

入侵植物猫爪藤体外细胞毒活性成分的筛选分离

郑志忠^{1,2}, 谌迪², 刘韶松², 邓远¹, 林志灿², 明艳林^{1,2*}

(1. 华侨大学化工学院, 福建 厦门 361021; 2. 厦门华侨亚热带植物引种园, 厦门市植物引种检疫与植物源产物重点实验室, 福建 厦门 361002)

摘要: 为了筛选分离入侵植物猫爪藤的细胞毒活性成分, 采用 MTT 法以 75%乙醇提取物的不同组分分别处理人肝癌细胞 SMMC7721、Bel7402 和正常肝细胞 Chang Liver, 对他们的体外增殖抑制率进行了研究。结果表明, 总醇提物的氯仿组分对肝癌细胞表现出明显的体外增殖抑制作用, 其次是石油醚组分。从氯仿萃取组分中分离出具有更强细胞毒活性的成分熊果酸。因此, 入侵植物猫爪藤具有体外细胞毒活性, 熊果酸是其体外细胞毒活性的主要成分之一。

关键词: 入侵植物; 猫爪藤; 细胞毒; 有效成分; 筛选分离

doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2016.04.015

Screening and Isolation of Cytotoxicity *in vitro* from Invasive Plant *Macfadyena unguis-cati* L. (Bignoniaceae)

ZHENG Zhi-zhong^{1,2}, CHEN Di², LIU Shao-song², DENG Yuan¹, LIN Zhi-can², MING Yan-lin^{1,2*}

(1. College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, Fujian, China; 2. Xiamen Key Laboratory for Plant Introduction Quarantine and Natural Production, Xiamen Overseas Chinese Subtropical Plant Introduction Garden, Xiamen 361002, Fujian, China)

Abstract: In order to screen and isolate the active constituents from invasive plant *Macfadyena unguis-cati* L. (Bignoniaceae), the anti-proliferative effects of SMMC7721, Bel7402 by different solvent extraction fractions of ethanol extracts of *M. unguis-cati in vitro* were studied by using MTT assay. The results showed that the chloroform fraction of ethanol extracts had strong inhibitory effect on liver cancer cells, and then was petroleum ether fraction. An active constituent isolated from chloroform fraction, ursolic acid, had strong inhibitory effect. Therefore, invasive plant *M. unguis-cati* L. has cytotoxicity *in vitro*, and one of the main active components is ursolic acid.

Key words: Invasive plant; *Macfadyena unguis-cati*; Cytotoxicity; Active constituent; Screen and isolation

猫爪藤[*Macfadyena unguis-cati* (L.) A. Gentry] 为紫葳科(Bignoniaceae)猫爪藤属多年生常绿木质藤本植物, 原产热带美洲, 主要分布在墨西哥、巴西、阿根廷及西印度群岛和埃及等国。早年作为庭园篱笆和观赏植物引入广东和福建, 如今已逸为野生^[1-2]。猫爪藤具有生物入侵性, 对移植和归化地区的生物群落多样性造成严重的破坏, 在我国厦门市鼓浪屿岛随处可见猫爪藤, 早已被认定为外来入侵物种, 曾一度进行防治^[3-4]。然而在南

美洲的一些原产地, 猫爪藤被广泛地用作民间药物, 用来治疗毒蛇咬伤、炎症、痢疾、风湿、疟疾、腹泻和性病^[5-7], 因此对其药理, 药效和基础开始进行研究。有报道表明猫爪藤还具有体外抗肿瘤作用, 这无疑为抗肿瘤药物的开发提供了新的天然药物来源^[8-9]。本研究对猫爪藤的抗肝癌有效成分进行筛选分离, 旨在为今后研究其抗肿瘤药效机理, 明确其药效物质和开发抗肝癌新药提供依据。

收稿日期: 2015-10-10 接受日期: 2016-01-06

基金项目: 厦门市科技创新基金项目(3502Z20142007)资助

This work was supported by the Xiamen Science and Technology Innovation Fund (Grant No. 3502Z20142007).

