

基于UPLC-Q/TOF-MS技术的新疆阿魏菇 抗食管癌有效萜类组分分析

买合木提·阿布里克木, 王磊, 李静, 艾合买提江·艾海提*, 刘军*
(新疆大学生命科学与技术学院, 乌鲁木齐 830046)

[摘要] 目的:探究新疆阿魏菇中抗食管癌活性的有效萜类成分。方法:经人食管癌Eca109细胞活性筛选,将阿魏菇醇提物乙酸乙酯萃取相(PFEP-E)通过硅胶柱和制备型薄层色谱技术进行分离纯化,采用超高效液相色谱-串联四极杆-飞行时间质谱法(UPLC-Q/TOF-MS)技术,结合Metlin, MassBank, PubChem等在线网络数据库及相关文献对有效洗脱部位进行成分鉴定及含量分析。结果:硅胶柱石油醚-乙酸乙酯(3:1)洗脱部位($Fr_{2-3:1}$)对人食管癌Eca109细胞增殖的抑制活性最强,在正离子模式下分析鉴定出了24种萜类化合物,在负离子模式下分析鉴定出了28种萜类化合物,共52种,均为首次在该食用菌中分离得到;在 $Fr_{2-3:1}$ 组分中总萜类成分质量分数 $62.88 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,其包括2种单萜,5种倍半萜,15种二萜和30种三萜类,分别占总萜类含量的1.32%,12.04%,47.55%,39.09%。二萜类和三萜类是阿魏菇萜类的主要组成成分,占总萜类的86.64%。二萜类以赤霉素为主,占总二萜类的79.70%,三萜类以灵芝酸类为主,占总三萜类的29.25%。四甲基偶氮唑蓝(MTT)试验结果表明,赤霉素 A_3 和赤霉素 A_2 的抗食管癌活性较弱,而丝石竹皂苷元和齐墩果酸具有较强的抗食管癌活性。结论:新疆阿魏菇抗食管癌有效萜类是以灵芝酸类为主的三萜类化合物,可为其作为抗肿瘤药物的开发以及功能性食品的研制提供理论依据,有助于有效提升阿魏菇的附加产值。

[关键词] 阿魏菇; 萜类; 灵芝酸; 食管癌; 超高效液相色谱-串联四极杆-飞行时间质谱法(UPLC-Q/TOF-MS)

[中图分类号] R22;R857.3;R28;R73 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)10-0093-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210149

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20201123.1500.001.html>

[网络出版日期] 2020-11-23 16:23

Analysis of Effective Terpenoids in Xinjiang *Pleurotus ferulae* Against Esophageal Carcinoma by UPLC-Q/TOF-MS Technique

MAIHEMUTI Abulikemu, WANG Lei, LI Jing, AIHEMAITIJANG Aihaiti*, LIU Jun*
(College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

[Abstract] **Objective:** To discover the effective terpenoids in Xinjiang *Pleurotus ferulae* with the activity of anti-esophageal carcinoma. **Method:** By screening the activity of human esophageal cancer Eca109 cells, the ethyl acetate extract phase of *P. ferulae* ethanol extract (PFEP-E) was separated and purified by silica gel chromatography and preparative thin layer chromatography. Ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q/TOF-MS) combined with online network databases such as Metlin, MassBank, PubChem and related literature were used to identify the effective elution sites and analyze their contents. **Result:** The elution fraction ($Fr_{2-3:1}$) of petroleum ether-ethyl acetate (3:1) on the silica gel column had the strongest inhibitory activity on the proliferation of human esophageal cancer Eca109 cells. The component analysis showed that 24 effective terpenoids were identified under positive ion mode, and 28

[收稿日期] 20200909(017)

[基金项目] 新疆大学博士启动基金纵向项目(BS130116)

[第一作者] 买合木提·阿布里克木,在读硕士,从事食用资源营养功效研究,E-mail:2130541755@qq.com

[通信作者] *刘军,博士,副教授,从事食用资源功效及产业化研究,E-mail:liujunxju@sina.com;

*艾合买提江·艾海提,硕士,副教授,从事食品加工研究,E-mail:2386935884@qq.com

effective terpenoids were identified under negative ion mode, a total of 52 terpenoids were identified, which were isolated from this edible fungus for the first time. Content of total terpenoids in Fr_{2-3:1} were 62.88 mg·g⁻¹, including 2 monoterpenoids, 5 sesquiterpenoids, 15 diterpenoids and 30 triterpenoids, accounting for 1.32%, 12.04%, 47.55%, 39.09% of the total terpenoids, respectively. Diterpenoids and triterpenoids were the main components of the effective terpenoids in *P. ferulae*, accounting for 86.64% of the total terpenoids. Gibberellins were the main diterpenoids, accounting for 79.70% of the total diterpenoids, triterpenoids were mainly ganoderic acids, accounting for 29.25% of the total triterpenoids. The results of methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) test showed that gibberellin A₃ and gibberellin A₅ had weak anti-esophageal cancer activity, while gypsogenin and oleanolic acid had strong anti-esophageal cancer activity. **Conclusion:** The effective terpenoids of *P. ferulae* against esophageal cancer are triterpenoids mainly composed of ganoderic acids, which can provide theoretical basis for the development of terpenoids of *P. ferulae* as anti-tumor drugs and the development of functional foods, and help to effectively improve the additional output value of *P. ferulae*.

