

# 基于代谢组学的瓦楞子及其伪品化学成分差异分析及细胞实验验证

王巧珍, 何 晗, 黄仕如, 陈力源, 刘友平, 陈鸿平, 陈 林\*

成都中医药大学药学院 西南中药资源国家重点实验室, 成都 611130

**摘要:** 分析瓦楞子及其伪品的主要化学成分及其差异, 验证差异化学成分药效作用。采用广泛靶向代谢组学技术检测瓦楞子及其伪品整体化学成分, 通过聚类分析(HCA)、主成分分析(PCA)及正交偏最小二乘方判别分析(OPLS-DA)找出差异化学成分, 结合细胞实验验证差异化学成分药效。共计检测出1208个代谢物, 包括氨基酸及其代谢物、苯及其衍生物、杂环化合物等22类。其中正品共有成分1083个, 正品中有而伪品中没有的成分40个。PCA结果显示不同基原正品之间可以被区分开, 正品与伪品密肋粗饰蚶可以被区分开; 差异代谢物分析发现, 在正品中显著上调的差异代谢物有67个。细胞实验结果表明差异代谢物N<sup>6</sup>-异戊烯基腺苷可促进人甲状腺癌细胞TPC-1的凋亡; 通过诱导S、G2期阻滞抑制细胞增殖。N<sup>6</sup>-异戊烯基腺苷可作为瓦楞子潜在的质量标志物。本研究为瓦楞子品质分析及质量控制提供技术支持。

**关键词:** 瓦楞子; 混伪品; 代谢组学; 化学成分差异; 人甲状腺癌细胞

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)6-0925-13

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.6.002

## Metabolomics-based analysis of chemical composition differences between *Arcae Concha* and counterfeit product and cell experimental verification

WANG Qiao-zhen, HE Han, HUANG Shi-ru, CHEN Li-yuan, LIU You-ping, CHEN Hong-ping, CHEN Lin\*

State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, Pharmacy College, School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611130, China

**Abstract:** To analyze the main chemical composition and their differences of *Arcae Concha* and counterfeit product, and verify the efficacy of chemical composition. Widely targeted metabolomics technology was used to analyze the overall chemical composition of *Arcae Concha* and counterfeit product, identifying differential chemical compositions by cluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA). The efficacy of differential chemical compositions was verified by cell experiments. A total of 1208 compounds were identified from the samples, including 22 categories such as amino acids and their metabolites, benzene and its derivatives, and heterocyclic compounds. 1083 common components were identified and 40 compounds in the genuine product but not in the fake product. The results of PCA showed that the different sources of the genuine products could be distinguished, the genuine products and counterfeit product could be distinguished; there were 67 differential metabolites that were significantly up-regulated in the genuine products. The results of cell test showed that N<sup>6</sup>-Isopentenyladenosine can promote the apoptosis of human thyroid cancer cell line (TPC-1); through inducing S and G2 phase arrest to inhibit proliferation. N<sup>6</sup>-Isopentenyladenosine is expected to be a potential quality marker of *Arcae Concha*. This study provides technical support for quality analysis and control of *Arcae Concha*.

**Key words:** *Arcae Concha*; counterfeit product; metabolomics; differential chemical compositions; TPC-1

瓦楞子为蚶科动物毛蚶 *Arca subcrenata* Lischke、泥蚶 *Arca granosa* Linnaeus 或魁蚶 *Arca inflata*

Reeve 的贝壳, 为常用海洋贝类中药, 具有消痰化痰, 软坚散结, 制酸止痛的功效<sup>[1]</sup>。瓦楞子在临床上被广泛用于胃食管反流<sup>[2]</sup>、急性胃溃疡<sup>[3]</sup>、慢性胃炎<sup>[4]</sup>、胃痞<sup>[5]</sup>等胃系疾病的治疗; 以及甲状腺癌<sup>[6]</sup>、甲状腺结节<sup>[7]</sup>、肿瘤<sup>[8,9]</sup>、溃疡性结肠炎<sup>[10]</sup>、

收稿日期: 2023-02-16

接受日期: 2023-03-15

基金项目: 国家中医药管理局应用基础研究课题 (gzyjc20210901)

\* 通信作者 Tel: 86-28-61800076; E-mail: chenlin@cdutcm.edu.cn

高血压<sup>[11,12]</sup>等疾病的治疗。

瓦楞子为多基原药材,其混伪品也较多,主要有密肋粗饰蚶、结蚶、舟蚶、球蚶、异毛蚶等<sup>[13]</sup>。同其他贝类中药一样,瓦楞子化学成分由无机和有机两大类成分组成<sup>[14]</sup>。无机类成分主要为以碳酸钙为主的无机盐和微量无机元素,《中华人民共和国药典》2020年版一部规定其碳酸钙( $\text{CaCO}_3$ )含量不得少于93.0%。有机质成分主要以蛋白质、氨基酸、多糖等为主,有机成分一般占壳干重0.3%~5.0%左右<sup>[15,16]</sup>。由于其有机成分含量低、结构复杂,囿于研究方法和思路的限制,贝类中药整体药效物质基础研究较为薄弱,导致现行贝类中药质量标准缺少专属性鉴别及功效性成分含量测定方法,难以评价其内在质量。采用现代研究方法对其有机成分进行系统鉴定与解析,是阐明其物质基础,提升其质量标准的前提和基础。本研究采用整合了非靶向(四级杆飞行时间质谱, QTOF)和广泛靶向代谢物检测技术(利用多反应监测模式定量, multiple reaction monitoring, MRM)优点的 TM 广泛靶向代谢组学技术,该技术将非靶(高分辨、广覆盖)与广靶(高灵敏、精定量)结合,适合复杂样本的分析。中药品种鉴定是中药质量控制的关键,代谢组学技术可应用于代谢信息相似的中药质量控制<sup>[17]</sup>,近年来代谢组学技术广泛应用于中药质量比较研究<sup>[18,19]</sup>。因此本研究采用广靶技术对瓦楞子及其伪品密肋粗饰蚶代谢成分进行全面解析,明确其差异代谢物,寻找其潜在质量标志物。研究表明瓦楞子治疗甲状腺癌效果明显<sup>[6,7,20]</sup>。本研究选择与其传统功效相关的人甲状腺癌细胞 TPC-1 细胞株探究部分差异代谢物的药效作用,为瓦楞子药效物质基础及质量标准提升研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验药物

$\text{N}^6$ -异戊烯基腺苷(购自成都千红科技有限公司,批号 S18169,纯度 98%);6- $\beta$ -羟基睾酮、环脯-酪氨酸(购自成都隆豪生物科技有限公司,纯度均为

98%,批号分别为 CY12563、CY20814)。

### 1.2 细胞

人甲状腺癌细胞株 TPC-1(细胞株编号 CL-0643)购自武汉普诺赛生命科技有限公司,细胞株用含 10% 胎牛血清,1% 双抗的 RPMI-1640 培养液,置于 37 °C、5%  $\text{CO}_2$ ,饱和湿度的培养箱中培养。

### 1.3 试剂

甲醇、乙腈(色谱纯,美国 Merck 公司);甲酸(色谱纯,美国 Aladdin 公司);水(超纯水);醋酸(分析纯,成都市科隆化学品有限公司);胰酶细胞消化液、胎牛血清、PBS 缓冲液(Biosharp,批号分别为 700904500、2106044、2138268);青霉素-链霉素双抗溶液(美国 HyClone 公司,批号 J190033);噻唑蓝(安耐吉生物,批号 EQ9RED6D);二甲基亚砜(Sigma,细胞级,批号 SHBK2703);细胞周期与凋亡检测试剂盒、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为 C1052、C1062M)。

