

# 虫草素分离鉴定及对 Hep G2 细胞抑制研究

张虎成<sup>1</sup>, 杨 军<sup>1</sup>, 范海涛<sup>1</sup>, 王维彬<sup>1</sup>, 杜天宇<sup>1</sup>, 李泽亚<sup>1</sup>,  
毕 磊<sup>1</sup>, 尹逸奇<sup>1</sup>, 胡 宇<sup>1</sup>, 王丁瑶<sup>1</sup>, 张金军<sup>2</sup>, 陈小峰<sup>2</sup>, 张征田<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>北京电子科技职业学院生物工程学院, 北京 100170; <sup>2</sup>北京第 35 中学, 北京 100020;

<sup>3</sup>南阳师范学院生命科学与技术学院, 南阳 473061

**摘要:**从蛹虫草小麦培养基中提取和纯化虫草素, 并进行了体外肝癌 Hep G2 细胞的抑制作用研究。以蛹虫草小麦培养基为原料, 研究热超声水提取, 探究 pH 值、温度、浸提时间、超声功率对虫草素的提取效果, 用 AB-8 柱层析分离、重结晶纯化虫草素, 并用 HPLC、红外光谱鉴定。虫草素处理 Hep G2 肝癌细胞后, 倒置相差显微镜下观察肝癌细胞形态变化, 并用四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 法测定细胞生长情况。结果表明, 热超声水提取工艺为: 固液比 1:50、pH 值 6、温度 60 °C、浸提时间 3 h、超声功率 300 W 时提取效果好。经鉴定, 分离提取物为虫草素, 纯度达到 99% 以上。不同浓度的虫草素对 Hep G2 肝癌细胞有明显的抑制作用, 且以浓度和时间呈正相关, 被抑制的细胞变圆、凝集、碎裂增加。

**关键词:**培养残基; 虫草素; 分离提取; 肝癌 G2 细胞; 抑制

中图分类号: Q936

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2020) Suppl-0001-06

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2020.S.001

## Isolation and identification of cordycepin and its inhibitory effect on Hep G2 cells

ZHANG Hu-cheng<sup>1</sup>, YANG Jun<sup>1</sup>, FAN Hai-tao<sup>1</sup>, WANG Wei-bin<sup>1</sup>, DU Tian-yu<sup>1</sup>, LI Ze-ya<sup>1</sup>,  
BI Lei<sup>1</sup>, YIN Yi-qi<sup>1</sup>, HU Yu<sup>1</sup>, WANG Ding-yao<sup>1</sup>, ZHANG Jin-jun<sup>2</sup>, CHEN Xiao-feng<sup>2</sup>, ZHANG Zheng-tian<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Bioengineering College, Beijing Polytechnic, Beijing 100170, China; <sup>2</sup>Beijing No. 35 High School, Beijing 100020, China;

<sup>3</sup>Department of Life Sciences, Nanyang Normal University, Nanyang 473061, China

**Abstract:** Cordycepin was extracted and purified from wheat medium of *Cordyceps militaris* and its inhibitory effect on Hep G2 cells was studied in vitro. The extraction of cordycepin was optimized using a thermosonic water bath at varying pH values, temperatures, extraction times and ultrasonic power. The results show that the extraction was better when solid to liquid ratio of 1:50, at pH 6, at 60 °C, with an extraction duration of 3 hours, and 300 W ultrasonic power. The purity of cordycepin was over 99%. The extracted cordycepin was then purified employing a macroporous adsorptive resin (AB-8), and was identified by HPLC and Infrared spectroscopy. The growth of Hep G2 cells treated with the purified cordycepin was measured using the MTT assay, and the morphological changes of Hep G2 cells were observed by means of inverted differential microscopy. Different concentrations of cordycepin showed significant inhibitory effect on Hep G2 cells, and showed a positive correlation with concentration and inhibitory time. The inhibited cells became round, agglutinated and fragmented.