[Key words] *Pleurotus ferulae*; terpenoids; ganoderic acids; esophageal carcinoma; ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q/TOF-MS)

阿魏菇又名阿魏侧耳等,是一种大型肉质伞菌,因寄生或腐生在干旱草原一种药用植物阿魏上而得名,是新疆特有的一种药食同源菌类^[1],具有抗肿瘤、抗氧化、提高免疫力、降血脂等功能,随着对阿魏菇的研究深入,普遍认为这些功能与阿魏菇中存在的大量活性物质有关^[2-5]。阿魏菇中活性成分众多,目前对其水提物已进行了较为全面的研究,例如,LI等^[6]研究表明阿魏菇水提物中的多糖有促进树突状细胞(DC细胞)成熟、增强免疫力的功能,而对其醇提物活性成分的研究报道极少,且阿魏菇化学成分研究多见于粗提取物定性检测和抗肿瘤活性研究。YANG等^[7-8]研究表明阿魏菇醇提物石油醚萃取相具有良好的抗肿瘤效果,能抑制黑色素瘤B16细胞、人食管癌Eca109细胞、人胃癌BGC823细胞和人宫颈癌HeLa细胞的增殖,并且采用气相色谱-质谱联用技术从阿魏菇醇提物石油醚萃取相中检测得到了21种脂肪酸,利用硅胶柱色谱、质谱、核磁共振等技术分离并鉴定了麦角甾醇及其过氧化物等抗肿瘤活性成分,而阿魏菇醇提物乙酸乙酯萃取相的具体化学成分尚未见报道。本课题组的前期研究发现,阿魏菇总三萜组分(PFTP)具有良好的抗消化道肿瘤作用,其中对人食管癌Eca109细胞的抑制增殖效果最强,进一步研究发现,阿魏菇醇提物乙酸乙酯萃取相具有较强的抗人食管癌Eca109细胞活性,采用光谱技术检测表明其可能含有萜类、生物碱和皂苷类化合物^[9-10]。

萜类化合物是药用真菌中的主要抗肿瘤活性成分之一,已被广泛应用于抗肿瘤药物和功能性食品领域^[11],包括生产抗氧化、抗炎^[12]、提高免疫力^[13]

和抗癌类等制品^[14]。为进一步明确新疆阿魏菇中的抗肿瘤有效萜类成分,本实验经人食管癌Eca109细胞活性筛选,对阿魏菇醇提物乙酸乙酯萃取相中抗食管癌有效萜类化合物进行分离,并对其有效组分进行成分鉴定和含量分析,以期为阿魏菇的深度开发与综合利用奠定基础。

1 材料

Laborota4000型旋转蒸发仪(德国 Heidolph 公司),FreeZone 2.5型冷冻干燥机(美国 Labconco 公司),MT-20型超纯水机(上海砾鼎水处理设备有限公司),Scientz-48型高通量组织研磨仪(宁波新芝生物科技股份有限公司),1290 Infinity型高效液相色谱仪和6530型四级杆-飞行时间质谱仪(美国 Agilent 公司),iMark型酶联免疫检测仪(美国 Bio-Rad 公司)。

阿魏菇由新疆南山栽培基地提供,并经新疆大学生命科学与技术学院买买提明·苏来曼教授鉴定为侧耳科阿魏菇 *Pleurotus ferulae* 的子实体。人食管癌 Eca109 细胞由上海欧易生物医学科技有限公司提供。四甲基偶氮唑蓝(MTT,批号 1212U0516)和齐墩果酸对照品(批号 1220A024,纯度>98%)均购自北京索莱宝科技有限公司,二甲基亚砜(DMSO,美国 Sigma,批号 WXBC7821V),胎牛血清(FBS,以色列 BI,批号 1850107),胰蛋白酶、青霉素链霉素和 RPMI-1640 培养基(美国 Hyclone,批号分别为 J190034, J190007, AE29441958),二氯苯丙氨酸[内标,吉尔生化(上海)有限公司,批号 GLS151121-20420,纯度>98%],赤霉素 A₃ 和丝石竹皂苷元对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号

分别为 S17J10Y90820, P12J10L79601, 纯度均 > 98%), 叶绿醇、赤霉素 A₅ 对照品(上海甄准生物科技有限公司, 批号分别为 2-PAX-82-1, 9-MP-128-1, 纯度均 > 95%), 青蒿素对照品(中国食品药品检定研究院, 批号 100202-201606, 纯度 > 99%), 水为超纯水, 甲醇、甲酸、乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 阿魏菇醇提物乙酸乙酯萃取相(PFEP-E)的制备 将新鲜阿魏菇子实体清洗干净切成薄片, 真空冻干, 粉碎过 40 目筛, 包装保存。称量阿魏菇冻干粉 100 g, 加入 95% 乙醇 2 L(料液比 1:20), 混匀, 于 50 °C 超声 40 min, 75 °C 水浴 25 min, 抽滤, 收集上清液; 重复提取 2 次, 合并滤液, 减压浓缩至 100 mL, 得阿魏菇醇提物。将该醇提物依次用石油醚、乙酸乙酯等体积萃取, 各相萃取 3 次, 每次 30 min, 将乙酸乙酯萃取相减压浓缩, 冻干, 得 PFEP-E 浸膏。

