

提取方法对地衣提取物抗肿瘤活性的影响

胡松杉¹,贺小琼^{1*},吴怡²,姚乾³,王静¹,贺云发¹

¹昆明医科大学公共卫生学院;²昆明医科大学科研实验中心,昆明 650500;

³昆明医科大学第三附属医院云南省肿瘤研究所,昆明 650031

摘要:采用60%乙醇常温、60%乙醇70℃水浴、95%乙醇常温、95%乙醇70℃水浴、95%甲醇常温和95%甲醇70℃水浴6种手段对某地衣植物进行提取,粗提物再经80%乙醇醇沉和氯仿萃取,得到研究样品A、B、C、D、E、F。比较不同提取条件下样品的得率、体外抗肿瘤活性和色谱图差异,与已分离的功效化合物图谱进行比较,筛选较优的活性部位提取工艺。结果表明,乙醇相对于甲醇能够更有效提取功效化合物a和b。60%乙醇70℃恒温水浴提取的有效部位得率为1.01%,在40 μg/mL浓度下对Hela和T-24的抑制率分别为81.17%、88.56%,体外抗肿瘤活性最强,为较优的抗肿瘤活性部位提取方法。

关键词:提取工艺;抗肿瘤活性;有效组分;高相液相色谱

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.7.020

Influence of Different Extraction Methods on Antitumor Activity of *Usnea diffracta* Vain Fraction

HU Song-shan¹, HE Xiao-qiong^{1*}, WU Yi², YAO Qian³, WANG Jing¹, HE Yun-fa¹

¹School of Public Health, Kunming Medical University; ²Experiment Center for Medical

Science Research, Kunming Medical University, Kunming 650500, China; ³Yunnan Institute for Cancer,

The Third Affiliated Hospital, Kunming Medical University, Kunming 650031, China

Abstract: Six kinds of extraction methods, including 60% ethanol at room temperature, 60% ethanol at 70℃ water-bath, 95% ethanol at room temperature, 95% ethanol at 70℃ water-bath, 95% methanol at room temperature, 95% methanol at 70℃ water-bath were used for the extraction of *Usnea diffracta* Vain fraction. The crude extracts were then further extracted by 80% ethanol, and the ethanol extracts were finally fractionated by chloroform to obtain sample A, B, C, D, E and F, respectively. The yield, antitumor activity and HPLC chromatograms of 6 samples were then compared. The HPLC chromatograms of 2 purified bioactive compounds (compound a and b) were used for the identification of bioactive peaks. Our results showed that ethanol, not methanol, can effectively extract bioactive compounds a and b. Sample B showed the highest inhibitory rates both against Hela and T-24 tumor cell lines (81.17% and 88.56% at 40 μg/mL, respectively). Present study indicated that extraction method and extraction solvent significantly influenced the bioactivity of sample. 60% ethanol at 70℃ water-bath was the optimal method for the extraction of the antitumor bioactive fraction among the 6 methods.

Key words: extraction method; antitumor activity; bioactive fraction; high performance liquid chromatography

药物有效成分的提取分离是药物生产过程的关键环节,其工艺特点、工艺流程的选择和设备配置都直接影响着被提取活性组分的质量、数量和疗效^[1-4]。本课题组前期研究表明^[5-12],云南某特殊地衣提取物AMH(Antimutagen-He)及其活性组分具有

极显著的抗突变、体外杀灭人类癌细胞和抑制动物体内移植性肿瘤生长作用,在肿瘤防治方面具有良好的应用前景。研究中还发现,甲醇和乙醇提取对样品的活性影响差异较大。但前期实验室提取工作中,没有系统科学研究提取工艺对样品活性的影响,未进行工艺参数比较和质量控制,不利于后期的深入研究和开发应用。本文采用常规提取溶剂甲醇和乙醇在不同温度下对地衣进行提取,观察不同条件下样品的体外抗肿瘤活性和HPLC色谱图差异,并

收稿日期:2016-01-12 接受日期:2016-05-18

基金项目:国家自然科学基金(30960437);云南省科技计划项目(2009FXL001);云南省科技厅-昆明医科大学联合专项重点项目(2012FB001)

