

土牛膝醇提物提取工艺优化及体外抗人肺腺癌 A549 细胞活性研究

刘婉[†], 曾慧聪[†], 唐杏,
李思瞳, 欧缘, 赵琳淼, 刘文珍, 汪美凤^{*}

湖南科技学院 湖南省生物质资源综合利用工程技术研究中心, 永州 425199

摘要: 土牛膝是应用广泛的药用植物, 其功效众多, 为研究其醇提物抗癌功效, 采用 Box-Behnken 响应面法优化土牛膝的醇提工艺, 并对醇提物进行体外人肺腺癌 A549 细胞毒性及细胞划痕试验。获得了最佳提取工艺为: 提取温度 90 °C, 液料比 40:1, 提取时间 2 h, 在此条件下, 土牛膝醇提物提取率为 9.23%。细胞毒性试验结果显示, 随着醇提物浓度的上升, A549 细胞的存活率迅速下降, 当醇提物浓度为 256 μg/mL 时, 对 A549 细胞的抑制率达 94.65%, 且细胞划痕结果显示醇提物对 A549 细胞迁移有一定抑制作用, 可为研究土牛膝药用特性提供参考。

关键词: 土牛膝; 醇提物; 抗癌活性; 人肺腺癌 A549 细胞

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)7-1191-08

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.7.010

Optimization of extraction technology of alcohol extract from *Achyranthes aspera* L. and its activity against human lung adenocarcinoma A549 cells *in vitro*

LIU Wan[†], ZENG Hui-cong[†], TANG Xing,
LI Si-tong, OU Yuan, ZHAO Lin-miao, LIU Wen-zhen, WANG Mei-feng^{*}

Hunan Engineering Technology Research Center for Comprehensive Development and Utilization of Biomass Resources, Hunan University of Science and Engineering, Yongzhou 425199, China

Abstract: *Achyranthes aspera* L. is a widely used medicinal plant with many effects. In order to study the anti-cancer effect of its alcohol extract, the alcohol extraction process from *A. aspera* was optimized by Box-Behnken response surface method, and the cytotoxicity and cell scratch test of human lung cancer A549 cells were carried out *in vitro*. The optimum extraction conditions were as follows: extraction temperature 90 °C, liquid-solid ratio 40:1, extraction time 2 h. Under these conditions, the extraction rate of alcohol extract from *A. aspera* was 9.23%. The results of cytotoxicity test showed that the survival rate of A549 cells decreased rapidly with the increase of alcohol extract concentration. When the concentration of alcohol extract was 256 μg/mL, the inhibition rate of A549 cells was 94.65%. The cell scratch results showed that alcohol extract had a certain inhibitory effect on the migration of A549 cells, which can provide a reference for the study of the medicinal properties from *A. aspera*.

Key words: *Achyranthes aspera* L.; alcohol extract; anticancer activity; human lung adenocarcinoma A549 cell

土牛膝 (*Achyranthes aspera* L.), 别名倒扣草, 具有败毒抗癌、逐瘀除痹、消炎利尿之效, 为我国西南

苗族、瑶族、壮族、傣族、彝族等多个少数民族常用的药材^[1-3]。土牛膝中含有以齐墩果酸为母核的三萜皂苷类成分, 水解产物齐墩果酸具有抗氧化、消炎、抗动脉粥样硬化等生物活性^[4-9]。因土牛膝具有降糖、抗菌及镇痛抗炎^[10-12]等功能特性, 使其在医药方面表现出独特的应用价值, 具有广阔的发展前景, 因此研究土牛膝的活性成分及功能特性具有重要意义。

收稿日期: 2022-11-21 接受日期: 2023-04-11

基金项目: 国家级大学生创新创业训练计划 (202210551007); 湖南科技学院科学研究项目 (20XKY071); 湖南神农国油茶产业科技创新创业团队 (湘人才发[2022]9号)