**Key words:** residual medium; cordycepin; extraction; Hep G2 cells; inhibitory effect

虫草素 (cordycepin) 是蛹虫草 (*Cordyceps militaris* (L.) Link) 主要活性成分之一, 是一种腺苷类似物, 化学名称为 3'-脱氧腺苷 (如图 1), 分子式为 C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>O<sub>3</sub>N<sub>5</sub>, 分子量为 251, 紫外光最大吸收波长为 259

nm。虫草素晶体为针状或片状结晶, 熔点 230 ~ 231 °C, 溶于水、热乙醇和甲醇, 不溶于苯、乙醚和氯仿等。

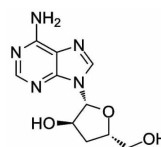


图 1 虫草素的结构式

Fig. 1 Structure of cordycepin

收稿日期: 2019-11-19 接受日期: 2020-04-01

基金项目: 北京市教师队伍建设-职业院校素质提高工程 (PXM2018\_014306\_000057/2)

\* 通信作者 E-mail: zhangzhengtian0105@163.com

虫草素具有多种生物活性,包括抗菌<sup>[1]</sup>、抗病毒<sup>[2]</sup>、抗氧化<sup>[3]</sup>、显著抑制多种癌症<sup>[4]</sup>,具有免疫调节等作用<sup>[5,6]</sup>,具有重要的科研、医药和商业价值。虫草素在天然及人工培养的蛹虫草体内提取的数量有限,使其广泛应用受到极大制约。人工蛹虫草培养基残基中有虫草素的存在<sup>[7]</sup>,从残基中提取虫草素,可以变废为宝,提高产业的附加值。近年来,国内外对虫草素的分离提取工艺进行了广泛的研究,并取得了一些进展。虫草素的提取大多采用热水浸提法、索式提取法、超声法、离子交换法、大孔吸附树脂、氧化铝提取法等方法<sup>[8]</sup>,但存在工艺复杂、污染较大等问题。本研究综合前人的研究结果,探究从蛹虫草小麦残基综合提取虫草素的工艺,以期找到更适合工业化生产虫草素的提取方法。本研究利用提取的虫草素对 Hep G2 肝癌细胞的抑制作用,为进一步探讨机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 人工蛹虫草小麦培养基残基

购买于辽宁沈阳山里人干货公司。

#### 1.1.2 细胞株

人肝癌细胞株 Hep G2 购买于中国医学科学院基础医学院研究所细胞资源中心。

#### 1.1.3 试剂

虫草素标准品(SIGMA);无水乙醇(分析纯);甲醇(色谱纯);纯净水、双蒸水(实验室自制)。AB-8 大孔吸附树脂。RPMI1640 粉剂、小牛血清和链霉素购买于赛默飞世尔生物化学制品有限公司。其他试剂购买于国药集团化学试剂有限公司。

#### 1.1.4 仪器

电热恒温水浴锅(上海跃华医疗器械厂 HHS-4S 型)。高效液相色谱仪 HPLC (Agilent HPLC 1200);C<sub>18</sub> 色谱柱(Cosmosil, 5 μm, 4.6 mm × 250 mm);日本东京理化 EYELA 旋转蒸发器(型号:N-

1100D-WD);Satoris 天平(BT25S);粉碎机(皇代小型粉碎机,800Y);新芝超声波清洗仪(宁波新芝生物科技股份有限公司,SB-5200DTD);紫外核酸蛋白检测仪(上海琪特分析仪器有限公司,AT-88A);冷却水循环装置(上海爱朗仪器有限公司,型号:CA-1111);红外光谱仪(赛默飞生命科技有限公司,Nicolet5700)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 标准曲线制作及虫草素含量检测

高效液相色谱仪 HPLC (Agilent HPLC 1200), C<sub>18</sub> 色谱柱(Cosmosil, 5 μm, 4.6 mm × 250 mm),柱温 30 °C,检测波长为 259 nm。梯度洗脱程序:0 ~ 20 min,2% → 100% 甲醇。流速为 1 mL/min,进样量 20 μL。精确称取虫草素标准品 1 mg,用蒸馏水溶解并定容至 10 mL,配制成 0.1 mg/mL 标准储备液。分别准确量取上述储备液稀释,定容至质量浓度 10、20、40、60、80、100 μg/mL 的标准溶液。所有虫草素标准品及虫草素提取液待测样品,均利用 0.45 μm 滤膜微滤后,HPLC 检测。每次检测均做 3 次重复,每次做 3 个平行实验,取平均值。以虫草素浓度为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线。

