

## 长根静灰球活性物质提取及体外抗肿瘤作用研究

曾庆华<sup>1,2</sup>, 叶勇<sup>1</sup>, 刘坤<sup>1</sup>, 张傲娜<sup>1</sup>, 曹晶晶<sup>1</sup>, 曾庆梅<sup>1\*</sup><sup>1</sup>合肥工业大学食品科学与工程学院, 合肥 230009; <sup>2</sup>聊城大学食品科学与工程系, 聊城 252000

**摘要:**以长根静灰球为原料, 石油醚为溶媒, 进行索氏提取, 抽滤、干燥后得到石油醚提取物; 滤渣干燥后, 同样的方法依次加入乙酸乙酯、正丁醇、乙醇、蒸馏水进行提取, 分别得到乙酸乙酯提取物、正丁醇提取物、乙醇提取物和水提取物。采用 MTT 法检测不同溶剂提取物对 MDA-MB-231 (人乳腺癌细胞)、Hela (子宫颈癌细胞) 细胞的细胞活力的抑制作用, 对正丁醇提取物处理过的 MDA-MB-231 细胞进行胞内活性氧 (ROS) 测定、线粒体膜电位检测和 DAPI 检测细胞凋亡, 用倒置荧光显微镜观察。结果发现长根静灰球提取物可以诱导 MDA-MB-231、Hela 细胞活力降低, 特别是正丁醇提取物, 对 MDA-MB-231 和 Hela 细胞的细胞活力有明显的抑制作用, 正丁醇提取物的浓度在 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 细胞活力被显著抑制。相比 Hela, MDA-MB-21 对于提取物的作用较为敏感。长根静灰球正丁醇提取物, 能使 MDA-MB-231 细胞活力明显下降, 线粒体膜电位显著下降, 胞内活性氧显著增加, 通过产生 ROS 调节线粒体途径引发细胞凋亡。

**关键词:**长根静灰球; 马勃; 提取物; 抗肿瘤

中图分类号: TS201.2; R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.1.018

Extraction and Antitumor Activity of Active Ingredients in *Bovistella radicata*ZENG Qing-hua<sup>1,2</sup>, YE Yong<sup>1</sup>, LIU Kun<sup>1</sup>, ZHANG Ao-na<sup>1</sup>, CAO Jing-jing<sup>1</sup>, ZENG Qing-mei<sup>1\*</sup><sup>1</sup>School of Food Science and Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China;<sup>2</sup>Department of Food Science and Engineering, Liaocheng University, Liaocheng 252000, China

**Abstract:** *Bovistella radicata* was used as raw material and petroleum ether was used as solvent to carry out Soxhlet extraction, and the petroleum ether extract was obtained after drying. After drying the residue, the same method was followed by adding ethyl acetate, n-butanol, ethanol, distilled water to afford ethyl acetate extract, n-butanol extract, ethanol extract and water extract. The inhibitory effects of different solvent extracts on the cell viability of MDA-MB-231 and Hela cells were detected by MTT assay. The intracellular reactive oxygen species (ROS), mitochondrial membrane potential detection and DAPI detection of apoptosis in MDA-MB-231 cells treated with n-butanol extract were observed by inverted fluorescence microscopy. The results showed that the extracts of *B. radicata* can decrease the viability of MDA-MB-231 and Hela cells, especially the n-butanol extract. When the concentration of n-butanol extract was 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , the cell viability was significantly inhibited. Compared to Hela, MDA-MB-21 was more sensitive to the effect of the extracts. When treated with the n-butanol extract, the activity of MDA-MB-231 cells decreased significantly, the mitochondrial membrane potential decreased significantly, and the intracellular reactive oxygen species increased significantly, and the mitochondrial pathway was induced by ROS.

