.2.5 代谢组分析 对桑树桑黄和杨树桑黄水提物原液、3000 D 超滤截留液、粗多糖液均设置 3 次生物学重复, 每个样品 2.0 mL, 送上海百趣生物医学科技有限公司, 采用 Thermo Vanquish 液相色谱仪和 Thermo Orbitrap Exploris 120 质谱仪 LC-MS 进行全靶代谢组分析。

2 结果与分析

2.1 桑黄水提物对小鼠肝癌细胞 Hepa 1-6 的抑制活性

添加桑树桑黄和杨树桑黄提取物原液能够引起小鼠肝癌细胞 Hepa1-6 的细胞膜损伤并诱导细胞凋亡 (图 1A, 图 2A), 其抑制率分别达到 (80.33 $\pm$ 5.32)% 和 (83.51 $\pm$ 4.62)% (图 3)。桑树桑黄和杨树桑黄粗多糖液亦能使小鼠肝癌细胞 Hepa1-6 的细胞膜损伤并诱导细胞凋亡 (图 1B, 图 2B), 但其作用活性较水提物原液显著降低, 其抑制率分别为 (48.15 $\pm$ 4.27)% 和 (57.14 $\pm$ 4.36)% (图 3), 比水提物原液分别下降 32.18% 和 26.37%。桑黄粗多糖液中的总糖含量与水提物原液的总糖含量差异不显著 (图 4), 说明采用乙醇沉淀法提取粗多糖的过程中损失了部分抗癌活性成分。

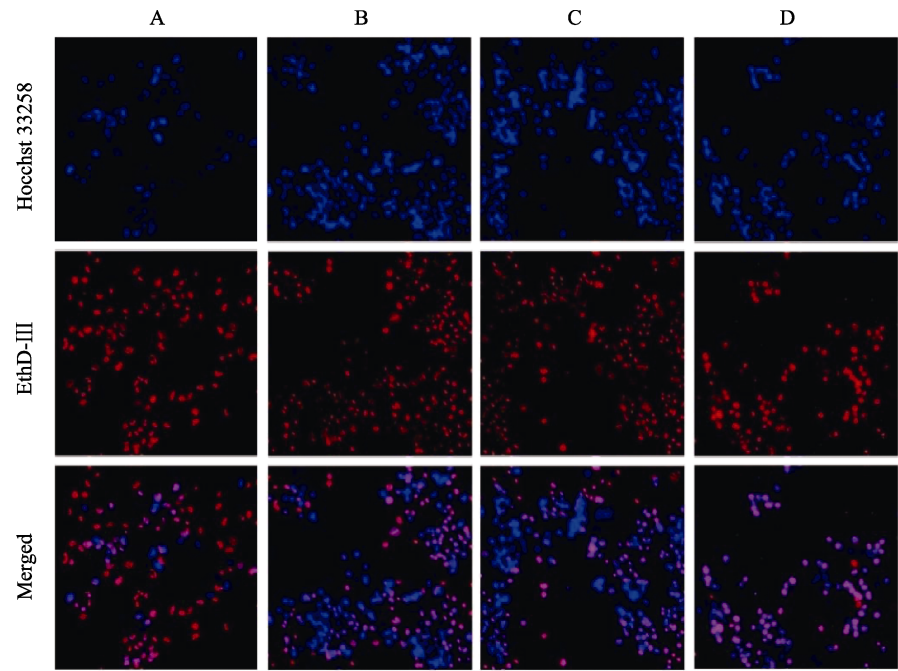
桑树桑黄和杨树桑黄提取物 3000 D 超滤液亦能对小鼠肝癌细胞 Hepa 1-6 造成损伤和诱导凋亡 (图 1C, 图 2C), 其抑制率分别为 (38.64 $\pm$ 4.35)% 和 (32.52 $\pm$ 3.57)% (图 3), 而且其超滤液中总糖含量仅分别为 (1.15 $\pm$ 0.35)mg/mL 和 (1.44 $\pm$ 0.42)mg/mL (图 4), 说明桑黄水提物中含有分子量 ≤ 3000 Da 的非还原糖类的抗癌活性成分。

用桑树桑黄和杨树桑黄粗多糖液分别与其超滤液共同处理小鼠肝癌细胞 Hepa 1-6, 能够显著提高细胞膜损伤和细胞凋亡率 (图 1D, 图 2D), 其抑制率分别达到 (77.27 $\pm$ 6.21)% 和 (76.92 $\pm$ 5.45)% (图 3)。说明桑黄水提物中的小分子化合物能够与桑黄粗多糖协同抑制小鼠肝癌细胞 Hepa 1-6。

2.2 桑黄水提液代谢组分析

如表 1 所示, 桑树桑黄水提物原液中共检测到 17 140 个有效化合物, 其中, 特有化合物 5171 个, 可匹配注释物质 1861 个, 未知化合物 15 279 个; 一级匹配注释 (Level 1) 化合物 381 个, 二级匹配注释 (Level 2) 化合物 1343 个, 三级匹配注释 (Level 3) 化合物 137 个。杨树桑黄水提物原液共检测到有效化合物 17 292 个, 其中特有化合物 5323 个, 可匹配注释物质 1866 个, 未知化合物 15 426 个; 一级匹配注释 (Level 1) 化合物 382 个, 二级匹配注释 (Level 2) 化合物 1338 个, 三级匹配注释 (Level 3) 化合物 146 个。桑树桑黄和杨树桑黄水提物原液中可鉴别化合物总数差异不显著。

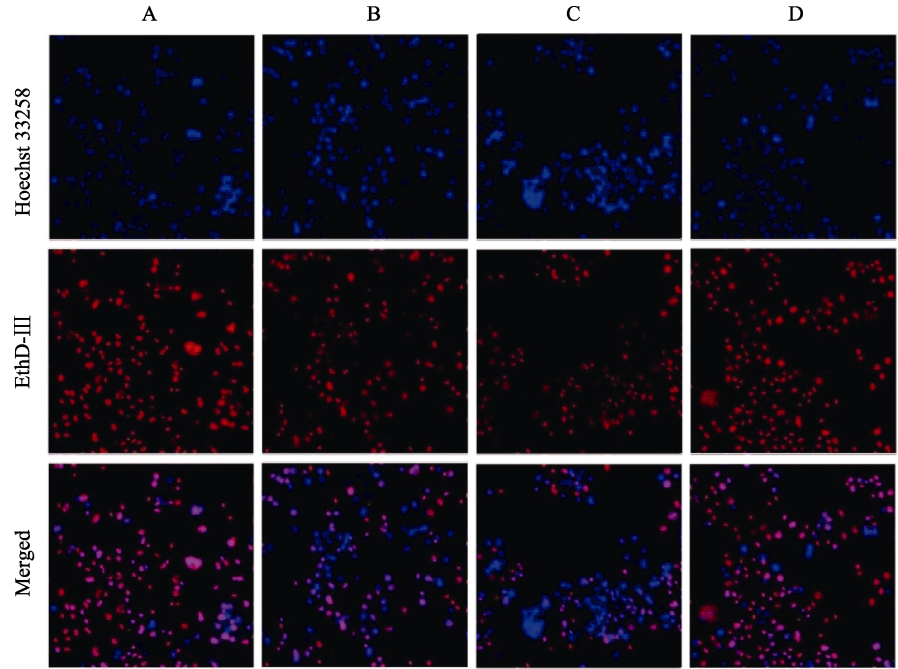
如图 5 和表 1、表 2 所示, 与桑黄水提物原液相比, 桑黄超滤截留液中约有 58% 的化合物含量降低, 而粗多糖液中约 33% 的化合物含量降低。桑树桑黄超滤截留液中共检测出 9718 个化合物, 可匹配注释化合物 1551 个; 对比原液含量减少的化合物计 11 644 个, 其中含量降低 50% 及以上化合物 11 526 个。桑树桑黄粗多糖液中共检测出 12 947 个化合物, 可匹配注释化合物 1773 个; 对比原液含量减少的化合物计 5713 个, 其中含量降低 50% 及以上化合物 5259 个。杨树桑黄超滤截留液共检测出化合物 10 228 个, 可匹配注释化合物 1620 个; 对比原液含量减少的化合物计 11 645 个, 其中含量降低 50% 及以上化合物 11 544 个。杨树桑黄粗多糖液中共检测出化合物 14 580 个, 可匹配注释化合物 1809 个; 对比原液含量减少的化合物有 5689 个, 其中含量降低 50% 及以上化合物 5164 个。