作者简介: 郑志忠(1984~), 男, 助理研究员, 主要从事天然产物抗肿瘤活性研究。E-mail: zhizhong29@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: xmyanlin@gmail.com

1 仪器和材料

材料为未开花的猫爪藤 [*Macfadyena unguis-cati* (L.) A. Gentry] 枝叶, 采自福建省厦门市鼓浪屿地区, 经张永田教授鉴定, 标本保存于中国科学院植物研究所植物标本馆(01647026)。人正常肝细胞 Chang Liver、人肝癌细胞株 SMMC7721、Bel7402 均购自中国科学院上海细胞库。

旋转蒸发器; 冷冻干燥机、酶标仪(美国 THERMO Multiskan MK3)、CO₂ 培养箱; 洁净工作台(中国安泰公司); 纯水机(英国 PALL 公司); 倒置显微镜(日本 Olympus 公司)、高效液相(美国安捷伦 1200)、质谱仪(美国 SCIEX AB Sciex QTRAP[®] 6500)、核磁共振仪(德国 Bruker AVANCE III spectrometer)等。

RPMI1640、DMEM 培养基和新生牛血清购自美国 Gibco 公司; 胰蛋白酶、四甲基偶氮唑盐(MTT) 购自上海生工; 二甲基亚砜(DMSO) 购自吉泰科技有限公司; 其余试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 提取和分离

将采集的猫爪藤枝叶晒干粉碎, 取 2 kg 粗粉用 75% 乙醇按 1:4 (M/V) 在 60℃ 浸渍提取 3 次, 每次 24 h; 提取液抽滤后合并滤液, 经减压浓缩得棕褐色粘稠浸膏, 即猫爪藤总醇提物(MT, 320 g)。浸膏用适量的蒸馏水(W)混悬, 按 1:1 (V/V) 依次用石油醚(P)、氯仿(C)、乙酸乙酯(E)、正丁醇(B)顺序萃取分离 3 次, 经冻干后, 获得石油醚萃取组分(MP, 24 g)、氯仿萃取组分(MC, 63 g)、乙酸乙酯萃取组分(ME, 47 g)、正丁醇萃取组分(MB, 68 g)和水组分(MW, 84 g), 用于抗肿瘤活性测定。

取 30 g 氯仿萃取组分(MC)经硅胶柱层析(200~300 目); 以石油醚-乙酸乙酯(10:1、7:1、5:1、3:1、1:1、1:3、1:5、0:1)梯度洗脱, 得到 8 个组分(MC₁~MC₈), 用于细胞毒活性测定。经 Sephadex LH-20 丙酮-甲醇洗脱, 分别从 MC₁~MC₃ 组分中得化合物 1 (27 mg)和 2 (45 mg); MC₄ 组分洗脱后用活性炭吸附过滤, 浓缩滤液得到化合物 3 (10 mg)。

2.2 抗肿瘤活性测定

SMMC7721, Bel7402 细胞用含 10%新生牛血

清的 RPMI1640 完全培养液于 37℃, 5% CO₂ 和饱和湿度下培养, Chang Liver 用含 10%新生牛血清的 DMEM 完全培养液以相同条件培养。贴壁的细胞用 0.25%胰蛋白酶消化。参照前人^[10-11]方法, 取对数生长期细胞, 按照每孔 5000 个 (100 μL)⁻¹ 接种入 96 孔板中, 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中温育 24 h, 加入 200 μL 药液(浓度分别为 6.25、12.5、25、50 和 100 μg mL⁻¹)继续培养。用药组和对照组(不加药)均设 4 个复孔, 同时设空白组(不加细胞不加药), 重复 3 次。72 h 后吸掉上清液, 每孔加 200 μL 的 MTT (500 μg mL⁻¹)后置于 37℃温育 4 h, 弃上清, 每孔加入 200 μL 的 DMSO, 用微孔板快速振荡器振荡 20 min 使结晶物充分溶解。用酶标仪在波长 492 nm 下测定吸光值 *A*, 计算抑制率和半数抑制率 IC₅₀ 值。抑制率 = (*A*_{对照组} - *A*_{用药组}) / (*A*_{对照组} - *A*_{空白组}) × 100%。

2.3 细胞形态学观察

将对数生长期的细胞接种于盖玻片上, 加入 50 μg mL⁻¹ 药液, 对照加等量培养液。在 37℃、5% CO₂ 培养箱中温育 72 h, 在 Olympus 倒置显微镜下观察细胞形态, 了解细胞凋亡过程。