**Key words:** *Bovistella radicata*; puffball; extraction; antitumor

长根静灰球 [*Bovistella radicata* (Mont.) Pat.] 是一种属于马勃科静灰球菌属的大型真菌。马勃是一类独特的大型真菌生物, 一些种类在新鲜时可食用, 有很好的食用价值, 不少国家的人民认为它是一种野生蘑菇, 富含蛋白质、多糖、纤维素和维生素

素<sup>[1-3]</sup>。而其他多数种类可以药用, 有多种药用价值<sup>[4-7]</sup>。中国药典(2015版)<sup>[8]</sup>收录的3种正品马勃为脱皮马勃 *Lasiosphaera fenzi* Reich.、大马勃 *Calvatia gigantea* (Batsch ex pers.) Lloyd. 和紫色马勃 *Calvatia lilacina* (Mont. et Berk.) Lloyd. 的干燥子实体。在非洲<sup>[9]</sup>和北美的印第安人, 这三种马勃也长期被用在传统医学上<sup>[10]</sup>。另外还有数十种马勃被民间作为药用, 长根静灰球就是其中之一, 主要分布在甘肃、云南、吉林一带。传统上, 马勃通常用于止

收稿日期: 2017-08-31 接受日期: 2017-12-19

基金项目: 国家自然科学基金(31371844)

\* 通信作者 E-mail: zengqingmei-1@163.com

血、咽喉痛和咳嗽。最近越来越多的证据表明,马勃的一些成分具有抗癌作用。Lam 等从新鲜的 *Calvatia caelata* 中分离出活性多肽 CULP,发现其对人乳腺癌 (MDA-MA-231) 细胞株具有良好的抑制活性<sup>[11]</sup>。Ng<sup>[12]</sup>等也从 *Calvatia caelata* 的新鲜子实体分离出分子质量为 39 kDa 的新蛋白质钙蛋白,可以大大降低乳腺癌细胞的生存力。用紫色马勃蛋白提取物处理 24 h 后,人结肠直肠癌细胞株 (SW480 细胞) 和人单核细胞白血病细胞株 (THP-1 细胞) 的存活率以浓度依赖性方式下降<sup>[13]</sup>。然而,对于长根静灰球的抗肿瘤作用并没有报道,其抗肿瘤的机制尚不清楚。

肿瘤是一种常见病,其中恶性肿瘤是危害人类健康最严重的一类疾病,《2014 年世界癌症报告》显示恶性肿瘤的发病率和致死率在全球范围内正迅速增加<sup>[14-16]</sup>。而目前所用的治疗手段有两种:传统手段和新手段,传统手段主要是化学治疗、手术治疗、中药治疗、放射治疗和免疫治疗<sup>[17]</sup>,新手段主要是基因治疗和生物治疗,临床上最为常用的是化学治疗、手术治疗。随着科学的进步和社会的发展,传统手段中的中药治疗越来越受到重视,最近的研究报道,植物来源的生物活性化合物主要通过细胞周期停滞<sup>[18]</sup>和凋亡途径的激活<sup>[19]</sup>拥有抗癌生物活性。在这种环境下,对于马勃的研究显得尤为重要,并且在所能查到的文献当中,有关马勃的研究论文少之又少。基于这种情况,鉴别马勃种类、化学成分、药用价值及临床应用,分析其研究进展和面临的问题,系统研究其活性成分和某些药理作用的关系,对于马勃资源的充分开发利用具有重要的参考价值。

本实验分别用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、乙醇和蒸馏水依次提取长根静灰球中的活性物质,并评价其对 MAD-MB-231 和 Hela 细胞活力的影响及作用机制,以期提出一种新的肿瘤活性的抑制方法和途径。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料与试剂

马勃:产地东北,购于甘肃药材市场,经甘肃中医药大学中药鉴定专家王明伟鉴定为长根静灰球<sup>[20]</sup>;MAD-MB-231 乳腺癌细胞株、Hela 子宫颈癌细胞株,中国科学院细胞库。

二甲基亚砷 DMSO 和四甲基偶氮唑盐 (MTT), 美国 Sigma 公司;高糖 DMEM 培养基、0.25% 胰酶

(含 EDTA 含酚红)、胎牛血清、DAPI 测定试剂盒、JC-1 测定试剂盒和 ROS 测定试剂盒,Life technology;PE-Annexin V/7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒,美国 BD 公司;石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、乙醇等其它试剂均为国产分析纯;水为蒸馏水。