A: 水提物; B: 粗多糖; C: 超滤液; D: 粗多糖+超滤液。Hoechst33258: 标记细胞核完整活细胞和凋亡细胞, 发出蓝色荧光; EthD-III: 标记细胞膜损伤和死细胞, 发出红色荧光; Merged: 合并后紫色细胞为凋亡细胞。
A: Aqueous extracts; B: Crude polysaccharide; C: Ultrafiltration filtrate; D: Crude polysaccharide + Ultrafiltration filtrate. Hoechst33258: Labeled healthy and apoptotic cells with the intact nucleus, emitting blue fluorescence; EthD-III: Labeled cell membrane damage and dead cells, emitting red fluorescence; Merged: Purple cells are apoptotic cells in merged maps.

图 1 不同桑树桑黄水提物对小鼠肝癌细胞 Hepa 1-6 的抑制作用

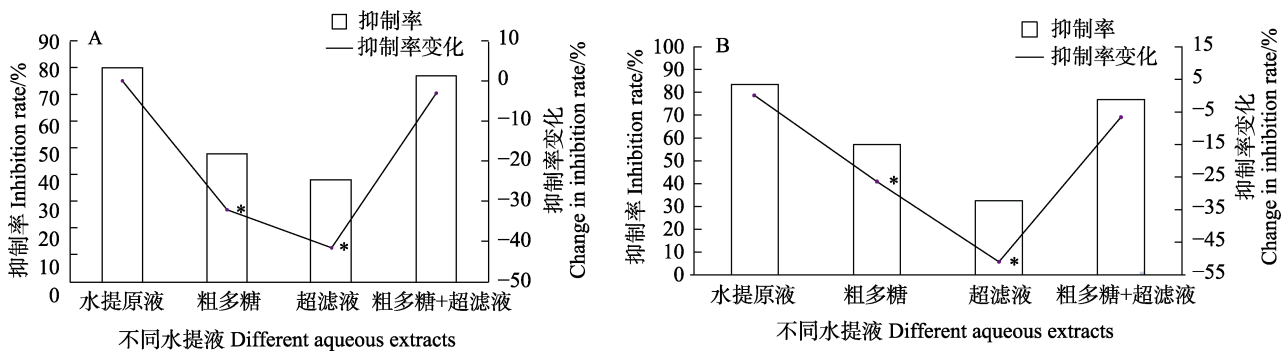
Fig. 1 Inhibition effects of different *S. sanghuang* aqueous extracts on mouse hepatocarcinoma cells Hepa 1-6



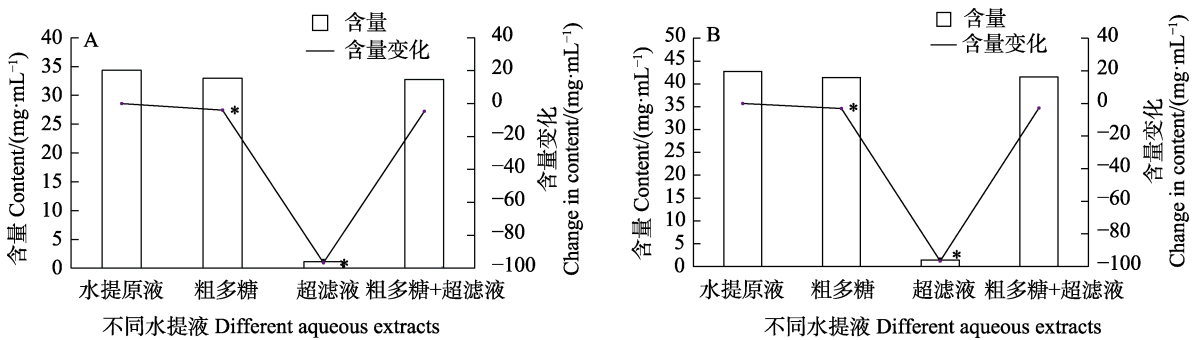
A: 水提物; B: 粗多糖; C: 超滤液; D: 粗多糖+超滤液。Hoechst33258: 标记细胞核完整活细胞和凋亡细胞, 发出蓝色荧光; EthD-III: 标记细胞膜损伤和死细胞, 发出红色荧光; Merged: 合并后紫色细胞为凋亡细胞。
A: Aqueous extracts; B: Crude polysaccharide; C: Ultrafiltration filtrate; D: Crude polysaccharide + Ultrafiltration filtrate. Hoechst33258: Labeled healthy and apoptotic cells with the intact nucleus, emitting blue fluorescence; EthD-III: Labeled cell membrane damage and dead cells, emitting red fluorescence; Merged: Purple cells are apoptotic cells in merged maps.

图 2 不同杨树桑黄水提物对小鼠肝癌细胞 Hepa 1-6 的抑制作用

Fig. 2 Inhibition effects of different *P. baumii* aqueous extracts on mouse hepatocarcinoma cells Hepa 1-6



A: 桑树桑黄; B: 杨树桑黄。*表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。
A: *S. sanghuang*; B: *P. baumii*. * indicates significant difference between treatments ($P<0.05$).
图 3 不同桑黄水提物对小鼠肝癌细胞 Hepa 1-6 的抑制率
Fig. 3 Inhibition rates on mouse hepatocarcinoma cells Hepa 1-6 of different *Sanghuangporus* spp. aqueous extracts