2.4 数据统计

实验数据用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 以 One-Way ANOVA 方法进行单因子方差分析, 数据以 Mean±SD 表示。

3 结果和分析

3.1 对肝癌细胞体外增殖的抑制作用

从表 1 可见, 猫爪藤总醇提物 4 个萃取组分对 3 种肝细胞的增殖抑制活性存在显著差异, 其中氯仿萃取组分(MC)对肝癌细胞株 SMMC7721 和 Bel7402 以及人正常肝细胞 Chang Liver 均具有一定的抑制作用, 呈浓度依赖性关系, 且对人正常肝细胞 Chang Liver 的抑制作用明显弱于 2 种肝癌细胞株。半数抑制率(IC₅₀)分别为(62.54±1.51) μg mL⁻¹ (SMMC7721)、(55.53±2.30) μg mL⁻¹ (Bel7402)和(74.06±5.13) μg mL⁻¹ (Chang Liver)。其他萃取组分则对肝癌细胞的抑制作用较弱或无作用。因此, 我们确定以氯仿萃取组分为有效部位进行进一步分离纯化和活性的跟踪筛选。

3.2 洗脱组分对肝癌细胞体外增殖的抑制作用分析

采用 TLC 法跟踪洗脱组分, 结果表明 MC₄ 和 MC₇ 对肝癌细胞的抑制作用最强, MC₄ 的 IC₅₀ 分别

为(49.15±2.61) μg mL⁻¹ (SMMC7721)和(55.61±0.56) μg mL⁻¹ (Bel7402); MC₇ 的 IC₅₀ 分别为(38.42±1.03) μg mL⁻¹ 和(39.73±2.00) μg mL⁻¹ (表 2)。

表 1 总醇提物各萃取组分对肝癌细胞体外增殖作用的影响

Table 1 Effect of total alcohol extract on proliferation of hepatocellular carcinoma cells *in vitro*

	IC ₅₀ (μg mL ⁻¹)		
	SMMC7721	Bel7402	Chang Liver
MP	82.72±1.56	97.90±5.37	63.82±3.00
MC	62.54±1.51	55.53±2.30	74.06±5.13
ME	>100	85.63±12.63	75.48±10.50
MB	>100	>100	>100
MW	>100	>100	>100

表 2 有效组分对肝癌细胞体外增殖作用的影响

Table 2 Effect of effective fraction on proliferation of hepatocellular carcinoma cells *in vitro*

	IC ₅₀ (μg mL ⁻¹)		
	SMMC7721	Bel7402	Changliver
MC ₁	>100	>100	>100
MC ₂	>100	>100	>100
MC ₃	68.32±2.78	>100	>100
MC ₄	49.15±2.61	55.61±0.56	>100
MC ₅	>100	>100	63.19±3.69
MC ₆	>100	>100	>100
MC ₇	38.42±1.03	39.73±2.00	>100
MC ₈	>100	>100	87.59±4.71

3.3 细胞形态学观察

采用 MTT 法用 MC₄ 和 MC₇ 分别处理 2 种肝癌细胞和人正常肝细胞 72 h, 结果表明, 他们能够明显改变癌细胞的形态, 随着浓度增加, 癌细胞逐渐变圆, 体积缩小, 数量减少, 呈颗粒状, 部分细胞脱落漂浮于培养液中, 不能进入对数生长期, 而对照细胞则饱满舒展, 为梭形或多角形, 贴壁成片生长(图 1, 2)。

3.4 有效部位的化学成分鉴定

采用中药化学鉴定方法对未知组分进行化学成分归属分析, MC₄ 和 MC₇ 分别添加 FeCl₃ 试剂, 显色反应呈阴性, 表明没有酚羟基存在, 没胡酚类或黄酮类化合物; 与 KOH 试剂反应也没有阳性显色反应, 表明没有蒽醌类化合物; 用 10%硫酸-乙醇喷洒置于 365 nm 紫外照射下能激发出荧光(橙红色), 这是三萜类成分的特征, 表明组分中可能有萜类物质。