2.2 PFEP-E 的分离纯化 将 PFEP-E 溶解于甲醇中, 用 200~300 目硅胶拌样, 依次用体积比为 6:1, 4:1, 2:1, 1:2 的石油醚-乙酸乙酯进行梯度洗脱, 以石油醚-乙酸乙酯-冰乙酸(7:3:0.1)和石油醚-丙酮-冰乙酸(7:3:0.1)进行洗脱, 以体积比分别为 7:3:0.1, 6:4:0.1, 5:5:0.1, 4:6:0.1, 3:7:0.1, 2:8:0.1, 1:8:2, 1:8:4 的乙酸乙酯-丙酮-冰乙酸分别进行洗脱, 以体积比 1:10, 0.5:1, 0:10 的乙酸乙酯-甲醇进行洗脱。每个萃取相洗脱 4 倍柱体积, 收集并编号为 f₁~f₁₇; 经人食管癌 Eca109 细胞 MTT 试验筛选, 发现石油醚-乙酸乙酯(4:1)至乙酸乙酯-丙酮-冰乙酸(7:3:0.1)的样品为好, 将其合并为 1 个组分, 命名为 Fr₂。该组分用体积比分别为 7:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5 的石油醚-乙酸乙酯进行硅胶柱色谱洗脱, 收集并编号为 Fr_{2,7:1}~Fr_{2,1:5}, 同时 Fr₂ 以制备型薄层色谱分离, 将分离组分减压浓缩后冻干。经过薄层色谱法(TLC)检视, 人食管癌 Eca109 细胞 MTT 试验筛选, 确定以 Fr_{2,3:1} 为优, 故对其进行成分鉴定及含量分析。

2.3 UPLC-Q/TOF-MS 分析

2.3.1 样品处理 称取组分 Fr_{2,3:1} 50 mg, 加入甲醇 800 μL(含 2.8 g·L⁻¹ 二氯苯丙氨酸)。将其置于组织研磨仪中 65 Hz 研磨 90 s, 冰浴超声 30 min, 于温度 -20 °C 静置 1 h, 4 °C 离心(12 000 rmin⁻¹, 15 min, 离心半径 8.6 cm), 吸取上清液 200 μL, 转入进样小瓶中待测。

2.3.2 色谱分离条件 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 2.5 μm), 柱温

40 °C, 流速 0.35 mL·min⁻¹, 流动相选择 0.1% 甲酸水溶液(A)-0.1% 甲酸乙腈溶液梯度洗脱(0~1 min, 5%B; 1~6 min, 5%~20%B; 6~9 min, 20%~50%B; 9~13 min, 50%~95%B; 13~15 min, 95%B), 进样量设定 4 μL, 自动进样器温度 4 °C。

2.3.3 质谱条件 采用电喷雾离子源(ESI), 正、负离子检测模式, 质谱采集范围 *m/z* 100~1 000。正、负离子模式下毛细管电压分别为 4, 3.5 kV, 干燥气流速 11 L·min⁻¹, 干燥器温度 350 °C, 喷雾器压力 310.3 kPa, 碎裂电压 120 V, 锥孔电压 60 V。质谱采集过程中同时打入参比离子用于监测质量轴的准确性, 正离子模式为 *m/z* 121.050 9, 922.009 8; 负离子模式则为 *m/z* 119.036 3, 966.000 7。

2.3.4 质谱分析 质谱数据在 R 软件平台下采用 XCMS 程序包进行特征峰提取及预处理, 并在 Excel 2010 软件中进行后期编辑, 将最终结果组织为二维数据矩阵, 包含保留时间(*t_R*), 质荷比(*m/z*), 观察量(样本)和峰强度等信息。根据 UPLC-Q/TOF-MS 总离子流图(TIC), 提取离子流图(EIC)及二维数据矩阵中的离子质量(Mass 值)等, 结合 Metlin, MassBank, PubChem 等数据库及相关文献进行成分鉴定。各成分含量通过内标法计算。计算公式为成分 *i* 的含量 = $P_i/P_s \times M_s/M \times 1000$, 式中 P_i 为成分 *i* 的峰面积, P_s 为内标(二氯苯丙氨酸)的峰面积, M_s 为内标的质量, M 为样品总质量。

2.4 细胞培养 将细胞在含 10% FBS, 100 U·mL⁻¹ 青霉素、100 U·mL⁻¹ 链霉素的 RPMI-1640 培养基中培养, 在 37 °C, 5% CO₂, 相对湿度 92% 的 CO₂ 培养箱中孵育, 每 2~3 d 传代换液 1 次, 取接种 24 h 后的细胞进行实验。