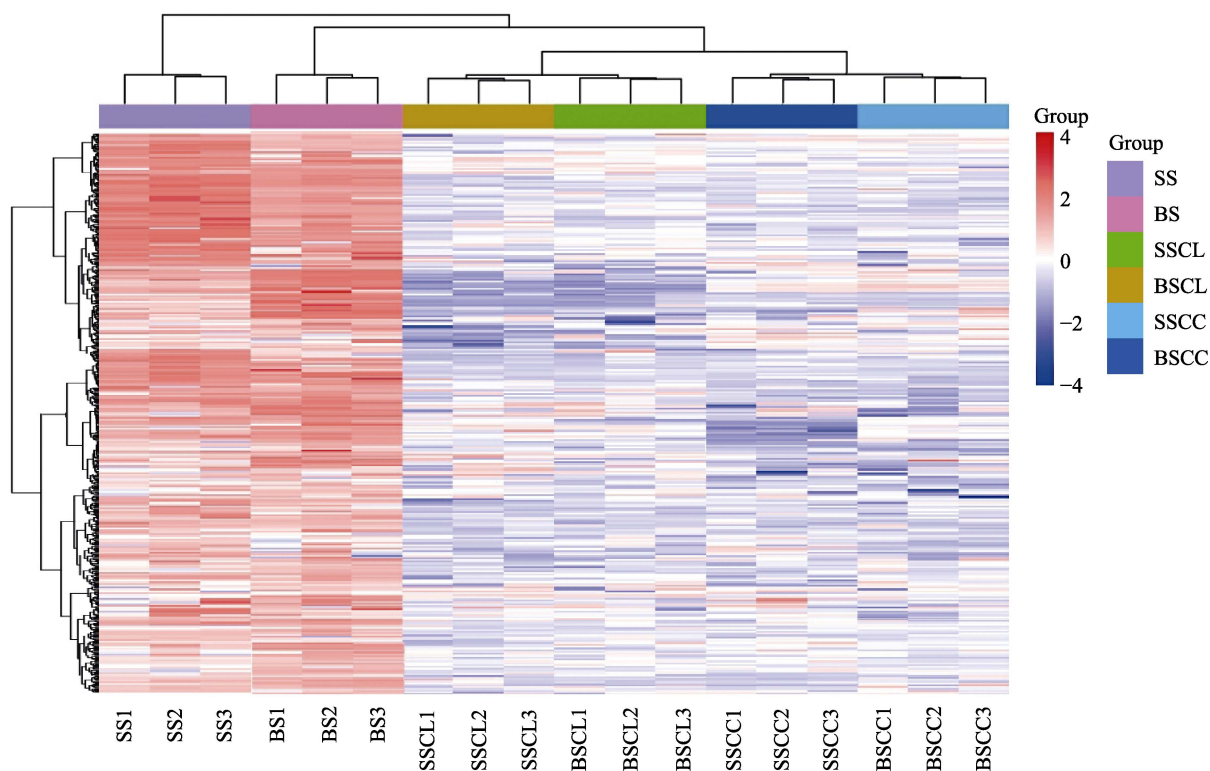
A: 桑树桑黄; B: 杨树桑黄。*表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。
A: *S. sanghuang*; B: *P. baumii*. * indicates significant difference between treatments ($P<0.05$).
图 4 不同桑黄水提物中总糖含量
Fig. 4 Total sugar contents of different *Sanghuangporus* spp. aqueous extracts

表 1 各水提液组分的代谢组分析						
Tab. 1 Metabolomic analysis of total components of each aqueous extract						
组分 Component	桑树桑黄 <i>S. sanghuang</i>			杨树桑黄 <i>P. baumii</i>		
	水提原液 Aqueous extract	粗多糖液 Crude polysaccharide	超滤截留液 Interception fluid	水提原液 Aqueous extract	粗多糖液 Crude polysaccharide	超滤截留液 Interception fluid
Level 1	381	372	345	382	380	359
Level 2	1343	1274	1095	1338	1292	1138
Level 3	137	127	111	146	137	123
Level 4	15 279	11 174	8167	15 426	12 771	8608
可鉴别物质	1861	1773	1551	1866	1809	1620
特有物质	5171			5323		
有效物质	17 140	12 947	9718	17 292	14 580	10 228

注：Level 1 为样本中的代谢物与标准品与 MS1、MS2 和 RT 均匹配；Level 2 为样本中的代谢物与公共数据库中的 MS1 和 MS2 均匹配；Level 3 为样本中的代谢物与 MS1 或 MS2 或 RT 匹配；Level 4 为未知化合物。MS1 为根据母离子质荷比即一级质谱匹配得出的物质；MS2 为通过二级质谱匹配定性得出的物质；RT 为根据本地数据库中代谢物的保留时间匹配得出的物质。

Note: Level 1 means metabolites and the standards matched with both MS1, MS2 and RT; Level 2 means metabolites matched with both MS1 and MS2 of the public databases; Level 3 means metabolites matched with MS1 or MS2 or RT; Level 4 means unknown compound. MS1 means the substance obtained by matching the mass to charge ratio of the parent ion, i.e. the primary mass spectrometry; MS2 means qualitative substances obtained through secondary mass spectrometry; RT means substances based on the retention time of metabolites in the local database.

通过对 2 种桑黄水提物的超滤截留液、粗多糖溶液、水提物原液进行组间交叉比对分析，得出差异小分子化合物数据集，表 3 为含量减少前 20 的小分子化合物，其中包括脑苷-B (cerebroside-B)、玫瑰树碱 (ellipticine)、左旋水苏碱 (betonicine) 等已知明确具有抑癌功能的化合



SS: 桑树桑黄; BS: 杨树桑黄; SSCL: 桑树桑黄-超滤截留液; BSCL: 杨树桑黄-超滤截留液;
SSCC: 桑树桑黄粗多糖; BSCC: 杨树桑黄粗多糖。
SS: *S. sanghuang*; BS: *P. baumii*; SSCL: *S. sanghuang*-interception fluid; BSCL: *P. baumii*-interception fluid;
SSCC: *S. sanghuang*-crude polysaccharide; BSCC: *P. baumii*-crude polysaccharide.

图 5 差异化合物的聚类分析热图

Fig. 5 Heat map of cluster analysis of differential metabolites

表 2 各处理组水提液的相对组分差异

Tab. 2 Relative component differences of water extracts from each treatment group

组分 Component	桑树桑黄 <i>S. sanghuang</i>		杨树桑黄 <i>P. baumii</i>	
	粗多糖液 Crude polysaccharide	超滤截留液 Interception fluid	粗多糖液 Crude polysaccharide	超滤截留液 Interception fluid
含量减少物质	5713	11 644	5689	11 645
减少 50%以上	5259	11 526	5164	11 544
未检出	1408	4678	1227	4201
Level 1	112	328	113	328
Level 2	516	1126	509	1126
Level 3	41	110	41	110
Level 4	5044	10 080	5026	10 081

注: Level 1 为样本中的代谢物 and 标准品与 MS1、MS2 和 RT 均匹配; Level 2 为样本中的代谢物与公共数据库中的 MS1 和 MS2 均匹配; Level 3 为样本中的代谢物与 MS1 或 MS2 或 RT 匹配; Level 4 为未知化合物。MS1 为根据母离子质荷比即一级质谱匹配得出的物质; MS2 为通过二级质谱匹配定性得出的物质; RT 为根据本地数据库中代谢物的保留时间匹配得出的物质。

Note: Level 1 means metabolites and the standards matched with both MS1, MS2 and RT; Level 2 means metabolites matched with both MS1 and MS2 of the public databases; Level 3 means metabolites matched with MS1 or MS2 or RT; Level 4 means unknown compound. MS1 means the substance obtained by matching the mass to charge ratio of the parent ion, i.e. the primary mass spectrometry; MS2 means qualitative substances obtained through secondary mass spectrometry; RT means substances based on the retention time of metabolites in the local database.