3.5 化合物结构鉴定

化合物 1 白色固体粉末, 丙酮中结晶, 波

谱法结构鉴定为正三十烷酸(*n*-Triacontanoic acid)。IR(KBr) cm⁻¹: 3421 (OH), 2918 (C-H), 2849 (C-H), 1711 (C=O)。EI-MS *m/z*: 452 [M]⁺, 424 [M - (CH₂)₂]⁺, 396 [M - (CH₂)₄]⁺, 368 [M - (CH₂)₆]⁺, 而 185 [(CH₂)₁₀COOH]⁺, 129 [(CH₂)₆COOH]⁺, 73 [(CH₂)₂COOH]⁺ 等为含羧基的特征峰, 以及麦氏重排产生的含羧基离子峰 *m/z* 60。EI-MS 显示低质量区为一系列 *m/z* 递减 14 (CH₂) 的群峰, 符合长链饱和脂肪酸的裂解规律, 分子式为 C₃₀H₆₀O₂; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃+CD₃OD): δ 7.26 (¹H, -COOH)为羧基氢信号, 2.21 (²H, CH₂)为羧基旁的 CH₂, 1.16~1.54 显示长链中间有多个 CH₂, 0.78 (³H, -CH₃)为末端甲基氢信号; ¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃+CD₃OD): δ 13.81 (30-CH₃), 22.47 (29-CH₂), 24.74 (28-CH₂), 29.49~28.97 (4~27-CH₂), 31.72 (3-CH₂), 33.90 (2-CH₂), 176.53 (1-COOH)。

化合物 2 无色针状晶体, 丙酮中结晶, 波谱法结构鉴定为 β-谷甾醇(β-Sitosterol)。IR(KBr) cm⁻¹: 3422 (OH); 2960, 2936, 2867, 2852 (C-H); 1465, 1381 (CH₃); 1657, 801 (-C=C-)。EI-MS *m/z*:

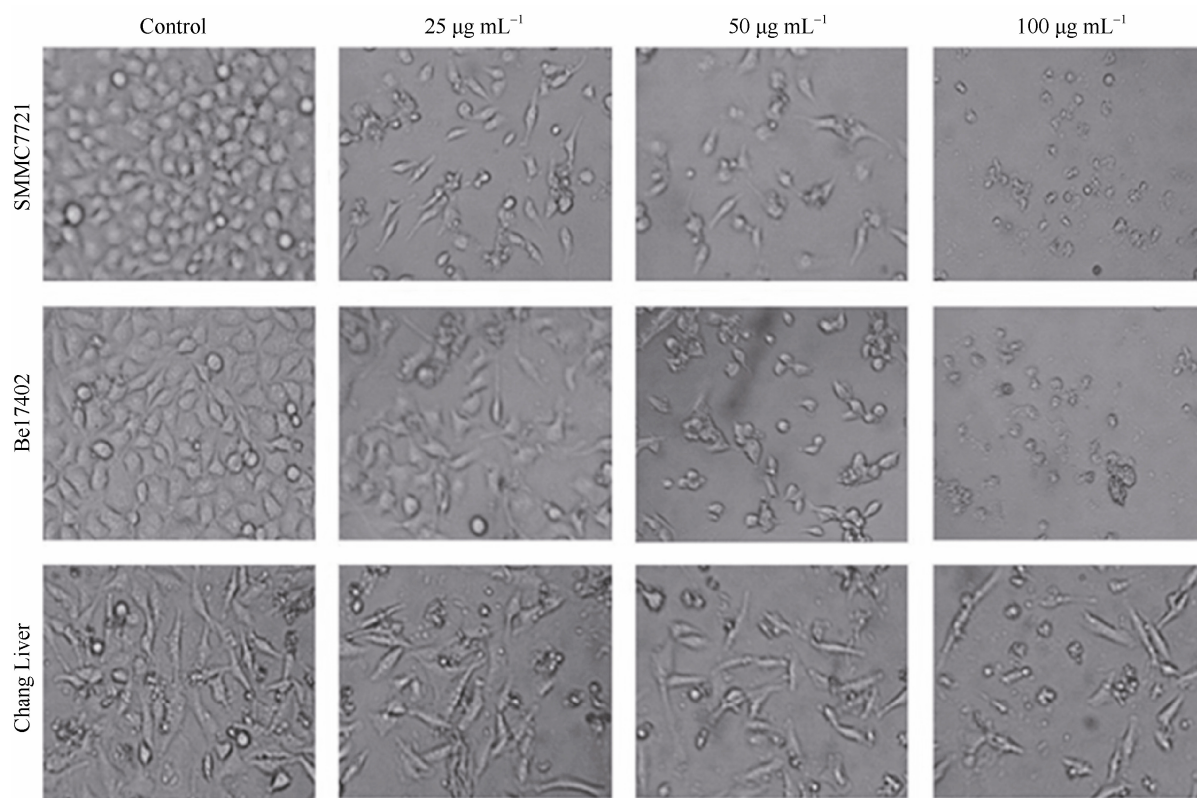


图 1 MC₄ 处理 72 h 后的肝癌细胞及 Chang Liver。放大倍数 200 ×

Fig. 1 Chang Liver and liver cancer cells treated with MC₄ for 72 hours. Magnification 200 ×

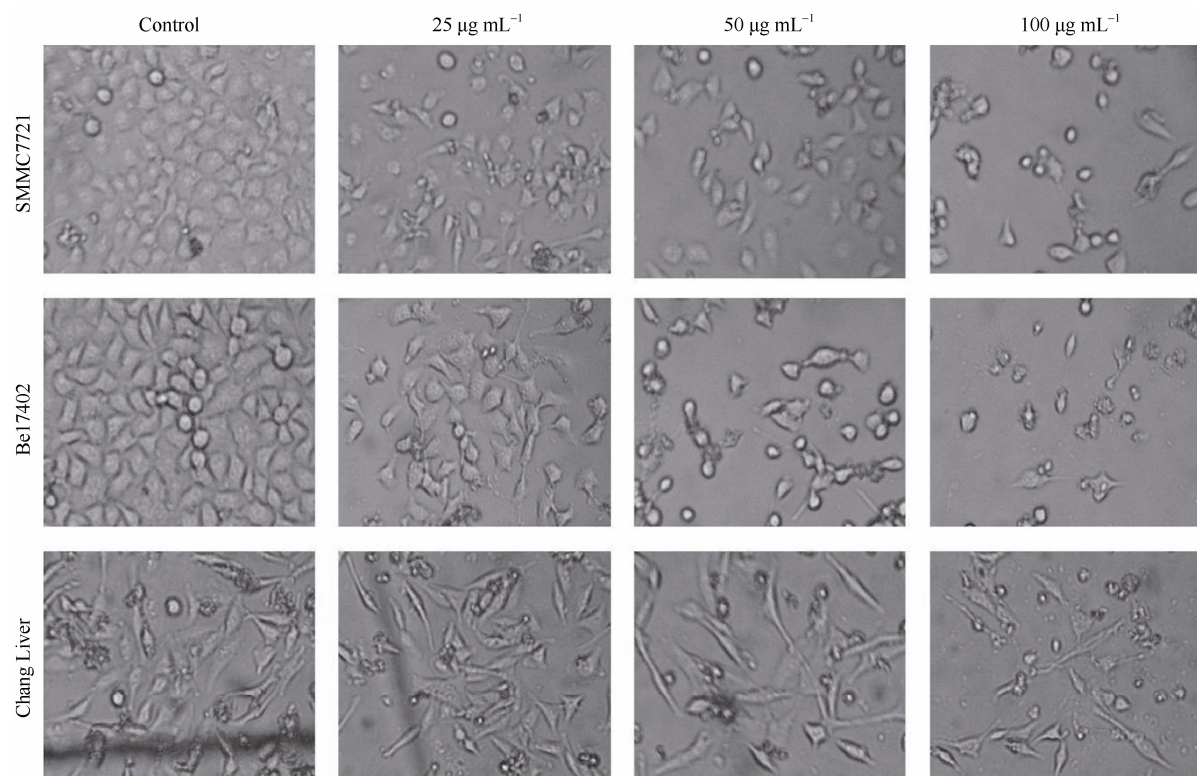


图 2 MC₇ 处理 72 h 后的肝癌细胞和 Chang Liver。放大倍数 200 ×

Fig. 2 Chang Liver and liver cancer cells treated with MC₇ for 72 hours. Magnification 200 ×