### 1.4 主要仪器

超高效液相色谱(ExionLC AD)、四级杆飞行时间质谱(Triple TOF 6600, AB SCIEX)、串联质谱(QTRAP<sup>®</sup>)(美国 SCIEX 公司);色谱柱(Acquity HSS T3, 2.1 mm × 100 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ )、色谱柱(Waters Acquity UPLC HSS T3  $\text{C}_{18}$ , 2.1 mm × 100 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ );HCB-1300V 洁净工作台、HCP-168 二氧化碳培养箱(青岛海尔生物医疗股份有限公司);GR85DA 高压灭菌锅(美国 Zealway Instrument Inc);3001 酶标仪(Thermo Fisher Scientific Oy);CytoFLEX 流式细胞仪(Beckman coulter)。

### 1.5 样品

#### 1.5.1 样品收集

本实验共收集到 12 批次样品,经成都中医药大学药学院卢先明教授鉴定为蚶科动物毛蚶 *Arca subcrenata* Lischke、泥蚶 *Arca granosa* Linnaeus、魁蚶 *Arca inflata* Reeve、密肋粗饰蚶 *Arca crebricostata* Reeve 的贝壳。样品信息见表 1。

表 1 样品信息

Table 1 Sample information

基原 Origin	编号 Number	产地 Produce area	收集时间 Collection time
毛蚶 <i>Arca subcrenata</i> Lischke	MH1	浙江宁波余姚	2020.12.07
	MH2	广东江门	2020.11.28

续表 1 (Continued Tab. 1)

基原 Origin	编号 Number	产地 Produce area	收集时间 Collection time
毛蚶 <i>Arca subcrenata</i> Lischke	MH3	山东淄博	2020.06.04
泥蚶 <i>Arca granosa</i> Linnaeus	NH1	福建宁德霞浦县	2020.12.01
	NH2	福建厦门	2020.11.18
	NH3	福建福州马尾区	2020.12.21
魁蚶 <i>Arca inflata</i> Reeve	KH1	山东威海	2020.11.08
	KH2	辽宁旅大	2022.03.02
	KH3	山东青岛	2022.03.02
密肋粗饰蚶 <i>Arca crebricostata</i> Reeve	MLCSH1	广西玉林	2020.04.29
	MLCSH2	浙江	2022.03.08
	MLCSH3	浙江	2022.03.08

### 1.5.2 样品制备

取样品粉末(过五号筛),加至6倍量10%醋酸溶液中(将样品粉末少量多次加入到醋酸溶液中,过程中会产生大量气泡,应避免损失),室温下磁力搅拌过夜,离心取上清,冷冻干燥,得冻干粉。

从-80℃冰箱中取出样本放冰上解冻(后续所有操作都在冰上进行);在液氮环境下将样本研磨均匀,称取样本20 mg(±1 mg)到对应编号的离心管中;加入70%甲醇水内标提取液400 μL,1 500 r/min 振荡5 min,冰上静置15 min;在4℃条件下,12 000 r/min 离心10 min,移取上清液300 μL到另一对应编号离心管中,-20℃冰箱中静置30 min;在4℃条件下,12 000 r/min 再离心3 min,移取上清液200 μL到对应进样瓶内衬管中,用于上机分析。

## 1.6 方法

### 1.6.1 非靶向检测采集条件

流动相:A相为超纯水(0.1%的甲酸),B相为乙腈(0.1%的甲酸);洗脱梯度:0~10.0 min,5% B;10.0~11.0 min,5%→90% B;11.0~11.1 min,90%→5% B;11.1~14.0 min,5% B;柱温40℃;流速0.35 mL/min;进样量5 μL;

质谱采集条件主要包括:电喷雾离子源(ESI)温度为500℃,质谱电压5 500 V(正离子模式)/-4 500 V(负离子模式),离子源气体I(GS I),气体II(GS II)和气帘气(CUR)分别设置为50、50。

### 1.6.2 广泛靶向检测采集条件

流动相:A相为超纯水(0.1%的甲酸),B相为乙腈(0.1%的甲酸);洗脱梯度:0~11.0 min,5% B;11.1~12.0 min,5%→90% B;12.0~12.1 min,

90%→5% B,12.1~14.0 min,5% B;流速0.35 mL/min;柱温40℃;进样量2 μL。

质谱采集条件主要包括:电喷雾离子源(ESI)温度为500℃,质谱电压5 500 V(正离子模式)/-4 500 V(负离子模式),离子源气体I(GS I),气体II(GS II)和气帘气(CUR)分别设置为50、50和25 psi,碰撞诱导电离(CAD)参数设置为高。在三重四极杆中,每个离子对是根据优化的去簇电压(DP)和碰撞能(CE)进行扫描检测。

### 1.6.3 代谢物定性定量原理

所有样本提取液等量混合,进行LC-QTOF-MS/MS实验,基于自建靶向标品数据库MWDB(含二级谱、保留时间(retention time, RT))和迈维整合公共数据库MHK数据库(包含Metin、HMDB、KEGG数据库信息,含二级谱、RT)以及MetDNA进行准确定性,并提取出鉴定代谢物的多离子对信息及保留时间RT,结合迈维自建靶标数据库,同时在Q-Trap进行群体样本的精确定量。

代谢物定量是利用三重四极杆质谱的MRM分析完成。MRM模式中,第一重四极杆首先筛选目标物质的前体离子(母离子),排除掉其他物质对应的前体离子以初步排除干扰;前体离子在第二重四极杆中经碰撞诱导电离后被打碎,并依据物质自身的结构特征断裂形成一系列该物质特有的碎片离子,碎片离子再通过第三重四极杆过滤选择出一个典型的特征碎片离子,排除非目标离子的干扰,使定量更为精确,重复性更好。在获得不同样本的液质下机数据后,对所有代谢物的提取离子色谱峰分别进行峰下面积积分,并对其中同一代谢物在不同标本中

的色谱峰进行积分校正。

#### 1.6.4 细胞增殖实验

将对数生长期 TPC-1 细胞以每孔 4 000 个细胞接种于 96 孔板。待细胞贴壁后,每孔加入不同浓度  $N^6$ -异戊烯基腺苷、6- $\beta$ -羟基睾酮、环脯-酪氨酸培养液 100  $\mu$ L,每组设 5 个平行孔,培养 24、48 h 后,加入配制好的 MTT(5 mg/mL)试剂 20  $\mu$ L/孔,在培养箱中继续孵育 4 h,吸去培养上清液后加入 150  $\mu$ L/孔 DMSO,放置于摇床上低速避光振荡 10 min,使结晶物充分溶解。用酶标仪测定 570 nm 处每孔的 OD 值。按如下公式计算细胞增殖抑制率。

$$\text{细胞增殖抑制率} = (OD_{\text{空白}} - OD_{\text{实验}}) / OD_{\text{空白}} \times 100\%$$

式中,  $OD_{\text{空白}}$  为空白组(含有细胞的培养基、MTT、不含药物)吸光度,  $OD_{\text{实验}}$  为实验组(含有细胞的培养基、MTT、不同浓度的药物)吸光度。

#### 1.6.5 流式细胞术检测细胞凋亡

将对数生长期 TPC-1 细胞以每孔  $5 \times 10^4$  个细胞接种于六孔板,培养 24 h 后按照  $N^6$ -异戊烯基腺苷四个浓度 2.25、4.5、6.75、9  $\mu$ mol/L 加入培养液 2 mL/孔,继续培养 48 h,消化、重悬细胞。按照说明书,每管加入 195  $\mu$ L 的 Annexin V-FITC 结合液轻轻悬浮细胞,加 5  $\mu$ L 的 Annexin V-FITC 混匀后,再加入 10  $\mu$ L 的 PI 轻轻混匀,并在室温下避光孵育 5 ~ 15 min,使用流式细胞仪进行检测。