物。6-氟吲哚 (6-fluoroindole)、2,4,6-三甲基吡啶 (2,4,6-trimethylpyridine)、DL-2,3-二氨基丙酸 (DL-2,3-diaminopropionic acid) 以及 1'-萘酰基

-2-甲基吲哚 (1'-naphthoyl-2-methylindole) 等为桑树桑黄和杨树桑黄粗多糖、超滤截留液含量均显著减少的化合物。2'-O-甲基腺苷 (2'-O-

表 3 含量减少前 20 的化合物
Tab. 3 Top 20 compounds with reduced content

编号 No.	粗多糖液 Crude polysaccharide		超滤截留液 Interception fluid	
	桑树桑黄 <i>S. sanghuang</i>	杨树桑黄 <i>P. baumii</i>	桑树桑黄 <i>S. sanghuang</i>	杨树桑黄 <i>P. baumii</i>
1	6-氟吲哚 [▲] 6-fluoroindole	6-氟吲哚 [▲] 6-fluoroindole	腺苷 [★] adenosine	腺苷 [★] adenosine
2	2-(2,6-二甲基吗啉-4-基)乙醇 [■] 2-(2,6-dimethylmorpholin-4-yl) ethanol	2,4,6-三甲基吡啶 [▲] 2,4,6-trimethylpyridine	2-氧代-4-苯基丁酸 [★] 2-oxo-4-phenylbutyric acid	N-(5-氯吡啶-2-基)-5-丙基噻吩-3-甲酰胺 [★] N-(5-chloropyridin-2-yl)-5-propylthiophene-3-carboxamide
3	左旋水苏碱 [■] betonicine	DL-2,3-二氨基丙酸 [▲] DL-2,3-diaminopropionic acid	木糖醇 [★] xylitol	2-氧代-4-苯基丁酸 [★] 2-oxo-4-phenylbutyric acid
4	羟基水杨酸 [■] hydroxysydonic acid	亮氨酸-异亮氨酸 [★] Leu-Ile	核糖醇 [★] ribitol	6-氟吲哚 [▲] 6-fluoroindole
5	1'-萘酰基-2-甲基吲哚 [▲] 1'-naphthoyl-2-methylindole	1-甲基腺苷 [★] 1-methyladenosine	阿糖醇 [★] arabitol	5-[2-(4-氯苯基)胍-1-亚基]-2,2-二甲基-1,3-二恶烷-4,6-二酮 5-[2-(4-chlorophenyl)hydrazin-1-ylidene]-2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4,6-dione
6	(+)-毒蕈碱阳离子(+)-muscarine cation	N6-甲基腺苷 [★] N6-methyladenosine	甘油磷酸胆碱 glycerophosphocholine	玫瑰树碱 [★] ellipticine
7	2'-O-甲基腺苷 [■] 2'-O-methyladenosine	3-氨基-2-哌啶酮 [▲] 3-amino-2-piperidone	甘露醇 mannitol	2,4,6-三甲基吡啶 [▲] 2,4,6-trimethylpyridine
8	7-甲基鸟嘌呤 [■] 7-methylguanine	1'-萘酰基-2-甲基吲哚 [▲] 1'-naphthoyl-2-methylindole	葡萄糖醇 glucitol	核糖醇 [★] ribitol
9	腺嘌呤 adenine	2'-O-甲基腺苷 [■] 2'-O-methyladenosine	半乳糖醇 galactitol	阿糖醇 [★] arabitol
10	2-腺嘌呤 [■] 2-aminopurine	脑苷-B [■] cerebroside-B	5-[2-(4-氯苯基)胍-1-亚基]-2,2-二甲基-1,3-二恶烷-4,6-二酮 [★] 5-[2-(4-Chlorophenyl)hydrazin-1-ylidene]-2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4,6-dione	木糖醇 [★] xylitol
11	1,5-脱水葡萄糖醇 1,5-anhydroglucitol	2-(二乙氨基)乙酸 [■] 2-(diethylamino)acetic acid	N-(5-氯吡啶-2-基)-5-丙基噻吩-3-甲酰胺 [★] N-(5-chloropyridin-2-yl)-5-propylthiophene-3-carboxamide	DL-2,3-二氨基丙酸 [▲] DL-2,3-diaminopropionic acid
12	2-(二乙氨基)乙酸 [■] 2-(diethylamino)acetic acid	7-甲基鸟嘌呤 [■] 7-methylguanine	6-氟吲哚 [▲] 6-fluoroindole	亮氨酸-异亮氨酸 [★] Leu-Ile
13	2-(2',3',4'-三羟基丁基)喹喔啉 2-(2',3',4'-Trihydroxybutyl) quinoxaline	1-(2-羟乙基)吡唑 1-(2-Hydroxyethyl) pyrazole	2-(2,6-二甲基吗啉-4-基)乙醇 [■] 2-(2,6-dimethylmorpholin-4-yl) ethanol	1-甲基腺苷 [★] 1-methyladenosine
14	[6]-姜酚 _{3,5} -二乙酸酯 [6]-gingerdiol _{3,5} -diacetate	L-缬氨酸-L-苯丙氨酸 L-valyl-L-phenylalanine	左旋水苏碱 [■] betonicine	N6-甲基腺苷 [★] N6-methyladenosine
16	2,4,6-三甲基吡啶 [▲] 2,4,6-trimethylpyridine	2-氨基-6-丙基-1H-嘧啶-4-酮 2-amino-6-propyl-1H-pyrimidin-4-one	DL-2,3-二氨基丙酸 [▲] DL-2,3-diaminopropionic acid	5'-脱氧腺苷 5'-deoxyadenosine
17	DL-2,3-二氨基丙酸 [▲] DL-2,3-diaminopropionic acid	2-腺嘌呤 [■] 2-aminopurine	L-异亮氨酸-L-脯氨酸 L-isoleucyl-L-proline	脱氧腺苷 deoxyadenosine
18	4-氯-5,6,7,8-四氢喹唑啉-2-胺 4-chloro-5,6,7,8-tetrahydroquinazolin-2-amine	(Z)-9,12,13-三羟基十八碳-15-烯酸 (Z)-9,12,13-trihydroxyoctadec-15-enoic acid	2,4,6-三甲基吡啶 [▲] 2,4,6-trimethylpyridine	虫草素 cordycepin
19	2-(1',2',3',4'-四羟基丁基)喹喔啉 2-(1',2',3',4'-tetrahydroxybutyl) quinoxaline	苯乙酮 acetophenone	玫瑰树碱 [★] ellipticine	3-氨基-2-哌啶酮 [★] 3-amino-2-piperidone
20	脑苷-B [■] cerebroside-B	L-赤藓糖 L-erythrulose	羟基水杨酸 [■] hydroxysydonic acid	福多斯坦 fudosteine
21	2-(4-叔丁基苯基)苯并咪唑 2-(4-tert-butylphenyl) benzimidazole	亮氨酸 leucylphenylalanine	1'-萘酰基-2-甲基吲哚 [▲] 1'-naphthoyl-2-methylindole	1'-萘酰基-2-甲基吲哚 [▲] 1'-naphthoyl-2-methylindole

注：[▲]指桑树桑黄和杨树桑黄的超滤截留液、粗多糖液中含量均显著降低的相同化合物；[■]指桑树桑黄和杨树桑黄的粗多糖液中含量显著下降的相同化合物；[★]表示桑树桑黄和杨树桑黄的超滤截留液中含量显著下降的相同化合物；[●]表示桑树桑黄的超滤截留液、粗多糖液中含量显著下降的相同化合物；[☆]指杨树桑黄的超滤截留液、粗多糖液中含量显著下降的相同化合物。