[†] 共同第一作者

^{*} 通信作者 Tel: 86-746-6381164; E-mail: wmf0713@163.com

前人已从土牛膝中分离鉴定了 58 种重要物质,其中已分离并获得的主要成分大多为多糖^[10,11],黄酮属^[12]、萜类^[13]、植物甾醇^[14-16]、皂甙类^[11,17]等,有抗炎^[11,12]、抗氧化^[14]、降血糖、抗菌^[18]等多种药用特性,使其在医药方面表现出广阔的发展前景。牛膝水提物及醇提物均具有良好的抗菌活性^[19,20],但尚未开展体外抗癌活性及临床作用机制研究。本研究拟采用乙醇回流法从土牛膝中提取土牛膝醇提物,在单因素的基础上,采用响应面优化提取工艺,以期找到一种高效并破坏性小的提取工艺,并在细胞水平上初步研究土牛膝醇提物对人肺腺癌 A549 细胞的影响,以期为土牛膝的利用和土牛膝醇提物的抗癌功能开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

土牛膝(湖南时代阳光药业股份有限公司);人肺腺癌 A549 细胞(上海钰博生物科技有限公司, YB73023L);噻唑蓝(MTT)、磷酸盐(PBS)缓冲液、胰蛋白酶-EDTA 消化液、青霉素-链霉素混合液(北京索莱宝科技有限公司,批号:715F0525、20210630、20210601、20210531);无水乙醇(安徽安特食品股份有限公司,2111073604);乙酸乙酯(天津博迪化工有限公司,20210309);石油醚(湖南汇虹试剂有限公司,20210812);二甲基亚砜(生工生物工程股份有限公司,A100231-0500);无水乙醇、乙酸乙酯、石油醚等均为分析纯;二甲基亚砜、噻唑蓝(MTT)等均为细胞培养级别。

1.2 仪器与设备

自动酶标比色仪(FC-357 型,赛默飞世尔仪器有限公司);恒温培养振荡箱(BPN-80CHC 型,上海恒科学仪器有限公司);紫外可见分光光度计(UV 2800 型,上海舜宇恒平科学仪器有限公司);循环水真空泵(SHZ-III,上海亚荣生化仪器厂);立式压力蒸汽灭菌锅(MLS-3750,SANYO Electric Co. Ltd.);电子天平(LE104E/O2,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);电热鼓风干燥箱(101-1AB,余姚市东方仪器有限公司);单人双面净化工作台(SW-CJ-1F,苏州净化);超纯水机(DZG-303A,上海砾鼎水处理设备有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 土牛膝醇提物的提取

土牛膝预处理,洗净,干燥并粉碎,进行脱脂处

理并过 100 目筛备用。准确称取过筛后的土牛膝粉末 5.0 g,以 60% 乙醇为提取液,液料比为 40:1,提取温度为 90 °C 冷凝回流提取 2 h,重复 3 次。65 °C 减压回收溶剂,加适当水分散,水分散液分别用石油醚、乙酸乙酯充分萃取,减压回收各萃取层溶剂^[18],进行旋转蒸发浓缩,脱色后真空干燥密封保存,试验平行 3 次。醇提物提取率计算公式如下。

$$\text{醇提物提取率} = (m/M) \times 100\% \quad (1)$$

式中: m 为醇提物质量(g); M 为原料重量(g)。

1.3.2 单因素试验设计

选择提取时间(1.5、2.0、2.5、3.0、4.0 h),提取温度(60、70、80、90、95 °C),液料比(10:1、20:1、30:1、40:1、50:1,mL/g)和乙醇浓度(50%、60%、70%、75%、80%)进行单因素试验。

1.3.3 Box-Behnken 试验设计

应用 Design-Expert 13 软件,进行 Box-Behnken 设计响应面试验,在单因素试验结果的基础上,以醇提物的提取率(Y)为响应值,对主要单因素:提取时间(A)、提取温度(B)、液料比(C)进行优化。每个实验重复三次。利用响应面实验结果筛选土牛膝醇提物的最佳提取工艺条件。