#### 1.6.6 流式细胞术检测细胞周期

将对数生长期 TPC-1 细胞以每孔  $1 \times 10^5$  个细胞接种于六孔板,培养 24 h 后按照  $N^6$ -异戊烯基腺苷四个浓度 3、6、9、12  $\mu$ mol/L 加入培养液 2 mL,继续培养 24 h,用不含 EDTA 的胰酶消化细胞,1 000 g 离心 3 min,细胞沉淀用预冷 PBS 洗 2 次,离心后弃上清,细胞沉淀缓慢加入 1 mL 预冷 70% 乙醇,4 度

固定过夜。离心后弃上清,用预冷 1 mL PBS 重悬细胞后离心,弃上清,按照试剂盒说明书,每管细胞样品中加入 0.5 mL 碘化丙啶染色液,充分重悬细胞,37  $^{\circ}$ C 避光温裕 30 min。随后冰浴避光存放,上机检测。

#### 1.6.7 统计学方法

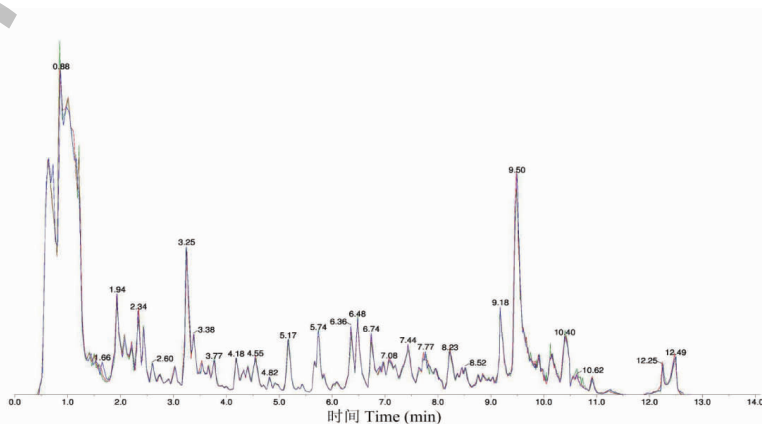
对所有样本的代谢数据进行多元统计主成分分析(PCA),正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)以评估组内和组间样本的代谢物多样性,来筛选组间差异代谢产物,分析前对数据进行标准化处理。建立了两个重要差异代谢物的筛选标准:差异倍数(fold change, FC)  $\geq 2$  或  $\leq 0.5$ ;以及 OPLS-DA 模型中投影的可变重要性(VIP)  $\geq 1$ ,则认为差异显著。对应用筛选标准鉴定得到的差异代谢物的原始相对含量按行采用标准化处理,通过 R 软件(<https://www.r-project.org>)绘制聚类热图对代谢物进行可视化。

细胞实验数据采用 SPSS23.0 软件进行单因素方差分析,以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,对方差齐性进行检验,方差齐,采用 LSD 检验。 $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同基原瓦楞子及其伪品密肋粗饰蚶中的代谢产物

代谢物检测分析过程中分为正离子和负离子模式进行检测,并对混样质控(quality control, QC)样本的总离子流图(total ion chromatogram, TIC)进行重叠(见图 1a、1b),并绘制了 MRM 代谢物检测多峰图(多物质提取的离子流图谱,见图 2a、2b)。QC 样本质谱峰的保留时间和峰强度均一致,曲线重叠性高,表明质谱对同一样品不同时间检测时,信号稳定性好,同时仪器的高稳定性为数据的重复性和可靠



续图 1(Continued Fig.1)

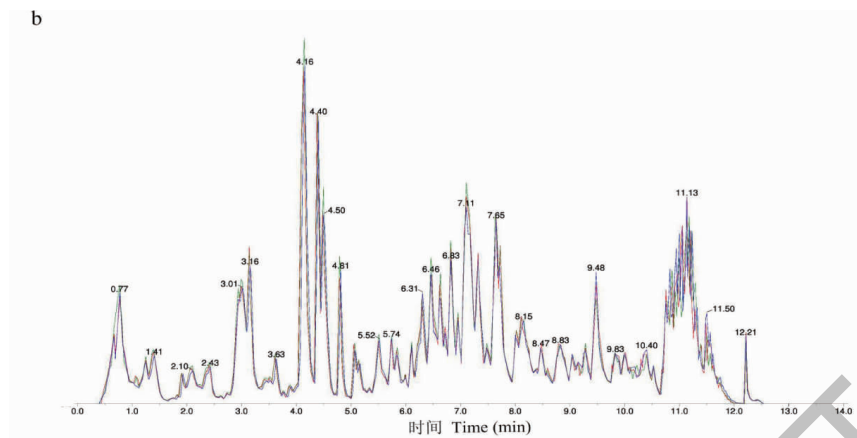


图 1 QC 样本总离子流重叠图

Fig. 1 Overlapped TIC of mixed quality control

注:a:正离子模式;b:负离子模式。Note:a:Positive ion mode;b:Negative ion mode.

性提供了重要的保障(见图 1)。不同基原瓦楞子及其伪品密肋粗饰蚶中合计检测到 1 208 个代谢物,

其中毛蚶中检测到 1 196 个,泥蚶中检测到 1 174 个,魁蚶中检测出 1154 个,密肋粗饰蚶中检测到

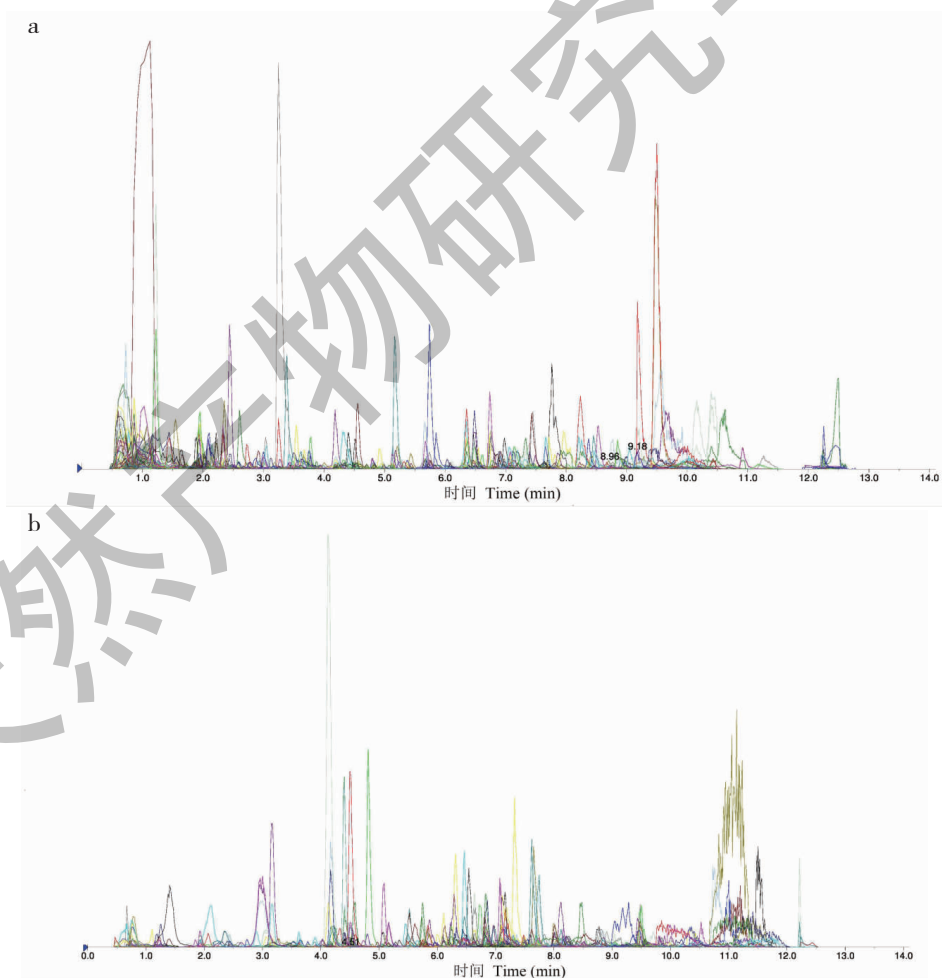


图 2 MRM 成分检测多峰图

Fig. 2 MRM multimodal plots of component detection

注:a:正离子模式;b:负离子模式。Note:a:Positive ion mode;b:Negative ion mode.