#### 1.2.2 样品前处理

将蛹虫草废弃小麦固体培养残基 100 °C 烘烤 2 h 至干燥,用粉碎机粉碎至粉末,备用。采用热水超声浸提法对培养残基中的虫草素进行粗提。每次称取蛹虫草小麦培养基固体样 10 g 于 150 mL 纯水中,60 °C 水浴超声浸提 3 次,每次 1 h,合并滤液,冷却后,离心收集上清液,HPLC 检测虫草素含量。

#### 1.2.3 正交验证试验

提取 pH、浸提时间、超声功率和浸提温度是影响虫草素提取的重要因素,本实验设计了一个 4 因素 3 水平的正交试验,见表 1,以确认最佳的提取工艺。离心后收集上清液,HPLC 检测虫草素含量。

表 1 虫草素提取正交试验因素水平

Table 1 The levels of orthogonal experiment for cordycepin purification

水平编号 Level No.	因素 Factor			
	A pH	B 温度 Temperature(°C)	C 时间 Time(h)	D 功率 Power(W)
1	5	50	1	200
2	6	60	2	250
3	7	70	3	300

### 1.2.4 AB-8 分离提取与结晶

AB-8 树脂用 95% 乙醇浸泡 24 h 后,除去树脂碎片和杂质。湿法装柱(10 mm × 300 mm),用 95% 乙醇洗至不产生白色浑浊流出液为止,再用蒸馏水洗至无醇味。先用蒸馏水(pH6)平衡 AB-8 层析柱,随后以 1 BV/min 的流速加入 5 BV 的滤液,再用蒸馏水(pH6)洗涤 AB-8 层析柱,至基线平衡后,改用的 20% 乙醇(pH6)洗脱层析柱,收集洗脱峰,减压浓缩蒸干得虫草素粗提物。HPLC 检测各个洗脱峰的虫草素含量,方法参照文献<sup>[8]</sup>。粗提物按照 1:10 比例加入无水乙醇冰箱冷冻结晶,出现大量虫草素白色晶体,虫草素粗晶体再用无水乙醇重新溶解,置于冰箱冷冻重结晶。HPLC 测虫草素含量。

### 1.2.5 虫草素鉴定

HPLC 方法鉴定见“1.2.1”。将得到的虫草素结晶体与 KBr 研磨压片,用红外光谱仪在 4 000 ~ 450 cm<sup>-1</sup> 范围内进行扫描。

### 1.2.6 虫草素对肝癌 Hep G2 细胞的抑制

将肝癌 Hep G2 细胞放在含有 10% 小牛血清、链霉素(100 μg/mL)的 RPMI1640 培养液中,并于 37 °C 在含有 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中传代培养。取对数生长期肝癌 Hep G2 细胞以 2 × 10<sup>3</sup>/mL 接种于 96 孔板中,每孔 200 μL,对照组为全培养基,空白组为不加入细胞的全培养基。培养至对数生长期后加入虫草素,实验组含有提取的虫草素,终浓度分别为 12.5 μg/mL(实验组 1)、25 μg/mL(实验组 2)、50 μg/mL

(实验组 3)、75 μg/mL(实验组 4)、100 μg/mL(实验组 5)、150 μg/mL(实验组 6)、200 μg/mL(实验组 7)、250 μg/mL(实验组 8)。继续培养 72 h。分别在 24、48 和 72 h 用倒置显微镜(×200)观察细胞形态。为了检测活细胞数量,在 72 h 时加入 50 μL 的 1 mg/mL 的 MTT(四甲基偶氮唑盐)溶液继续培养 4 h,再向每个孔中加入 100 μL 的二甲亚砷,在 490 nm 处测量吸光值 A,计算细胞致死率。

$$\text{致死率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$$

### 1.3 统计学方法

实验数据采用 Excel 2010 统计单因素方差分析,以  $\bar{x} \pm s$  表示;计数资料采用 (R × C)χ<sup>2</sup> 检验,以 P ≤ 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 虫草素标准品浓度曲线及含量测定

#### 2.1.1 标准品浓度曲线

虫草素标准品的浓度与峰面积的回归方程为  $y = 0.0009x + 6E-7$ ,  $R^2 = 1$ ,线性范围为 10 ~ 100 μg/mL,在此范围内,线性关系良好。在选定的色谱条件下,虫草素的保留时间为 9.1 min 左右。