Note: [▲] refers to the same compounds with significantly reduced content both in the ultrafiltration filtrate and crude polysaccharide solution of *S. sanghuang* and *P. baumii*; [■] refers to the same compounds with significantly reduced content both in the crude polysaccharide solution of *S. sanghuang* and *P. baumii*; [★] refers to the same compounds with significantly reduced content both in the ultrafiltration filtrate of *S. sanghuang* and *P. baumii*; [●] refers to the same compounds with significantly reduced content both in the crude polysaccharide solution and ultrafiltration filtrate of *S. sanghuang*; [☆] refers to the same compounds with significantly reduced content both in the crude polysaccharide solution and ultrafiltration filtrate of *P. baumii*.

methyadenosine)、7-甲基鸟嘌呤(7-methylguanine)、2-腺嘌呤(2-aminopurine)、2-(二乙氨基)乙酸[2-(diethylamino)acetic acid]以及脑苷-B等为桑黄粗多糖溶液中含显著降低的化合物。腺苷(adenosine)、2-氧代-4-苯基丁酸(2-oxo-4-phenylbutyric acid)、木糖醇(xylitol)、核糖醇(ribitol)、阿糖醇(arabitol)、5-[2-(4-氯苯基)胍-1-亚基]-2,2-二甲基-1,3-二恶烷-4,6-二酮[5-[2-(4-chlorophenyl)hydrazin-1-ylidene]-2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4,6-dione]、N-(5-氯吡啶-2-基)-5-丙基噻吩-3-甲酰胺[N-(5-chloropyridin-2-yl)-5-propylthiophene-3-carboxamide]以及玫瑰树碱等为超滤截留液中含显著降低的化合物。2-(2,6-二甲基吗啉-4-基)乙醇[2-(2,6-dimethylmorpholin-4-yl)ethanol]、左旋水苏碱、羟基水杨酸(hydroxysydonic acid)为桑树桑黄特有的含量显著降低的化合物;而亮氨酸-异亮氨酸(Leu-Ile)、1-甲基腺苷(1-methyadenosine)、N6-甲基腺苷(N6-methyadenosine)以及3-氨基-2-哌啶酮(3-amino-2-piperidone)为杨树桑黄特有的含量显著降低的化合物。

3 讨论

桑黄水提物中含有多糖、黄酮、甾体、萜烯、生物碱、氨基酸等多种活性物质^[13]。药理学认为,桑黄具有抗肿瘤、抗纤维化、抗氧化、增强免疫力以及抑制血管增生等功效^[2-4]。此外桑黄中亦分离出牛奶树碱(hispidin)、咖啡酸(caffeic acid)、烟碱酮(inotilone)、纤孔菌素A(phellinsin A)、苯乙烯吡喃酮(baumin)等抗氧化、消炎和增强免疫力的小分子化合物^[14-16]。

3.1 传统桑黄抑癌机理

桑黄水提物对肝癌、肺癌、胃癌、前列腺癌、脑癌、结肠癌、乳腺癌、膀胱癌、口腔癌、宫颈癌等具有显著的抑制作用^[9]。桑黄水提物中的多糖、三萜类物质协同桑黄素等黄酮类物质通过多种渠道实现抑癌活性:(1)通过抑制细胞周期,造成细胞周期阻滞,抑制肿瘤细胞的增殖^[2,8];(2)通过增加凋亡相关蛋白,活化caspase表达,减少抗凋亡蛋白表达,诱导细胞凋亡^[7,17];(3)通过下调磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositide 3-kinases, PI3K)表达、抑制丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶B(RAC- α serine/threonine-protein kinase, AKT)和哺乳动物西罗莫司靶点(mammalian

target of rapamycin, mTOR)磷酸化水平,干扰肿瘤细胞PI3K/AKT/mTOR信号通路^[18];通过降低细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)、c-Jun kinase(JNK)和p38的磷酸化水平,抑制丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路,抑制肿瘤细胞增殖和迁移^[1,18];(4)促进干扰素(interferon, IFN)和白细胞介素(IL)合成,抑制肿瘤坏死因子合成,调高机体免疫机能^[3-4]。

3.2 桑黄水提物中小分子化合物的抑癌活性

桑黄水提物中小分子化合物的抑癌活性研究鲜有报道。本研究发现,桑黄小分子化合物能够显著抑制小鼠肝癌细胞Hepa 1-6。本研究通过代谢组分析从桑黄水提液中鉴定出玫瑰树碱、左旋水苏碱、脑苷-B等具有肿瘤细胞抑制活性的化合物,同时鉴定出6-氟吡啶、2,4,6-三甲基吡啶、1'-萘酰基-2-甲基吡啶等杂环类,1-甲基腺苷、N6-甲基腺苷、虫草素、2'-O-甲基腺苷、2-腺嘌呤等核苷-碱基类,亮氨酸+*、异亮氨酸+*和 γ -谷氨酰+*等二肽-环肽类,木糖醇、核糖醇等糖醇类等可能参与肿瘤细胞抑制化合物合成或直接作用于肿瘤细胞生长的功能活性物质。

3.2.1 生物碱类化合物及其抑癌机理 本研究在桑黄中鉴定出玫瑰树碱和左旋水苏碱。玫瑰树碱主体为吡啶结构,由共平面的3个六元环和1个五元环组成,玫瑰树碱及9-羟基-N2-甲基玫瑰树碱(NSC264-137)等衍生物对黑色素瘤、肉瘤、肝癌、结肠癌、肺癌、乳腺癌等肿瘤细胞均有抑制作用^[19-20]。玫瑰树碱及其衍生物能够通过调节IL-6、IL-18、caspase 3、caspase 4、gasdermin D等基因表达,以及提高肿瘤细胞活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平等,诱导胰腺癌PANC-1细胞焦亡和损伤^[21]。玫瑰树碱亦可上调非小细胞肺癌细胞主要组织相容性复合体I类相关分子A和B(major histocompatibility complex class I-related chain A and B, MICA/B)的表达水平,进而提高自然杀伤(natural killer, NK)细胞对肿瘤细胞的识别与杀伤效率^[22]。左旋水苏碱能够通过抑制平滑肌肌动蛋白2(smooth muscle actin 2, ACTG2)的表达,进而下调VEGF、bFGF、TNF- α 及PDGF等血管生成因子的表达,抑制乳腺癌、前列腺癌、结肠癌细胞的增殖与侵袭^[23-25]。

3.2.2 杂环类化合物及其抑癌机理 6-氟吡啶、1'-萘酰基-2-甲基吡啶是合成吡啶系列抗肿瘤药

物、精神病药物所需的重要中间体^[26-29]。玫瑰树碱的 6 位氮游离对其抗肿瘤活性尤其重要, 而甲基吡啶是化学合成玫瑰树碱的出发底物之一^[30], 因此本研究推测桑黄中可能存在以吡啶衍生物为底物合成玫瑰树碱等抗肿瘤药物的生物代谢途径, 但桑黄中的吡啶类化合物抑制肿瘤细胞的分子机制有待深入研究。3-甲基吡啶是另一类抑癌药物合成的重要原料, 通过分子改造和修饰, 可以得到含有 3-甲基吡啶结构的衍生物, 具有抗炎、抗菌、抗肿瘤等生物活性^[31]。