2.5 细胞增殖能力的检测 采用 MTT 法。取培养至对数期的人食管癌 Eca109 细胞, 胰蛋白酶消化, 在 96 孔板中接种细胞悬液(5×10³ 个/孔) 100 μL, 培养 24 h, 每孔加入含有不同浓度待测样品的培养基 100 μL(设有加细胞和培养基的空白组), 平行 5 个孔, 处理细胞 24, 48, 72 h, 向每孔加入 5 g·L⁻¹ MTT 溶液 20 μL, 孵育 4 h。终止培养, 吸弃孔内培养液, 每孔加入 DMSO 150 μL, 震荡至结晶溶解, 于波长 490 nm 处测定吸光度 *A*, 按公式细胞增殖率 = $A_{\text{实验组}}/A_{\text{空白组}} \times 100\%$ 计算细胞增殖率, 并根据细胞增殖率计算半抑制浓度(IC₅₀)。

3 结果

3.1 PFEP-E 的分离纯化 将 PFEP-E 75 g 用硅胶柱色谱(200~300 目, 750 g) 分离, 得 17 个组分

($f_1 \sim f_{17}$), 其中 $f_2 \sim f_7$ 的抗肿瘤活性较强, 见表1, 且 TLC 检识为同颜色的斑点荧光, 故将其合并为 Fr_2 (27 g)。通过2种方法对 Fr_2 分离纯化, 在第1种方法中采用硅胶柱色谱(200~300目, 200 g)分离, 石油醚-乙酸乙酯(7:1~1:5)系统梯度洗脱, 根据TLC检测和MTT试验验证结果显示, 通过 Fr_2 硅胶柱色谱洗脱的6个组分中组分 $Fr_{2:3:1}$ 和 $Fr_{2:1:3}$ 可显著抑制 Eca109 细胞活性; 在第2种方法中, 通过制备型 TLC 分离 Fr_2 , 展开剂为石油醚-丙酮-冰乙酸(7:3:0.1), 得到与组分 $Fr_{2:3:1}$ 相同的条带3, 见图1。条带3也具有较好的抑制 Eca109 细胞增殖作用。由 $Fr_{2:3:1}$, $Fr_{2:1:3}$ 和条带3对人食管癌 Eca109 细胞的 IC_{50} 可知, $Fr_{2:3:1}$ 的抗肿瘤活性最好, 其 IC_{50} 约为 PFEP-E 的 1/5, 处理时间越长, IC_{50} 越小, 表明 $Fr_{2:3:1}$ 具有时间依赖性的抗食管癌活性, 见表2。故选取组分 $Fr_{2:3:1}$ 进行成分鉴定及成分含量分析。

表1 阿魏菇醇提物乙酸乙酯萃取相硅胶柱色谱组分对人食管癌 Eca109 细胞的 IC_{50} (24 h)

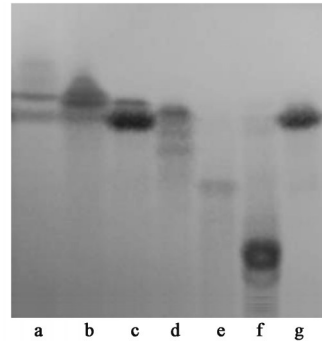
Table 1 IC_{50} (24 h) of silica gel column chromatographic fractions of ethyl acetate extract phase of *Pleurotus ferulae* ethanol extract for human esophageal cancer Eca109 cells

组分	得率/%	$IC_{50}/mg \cdot L^{-1}$	组分	得率/%	$IC_{50}/mg \cdot L^{-1}$
f_1	15.765	325.10	f_{10}	0.035	169.59
f_2	1.909	50.08	f_{11}	2.286	123.40
f_3	8.086	68.74	f_{12}	1.373	121.31
f_4	9.569	237.12	f_{13}	7.774	232.92
f_5	0.680	171.29	f_{14}	15.101	-
f_6	1.405	40.96	f_{15}	13.544	-
f_7	4.343	103.29	f_{16}	1.225	-
f_8	3.141	299.30	f_{17}	0.295	169.89
f_9	2.387	184.60	PFEP-E	3.750	201.52

3.2 UPLC-Q/TOF-MS 分析阿魏菇的有效萜类成分
为了明确阿魏菇乙酸乙酯相有效萜类成分, 对组分 $Fr_{2:3:1}$ 进行组分鉴定, 正、负离子模式下的 TIC 见图2。在正离子模式下, 准分子离子峰一般为 $[M+H]^+$ 和 $[M+Na]^+$; 而在负离子模式下, 准分子离子峰一般为 $[M-H]^-$ 和 $[M+Cl]^-$ 。通过分析裂解规律、数据库比对和文献检索, 共鉴定出了52种萜类, 包括2种单萜, 5种倍半萜, 15种二萜和30种三萜类。这些萜类化合物的鉴定结果见表3, 4。