#### 2.1.2 虫草素含量测定

将蛹虫草小麦培养基按上述实验过程进行前处理,再用 HPLC 测定虫草素含量,见图 2,结果见表 2。蛹虫草小麦培养基中虫草素含量为 1.87 mg/g。本实验试图通过活性炭吸附去掉色素,但是效果不理想(图 2C)。

表 2 蛹虫草小麦培养基中虫草素含量

Table 2 The content of cordycepin in *Cordyceps* wheat medium

残基质量 Residue mass(g)	出峰时间 Peak time(min)	峰面积 Peak area	含量 Content(mg/g)
10	9.106	610	1.88
10	9.109	640	1.82
10	9.099	605	1.90
平均值 Average	9.105	618	1.87

## 2.2 虫草素分离提取及鉴定

### 2.2.1 正交试验

酸碱度(A)、温度(B)、浸提时间(C)和超声功率(D)4 个因素作 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 试验,以确定其最佳提取条件。因素水平设计、试验结果及直观分析和方差分析见表 3。结果显示,正交试验结果中 R 值由大到小依次为 A、C、B、D 因素。根据各因素 K 的变化率可以看出,各因素的最佳搭配为 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>D<sub>3</sub>,即 pH

值 6、温度 60 °C、浸提时间 3 h、超声功率 300 W。

### 2.2.2 大孔吸附树脂分离虫草素

按照料液比为 1:50、pH 值 6、温度 60 °C、浸提时间 3 h、超声功率 300 W 工艺提取,得到的提取液用大孔吸附树脂 AB-8(10 mm × 300 mm)层析柱分离。先用 pH 6 的蒸馏水平衡 AB-8 层析柱,再以 1 BV/min 的流速加入 5 BV 的浓缩液,接着用 pH6 的蒸馏水洗脱 AB-8 层析柱,出现第一个峰(图 3),至

表3 蛹虫草小麦培养基虫草素热超声提取正交试验

Table 3 Orthogonal test for extraction of cordycepin from wheat medium by thermo-ultrasonic extraction

编号 No.	水平组合 Level	A (pH)	B (°C)	C (h)	D (W)	结果 Result (mg/g)
1	A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> C <sub>1</sub> D <sub>1</sub>	5	50	1	200	1.82
2	A <sub>1</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub> D <sub>2</sub>	5	60	2	250	1.86
3	A <sub>1</sub> B <sub>3</sub> C <sub>3</sub> D <sub>3</sub>	5	70	3	300	1.89
4	A <sub>2</sub> B <sub>1</sub> C <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	6	50	2	300	1.92
5	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>3</sub> D <sub>1</sub>	6	60	3	200	1.97
6	A <sub>2</sub> B <sub>3</sub> C <sub>1</sub> D <sub>2</sub>	6	70	1	250	1.88
7	A <sub>3</sub> B <sub>1</sub> C <sub>3</sub> D <sub>2</sub>	7	50	3	250	1.92
8	A <sub>3</sub> B <sub>2</sub> C <sub>1</sub> D <sub>3</sub>	7	60	1	300	1.91
9	A <sub>3</sub> B <sub>3</sub> C <sub>2</sub> D <sub>1</sub>	7	70	2	200	1.90
I	5.57	5.66	5.61	5.69	T = 17.07	
II	5.77	5.74	5.68	5.66		
III	5.73	5.67	5.78	5.72		
K1	1.857	1.887	1.870	1.897		
K2	1.923	1.913	1.893	1.887		
K3	1.910	1.890	1.927	1.907		
R	0.067	0.027	0.057	0.020		