414 [M]⁻, 396 [M - H₂O]⁻, 381 [M - H₂O - CH₃]⁻, 273 [M - C₁₀H₂₁]⁻, 255 [M - C₁₀H₂₁ - H₂O]⁻, 231 [M - C₁₀H₂₁ - C₃H₆]⁻, 213 [M - C₁₀H₂₁ - C₃H₆ - H₂O]⁻, 分子量为 414。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 0.80~2.28 间出现多重山峰似的笛体或三萜母核特征峰, 是由多个化学环境相似的亚甲基(-CH₂-)和次甲基(-CH-)信号相互重叠所产生; δ 5.34 (1H, d, *J* = 5.5 Hz, H-6) 为典型的烯氢信号; δ 3.52 (1H, m, 3-H) 为连氧叔碳氢信号; δ 0.67 (3H, s, 18-CH₃), 1.00 (3H, s, 19-CH₃), 0.92 (3H, d, *J* = 6.0 Hz, 21-CH₃), 0.82 (3H, d, *J* = 4.5 Hz, 26-CH₃), 0.80 (3H, d, *J* = 4.5 Hz, 27-CH₃), 0.84 (3H, d, *J* = 6.0 Hz, 29-CH₃), 分别为 6 个甲基氢信号。¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 140.72 (C-5),

121.69 (C-6), 71.79 (C-3), 56.74 (C-14), 56.04 (C-17), 50.12 (C-9), 45.82 (C-24), 42.25 (C-4), 42.25 (C-13), 39.76 (C-12), 37.23 (C-1), 36.48 (C-10), 36.12 (C-20), 33.93 (C-22), 31.88 (C-8), 31.86 (C-7), 31.61 (C-2), 29.15 (C-25), 28.22 (C-16), 26.08 (C-23), 24.28 (C-15), 23.05 (C-28), 21.06 (C-11), 19.78 (C-27), 19.37 (C-19), 19.01 (C-26), 18.75 (C-21), 11.95 (C-29), 11.83 (C-18)。

化合物 3 白色粉末状, 分子式为 C₃₀H₄₈O₃, 波谱数据见表 3, 其结构见图 3。经数据库与文献检索表明化合物 **3** 是已知化合物熊果酸(Ursolic acid), 与文献[12]报道一致。同时也印证有效部位的硫酸-乙醇显色反应结果, 即含有三萜类成分。熊果酸的抗肝癌活性见表 4。

表 3 化合物 **3** 的 NMR 波谱数据

Table 3 NMR data of compound **3** (δ)

位置 Position	¹ H	¹³ C	HMBC	¹ H- ¹ H COSY
1	1.57 (1H, m) 1.51 (1H, m)	36.3t		
2	1.49 (1H, m) 1.44 (1H, m)	26.9t		H-3
3	3.02 (1H, m)	76.8d		H-2, HO-3
4		38.3s		
5	0.67 (1H, m)	54.7d		
6	1.47 (1H, m) 1.31 (1H, m)	17.9t		
7	1.41 (1H, m) 1.26 (1H, m)	32.6t		
8		38.9s		
9	1.47 (1H, m)	46.9d		
10		36.5s		
11	1.85 (2H, m)	22.8t		
12	5.14 (1H, t, 3.1)	124.5d	C-9, C-14, C-18	H-11
13		138.1s		
14		41.6s		
15	1.80 (1H, m) 1.01 (1H, m)	27.5t		
16	1.94 (1H, m) 1.53 (1H, m)	23.7t		
17		46.8s		
18	2.12 (1H, m)	52.3d	C-12, C-13, C-14, C-16 C-17, C-20, C-22, C-30	H-19
19	1.31 (1H, m)	38.4d		
20	0.91 (1H, m)	38.3d		
21	1.42 (1H, m) 1.28 (1H, m)	30.1t		
22	1.52 (1H, m) 0.90 (1H, m)	38.2t		
23	0.89 (3H, s)	28.2q	C-3, C-4, C-5, C-24	
24	0.67 (3H, s)	16.0q	C-3, C-4, C-5, C-23	
25	0.87 (3H, s)	15.2q	C-1, C-5, C-9, C-10	
26	0.75 (3H, s)	17.0q	C-7, C-8, C-9, C-14	
27	1.04 (3H, s)	23.2q	C-8, C-13, C-14, C-15	
28		178.2s		
29	0.82 (3H, d, 6.4)	17.0q	C-18, C-19, C-20	H-19
30	0.91 (3H, d)	21.0q	C-19, C-20, C-21	H-20
HO-3	4.31 (1H, d, 5.1)		C-2, C-3, C-4	H-3
HOOC-28	11.98 (1H, brs)			

