

浙江香茶菜属植物抗肿瘤活性成分的比较研究及药效物质的快速发现

滕飞¹ 杨波¹ 林能明^{2,3}

1. 浙江中医药大学药学院 杭州 310053 2. 浙江大学医学院附属杭州市第一人民医院浙江省临床肿瘤药理与毒理学研究重点实验室 3. 浙江大学医学院附属杭州市第一人民医院转化医学研究中心

摘要: [目的] 比较香茶菜属植物体外抗肿瘤成分及作用的差异, 初步阐明其抗肿瘤药效物质。[方法] 制备香茶菜属植物地上和地下部分乙酸乙酯提取物, 以薄层色谱(thin layer chromatography, TLC)分析研究香茶菜属植物及其不同入药部位的成分差异; MTT法研究不同样品对人源乳腺癌细胞 MCF-7 的抑制作用, 筛选出具有体外抗肿瘤活性的香茶菜属植物种类及入药部位; 以有效乙酸乙酯提取物与还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)共同孵育, 超高效液相色谱(ultra performance liquid chromatography, UPLC)分析孵育前后成分的变化, 推测其可能的抗肿瘤药效物质的化学结构类别。[结果] TLC 分析显示, 浙江香茶菜属不同种植物地上与地下部分之间化学成分存在差异, 其中香茶菜[*Isodon amethystoides* (Benth) H. Hara]、大萼香茶菜[*Isodon macrocalyx* (Miquel) Kudo]与本属其他植物对比成分明显不同; 对 MCF-7 细胞抑制作用最好的是大萼香茶菜的地上部分, 半数抑制浓度(50% inhibiting concentration, IC_{50})为 $8.29 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; UPLC 分析显示, 该样品中存在能够与 GSH 结合的成分, 可能为迈克尔受体分子型二萜类成分。[结论] 浙江产大萼香茶菜的地上部分具有较强抗肿瘤作用, 初步确定其抗肿瘤药效物质为迈克尔受体分子型二萜类成分。

关键词: 香茶菜属; 迈克尔受体分子; 抗肿瘤活性; 超高效液相色谱; 成分差异

中图分类号: R282 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-5509(2020)03-0297-06

DOI: 10.16466/j.issn1005-5509.2020.03.021

Comparative Study on Antineoplastic Active Components and Rapid Detection of Pharmacodynamic Substances of *Lamiaceae Isodon* from Zhejiang Province TENG Fei¹, YANG Bo¹, LIN Nengming^{2,3} 1. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou(310053), China; 2. Key Laboratory of Clinical Cancer Pharmacology and Toxicology Research of Zhejiang Province, Affiliated Hangzhou First People's Hospital, Zhejiang University School of Medicine; 3. Translational Medicine Research Center, Affiliated Hangzhou First People's Hospital, Zhejiang University School of Medicine

Abstract: [Objective] To compare the in vitro antitumor activity and components of *Lamiaceae Isodon*, and to elucidate the antitumor pharmacodynamic substances of *Lamiaceae Isodon*. [Methods] The ethyl acetate extracts of aboveground and underground parts of *Lamiaceae Isodon* were prepared, and thin layer chromatography (TLC) was used to study the composition differences of their different medicinal parts. MTT method was used to study the inhibitory effect of different samples on human breast cancer cell MCF-7, and to screen out the species and drug sites with anti-tumor activity in vitro. Effective ethyl acetate extract was incubated with reduced glutathione (GSH), and the changes of components before and after incubation were analyzed by ultra performance liquid chromatography (UPLC), so as to determine the possible chemical structure categories of anti-tumor efficacy substances. [Results] The chemical compositions of aboveground and underground parts of *Lamiaceae Isodon* are different, especially, *Isodon amethystoides* (Benth) H. Hara and *Isodon macrocalyx* (Miquel) Kudo are significantly different from other plants of the genus. The best inhibitory effect on MCF-7 cells was found in the aboveground part of *Isodon macrocalyx*, 50% inhibiting concentration (IC_{50}) was $8.29 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. UPLC analysis showed that GSH binding components were present in the sample, which might be Michael acceptor molecular diterpenoids. [Conclusion] In this study, it was found by screening that the aboveground part of *Lamiaceae Isodon* from Zhejiang Province had strong antitumor effect, and its antitumor active substance was Michael acceptor molecular diterpenoids.