3.2.3 核苷-碱基类化合物及其抑癌机理 桑黄中含有大量的腺苷类物质, 如腺苷、N6-甲基腺苷 (N6-methyladenosine, m6A)、N1-甲基腺苷、2'-O-甲基腺苷等。其中腺苷是桑树桑黄和鲍氏桑黄中含量最高的化合物, 推测桑黄中可能存在复杂多样的腺苷类衍生物代谢合成途径。N6-甲基腺苷等参与的甲基化修饰是一种动态且可逆的修饰, 参与 mRNA、miRNA 的合成、翻译等生物过程, 引起基因的表达异常, 与白血病、肝癌、肺癌、宫颈内膜癌、胰腺癌和乳腺癌等多种癌症的发生密切相关^[32-34]。肿瘤细胞可能通过吸收大量的甲基腺苷类物质导致 mRNA 的 m6A 修饰水平提高, 进而引起肿瘤细胞凋亡^[34-35]。本研究发现, 桑黄中含有虫草素, 研究表明虫草素具有免疫调节、抗肿瘤、抗三高、肺肾保护以及抗菌消炎等功能^[36-38]。但桑黄中是否真正存在虫草素相关代谢途径需进一步验证。

3.2.4 二肽-环肽类化合物及其抑癌机理 桑黄水提物中含有的大量的亮氨酸+* (Leu-Val、Leu-Trp、Leu-Thr、Leu-Leu、Leu-Ile、Leu-Gly、Leu-Glu)、异亮氨酸+* (Ile-Tyr、Ile-Pro、Ile-Leu、Ile-Glu、Ile-Gln、Ile-Asp、Ile-Asn) 等二肽类化合物, 以及 Leu-Gly-Leu、Val-Gly-Val、Trp-Gly-Trp、Gly-Pro-Arg、Gly-Gly-Leu、Arg-Pro-Pro 等三肽类化合物, 但其具体抑癌机制尚不明确。环二肽、环三肽等肽类具有抗菌消炎、抗氧化、抑制肿瘤等生物学活性^[39-40], 推测桑黄水提物中的二肽和三肽类物质可能参与环二肽、环三肽化合物的合成。此外本研究还发现桑黄中含有大量的 γ -谷氨酰+*二肽化合物, 如 γ -谷氨酰丙氨酸、 γ -谷氨酰苏氨酸、 γ -谷氨酰赖氨酸、 γ -谷氨酰谷氨酰胺、 γ -谷氨酰谷氨酸等。 γ -谷氨酰转移酶 (γ -glutamyltransferase, GGT) 酶活在原发性和转移性肿瘤中异常升高, 是重要的肿瘤临床

检测指标, 而补充谷氨酰丙氨酸等化合物可以有效控制肿瘤恶化^[41-44]。本研究推测桑黄中大量的 γ -谷氨酰+*等二肽类物质可能通过调节谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 代谢途径, 调节 ROS 水平, 抑制肿瘤细胞增殖和迁移。

3.2.5 其他化合物 (1) 脑苷脂-B。本研究在桑黄中鉴定出脑苷-B。脑苷-B 是一种中性鞘糖脂, 广泛存在于动植物及低等生物的细胞膜中, 通过活化 II 型 NKT 细胞快速分泌 IL-10、IL-4、IL-13、IFN- γ 等细胞因子, 发挥抗病毒、抗肿瘤、免疫调节以及调节神经系统等功效^[45-46]。

(2) 糖醇类物质。桑黄中含有大量的糖醇类物质, 包括木糖醇、核糖醇、甘露醇、赤藓糖醇、葡萄糖醇以及阿拉伯糖醇等除半乳糖外几乎所有的常见单糖糖醇。糖醇类物质可能通过破坏肿瘤细胞的能量代谢, 延缓细胞增殖抑制肿瘤细胞; 亦可能参与多种糖醇酯、糖醇蛋白、糖苷类物质的合成, 导致肿瘤细胞代谢紊乱^[47]。桑黄中还鉴定出甘露糖赤藓糖醇酯 (mannosylerythritol lipids, MEL), 为糖脂类生物表面活性剂, 具有抗菌、抗氧化、界面活性和抗肿瘤等活性, 但其抑制肿瘤细胞的分子机制尚不明确^[48]。

综上所述, 桑黄水提物中鉴定出玫瑰树碱、左旋水苏碱、脑苷-B 等具有抑癌活性的小分子化合物, 以及多种抑癌化合物合成的中间体分子, 为解析桑黄抑癌的分子机制提供了新的见解。此外桑黄中还有 10 000 余种未知化合物, 可能蕴藏更丰富的抑癌或其他医药功能物质, 需要进一步纯化和功能鉴定。

参考文献

- [1] 刘漠浩, 曾建红. 桑黄化学成分及其抗肿瘤作用机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 30(8): 275-282.
LIU M H, ZENG J H. Chemical components of *Phellinus* and antitumor mechanism: a review[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2023, 30(8): 275-282. (in Chinese)
- [2] 李天平, 轩贵平, 刘德勇, 杨娜, 梁忠厚. 桑黄有效成分及抗肿瘤作用机制研究[J]. 中医学, 2024, 13(3): 530-536.
LI T P, XUAN G P, LIU D Y, YANG N, LIANG Z H. Study on the active ingredients and anti-tumor mechanism of *Phellinus igniarius*[J]. Traditional Chinese Medicine, 2024, 13(3): 530-536. (in Chinese)
- [3] YIN C M, LI Y H, LI J T, FAN X Z, YAO F, SHI D F, CHENG Y Q, LIU M F, LU Q, GAO H. Gastrointestinal di-