3.3 化学成分鉴定举例

3.3.1 二萜类化合物 正、负离子模式下共鉴定出了15种二萜类。二萜类化合物是由4个异戊二烯



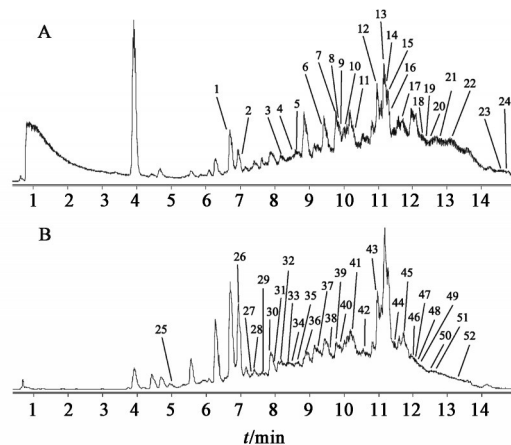
a-f. 石油醚-乙酸乙酯(7:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5)硅胶柱系统梯度洗脱组分; g(条带3). 石油醚-丙酮-冰乙酸(7:3:0.1)薄层色谱展开剂洗脱组分

图1 阿魏菇 Fr_2 组分的硅胶柱洗脱组分 TLC
Fig. 1 TLC of silica gel column eluting components from Fr_2 fraction of *Pleurotus ferulae*

表2 阿魏菇 Fr_2 组分的硅胶柱色谱组分对人食管癌 Eca109 细胞的 IC_{50}

Table 2 IC_{50} of silica gel column eluting components from Fr_2 fraction of *Pleurotus ferulae* for human esophageal cancer Eca109 cells

组分	$IC_{50}/mg \cdot L^{-1}$		
	24 h	48 h	72 h
$Fr_{2:3:1}$	42.63	13.76	3.65
$Fr_{2:1:3}$	71.53	63.03	37.93
条带3	90.84	61.90	37.93



A. 正离子模式; B. 负离子模式
图2 阿魏菇 $Fr_{2:3:1}$ 组分在不同离子模式下的 TIC
Fig. 2 TIC of $Fr_{2:3:1}$ components of *Pleurotus ferulatus* in different ion modes

(C_5H_8) 单元组成, 从结构上看萜类化合物是异戊二烯的低聚物以及其氢化物和含氧衍生物的总称。二萜类鉴定以化合物 26 为例, 在 ESI 模式下其有准分子离子 $[M-H]^-$ m/z 345.133 9, 检测到3个碎片离子。参考文献[15]分析其可能裂解途径, 碎片离子

表3 阿魏菇 Fr_{2,3:1}组分在正离子模式下的成分鉴定

Table 3 Identification of Fr_{2,3:1} components of *Pleurotus ferulatus* in positive ion mode

化合物	t _R /min	准分子离子 m/z	分子式	主要碎片离子 m/z	名称	质量分数/mg·g ⁻¹
1	6.726	283.151 6 [M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₂ O ₅	199.101 9, 155.110 8	青蒿素	2.675 7 ^b
2	7.046	371.186 0 [M+Na] ⁺	C ₂₀ H ₂₈ O ₅	201.116 6	赤霉素 A ₃₃	0.106 5 ^c
3	8.163	455.220 3 [M+H] ⁺	C ₂₆ H ₃₀ O ₇	327.221 0, 229.147 1, 169.089 3	黄柏酮	0.426 5 ^c
4	8.732	319.302 6 [M+Na] ⁺	C ₂₀ H ₄₀ O	229.065 4, 158.152 2, 79.020 4	叶绿醇	1.427 2 ^c
5	8.788	405.201 2 [M+H] ⁺	C ₂₂ H ₂₈ O ₇	311.225 7, 255.162 2	香茶菜醛	0.551 4 ^c
6	9.562	595.342 2 [M+Na] ⁺	C ₃₄ H ₅₂ O ₇	388.196 3, 325.201 5, 183.102 4	灵芝酸 W	0.469 2 ^d
7	9.854	333.200 0 [M+H] ⁺	C ₂₀ H ₂₈ O ₄	311.220 1	赤霉素 A ₁₂	18.746 2 ^c
8	9.914	509.326 3 [M+Na] ⁺	C ₃₀ H ₄₆ O ₅	313.225 5, 271.188 5	皂皮酸	0.176 9 ^d
9	9.938	415.210 3 [M+Na] ⁺	C ₂₂ H ₃₂ O ₆	313.235 7, 271.189 3	isodomedin	2.179 6 ^c
10	10.197	593.335 4 [M+Na] ⁺	C ₃₄ H ₅₀ O ₇	311.223 7	灵芝酸 Mk	0.409 8 ^d
11	10.477	235.169 3 [M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	227.126 1, 171.101 1	缬草烯酸	0.641 9 ^b
12	10.990	459.310 3 [M+Na] ⁺	C ₃₀ H ₄₄ O ₂	295.227 5	灵芝醛 A	1.137 4 ^d
13	11.200	243.136 2 [M+Na] ⁺	C ₁₄ H ₂₀ O ₂	-	glutinosone	0.663 6 ^a
14	11.319	609.381 1 [M+Na] ⁺	C ₃₅ H ₃₄ O ₇	395.240 0, 295.228 0	灵芝酸 Md	0.475 2 ^d
15	11.350	561.352 3 [M+H] ⁺	C ₃₂ H ₄₈ O ₈	478.287 5, 277.141 8	葫芦素 C	0.955 4 ^d
16	11.391	577.351 2 [M+Na] ⁺	C ₃₄ H ₅₀ O ₆	395.239 3, 295.225 1	灵芝酸 Me	0.716 7 ^d
17	11.726	723.434 9 [M+H] ⁺	C ₃₉ H ₆₂ O ₁₂	297.244 8	yamogenin 3-O-neohesperidoside	0.114 0 ^d
18	12.324	507.358 9 [M+H] ⁺	C ₃₀ H ₅₀ O ₆	467.337 5, 295.229 1, 134.895 4	theasapogenol A	1.103 5 ^d
19	12.365	661.440 8 [M+Na] ⁺	C ₃₆ H ₆₂ O ₉	557.374 0, 451.309 0, 295.228 9	sanchinoside B ₁	0.676 2 ^d
20	12.388	529.383 4 [M+H] ⁺	C ₃₃ H ₅₂ O ₅	506.319 1, 451.309 2, 323.224 7	tsugaric acid B	0.263 9 ^d
21	12.658	545.374 0 [M+H] ⁺	C ₃₃ H ₅₂ O ₆	469.353 2, 271.228 9	灵芝酸 Mi	1.508 9 ^d
22	13.006	461.344 1 [M+Na] ⁺	C ₃₀ H ₄₆ O ₂	415.285 9, 297.244 7, 100.934 0	灵芝醇 A	0.171 1 ^d
23	14.467	531.376 9 [M+Na] ⁺	C ₃₀ H ₅₂ O ₆	423.348 0, 397.332 0, 353.271 0	fasciculol C	0.998 3 ^d
24	14.572	491.375 0 [M+H] ⁺	C ₃₀ H ₅₀ O ₅	473.325 4, 349.241 1, 144.924 3	玉蕊皂苷元 C	0.399 0 ^d