*通讯作者 Tel:86-013759589108; E-mail:hexqcn@aliyun.com

与已经分离得到的功效化合物的图谱进行比对,筛选较优的抗肿瘤活性组分提取工艺,为后期活性组分的规模化提取分离和抗肿瘤活性成分的分离鉴定提供研究基础。

1 材料与仪器

1.1 实验试剂

DMEM/F12 培养基,胎牛血清,青链双抗,磷酸缓冲液、胰蛋白酶等,均由 HyClone 公司生产;DDP(顺铂)由齐鲁制药有限公司生产,以 PBS 进行配制,试验浓度为 3 μM ;DMSO(二甲基亚砜)为分析纯,由西陇化工股份有限公司生产;色谱用流动相和配置样品用乙腈、甲醇为色谱纯,由 Sigma 公司生产;超纯水,由昆明医科大学科研实验中心提供;其余试剂均为分析纯。

1.2 样品

A、B、C、D、E、F 为采用不同提取方法得到的地衣提取组分样品。HPLC 色谱检测中样品以甲醇溶解,应用浓度为 2.5 mg/mL。体外抗肿瘤实验中,样品以分析纯 DMSO 配制,试验浓度分别为 2.5、5、10、20 和 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

化合物 a、b 为本实验室通过柱层析的方法,从该地衣中分离得到的具有显著性抗肿瘤作用的功效化合物,其中 a 为新结构化合物,b 为已知结构化合物。

1.3 细胞株

人宫颈癌细胞株 HeLa 和人膀胱癌细胞株 T-24,由中国科学院云南动物研究所细胞库提供。

1.4 仪器

RE-85Z 型旋转蒸发仪(上海青浦沪西仪器厂);SHZ-D 型循环真空水泵(巩义市予华仪器厂);L-2000 高效液相色谱仪(日立 HITACHI);TD5M 低速多管架自动平衡离心机(长沙迈佳森仪器设备有限公司);SK5200LHC 超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司)。

2 实验方法

2.1 样品的提取

称取从昆明药材市场购买的地衣粉末 6 份,1000 g/份,按照 4000 mL 提取液加 1000 g 地衣粉末的比例,分别采用 60% 乙醇室温、60% 乙醇 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴、95% 乙醇室温、95% 乙醇 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴以及 95% 甲醇室温、95% 甲醇 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 6 种工艺进行提取,重复提取 5 次,分别合并提取液,减压、浓缩、干燥得粗

提物 AMH。

粗提物分别加入少量纯净水搅匀,按照液料比 5:1 (mL/g) 与无水乙醇混合(乙醇终浓度为 80%) 进行醇沉,静置 24 h,分离上层提取液,重复提取 5 次,分别合并提取液,减压浓缩得 AMH-A。以氯仿按液料比 3:1 (mL/g) 对 AMH-A 进行萃取,重复 6 次,合并氯仿萃取液,减压、浓缩、干燥得到样品 A、B、C、D、E、F。每种方法同时进行 3 次平行试验,计算不同分离方法下样品重量和标准差,并计算每个样品的平均得率。

2.2 体外抗肿瘤活性检测

采用 MTT 法进行体外抗肿瘤活性检测。收集对数生长期肿瘤细胞,用培养液稀释至接种浓度后接种于 96 孔板,贴壁培养 24 h,弃去培养液。每孔分别加入含有相应浓度样品 A、B、C、D、E、F 的培养液 200 μL ,每样品每浓度设置 8 个复孔,样品剂量分别为 0、2.5、5、10、20 和 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。培养 72 h 后,弃去培养液,每孔加入含有 MTT(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的完全培养液 200 μL ,继续培养 4 h,弃去培养液,每孔加入 150 μL DMSO,避光震荡 10 min,在 490 nm 波长下测定每孔的吸光值(OD),计算抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{DMSO 组校正 OD 值} - \text{待测物组校正 OD 值}}{\text{DMSO 组校正 OD 值}} \times 100\%$$

校正 OD 值 = 实际测量 OD 值 - 空白对照 OD 值
式中:空白对照为不加细胞的背景对照,用以排除培养板、培养液和 MTT 试剂对吸光度的影响。

2.3 样品的 HPLC 色谱检测

2.3.1 色谱条件选择

采用 SinoChrom C₁₈ 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm),对不同样品浓度(5、2.5、1 mg/mL)、流动相(甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾)和流动相梯度条件、保留时长(80、100、120 min)、检测波长(210、220、230 nm)等因素进行优化筛选,确定最佳的色谱条件。