### 1.2 仪器与设备

MCO-15AC 型二氧化碳培养箱和 MLS-3750 灭菌锅,日本 SANYO;TS-100 荧光倒置显微镜,日本 NIKON;iMark 酶标仪,美国 BioTek 公司;移液器,德国 Eppendorf;SW-CJ-IF 超净工作台,苏州净化;T-214 分析天平,美国 DENVER;3HB-III 循环水式多用真空泵,郑州长城科工贸有限公司;旋转蒸发器 RE52CS,上海亚荣生化仪器厂;索氏提取器。

## 2 实验方法

### 2.1 长根静灰球活性物质提取及初步分离方法

#### 2.1.1 长根静灰球活性物质提取及初步分离工艺流程

长根静灰球干燥子实体→不同溶剂索氏提取→抽滤→真空浓缩→浸膏干燥→提取物→正丁醇提取物薄层层析→六个组分。

#### 2.1.2 长根静灰球活性物质提取及初步分离操作方法

称取长根静灰球 30 g,用滤纸包裹起来拧成糖果状,放入索氏提取器内,加入 500 mL 石油醚于圆底烧瓶内,连接好索氏提取器,放到油浴锅上,调节油温在 95 °C 条件下进行提取 24 h,真空抽滤,石油醚提取液进行减压浓缩,所得的粘稠膏进行干燥,得石油醚提取物 A。滤渣干燥后,同样的方法依次加入乙酸乙酯、正丁醇、乙醇、蒸馏水,分别在 105、110、95、95 °C 进行索氏提取,所得提取物进行减压浓缩、干燥,分别得到乙酸乙酯提取物 B、正丁醇提取物 C、乙醇提取物 D 和水提取物 E。针对细胞株 MDA-MB-231、Hela 做 MTT 检测,测定提取物对细胞活力的影响,选出对细胞活力影响最大的正丁醇提取物 C 做薄层层析。将正丁醇提取物用石油醚:丙酮按体积比 10:1 展开,做薄层层析,得到 6 个组分,分别对 MDA-MB-231、Hela 细胞做 MTT 测定,3 号组分效果最好,接下来以 3 号组分进一步实验。

### 2.2 细胞培养

将冻存的 MAD-MB-231 细胞复苏后,用预先准备好的培养基(由 90% 高糖 DMEM、10% 胎牛血清组成)稀释至原体积的 10 倍以上,置于 37 °C、5%

CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养,16 h 后观察,根据情况换液或消化。消化时,弃取旧培养基,用 PBS 缓冲液洗两次,之后加入 0.25% 胰酶,进行消化,消化适度后,用枪进行吹打,使细胞均匀分开,然后加培养基,终止消化,继续吹打均匀,离心 5 min (1000 rpm)。最后把细胞重新悬浮,分别接到培养瓶和 96 孔板,培养至汇合度达到 60% ~ 70% 时加提取物。Hela 细胞培养采取相同的培养方法。

### 2.3 提取物配制及采用 MTT 法检测提取物对肿瘤细胞活力的影响

将 2.1.2 得到的提取物 A、B、C、D、E 及薄层层析得到的六个组分分别用 DMSO 配制成浓度为 200mg/mL 的原液。用配制好的培养基将提取物原液分别稀释成一系列浓度:200、400、600、800、1000、1200 μg/mL,薄层层析 6 个组分原液分别稀释成 50、100、200、300、400、500 μg/mL,依次加入到汇合度 60% ~ 70% 的 96 孔板中,每孔 100 μL,同时设置空白对照组,每个浓度做 5 个平行。置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。在培养箱培养 24 h 后,在倒置显微镜下观察、拍照。弃去旧的培养液,于避光条件下每孔加入 100 μL 浓度为 5 mg/mL 的 MTT 溶液,在 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 4h,后弃去上层溶液,每孔加入 100 μL 的 DMSO,用酶标仪震荡混匀检测在 490 nm 处的吸光值,并计算出细胞活力抑制率(%) : 细胞活力抑制率(%) = (1 - 试验组 OD 值 / 正常组 OD 值) × 100%<sup>[21]</sup>。测定一式三份。进一步做 3 号组分对 MAD-MB-231 乳腺癌细胞的影响。

### 2.4 流式细胞术检测 MAD-MB-231 细胞凋亡

使用 PE-Annexin V / 7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒(BD Pharmacy Biosciences, USA)通过流式细胞仪(Guava 6, Merck millipore, USA)分析细胞凋亡,所加 3 号组分的浓度为 100 μg/mL。