1 141 个。比对出的代谢物种类如表 2 所示,包括氨基酸及其代谢物,苯及其衍生物,杂环化合物,有机酸及其衍生物,醛、酮、酯类,核苷酸及其代谢物等 22 类。其中包括 *L*-谷氨酸、己酰甘氨酸、环(甘氨酸-谷氨酸)等 237 个氨基酸及其代谢产物,苯乙醛酸、3-苯氧基苯甲酸等 189 个苯及其衍生物,法尼基硫代水杨酸、HC-毒素等 161 个杂环化合物,2-羟基-

4-甲基戊酸、3-羟基十四烷酸等 145 个有机酸及其衍生物,反式脱氢松香酮、9-芴酮等 73 个醛、酮、酯类化合物, $N^6$ -异戊烯基腺苷、腺苷等 72 个核苷酸及其代谢物。如图 3 所示,正伪品中共有成分 1 083 个,3 基原正品中共有而伪品没有的成分 40 个,毛蚶中独有而其他 3 样本中没有的成分有 9 个。正伪品主体有机成分相同,但也存在差异性成分。

表 2 瓦楞子及其伪品密肋粗饰蚶中检测到的代谢物类别及数量

Table 2 Classification and number of the detected metabolites in Arcae Concha and MLCSH

代谢物种类 Classification of the detected metabolites	数量 Number
氨基酸及其代谢物 Amino acid and its metabolites	237
苯及其衍生物 Benzene and substituted derivatives	189
杂环化合物 Amino acid and its metabolites	161
有机酸及其衍生物 Organic acid and its derivatives	145
醛、酮、酯类 Aldehyde, ketones, esters	73
核苷酸及其代谢物 Nucleotide and its metabolites	72
脂肪酰类 Fatty acyl	69
醇、胺类 Alcohol and amines	66
碳水化合物及其代谢物 Carbohydrates and its metabolites	41
甘油磷脂类 Glycerophospholipids	27
激素及激素相关物质 Hormones and hormone related compounds	27
生物碱 Alkaloids	19
辅酶和维生素 CoEnzyme and vitamins	14
黄酮类 Flavonoids	11
萜类 Terpenoids	9
鞘脂类 Sphingolipids	7
木脂素和香豆素 Lignans and coumarins	6
胆汁酸 Bile acids	3
色胺、胆碱、色素 Tryptamines, cholines, pigments	2
甘油脂类 Glycerolipids	2
类固醇 Steroids	1
其他 Others	27

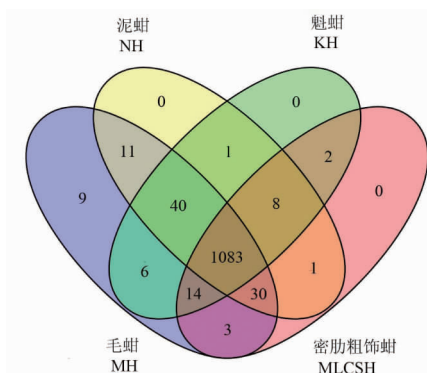


图 3 瓦楞子及其伪品密肋粗饰蚶代谢物比较韦恩图

Fig. 3 Venn diagram for differential metabolite comparison of Arcae Concha and MLCSH



## 2.2 主成分分析

主成分分析(PCA)是一种无监督的模式识别方法,通过将原有的复杂数据进行降维处理,可有效地找出数据中最主要的信息。采用PCA模式识别不同基原瓦楞子、正伪品代谢物的差异,所得PCA得分图(见图4)。每个样本的三个生物学重复都聚集

在一起,表明组内样本之间几乎没有变化,实验是可重复和可靠的。正伪品之间,第一主成分和第二主成分共同解释了样品之间58.67%的差异,同时也在正伪品间有明显的规律,正伪品样本明显分离,表明它们之间的代谢表型存在显著差异。

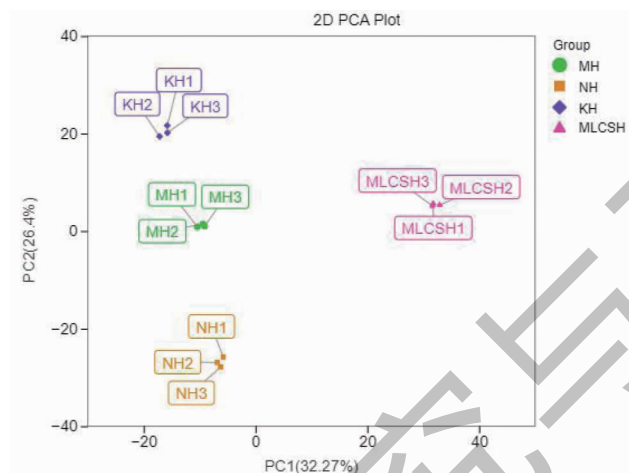


图4 瓦楞子及其伪品密肋粗饰蚶 PCA 得分图

Fig. 4 PCA Score plot of Arcae Concha and MLCSH

## 2.3 聚类分析

代谢物含量数据采用 unit variance scaling (UV) 进行标准化处理,通过R软件对代谢物在不同样本间的累积模式进行聚类分析(hierarchical cluster analysis, HCA)。从图5可知,不同基原瓦楞子及其

伪品密肋粗饰蚶各自聚为一类且被明显分为4个区域,3基原正品聚为一类,伪品聚为一类,表明不同基原瓦楞子及其伪品密肋粗饰蚶之间化学成分差异显著,所建立的广靶代谢组学方法可良好地表征各部位的化学特征。

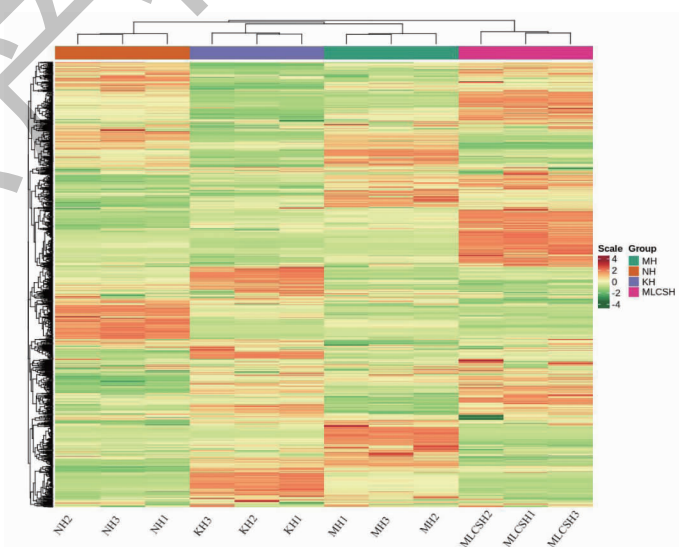


图5 瓦楞子及其伪品密肋粗饰蚶代谢物的热图分析

Fig. 5 Hetmap of compounds of Arcae Concha and MLCSH

注:纵轴表示代谢物组分,横轴表示不同样本;红色表示代谢物相对量高,绿色表示相对量低。Note: The vertical axis represents metabolite components, and the horizontal axis represents different samples; Red indicates high relative metabolite levels, and blue indicates low relative metabolite levels

