

# 恰玛古异硫氰酸酯的酶解制备及抗宫颈癌活性

解帽轩,塔玛莎·库尔曼江,王昊,  
陈雲杰,努尔阿米乃·麦麦提,王小静\*,李金玉\*

新疆师范大学生命科学学院 新疆特殊环境物种保护与调控生物学实验室  
新疆特殊环境物种多样性应用与调控重点实验室,乌鲁木齐 830017

**摘要:**优化了恰玛古异硫氰酸酯(*Brassica rapa* L. isothiocyanate, BRIe)的外源酶解制备工艺,分析、评价了酶解产物的化学成分和抗宫颈癌活性。采用外源黑芥子酶对恰玛古硫代葡萄糖苷进行降解,通过单因素和正交优化实验确定了酶解法的最佳制备工艺:酶量为 20  $\mu$ L、酶解温度 70  $^{\circ}$ C、pH 6.5、酶解时间 2 h、抗坏血酸浓度为 0.01 mg/g,在此条件下,异硫氰酸酯的提取率为 11.13%;GC-MS 鉴定分析所得酶解产物的化学成分有 7 种,分别为 3-氨基-2-恶唑烷酮、2-恶唑烷硫酮、3-丁烯基异硫氰酸酯、2-苯乙基异硫氰酸酯、异硫氰酸异丙酯、异硫氰酸-2-苯乙酯。采用 MTT 法检测 BRIe 对宫颈癌 Hela、Siha、U14 细胞的增殖抑制活性,其中 BRIe 对 Hela 细胞的抑制作用最强,72 h  $IC_{50}$  为 97.48  $\mu$ g/mL;细胞划痕实验显示 BRIe 抑制了 Hela 细胞的迁移,PI 流式细胞染色显示 BRIe 将细胞周期阻滞在 S 期和 G2/M 期,Hochst 33258、Annexin V-FITC 和 PI 染色表明 BRIe 诱导了 Hela 细胞凋亡。研究结果为开发利用恰玛古用于功能食品和抗宫颈癌药物提供了科学依据。

**关键词:**异硫氰酸酯;恰玛古;酶解;抗肿瘤

中图分类号:Q559

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2024)6-1032-13

DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.6.014

## Enzymatic preparation and antitumor activity of *Brassica rapa* L. isothiocyanate

XIE Guo-xuan, TAMASHA · Kurmanjiang, WANG Hao,  
CHEN Yun-jie, NURAMINA · Mamat, WANG Xiao-jing\*, LI Jin-yu\*

Biology Laboratory of Conservation and Regulation of Special Environmental Species in Xinjiang,  
Key Laboratory of Application and Regulation of Species Diversity in Special Environment in Xinjiang,  
College of Life Sciences, Xinjiang Normal University, Urumqi 830017, China

**Abstract:** The exogenous enzymatic preparation process of *Brassica rapa* L. isothiocyanate (BRIe) was optimized, and anti-cervical cancer activity of the enzymatic products were analyzed and evaluated. The exogenous myrosinase was used for the degradation of *B. rapa* glucosinolate and the optimal preparation process for the enzymatic method was determined by one-way and orthogonal optimization experiments; the amount of myrosinase addition was 20  $\mu$ L, enzymatic temperature was 70  $^{\circ}$ C, pH 6.5, enzyme time was 2 h, and the ascorbic acid concentration was 0.01 mg/g. Under these conditions, the extraction rate of isothiocyanate was 11.13%. There are seven chemical components of the enzymatic hydrolysis products obtained by GC-MS identification and analysis, namely 3-amino-2-oxazolidinone, 2-oxazolidinethione, 2-oxazolidinethione, 3-butenyl isothiocyanate, 2-Phenethyl isothiocyanate, isopropyl isothiocyanate, 2-phenylethyl isothiocyanate. The proliferation inhibitory activity of BRIe on cervical cancer Hela, Siha and U14 cells was detected by MTT assay, in which BRIe had the strongest inhibitory effect on Hela cells, with a 72 h  $IC_{50}$  of 97.48  $\mu$ g/mL; Cell scratch experiments showed that BRIe inhibited the migration of Hela cells, PI flow cytometry staining exhibited that BRIe arrested the cell cycle in the S phase and G2/M phase, and Hoechst

收稿日期:2023-09-05

接受日期:2023-12-18

基金项目:国家自然科学基金(82360847);新疆维吾尔自治区重点研发计划项目子课题(2022B03018-5);新疆特殊环境物种多样性应用与调控重点实验室(XJTSWZ-2021-02);2023年自治区高校科研计划(XJEDU2023P076)

\*通信作者: Tel:86-991-4332325; E-mail:lijinyu234@163.com, wxjdy@163.com

33258, Annexin V-FITC and PI staining demonstrated that BRle induced apoptosis in HeLa cells. The findings provide a scientific basis for the development and utilization of *B. rapa* for functional foods and anti-cervical cancer drugs.

**Key words:** isothiocyanate; *Brassica rapa* L.; enzymatic preparation; antitumor activity

近年来我国癌症发病率日益剧增,癌症的预防与治疗刻不容缓。研究表明,增加十字花科蔬菜的摄入量能够有效降低癌症的发病率<sup>[1]</sup>。十字花科蔬菜中含有丰富的硫代葡萄糖苷即硫苷(glucosinolates, GLs),当植物受到机械损伤时,硫代葡萄糖苷可以被自身的黑芥子酶水解而产生异硫氰酸酯(isothiocyanate)<sup>[2]</sup>。异硫氰酸酯是一类含有共轭双键的化合物,分子式为 R-N=C=S(R代表不同种类的烃基)<sup>[3]</sup>。近年来,异硫氰酸酯因其突出的生物活性成为研究的热点。研究表明异硫氰酸酯具有抗肿瘤<sup>[4]</sup>、抗菌<sup>[5]</sup>、清除自由基<sup>[6]</sup>、抵御病原体<sup>[7]</sup>等多种生物活性。现已被开发用在医疗、食品和农业等众多领域。

恰玛古(*Brassica rapa* L.)学名“芜菁”,十字花科芸薹属两年生草本植物,主要分布在新疆天山西南、塔里木西北地区,是新疆各族人民普遍食用的一种地方特色蔬菜<sup>[8]</sup>。研究发现,恰玛古根中含有丰富的GLs。Zhuang等<sup>[9]</sup>利用超高液相色谱技术,对新疆芜菁营养生长期不同发育阶段、不同生长部位(根、茎、叶)中GLs种类和含量进行了分析,发现营养生长期不同发育阶段,硫苷种类与质量分数都有一定差异。植物体内GLs种类及含量差异将会引起异硫氰酸酯种类和含量的不同,从而导致生物活性的不同。Sun<sup>[10]</sup>曾报道恰玛古籽中含有异硫氰酸苯乙酯、异硫氰酸叔丁酯、异硫氰酸异丙酯和异硫氰酸烯丙酯4种异硫氰酸酯。

目前,异硫氰酸酯的制备主要有化学合成法和酶解法。其中化学合成法步骤繁琐,中间产物多,对环境不友好且合成率低<sup>[11]</sup>;酶解法是利用十字花科植物中硫代葡萄糖苷-黑芥子酶这一系统<sup>[12]</sup>,从植物中提取出异硫氰酸酯,具有操作简单,产率相对较高等优点。酶解法又分为内源黑芥子酶降解法和外源黑芥子酶降解法。采用内源酶解制备异硫氰酸酯,虽然工艺简单,但植物体内的内源黑芥子酶不能完全释放,导致酶解时间过长,效率较低。Ding<sup>[13]</sup>通过比较油菜籽内源酶和外源酶降解GLs生成异硫氰酸酯量,发现外源黑芥子酶生成异硫氰酸酯的含量是内源黑芥子酶生成异硫氰酸酯的7.6倍,经GC-MS鉴定分析,外源黑芥子酶降解产物种类多,

相对含量高,杂质少。

本研究以恰玛古根为原料,采用外源黑芥子酶降解法来制备恰玛古异硫氰酸酯(*Brassica rapa* L. isothiocyanate, BRle)在单因素的基础上筛选出酶解时间、酶解温度、pH、抗坏血酸浓度为显著影响因素,采用四因素三水平正交实验优化提取工艺;最后通过气相色谱-质谱法(GC-MS)分析其化学成分,并研究了异硫氰酸酯的抗癌作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞、材料与仪器