### 2.5 DAPI 检测 MAD-MB-231 细胞凋亡

首先用甲醇稀释 DAPI 荧光剂,将 3 号组分(浓

度为 100 μg/mL) 干预 24 h 的 96 孔细胞培养板中的培养基弃去,每孔加入 30 μL 的 DAPI 稀释液,每个浓度做两个平行对照,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱孵育 30 min,弃上清,用甲醇清洗两次,每次置于培养箱中温 5 ~ 10 min,最后每孔加入 100 μL 甲醇溶液,利用倒置荧光显微镜,在紫外激发光的激发作用下观察并拍照。

### 2.6 JC-1 荧光探针检测 MAD-MB-231 细胞线粒体膜电位

用高糖 DMEM 稀释 JC-1 荧光剂,将 3 号组分干预 24 h 的 96 孔板中的培养液弃去,每孔加入 30 μL JC-1 试剂,每个浓度做两个平行对照,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱孵育 30 min,弃上清,并用 PBS 清洗两次,每次置于培养箱中培养 5 ~ 10 min,最后每孔加入 100 μL 温的 PBS,用荧光显微镜在相同的位置下分别用蓝光和绿光观察并拍照。

### 2.7 3#组分对 MDA-MB-231 细胞发生凋亡胞内活性氧(ROS)水平的影响

用高糖 DMEM 将 DCFH-DA 原液稀释,将 3 号组分干预 24 h 的 96 孔板中培养基弃掉,每个孔加入 30 μL 稀释液,并且每个浓度做两个平行对照,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中孵育 30 min 取出弃上清,用 PBS 溶液洗两次,每次清洗时置于培养箱中温 5 ~ 10 min,最后每孔加入 100 μL 温的 PBS,在荧光显微镜下用蓝光观察并拍照<sup>[22]</sup>。

## 3 结果与分析

### 3.1 长根静灰球不同溶剂提取物对 MDA-MB-231 和 Hela 细胞活力的影响

从表 1 和表 2 可以看出,经不同浓度的长根静灰球提取物处理 24 h 后 MDA-MB-231 和 Hela 细胞的细胞活力均降低,其中正丁醇提取物对 MDA-MB-231 和 Hela 细胞活力的抑制效果最为显著。相比 Hela, MDA-MB-21 细胞对于提取物的作用较为敏感。

表 1 长根静灰球不同溶剂提取物对 MDA-MB-231 细胞活力的抑制作用(用抑制率表示)  
Table 1 Inhibitory effects of different solvent extracts of *B. radicata* on activity of MDA-MB-231 cells

提取物浓度 Concentration (μg/mL)	石油醚提取物 Petroleum ether extract (%)	乙酸乙酯提取物 Ethyl acetate extract (%)	正丁醇提取物 N-butanol extract (%)	乙醇提取物 Ethanol extract (%)	水提取物 Water extract (%)
200	10.50	6.60	56.40	3.15	1.14
400	38.23	2.40	49.22	9.22	2.26
600	49.02	2.71	70.42	11.12	6.74
800	44.70	4.83	85.85	17.13	12.32
1000	46.66	5.74	89.61	21.33	24.70
1200	51.70	8.63	93.26	26.13	31.11

表 2 长根静灰球不同溶剂提取物对 Hela 细胞活力的抑制作用(用抑制率表示)

Table 2 Inhibitory effects of different solvent extracts of *B. radicata* on activity of Hela cells

提取物浓度 Concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	石油醚提取物 Petroleum ether extract (%)	乙酸乙酯提取物 Ethyl acetate extract (%)	正丁醇提取物 N-butanol extract (%)	乙醇提取物 Ethanol extract (%)	水提取物 Water extract (%)
200	1.13	-4.91	48.76	-7.01	1.13
400	2.93	-8.14	50.50	-6.28	5.59
600	15.96	-5.51	62.95	3.55	10.82
800	16.48	2.45	60.70	19.32	20.63
1000	29.22	7.92	66.82	25.02	30.18
1200	37.95	18.71	67.27	40.57	44.19