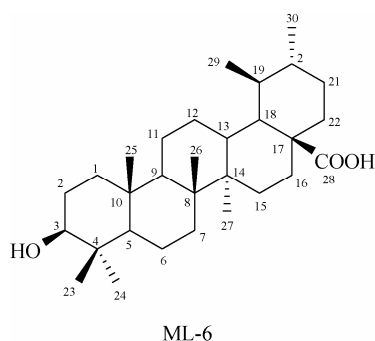


图3 化合物3的结构

Fig. 3 Structure of compound 3

表4 有效成分的抗肝癌活性

Table 4 Activity of effective components against hepatocellular carcinoma

	IC ₅₀ (μg mL ⁻¹)		
	SMMC7721	Bel7402	Chang Liver
MC	62.54±1.51	55.53±2.30	74.06±5.13
MC ₄	60.83±3.20	63.99±3.02	>100
MC ₇	51.83±3.59	52.44±2.32	>100
熊果酸 Ursolic acid	29.71±2.70	33.41±0.14	41.49±2.17

4 结论和讨论

猫爪藤主要分布在热带美洲国家,如巴西、阿根廷、墨西哥和西印度群岛等,在埃及、意大利和我国亦有移植或归化。猫爪藤在民间广泛用作药物,治疗风湿、炎症、毒蛇咬伤、疟疾等,已展开了一些药理药效学研究。Duarte等^[8]研究表明,猫爪藤去除叶片的枝藤提取物对肿瘤细胞有明显的增殖抑制作用,并分离出拉帕醇、羽扇豆醇、β-香树脂醇等成分,其中拉帕醇是主要活性物质。但近年来的研究表明熊果酸的作用比拉帕醇、羽扇豆醇更好^[13-15]。Aboutabl等^[5]以猫爪藤总醇提取物对几种肿瘤细胞进行了体外增殖抑制作用研究,表明其对肺癌细胞有中等强度的细胞毒性。

在整个筛选过程中,每经过1次分离筛选,有效组分对肝癌细胞的增殖抑制效果总体上较上游部位有所提高,对正常肝细胞的毒性明显降低,这则表明该筛选体系是有效的,能够成功跟踪猫爪藤中抗肝癌活性成分。猫爪藤中抗肝癌的主要活性成分可能集中在MC₄和MC₇中,而熊果酸是MC₄中重要的活性成分,但其对正常肝细胞的毒性与肝癌细胞接近(表4),因此需要控制用量。此外,MC₇中可能还存在活性更好的成分,有待继续深入研究。本研究结果表明,猫爪藤植物中存在能够有效