1.3.4 土牛膝醇提物抗癌活性的测定

1.3.4.1 土牛膝醇提物对 A549 细胞增殖的影响

MTT 法检测细胞活性^[21],取对数期生长的 A549 细胞,经 0.25% 胰酶消化后收集细胞并调整至需要的浓度。将细胞接种于 96 孔细胞培养板中(每孔 $3 \times 10^3 \sim 5 \times 10^3$ 个),置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度的 CO₂ 培养箱中无菌培养,培养 24 h,至细胞生长旺盛贴壁后,去掉原培养液。设定对照组和加药组,将上述培养好的 96 孔板,分别加上以上分组(8、16、32、64、128、256 μg/mL)实验用药,加样后分别继续培养 48 h,于实验结束前 4 h 吸去上清,加入 20 mL 5 g/L MTT,37 °C 孵育 4 h,吸尽上清。加入 200 μL 二甲基亚砜振荡 10 min,待沉淀溶解完全后用自动酶标比色仪在波长 490 nm 处读取吸光值(OD)^[11,22]。细胞抑制率计算公式如下。

$$\text{细胞抑制率} = (OD_{\text{对照}} - OD_{\text{加药}}) / OD_{\text{对照}} \times 100\% \quad (2)$$

1.3.4.2 土牛膝醇提物对 A549 细胞迁移的影响

用细胞划痕实验法检测^[23]。将细胞按 2×10^6 / mL 接种在 6 孔板中,每组设置 3 个复孔,加入 1640 完全培养基,置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。培养 24 h 至细胞汇合度 90% 至 100%,用无

菌 200 μL 枪头在 6 孔板每孔中进行划痕,并保证划痕细胞完全脱离。用 PBS 漂洗,加入对照组和实验组培养基(对照组为 1640 基础培养基,经预实验后实验组为土牛膝醇提物浓度是 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 1640 基础培养基),为每组设 3 个平行孔,培养 24 h 后,选取 0、24 h 在显微镜下拍照,采用 Image J 软件分析各组细胞不同时间段的照片,比较 A549 细胞细胞迁移的愈合率^[23-25]。每组试验平行 3 次。愈合率计算公式如下。

$$\text{愈合率} = (a-b)/a \times 100\% \quad (3)$$

式中, a :0 h 划痕宽度; b :培养 24 小时后划痕宽度

1.3.5 数据分析

使用计算机软件 Design-Expert 13 响应面分析软件和 SPSS 17.0 统计软件,采用 One-way ANOVA 和 LSD- t 检验。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 提取时间对土牛膝醇提物提取率的影响

由图 1 可知,提取时间在 1.5 ~ 2.0 h 范围内,提取率呈上升趋势,在 2.0 ~ 2.5 h 间提取率呈下降趋势,可能是随提取时间增加,提取物与其他物质发生反应或发生降解,导致提取率呈现下降趋势,但在 2.5 h 后提取率又有一定的上升,可能是部分醇提物成分与其他组分结合紧密,溶出速率较慢。综合提取效果及节约能耗考虑,土牛膝醇提物提取的最佳时间为 2.0 h。

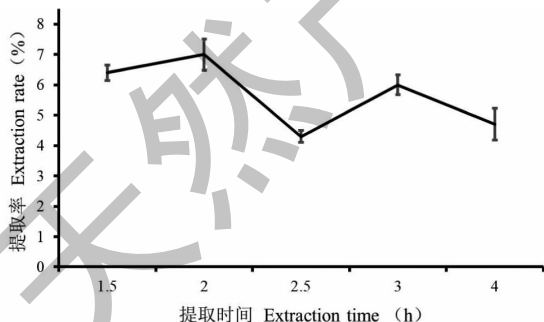


图 1 提取时间对土牛膝提取物提取率的影响

Fig. 1 Effect of extraction time on extraction rate of alcohol extract from *A. aspera*

2.1.2 提取温度对土牛膝醇提物提取率的影响

由图 2 可知,在一定时间范围内,提取温度在 60 ~ 90 $^{\circ}\text{C}$ 内,提取率呈上升趋势,在 90 $^{\circ}\text{C}$ 后提取率显著降低,可能随提取温度升高,提取物结构发生破

坏,导致提取率呈现下降趋势,当提取温度为 90 $^{\circ}\text{C}$ 时,提取率达到最大值,为 11.8%。因此土牛膝醇提物提取的最佳温度为 90 $^{\circ}\text{C}$ 。