### 3.2 正丁醇提取物的组分对 MDA-MB-231 细胞活力的影响

通过表 1、表 2 可以发现,正丁醇提取物对 MDA-MB-231 细胞活力有较明显的抑制作用,然后通过薄层层析将正丁醇提取物分离得到 6 种不同的

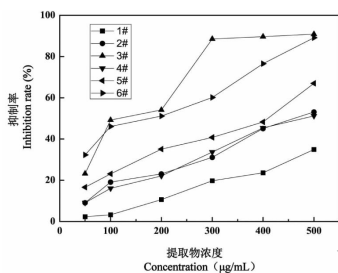


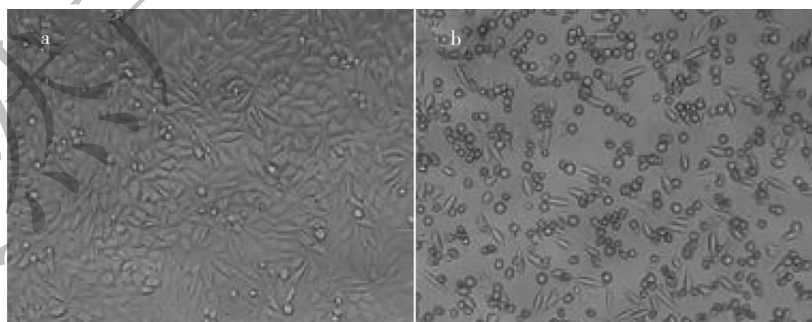
图 1 正丁醇提取物 6 个组分对 MDA-MB-231 细胞活力的抑制作用

Fig. 1 Effects of six components of n-butanol extract on viability of MDA-MB-231 cells

组分。如图 1 所示,6 种组分(1#,2#,3#,4#,5#,6#)均可以诱导细胞活力降低,但 3# 组分效果最好。

### 3.3 细胞形态学观察

将 MDA-MB-231 细胞与渐增浓度梯度 3# 组分共同培养 24 h,结果发现,3# 组分对 MDA-MB-231 细胞活力的抑制具有浓度依赖性,而对照组的细胞几乎是完整的。在荧光显微镜下观察对照组细胞和加入 3# 组分(浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )细胞的形态,结果如图 2 所示,图 2a 表示空白对照组细胞的形态,细胞贴壁生长,大多数成梭形并且透明度高,有少部分细胞死亡成圆形,细胞生长的比较饱满,分裂正常。图 2b 表明,在 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度下,加入 3# 组分的细胞表现出明显的死亡特征,总体细胞固缩变圆,部分细胞体积变小,甚至有少部分细胞脱落漂浮于培养基中,细胞的密集度降低,而且随加药浓度的增大,时间的增长,这种现象也更加明显。

图 2 空白对照组(a)与加 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  3# 组分(b)后细胞系形态观察结果Fig. 2 Morphological observation of blank control group (a) and with 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of 3# fraction group (b)

### 3.4 DAPI 检测 MDA-MB-231 细胞凋亡

利用 DAPI 染色来检测细胞核的形态,如图 4 所示,空白对照细胞 DAPI 染色呈蓝白色荧光,并未发现有明显的荧光浓缩点;经 3# 组分(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

处理 24 h 之后,检测到凝聚核和核碎裂系列的显蓝色荧光的特征:DAPI 细胞核皱缩,有亮点出现,后期出现凋亡小体,细胞核破碎。这是细胞凋亡的典型变化。

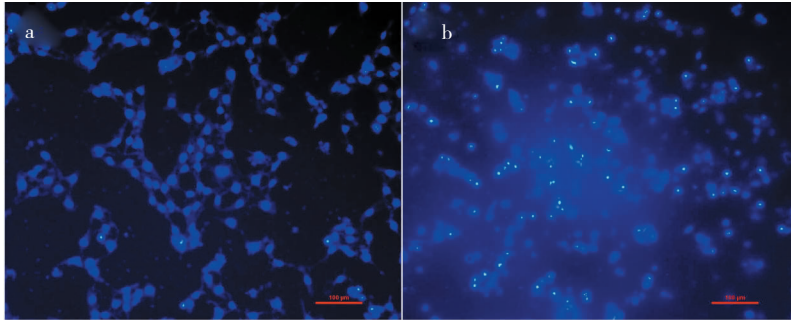


图3 DAPI检测空白对照组(a)与加100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  3#组分后(b)MDA-MB-231细胞凋亡