## 2.4 差异代谢物分析

在 OPLS-DA 分析中,  $Q^2$  是一个重要的参数, 若数值大于 0.9, 则可以反映该模型的可靠性与稳定性。其中 MLCSH 与 MH 的  $R^2X = 0.774$ 、 $R^2Y = 1$ 、 $Q^2 = 0.988$ , MLCSH 与 NH 的  $R^2X = 0.767$ 、 $R^2Y = 1$ 、 $Q^2 = 0.987$ , MLCSH 与 KH 的  $R^2X = 0.764$ 、 $R^2Y = 1$ 、 $Q^2 = 0.984$ , 模型拟合效果较好, 证明该模型可以用以下一步的差异代谢物分析。

结合 OPLS-DA 模型的 FC 和 VIP 值筛选各对照组的差异代谢物, 筛选条件为 FC 值  $\geq 2$  或者  $\leq 0.5$  和 VIP 值  $\geq 1$ 。结果表明 MLCSH 和 MH 之间有 410 个显著不同的代谢产物, 其中 224 个上调, 186 个下调。MLCSH 和 NH 之间有 398 个显著不同的代谢产物, 其中 177 个上调, 221 个下调。MLCSH 和 KH 之间有 440 个显著不同的代谢产物, 其中 182 个上调, 258 个下调。3 种基原瓦楞子与伪品比较共有 167 个差异代谢物, 包括氨基酸及其代谢物 44 个、

苯及其衍生物 27 个、杂环化合物 27 个、醛、酮、酯类 14 个、激素及激素相关物质 8 个、核苷酸及其代谢物 8 个、有机酸及其衍生物 7 个、醇、胺类 6 个、生物碱 6 个、甘油磷脂类 5 个、碳水化合物及其代谢物 3 个、它类 3 个、萜类 2 个、辅酶和维生素 2 个、色胺、胆碱、色素类 1 个、木脂素和香豆素 1 个、黄酮类化合物 1 个、胆汁酸 1 个、脂肪酰类 1 个, 结果如图 6a、6b 及表 3 所示。通过对 167 个差异代谢物进行分析, 67 个代谢物在 3 种基原正品中均表现为上调, 其中 3 个基原正品中独有而伪品中没有的物质有 40 个, 具体信息见表 4。79 个代谢物在 3 种基原正品中表现为下调; 21 个代谢物在部分正品样本中表现为上调, 在部分正品样本中则表现为下调。通过文献查阅, 选择具有生物活性且在正品中显著上调的差异代谢物  $N^6$ -异戊烯基腺苷、6- $\beta$ -羟基睾酮、环脯-酪氨酸进行细胞验证实验, 以期挖掘瓦楞子药效物质。

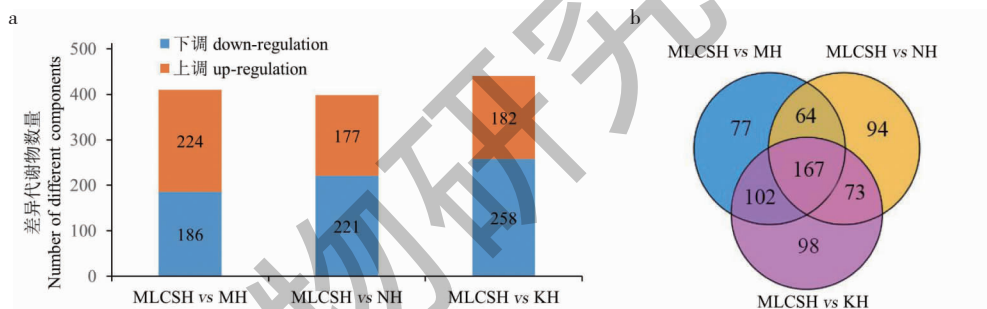


图 6 不同基原瓦楞子及其伪品密肋粗饰蚶差异代谢物数量及韦恩图

Fig. 6 Number of differential metabolites and Venn diagram of three species of Arcae Concha and MLCSH

表 3 瓦楞子及其伪品密肋粗饰蚶差异代谢物种类及数量

Table 3 Classification and number of the differential metabolites between Arcae Concha and MLCSH

代谢物种类 Classification of the detected metabolites	数量 Number
氨基酸及其代谢物 Amino acid and its metabolites	44
苯及其衍生物 Benzene and substituted derivatives	27
杂环化合物 Amino acid and its metabolites	27
醛、酮、酯类 Aldehyde, ketones, esters	14
激素及激素相关物质 Hormones and hormone related compounds	8
核苷酸及其代谢物 Nucleotide and its metabolites	8
有机酸及其衍生物 Organic acid and its derivatives	7
醇、胺类 Alcohol and amines	6
生物碱类 Alkaloids	6
甘油磷脂类 Glycerophospholipids	5
碳水化合物及其代谢物 Carbohydrates and its metabolites	3



续表 3 (Continued Tab. 3)

代谢物种类 Classification of the detected metabolites	数量 Number
萜类 Terpenoids	2
辅酶和维生素 CoEnzyme and vitamins	2
色胺、胆碱、色素类 Tryptamines, cholines, pigments	1
木脂素和香豆素类 Lignans and coumarins	1
黄酮类 Flavonoids	1
胆汁酸类 Bile acids	1
脂肪酰类 Fatty acyl	1
其他类 Others	3

表 4 仅在正品中检测到的 40 个成分具体信息

Table 4 Specific information on 40 ingredients that detected only in genuine products

序号 No.	分子式 Molecular formula	化合物 Compound	分类 Classification	准分子离子 Quasi-molecular ion	离子模式 Ion mode	二级质谱 Secondary mass spectrum
1	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O	阿卡他定 Alcaftadine	杂环化合物	308.176 3	[M + H] <sup>+</sup>	195.094 9
2	C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	10,11-二甲氧基马钱子碱 Brucine	杂环化合物	395.187 6	[M + H] <sup>+</sup>	256.969 0
3	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub>	茉莉酸 Jasmonic acid	有机酸及其衍生物	209.100 0	[M-H] <sup>-</sup>	163.112 1
4	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub>	玉米赤霉酮 Zearalanone	醛、酮、酯	319.152 0	[M-H] <sup>-</sup>	237.149 2
5	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	紫杉二烯-5 $\alpha$ ,13 $\alpha$ -二醇 Taxa-4(20),11(12)-dien-5 $\alpha$ ,13 $\alpha$ -diol	杂环化合物	339.212 4	[M + Cl] <sup>-</sup>	293.213 0
6	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	二羟吲哚 Dioxindole	杂环化合物	148.000 0	[M-H] <sup>-</sup>	148.039 9
7	C <sub>35</sub> H <sub>49</sub> NO <sub>12</sub>	结乌头根碱 Jesaconitine	苯及其衍生物	674.319 8	[M-H] <sup>-</sup>	630.293 3
8	C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> O	$\alpha$ -紫罗兰酮 (E)- $\alpha$ -Ionone	醛、酮、酯	239.163 3	[M + HCOO + 2H] <sup>+</sup>	161.131 9
9	C <sub>32</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	银杏素 Ginkgetin	黄酮类化合物	565.114 1	[M-H] <sup>-</sup>	329.060 4
10	C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>	苯甲酸雌二醇 $\beta$ -Estradiol 3-benzoate	激素和激素相关化合物	359.196 5	[M + H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	240.231 4
11	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub> S	法尼基硫代水杨酸 Salirasib	杂环化合物	357.190 0	[M-H] <sup>-</sup>	339.178 6
12	C <sub>26</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>	17-安息香酸雄甾醇酮 Stanolone benzoate	激素和激素相关化合物	393.238 6	[M-H] <sup>-</sup>	201.124 1
13	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	对甲氧基苯甲酸 Anisic acid	苯及其衍生物	153.300 0	[M + H] <sup>+</sup>	109.200 0
14	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	大麻二醇酸 Cannabidiolic acid	苯及其衍生物	357.217 0	[M-H] <sup>-</sup>	227.134 1
15	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	HC-毒素 <i>Helminthosporium carbonum</i> toxin	杂环化合物	435.232 9	[M-H] <sup>-</sup>	271.227 6
16	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	12R-Hydroxy-5Z,8Z, 10E,14Z-eicosatetraenoic acid	脂肪酰类	355.211 2	[M + Cl] <sup>-</sup>	247.153 7
17	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> BrNO <sub>3</sub>	3-溴酪氨酸 3-Bromotyrosine	氨基酸及其代谢产物	260.000 0	[M + H] <sup>+</sup>	135.067 8

