

桦褐孔菌提取物抗乳腺癌活性部位筛选及成分分析

刘鑫¹, 侯若琳¹, 许凯强², 李佳欢², 林文雄², 郑明锋¹, 傅俊生^{*2}

(1. 福建农林大学 食品科学学院, 福建 福州 350002; 2. 福建农林大学 生命科学学院, 福建 福州 350002)

摘要: 以人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞筛选桦褐孔菌抗乳腺癌活性部位, 并对其活性部位的成分进行初步分析。采用 MTT 法检测发酵液不同萃取部位抗乳腺癌活性; 通过细胞形态观察进一步了解药物对细胞的影响; 划痕试验检测桦褐孔菌活性部位对细胞迁移的影响; 采用 LC-MS/MS 对活性部位的成分进行分析。结果表明, 桦褐孔菌石油醚萃取部位对 MDA-MB-231 细胞增殖的抑制作用最强, 且呈量效和时效关系, 作用 24 h 的 IC_{50} 值为 76.17 $\mu\text{g/mL}$; 细胞形态观察显示石油醚萃取部位对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的凋亡作用随着药物质量浓度的升高而加强; 划痕实验显示, 药物对细胞迁移有较强的抑制作用; LC-MS/MS 数据初步表征了其中的 14 个化学成分, 初步鉴定了其中的 10 种成分, 这 10 种成分首次从桦褐孔菌中得到鉴定, 虽然其他 4 个物质未能鉴定, 但亦对其相对分子质量和分子式进行了初步表征。证实了石油醚部位是桦褐孔菌抗乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的主要活性部位, 能抑制乳腺癌细胞增殖并诱导细胞凋亡, 为进一步开发利用桦褐孔菌食药资源提供科学依据。

关键词: 桦褐孔菌; 细胞凋亡; MDA-MB-231 细胞; 液相色谱-质谱/质谱联用 (LC-MS/MS)

中图分类号: R 285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2018)12-1266-06

Screening of Anti-Breast Cancer Active Fractions in *Inonotus obliquus* and Its Component Analysis

LIU Xin¹, HOU Ruolin¹, XU Kaiqiang², LI Jiahuan², LIN Wenxiong²,
ZHANG Mingfeng¹, FU Junsheng^{*2}

(1. College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: To achieve this study, MTT assay is used to measure the anti-breast cancer activity in different extracts from *Inonotus obliquus*; Change of cellular morphology is observed as the apoptosis detection; Cell scratch test is used to determine the effect of drug on cell migration; LC-MS/MS is used to analyze the active constituents in drug. MTT shows that the petroleum ether extract fraction has the strongest cell growth inhibitory effect on MDA-MB-231 cells in a dose and time dependent manner ($P < 0.05$); the IC_{50} value for 24 hours is 76.17 $\mu\text{g/mL}$. Cell morphology observation shows

收稿日期: 2016-01-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(81503187); 福建省中青年教育科研项目(JA15177); 福建农林大学现代种业工程研究院建设经费; 福建省重大农技推广服务试点项目(KNJ-153011-4); 福建省食用菌产业技术重大研发平台项目(2014N2001)。

* 通信作者: 傅俊生(1981—), 男, 福建福州人, 理学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事食药真菌功效物质分析与药效机理方面的研究。E-mail: fujunsheng81@163.com

引用本文: 刘鑫, 侯若琳, 许凯强, 等. 桦褐孔菌提取物抗乳腺癌活性部位筛选及成分分析[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(12): 1266-1271.

that apoptosis effect of petroleum ether extract fraction is increased in MDA-MB-231 cells in a dose manner. Scratch test shows that the petroleum ether extract fraction has a significant inhibitory effect on cell migration. LC-MS/MS data preliminarily characterizes 14 chemical components, of which 10 components are firstly identified in *Inonotus obliquus*. Although the other 4 substances have not been identified, the molecular weight and molecular formula have been characterized. The petroleum ether extract fraction is considered as the main anti-breast cancer active fraction of *Inonotus obliquus*. It can inhibit the growth of MDA-MB-231 cells and induce apoptosis, which provided the scientific basis for further development and utilization of the food and medicinal resources of *Inonotus obliquus*.