Fig. 3 Apoptosis of MDA-MB-231 cells in blank control group (a) and with 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of 3# fraction group (b) detected by DAPI

### 3.5 流式细胞术检测 MDA-MB-231 细胞凋亡

为了进一步证实暴露细胞凋亡的刺激,我们还通过流式细胞仪用 Annexin V-FITC/7-ADD 双标记

技术检测了凋亡水平。结果如图3所示,当用3#组分处理时,存在更多的 Annexin-V 阳性细胞。

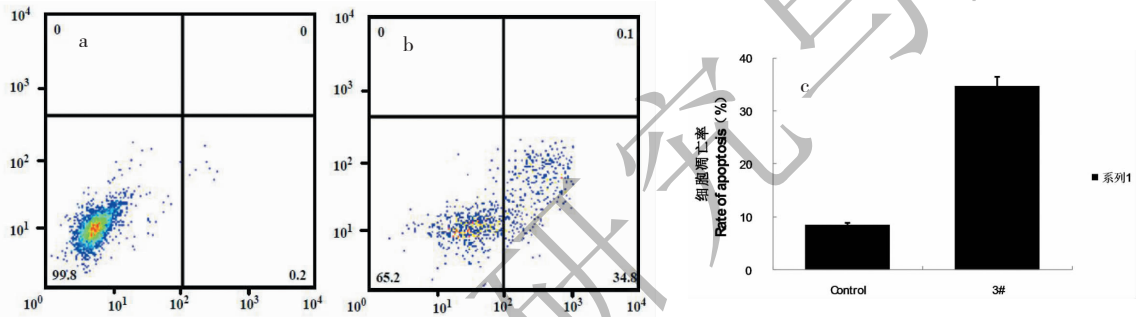


图4 流式细胞术检测 MDA-MB-231 细胞凋亡

Fig. 4 Apoptosis of MDA-MB-231 cells detected by flow cytometry

注:a:空白对照组;b:加100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  3#组分;c:对照组和加100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  3#组分凋亡效果比较

Note:a:control group;b:100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  3# fraction;c:comparison of apoptotic effects of control and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  3# fraction

### 3.6 3#组分对 MDA-MB-231 细胞线粒体膜电位的影响

线粒体途径凋亡中线粒体膜电位(MMP)的破坏是非常重要的,同时MMP的降低是ROS积累的一个特征。MMP的改变用JC-1荧光染料来评价,正常情况,JC-1是聚合物,产生红色荧光,如果线粒体受到破坏,膜电位下降或者没了,JC-1以单体形式存在,就显绿色的荧光,所以可以通过JC-1染色后红绿荧光的相对比例衡量线粒体去极化的比例。

结果表明,在对照组MDA-MB-231细胞中,JC-1荧光染料呈现红-橙色荧光(图5a),说明JC-1在线粒体基质中形成了聚合物,此时的MMP比较高,细胞处于正常状态;而在加入100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  3#组分并培养24h后的细胞中,JC-1荧光染料呈现绿色荧光(图5b),与对照组相比,处理组中JC-1的单体(绿色)/二聚体(红色)比例显著增加,说明3#组分处理

细胞的线粒体MMP降低。

### 3.7 3#组分对 MDA-MB-231 细胞发生凋亡胞内活性氧(ROS)水平的影响

目前情况下,细胞凋亡有两种途径,即死亡感受器调节的非固有途径和线粒体调节的固有途径。其中,由死亡感受器调节的非固有途径可以由很多刺激因素激发,如氧化应激产生活性氧(ROS),ROS的信号途径是细胞生存和增殖的关键<sup>[23]</sup>。经ROS荧光染色检查了ROS水平,结果(如图6)显示3#组分可诱导高水平的ROS,可能导致细胞死亡。