2.3.2 色谱图检测

样品以微孔滤膜(0.45 μm) 过滤,按优选的色谱条件对样品进行 HPLC 分析,得到其色谱图。

2.4 数据统计分析

所有数据均以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析、秩和检验及 LSD 检验。除秩和检验校正 $P < 0.083$ 为差异具有统计学意义,其余 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 不同提取条件对得率的影响

6种提取条件下,每1 kg 干地衣粉末提取的样

表1 不同条件下提取的样品得率的差异比较(P值)

Table 1 The discrepancy of P value compared among different samples

	A	B	C	D	E	F
A	-	0.852	0.001**	0.000**	0.000**	0.000**
B	-	-	0.002**	0.000**	0.000**	0.000**
C	-	-	-	0.009**	0.206	0.000**
D	-	-	-	-	0.103	0.064
E	-	-	-	-	-	0.003**

注:组间比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

Note:Comparison between groups,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

由表1 结果可见,相同提取溶剂下,不同提取温度时所得样品重量: $B > A, D > C, F > E$,经单因素方差分析和LSD 检验,除了样品A 与B 之间得率差别不具有统计学意义,样品D 与C、E 与F 得率差别均具有统计学意义($P < 0.05$)。相同提取温度,不同溶剂、不同溶剂比例时所得样品重量: $E > C > A, F > D > B$,经单因素方差分析和LSD 检验,除了样品C 和E 之间、D 和F 之间得率差别不具有统计学意义,样品A 与C、A 与E、B 与D 以及B 与F 差别均

品重量分别为9.70、10.13、19.17、26.20、22.20 g 和30.83 g,其得率为0.97%、1.01%、1.92%、2.62%、2.22%和3.08%, $F > D > E > C > B > A$ 。

具有统计学意义。6种条件提取研究结果表明:95% 甲醇组得率 $>$ 95% 乙醇组得率 $>$ 60% 乙醇组得率,70℃ 组得率 $>$ 常温组得率。

3.2 体外抗肿瘤活性检测

6种条件提取的样品A、B、C、D、E、F 在浓度为0、2.5、5、10、20 和40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对人宫颈癌细胞株Hela 和人膀胱癌细胞株T-24 的增殖抑制作用结果见表2、表3。

表2 样品对肿瘤细胞株Hela 的生长抑制作用(%)

Table 2 Inhibitory effects of samples on Hela cell line(%)

组别 Group	剂量 Dose($\mu\text{g}/\text{mL}$)					
	0	2.5	5	10	20	40
DMSO	0	0	0	0	0	0
A	0	-0.57	-2.45	-0.29	-0.54	46.06 Δ
B	0	3.13	1.42	4.22*	-0.44	81.17**
C	0	-1.92	-1.30	3.06	1.49	33.10**
D	0	1.21	-1.27	-5.12	-2.28	10.85 Δ
E	0	-11.67	-6.28	-6.07	-7.71	-3.88
F	0	-18.38	-12.22	-9.94	-7.63	-5.79

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ (方差分析); $\Delta P < 0.0083$ (秩和检验)。

Note:Compared with control,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ (variance analysis); $\Delta P < 0.0083$ (Rank-sum test)。

DDP(3 μM) 阳性对照组对Hela 的抑制率为10.52%,差异具有统计学意义($P < 0.05$),说明实验条件可靠。由表2 结果可见,样品A、B、C、D、E、F 在浓度为2.5、5、10 和20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对Hela 增殖抑制作用不明显。在40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,除样品E、F 外,样品A、B、C、D 对Hela 均有显著性的抑制作用,抑制率分别为40.06%、81.17%、33.10%、10.58% [$P <$

0.05(单因素方差分析)、 $P < 0.083$ (秩和检验)],样品B 的抑制作用最强。

DDP(3 μM) 阳性对照组对T-24 的抑制率为12.03%,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。由表3 结果可见,样品A、B、C、D、E、F 对T-24 的增殖抑制作用与Hela 类似,在浓度为40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,样品A、B、C、D 对T-24 的抑制率分别为76.90%、88.56%、

表3 样品对肿瘤细胞株 T-24 生长抑制作用 (%)
Table 3 Inhibitory effects of samples on T-24 cell line (%)

组别 Group	剂量 Dose(μg/mL)					
	0	2.5	5	10	20	40
DMSO	0	0	0	0	0	0
A	0	-1.14	-0.23	-3.19	-11.81	76.90**
B	0	1.37	-0.60	-4.01	-15.29	88.56**
C	0	-11.42	-12.47	-12.37	-18.91	75.08 [△]
D	0	-6.51	-11.99	-6.66	-18.50	35.15 [△]
E	0	-16.71	-12.88	-12.02	-20.24	5.48
F	0	-12.32	-17.26	-18.56	-37.84	-7.92