注: a. 单萜; b. 倍半萜; c. 二萜; d. 三萜。

m/z 241.108 7 [M-H-104]⁻ 对应准分子离子 m/z 345.133 9 中失去 1 个 COOH, 1 个 CH₃, 1 个 OH 和 1 个 CO 离子, 同时从溶剂中加合 1 个氢离子所得的碎片离子; 碎片离子 m/z 201.116 4 [M-H-104-40]⁻ 对应碎片离子 m/z 241.108 7 [M-H-104]⁻ 中再失去 1 个 CO₂ 分子, 同时从溶剂中加合 4 个氢离子所得的碎片离子; 碎片离子 m/z 171.103 3 [M-H-104-70]⁻ 对应碎片离子 m/z 241.108 7 [M-H-104]⁻ 中再失去 1 个 OH 和 1 个 C₄H₅ 离子所得的碎片离子。其相对分子质量 346.141 6, 根据元素组成分析, 推断该化合物的分子式为 C₁₉H₂₂O₆, 结合在线网络数据库比对鉴定该化合物为赤霉素 A₃。

3.3.2 三萜类化合物 正、负离子模式下共检测鉴定出 30 种三萜类。三萜类成分大多数由 6 个异戊二烯单元组成, 一般根据三萜类成分碳环的有无和多少进行分类, 常见的有四环三萜和五环三萜。三

萜类鉴定以化合物 **52** 为例, 在 ESI 模式下其有准分子离子 [M+Cl]⁻ m/z 491.334 4, 检测到了 2 个碎片离子。参考文献 [16-17] 分析其可能的裂解途径, 碎片离子 415.266 4 [M+Cl-76]⁻ 对应齐墩果酸分子中失去 1 个 COOH, 1 个 C₂H₇ 离子所得的碎片离子, 碎片离子 327.291 1 [M+Cl-76-88]⁻ 对应碎片离子 415.266 4 [M+Cl-76]⁻ 再失去 1 个 OH 和 C₅H₁₁ 离子所得的碎片离子。其相对分子质量 456.360 3, 根据元素组成分析, 推断该化合物的分子式为 C₃₀H₄₈O₃, 结合在线网络数据库比对鉴定该化合物为齐墩果酸。

3.4 Fr_{2,3:1} 组分中各种萜类的含量分析 根据 UPLC-Q/TOF-MS 所得到的各成分峰面积和样品、内标浓度核算 Fr_{2,3:1} 组分中各萜类成分的含量。结果表明 Fr_{2,3:1} 组分中总萜类质量分数 62.88 mg·g⁻¹, 其中单萜、倍半萜、二萜、三萜质量分数分别为 0.83,

表4 阿魏菇 Fr_{2,3:1}组分在负离子模式下的成分鉴定

Table 4 Identification of Fr_{2,3:1} components of *Pleurotus ferulatus* in negative ion mode