人宫颈癌细胞 HeLa、人宫颈癌细胞 Siha、小鼠宫颈癌细胞 U14 由新疆大学生命科学学院科研实验中心馈赠。

无水乙醇(批号:20220506)、甲醇(批号:20220412)、L-抗坏血酸(批号:A103533-100 g)(上海阿拉丁生化科技股份有限公司);1,4-苯二硫醇(批号:M06M9E55052,上海源叶生物科技有限公司);异硫氰酸酯苯乙酯(批号:SHBL9110,上海麦克林生化科技有限公司);黑芥子酶来源于白芥种子(批号:T2458-25 UN,西格玛奥德里奇上海贸易有限公司);DMEM/1640 基础培养基(批号:AD17321264,Hycon 科技公司);胎牛血清(批号:2306214)、细胞培养级二甲基亚砜 DMSO(批号:CD341434200)、100 × 青-链霉素混合液(批号:2348380)(美国 Gibco 公司);MTT(批号:061622221107,北京索来宝生物技术有限公司);Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(批号:090921211105)、细胞凋亡-Hoechst 33258 染色试剂盒(批号:122121220428)(碧云天生物技术有限公司);胰蛋白酶-EDTA(批号:221107,索来宝生物技术有限公司)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 GLs 的提取

将新鲜的恰玛古切片放置烘箱内(70 °C, 48 h)烘干,用粉碎机粉碎,过筛(140 目)收集干粉。将 20 g 恰玛古干粉 110 °C 烘干 1 h 使其内源黑芥子酶钝化,石油醚脱脂回流 2 次(料液比 1:10)后振荡器震荡 2 h 使其干燥,通风橱通风过夜;70% 乙醇(料液比 1:10)70 °C 水浴浸提 3 次,每次 20 min。离心

(4 000 r/min, 15 min)取上清;使用0.45 μm有机滤膜过滤,收集滤液,并加入粗提液体积1/50的0.5 mol/L醋酸铅溶液去除蛋白,再次离心(4 000 r/min, 15 min)取上清;旋转蒸发浓缩直至原体积的10%左右,-80℃冷冻过夜,次日浓缩冻干,即得到GLs粗提物冻干粉,并计算其提取率。

### 1.2.2 BRIe的酶解制备

称取一定量的GLs冻干粉于50 mL容量瓶中,经酶处理后再进行100℃灭酶处理,探究GLs冻干粉添加量、酶量、酶解温度、酶解时间、pH、抗坏血酸浓度等6个因素对BRIe提取量的影响,提取结束后用5 mL乙酸乙酯超声提取30 min,45℃水浴30 min后离心15 min(5 000 r/min)取有机层过0.45 μm滤膜,35℃旋转蒸发浓缩,即得到BRIe,通过紫外分光光度计测其在365 nm处的吸光值变化,按照公式(1)计算其BRIe提取量。

$$E = \frac{A_1 - 0.0016}{0.0019} \times V \times M \quad (1)$$

式中: $E$ 表示BRIe的提取量,g; $A_1$ 表示样品在365 nm处的吸光光度值; $V$ 表示样品体积,mL; $M$ 表示异硫氰酸酯标准品(异硫氰酸苯乙酯)的摩尔质量163.24,g/mol。

### 1.2.3 单因素实验

#### 1.2.3.1 GLs冻干粉添加量对BRIe提取量的影响

将一定量的GLs冻干粉置于容量瓶中,按照10 mg/mL黑芥酶液20 μL,1 mL抗坏血酸(0.005 mg/g)与5 mL的磷酸钾缓冲液(1/15 mol/L,pH 6.5)混合,40℃反应2 h,100℃灭酶15 min终止反应。后续操作如“1.2.2”所述,观察BRIe提取量在0.5、1、2、3、4 g GLs冻干粉添加量条件下的变化。

#### 1.2.3.2 黑芥子酶添加量对BRIe提取量的影响

将2 g的GLs冻干粉置于容量瓶中,按照10 mg/mL黑芥酶液若干毫升,1 mL抗坏血酸(0.005 mg/g)与5 mL的磷酸钾缓冲液(1/15 mol/L,pH 6.5)混合,40℃反应2 h,100℃灭酶15 min终止反应。后续操作如“1.2.2”所述,观察BRIe提取量在20、30、40、50 μL条件下的变化。

#### 1.2.3.3 反应温度对BRIe提取量的影响

将2 g的GLs冻干粉置于容量瓶中,按照10 mg/mL黑芥酶液20 μL,1 mL抗坏血酸(0.005 mg/g)与5 mL的磷酸钾缓冲液(1/15 mol/L,pH 6.5)混合,适当温度反应2 h,100℃灭酶15 min终止反应。后续操作如“1.2.2”所述,观察BRIe提取量在40、

50、60、70℃酶解温度条件下的变化。

#### 1.2.3.4 反应时间对BRIe提取量的影响

将2 g的GLs冻干粉置于容量瓶中,按照10 mg/mL黑芥酶液20 μL,1 mL抗坏血酸(0.005 mg/g)与5 mL的磷酸钾缓冲液(1/15 mol/L,pH 6.5)混合,40℃反应若干小时,100℃灭酶15 min终止反应。后续操作如“1.2.2”所述,观察BRIe提取量在1、2、3、4 h酶解时间条件下的变化。

#### 1.2.3.5 反应pH对BRIe提取量的影响

将2 g的GLs冻干粉置于容量瓶中,按照10 mg/mL黑芥酶液20 μL,1 mL抗坏血酸(0.005 mg/g)与5 mL的磷酸钾缓冲液(1/15 mol/L)混合,40℃反应2 h,100℃灭酶15 min终止反应。后续操作如“1.2.2”所述,观察BRIe提取量在磷酸钾缓冲液pH为5.5、6.5、7.5、8.5条件下的变化。

#### 1.2.3.6 抗坏血酸的浓度对BRIe提取量的影响

将2 g的GLs冻干粉置于容量瓶中,按照10 mg/mL黑芥酶液20 μL,1 mL抗坏血酸与5 mL的磷酸钾缓冲液(1/15 mol/L)混合,40℃反应2 h,100℃灭酶15 min终止反应。后续操作如“1.2.2”所述,观察BRIe提取量在抗坏血酸浓度为0.005、0.01、0.02 mg/g条件下的变化。

### 1.2.4 正交实验

根据单因素实验,在GLs冻干粉添加量为3 g、黑芥子酶添加量20 μL的前提下,以BRIe提取量为响应值,选择酶解时间( $A$ )、酶解温度( $B$ )、抗坏血酸浓度( $C$ )、pH( $D$ )为考察因素,采用Spass Au软件,设计了四因素三水平正交表,试验设计水平安排见表1,记录每个实验条件下BRIe的提取量,对实验数据进行极差和方差分析。

### 1.2.5 GC-MS分析对BRIe提取量的影响

#### 1.2.5.1 气相色谱条件

色谱柱为Hp-5ms石英毛细管柱;载气为高纯度氦气;流速为1 mL/min;进样口温度为250℃,接口温度为280℃;程序升温:起始温度为50℃,保持2 min,5℃/min升温至280℃,保持6 min。

#### 1.2.5.2 质谱条件

电子轰击(EI)离子源,电离电压70 eV;离子源温度230℃;接口温度270℃;四极杆温度150℃;溶剂延迟时间3 min;扫描范围40~800  $m/z$ 。对照质谱库NIST进行成分的分析。

### 1.2.6 BRIe抗宫颈癌活性检测

#### 1.2.6.1 MTT法检测细胞活力

表 1 正交实验因素及水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal design

水平 Level	因素 Factor			
	A:酶解时间 Enzymolysis time (h)	B:酶解温度 Enzymolysis temperature (°C)	C:抗坏血酸浓度 Ascorbate concentration (mg/g)	D:pH
1	1	40	0.005	5.5
2	2	50	0.01	6.5
3	3	70	0.02	7.5