Key words: *Lamiaceae Isodon*; Michael acceptor molecular; antitumor activity; UPLC; composition difference

唇形科香茶菜属 [*Lamiaceae Isodon* (Schrader ex Benth) Sp.] 植物是我国民间的常用草药, 供药用的有 30 多种, 富含萜类、黄酮、挥发油等多种成分。孙汉董院士等从香茶菜属植物中分离出 80 多种化

学物质^[1], 其中二萜类是香茶菜属植物中最典型的化合物类型^[1-3]。浙江香茶菜属植物分布广泛, 种类丰富, 且不同生长环境和不同种类的香茶菜属植物地下部位二萜类含量明显不同, 其药理作用也大不相同^[4-6]。

基金项目: 杭州市科技发展计划项目(20172016A01); 浙江省省级重点实验室培育项目(2020E10021)

Fund projects: Hangzhou Science and Technology Development Project(20172016A01); Provincial Key Laboratory Cultivation Project of Zhejiang Province(2020E10021)

通讯作者: 林能明, E-mail: lnm1013@163.com

据《浙江省中药炮制规范(2015 版)》^[7]收载,中药香茶菜(*Rhizoma Isodone*)又名铁菱角、菱角三七,其来源是植物香茶菜或大萼香茶菜及同属数种植物的干燥根茎或地上部分。

迈克尔受体分子(Michael acceptor molecular)是含有烯键或炔键与吸电子基形成的亲电共轭体系的一类化合物,其与亲核负电体系进行的共轭加成反应称为迈克尔加成反应(Michael addition reaction)^[8-9]。已有研究报道,香茶菜属植物中存在大量对映贝壳杉烷型二萜类迈克尔受体分子,如冬凌草甲素、冬凌草乙素等^[10-11],该类化合物具有广谱抗肿瘤活性,且其活性机制与 D 环中的 exo-亚甲基环戊酮结构有关,该结构可与氨基酸中的氨基、羟基、巯基等亲核基团发生反应,从而显示出较好的抗肿瘤活性^[12-13];故其也可与细胞中的还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)发生反应,降低细胞 GSH 水平,引起细胞受损及死亡^[14]。

为研究浙江省香茶菜属不同植物的抗肿瘤活性和其中可能含有的有效成分,笔者选取产自浙江的 7 种香茶菜属植物,对其不同生长部位的有效成分含量差异进行了研究,并对对映贝壳杉烷型二萜类迈克尔受体分子抗肿瘤有效成分进行快速发现,以期初步阐明其抗肿瘤药效物质,并为研究迈克尔受体分子活性成分的发现提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 试药 香茶菜 [*Isodon amethystoides* (Benth) H. Hara]、显脉香茶菜 [*Isodon nervosus* (Hemsley) Kudô]、碎米桠 [*Isodon rubescens* (Hemsley) H. Hara] 采自浙江杭州市临安区;长管香茶菜 [*Isodon longitubus* (Miquel) Kudô]、大萼香茶菜 [*Isodon macrocalyx* (Miquel) Kudô] 采自浙江丽水龙泉市住龙镇;线纹香茶菜 [*Isodon lophanthoides* (Buch. Ham ex D. Don) Hara]、歧伞香茶菜 [*Isodon macrophyllus* (Migo) H. Hara] 采自浙江衢州市开化县,标本均保存于浙江中医药大学标本馆。

1.2 主要仪器 超高效液相色谱仪购于美国 Waters 公司,色谱柱为 Waters ACQuity UPLC C18 柱(2.1mm×100mm, 1.7μm);超低温冰箱为美国 Forma 公司产品;MK-3 酶标仪购于美国 Thermo Labsystems 公司;D2012 Plus 台式高速微量小型离心机购于上海安亭科学仪器公司。