续表 4 (Continued Tab. 4)

序号 No.	分子式 Molecular formula	化合物 Compound	分类 Classification	准分子离子 Quasi-molecular ion	离子模式 Ion mode	二级质谱 Secondary mass spectrum
18	C <sub>33</sub> H <sub>33</sub> FO <sub>6</sub>	依他洛西 Etalocib	苯及其衍生物	543.229 3	[M-H] <sup>-</sup>	300.036 1
19	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	3,4-二甲基苯甲酸 3,4-Dimethylbenzoic acid	苯及其衍生物	149.100 0	[M-H] <sup>-</sup>	121.020 0
20	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>	4-吡哆酸 4-Pyridoxic acid	杂环化合物	184.100 0	[M+H] <sup>+</sup>	148.000 0
21	C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub>	N-3-苯基丙酰基甘氨酸 N-(3-Phenylpropionyl) glycine	氨基酸及其代谢产物	208.100 0	[M+H] <sup>+</sup>	105.069 9
22	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	盐酸奥西克利平 Oxyphenyclimine	杂环化合物	345.216 5	[M+H] <sup>+</sup>	228.138 6
23	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>	Testolactone	醛、酮、酯	344.221 7	[M+CH <sub>3</sub> CN+H] <sup>+</sup>	298.216 2
24	C <sub>22</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	嘧菌酯 Azoxystrobin	苯及其衍生物	402.104 3	[M-H] <sup>-</sup>	359.096 8
25	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	3,4-二羟基苯甲酸乙酯(安息香酸) Ethyl 3,4-dihydroxybenzoate (benzoic acid)	苯及其衍生物	181.000 0	[M-H] <sup>-</sup>	108.021 7
26	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	3-(4-羟基苯基)-1-丙醇 3-(4-Hydroxyphenyl)-1-propanol	有机酸及其衍生物	151.100 0	[M-H] <sup>-</sup>	107.051 1
27	C <sub>23</sub> H <sub>38</sub> O <sub>5</sub>	泰内酯 Tylactone	醛、酮、酯	415.245 0	[M+Na-2H] <sup>-</sup>	333.204 2
28	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>5</sub>	暗黄猪屎豆碱 Fulvine	杂环化合物	308.149 5	[M-H] <sup>-</sup>	221.154 1
29	C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	N <sup>6</sup> -异戊烯基腺苷 N <sup>6</sup> -Isopentenyladenosine	核苷酸及其代谢物	336.200 0	[M+H] <sup>+</sup>	136.060 8
30	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	N-乙酰基-D-色氨酸 N-AcetylTryptophan	氨基酸及其代谢产物	245.100 0	[M-H] <sup>-</sup>	74.024 5
31	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	前列腺素 A2 Prostaglandin A2	脂肪酰类	333.200 0	[M-H] <sup>-</sup>	333.204 4
32	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	Δ <sup>12</sup> -前列腺素 J2 Δ <sup>12</sup> -Prostaglandin J2	脂肪酰类	333.200 0	[M-H] <sup>-</sup>	333.204 4
33	C <sub>35</sub> H <sub>36</sub> MgN <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	3-羟乙基叶绿素 A 3-Hydroxyethylchlorophyllide a	杂环化合物	631.254 2	[M-H] <sup>-</sup>	175.055 2
34	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> OS	N-羟基-2-(1-H-咪唑-3-基)乙硫酰胺 Indolylmethylthiohydroximate	杂环化合物	225.054 9	[M+F] <sup>-</sup>	210.031 2
35	C <sub>44</sub> H <sub>56</sub> N <sub>4</sub> O <sub>16</sub>	前咕啉 6Y Precorrin 6Y	杂环化合物	879.355 9	[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	799.383 9
36	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>5</sub>	积雪草酸 Asiatic acid	有机酸及其衍生物	487.341 9	[M-H] <sup>-</sup>	237.144 4
37	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	13-(2-甲基巴豆酰基)氧化羽扇豆碱 13-(2-Methylcrotonoyl) oxylupanine	生物碱	345.219 6	[M-H] <sup>-</sup>	187.098 6
38	C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> FO <sub>3</sub>	6α-Fluoropregn-4-ene-3, 11, 20-trione	醛、酮、酯	345.191 6	[M-H] <sup>-</sup>	187.097 0
39	C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> NO <sub>7</sub> P	LPE(17:1/0:0)	甘油磷脂类	466.300 0	[M+H] <sup>+</sup>	325.274 1
40	C <sub>26</sub> H <sub>21</sub> F <sub>6</sub> NO <sub>5</sub>	氟丙菊酯 Acrinathrin	苯及其衍生物	542.140 6	[M+H] <sup>+</sup>	270.088 5

## 2.5 差异代谢物对 TPC-1 细胞增殖的抑制作用

如图 7a 所示,6-β-羟基甾酮组和环脯-酪氨酸组在 200、100、50、25、12.5 μmol/L 浓度下作用 24 h 对 TPC-1 细胞的增殖未呈现浓度依赖性,平均抑制率分别为-2.65%、3.22%。如图 7b 所示,N<sup>6</sup>-异戊烯基腺苷在 1.56、3.12、6.25、12.5、25 μmol/L 浓度下对 TPC-1 细胞具有较好增殖抑制作用,且呈浓度依

赖性。作用 24 h、48 h 的 IC<sub>50</sub> 均为 4.56 μmol/L。

## 2.6 N<sup>6</sup>-异戊烯基腺苷对 TPC-1 细胞凋亡的影响

为了进一步了解 N<sup>6</sup>-异戊烯基腺苷对 TPC-1 增殖的影响,对细胞进行 Annexin V-FITC/PI 双染,用流式细胞仪检测 N<sup>6</sup>-异戊烯基腺苷对细胞凋亡的诱导作用。由图 8a、8b 可知,N<sup>6</sup>-异戊烯基腺苷对 TPC-1 细胞具有明显诱导凋亡的作用,并且随着药

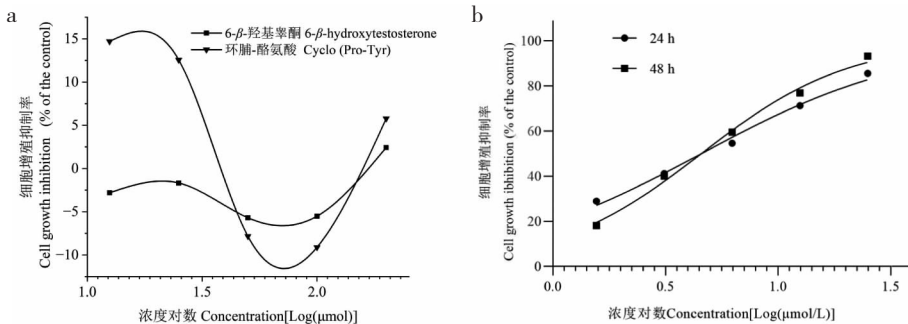


图7 6-β-羟基睾酮、环脯-酪氨酸、N<sup>6</sup>-异戊烯基腺苷对细胞增殖的影响

Fig. 7 The effect of 6-β-hydroxytestosterone, cyclo(Pro-Tyr), N<sup>6</sup>-isopentenyladenosine on cell proliferation