Keywords: *Inonotus obliquus*, apoptosis, MDA-MB-231 cells, LC-MS/MS

桦褐孔菌 *Inonotus obliquus* 属于担子菌门纤孔菌属 *Inonotus*^[1], 是一种寄生在白桦、榆树、银桦等树种上的白腐菌^[2]。其主要分布于俄罗斯北部、北欧、日本北海道以及我国长白山和大兴安岭等北纬 40~50°的地区^[3]。它是一种药用真菌, 广泛用于预防和治疗肝病、糖尿病、心脏病、胃病等疾病, 且无明显的毒副作用^[4]。随着国内外对桦褐孔菌的深入研究, 发现桦褐孔菌提取物具有多种生物活性, 主要有抗癌^[5-7]、抗氧化^[8-9]、增强免疫力^[10-11]、降血糖^[12]、抗病毒^[13]和抗炎^[14], 尤其是抗肿瘤方面表现出良好的活性。王文娟^[15]等研究发现, 桦褐孔菌水提醇沉物对人肝癌细胞的增殖抑制作用优于其他萃取物; Zhao^[16]等研究发现, 桦褐孔菌对宫颈癌 HeLa 细胞有明显的抑制增殖和诱导凋亡作用。

为了进一步寻找桦褐孔菌抗乳腺癌的活性部位, 作者选取具有高转移能力的恶性乳腺癌 MDA-MB-231 作为细胞模型, 研究了桦褐孔菌提取物不同溶剂萃取部位抗乳腺癌活性, 并采用 LC-MS/MS 初步分析其主要活性部位的化学成分, 为开发利用桦褐孔菌食药资源提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞: 赛百慷生物技术股份有限公司; 桦褐孔菌子实体: 长白山保护开发区福生园参茸有限公司; 石油醚、乙醇、乙酸乙酯、二甲基亚砜 (DMSO)、正丁醇: 国药集团化学试剂有限公司; 胎牛血清 (FBS): 杭州四季青生物工程有限公司; MTT: Sigma 公司; RPMI-1640 培养基: Gibco 公司; 其余试剂为分析纯。

1.2 仪器与设备

KH3200B 型超声波清洗器: 昆山禾创超声仪器有限公司; 高速万能粉碎机: 天津市泰斯特仪器有限公司; N-1000 v-W 型旋转蒸发器: 瑞士 Büchi 公司; 酶标仪: 美国 Bio-Rad 公司; ST16 R 型离心机: 美国 Thermo 公司; MCO-15AC 型 CO₂ 培养箱: 日本三洋公司; XDS-3 型倒置生物显微镜: 意大利 Optika 公司; LTQ XL 型 LC-MS/MS: 美国 Thermo 公司。

1.3 方法

1.3.1 提取与分离方法 桦褐孔菌干子实体置于烘箱干燥至恒质量, 用粉碎机粉碎后过 60 目铁筛, 得干粉。取 20 g 上述所得干粉于 500 mL 烧杯中, 加入 75% 乙醇 400 mL, 70 °C 超声 60 min, 重复提取操作一次, 合并提取液, 抽滤, 收集滤液, 倒掉滤渣。减压浓缩滤液, 旋转蒸瓶每次加液约瓶体积的 1/3, 压强 0.09 MPa, 温度 37 °C, 回收乙醇得浸膏, 浸膏质量 4.8 g。以适量水重悬上述浸膏, 浸膏依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取 4 次, 合并萃取液并减压浓缩干燥, 得石油醚部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位和水部位, 操作流程见图 1。以上 4 种干膏用 DMSO 促溶, DMSO 体积分数小于 0.1%。PBS 配制 100 mg/mL 的储存液, 保存在 4 °C 冰箱, 避光保存, 使用时配制成所需质量浓度。

1.3.2 细胞培养 MDA-MB-231 细胞用含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养液传代, 在 5% CO₂、37 °C 条件下培养, 实验用细胞均处于对数生长期。