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ (方差分析);[△] $P < 0.0083$ (秩和检验)

Note:Compared with control,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ (variance analysis);[△] $P < 0.0083$ (Rank-sum test)

75.08%、35.15%,其抑制率与溶剂对照组比较差别具有统计学意义 [$P < 0.05$ (单因素方差分析)、 $P < 0.083$ (秩和检验)],样品 B 的抑制作用最强。

样品 A、B、C、D、E、F 在浓度为 40 μg/mL 对人宫颈癌细胞株 Hela 和人膀胱癌细胞株 T-24 的体外增殖抑制作用强弱顺序均为:B>A>C>D>E>F。乙醇提取组均具有显著的体外抗肿瘤作用,其中 60% 乙醇 70 °C 水浴提取的地衣组分对 Hela 和 T-24

的增殖抑制作用最强,甲醇提取组对 Hela 和 T-24 均没有明显的增殖抑制作用。

药物处理 72 h 后,显微镜下见溶剂对照组的细胞生长良好,细胞形态无明显变化,Hela 为多角型,T-24 为梭型,细胞密度均匀、贴壁生长旺盛。药物处理组在药物浓度为 40 μg/mL 时,除 F 样品外,其余样品对 Hela、T-24 细胞形态、密度均有不同程度影响,结果见图 1、图 1。

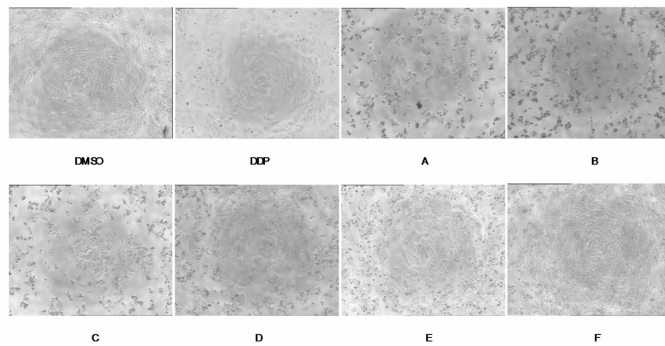


图1 不同样品对 Hela 肿瘤细胞形态的影响(40 μg/mL)

Fig. 1 Effects of different samples on the growth of Hela cells(40 μg/mL)

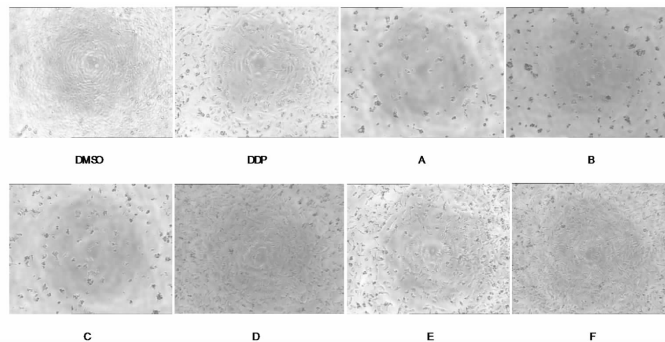


图2 不同组分对 T-24 肿瘤细胞形态的影响(40 μg/mL)

Fig. 2 Effects of different samples on the growth of T-24 cells(40 μg/mL)

由图1的结果可见,对于Hela,样品A、B、C、D、E在浓度为40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时细胞密度均有明显下降,其中样品A、B最为明显,正常形态的细胞数量明显减少,出现大量死亡细胞,样品E细胞数量有一定降低,样品F基本没有作用。

由图2的结果可见,样品对T-24的结果与Hela类似,样品A、B、C、D、E在浓度为40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对细胞密度和细胞形态均有一定影响,其中样品A、B、C最为明显,表现为细胞皱缩、形态异常,脱落呈悬浮状,并出现大量细胞碎片;而样品E和F作用不明显。

3.3 样品的色谱图比较

3.3.1 色谱条件的优选

检测波长230 nm,柱温为40 $^{\circ}\text{C}$,流速0.8 mL/min,进样量20 μL ,保留时间为100 min,色谱流动

表4 化合物a和b对人宫颈癌细胞株Hela的生长抑制作用(%)