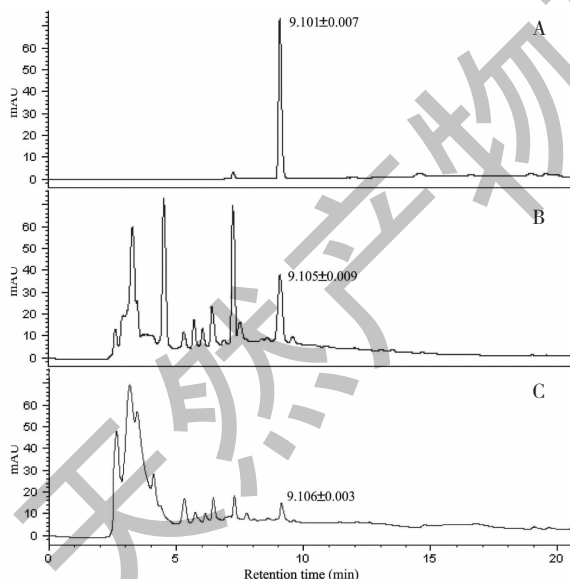


图2 培养基残基虫草素 HPLC 图

Fig. 2 HPLC profile of cordycepin

注: A: 虫草素标准品; B: 虫草素原液; C: 残基脱色后的虫草素。

Note: A: Authentic cordycepin; B: Cordycepin in wheat medium;  
C: Cordycepin after decolorization.

间为 11.6 min, 随后用 pH6 的 95% 乙醇再生 AB-8 树脂, 洗去多余的杂质(图 3)。

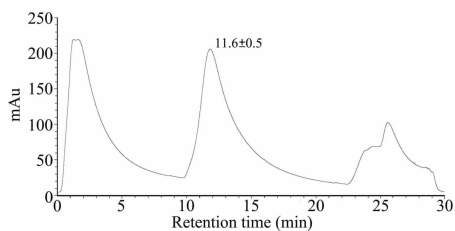


图3 AB-8 大孔吸附树脂分离虫草素图谱

Fig. 3 Purification profile of cordycepin by AB-8 macroporous resin

### 2.2.3 HPLC 鉴定虫草素

将大孔吸附树脂 AB-8 分离小麦残基中的第一个峰和第二个峰收集后, 进行 HPLC 鉴定, 第一个峰虫草素含量极低, 占到 1% (图 4A), 第二个峰中虫草素含量极高, 占到 90% (图 4B)。重结晶后的虫草素纯度达到 99% 以上(图 4C)。

### 2.2.4 红外光谱分析

从图 5 红外光谱分析, 3 413  $\text{cm}^{-1}$  为虫草素的  $\text{-NH}_2$  伸缩振动峰, 3 138  $\text{cm}^{-1}$  为虫草素  $\text{-OH}$  伸缩振动峰, 2 920  $\text{cm}^{-1}$  为  $\text{-CH}_2\text{-}$  的出峰伸缩振动峰, 1 678

基线平衡后, 改用 pH6 的 20% 乙醇洗脱层析柱, 流速为 1 BV/min, 收集第二个洗脱峰(图 3), 保留时

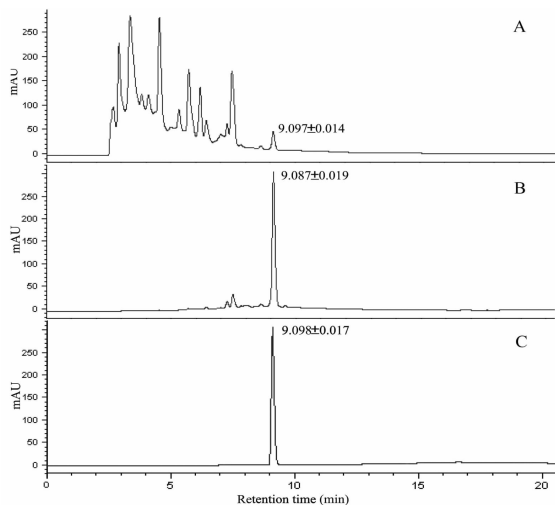


图4 AB-8 分离得到的虫草素 HPLC 鉴定图

Fig. 4 HPLC profile of cordycepin from AB-8

注:A:AB-8 一峰的虫草素;B:AB-8 二峰;C:重结晶后的虫草素。

Note: A: First peak from AB-8; B: Second peak from AB-8;

C: Cordycepin after recrystallization.