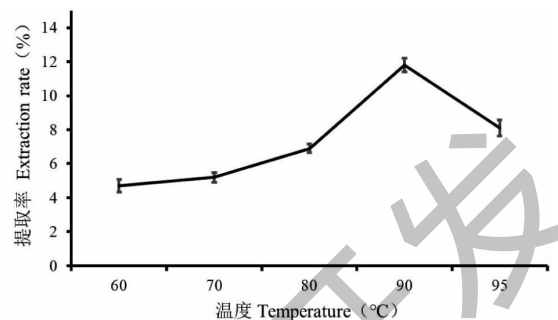


图 2 温度对土牛膝醇提物提取率的影响

Fig. 2 Effect of temperature on extraction rate of alcohol extract from *A. aspera*

2.1.3 液料比对土牛膝醇提物提取率的影响

由图 3 可知,在一定时间范围内,当液料比为 10:1 时,提取率达到较大值 14.1%,液料比在 10:1 至 30:1 范围内,提取率呈下降趋势,而液料比为 40:1 时,提取率较液料比 10:1 时增加 0.9%,可能是由于液料比的增加,乙醇的提取效能增加。从节约资源的角度考虑液料比的增加会造成溶剂的浪费,因此土牛膝醇提物提取的最佳液料比为 10:1。

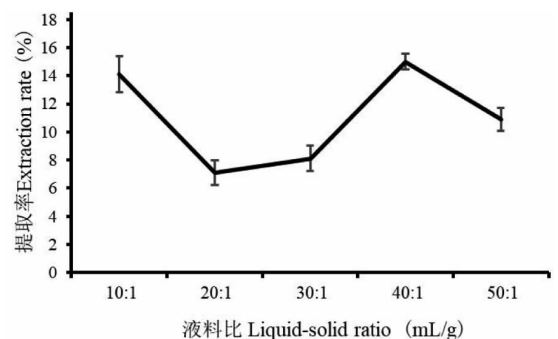


图 3 液料比对土牛膝醇提物提取率的影响

Fig. 3 Effect of Liquid-solid ratio on the extraction rate of alcohol extract from *A. aspera*

2.1.4 乙醇浓度对土牛膝醇提物提取率的影响

由图 4 可知,在一定时间范围内,乙醇浓度在 50% 至 60% 范围内,提取率呈上升趋势,在 60% 至 75% 间提取率显著降低,可能是因为提取物与乙醇的极性越相似,提取物溶出越多,当乙醇浓度为 60% 时,与提取物极性最相似,提取率达到最大值,为 11.9%,因此土牛膝醇提物提取的最佳乙醇浓度为 60%。

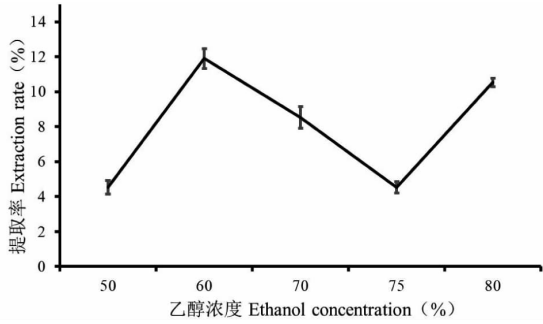


图4 乙醇浓度对土牛膝醇提物提取率的影响

Fig. 4 Effect of ethanol concentration on the extraction rate of alcohol extract from *A. aspera*

2.2 响应面实验设计和结果

以单因素结果为依据,细化因素水平根据 Box-Behnken 试验设计原理得到响应面试验因素设计水平(见表1)。

表1 土牛膝 Box-Behnken 的中心组合因素水平表

Table 1 Horizontal table of central combination factors of *A. aspera* Box-Behnken

水平 Level	因素 Factor		
	A: 提取时间 Extraction time (h)	B: 液料比 Liquid-solid ratio (mL/g)	C: 温度 Temperature (°C)
-1	1.5	30:1	80
0	2.0	40:1	90
1	2.5	50:1	95