化合物	t _R /min	准分子离子 m/z	分子式	主要碎片离子 m/z	名称	质量分数/mg·g ⁻¹
25	4.998	225.080 7 [M-H] ⁻	C ₁₁ H ₁₄ O ₅	215.092 0, 159.066 0	栀子苷元	0.171 3 ^a
26	6.906	345.133 9 [M-H] ⁻	C ₁₉ H ₂₂ O ₆	241.108 7, 201.116 4, 171.103 3	赤霉素 A ₃	2.000 1 ^c
27	7.300	361.199 6 [M-H] ⁻	C ₂₁ H ₃₀ O ₅	339.200 3, 213.114 3	poststerone	1.086 8 ^c
28	7.360	363.144 0 [M-H] ⁻	C ₁₉ H ₂₄ O ₇	281.140 5, 213.104 6, 169.124 5	赤霉素 A ₈	0.162 2 ^c
29	7.826	283.130 3 [M+Cl] ⁻	C ₁₅ H ₂₀ O ₃	227.127 1, 197.116 8	1,2-dihydrosantonin	1.197 1 ^b
30	7.842	383.115 9 [M+Cl] ⁻	C ₁₉ H ₂₄ O ₆	329.236 8, 283.157 1, 183.140 4	赤霉素 A ₁	0.131 5 ^c
31	7.997	287.142 1 [M+Cl] ⁻	C ₁₅ H ₂₄ O ₃	217.146 3, 197.392 4	cuauhtemone	1.547 7 ^b
32	8.190	459.207 4 [M+Cl] ⁻	C ₂₂ H ₃₂ O ₈	408.227 3, 327.221 0, 169.089 3	苦木内酯H	0.156 6 ^c
33	8.270	355.118 3 [M-H] ⁻	C ₂₀ H ₂₀ O ₆	345.230 8, 209.119 8	plaunol B	0.232 3 ^c
34	8.351	587.284 7 [M+Cl] ⁻	C ₃₀ H ₄₈ O ₇ S	390.213 4, 327.219 0, 213.150 1	triterpenoid	0.089 6 ^d
35	8.486	363.194 0 [M+Cl] ⁻	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	241.144 5, 171.103 7	auxin A	1.507 8 ^b
36	8.903	345.169 0 [M-H] ⁻	C ₂₀ H ₂₆ O ₅	343.247 9, 311.225 3	赤霉素 A ₃₇	0.651 4 ^c
37	9.353	361.165 9 [M-H] ⁻	C ₂₀ H ₂₆ O ₆	325.203 7, 265.145 9, 183.104 2	赤霉素 A ₃₆	1.355 7 ^c
38	9.598	573.321 9 [M-H] ⁻	C ₃₂ H ₄₆ O ₉	463.267 3, 388.195 9, 309.206 1	灵芝酸K	0.119 9 ^d
39	9.692	365.120 9 [M+Cl] ⁻	C ₁₉ H ₂₂ O ₅	325.251 1	赤霉素 A ₅	0.681 1 ^c
40	9.816	515.303 2 [M-H] ⁻	C ₃₀ H ₄₄ O ₇	311.229 9	葫芦素D	0.409 9 ^d
41	10.095	511.282 1 [M-H] ⁻	C ₃₀ H ₄₀ O ₇	311.222 3	赤芝孢子内酯A	3.679 8 ^d
42	10.653	499.335 7 [M-H] ⁻	C ₃₀ H ₄₄ O ₆	478.287 7, 309.204 8, 269.210 3	灵芝酸β	0.815 3 ^d
43	11.042	505.310 5 [M+Cl] ⁻	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	295.231 3	丝石竹皂苷元	1.588 7 ^d
44	11.506	523.318 3 [M+Cl] ⁻	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	395.244 8, 325.481 4, 293.213 8	积雪草酸	0.408 9 ^d
45	11.876	489.300 2 [M+Cl] ⁻	C ₃₀ H ₄₆ O ₃	297.242 6	灵芝酸Y	1.839 7 ^d
46	11.995	785.445 7 [M-H] ⁻	C ₄₁ H ₇₀ O ₁₄	623.445 1, 506.319 5, 295.225 9	珠子参苷R ₂	0.086 1 ^d
47	12.079	553.364 3 [M-H] ⁻	C ₃₄ H ₅₀ O ₆	506.322 9, 473.297 5, 134.894 5	灵芝酸R	0.724 2 ^d
48	12.138	607.263 5 [M+Cl] ⁻	C ₃₂ H ₄₄ O ₉	506.321 2, 467.331 5, 295.226 2	灵芝酸H	0.110 6 ^d
49	12.167	463.312 1 [M-H] ⁻	C ₂₇ H ₄₄ O ₆	429.265 3, 323.259 4, 295.228 7	松甾酮A	0.674 4 ^d
50	12.406	467.323 5 [M-H] ⁻	C ₃₀ H ₄₄ O ₄	451.306 5, 349.240 3, 299.418 4	光甘草内酯	1.410 8 ^d
51	12.585	569.361 7 [M-H] ⁻	C ₃₄ H ₅₀ O ₇	569.367 8, 487.255 7, 271.227 2	赤灵酸P ₂	2.103 4 ^d
52	13.236	491.334 4 [M+Cl] ⁻	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	415.266 4, 327.291 1	齐墩果酸	0.994 5 ^d