1.3 主要试剂 GF254 薄层层析硅胶板购于青岛海

洋化工公司(批号:T11254);甲醇、乙腈、香草醛购于上海阿拉丁公司(批号:M116126、A119010、B135387);DMEM 培养基、胰蛋白酶均购于美国 Gibco 公司(批号:12100046、25200-056);无支原体胎牛血清购于美国 Hyclone 公司(批号:SH30084.03);MTT 试剂购于美国 Amresco 公司(批号:97062-376);二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)为美国 Sigma 公司产品(批号:D2650)。

1.4 细胞株 人源乳腺癌细胞 MCF-7 购于上海酶研生物科技有限公司,由浙江中医药大学药理研究所提供,采用含 10%无支原体胎牛血清的 DMEM 完全培养基,在 37℃, 5%CO₂ 条件下培养。

1.5 方法

1.5.1 样品制备 取显脉香茶菜地上部分约 200g,粉碎后以 95%乙醇 1 600mL(约 8 倍量)回流提取 3 次,45min/次,合并 3 次提取液置于旋转蒸发仪上,减压蒸发回收乙醇至全干,加水混悬至约 100mL,加等体积乙酸乙酯萃取 3 次,合并乙酸乙酯萃取液并置于旋转蒸发仪上,减压蒸发回收乙酸乙酯至全干,即得到显脉香茶菜地上部分乙酸乙酯提取物(以下简称 INE1)。

同样方法制备显脉香茶菜地下部分提取物(INE2);长管香茶菜地上、地下部分提取物(ILE1、ILE2);大萼香茶菜地上、地下部分提取物(IMA1、IMA2);香茶菜地上、地下部分提取物(IAM1、IAM2);线纹香茶菜地上部分提取物(ILE1);碎米桠地上、地下部分提取物(IRU1、IRU2);歧伞香茶菜地上、地下部分提取物(IMS1、IMS2)。

1.5.2 薄层色谱分析 检识探究不同样品提取物的成分差异 为探究不同样品之间成分的差异性,对上述 13 种香茶菜属植物提取物进行薄层色谱分析(thin layer chromatography, TLC)检识。先将 13 种样品点在同一块 GF254 硅胶薄层板上,以石油醚-乙酸乙酯 3:2 混合溶液为展开剂,展距约为 9cm。待展开剂晾干后,于 254nm 紫外灯下检识,1%硫酸-香草醛溶液显色,110℃加热至显色清晰。

1.5.3 MTT 法测定 不同样品提取物对肿瘤细胞的抑制作用 取生长状态良好且处于对数生长期的人源乳腺癌细胞 MCF-7,制成细胞密度为 1×10⁵ 个/mL 的细胞悬液,接种于 96 孔板。每孔加入细胞悬液 100μL,再加入以 DMSO 溶解的不同样品提取物溶液

10 μ L,以培养液补足体积为 200 μ L,每个样品设置 6 个复孔;同时设置阴性对照组,细胞悬液体积同上,加入适量的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)补足体积;空白对照组为不含细胞的培养基和 DMSO^[15]。培养 48h 后,以 MTT 法检测 570nm 波长处的光密度(optical density, OD)值,计算细胞增殖抑制率(%)和半数抑制浓度(50% inhibiting concentration, IC₅₀)。计算公式:细胞增殖抑制率(%)=[1-(OD_{不同样品组}-OD_{空白对照组})/(OD_{阴性对照组}-OD_{空白对照组})] $\times$ 100%。依据细胞增殖抑制率计算 IC₅₀。