称取 1 mg 酶解制备的 BR1e 冻干粉,用 1 mL DMSO 溶解,母液放冰箱冷藏备用。将处于对数生长期的 HeLa、U 14、Siha 细胞稀释成单细胞混悬液,以  $1 \times 10^5$  个/mL 细胞浓度接种于 96 孔的培养板上,每孔体积 100  $\mu$ L,同时 96 孔板细胞培养板的边缘孔以无菌的 PBS 缓冲液填充,尽量避免边缘效应。待 24 h 后加药(待测样品通过 DMSO 溶解稀释分别为 3 个浓度)。各个浓度(100、200、400  $\mu$ g/mL)均做 3 个复孔,并设置等量 DMSO 的实验组和有细胞但不加药物的对照组(control, Con)。将细胞板置于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 培养箱分别 24 h、48 h、72 h,检测前,在接种板的各孔中加入 100  $\mu$ L 稀释 10 倍的 MTT 工作液,培养箱继续培养 4 h 后,用酶联免疫检测仪检测其在 490 nm 处的吸光值,并按照公式(2)计算相对细胞活力。

$$C = \frac{OD_{\text{实验组}} - OD_{\text{对照组}}}{OD_{\text{对照组}}} \times 100\% \quad (2)$$

式中:  $C$  表示相对细胞活力;  $OD_{\text{实验组}}$  为 DMSO 组与 100、200、400  $\mu$ g/mL 的药物组在 490 nm 处的吸光值;  $OD_{\text{对照组}}$  为 Con 组在 490 nm 处的吸光值。

#### 1.2.6.2 细胞划痕检测细胞迁移

将对数生长期的 HeLa 细胞以每皿  $1 \times 10^5$  个细胞接种在 24 孔板并在 37 °C 培养箱中培养 24 h。待细胞长满 80% 时,用 10  $\mu$ L Tip 枪头在每孔中央划线,再用 500  $\mu$ L PBS 清洗 1 遍。用 0、100、200、400  $\mu$ g/mL 的 BR1e 处理细胞 24、48 h 后,倒置显微镜观察拍照,最后按照公式(3)计算伤口愈合率。

$$W = \frac{S_t}{S_0} \times 100\% \quad (3)$$

式中:  $W$  表示伤口愈合率;  $S_t$  表示某一时间点划痕面积,  $\mu\text{m}^2$ ;  $S_0$  表示 0 h 划痕面积,  $\mu\text{m}^2$ 。

#### 1.2.6.3 流式细胞术检测细胞周期

将对数生长期的 HeLa 细胞以每皿  $4 \times 10^5$  个细胞接种于 60 mm 的细胞培养皿中,并在 37 °C 培养

箱中培养 24 h;用 0、100、200、400  $\mu$ g/mL 的 BR1e 处理细胞 12 h 后胰酶消化细胞从而获得细胞悬液。细胞悬液经 1 200 r/min 离心 5 min 后,弃上清,用 1 mL PBS 重复清洗 2 次,离心去上清。然后用 70% 的预冷乙醇在 4 °C 固定细胞 3 h 后,用 1 mL PBS 清洗 2 次,1 200 r/min 离心 5 min 后收集细胞,每个样品中加入 PI 染料,室温避光染色 30 min,最后用 300 目铜网过滤样品后,流式细胞仪上机检测。

#### 1.2.6.4 Hoechst staining 33258 染色法检测细胞核形变化

将对数生长期的 HeLa 细胞以每皿  $1 \times 10^5$  个细胞接种在 24 孔板并在 37 °C 培养箱中培养 24 h;用 0、100、200、400  $\mu$ g/mL 的 BR1e 处理细胞 24 h 后,去除培养基,每孔用 500  $\mu$ L PBS 清洗 1 次,然后每孔加入 500  $\mu$ L 的 70% 预冷乙醇并在 4 °C 冰箱内固定 10 min, PBS 清洗 2 次;最后向每孔中加入 500  $\mu$ L Hoechst 33258 染液,避光染色 10 min,荧光正置显微镜拍照观察。

#### 1.2.6.5 流式细胞术检测细胞凋亡

将对数生长期的 HeLa 细胞以每皿  $4 \times 10^5$  个细胞接种于 60 mm 的细胞培养皿中,并在 37 °C 培养箱中培养 24 h;用 0、100、200、400  $\mu$ g/mL 的 BR1e 处理细胞 24 h 后,胰蛋白酶消化并收集细胞悬液;按照凋亡试剂盒说明书对样品进行 Annexin V-FITC 和 PI 双染并避光染色 10 min;样品用 300 目铜网过滤后流式细胞仪进行检测。

### 1.3 数据处理与分析

通过 GraphPadPrism9.4 软件绘图,统计分析采用极差、多因素以及单因素(ANOVA)方差分析,结果以平均值  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义;GC-MS 数据通过新疆理化所数据处理软件分析图谱,结合人工图谱解析及资料分析,确定鉴定物质的各个化学成分的结构式及含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 GLs 提取结果

按照“1.2.1”的乙醇回流粗提法提取到硫苷。恰玛古干粉总重为 900 g, 提取到的 GLs 冻干粉重为 118.2 g, 其提取率为 13.13%。

### 2.2 单因素实验结果

#### 2.2.1 GLs 冻干粉添加量对 BRIe 提取量的影响

在不同 GLs 冻干粉添加量下对硫苷进行酶解, BRIe 的提取量结果见图 1。随着 GLs 冻干粉添加量的改变, 在 GLs 冻干粉添加量为 0.5 ~ 1 g 时, BRIe 的提取量随着 GLs 冻干粉添加量的增加而增多, 当添加量为 2 g 时, 酶被底物充分饱和, BRIe 提取量达到最大值 19.52 g, 之后再增加 GLs 时, BRIe 的提取量反而下降, 分析推测当底物 GLs 添加量超过 2 g 以上时, 此时底物过量, 超出了酶所能结合的量, 过量的底物聚集在酶分子上, 生成无活性的中间产物, 不能释放出酶分子, 从而也会降低反应速度, 因此 BRIe 的提取量反而大幅度减少。

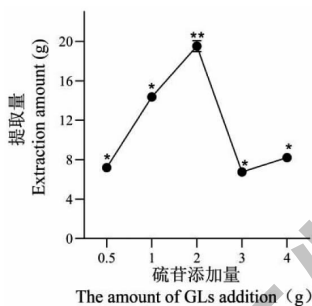


图 1 硫苷添加量对恰玛古异硫氰酸酯提取量的影响

Fig. 1 Effect of the amount of GLs addition on the BRIe extraction amount

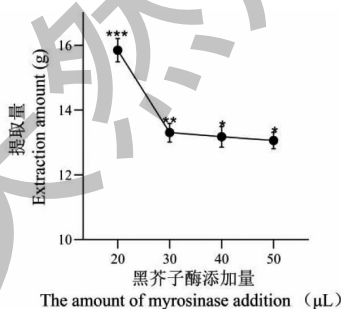


图 2 黑芥子酶添加量对恰玛古异硫氰酸酯提取量的影响

Fig. 2 Effect of the amount of myrosinase addition on the BRIe extraction amount

#### 2.2.2 黑芥子酶添加量对 BRIe 的影响

在不同黑芥子酶添加量下对 GLs 进行酶解,

BRIe 的提取量结果见图 2。从图中可以看出, 随着黑芥子酶添加量的增加, BRIe 的提取量有所变化。当酶的添加量 20 μL 时, BRIe 的提取量达到最大, 最大提取量为 15.84 g, 当继续增加黑芥子酶量时, 因底物有限, 底物与酶的反应达到饱和状态, 因此, BRIe 的提取量不会再增加。

#### 2.2.3 酶解温度对 BRIe 提取量的影响

在不同酶解温度下对 GLs 进行酶解, BRIe 的提取量结果见图 3。从图中可以看出, 随着温度的升高, BRIe 的提取量在 40 ~ 50 °C 呈现递增趋势, 但在 60 °C 时出现拐点, 70 °C 时 BRIe 的提取量最高, 其提取量为 4.05 g。分析其原因, 可能 60 °C 的温度对于黑芥子酶具有不适应性。综上, 70 °C 是黑芥子酶反应的最适温度。