抑制肿瘤细胞增殖的化学成分,具有进一步开发新的抗肿瘤药物的价值,提示对猫爪藤抗肝癌作用的研究值得进一步深入。

参考文献

- [1] LU C Y, ZHANG M Q. A summary of invasive plant *Macfadyena unguis-cati* (L.) A. Gentry [J]. Weed Sci, 2003(4): 49-51. doi: 10.3969/j.issn.1003-935X.2003.04.021.
卢昌义, 张明强. 外来入侵植物猫爪藤概述 [J]. 杂草科学, 2003(4): 46-48. doi: 10.3969/j.issn.1003-935X.2003.04.021.
- [2] WANG Z, DONG S Y, LUO Y Y, et al. Invasive plants in Guangzhou, China [J]. J Trop Subtrop Bot, 2008, 16(1): 29-38. doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2008.01.005.
王忠, 董仕勇, 罗燕燕, 等. 广州外来入侵植物 [J]. 热带亚热带植物学报, 2008, 16(1): 29-38. doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2008.01.005.
- [3] LU C Y, HU H Y, ZHANG M Q, et al. Studies on the control of alien invasive plant *Macfadyena unguis-cati* with ecological substitution [J]. Plant Prot, 2005, 31(3): 53-56. doi: 10.3969/j.issn.0529-1542.2005.03.013.
卢昌义, 胡宏友, 张明强, 等. 人工清除结合生态替代根除外来入侵植物猫爪藤 [J]. 植物保护, 2005, 31(3): 53-56. doi: 10.3969/j.issn.0529-1542.2005.03.013.
- [4] LI Z Y, XIE Y. Invasive Alien Species in China [M]. Beijing: China Forestry Publisher, 2002: 1-211.
李振宇, 解焱. 中国外来入侵种 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2002: 1-211.
- [5] ABOUTABL E A, HASHEM F A, SLEEM A A, et al. Flavonoids, anti-inflammatory activity and cytotoxicity of *Macfadyena unguis-cati* L. [J]. Afr J Trad Compl Altern Med, 2007, 5(1): 18-26. doi: 10.4314/ajteam.v5i1.31251.
- [6] WILLIAMS H E. Life history and laboratory host range of *Charidotis auroguttata* (Boheman) (Coleoptera: Chrysomelidae), the first natural enemy released against *Macfadyena unguis-cati* (L.) Gentry (Bignoniaceae) in South Africa [J]. Coleopt Bull, 2009, 56(2): 299-307. doi: 10.1649/0010-065X(2009)056[0299:LHALHR]2.0.CO;2.
- [7] LU C Y, ZHANG M Q, ZHENG F Z. Study on glyphosate applied technology in controlling invasive plant *Macfadyena unguis-cati* (L.) A. Gentry in Xiamen [J]. J Xiamen Univ (Nat Sci) 2006, 45(1): 136-140. doi: 10.3321/j.issn:0438-0479.2006.01.032.
卢昌义, 张明强, 郑逢中. 草甘膦防除厦门外来入侵植物猫爪藤的应用研究 [J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2006, 45(1): 136-140. doi: 10.3321/j.issn:0438-0479.2006.01.032.

- [8] DUARTE D S, DOLABELA M F, SALAS C E, et al. Chemical characterization and biological activity of *Macfadyena unguis-cati* (Bignoniaceae) [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2000, 52(3): 347–352. doi: 10.1211/0022357001773904.
- [9] ABOUTABLE E A, HASHEM F A, SLEEM A A, et al. Phytochemical and bioactivity investigations of *Macfadyena unguis-cati* L. (Bignoniaceae) [J]. *Planta Med*, 2007, 73(9): 925. doi: 10.1055/s-2007-987111.
- [10] CHEN B Q, LIN Y, MING Y L, et al. Inhibitory effect of three kinds of Chinese herbs on human hepatoma cell line SMMC7721 *in vitro* [J]. *J Huaqiao Univ (Nat Sci)*, 2009, 30(4): 425–428.
陈碧强, 林毅, 明艳林, 等. 三种中草药对人肝癌细胞 SMMC7721 体外增殖抑制 [J]. *华侨大学学报: 自然科学版*, 2009, 30(4): 425–428.
- [11] ZHENG Z Z, CHEN L H, ZHENG G H, et al. Preliminary study on screening anti-tumor active fraction of extracts from seven Chinese herbal medicines [J]. *Subtrop Plant Sci*, 2011, 40(3): 31–35. doi: 10.3969/j.issn.1009-7791.2011.03.009.
郑志忠, 陈良华, 郑国华, 等. 七种中草药提取物抗肿瘤活性部位的筛选研究初报 [J]. *亚热带植物科学*, 2011, 40(3): 31–35. doi: 10.3969/j.issn.1009-7791.2011.03.009.
- [12] NYILIGIRA E, VILJOEN A M, van HEERDEN F R, et al. Phytochemistry and *in vitro* pharmacological activities of South African *Vitex* (Verbenaceae) species [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 119(3): 680–685. doi: 10.1016/j.jep.2008.07.004.
- [13] RANI M P, RAGHU K G, NAIR M S, et al. Isolation and identification of α -glucosidase and protein glycation inhibitors from *Stereospermum colais* [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2014, 173(4): 946–956. doi: 10.1007/s12010-014-0898-y.
- [14] SILVA E O, de CARVALHO T C, PARSHIKOV I A, et al. Cytotoxicity of lapachol metabolites produced by probiotics [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2014, 59(1): 108–114. doi: 10.1111/lam.12251.
- [15] RAUF A, UDDIN G, KHAN H, et al. Anti-tumour-promoting and thermal-induced protein denaturation inhibitory activities of β -sitosterol and lupeol isolated from *Diospyros lotus* L. [J]. *Nat Prod Res*, 2015: 1–3. doi: 10.1080/14786419.2015.1046381.