1.5.4 超高效液相色谱分析 依据 MTT 活性检测结果,大萼香茶菜地上部分对 MCF-7 细胞活性抑制效果最好,其余样品无明显抑制效果,因此选用大萼香茶菜地上部分进行后续实验,采用超高效液相色谱(ultra performance liquid chromatography, UPLC)对大萼香茶菜地上部分进行了分析。取 IMA1 5mg 加甲醇 1mL 配成浓度为 5mg $\cdot$ mL⁻¹的甲醇溶液,10 000r/min 离心 15min,取上清液进行分析。进样量:1 μ L;柱温:30 $^{\circ}$ C;样品温度:25 $^{\circ}$ C;检测波长:220nm;流速:0.25mL $\cdot$ min⁻¹;流动相:水-乙腈;梯度:0~1min 25%乙腈;1~21min 25%~85%乙腈;21~23min 85%乙腈;23~24min 85%~25%乙腈;24~27min 25%乙腈。

1.5.5 GSH 探针分析 将 IMA1 样品配制成 20mg $\cdot$ mL⁻¹ 甲醇溶液,取 40 μ L 加入三(羟甲基)氨基甲烷-盐酸[Tris(hydroxymethyl)aminomethane-hydrochloride, Tris-HCl] 缓冲液-GSH 360 μ L 作为实验组,以 pH=8.00 的 Tris-HCl 缓冲液作为阴性对照,37 $^{\circ}$ C 反应 2h,10 000r/min 离心 15min,取上清液进行 UPLC 分析,色谱条件同 1.5.4。

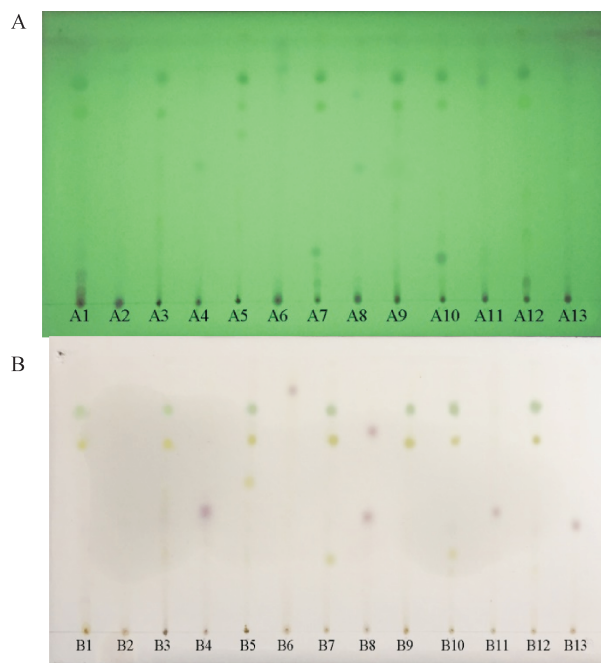
1.6 统计学分析 采用 SPSS 23.0 统计软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各样品 TLC 检识结果 各样品 TLC 检识结果见图 1。图中 1~13 分别为样品 INE1、INE2、ILO1、ILO2、IMA1、IMA2、IAM1、IAM2、ILS1、IRU1、IRU2、IMS1、IMS2。地上部分在 254nm 紫外灯下进行检识;地下部分斑点以 1%硫酸-香草醛溶液为显色剂,日光下较为清晰。地上部分样品 INE1(A1)、ILO1(A3)、ILS1(A9)、IMS1(A12)均有一个绿色斑点和一个黄色斑点,IMA1(A5)较其他地上部分样品多一个淡黄色

斑点,而 IAM1(A7)和 IRU1(A10)的下部出现一个额外的浅褐色斑点。地下部分斑点以 1%硫酸-香草醛溶液为显色剂,日光下较为清晰。其中样品 INE2(B2)无可见斑点,ILO2(B4)、IAM2(B8)、IRU2(B11)、IMS2(B13)中部有一紫色斑点,IAM2(B8)上部还有一额外斑点,而 IMA2(B6)只有上部有一棕色斑点。

2.2 各样品对 MCF-7 细胞抑制作用比较 MTT 法



注:A. 254nm 紫外灯下检识结果;B. 1%硫酸-香草醛显色剂日光下检识结果

Note: A. Inspection results under 254nm UV light; B. Inspection results of 1% sulfuric acid-vanillin developer under sunlight