## 4 结论

本文主要以长根静灰球为原料,采用MTT法检测不同溶剂提取物对MDA-MB-231(人乳腺癌细胞)、Hela(子宫颈癌细胞)细胞的细胞活力的抑制作用,对正丁醇提取物处理过的MDA-MB-231细胞进行胞内活性氧(ROS)测定、线粒体膜电位检测和

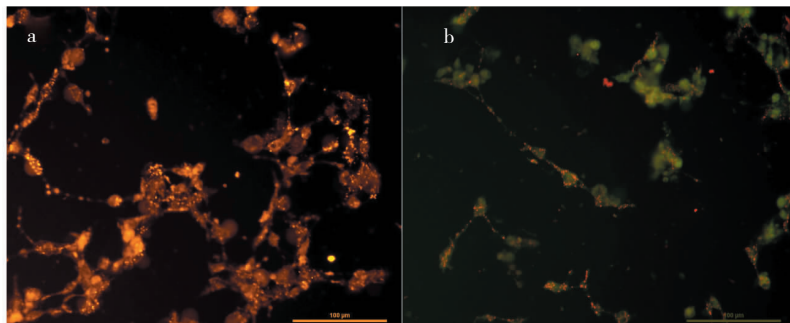


图5 3#组分对MDA-MB-231细胞线粒体膜电位的影响

Fig. 5 Effects of 3# fractions on mitochondrial membrane potential of MDA-MB-231 cells

注:a:空白对照组;b:加100 μg/mL 3#组分

Note:a:control group;b:100 μg/mL 3 # fraction

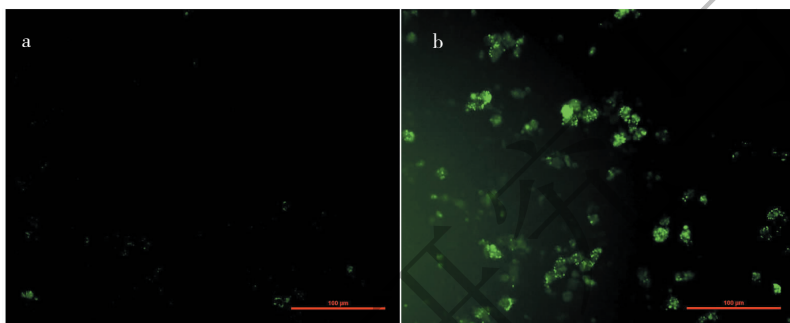


图6 3#组分对MDA-MB-231细胞发生凋亡胞内活性氧(ROS)水平的影响

Fig. 6 Effects of 3# fraction on intracellular activation of oxygen (ROS) in MDA-MB-231 cells

注:a:空白对照组;b:加100 μg/mL 3#组分

Note:a:control group;b:100 μg/mL 3# fraction

DAPI 检测细胞凋亡,用倒置荧光显微镜观察。结果发现长根静灰球提取物可以诱导 MDA-MB-231、Hela 细胞活力降低,特别是正丁醇提取物,对 MDA-MB-231 和 Hela 细胞的细胞活力有明显的抑制作用,正丁醇提取物的浓度在 200 μg/mL 时,细胞活力被显著抑制。相比 Hela,MDA-MB-21 较为敏感。长根静灰球正丁醇提取物,能使 MDA-MB-231 细胞活力明显下降,线粒体膜电位显著下降,胞内活性氧显著增加,通过产生 ROS 调节线粒体途径引发细胞凋亡。这为寻找新的抗肿瘤药物和抗肿瘤机制奠定了理论基础。

#### 参考文献

- Pereira E, Barros L, Martins A, *et al.* Towards chemical and nutritional inventory of Portuguese wild edible mushrooms in different habitats [J]. *Food Chem*, 2012, 130:394-403.
- Reis FS, Barros L, Martins A, *et al.* Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivat-

ed mushrooms; an inter-species comparative study [J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50:191-197.