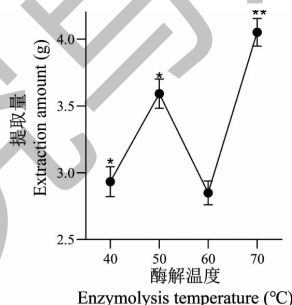


图 3 酶解温度对恰玛古异硫氰酸酯提取量的影响

Fig. 3 Effect of enzymolysis temperature on the BRIe extraction amount

#### 2.2.4 酶解时间对 BRIe 提取量的影响

在不同反应时间下对 GLs 进行酶解, BRIe 的提取量结果见图 4。从图中可以看出, 随着反应时间的延长, BRIe 的提取量逐渐增加, 当反应时间为 3 h 时, BRIe 的提取量达到最大为 0.650 g, 酶解时间较短, 底物 GLs 没有得到充分的酶解, 所以 BRIe 的提取量较低。

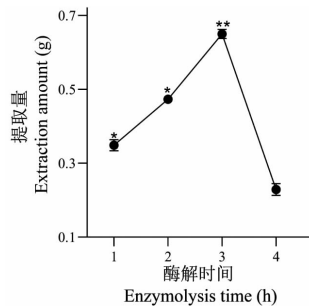


图 4 酶解时间对恰玛古异硫氰酸酯提取量的影响

Fig. 4 Effect of enzymolysis time on the BRIe extraction amount

### 2.2.5 反应 pH 对 BR1e 提取量的影响

在不同反应 pH 下对 GLs 进行酶解, BR1e 的提取量结果见图 5。从图中可以看出,当 pH 在中性或碱性条件下时,降解产物以腈类为主。在 pH 为 6.5 时, BR1e 的提取量达到最大,此时 BR1e 的提取量为 6.54 g。

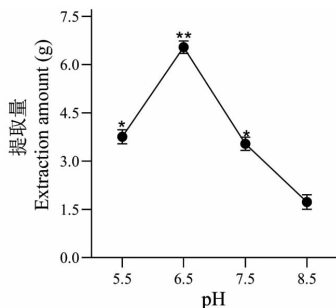


图 5 pH 对恰玛古异硫氰酸酯提取量的影响

Fig. 5 Effect of pH on the BR1e extraction amount

### 2.2.6 抗坏血酸对 BR1e 提取量的影响

在不同抗坏血酸浓度下对 GLs 进行酶解, BR1e 的提取量结果见图 6。从图中可以看出, BR1e 的提取量随着抗坏血酸浓度先增高后降低, 据文献报道, 加入适量的抗坏血酸可以提高黑芥子酶的活性, 当抗坏血酸浓度为 0.005 mg/g 时, 黑芥子酶活性达到最大, 此时 BR1e 的提取量达到最大为 6.28 g。

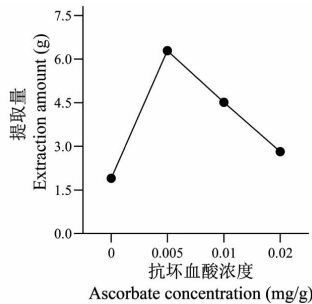


图 6 抗坏血酸对恰玛古异硫氰酸酯提取量的影响

Fig. 6 Effect of ascorbate concentration on the BR1e extraction amount

## 2.3 正交实验结果

通过单因素实验, 选取酶解时间 ( $A$ )、酶解温度 ( $B$ )、抗坏血酸浓度 ( $C$ )、pH ( $D$ ) 为考察因素, 正交实验结果详见表 2, 通过各个因素的  $K$  值和极差进行直观分析, 结果显示各因素对 BR1e 提取量影响大小依次为:  $C$  (抗坏血酸浓度)  $> A$  (酶解时间)  $> D$  (pH)  $> B$  (酶解温度), 以极差最小的因素  $B$  为误差项, 方差分析结果详见表 3, 其中酶解时间、pH、抗坏血酸浓度对 BR1e 提取量有显著影响; 通过  $K$  值可以确定 BR1e 的最佳提取条件为  $A_3B_2C_2D_2$ , 即硫苷冻干粉中加入 0.01 mg/g 的抗坏血酸、pH 为 6.5 的磷酸钾缓冲液, 在 70 °C 的条件下反应 3 h。

表 2  $L_9(3^4)$  正交实验结果分析

Table 2 The result of  $L_9(3^4)$  orthogonal test

水平 Level	因素 Factor				提取量 Extraction amount (g)
	$A$	$B$	$C$	$D$	
1	1	1	1	1	0.79
2	1	2	2	2	1.08
3	1	3	3	3	0.71
4	2	1	2	3	0.91
5	2	2	3	1	0.66
6	2	3	1	2	0.83
7	3	1	3	2	0.97
8	3	2	1	3	0.99
9	3	3	2	1	1.47
$K_1$	2.58	2.67	2.61	2.92	
$K_2$	0.078	2.73	3.46	2.96	
$K_3$	3.43	3.01	2.34	2.53	
极差 Range	3.352	0.34	1.12	0.43	

表3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

方差来源 Source of variance	偏差平方和 Sum of squares of deviations	自由度 <i>df</i>	<i>F</i> 值 <i>F</i> -value	显著水平 Significance level
A	16.43	2	6.25	$P < 0.05$
B	0.89	2	0.005 8	$P > 0.05$
C	18.68	2	9.74	$P < 0.05$
D	15.63	2	8.45	$P < 0.05$
误差 Error	1.87	2	-	-

注:  $F_{0.05}(2, 2) = 21.00$ ;  $F > F_{0.05}(2, 2)$ 。

## 2.4 GC-MS 分析结果

按照“1.2.5”的 GC-MS 条件对 BRIe 成分进行检测,经谱库检索后相关性较高,所得的总离子图见图 7,对以上产物分析,发现有 7 种酶解相关的化合物,分别是 3-氨基-2-恶唑烷酮、2-恶唑烷硫酮、3-

丁烯基异硫氰酸酯、2-苯乙基异硫氰酸酯、1-异硫氰酸丙酯、异硫氰酸异丙酯、异硫氰酸-2-苯乙酯,整理结果见表 4,其中 1-异硫氰酸丙酯、异硫氰酸异丙酯和异硫氰酸-2-苯乙酯的相对丰度分别为 1.999%、1.999% 和 1.875%。

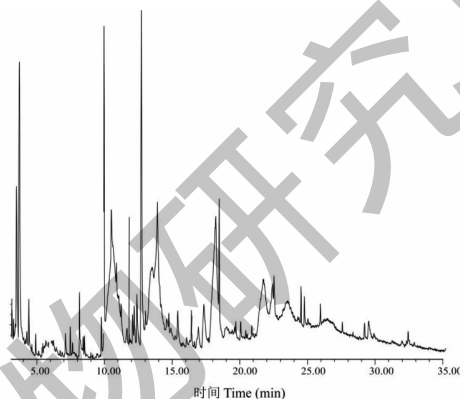


图7 恰玛古异硫氰酸酯总离子流图

Fig. 7 Total ion chromatogram of BRIe

表4 恰玛古异硫氰酸酯的 GC-MS 分析

Table 4 GC-MS analysis of BRIe

序号 No.	保留时间 $t_R$ (min)	成分 Constituent	CAS	分子式 Molecular formula	丰度 Intensity
1	3.285	3-氨基-2-恶唑烷酮 3-Amino-2-oxazolidinone	000080-65-9	$C_3H_6N_2O_2$	0.159
2	3.729	2-恶唑烷硫酮 2-Oxazolidinethione	005840-81-3	$C_3H_5NOS$	6.067
3	5.820	3-丁烯基异硫氰酸酯 3-Buten-1-yl isothiocyanate	003386-97-8	$C_5H_7NS$	0.33
4	6.132	苯乙基异硫氰酸酯 Phenethyl isothiocyanate	001943-82-4	$C_9H_9NO$	0.254
5	17.390	1-异硫氰酸丙酯 1-Propyl isothiocyanate	000628-30-8	$C_4H_7NS$	1.999
6	17.390	异硫氰酸异丙酯 Isopropyl isothiocyanate	002253-73-8	$C_4H_7NS$	1.999
7	18.495	异硫氰酸-2-苯乙酯 2-Phenylethyl isothiocyanate	002257-09-2	$C_9H_9NS$	1.875