1.3.3 MTT 法^[17] 检测不同萃取部位抗乳腺癌活性 将 MDA-MB-231 细胞的浓度调整到 1×10⁵ 个/mL 接种于 96 孔板, 每孔加细胞悬液 200 μL, 在 37 °C、

5% CO₂ 环境下培养 24 h, 待细胞贴壁, 吸弃培养液, 每孔加入 180 μL 新培养基, 将其分成空白对照组 (0 μg/mL) 和给药组, 每组平行设 4 个重复; 空白对照组加入 20 μL 不含药物的培养基, 给药组依次加入桦褐孔菌提取物不同萃取部位药液 20 μL, 使其终质量浓度分别为 10、20、30、40、50、60、80、100 μg/mL, 继续培养 24 h 后, 吸除药液, 每孔加 5 mg/mL 的 MTT 20 μL, 培养基 180 μL, 培养 4 h 后, 吸除 MTT, 每孔加 150 μL DMSO, 振荡 15 min, 570 nm 下测光密度 OD 值。计算药物对肿瘤细胞的抑制率, 对药效进行初步评价, 并采用 lgC-抑制率回归分析法计算半数抑制浓度 (IC₅₀)。

细胞抑制率 (%) =
$$\left(1 - \frac{\text{给药组 OD 值} - \text{调零孔 OD 值}}{\text{空白对照组 OD 值} - \text{调零孔 OD 值}}\right) \times 100\%$$

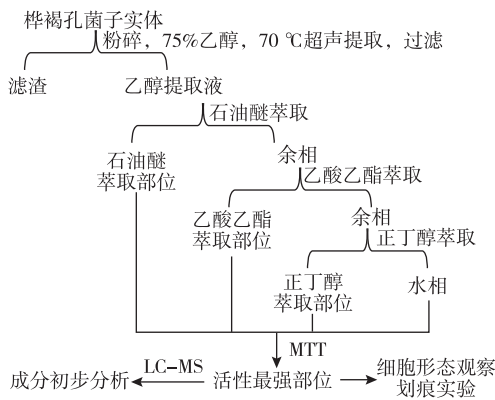


图 1 实验操作流程

Fig. 1 Operation process of the experiment

1.3.4 活性部位对 MDA-MB-231 细胞生长的影响 将 MDA-MB-231 细胞的浓度调整到 1×10⁵ 个/mL, 接种于 6 孔板, 每孔加 2 mL 细胞悬液, 培养 24 h, 待细胞贴壁, 吸弃培养液, 加入药物 (活性最强萃取部位) 质量浓度为分别为 20、40、80 μg/mL 的细胞培养液 2 mL, 同时设置空白对照组 (0 μg/mL), 于 37 °C 培养箱中培养, 在 24 h 时观察并记录细胞形态。

1.3.5 划痕试验^[18]检测活性部位对 MDA-MB-231 细胞迁移力的影响 将 MDA-MB-231 细胞接种于 6 孔板内培养, 待细胞基本长满, 用 200 μL 枪头于细胞层中纵向划痕, 造成培养细胞缺损区域带, 加入一定浓度的含药 (活性最强萃取部位) 无血清培养基继续培养 48 h, 倒置显微镜下观察划痕处细胞的覆盖情况。

1.3.6 LC-M/MS 初步分析 LC 参数设定: 色谱柱: Hypersil GOLD C18, 100 mm×2.1 mm, 5 μm; 流动相: A: ACN B: 0.1% 甲酸水溶液; 流速: 300 μL/min; 进样量: 10 μL; 洗脱程序见表 1。

表 1 LC 梯度洗脱程序

Table 1 LC gradient elution program

时间/min	A/%	B/%	速率/(μL/min)
0	5	95	300
5	10	90	300
10	20	80	300
15	40	60	300
20	80	20	300
25	80	20	300
26	5	95	300
30	5	95	300

质谱参数设定见表 2。

表 2 质谱参数

Table 2 MS parameters

参数	数值
Ion Source	ESI
Scan Mode	Negative ion mode
Vaporizer Temp	400 °C
Sheath Gas Flow Rate	50 arb
Aux Gas Flow Rate	10 arb
Sweep Gas Flow Rate	0 arb
I spray voltage	3.2 kV
Capillary Temp	350 °C
Mass range m/z	100~1 000

1.3.7 统计学处理 数据用 SPSS 13.0 统计软件分析处理。统计描述: 计量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间的均数比较采用 *t* 检验, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 MTT 法检测桦褐孔菌提取物各萃取部位抗乳腺癌活性

结果见表 3 和图 2。药物作用 24 h 后, 在一定质量浓度范围内, 各萃取部位均可抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖, 且呈一定的剂量依赖性; 根据 IC₅₀ 的数据显示, 药物对 MDA-MB-231 细胞的抑制作用大小依次为: 石油醚部位 > 正丁醇部位 > 水部位 > 乙酸乙酯部位; 其中乙酸乙酯部位在低质