图 1 各样品 TLC 检识结果

Fig.1 TLC inspection results for each sample

检测各样品对 MCF-7 细胞的抑制作用,以 IC₅₀ < 30 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 为有效样品,舍弃 IC₅₀ > 30 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 的样品分析结果,认为 INE1、ILO1、IMA1、IRU1、IMS1 能够抑制 MCF-7 细胞生长,其中 IMA1(IC₅₀=8.29 μ g $\cdot$ mL⁻¹)抑制作用最强($P < 0.05$)。见表 1。

2.3 UPLC 分析 由 MTT 检测结果得出,13 种香茶菜属样品中 IMA1 具有较高活性,且大萼香茶菜为《浙江省中药炮制规范(2015 版)》^[7]规定的中药香茶菜药材来源植物之一,故以 UPLC 对 IMA1 进行了梯度分析,为 GSH 探针分析实验摸索条件。结果表明,IMA1 共有 13 种主要化学成分(峰 1~峰 13),其中峰 1、峰 2、峰 3、峰 6、峰 7、峰 12、峰 13 含量较高。见图 2。

表 1 各样品对 MCF-7 细胞增殖抑制作用比较($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig.1 Comparison of the proliferation inhibitory ability of *Isodon* species on MCF-7 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

序号	样品	IC ₅₀ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
1	INE1	13.1 [*]
2	ILO1	24.8 [*]
3	IMA1	8.29
4	IRU1	14.7 [*]
5	IMS1	17.7 [*]

注:与 IMA1 比较, ^{*} $P<0.05$
Note: Compared with IMA1, ^{*} $P<0.05$

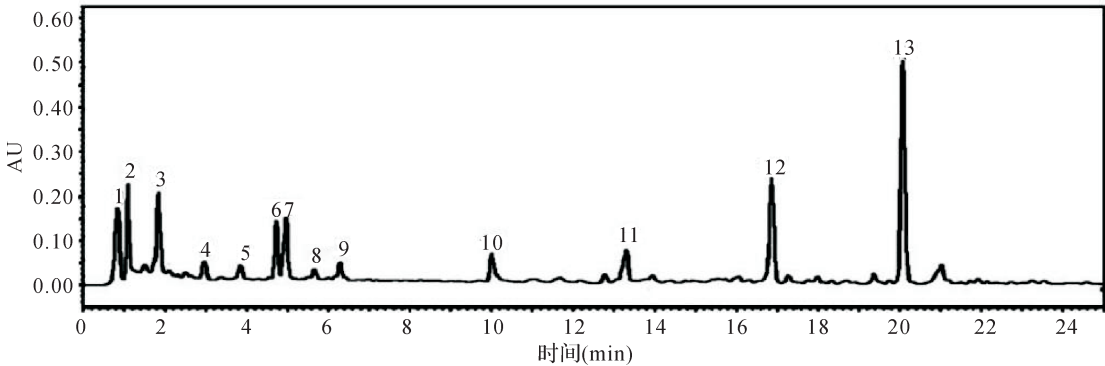


图 2 220nm 下的 IMA1 UPLC 分析图谱
Fig.2 UPLC analysis spectrum of IMA1 at 220nm

2.4 GSH 探针分析 实验组将 IMA1 与 GSH 探针结合,通过 UPLC 分析得到图 3A;阴性对照将 IMA1 与 Tris-HCl 结合,通过 UPLC 分析得到图 3B。进一步与阴性对照峰面积的差异进行比较,判断其中是否存在迈克尔受体分子类物质,其中峰 1、峰 2 和峰 3 显著增加,峰 4、峰 5 略微减小,峰 6、峰 7 完全消失,峰 8、峰 9 有所减小,峰 11、峰 12 未完全消失,由此判断这些化合物与 GSH 发生了不同程度的迈克尔加成反应,峰 1、峰 2 和峰 3 为迈克尔加成产物,峰 4、峰 5、峰 6、峰 7、峰 8、峰 9、峰 11、峰 12 为迈克尔受体分子。见图 3C。