响应面试验设计及结果见表2,根据响应面设计方案,对其进行方差分析,回归模型方差分析见表3^[26]。

2.3 模型建立与显著性分析

采用响应面法分析实验结果得到方差分析如表3所示,二次回归拟合方程如下。

$$Y = +9.23 + 0.42A + 0.35B - 0.43C - 0.50AB + 0.25AC - 1.00BC - 0.55A^2 - 1.49B^2 - 1.14C^2$$

表2 Box-Behnken 实验设计及其结果

Table 2 Box-Behnken experimental design and results

实验号 Test number	A	B	C	Y: 提取率 Extraction rate (%)
1	0	0	0	8.990 6
2	0	-1	-1	5.796 5
3	1	1	0	6.989 7
4	0	0	0	8.787 6
5	0	0	0	9.785 1
6	0	1	-1	8.591 7
7	-1	-1	0	6.393 1
8	0	0	0	9.188 4
9	1	0	1	8.387 3
10	0	0	0	9.391 5
11	-1	0	-1	7.191 1
12	-1	0	1	6.193 3
13	1	0	-1	8.387 3
14	-1	1	0	7.995 2
15	0	-1	1	6.592 9
16	0	1	1	5.392 1
17	1	-1	0	7.389 7

表3 响应面实验结果方差分析

Table 3 Response surface analysis of variance

来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值	Prob > F	显著性 Significance
模型 Model	26.80	9	2.98	9.06	0.004 1	**
A	1.43	1	1.43	4.35	0.075 4	-
B	0.98	1	0.98	2.98	0.128 2	-
C	1.45	1	1.45	4.40	0.074 1	-
AB	1.00	1	1.00	3.05	0.124 2	-
AC	0.25	1	0.25	0.76	0.412 9	-
BC	3.99	1	3.99	12.15	0.010 2	*
A ²	1.25	1	1.25	3.81	0.091 9	-
B ²	9.37	1	9.37	28.52	0.001 1	**
C ²	5.51	1	5.51	16.77	0.004 6	**

续表 3 (Continued Tab. 3)

来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值	Prob > F	显著性 Significance
残差 Residual	2.30	7	0.33	-	-	-
失拟项 Lack of fit	1.71	3	0.57	3.87	0.112 0	-
纯误差 Pure error	0.59	4	0.15	-	-	-
总差 Cor total	29.10	16	-	-	-	-

注: * 差异显著 ($P < 0.05$); ** 差异极显著 ($P < 0.01$)。

Note: * Significant difference ($P < 0.05$); ** Highly significant difference ($P < 0.01$).

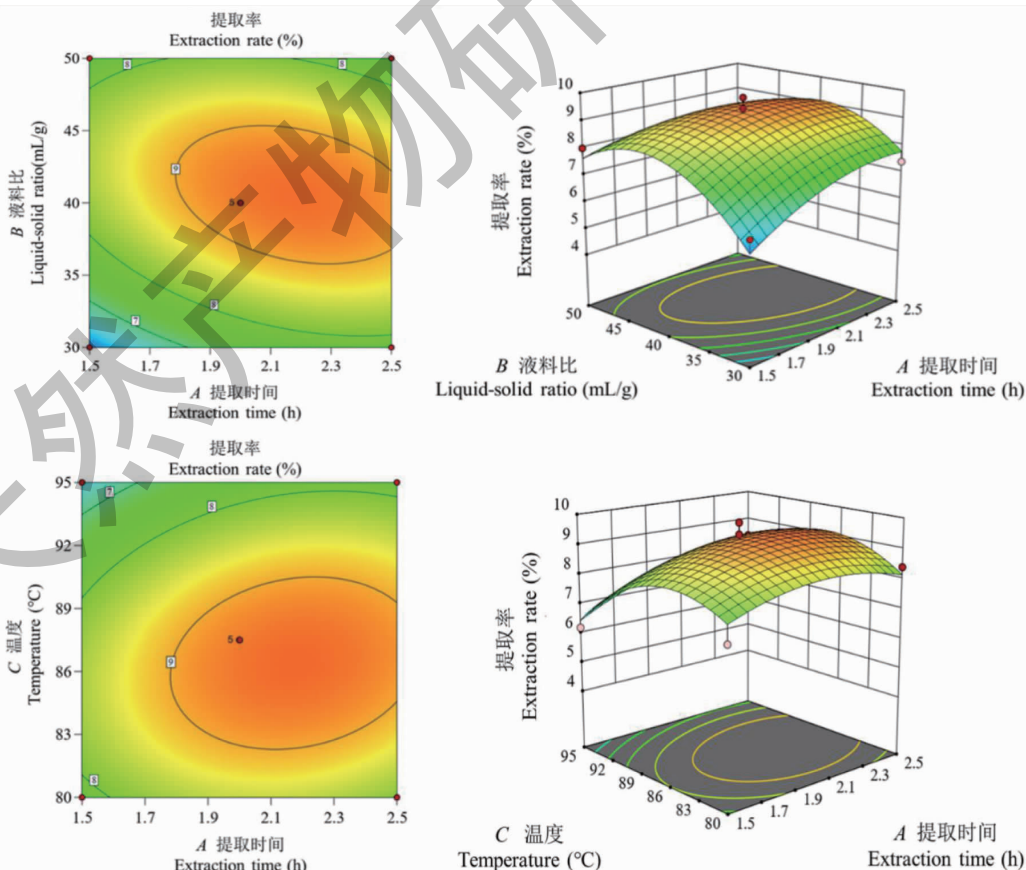
从表 3 可知,模型 $P = 0.004 1 < 0.01$,表明该模型极显著具有统计学意义;模型 $R^2 = 0.921 0$,说明响应值 (Y) 和自变量之间存在显著的相关关系。失拟项 $P = 0.112 0 > 0.05$,差异不显著,模型与实际实验值拟合较好,未知因素对模拟的结果干扰小,表明该回归模型可用于分析和预测乙醇回流提取土牛膝产物的效果^[26]。