Table 4 Inhibitory effects of compound a and b on Hela cell line(%)

组别 Group	剂量 Dose($\mu\text{g}/\text{mL}$)					
	0	2.5	5	10	20	40
a	0	18.73	41.24	79.10	99.48	99.62
b	0	4.08	12.81	22.29	31.65	72.06

在确定最佳色谱条件后,对6种不同提取方法得到的样品进行HPLC色谱分析,并与已分离得到

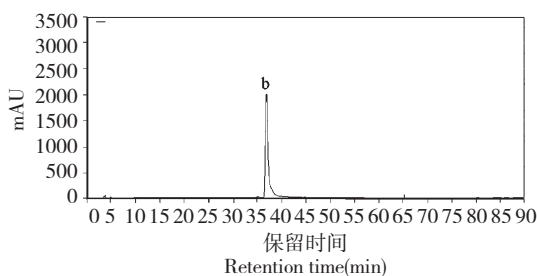
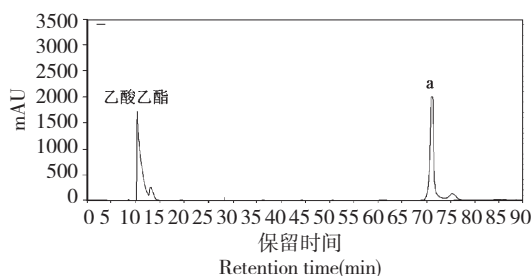


图3 功效化合物a和b的HPLC色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of bioactive compound a and b

对比图3、图4的色谱图,不同提取方法对提取物的成分组成和含量具有明显的影响。本次实验样品共有46个主要色谱峰,其中有30个共有峰,16个非共有峰,不同提取方法下色谱峰数目和峰面积存在明显差异。化合物a和b与本次实验的32和19色谱峰相对应,不同提取方法下这2个成分在色谱峰面积上存在较大差异,其结果见表5。

由图4和表5可见,在同等检测浓度下,甲醇提取的样品E和F中,化合物a和b峰面积较小,明

相:A为20%乙腈:80%磷酸二氢钾,B为80%乙腈:20%磷酸二氢钾,均调节pH=3.2,(梯度洗脱:0→15→60→75→90→100 min,A的体积百分数为95%→70%→50%→30%→0%→0%)时分离效果最佳,各色谱峰之间的峰面积和峰高比例较均衡,峰形好且出峰时间适中。因此,确定该色谱条件为地衣样品有效组分数谱的研究条件。

3.3.2 色谱图比较

采用柱层析分离已经从该地衣功效部位中分离得到了2个具有显著性抗肿瘤作用的功效化合物a和b。MTT实验表明(未发表资料),化合物a对Hela和T-24的体外抗肿瘤作用最强,化合物b次之。化合物a和b对Hela的体外增值抑制作用结果见表4(目前正在准备申请专利保护,暂不能在本文列出功效化合物的化学结构)。

的2个功效化合物的HPLC图谱进行比较分析,其结果见图3、图4。

显低于采用乙醇提取的样品A、B、C和D。图谱比较结果与本次体外抗癌功效检测结果趋势一致,也与我们前期研究发现甲醇提取物没有明显体外抗癌作用的结果相同。95%乙醇提取物样品C和D的HPLC图谱中,化合物a和b含量都较高,但体外抗肿瘤活性显著性低于60%乙醇提取物样品B,可能是样品B中可能还含有其它具有强体外抗癌作用的功效化合物,或者C、D样品中含有拮抗物质,具体原因有待进一步研究。