物浓度的递增,细胞凋亡率增多。当 N<sup>6</sup>-异戊烯基腺苷的作用浓度分别为 0、2.25、4.5、6.75、9 μmol/L 时,TPC-1 细胞的凋亡率为 (6.64 ± 1.46)%、

(13.05 ± 1.33)%、(18.59 ± 4.3)%、(29.51 ± 4.22)% 及 (51.35 ± 4.58)%。

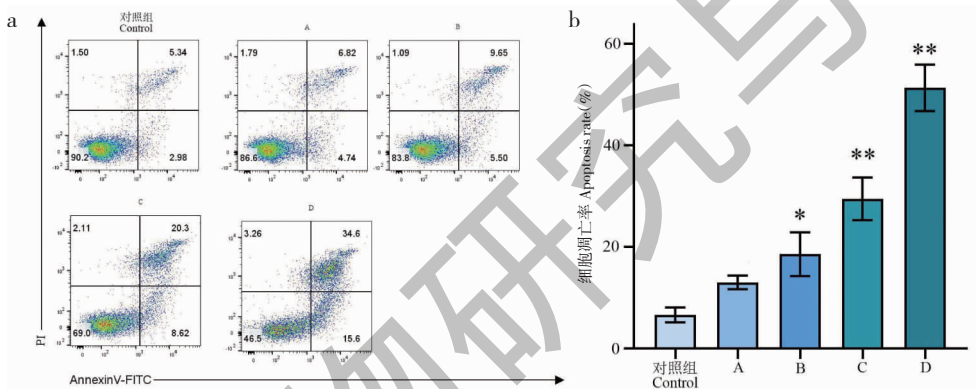


图8 N<sup>6</sup>-异戊烯基腺苷对细胞凋亡的影响 (n = 3)

Fig. 8 The effect of N<sup>6</sup>-isopentenyladenosine on cell apoptosis (n = 3)

注:A~D代表给药浓度为2.25、4.5、6.75、9 μmol/L。与对照组(0 μmol/L)相比,\*P<0.05,\*\*P<0.01。Note:A-D represent the dose concentration is 2.25, 4.5, 6.75, 9 μmol/L. Compared with the control group (0 μmol/L), \*P<0.05, \*\*P<0.01.

### 2.7 N<sup>6</sup>-异戊烯基腺苷对 TPC-1 细胞周期的影响

为了探究抑制 N<sup>6</sup>-异戊烯基腺苷对 TPC-1 增殖

的作用机制,利用流式细胞仪进一步检测 N<sup>6</sup>-异戊烯基腺苷对细胞周期变化的影响。由图 9a、9b 可

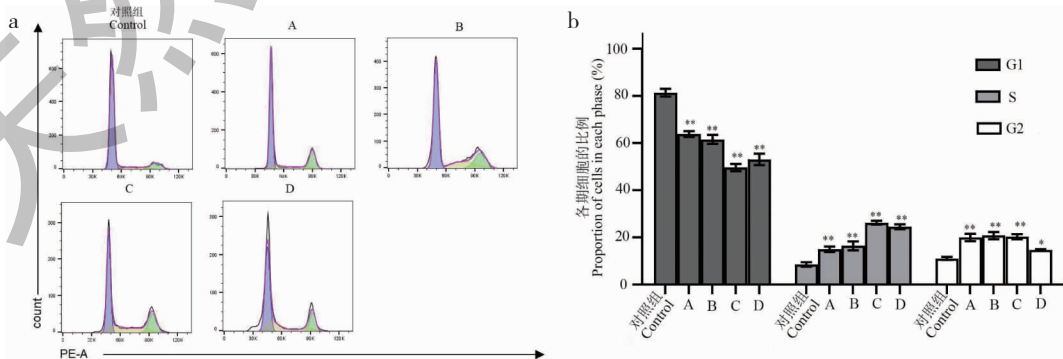


图9 N<sup>6</sup>-异戊烯基腺苷对细胞周期的影响 (n = 3)

Fig. 9 The effect of N<sup>6</sup>-isopentenyladenosine on cell cycle (n = 3)

注:A~D代表给药浓度为3、6、9、12 μmol/L,与对照组(0 μmol/L)相比,\*P<0.05,\*\*P<0.01。Note:A-D represent the dose concentration is 3, 6, 9, 12 μmol/L. Compared with the control group (0 μmol/L), \*P<0.05, \*\*P<0.01.

知, N<sup>6</sup>-异戊烯基腺苷对 TPC-1 周期变化有明显影响, 随着药物浓度增大, G1 期细胞显著减少, S 期及 G2 期细胞显著增加。当 N<sup>6</sup>-异戊烯基腺苷的作用浓度分别为 0、3、6、9、12 μmol/L 时, S 期分别为 (8.52 ± 0.98)%、(14.93 ± 1.16)%、(16.43 ± 1.88)%、(26.23 ± 0.8)%、(24.5 ± 1.06)%。G2 期分别为 (11.07 ± 0.61)%、(19.97 ± 1.59)%、(20.77 ± 1.55)%、(20.3 ± 1.11)%、(14.67 ± 0.4)%。表明 N<sup>6</sup>-异戊烯基腺苷可阻滞细胞于 S、G2 期, 从而延长细胞周期, 抑制细胞增殖。

### 3 讨论与结论

瓦楞子药效物质基础及其作用机制研究薄弱, 本研究首次采用广靶代谢组学技术对瓦楞子及其伪品中的代谢成分进行了全面的解析, 检测出 22 类共 1 208 个代谢物。主要包括氨基酸及其代谢物、苯及其衍生物、杂环化合物、有机酸及其衍生物、醛、酮、酯类、核苷酸及其代谢物等, 初步阐明了其物质基础。

课题组前期对瓦楞子及其混伪品进行了碳酸钙含量、水煎液 Ca<sup>2+</sup> 含量、水溶性浸出物含量、水浸液 pH 值及总氨基酸含量等传统指标的比较, 结果无显著性差异; 又采用差热分析、X 射线衍射和 X 射线荧光进行系统的比较分析, 结果仍无显著性差异<sup>[13]</sup>。本研究对其正伪品代谢成分进行分析, 其中共有代谢成分 1 083 个, 差异代谢物 167 个, 表明各样本主体有机成分相同, 但也存在差异, PCA 及聚类热图表明, 3 种正品基原样本可聚为一类, 伪品单独聚为一类, 表明广靶代谢分析方法对于贝类中药的正伪鉴定有很好的参考价值。

本实验检出核苷酸及其代谢物 72 个, 包括 N<sup>6</sup>-异戊烯基腺苷、腺苷等, 核苷类物质在动物药发挥其药效时有着重要作用。现代研究表明核苷类成分具有舒张支气管平滑肌、抗组胺、平喘、抗菌、抗血小板聚集、镇静中枢神经和抗惊厥等作用<sup>[21-23]</sup>。其中 N<sup>6</sup>-异戊烯基腺苷是一种潜在的新兴抗癌药物<sup>[24]</sup>。研究表明, 10 μmol/L N<sup>6</sup>-异戊烯基腺苷处理后, 8 种人类上皮癌细胞系中的克隆形成活性被完全抑制<sup>[25]</sup>。腺苷可以抑制胃癌 MGC-803 细胞的增殖, 并且促进凋亡, 而内质网应激可能参与了腺苷引起的凋亡<sup>[26]</sup>。细胞验证实验表明 N<sup>6</sup>-异戊烯基腺苷可促进细胞凋亡, 亦可通过将细胞周期阻滞在 S、G2 期, 抑制细胞增殖。且 N<sup>6</sup>-异戊烯基腺苷在正品显著上调, 有望作为区分瓦楞子正伪品的潜在质量标