2.4 响应面交互作用分析

采用响应面分析法对液料比与提取时间、温度与提取时间、液料比与温度三个相互作用项进行了分析,得到了三维曲面图和等高线图。响应面图能反映各因素之间的相互作用关系,曲线越陡,对响应

值的影响越大^[27-29];判断交互作用是否显著的关键是等高线的形状。圆形等高线表明两个因素之间的交互作用不显著,椭圆形等高线表明两个因素之间的交互作用显著。分析结果见图 5。

如图 5 所示,当土牛膝醇提物提取率在提取时间为 2.10 ~ 2.30 h,液料比为 40:1 ~ 43:1 mL/g,温度在 83 ~ 86 °C 之间时达到最大值,随着提取时间的增加,土牛膝醇提物的提取率先增加后减少,原因可能是长时间的回流使得部分有效成分如黄酮类物质发生降解,导致提取率降低。随着温度的升高,土牛膝醇提物的提取率先增加后减少,原因可能是由于高温破坏了土牛膝的部分有效成分,从而使提取率



续图 5 (Continued Fig. 5)

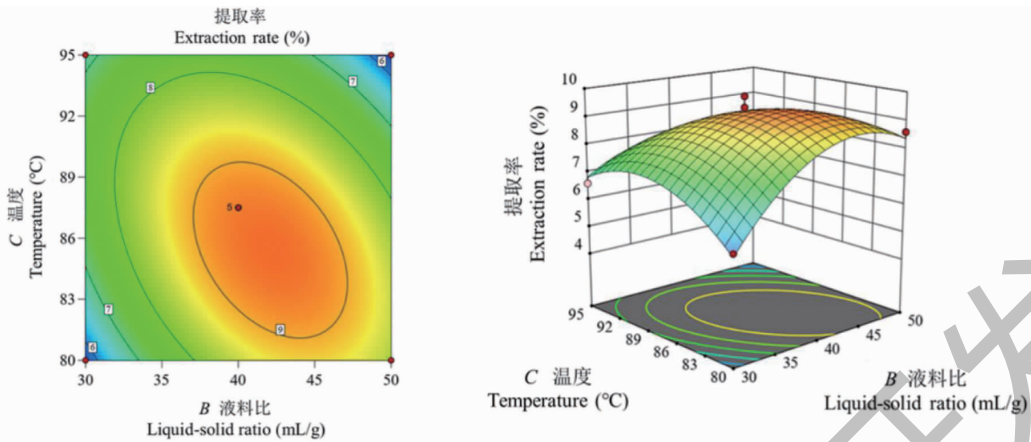


图5 因素间交互作用的响应面图和等高线图

Fig. 5 Response surface graphs and contour plots for the interaction among factors

降低。随着液料比的增大,土牛膝醇提物的提取率先增加后减少,说明在某个液料比时土牛膝的醇提取物大部分已经被提取出来。根据响应面、等高线图以及方差分析表可以看出温度是影响土牛膝醇提取物提取率的重要因素,且影响为温度 > 提取时间 > 液料比。