$\text{cm}^{-1}$ 左右处为官能团五元环出的峰,  $1\ 609\ \text{cm}^{-1}$ 为 C-N, 伸缩振动特征, 进一步证明为  $-\text{NH}_2$  的存在。  $1\ 476 \sim 1\ 497\ \text{cm}^{-1}$  为苯环和氮杂环的骨架振动峰,  $1\ 338\ \text{cm}^{-1}$  为  $-\text{OH}$  伯醇指纹峰,  $1\ 114\ \text{cm}^{-1}$  为  $-\text{O}-$ 脂肪醚键特征指纹峰,  $720\ \text{cm}^{-1}$  为苯环的邻位取代峰。从红外图谱来看, 所测晶体具备的官能团与虫草素的相一致, 所以从红外图谱分析可以看出, 实验所得出的结晶物结构与虫草素结构相符。

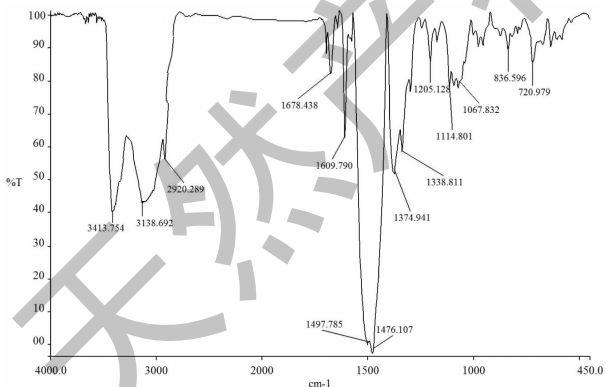


图5 目标物质晶体的红外光谱

Fig. 5 IR chromatogram of separated target crystal

## 2.3 提取的虫草素对 Hep G2 肝癌细胞的抑制作用

### 2.3.1 对 Hep G2 肝癌细胞形态的影响

对照组细胞形态饱满, 呈梭形生长, 细胞数量增多, 贴壁生长状况良好, 可见典型的细胞分裂, 并形

成集落。实验组细胞生长状态变差, 高倍镜下观察发现细胞内部有明显的空泡出现, 部分细胞形态发生改变, 细胞变圆, 粘附性降低, 部分细胞漂浮于培养液中, 呈现出一系列细胞凋亡特征性的形态学变化。随着虫草素浓度增加, 这些症状更加突出。当虫草素浓度超过  $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$  时, 大部分细胞死亡并漂浮于培养液中, 存活的细胞生长状态较差。

### 2.3.2 对 Hep G2 肝癌细胞增殖的影响

MTT 检测结果显示, 虫草素对 Hep G2 细胞增殖有抑制作用, 且随虫草素浓度的增加以及作用时间延长而抑制作用逐渐增强 ( $P < 0.05$ ); 随着作用时间增加而抑制作用更明显 ( $P < 0.05$ ), 且各种浓度在 72 h 的抑制作用均高于 50% (图 6)。虫草素浓度大于等于  $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$  时, 24 h 的抑制作用均高于 50%, 且抑制作用基本不变, 而 48 和 72 h 的抑制作用则更强。作用时间为 24、48 和 72 h 时,  $\text{IC}_{50}$  分别为 85、65、 $12.5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

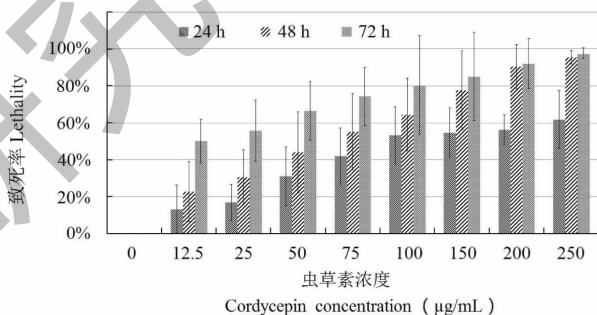


图6 不同浓度虫草素对 Hep G2 肝癌细胞抑制作用

Fig. 6 Inhibitory effect of cordycepin on Hep G2 cells

## 3 讨论

本试验采用热超声法水提取蛹虫草小麦培养基中虫草素, 主要对提取 pH 值、提取温度、提取时间及提取功率进行研究, 通过正交试验, 确定虫草素提取的最佳工艺参数为: pH 值 6、温度  $60\ ^\circ\text{C}$ 、浸提时间 3 h、超声功率 300 W, 在实际工业化生产中料液体积过大, 会加大生产周期, 厂家可根据其设备作适当调整。活性炭用木屑、果壳、褐煤等含碳物质为原料, 多孔, 比表面积大, 对弱极性有机物有较强的吸附性。本实验试图通过活性炭吸附出去粉碎液中的色素, 但是实验结果不理想, 这个结果和有关文献报道出入较大。