志物。表明核苷类物质可能是瓦楞子“消痰化痰, 软坚散结”药效物质基础的重要组成部分。

本实验检出氨基酸及其代谢物 237 个, 其中小肽 134 个, 包括 12 个环二肽 (CDPs)。现代研究表明 CDPs 具有普遍的生物活性, 且有较强的抗肿瘤作用, 对多种癌细胞的生长具有抑制作用<sup>[27]</sup>。细胞增殖实验表明环脯-酪氨酸对 TPC-1 细胞无明显的增殖抑制作用, 后续应进行进一步探究。

正品中有而伪品中没有的代谢物 40 个, 其中苯甲酸雌二醇对乳腺癌的发生具有抑制作用, 其作用机制与对雌激素受体 ER $\alpha$  和 ER $\beta$  的调节有关<sup>[28]</sup>, HC-毒素对人乳腺癌 T47D 细胞有显著的抗增殖作用<sup>[29]</sup>, 法尼基硫代水杨酸是一种 RAS 和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 抑制剂, 能够抑制肿瘤细胞生长和增殖<sup>[30]</sup>。这 3 个物质有望作为瓦楞子潜在质量标志物。

由于贝壳类中药研究基础薄弱, 缺少对照品与数据库, 造成了其物质定性困难。在差异代谢物分析时发现, 有部分代谢物, 如银杏素、积雪草酸等主要存在于植物中的成分, 关于其真正来源, 值得进一步探讨。后续应对检测到的成分与对照品进行确证, 以提高定性准确性。

### 参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 72.
- 2 Tian YZ. Based on data mining analysis and summary of professor XIE Jingri's medication rules in the treatment of gastroesophageal reflux disease [D]. Haerbin: Heilongjiang University of Chinese Medicine (黑龙江中医药大学), 2021.
- 3 Fang H, Yan YF, Tao MB, et al. Comparative study on the protective effect of Concha Arcae and different processed products on acute gastric ulcer in rats [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med (中药药理与临床), 2018, 34: 116-121.
- 4 Gao LY, Liu XJ, Zhang Y, et al. Data analysis of Dr. ZHOU Hengde's experience in treating chronic gastritis [J]. Zhejiang J Integr Tradit Chin West Med (浙江中西医结合杂志), 2020, 30: 609-611.
- 5 Ren Y. Discussion on the medication rule of professor Mi Ziliang in the treatment of distention and fullness based on the traditional Chinese medicine inheritance support system [D]. Huhehaote: Inner Mongolia Medical University (内蒙古医科大学), 2020.
- 6 Chen R. Jiakun's Five methods of differentiation and treat-

- ment of thyroid cancer[J]. Chin Community Doct(中国社区医师),2012,28:19.
- 7 Zhang MX, Wang ZM, Li YN. Clinical application of the Ru-anjian decoction[J]. Chin Med Mod Distance Educ China(中国中医药现代远程教育),2019,17:87-88.
- 8 Zhou Y, Zhang S, Chen XP, et al. Deng Zhongjia's experience in using drugs to treat tumors[J]. Beijing J Tradit Chin Med(北京中医药),2010,29:836-837.
- 9 Wei MC, Lin J, Yi JC, et al. Medication rules of anti-tumor formulas containing marine Chinese medicinals[J]. Beijing Univ Tradit Chin Med(北京中医药大学学报),2018,41:253-258.
- 10 Ding H, Wang LL, Xiao JS, et al. Treatment of ulcerative colitis with Walengzi powder and mesalazine[J]. Acta Chin Med(中医学报),2018,33:2436-2440.
- 11 Peng QQ, Hong Y, Liao GH. Experimental study of six testacean TCM on the mechanism of "calming the liver and suppressing yang" in rats with hypertension of hyperactivity of liver yang[J]. J Emerg Tradit Chin Med(中国中医急症),2014,23:1016-1018.
- 12 Sheng YK, Zhang J, Hong Y, et al. Mechanism study on the antihypertensive effect of crude *Ostreae Concha*, *Haliotidis Concha* and *Arcae Concha* and their calcined products on rats with hypertension of liver-yang hyperactivity type[J]. New Chin Med(新中医),2019,51:5-9.
- 13 Tao MB. Study on processing technology and processing mechanism of *Arcae Concha*[D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine(成都中医药大学),2018.
- 14 Yang L, Liu YP, Wei Z, et al. Research progress of the shell medicinal material of crude *Ostreae Concha*, *Haliotidis Concha* and *Margaritifera Concha*[J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药),2013,24:2990-2992.
- 15 Jiang GL, Chen L, Liu Y. Organic substrates and biomineralization of shell[J]. Mar Sci(海洋科学),2002,26:16-18.
- 16 Hu H. Organic substrates in mollusk shells and shell biomineralization[J]. Jiangsu Salt Sci Technol(苏盐科技),2005,1:18-19.
- 17 Li J, Zuo TT, Zhang CX, et al. Simultaneous profiling and holistic comparison of the metabolomes among the flower buds of *Panax ginseng*, *Panax quinquefolius*, and *Panax notoginseng* by UHPLC/IM-QTOF-HDMSE-based metabolomics analysis[J]. Molecules,2019,24:2188.
- 18 Han Y, Xu YD, Kong M, et al. Quality evaluation of *Cuscuta australis* R. B and *Cuscuta japonica* Choisy by UPLC-QTOF-MS/MS based metabolomics approach[J]. Chin Wild Plant Res(中国野生植物资源),2022,41:1-9.
- 19 Han XJ, Yu DQ, Shan YT, et al. UPLC-Q-TOF-MS-Based metabolomics analysis of chemicals from cultivated *Ganoderma lucidum* in Huoshan[J]. Mod Chin Med(中国现代中药),2021,23:280-285.
- 20 Peng QQ, Hong Y, Liao GH. Experimental study of six testacean TCM "endometriosis" role on goiter model rats[J]. J Zhejiang Univ Tradit Chin Med(浙江中医药大学学报),2013,37:1429-1432.
- 21 Li T, Mo XL, Liu YJ, et al. Study on improvement of quality standard of cicada slough[J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊),2019,37:1151-1154.
- 22 Li SW, Hao EW, Du ZC, et al. Research progress on chemical components and pharmacological effects of *Pheretima aspergillum* and predictive analysis on quality marker[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2022,53:2560-2571.
- 23 Ge Q, Wan JQ, Zhu YL, et al. Qualitative and quantitative analysis of nucleoside components in *Cordyceps cicadae* by LC-MS and HPLC[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2019,31:1857-1863.
- 24 Bifulco M, Malfitano A M, Proto M C, et al. Biological and pharmacological roles of N<sup>6</sup>-isopentenyladenosine: an emerging anticancer drug[J]. Anticancer Agents Med Chem,2008,8:200-204.
- 25 Spinola M, Colombo F, Falvella F S, et al. N<sup>6</sup>-isopentenyladenosine: a potential therapeutic agent for a variety of epithelial cancers[J]. Int J Cancer,2007,120:2744-2748.
- 26 Gao WQ, Liu Q, Zhou Y, et al. Effects of adenosine on proliferation and apoptosis in human gastric cancer cell line MGC-803[J]. J Pract Clin Med(实用临床医药杂志),2016,20:44-47.
- 27 Qiang W, Mei G. Research progress on antitumor activity of fungal cyclic dipeptides and their derivatives[J]. China Pharm(中国药房),2014,25:2007-2010.
- 28 Kim S, Kang J, Jang D, et al. Differential gene expression in estradiol-3-benzoate-treated liver and chemically-induced hepatocellular carcinoma[J]. J Microbiol Biotechnol,2004,14:1286-1294.
- 29 Joung KE, Kim DK, Sheen YY. Antiproliferative effect of trichostatin A and HC-toxin in T47D human breast cancer cells[J]. Arch Pharm Res,2004,27:640-645.
- 30 Yue W, Wang J, Li Y, et al. Farnesylthiosalicylic acid blocks mammalian target of rapamycin signaling in breast cancer cells[J]. Int J Cancer,2005,117:746-754.