量浓度下对细胞的增殖有促进作用,随着质量浓度进一步的增大,则表现出抑制作用;石油醚萃取部位的抑制强度最大,其作用 24 h 的 IC_{50} 值为 76.17 $\mu\text{g/mL}$,因此选石油醚部位进行后续试验。

表 3 MTT 法检测桦褐孔菌提取物各萃取部位抗乳腺癌 MDA-MB-231 细胞活性 ($\%, x \pm s, n=4$)
Table 3 Anti-breast cancer (MDA-MB-231) activity of different extraction parts

质量浓度/ $(\mu\text{g/mL})$	抑制率/ $\%$			
	石油醚部位	正丁醇部位	水部位	乙酸乙酯部位
空白对照组	0	0	0	0
10	-0.03 ± 2.54	0.23 ± 1.07	3.42 ± 0.71	3.21 ± 1.26
20	2.84 ± 2.24	-0.07 ± 2.08	5.88 ± 1.17	-6.56 ± 3.57
30	6.62 ± 2.46	0.00 ± 3.11	8.74 ± 1.83	-16.79 ± 4.84
40	9.40 ± 2.00	1.41 ± 1.87	$10.73 \pm 2.17^*$	-11.73 ± 1.90
50	$24.71 \pm 2.66^{*\Delta}$	1.74 ± 2.51	$15.69 \pm 1.61^*$	-7.57 ± 7.11
60	$29.26 \pm 1.64^*$	$6.34 \pm 1.62^*$	$16.25 \pm 1.56^*$	1.12 ± 2.63
80	$51.10 \pm 1.07^{*\Delta}$	$7.55 \pm 1.05^*$	$17.99 \pm 4.24^*$	$13.01 \pm 0.49^*$
100	$73.49 \pm 1.23^{*\Delta}$	$9.06 \pm 0.67^*$	$20.95 \pm 2.79^*$	$19.81 \pm 0.14^*$
$IC_{50}/(\mu\text{g/mL})$	76.17	417.48	420.51	549.76

注:与空白对照组比较: $^*P<0.05$;组间相邻不同浓度比较: $^{\Delta}P<0.05$

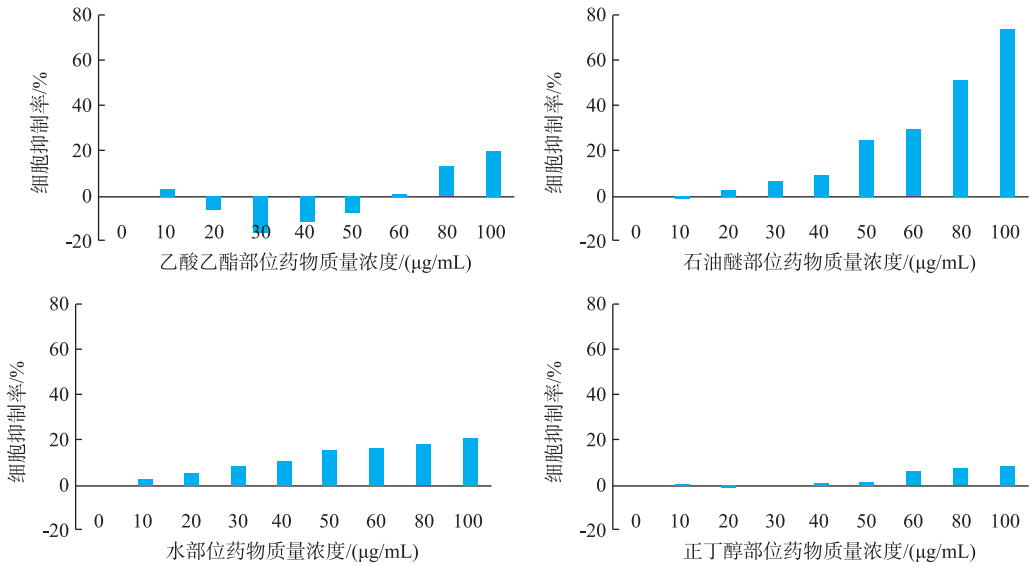


图 2 各萃取部位抗乳腺癌 MDA-MB-231 细胞活性

Fig. 2 Anti-breast cancer (MDA-MB-231) activity of different extraction parts

2.2 桦褐孔菌提取物石油醚部位对 MDA-MB-231 细胞生长的影响

上述结果显示,石油醚萃取部位相比其它萃取部位对肿瘤细胞表现出更强的抑制作用,因此选取该部位进一步探究其对细胞生长的影响。

形态观察结果见图 3。由形态观察可知:空白对照组 MDA-MB-231 细胞生长正常,加药组随着石油醚部位药物的质量浓度升高,细胞形态发生明显的变化,细胞逐渐由梭形变成圆球形,并逐渐脱落,