AB-8 型大孔吸附树脂是苯乙烯型弱极性共聚体, 该树脂是以二乙烯苯为骨架结构的吸附剂, 对于一些性质相近的分子和多种环状芳香族化合物有很

强的吸附能力,且随被吸附分子的亲油性加强而增加。AB-8型大孔吸附树脂适用于天然产物的分离,尤其适用于水溶性、弱极性化合物的分离,且容易再生,可反复使用,在纯化工艺中占有极为重要位置。

每种分子都有其组成和结构决定的独有的红外吸收光谱,据此可以对分子进行结构分析和鉴定。红外吸收光谱是分子振动转动能级跃迁引起的吸收光谱。当分子中各原子以同一频率、同一相位在平衡位置附近作简谐振动时,这种振动方式称简正振动。分子振动的能量与红外射线的光量子能量正好对应,因此当分子的振动状态改变时,就可以发射红外光谱,也可以因红外辐射激发分子而振动而产生红外吸收光谱。这就决定了虫草素分子的红外光谱吸收峰一致,是鉴定的重要依据。

本研究用质谱检测提取的虫草素,结果和标准品一致,已发表<sup>[8]</sup>。本研究工艺在原料前处理上不需脱脂,从而减少了有机溶剂的使用并简化了生产工序。此提取工艺能对蛹虫草小麦培养基中虫草素有效提取,且工艺操作性强,生产成本低,完全适合大规模生产。

肝癌是世界第六大常见恶性肿瘤,根据国际癌症研究中心估计,我国肝癌发病和死亡率占全球50%以上。治疗原发性肝癌仍采用手术为主的综合性治疗,包括放射治疗、化疗等多种方法,对早期肝癌有较好的效果,但是对中晚期肝癌的治疗仍然不理想。因此寻找毒副作用小而提高生存率和生活质量的有效抗肿瘤药物是非常有意义的。本试验结果表明虫草素对Hep G2肝癌细胞有明显的抑制作用,使细胞出现典型的凋亡形态改变,细胞核变小、浓缩、变圆、碎裂。虫草素使肝癌细胞凋亡的机制是下一步研究的方向,为虫草素抗肝癌的临床应用提供理论依据。

## 参考文献

- 1 Choi YH, Kim GY, Lee HH. Anti-inflammatory effects of cordycepin in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages through Toll-like receptor 4-mediated suppression of mitogen-activated protein kinases and NF- $\kappa$ B signaling pathways [J]. Drug Des Devel Ther, 2014, 8: 1941-1953.
- 2 Eunhyun R, Son M, Lee M, et al. Cordycepin is a novel chemical suppressor of Epstein-Barr virus replication [J]. Oncoscience, 2014, 1: 866-881.
- 3 Olatunji OJ, Feng Y, Olatunji OO, et al. Cordycepin protects PC12 cells against 6-hydroxydopamine induced neurotoxicity via its antioxidant properties [J]. Biomed Pharmacother, 2016, 81: 7-14.
- 4 Khan MA, Tania M. Cordycepin in anticancer research: Molecular mechanism of therapeutic effects [J]. Curr Med Chem, 2019, 26: 1-12.
- 5 Yong TQ, Chen SD, Xie YZ, et al. Cordycepin, a characteristic bioactive constituent in *Cordyceps militaris*, ameliorates hyperuricemia through URAT1 in hyperuricemic mice [J]. Front Microbiol, 2018, 9: 58.
- 6 Wang XL, Xi DS, Mo J, et al. Cordycepin exhibits a suppressive effect on T cells through inhibiting TCR signaling cascade in CFA-induced inflammation mice model [J]. Immunopharm Immunot, 2020, 42: 119-127.
- 7 Chen LB, Wu GX, Cheng W, et al. Extraction, purification, and antitumor activity of cordycepin from *Cordyceps militaris* residue medium [J]. J Food Sci Tech (食品科学技术学报), 2016, 34: 73-79.
- 8 Zhang HC, Fan HT, Wang XJ, et al. Purification of cordycepin from fermentation broth of *Cordyceps militaris* by use of macroporous resin AB-8 and octadecyl bonded silica chromatography [J]. Mycosystema (菌物学报), 2015, 3: 490-498.