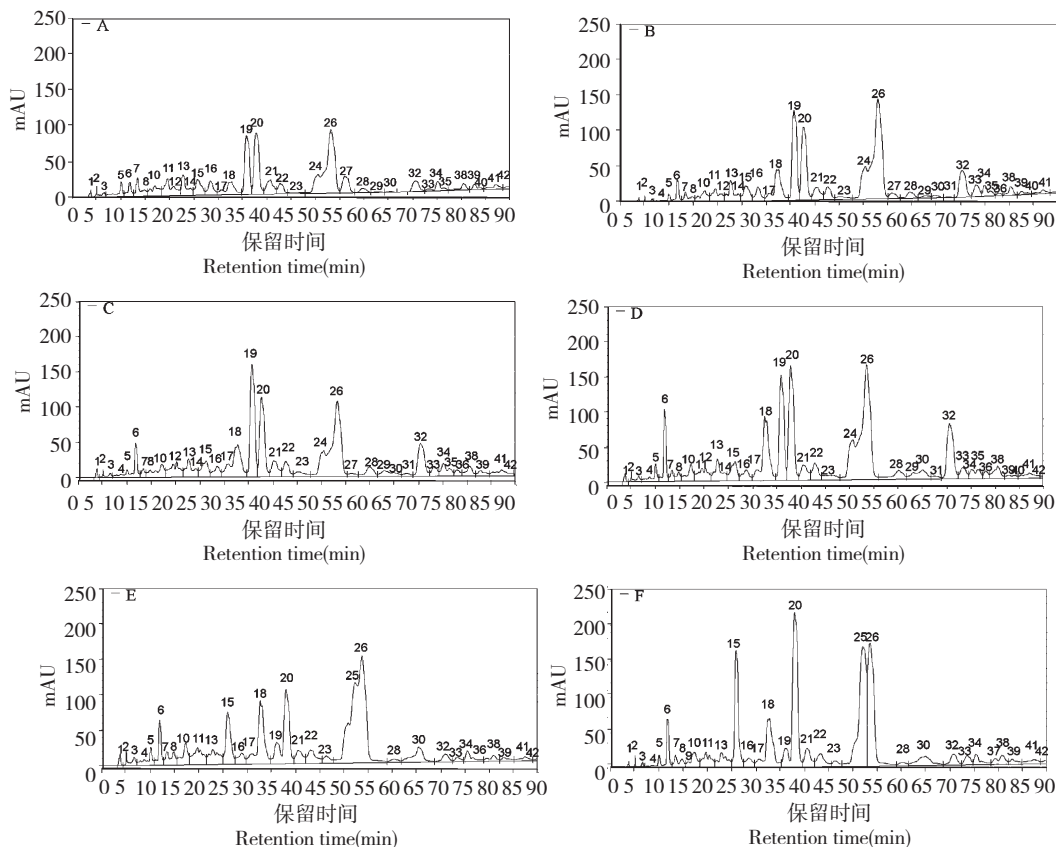


图4 提取样品 A~F 的 HPLC 色谱图

Fig. 4 HPLC chromatograms of samples A-F

表5 功效组分 HPLC 图谱特征

Table 5 HPLC chromatogram characteristics of Bioactive fractions

峰号 No.	化合物 Compound	保留时间 Retention time	峰面积 Peak areas					
			A	B	C	D	E	F
19	b	35.840	22347149	34194340	41216937	40315638	9305441	10365896
32	a	70.717	5686981	13884498	15888924	29259985	4307103	6034135

3 讨论与结论

已投入使用的抗肿瘤药物中,大部分都直接或间接来自天然产物或其衍生物,与传统化疗药物相比,天然植物来源药物往往具有毒副作用小、抗肿瘤作用机制独特等优点^[13,14],从天然植物中提取分离高效低毒的抗肿瘤药物已成为抗肿瘤新药研究与开发的重要方向。我们前期研究表明,本实验地衣提取物 AMH 在肿瘤防治方面具有良好的应用前景。为了确定地衣提取物 AMH 功效组分的提取工艺,本文在 6 种不同条件下对其功效部位进行了提取,对不同提取手段所得样品的体外抗肿瘤活性进行了

检测,并比较了提取物和已分离功效化合物的色谱图。

本研究结果显示,不同提取条件对地衣组分的提取得率存在明显的影响。70℃组得率>常温组得率,可能是温度升高使地衣组分溶解度增大,溶剂容易溶解出更多的样品。95%甲醇组得率>95%乙醇组得率>60%乙醇组得率,甲醇分子极性大于乙醇,甲醇提取了更多极性较大的物质,使得甲醇提取效率高于乙醇;而60%乙醇组提取的水溶性物质相对更多,在氯仿萃取后,部分水溶性物质被水相溶解,使得60%乙醇提取得率低于95%乙醇。

体外抗肿瘤实验结果显示组分得率与抗肿瘤活

性结果没有平行关系,甲醇提取的组分得率最高,但在试验剂量下基本没有体外抗肿瘤作用。根据HPLC图谱比较分析,可能是甲醇不能有效提取地衣中的抗肿瘤有效成分,而是提取了较多极性较大的无效杂质成分。60%乙醇组体外抗肿瘤活性>95%乙醇组活性,可能原因是60%乙醇相对于95%乙醇更容易提取出该地衣中一些具有抗肿瘤活性的水溶性物质如多糖类、皂苷等,也可能与95%乙醇提取物中含有较多的活性拮抗物有关。