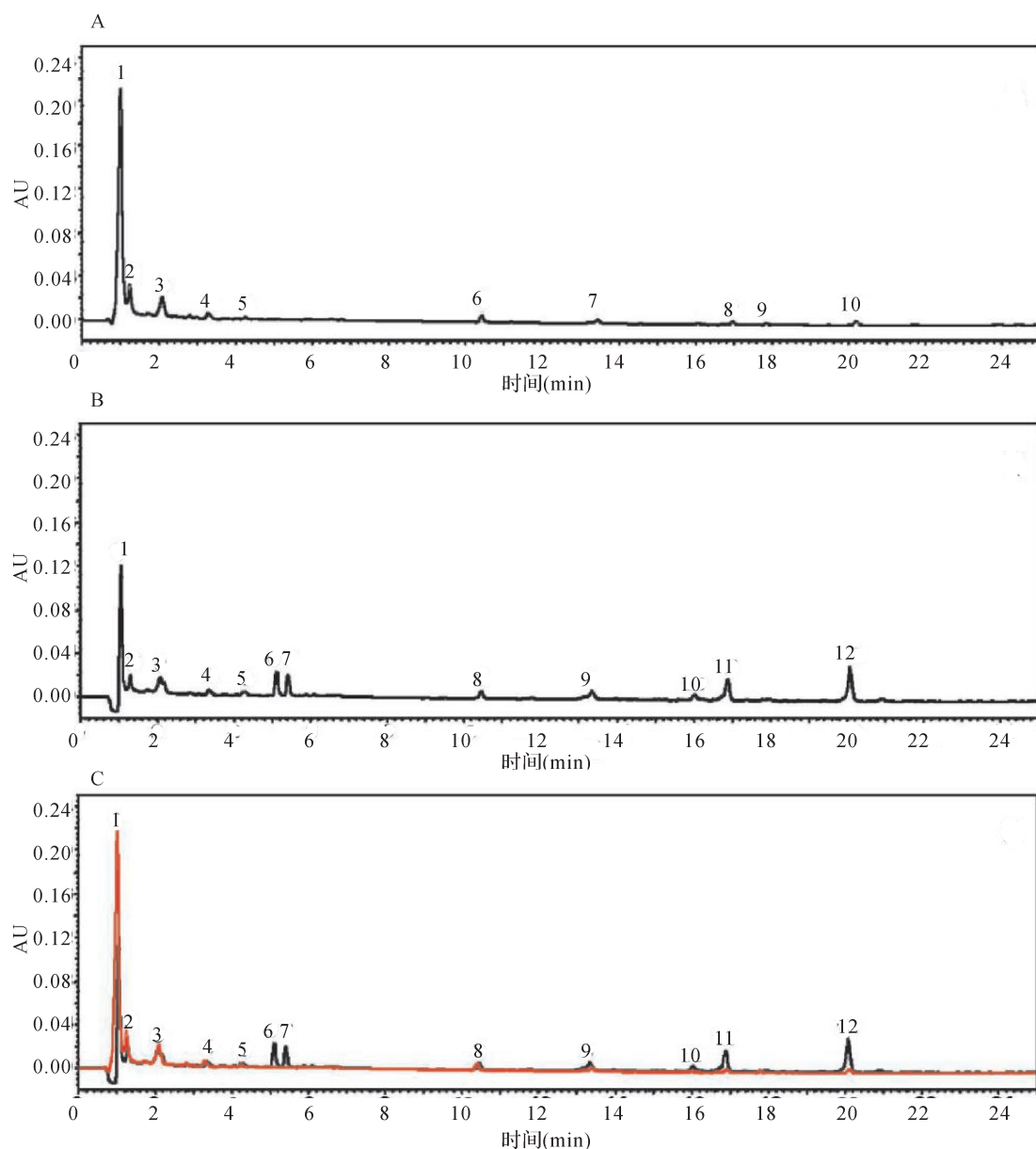
3 讨论

本研究选用了浙江省主产的 7 种香茶菜属植物样本的地上部分和地下部分,因线纹香茶菜野外资源稀少,能够采集到的数量有限,且其植株柔弱,地下部分为极细小的须根,无法制备足够的样品,因此共制备了 13 个样品。经化学成分比对分析,确定了不同种香茶菜属植物化学成分的差异,并通过 MTT 法检测其对人源乳腺癌细胞 MCF-7 的抑制活性,结果提