## 2.5 BRIe 抗宫颈癌活性

### 2.5.1 MTT 法检测细胞增殖

采用不同浓度的 BRIe (100、200、400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 作用宫颈癌 HeLa、Siha、U14 细胞 24、48、72 h 后进行细胞形态观察,倒置显微镜观察结果见图 8,随着 BRIe 作用浓度的增强,HeLa、Siha、U14 细胞的生长活力降低,表现在细胞数量逐渐减少,细胞逐渐失去形状。

采用 MTT 法检测不同浓度的 BRIe (100、200、400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 处理 HeLa、Siha、U14 细胞不同时间 (24、48、72 h) 下的抑制作用。如图 9 所示,BRIe 能够显著抑制细胞的增殖且呈时间和剂量依赖性。当

BRIe 处理 HeLa、Siha、U14 细胞 24 h 后,HeLa 细胞的细胞活力从 93.78% 降至 32.42%;Siha 细胞的细胞活力从 94.49% 降至 70.22%;U14 的细胞活力从 98.74% 降至 47.48%。经 Prism 9.4 计算,BRIe 处理的 HeLa 细胞在 24、48、72 h 的  $\text{IC}_{50}$  值分别为 197.48、100.14、97.48  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;Siha 细胞在 24、48、72 h 的  $\text{IC}_{50}$  值分别为 489.72、402.16、399.12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;U14 细胞在 24、48、72 h 的  $\text{IC}_{50}$  值分别为 152.75、107.29、98.37  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。以上结果表明,BRIe 能够显著抑制宫颈癌细胞的增殖,其中 HeLa 综合抑制效果最强。因此,后续细胞毒性实验主要在 HeLa 细胞开展。

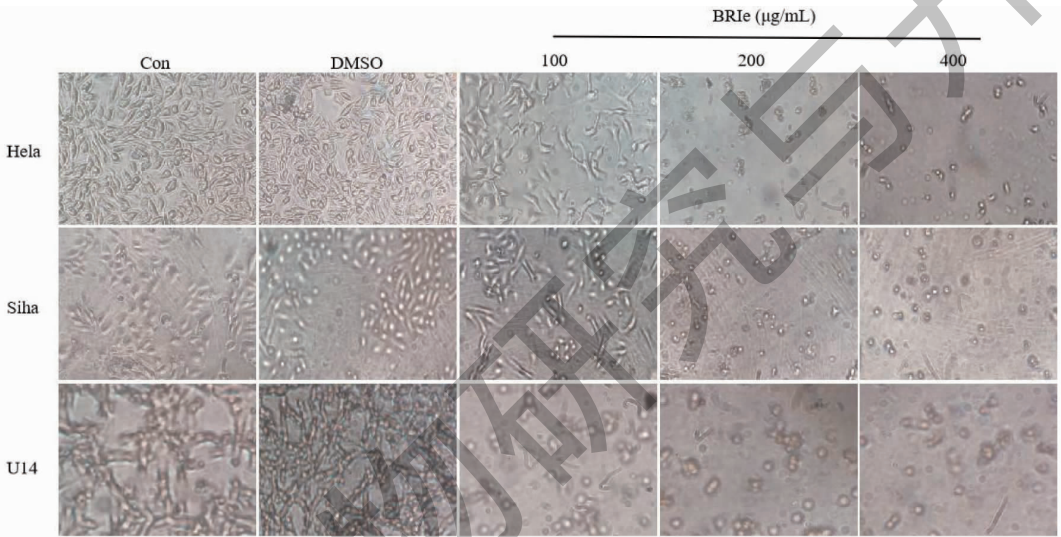
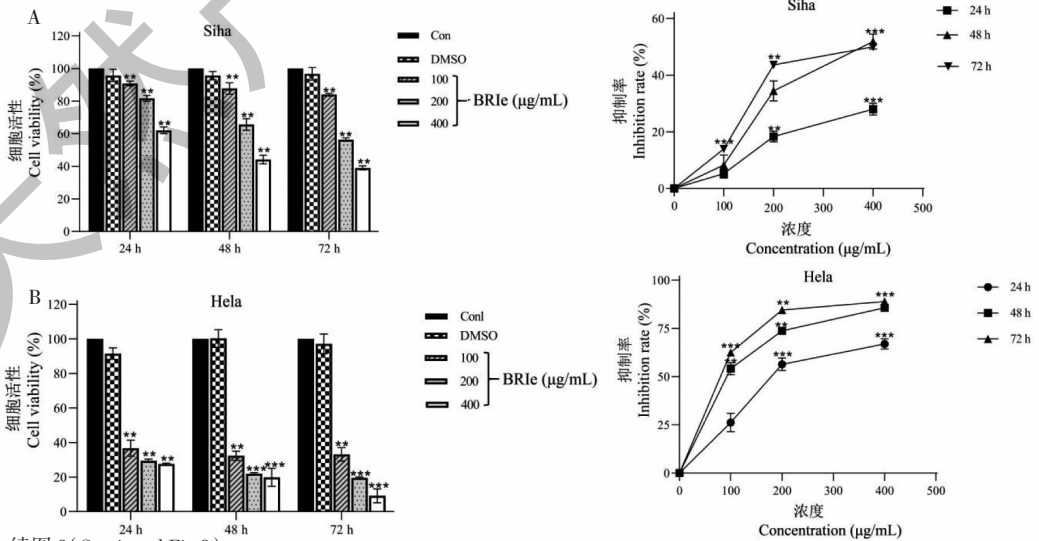


图 8 BRIe 作用宫颈癌细胞后的形态变化

Fig. 8 Morphological changes of cervical cancer cells after BRIe treatment



续图 9 (Continued Fig. 9)



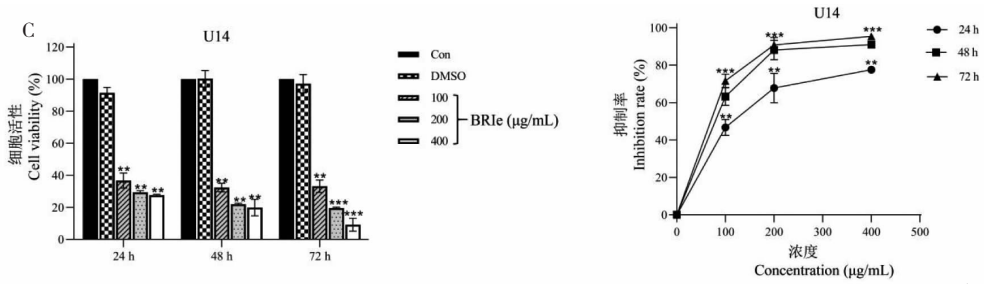


图9 BR1e对Siha、Hela、U14细胞活力的影响

Fig. 9 Effect of BR1e on HeLa, Siha, U14 cells viability

注:与Con比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ , \*\*\* $P < 0.001$ ,下同。Note: Compared with Con, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , the same below.