贴壁细胞数量减少,排列疏松,形态学上呈细胞凋亡状态^[19]。

2.3 划痕试验检测桦褐孔菌提取物石油醚部位对 MDA-MB-231 细胞迁移的影响

划痕实验结果见图 4。48 h 时空白对照组划痕区变窄;加药组划痕区细胞的迁移速度减慢甚至停滞、细胞脱落。可见桦褐孔菌提取物石油醚萃取部位对 MDA-MB-231 细胞的迁移存在一定的抑制作用。

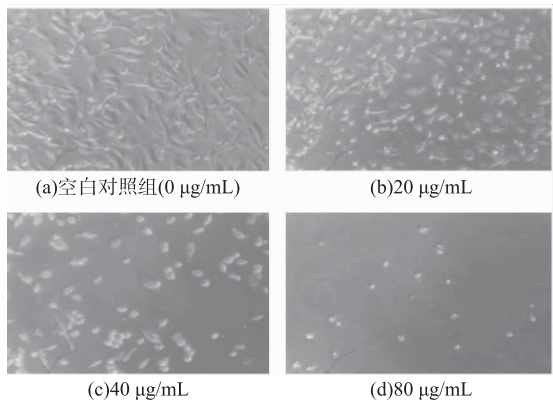


图3 不同质量浓度的药物对MDA-MB-231细胞凋亡的影响
Fig. 3 Effect of different concentration on the growth of MDA-MB-231 cells

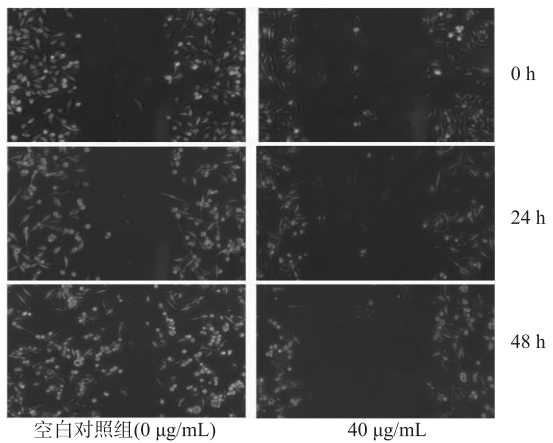


图4 桦褐孔菌石油醚部位对细胞迁移的影响
Fig. 4 Effect of petroleum ether extract fractions on cell migration

2.4 LC-MS/MS对石油醚部位中可能存在的物质进行初步分析

为进一步探究石油醚活性部位其可能含有的化学成分,采用LC-MS/MS方法对该部位成分进行初步分析。经LC-MS/MS检测,桦褐孔菌石油醚萃取物中有14个离子强度较大的色谱峰被检测到,对这些峰的一级质谱测得精确相对分子质量计算分子式,结合二级质谱的分析以进一步解析该14个色谱峰的结构组成;使用Thermo Scientific™Mass Frontier™7.0质谱解析软件对数据进行分析处理,推测对应分子可能的结构,分析数据见表4。