示这些植物的地上部分均有一定抗肿瘤活性,其中大萼香茶菜地上部分抗肿瘤活性最强。TLC 结果表明,不同香茶菜属植物乙酸乙酯提取部位化学成分大部分相同,但大萼香茶菜的地上与地下部分与其他香茶菜属植物比较却有明显差异,笔者认为这正是大萼香茶菜提取物抗肿瘤效果优于同属其他样品的物质基础。进一步以 GSH 为探针,将 IMA1 与 GSH 共同孵育,通过比较化学成分的变化,特异性识别大萼香茶菜中的迈克尔受体分子类物质。容易发生加成反应的迈克尔受体分子具有较强的亲电性,容易与受体氨基酸发生作用,从而体现出较好的抗肿瘤活性。刘建群等^[16]研究表明,迈克尔加成反应速率可能与抗肿瘤活性存在正相关性,因此图 3 中峰 6 和峰 7 化合物可能具有较好的抗肿瘤活性,值得关注。

香茶菜属植物中大量含有的贝壳杉烷型二萜类成分是其抗肿瘤药效物质,该类成分是一类迈克尔受体分子,由 GSH 探针结合反应可知,IMA1 中含有可与 GSH 上的游离巯基发生迈克尔加成反应的物质,能够使得细胞中 GSH 水平降低^[17]。已有研究表明,香

滕飞,等:浙江香茶菜属植物抗肿瘤活性成分的比较研究及药效物质的快速发现



注:A. IMA1+GSH 溶液孵育 2h 后 UPLC 分析图谱;B. IMA1+Tris-HCl 孵育 2h 后 UPLC 分析图谱;C. 对比分析图

Note: A. UPLC analysis map of IMA1+GSH solution after 2h incubation; B. UPLC analysis map of IMA1+Tris-HCl after 2h incubation; C. Comparative analysis map

图 3 GSH 探针孵育后 UPLC 分析
Fig.3 UPLC analysis after GSH probe incubation

茶菜属植物富含对映贝壳杉烷型二萜, 该二萜具有 α - β 不饱和羰基单元, 为一类迈克尔受体分子^[18]。GSH 为亲核试剂, 可以和该类成分发生加成反应, 因此初步判断 IMA1 中的这些迈克尔受体分子为对映贝壳杉烷型二萜类, 正是由于该类成分的存在使得 IMA1 表现出良好的抗肿瘤活性。同时本研究结果表明该方法可快速发现该属中迈克尔受体分子, 为后续针对性分离和鉴定这些活性成分奠定了基础, 并为香

茶菜属植物资源的研究开发与合理利用提供了科学依据。

参考文献:

References:

- [1] 孙汉董, 许云龙, 姜北. 香茶菜属植物二萜化合物[M]. 北京: 科学出版社, 2001:13-15.
SUN Handong, XU Yunlong, JIANG Bei. Diterpenoids from *Isodon* Species[M]. Beijing: Science Press, 2001:13-15.
- [2] Lin C, Liu F, Zhang R, et al. High-performance thin-