HPLC色谱对比研究显示,不同提取方法所得样品间色谱峰数目、峰面积和有效成分含量存在明显差异,说明提取溶剂和提取温度对提取成分具有明显影响。地衣活性部位的提取应结合活性研究结果,确定最佳的有效部位提取工艺,才能最大限度提取其有效成分。

本实验结果表明,甲醇不能有效提取该地衣AMH中的抗肿瘤活性成分,而毒性低的乙醇可作为地衣抗肿瘤活性部位的提取溶剂。体外抗癌活性检测和HPLC图谱分析表明,60%乙醇在70℃恒温水浴下的提取工艺为该地衣抗肿瘤活性部位的最佳提取工艺。本研究对后期的规模化抗肿瘤有效部位提取以及功效成分分离鉴定提供了研究发现基础。

致谢:感谢昆明医科大学科研实验中心、昆明医科大学第三附属医院云南省肿瘤研究所、昆明医科大学天然药物研究中心在科研上给予的帮助。

参考文献

- Li Z(李真),Jia L(贾亮),Jia SY(贾绍义). Extract technique of Chinese medicine efficacious ingredient and its application. *Chem Ind Eng* (化学工业与工程),2005,22:450-455.
- Liu MY(刘明言),Wang BC(王帮臣). Advances in new technologies applying to Chinese materia medica extraction. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药),2010,41:169-175.
- Wang SJ(王赛君),Wu ZF(伍振峰),Yang M(杨明),*et al.* Studies on new technology of extraction and application of conversion of traditional Chinese medicine at Home. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志),2014,39:1360-1366.
- Ye CL(叶陈丽),He S(贺帅),Cao WL(曹伟灵),*et al.* Research progress in new technologies for extraction and separation of Chinese materia medica. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药),2015,46:457-464.
- He XQ. The antimutagenicity and anticancer effects of a kind of wild mushroom extract. *Proceed Am Assoc Cancer Res*,2007,48:1310-1316.
- He XQ. The inhibitory effects of natural plant extract AMH on the mutagenicity of several carcinogens *in vitro*. *Chin J Lymphol Oncol*,2004,3:105-107.
- He XQ(贺小琼),Duan CS(段生朝),Deng Y(邓艳). Inhibitory effect of fungal extracts AMH on mutagenicity of cyclophosphamide. *Acta Chin Med Pharm* (中医学报),2004,32:55-56.
- He XQ(贺小琼),Duan SC(段生朝),Deng Y(邓艳). Inhibitory effect of fungal extracts AMH on mutagenicity of Benzo(a)pyrene *in vitro*. *Chin Tradit Pat Med* (中成药),2004,26:652-654.
- He XQ(贺小琼),Duan SC(段生朝),Deng Y(邓艳). Inhibitory effect of fungal extracts AMH on mutagenicity of 2-aminofluorene *in vitro*. *Yunnan J Tradit Chin Med Mater Med* (云南中医中药杂志),2004,25:33-34.
- He XQ(贺小琼),Chen YH(陈彦红),Xiong XL(熊祥玲). Inhibitory effect of AMH from fungi plant *Tricholoma mastutake* on the mutagenicity of cigarette smoke condensate *in vitro*. *Carcinogenesis Teratogenesis Mutagenesis*(癌变·畸变·突变),2004,16:46-49.
- He XQ(贺小琼),Duan SC(段生朝),Deng Y(邓艳),*et al.* Inhibitory effect of AMH from fungi plant *Tricholoma mastutake* on the mutagenicity of hair coloring cream *in vitro*. *Chin J Public Health* (中国公共卫生),2004,20:710-711.
- He XQ(贺小琼). Inhibitory effect of natural plant extract AMH on the mutagenicity of several carcinogens *in vitro*. *Tumor*(肿瘤),2003,23:494-496.
- Zhang H,Guo ZJ,Xu WM,*et al.* Antitumor effect and mechanism of an ellagic acid derivative on the HepG2 human hepatocellular carcinoma cell line. *Oncol Lett*,2014,7:525-530.
- Niu DL(牛东玲),Wang LS(王立松),Zhang YJ(张颖君),*et al.* Secondary metabolites and bioactivities of lichens. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发),2007,19:1079-1086.