2.5 确定及验证最佳提取工艺

运用 Design-Expert 13 软件对实验模型进行分析,得出土牛膝醇提取物回流提取的最佳工艺条件为温度 85.84 °C、液料比 41.46:1、提取时间 2.14 h,土牛膝醇提取物提取率的理论预估值为 9.36%,考虑到实际操作情况,采用温度 90 °C、液料比 40:1、提取时间 2 h,在此条件下得到的土牛膝醇提取物提取率为 9.23%,与预测值 9.36% 相差不大,说明此条件较准确。

2.6 抗癌活性研究

2.6.1 土牛膝醇提取物对 A549 细胞增殖的影响

如表 4 所示,土牛膝醇提取物能够有效抑制 A549

表 4 土牛膝醇提取物对 A549 细胞生长状态的影响

Table 4 Effect of alcohol extract from *A. aspera* on the growth state of A549 cells

浓度 Concentration(μg/mL)	OD	抑制率 Inhibition rate(%)
0	2.20 ± 0.22	0
8	1.70 ± 0.23	19.85**
16	1.73 ± 0.09	23.06**
32	1.73 ± 0.05	21.36**
64	1.53 ± 0.06	30.27***
128	1.32 ± 0.03	39.6***
256	0.11 ± 0.01	94.65***

注:与空白对照组比较,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

Note:Compared with control,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$.

细胞增殖,并随着提取物含量的增加,对细胞的抑制作用也随之增强,呈现剂量正相关效应。当土牛膝提取物浓度为 256 μg/mL 时,抑制率最高(94.65%)。可见土牛膝醇提取物具有抑制癌细胞增殖的作用,有一定的抗癌效果。

2.6.2 土牛膝醇提取物对 A549 细胞迁移的影响

为进一步验证醇提取物对肺癌细胞迁移能力的影响,研究开展了细胞划痕实验,结果如表 5 所示。土牛膝醇提取物(2 μg/mL)干预 A549 细胞 24 h 后,与空白对照组比较,其划痕愈合率明显低于空白对照组($P < 0.001$),表明土牛膝醇提取物具有抑制癌细胞 A549 迁移的能力。

表 5 土牛膝醇提取物对 A549 细胞侵袭迁移能力的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of alcohol extract from *A. aspera* on the invasive migration ability of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别 Group	给药剂量 Dose(μg/mL)	愈合率 Rate of healing(%)
空白对照组 Control group	-	16.82 ± 1.94
实验组 Experimental group	2	0.25 ± 2.25***

注:与空白对照组比较,*** $P < 0.001$ 。

Note:Compared with control,*** $P < 0.001$.

3 讨论与结论

采用乙醇回流对土牛膝的活性物质进行提取,结合单因素实验及响应面优化确定提取土牛膝醇提取物的最佳工艺条件:温度 85.84 °C、液料比 41.46:1、提取时间 2.14 h,理论提取率预估值为 9.36%。考虑到实际操作情况,采用温度 90 °C、液料比 40:1、提取时间 2 h,在此条件下得到的土牛膝醇提取物提取率为 9.23%,与预测值 9.36% 相差较小。细胞毒性实验结果显示,随着醇提取物浓度的上升,A549 细

胞的存活率迅速下降,当醇提物浓度为 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,A549 细胞的抑制率达 94.65%,且醇提物对癌细胞的划痕愈合率明显低于空白对照组 ($P < 0.001$),表明土牛膝醇提物具有一定的抗癌活性。后续可结合气相色谱-质谱法(GC-MS)、高效液相色谱串联四级杆/飞行时间质谱法(HPLC-Q-TOF/MS)等技术对土牛膝醇提物的化学成分进行定性、定量研究,尝试建立完整的质量控制体系,同时,研究土牛膝醇提物对裸鼠 A549 肺癌细胞移植瘤模型的作用,进一步考察其抗癌机制。