### 2.5.2 BR1e抑制Hela细胞的迁移

肿瘤发展中最关键的环节是细胞的迁移。为了探究RR1e能否抑制Hela细胞的迁移,采用细胞划痕的实验来探究细胞的迁移。细胞迁移结果见图

10A, BR1e作用Hela细胞24、48 h后,药物组的伤口愈合率从1.5%下降到0.2% (见图10B)。结果表明, BR1e能够抑制细胞的迁移。

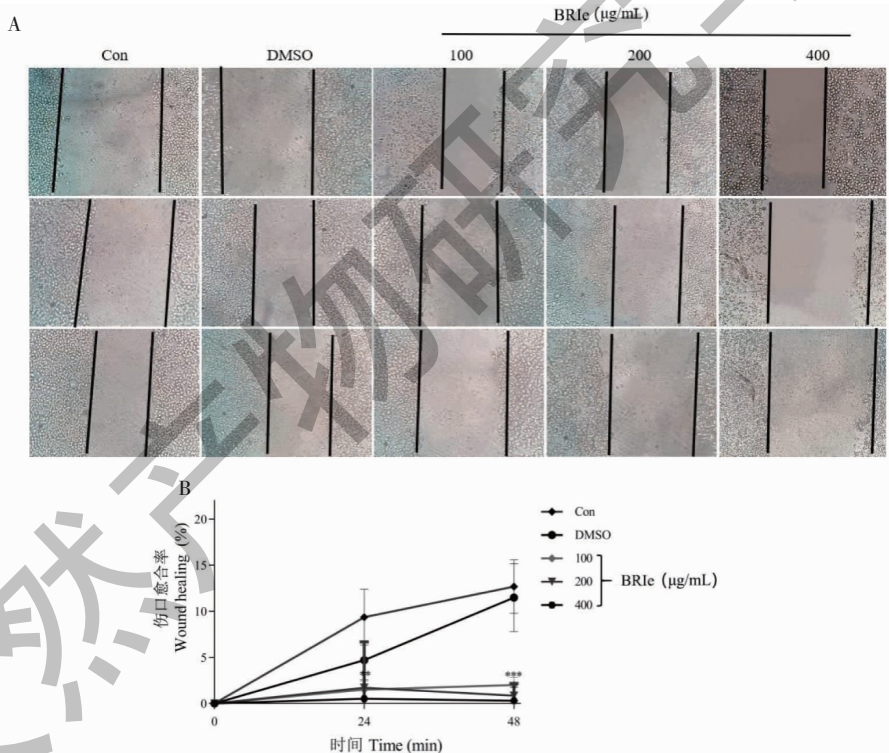


图10 BR1e对Hela细胞迁移能力的影响

Fig. 10 Effect of BR1e on the migration ability of HeLa cells

### 2.5.3 BR1e将Hela细胞阻滞在S期和G2/M期

为了检测BR1e是否能够阻滞Hela细胞的周期,用不同浓度的BR1e作用于Hela细胞24 h,然后进行PI单染,流式细胞术检测结果详见图11,与Con相比,100、200、400 µg/mL的BR1e使Hela细胞在S期和G2/M期分布增加,表明BR1e可以将Hela

细胞周期阻滞在S期和G2/M期。

### 2.5.4 BR1e诱导Hela细胞核DNA的凝聚

Hoechst 33258是一种能够对DNA染色用于检测细胞凋亡的荧光染料。不同浓度的BR1e作用于Hela细胞24 h后,用Hoechst 33258染色,荧光显微镜观察,如图12所示,与Con组相比,药物组的染

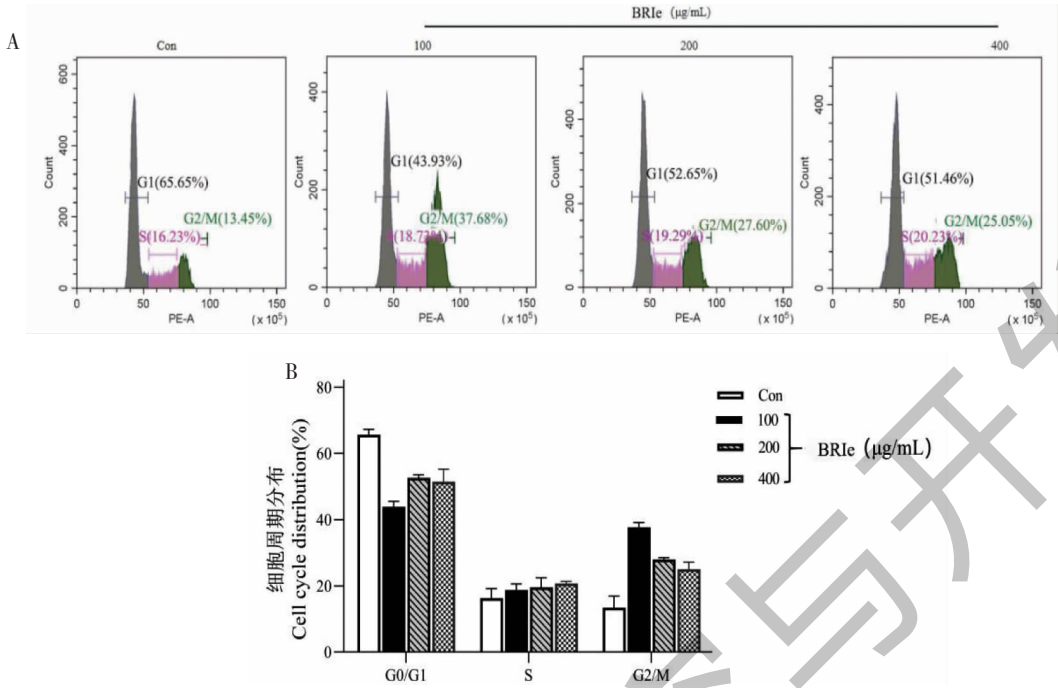


图 11 BR1e 对 HeLa 细胞周期的影响

Fig. 11 Effect of BR1e on the cell cycle of HeLa cells

色质浓缩,蓝白荧光强度随着浓度的增加而增强,细胞核碎片现象加重。表明 BR1e 诱导了 HeLa 细胞凋亡(见图 12B),细胞的凋亡数呈现浓度依赖性。

### 2.5.5 BR1e 诱导 HeLa 细胞凋亡

诱导肿瘤细胞凋亡是治疗癌症的手段之一。为

了探究 BR1e 是否对细胞凋亡有影响,采用 Annexin V-FITC 双染法,流式细胞术检测 BR1e 处理 HeLa 细胞 24 h 后的细胞凋亡率结果详见图 13,随着药物作用浓度的升高,其凋亡率由原来的 2.33% 显著升至 46.9%。这表明 BR1e 诱导了 HeLa 细胞凋亡。