- gestion, probiotic fermentation behaviors and immunomodulatory effects of polysaccharides from *Sanghuangporus vaninii*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 223(Part A): 606-617.
- [4] FU L Z, SONG J L, LU N, YAN J, LIN J Y, WANG W K. Effects of cultivation methods on the nutritional content, active component content, and antioxidant activity of fruiting bodies of *Sanghuangporus baumii* (Agaricomycetes)[J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2023, 25(7): 45-54.
- [5] QU Y, YANG H, LI S, LI L, LI Y, WANG D. The involvement of Th1 cell differentiation in the anti-tumor effect of purified polysaccharide from *Sanghuangporus vaninii* in colorectal cancer via multi-omics analysis[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 237(5): 123927.
- [6] MA J X, CAI C S, LIU J J, GAO S, ZHAO G, ZHANG X W. *In vitro* antibacterial and antitumor activity of total triterpenoids from a medicinal mushroom *Sanghuangporus sanghuang* (Agaricomycetes) in liquid fermentation culture[J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2021, 23(7): 27-39.
- [7] WU D, YUAN X, ZHOU R, CHEN W, LI W, LI Z, LI X, ZHU R, WANG H, YANG Y. Aqueous extract of *Sanghuangporus baumii* induces autophagy to inhibit cervical carcinoma growth[J]. Food & Function, 2023, 14(5): 2374-2384.
- [8] YU T, ZHONG S, SUN Y, SUN H, CHEN W, LI Y, ZHU J, LU L, HUO J. Aqueous extracts of *Sanghuangporus vaninii* induce S-phase arrest and apoptosis in human melanoma A375 cells[J]. Oncology Letters, 2021, 22(2): 628-636.
- [9] HUANG J, LI M T, SHEN A Q, WAN X, LIU X Q, LI Y Z, YANG Q Q, ZHANG B B. The mechanistic study of adding polyunsaturated fatty acid to promote triterpenoids production in submerged fermentation of *Sanghuangporus baumii*[J]. Biochemical Engineering Journal, 2023, 191(2): 108800.
- [10] ZHANG Y Y, LV G Y, SONG T T, CHEN C, ZHANG Z F, CAI W M. Recovery of the phenolic compounds from artificial cultivated *Sanghuangporus vaninii* using a green method and biological properties of phenolic extract *in vitro*[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2023, 58(7): 3669-3981.
- [11] 刘锦程, 弓志青, 杨鹏, 王延圣, 李永生, 杨正友, 王文亮. 桑黄营养成分、活性成分及多糖性质分析[J]. 食品工业科技, 2023, 44(22): 241-248.
- LIU J C, GONG Z Q, YANG P, WANG Y S, LI Y S, YANG Z Y, WANG W L. Analysis of nutritional components, active components and polysaccharide properties of *Phellinus igniarius*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(22): 241-248. (in Chinese)
- [12] SUN Y Q, HUO J X, ZHONG S, ZHU J X, LI Y G, LI X J. Chemical structure and anti-inflammatory activity of a branched polysaccharide isolated from *Phellinus baumii*[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 268(1): 118214.
- [13] 谢存一, 周禹佳, 张疏雨, 柴林山, 朱万芹, 李剑梅. 桑黄活性成分研究及行业发展分析[J]. 食用菌, 2023, 45(3): 1-5.
- XIE C Y, ZHOU Y J, ZHANG S Y, CHAI L S, ZHU W Q, LI J M. Research on active ingredients of *Phellinus igniarius* and analysis of industry development[J]. Edible Fungi, 2023, 45(3): 1-5. (in Chinese)
- [14] 石河, 梅景晨, 李荣雪, 李思琪, 陈大忠. 桑黄多糖的提取分离及药理作用研究进展[J]. 药物评论研究, 2023, 46(6): 1360-1368.
- SHI H, MEI J C, LI R X, LI S Q, CHEN D Z. Research progress in extraction, separation and pharmacological action of *Phellinus* polysaccharides[J]. Drug Evaluation Research, 2023, 46(6): 1360-1368. (in Chinese)
- [15] 刘佳, 魏宝红, 毕旺华, 杨文哲, 杨雪, 李欣, 王长云, 马晓青, 胡淑曼. 桑黄-昆布双向发酵菌质化学成分及抗肿瘤活性[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(19): 61-67.
- LIU J, WEI B H, BI W H, YANG W Z, YANG X, LI X, WANG C Y, MA X Q, HU S M. Chemical components and antitumor activity of *Inonotus eckloniae* thallus bidirectional fermentation product[J]. Food Research and Development, 2023, 44(19): 61-67. (in Chinese)
- [16] 魏宝红, 刘佳, 毕旺华, 胡淑曼, 马晓青, 杨文哲, 杨雪, 孙皓岩, 张鹏. 药用真菌桑黄的液态发酵工艺优化及体外抗肿瘤活性研究[J]. 生物化工, 2023, 9(4): 19-25.
- WEI B H, LIU J, BI W H, HU S M, MA X Q, YANG W Z, YANG X, SUN H Y, ZHANG P. Study on the optimization of liquid fermentation process of *Inonotus hispidus* and its antitumor activity *in vitro*[J]. Biological Chemical Engineering, 2023, 9(4): 19-25. (in Chinese)
- [17] 陶裕玲, 李杨蕾, 陈冬铭, 蒋晨磊, 陆红. 桑黄水提物诱导胃癌 SGC-7901 细胞凋亡和自噬机制研究[J]. 中药药理与临床, 2021, 37(3): 120-127.
- TAO Y L, LI Y L, CHEN D M, JIANG C L, LU H. Mechanism of *Phellinus igniarius* water extract in induction of apoptosis and autophagy of gastric cancer SGC-7901 cells[J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2021, 37(3): 120-127. (in Chinese)
- [18] GUO S, DUAN W, WANG Y, CHEN L, YANG C, GU X, XUE Q. Component analysis and anti-colorectal cancer mechanism via AKT/mTOR signalling pathway of *Sanghuangporus vaninii* extracts[J]. Molecules, 2022, 27(4): 1153.
- [19] ABDULWAHID F, HAIDER A, AL-MUSAWI S. Folate

- decorated dextran-coated magnetic nanoparticles for targeted delivery of ellipticine in cervical cancer cells[J]. *Advances in Natural Sciences-Nanoscience and Nanotechnology*, 2023, 14(1): 015001.
- [20] NADELLA L, DADINABOYINA S, KUMAR P, KANAPARTHY S, GADDAM V. Pd-catalyzed decarboxylative cross-coupling of N-aryl anthranilic acids to access carbazoles: gram scale total synthesis of anti-cancer drug ellipticine[J]. *Asian Journal of Organic Chemistry*, 2023, 12(11): 1-9.
- [21] 曹丹, 陈星, 汤晓燕, 张宇华, 邓尚贵. 玫瑰树碱诱导胰腺癌细胞焦亡的机制[J]. *中国医科大学学报*, 2023, 52(11): 965-970.
- CAO D, CHEN X, TANG X Y, ZHANG Y H, DENG S G. Mechanism of ellipticine-induced pyroptosis in pancreatic cancer cells[J]. *Journal of China Medical University*, 2023, 52(11): 965-970. (in Chinese)
- [22] 阎学伟, 龚陈媛, 祝晓雯, 胥孜杭, 姚超, 王莉新, 朱诗国. 玫瑰树碱促进 NK 细胞识别与杀伤非小细胞肺癌细胞的研究[J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(9): 1240-1247.
- YAN X W, GONG C Y, ZHU X W, XU Z H, YAO C, WANG L X, ZHU S G. Research on ellipticine promoting NK cells to recognize and kill non-small cell lung cancer cells[J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2020, 36(9): 1240-1247. (in Chinese)
- [23] ARES A M, MARTIN M T, TAPIA J A, GONZALEZ-PORTO A V, HIGES M, MARTIN-HERNANDEZ R, BERNAL J. Differentiation of bee pollen samples according to the betaines and other quaternary ammonium related compounds content by using a canonical discriminant analysis[J]. *Food Research International*, 2022, 160(10): 1-8.
- [24] SZYMANSKI M, WITKOWSKA-BANASZCZAK E, KŁAK N, MARCINIAK K, WOŁOWIEC T, SZYMANSKI A. Effects of trace elements on polyphenolic compounds in *Millefolii herba*[J]. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2014, 23(2): 459-466.
- [25] 赵林钢, 刘兆国, 杨爱华. 水苏碱通过调控 ACTG2 蛋白表达抑制结肠癌生长[J]. *中国药理学杂志*, 2018, 53(13): 1077-1082.
- ZHAO L G, LIU Z G, YANG A H. Stachydrine inhibits the growth of colon cancer by regulating the expression of ACTG2[J]. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2018, 53(13): 1077-1082. (in Chinese)
- [26] FUENTE-GOMEZ G J, KELLUM C L, MIRA A C, DUFF JR M R, HOWELL E E. Differentiation of the binding of two ligands to a tetrameric protein with a single symmetric active site by ^{19}F NMR[J]. *Protein Science*, 2021, 30(2): 477-484.
- [27] VALLRI K K, NAGARAJU P V V S, VISWANATH I V K, SINGH R V. Novel N-Alkyl-4-(6-fluoro-1H-indol-3-yl) benzamide derivatives as anticancer agents: design, synthesis, biological evaluation, and molecular docking study[J]. *Russian Journal of Organic Chemistry*, 2020, 56(3): 524-533.
- [28] 仇碧茹, 侯琳, 张丽, 牛婷婷, 宋军莹. 吲哚-2,3-二酮对 SH-SY5Y 细胞增殖与迁移的影响及其机制[J]. *精准医学杂志*, 2023, 38(4): 360-364.
- QIU B R, HOU L, ZHANG L, NIU T T, SONG J Y. Effects of indole-2,3-dione on the proliferation and migration of SH-SY5Y cells and underlying mechanisms[J]. *Journal of Precision Medicine*, 2023, 38(4): 360-364. (in Chinese)
- [29] 卓宇晴, 崔宝东. 3'-吲哚-3-氧化吲哚与苯基溴化物的多样性转化及其产物对肿瘤细胞 A549 和 HepG2 的抑制作用[J]. *合成化学*, 2024, 32(1): 1-10.
- ZHUO Y Q, CUI B D. Diversity transformation of 3'-indole-3-oxoindole with phenylbromides and its inhibition effect on A549 and HepG2 tumor cells[J]. *Chinese Journal of Synthetic Chemistry*, 2024, 32(1): 1-10. (in Chinese)
- [30] 林菁菁, 杨亚军, 沈珑璁, 潘显道. 抗肿瘤药玫瑰树碱及其衍生物的合成和药理研究进展[J]. *药科学报*, 2017, 52(9): 1387-1396.
- LIN J J, YANG Y J, SHEN L Y, PAN X D. Recent progress in synthesis and pharmacological effects of ellipticine and its derivatives[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2017, 52(9): 1387-1396. (in Chinese)
- [31] MENG F, BI S, SUN Z, WU D, ZHANG F. 2,4,6-Trimethylpyridine-derived vinylene-linked covalent organic frameworks for confined catalytic esterification[J]. *Angewandte Chemie*, 2022, 61(44): e202210447.
- [32] ZHI D, ZHOU K, LIU S, YU W, DONG M, YAN C. METTL3/YTHDF1 m⁶A axis promotes tumorigenesis by enhancing DDR2 expression in ovarian cancer[J]. *Pathology Research and Practice*, 2024, 253(1): 155047.
- [33] WEI Y, GUO X, LI L. The role of N6-methyladenosine methylation in PAHs-induced cancers[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2023, 30(56): 118078-118101.
- [34] XIA Y, ZHANG Y Y, HUANG J, CHEN B, JIANG Y J, SUN Z X, LIU Y. N6-methyladenosine modifications in pulmonary hypertension[J]. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2023, 108(6): 497-503.
- [35] 张琪鹏. 基于生物信息学分析 N1-甲基腺苷修饰相关基因在结直肠癌患者中的预后价值[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2023.
- ZHANG Q P. The prognostic value of N1-methyladenosine modified gene in colorectal cancer patients based on bioinformatics postgraduate[D]. Kunming: Kunming Medical University, 2023. (in Chinese)