- Huang JS (黄劲松), Chen JB (陈建兵), Du XF (杜先锋), *et al.* Capillary electrophoretic determination of water-soluble vitamins in mushroom powder [J]. *Food Sci* (食品科学), 2008, 29(5):344-346.
- Guo J (郭晶), Jiang WX (江蔚新), Fan MS (范明松). Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of puffballs [J]. *Mod Med Health* (现代医药卫生), 2013, 29:386-389.
- Xiang CK (相聪坤), Guan SJ (关胜江), Ma JJ (马娟娟). A comparative study on the anti-inflammatory and analgesic effects of *Calvatia gigantea* and *Bovistella sinensis* Lloyd [J]. *Tianjin J Tradit Chin Med* (天津中医药), 2016, 33:430-433.
- Guo M (郭玫), Zhang Y (张扬). A survey of traditional Chinese medicine puffballs [J]. *Gansu Coll TCM* (甘肃中医学院学报), 2010, 2(1):60-62.
- Liu B (刘波). Chinese Fungus Records Twenty-third Volume (中国真菌志第二十三卷) [M]. Beijing: Science



- Press, 2005, 2:25.
- 8 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2015, Vol 1;50.
- 9 Coetzee JC, Wyk AEV. The genus *Calvatia* ('*Gasteromyces*', *Lycoperdaceae*): A review of its ethnomycology and biotechnological potential[J]. *Afr J Biotechnol*, 2009, 22:6007-6015.
- 10 Burk WR. Puffball usages among north American Indians [J]. *J Ethnobiol*, 1983, 3(1):55-62.
- 11 Lam YW, Ng TB, Wang HX. Antiproliferative and antimitogenic activities in a peptide from puffball mushroom *Calvatia caelata* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 289:744-749.
- 12 Ng TB, Lam YW, Wang H. Calcaelin, a new protein with translation-inhibiting, antiproliferative and antimitogenic activities from the mosaic puffball mushroom *Calvatia caelata* [J]. *Planta Med*, 2003, 69:212-217.
- 13 Wu JY, Chen CH, Chang WH, et al. Anti-cancer effects of protein extracts from *Calvatia lilacina*, *Pleurotus ostreatus* and *Volvariella volvacea* [J]. *Evidence-Based Complement Alternat Med*, 2011, 2:982368.
- 14 Stewart BW, Wild CP. World Cancer Report 2014. The International Agency for Research on Cancer [M]. World Health Organization, 2014.
- 15 Chinese Journal of Cancer, Editorial Office of Chinese Journal of Cancer, Sun Yat-sen University Cancer Center. The 150 most important questions in cancer research and clinical oncology series: questions 15-24 [J]. *Chin J Cancer*, 2017, 36:39.
- 16 McCarthy M, Auda G, Agrawal S, et al. *In vivo* anticancer synergy mechanism of doxorubicin and verapamil combination treatment is impaired in BALB/c mice with metastatic breast cancer [J]. *Exp Mol Pathol*, 2014, 97(1):6-15.
- 17 Dunne AL, Price ME, Mothersill C, et al. Relationship between clonogenic radio sensitivity, radiation-induced apoptosis and DNA damage /repair in human coloncancer cells [J]. *British J Cancer*, 2003, 89:2277-2283.
- 18 Zhang EX, Song XH, Yin ST, et al. p21 induction plays a dual role in anti-cancer activity of ursolic acid [J]. *Exp Biol Med*, 2015, 241:501-508.
- 19 Yeh CH, Yang ST, Chen CH. *Calvatia lilacina* protein extract induces apoptosis through endoplasmic reticulum stress in human colon carcinoma cells [J]. *Proc Biochem*, 2011, 46:1599-1606.
- 20 Wang SM (王盛民). Handbook of Chinese Medicinal Herbs Identification and Retrieval(中药材检索鉴别手册) [M]. Beijing:Academy publishing house, 2004:669-673.
- 21 Xie SQ, Wu YL, Cheng PF, et al. NNAMB, a novel homospermidine conju gate, induces apoptosis and differentiation in B16 Melanoma cells [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2007, 23:1285-1290.
- 22 Buckley DI. Dietary micronutrients and cervical dysplasia in southwestern American Indian women [J]. *Nutr Cancer*, 1992, 17:178-179.
- 23 Larochette N, Decaudin D, Jacotot E, et al. Arsenite induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability trans-ition pore [J]. *Exp Cell Res*, 1999, 249:413-421.

致谢:对以下合作单位参与本刊的学术建设表示由衷的感谢!

广西壮族自治区药用植物园

广西科学院

重庆市药物种植研究所

昆明医科大学药学院