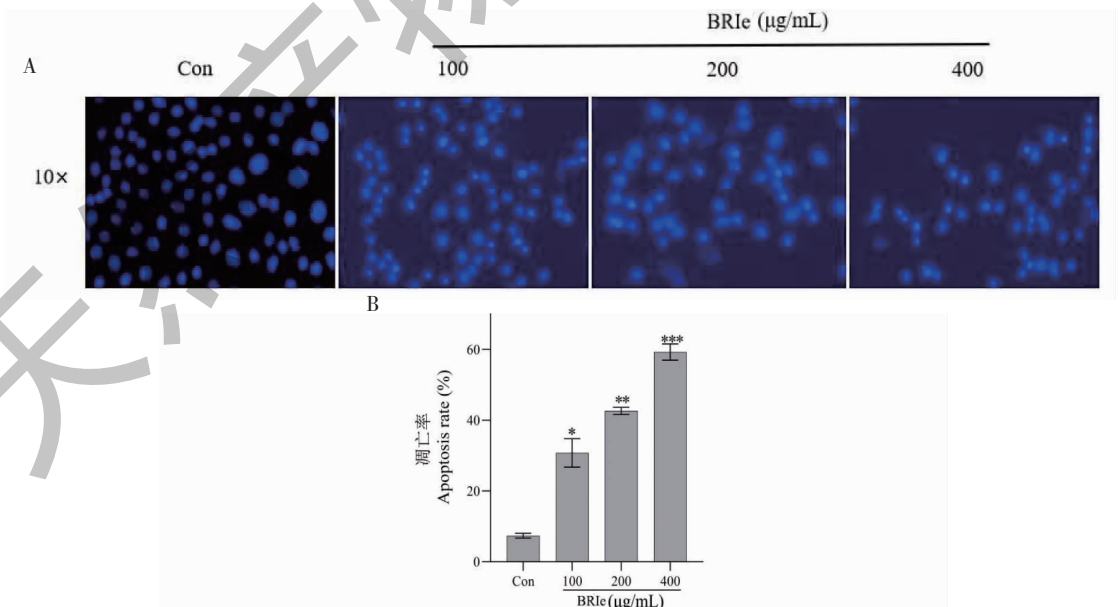


图 12 Hoechst 33258 检测 BR1e 对 HeLa 细胞凋亡的影响

Fig. 12 Effect of BR1e on HeLa cell apoptosis by Hoechst 33258 staining

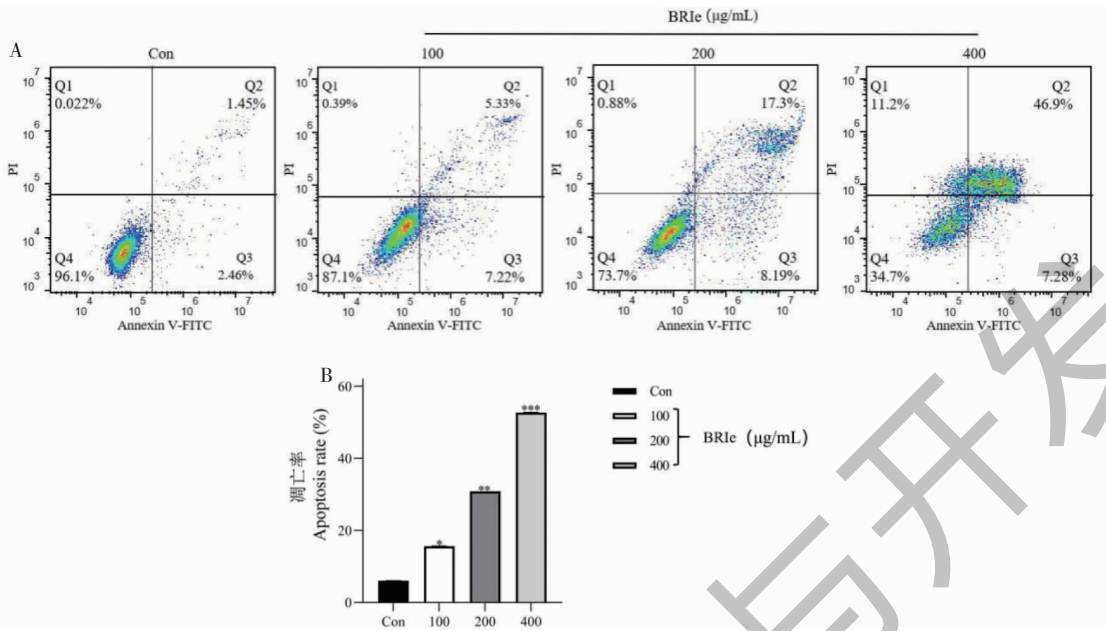


图 13 HeLa 细胞凋亡率的变化

Fig. 13 Change of apoptosis rate of HeLa cells

### 3 讨论与结论

癌症是威胁人类生命安全的恶性疾病之一,多项流行病学研究发现,多食用十字花科蔬菜可以有效地降低患癌的风险<sup>[14]</sup>。异硫氰酸酯是十字花科蔬菜中自身酶解的产物之一。研究表明异硫氰酸酯能够激活人体内 II 相酶(phase II enzymes),使得 I 相反应产物与葡萄糖醛酶(glucuronic acid)以及谷胱甘肽(glutathione)结合,从而促使致癌物尽快排出体外,因此异硫氰酸酯在医学上可作为一种癌症抑制剂<sup>[15]</sup>。恰玛古是新疆一种药食同源植物,含有硫代葡萄糖苷、黄酮、异硫氰酸酯、多糖等多种活性成分,然而目前对恰玛古异硫氰酸酯的开发利用尚不足。酶解法是目前提取异硫氰酸酯的一种环保方法,通过优化酶解条件不仅可以降低中间其他次级代谢物的产生,还可以加快目标产物的生成速度,从而增加产量<sup>[16]</sup>。Jang<sup>[17]</sup>利用十字花科体内的内源黑芥子酶制备了异硫氰酸酯。内源酶法虽然工艺简单,但植物体内的黑芥子酶不能完全释放,导致酶解时间过长,效率低。相较于内源酶,采用外源酶制备异硫氰酸酯,更易操控外源酶的酶解条件,从而有利于定向改变酶解产物种类和提高产物量。因此,优化外源酶解条件是制备异硫氰酸酯的关键。

酶解产物的形成除了与硫苷种类有关,还包括:酶解时间、酶解温度、pH、压力和  $Fe^{2+}$  的存在。Latté<sup>[18]</sup>发现当溶液 pH 为中性时,有利于硫苷生成

异硫氰酸盐,但在 pH 为酸性/碱性、环硫特性蛋白或  $Fe^{2+}$  存在时,酶解的产物会大量形成腈类。Yang<sup>[19]</sup>采用响应曲面法对 pH、EDTA 和抗坏血酸因素进行了分析,发现这三种因素对异硫氰酸的提取量有显著影响。Burmeister<sup>[20]</sup>发现抗坏血酸取代了黑芥子酶活性位点中催化碱的功能,具有催化黑芥子酶的特性。在新鲜的西兰花中添加适量的抗坏血酸能显著提高黑芥子酶的活性<sup>[21]</sup>,从而提高异硫氰酸酯的生成量。本研究采用外源黑芥子酶(来源于白芥种子)降解法制备 BR1e,通过单因素和正交实验优化酶解条件,筛选出对 BR1e 提取量具有显著影响的四个因素:酶解时间、酶解温度、抗坏血酸浓度、pH,确定了 BR1e 的最佳酶解条件:黑芥子酶添加量为 20  $\mu$ L、反应温度为 70  $^{\circ}$ C、反应时间为 3 h、pH 为 6.5、抗坏血酸浓度 0.1 mg/g、GLs 冻干粉为 2 g。有趣的是,本研究的最适酶解温度为 70  $^{\circ}$ C。有研究报道从西兰花中酶解植物异硫氰酸酯的温度范围为 20 ~ 60  $^{\circ}$ C<sup>[22]</sup>,其最适酶解温度为 40  $^{\circ}$ C;从山葵根中提取异硫氰酸酯的温度范围为 30 ~ 90  $^{\circ}$ C,其最适酶解温度为 70  $^{\circ}$ C<sup>[23]</sup>。因此,黑芥子酶来源种属不同,其最适温度也会有差异。

通常,酶解的条件不同,形成的异硫氰酸酯的种类也不同。Chen 等<sup>[22]</sup>采用内源酶解法,利用 GC-MS 鉴定西兰花中酶解产物为烯丙基异硫氰酸酯、异丁基异硫氰酸酯、1-丁烯基异硫氰酸酯、4-甲基硫代

丁腈、5-甲基硫代戊腈、3-(甲基硫代)丙基异硫氰酸酯、丁基异硫氰酸酯、萝卜硫腈、萝卜硫素,其中萝卜硫素含量最高。Yang<sup>[19]</sup>采用外源酶解法,鉴定西蓝花中的酶解产物为烯丙基异硫氰酸酯、苯乙基异硫氰酸酯、环戊基异硫氰酸酯、苯丙腈、2,1-苯丙噁唑烷酮、致甲状腺肿素。本研究通过 GC-MS 分析了 BRIe 的最佳酶解条件的组成成分,鉴定出 7 种酶解相关产物,分别是 3-氨基-2-恶唑烷酮、2-恶唑烷硫酮、3-丁烯基异硫氰酸酯(3-buten-1-yl isothiocyanate, BITC)、异硫氰酸酯苯乙酯(phenethyl isothiocyanate, PEITC)、1-异硫氰酸丙酯、异硫氰酸酯异丙酯(isopropyl isothiocyanate)、异硫氰酸-2-苯乙酯(2-phenylethyl isothiocyanate, 2-PITC),其中异硫氰酸酯种类占到了 4 种。

许多研究表明,异硫氰酸酯可以预防多种癌症的发生。研究发现,PEITC 呈剂量性地抑制小鼠骨肉瘤细胞 K7M2 的增殖,并能引起 G2/M 细胞周期的停滞以及细胞的凋亡<sup>[24]</sup>;BITC 可以显著降低胃癌细胞 AGS 的细胞活力,并能够引起细胞的凋亡和自噬<sup>[25]</sup>。然而,目前有关异硫氰酸酯对宫颈癌的作用及机制研究报道较少。本研究通过体外细胞模型发现,BRIe 显著抑制了宫颈癌细胞 HeLa、Siha、U14 的增殖,并呈时间和剂量依赖性。将这三种细胞 24 h 的 IC<sub>50</sub> 值做对比,综合表明 HeLa 细胞对 BRIe 最为敏感。细胞失控性增殖是引起癌症的根本性原因,造成这一结果是由于细胞的周期发生了紊乱,流式细胞术检测发现 BRIe 可将 HeLa 细胞周期阻滞在 S 期和 G2/M 期。癌细胞的转移一直是研究的热点和临床治疗难点。通过划痕实验发现,BRIe 可以有效地抑制 HeLa 细胞的迁移。Hochest 33258 染色发现,BRIe 可诱导 HeLa 细胞核 DNA 凝聚,能观察到细胞核可见的颗粒状荧光,初步推测其为凋亡小体。进一步通过 Annexin V-FITC 双染法发现,经 BRIe 处理的 HeLa 细胞在 24 h 后,细胞的凋亡率随浓度的增加而升高,表明 BRIe 诱导了 HeLa 细胞凋亡。综上,BRIe 表现了显著的抗宫颈瘤活性,结合 GC-MS 数据,推测 BITC、PEITC、异硫氰酸酯异丙酯、2-PITC 可能为其主要有效成分,尚需要通过体外体内实验进一步验证。