3 结 语

近年来,乳腺癌逐渐成为严重威胁人类健康的疾病,抗肿瘤药物的主要作用之一是有有效的抑制肿

表4 LC-MS/MS分析数据

Table 4 LC-MS/MS data

No	t_R/min	测得的相对分子质量(m/z)	分子式	相对偏差/ mmu	名称
1	18.743 1	286.019 43	$C_9H_{10}N_4O_3S_2$	-0.310 57	磺胺甲氧噻二唑
2	19.554 1	296.077 26	$C_{14}H_{11}F_3N_2O_2$	-0.162 74	氟苄烟酸
3	20.328 1	262.131 74	$C_{14}H_{18}N_2O_3$	-0.168 26	脯氨酸-苯丙氨酸
4	20.446 1	252.089 88	$C_{15}H_{12}N_2O_2$	-0.180 12	5,5-二苯基海因
5	21.390 9	211.110 95	$C_{13}H_{13}N_3$	-0.149 05	未知
6	24.401 9	384.266 45	$C_{25}H_{36}O_3$	-0.283 55	未知
7	21.429 9	441.139 68	$C_{19}H_{19}N_7O_6$	-0.260 32	叶酸
8	24.655 7	457.184 9	$C_{23}H_{27}N_3O_7$	-0.295 1	未知
9	25.127 1	227.115 76	$C_{11}H_{17}NO_4$	-0.144 24	Pro-Hyp
10	25.146 2	267.023 98	$C_8H_5N_5O_6$	-0.126 02	未知
11	25.702 6	170.021 52	$C_7H_6O_5$	-0.098 48	没食子酸
12	25.853 9	504.084 52	$C_{30}H_{16}O_8$	-0.355 48	金丝桃素
13	25.971 3	457.158 41	$C_{20}H_{27}NO_{11}$	-0.271 59	苦杏仁苷
14	26.395 7	492.090 39	$C_{22}H_{20}O_{13}$	-0.299 61	胭脂红酸

瘤细胞的生长和增殖。桦褐孔菌作为食药菌,具有抗肿瘤等作用,并且毒副作用小,因此研究其抗乳腺癌活性部位及成分为进一步开发利用桦褐孔菌资源具有重要的意义。

作者采用MTT法检测桦褐孔菌提取物各萃取部位抗乳腺癌MDA-MB-231细胞活性,结果显示桦褐孔菌石油醚萃取部位对MDA-MB-231细胞的抑制作用最强,作用24 h的 IC_{50} 值为76.17 $\mu g/mL$,实验中桦褐孔菌提取物各萃取部位对MBA-MB-231细胞的抑制活性表现为:石油醚萃取部位>正丁醇萃取部位>水萃取部位>乙酸乙酯萃取部位;由细胞形态观察可知,随着石油醚部位药物的质量浓度升高,细胞形态发生明显的变化,并有诱导细胞凋亡的趋势;划痕试验结果表明桦褐孔菌提取物石油醚萃取部位对MDA-MB-231细胞的迁移存在一定的抑制作用。

实验运用LC-MS/MS技术,对桦褐孔菌石油醚萃取部位的化学组成进行了初步分析。在负离子模式中有14个离子强度较大的色谱峰下被检测到,经过Mass Frontier™7.0软件解析和相关数据库的检索,14个化学成分被初步表征,其中的10种成分被初步鉴定,分别为:N1-(4-methoxy-1,2,5-thiadiazol-3-yl)sulfanilamide、氟苄烟酸、脯氨酸-苯丙氨酸、5,5-二苯基海因、N-[p-[(2-amino-4-

hydroxy-6-pteridiny]methyl]amino] benzoyl]glutamic acid、Pro-Hyp、没食子酸、金丝桃素、苦杏仁苷、胭脂红酸,这些化合物均首次从桦褐孔菌中得到鉴定。有研究报道金丝桃素对乳腺癌细胞有一定的抑制活性,而其它初步鉴定的化合物对乳腺癌细胞的抑制活性未见文献报道,关于何种成分发挥主要的抗乳腺癌活性还有待进一步研究。虽然其中4个物

质虽然没有初步鉴定,但亦对它们的相对分子质量及分子式进行了初步的表征。本研究采用的液质联用方法目的在于快速表征由多组分构成的复杂化学体系,能降低传统分离纯化过程中的盲目性,有利于提高活性化合物发现的概率,为进一步开发和利用桦褐孔菌药用资源提供科学的依据。

参考文献:

- [1] CUI Y, KIM D S, PARK K C. Antioxidant effect of *Inonotus obliquus*[J]. **Journal of Ethnopharmacology**, 2005, 96(2): 79-85.
- [2] NAJAFZADEH M, REYNOLDS P D, BAUMGARTNER A, et al. Chaga mushroom extract inhibits oxidative DNA damage in lymphocytes of patients with inflammatory bowel disease[J]. **Bio Factors**, 2007, 31(3-4): 191-200.
- [3] HUANG Wei, LU Zhenming, GENG Yan, et al. Optimization of submerged fermentation condition for production of mycelial biomass and steroids by *Inonotus obliquus*[J]. **Mycosystema**, 2012, 31(6): 909-916. (in Chinese)
- [4] ZHAO F, MAI Q, MA J, et al. Triterpenoids from *Inonotus obliquus* and their antitumor activities [J]. **Fitoterapia**, 2015, 101: 34-40.
- [5] KANG J H, JANG J E, MISHRA S K, et al. Ergosterol peroxide from Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) exhibits anti-cancer activity by down-regulation of the β -catenin pathway in colorectal cancer[J]. **J Ethnopharmacol**, 2015, 173: 303-312.
- [6] CHEN Yiyong, GU Xiaohong, TANG Jian. Study on anti-tumor activities of polysaccharides from *Inonotus obliquus* [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2011, 30(1): 65-69. (in Chinese)
- [7] LEE H S, KIM E J, KIM S H. Ethanol extract of *Inonotus obliquus* (Chaga mushroom) induces G1 cell cycle arrest in HT-29 human colon cancer cells[J]. **Nutrition Research and Practice**, 2015, 9(2): 111-116.
- [8] HU Y, SHENG Y, YU M, et al. Antioxidant activity of *Inonotus obliquus* polysaccharide and its amelioration for chronic pancreatitis in mice[J]. **Int J Biol Macromol**, 2016: 348-356.
- [9] HWANG B S, LEE I K, YUN B S. Phenolic compounds from the fungus *Inonotus obliquus* and their antioxidant properties[J]. **The Journal of Antibiotics**, 2016, 69(2): 108-110.
- [10] HARIKRISHNAN R, BALASUNDARAM C, HEO M S. *Inonotus obliquus* containing diet enhances the innate immune mechanism and disease resistance in olive flounder *Paralichthys olivaceus* against *Uronema marinum*[J]. **Fish and Shellfish Immunology**, 2012, 32(6): 1148-1154.
- [11] HARIKRISHNAN R, BALASUNDARAM C, HEO M S. Effect of *Inonotus obliquus* enriched diet on hematology, immune response, and disease protection in kelp grouper, *Epinephelus bruneus* against *Vibrio harveyi*[J]. **Aquaculture**, 2012, s 344-349 (3): 48-53.
- [12] ZHANG Y, ZHAO Y, CUI H, et al. Comparison of hypoglycemic activity of fermented mushroom of *Inonotus obliquus* rich in vanadium and wild-growing *I. obliquus*[J]. **Biological Trace Element Research**, 2011, 144(1): 1351-1357.
- [13] HILSZCZANSKA D. Medicinal properties of macrofungi[J]. **Forest Research Papers**, 2012, 73(4): 347-353.
- [14] MISHRA S K, KANG J H, KIM D K, et al. Orally administered aqueous extract of *Inonotus obliquus* ameliorates acute inflammation in dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice[J]. **Journal of Ethnopharmacology**, 2012, 143(2): 524-532.
- [15] WANG Wenjuan, LUO Xiangning, MA Xiaojun, et al. Effects of extracts of 5 kinds of *Inonotus obliquus* on proliferation of human hepatoma cell line HePG2 and SMMC7721[J]. **Shaanxi Traditional Chinese Medicine**, 2013(11): 1539-1542. (in Chinese)
- [16] ZHAO L W, ZHONG X H, YANG S Y, et al. Inotodiol inhibits proliferation and induces apoptosis through modulating expression of cyclinE, p27, bcl-2, and bax in human cervical cancer HeLa cells[J]. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, 2014, 15(7): 3195-3199.
- [17] XIE Qiongjun, XU Xianyun, ZHENG Jinrong, et al. Study on the effect of *Liquidambar* leaves extracts on K562 cells[J]. **Journal of Chinese Medicinal Materials**, 2015(7): 1493-1495. (in Chinese)
- [18] ZHONG Liangrui, LIN Shuang, WEI Kemin. Inhibitory effects of radix tetragium hemsleyi flavone on growth and invasion of lung carcinoma cells[J]. **Chinese Pharmacological Bulletin**, 2016(4): 480-483. (in Chinese)
- [19] ZHAO B, ZHANG J, GUO X, et al. Microwave-assisted extraction, chemical characterization of polysaccharides from *Lilium davidii* var. *unicolor* Salisb and its antioxidant activities evaluation[J]. **Food Hydrocolloids**, 2013, 31(2): 346-356.