参考文献

- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol IV (中华人民共和国药典:第四部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015:418.
- Hunan Food and Drug Administration. Hunan Standard for traditional Chinese Medicinal Materials (湖南省中药材标准) [M]. Changsha: Hunan Science and Technology Press, 2010:292.
- Wen Q, Fang L, Li RL, et al. Ethnical characteristics and research status of *Achyranthes aspera* [J]. Chin Pharm (中国药业), 2018, 27: 1-5.
- Xie Y, Li YH, Tang CY, et al. Determination of oleanolic acid in Houyanqing oral liquid by HPLC [J]. China Med Herald (中国医药导报), 2014, 11: 110-113.
- Zhang JJ, Lu WH, Shi XX, et al. Materia medica of *Achyranthes bidentata* [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国药研究), 1994, 5: 6-7.
- Meng YQ, Feng CQ, Zhang LF, et al. Synthesis and anti-tumor activity of oleanolic acid derivatives [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2015, 50: 469-474.
- Min BS, Kim YH, Lee SM, et al. Cytotoxic triterpenes from *Crataegus pinnatifida* [J]. Arch Pharm Res, 2000, 23: 155-158.
- Hu Y, He S, Wang Y. Progress in researches of the antibacterial effect of oleanolic acid [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2017, 26: 304-308.
- Hu L, Li RL, Wang XB, et al. Determination of oleanolic acid in *Achyranthes aspera* L. with different plant origins by HPLC [J]. J Pharm Res (药学研究), 2021, 40: 726-729.
- Wang XN, Jin BT, Zhao YR. Research progress on biological function of *Achyranthes bidentata* polysaccharides [J]. Guangdong Feed (广东饲料), 2012, 21: 34-35.
- Li WP, He LY, Ma ZL, et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of polysaccharides from *Radix Achyranthis Sylvestris* [J]. Chin Arch Tradit Chin Med (中华中医药学刊), 2012, 30: 747-749.
- Ouyang W, Luo YF, Li Z, et al. Study on the isolation, identification and content determination of anti-inflammatory components in Tunixu [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2020, 32: 1171-1181.
- He XR, Wang XX, Fang JC, et al. The genus *Achyranthes* a review on traditional uses, phytochemistry, and pharmacological activities [J]. J Ethnic Pharmacol, 2017, 203: 260-278.
- Tan JW, Zhang M, Lin LD, et al. Phytoecdysteroids from the roots of *Achyranthes bidentata* Blume [J]. Molecules, 2012, 17: 3324-32.
- Yang L, Jiang H, Yan ML, et al. A new phytoecdysteroid from the roots of *Achyranthes bidentata* Blume [J]. Nat Prod Res, 2017, 31: 1073-1079.
- Hu L, Fang L, Li RL, et al. Determination of β -ecdysterone in characteristic ethnic medicine *Achyranthes aspera* [J]. China Pharm (中国药师), 2020, 23: 1625-1627.
- Ou LL, Yu X, Zhang C, et al. Pharmacognostical Identification of *Achyranthes aspera* L. roots [J]. J Anhui Agric Sci (安徽农业科学), 2012, 40: 5204-5206.
- Luo YF, Ou YW, Tang DF, et al. Research progress of material basis and pharmacological effects of saponins and sterones in *Achyranthes* [J]. Mod Chin Med (中国现代中药), 2020, 22: 2122-2136.
- Shim SY, Lee M, Lee KD. *Achyranthes japonica* Nakai water extract suppresses binding of IgE antibody to cell surface Fc ϵ RI [J]. Prev Nutr Food Sci, 2016, 21: 323-329.
- Jung SM, Choi SI, Park SM, et al. Antimicrobial effect of *Achyranthes japonica* Nakai extracts against *Clostridium difficile* [J]. Korean J Food Sci Technol, 2007, 39: 564-568.
- Qiao PP, Tian YW, He Q, et al. Synthesis, structure and anti-cancer activity of binuclear polypyridine nickel complexes [J]. Chin J Inorg Chem (无机化学学报), 2021, 37: 1738-1744.
- Zhao P, Chen JM, Cao WB, et al. Role of TNF- α in promoting migration and invasion of colon cancer cells [J]. Tianjin Med J (天津医药), 2015, 43: 1368-1372.
- Fan LJ, Xiao QR, Lin KS, et al. Comparison of endothelial differentiation capacity of adipose-derived stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells from rats [J]. J South Med Univ (南方医科大学学报), 2016, 36: 1247-1254.
- Wu QE. Effect of the conditioned medium of hAMSCs on human fibroblasts [D]. Guilin: Guilin Medical University (桂林医学院), 2016.