- layer chromatographic fingerprints of triterpenoids for distinguishing between *Isodon lophanthoides* and *Isodon lophanthoides* var. *gerardianus*[J]. J AOAC Int, 2019,102(3): 714–179.
- [3] Zhao C L, Sarwar M S, Ye J H, et al. Isolation, evaluation of bioactivity and structure determination of amethynol A, a prototypic amethane diterpene from *Isodon amethystoides* bearing a six/five/seven-membered carbon-ring system[J]. Acta Crystallogr C Struct Chem, 2018,74 (Pt5):635–640.
- [4] Zhai K F, Duan H, Cao W G, et al. Protective effect of *Rabdosia amethystoides*(Benth) Hara extract on acute liver injury induced by concanavalin A in mice through inhibition of TLR4–NF– κ B signaling pathway[J]. J Pharmacol Sci, 2016,130(2):94–100.
- [5] Jin Y, Du Y, Shi X, et al. Simultaneous quantification of 19 diterpenoids in *Isodon amethystoides* by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. J Pharm Biomed Anal,2010, 53(3): 403–411.
- [6] 蒋燕,马丽娟,王亚文,等.香茶菜属植物中二萜成分的提取及抗肿瘤活性[J].新乡医学院学报,2016,33(12):1022–1027. JIANG Yan, MA Lijuan, WANG Yawen, et al. Extraction of diterpenoid from *Isodon* and its antitumor activity[J]. J Xinxiang Med Coll,2016,33(12):1022–1027.
- [7] 浙江省药品监督管理局.浙江省中药炮制规范[M].杭州:浙江科学技术出版社,2015:306. Zhejiang Medical Products Administration. Processing Regulation of Traditional Chinese Medicine of Zhejiang Province[M].Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Press,2015:306.
- [8] 张潇雨.天然迈克尔反应受体分子的快速发现及活性研究[D].杭州:浙江大学, 2011:62. ZHANG Xiaoyu. Discovery and biological activities of natural Michael addition acceptors[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2011:62.
- [9] Kitahata S, Yakushiji F, Ichikawa S. Impact of the structures of macrocyclic Michael acceptors on covalent proteasome inhibition[J].Chem Sci,2017,8(10):6959–6963.
- [10] Men R, Li N, Ding C, et al. Chemopreventive agents from *Physalis minima* function as Michael reaction acceptors[J]. Pharmacogn Mag,2016,12(Suppl 2):S231–S236.
- [11] 刘建群,高俊博,刘小红,等.分子探针法快速发现半边旗中迈克尔反应受体分子[J].亚太传统医药,2014,10(6):19–21. LIU Jianqun, GAO Junbo, LIU Xiaohong, et al. Rapid detection of Michael reaction acceptor molecules in *Pteris semipinnata* by molecular probe method[J]. Asia–Pac Trad Med,2014,10(6):19–21.
- [12] Ding R, Zheng B, Wang Y, et al. A cation-directed enantioselective sulfur-mediated Michael/Mannich three-component domino reaction involving chalcones as Michael acceptors[J].Org Lett,2015,17(17):4128–4131.
- [13] Young C M, Taylor J E, Smith A D. Evaluating aryl esters as bench-stable C(1)–ammonium enolate precursors in catalytic, enantioselective Michael addition–lactonisations[J]. Org Biomol Chem, 2019, 17(19):4747–4752.
- [14] 李春燕,孙传政,宋鑫.肿瘤细胞死亡的一种新形式——铁死亡[J].中国生物化学与分子生物学报,2019,35(11):1208–1214. LI Chunyan, SUN Chuansheng, SONG Xin. A new form of tumor cell death: ferroptosis[J].Chin J Biochem Mol Biol,2019,35(11):1208–1214.
- [15] Van Meerloo J, Kaspers G J, Cloos J. Cell sensitivity assays: The MTT assay [J].Methods Mol Biol,2011,731: 237–245.
- [16] 刘建群,高俊博,舒积成,等.冬凌草甲素和冬凌草乙素与谷胱甘肽的迈克尔加成反应[J].海峡药学,2014,26(7):78–80. LIU Jianqun, GAO Junbo, SHU Jicheng, et al. Micheal addition reaction of oridonin and ponidicin with glutathione[J].Strait Pharm J,2014,26(7):78–80.
- [17] Qin Z, Du T, Zheng Y, et al. Glutathione induced transformation of partially hollow gold–silver nanocages for cancer diagnosis and photothermal therapy[J].Small,2019,15 (35):190–214.
- [18] Liu M, Wang W G, Sun H D, et al. Diterpenoids from *Isodon* species: an update[J]. Nat Prod Rep, 2017:34(9): 1090–1140.

(收稿日期:2019–10–18)