- [36] KHAN M, TANIA M. Cordycepin and kinase inhibition in cancer[J]. *Drug Discovery Today*, 2023, 28(3): 103481.
- [37] CHEN R Z, FENG C, CHEN L J, ZHENG X, FANG W W, WU S X, GAO X R, CHEN C, YANG J Y, WU Y, CHEN Y Y, ZHENG P P, HU N, YUAN M L, FU Y Y, YING H J, ZHOU J, JIANG J T. Single-cell RNA sequencing indicates cordycepin remodels the tumor immune microenvironment to enhance TIGIT blockade's anti-tumor effect in colon cancer[J]. *International Immunopharmacology*, 2024, 126(1): 111268.
- [38] WU S X, FANG W W, CHEN L J, FENG C, CHEN R Z, YING H J, ZHENG X, JIANG J T. Cordycepin remodels the tumor microenvironment of colorectal cancer by down-regulating the expression of PD-L1[J]. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2023, 149(19): 17567-17579.
- [39] CHRISTIAN B, OLIVER Z. The role of leucine and isoleucine in tuning the hydrophathy of class A GPCRs[J]. *Proteins*, 2024, 92(1): 15-23.
- [40] ZHENG Z, SUN N, MAO C, TANG Y, LIN S. Val-Leu-Leu-Tyr (VLLY) alleviates ethanol-induced gastric mucosal cell impairment by improving mitochondrial fission[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(48): 18722-18734.
- [41] MARTINA C, GIANDOMENICO R, GIUSEPPE A, MONICA R, RAFFAELE C, ROBERTO P, GABRIELE P, ANNA I, ENRICO M. Prognostic value of alkaline phosphatase and gamma-glutamyl transferase in patients with metastatic pancreatic cancer[J]. *Future Oncology*, 2023, 19(13): 937-946.
- [42] HINO C, CHAN G, JORDAAN G, CHANG S S, SAUNDERS J T, BASHIR M T, HANSEN J E, GERA J, WEISBART R H, NISHIMURA R N. Cellular protection from H₂O₂ toxicity by Fv-Hsp70: protection via catalase and gamma-glutamyl-cysteine synthase[J]. *Cell Stress Chaperon*, 2023, 28(4): 429-439.
- [43] 林燕, 吴坤生, 邱永军, 祝敏芳, 李克. 药学干预对肿瘤患者丙氨酰谷氨酰胺使用的效果分析[J]. *中国当代医药*, 2017, 24(30): 79-82.
- [44] LIN Y, WU K S, QIU Y J, ZHU M F, LI K. Analysis of effect of pharmaceutical intervention on the use of alanyl-glutamine in patients with tumor[J]. *China Modern Medicine*, 2017, 24(30): 79-82. (in Chinese)
- [44] 梁宏岩, 葛杰, 刘婷, 赵庭雨, 谢凯强, 刘合利, 唐密密. 不同浓度丙氨酰谷氨酰胺用于胃肠肿瘤术后患者肠外营养比较的随机对照临床试验[J]. *中国普通外科杂志*, 2023, 32(10): 1539-1551.
- [44] LIANG H Y, GE J, LIU T, ZHAO T Y, XIE K Q, LIU H L, TANG M M. A randomized controlled clinical study comparing different concentrations of alanylglutamine for par-enteral nutrition in postoperative gastrointestinal tumor patients[J]. *China Journal of General Surgery*, 2023, 32(10): 1539-1551. (in Chinese)
- [45] CHEN Y H, WU X N, XU L, EL-SHAZLY M, MA C, YUAN S J, WANG P P, LUO L Z. Two new cerebroside metabolites from the marine fungus *Hortaea werneckii*[J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2022, 19(4): e202200008.
- [46] HUSSAIN H, ALI I, ELIZBIT, HUSSAIN W, MAMADALIEVA N Z, HUSSAIN A, ALI M, AHMED I, ULLAH I, GREEN I R. Synthetic studies towards fungal glycosides: an overview[J]. *Current Organic Chemistry*, 2020, 24(24): 2865-2901.
- [47] 曹媛, 李瑛, 杜小霞, 周秀梅, 贾红程. 功能糖和糖醇的特性与应用[J]. *饮料工业*, 2022, 25(4): 74-80.
- [47] CAO Y, LI Y, DU X X, ZHOU X M, JIA H C. Characteristics and application of functional sugar & alditol[J]. *Beverage Industry*, 2022, 25(4): 74-80. (in Chinese)
- [48] 邱思元, 徐晶雪, 段育阳, 赵金玉, 赵文婧, 张莉欣, 任国领. 甘露糖赤藓糖醇酯生产及应用研究进展[J]. *生物技术进展*, 2023, 13(2): 210-219.
- [48] QIU S Y, XU J X, DUAN Y Y, ZHAO J Y, ZHAO W J, ZHANG L X, REN G L. Research progress on production and application of mannosylerythritol lipids[J]. *Current Biotechnology*, 2023, 13(2): 210-219. (in Chinese)