总之,本研究首次确定了恰玛古中异硫氰酸酯的外源酶解最佳制备工艺,通过 GC-MS 分析鉴定出 7 种酶解相关产物,获取的酶解产物 BRIe 具有抑制宫颈癌细胞增殖的作用,并能抑制细胞迁移,诱导细

胞周期阻滞和凋亡。为进一步开发利用恰玛古植物资源提供参考依据。

## 参考文献

- Li X, Chen KS, Zhang MF, et al. Research advances of glucosinolates from crucifer[J]. Acta Horti Sin(园艺学报), 2006, 33: 675-679.
- Boddupalli S, Mein JR, Lakkanna S, et al. Induction of phase 2 antioxidant enzymes by broccoli sulforaphane: perspectives in maintaining the antioxidant activity of vitamins A, C, and E[J]. Front Genet, 2012, 3: 7.
- Sang LY, Sun BX, Bai X. Current status of research development on isothiocyanates[J]. J Food Saf Qual Test(食品安全质量检测学报), 2017, 8: 4111-4114.
- Shin IS, Masuda H, Naohide K. Bactericidal activity of wasabi (*Wasabia japonica*) against *Helicobacter pylori* [J]. Int J Food Microbiol, 2004, 94: 255-261.
- Szydlowska-Czermiak A, Bartkowiak-Broda I, Karlović I, et al. Antioxidant capacity, total phenolics, glucosinolates and colour parameters of rapeseed cultivars [J]. Food Chem, 2011, 127: 556-563.
- Dinkova-Kostova AT, Kostov RV. Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease [J]. Trends Mol Med, 2012, 18: 337-347.
- Ling HM, Zheng XH, Zhou J, et al. Anticancer and antioxidant effects of glucosinolates and isothiocyanates progress [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2015, 32: 513-520.
- Lee JG, Bonnema G, Zhang N, et al. Evaluation of glucosinolate variation in a collection of turnip (*Brassica rapa*) germplasm by the analysis of intact and desulfo glucosinolates [J]. J Agric Food Chem, 2013, 61: 3984-3993.
- Zhuang HM, Liu HF, Han HW, et al. Identification and analysis of components of glucosinolate glucosides in turnip from Xinjiang, China [J]. Acta Agric Bor-occid Sin(西北农业学报), 2019, 28: 79-88.
- Sun L, Tian L, Abudukuer T. Content determination of 4 kinds of isothiocyanates compounds in the seeds of *Brassica rapa* by GC method [J]. China Pharm(中国药房), 2012, 23: 4482-4483.
- Vieira MF, Vieira A, Zanin GM, et al.  $\beta$ -Glucosidase immobilized and stabilized on agarose matrix functionalized with distinct reactive groups [J]. J Mol Catal B Enzym, 2011, 69: 47-53.
- Wu JP. Study on the separation and purification process of glucoerucin from rocket salad seeds [D]. Beijing: Beijing University of chemical technology(北京化工大学), 2013.

- 13 Ding Y, Li LQ, Cao R. Effect of enzymolysis conditions on glucosinolates in rapeseed Meal and identification of their degradation products [J]. Chin Agric Sci(中国农业科学), 2014, 47:383-393.
- 14 Liang H, Yuan QP, Dong HR, et al. Determination of sulforaphane in broccoli and cabbage by high-performance liquid chromatography[J]. J Food Compos Anal, 2006, 19: 473-476.
- 15 Chen N, Ren LY, Dai CY. Research advances on two kinds of isothiocyanates for cancer chemoprevention [J]. Food Mach (食品与机械), 2012, 28:241-244.
- 16 Kim KH, Moon E, Kim SY, et al. 4-Methylthio-butanyl derivatives from the seeds of *Raphanus sativus* and their biological evaluation on anti-inflammatory and antitumor activities[J]. Ethnopharmacol, 2014, 151:503-508.
- 17 Jang HW, Moon JK, Shibamoto T. Analysis and antioxidant activity of extracts from broccoli (*Brassica oleracea* L.) sprouts[J]. Agric Food Chem, 2015, 63:1169-1174.
- 18 Latté KP, Appel KE, Lampen A. Health benefits and possible risks of broccoli-an overview[J]. Food Chem Toxicol, 2011, 49:3287-309.
- 19 Yang D, Gong XX, Wang YJ, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis conditions for preparation isothiocyanate from broccoli seeds by response surface methodology [J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技), 2021, 42:146-152.
- 20 Burmeister WP, Cottaz S, Rollin P, Vasella A, Henrissat B. High resolution X-ray crystallography shows that ascorbate is a cofactor for myrosinase and substitutes for the function of the catalytic base [J]. J Biol Chem, 2000, 275: 39385-39393.
- 21 Tian M, Xu X, Hu H, et al. Optimisation of enzymatic production of sulforaphane in broccoli sprouts and their total antioxidant activity at different growth and storage days[J]. J Food Sci, 2017, 54:209-218.
- 22 Chen MM, Li JJ, Li XD, et al. Optimization enzymatic hydrolysis condition of sulforaphane formation from broccoli seeds with response surface method[J]. J Qingdao Agr Univ(青岛农业大学学报), 2021, 38:113-118.
- 23 Yu XQ, Kan JQ, Zhang LP. Study on storage and flavor producing conditions of Wasabi roots[J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技), 2008, 29:116-118.
- 24 Lv HH, Zhen CX, Liu JY, Shang P. PEITC triggers multiple forms of cell death by GSH-iron-ROS regulation in K7M2 murine osteosarcoma cells [J]. Acta Pharmacol Sin, 2020, 41:1119-1132.
- 25 Han KWW, Po WW, Sohn UD, Kim HJ. Benzyl Isothiocyanate induces apoptosis via reactive oxygen species-initiated mitochondrial dysfunction and DR4 and DR5 death receptor activation in gastric adenocarcinoma cells[J]. Biomolecules, 2019, 9:839.

(上接第 1081 页)

- 86 Wang FX, et al. Compatibility and rationality analysis of shenma yizhi recipe in the treatment of vascular dementia based on network pharmacology[J]. Chin J Integr Med Cardio-Cerebrovasc Dis(中西医结合心脑血管病杂志), 2023, 21:2929-2943.
- 87 Zhang LB, et al. Clinical Experience of professor LIU Guangzhen who has differentiated and treated membranous nephropathy [J]. J Sichuan Tradit Chin Med(四川中医), 2021, 39:4-6.
- 88 Miao BL, et al. Treatment of idiopathic membranous nephropathy based on "disease-evidence-disease-potential" [J]. J Tradit Chin Med(中医杂志), 2022, 63:173-176.
- 89 Peng L, et al. Clinical Study of Compound Ramulus Euonymi decoction in improving insulin resistance and hemorheological parameters of hypertension patients [J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med(广州中医药大学学报), 2007, 24:14-17.
- 90 Peng WY. Clinical research on Tangyou Jieyu decoction in treating diabetes mellitus complicating depression[D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine(南京中医药大学), 2014.
- 91 Li JM. Study on the pharmacy of Jiangtang Tongmai Granule and the criteria of quality control for *Euonymus alatus* [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine(南京中医药大学), 2020.
- 92 Zhang X, et al. Experience in syndrome differentiation and treatment of treating impaired glucose tolerance with hypertension[J]. Shandong J Tradit Chin Med(山东中医杂志), 2021, 40:172-174.
- 93 Bu XH, et al. Mechanism of Ramulus Euonymi in treatment of diabetic nephropathy based on network pharmacology and molecular docking[J]. J Hunan Univ Tradit Chin Med(湖南中医药大学学报), 2021, 41:1564-1573.