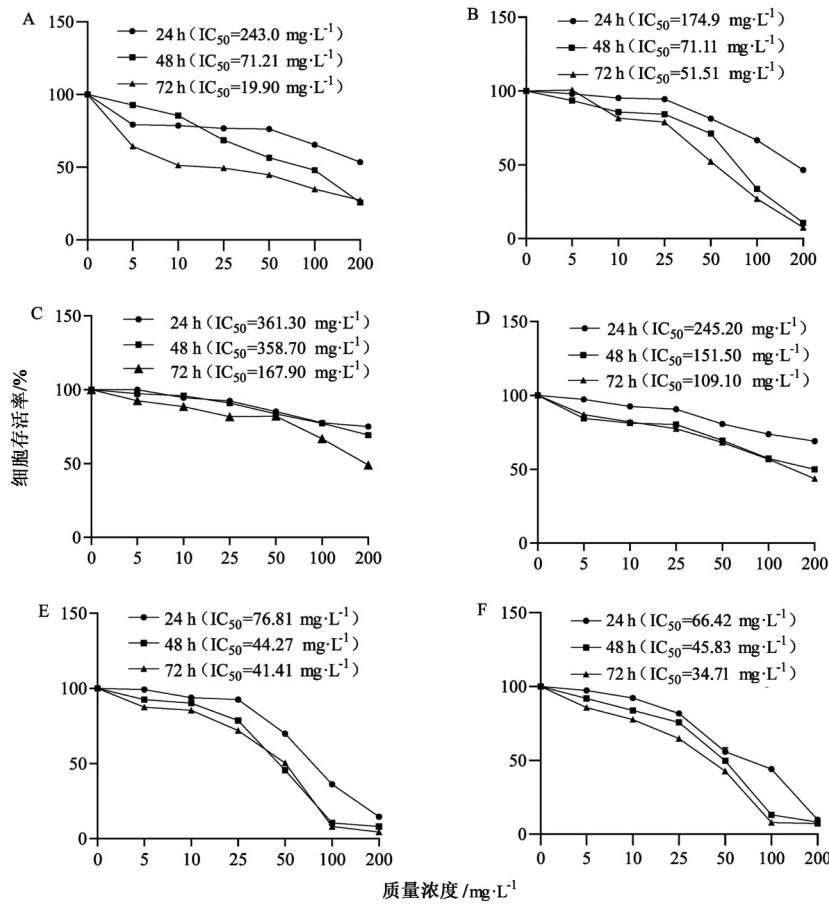
7.57, 29.90, 24.58 mg·g⁻¹, 分别占总萜类的 1.32%, 12.04%, 47.55%, 39.09%, 见表 3, 4。说明二萜类和三萜类是阿魏菇有效萜类的主要组成成分, 两者占总萜类的 86.64%。由表 3, 4 可知, 赤霉素类是二萜类的主要组成成分, 共 8 种, 质量分数 23.83 mg·g⁻¹, 占总萜类的 37.90%, 二萜类的 79.70%。灵芝酸类是三萜类的主要组成成分, 一共 10 种成分, 质量分数 7.19 mg·g⁻¹, 占总萜类的 11.43%, 三萜类的 29.25%。

3.5 萜类化合物抗食管癌活性 经过对 Fr_{2,3:1} 组分中各种萜类的含量分析, 初步确定二萜类和三萜类是新疆阿魏菇有效萜类的主要成分, 且这些萜类主要集中在赤霉素类和灵芝酸类。目前灵芝酸类抗肿瘤活性研究报道较多, 赤霉素类抗肿瘤活性研究

报道极少。相关研究表明, 灵芝酸 Y 能抑制肺癌细胞 H460 的增殖^[18], 灵芝酸 A 能抑制人骨肉瘤细胞 MG-63 的增殖^[19], 灵芝酸 B 能抑制肝癌细胞增殖^[20], 灵芝酸 T 能抑制肺癌细胞增殖^[21], 灵芝酸 D 能抑制人食管癌 Eca109 细胞的增殖^[22]。说明灵芝酸类具有较好的抗肿瘤效果, 而赤霉素类的抗肿瘤活性尚未明确。根据各种萜类的相对含量和抗食管癌活性的研究状况, 选取具有代表性和尚无报道抗食管癌活性研究的倍半萜类(青蒿素), 二萜类(赤霉素 A₃, 赤霉素 A₅ 和叶绿醇), 三萜类(丝石竹皂苷元和齐墩果酸), 通过 MTT 细胞毒性试验验证其抗人食管癌 Eca109 细胞活性。结果表明青蒿素和叶绿醇作用于人食管癌 Eca109 细胞 24 h 后, 其抑制

细胞增殖效果较弱,而作用48 h和72 h后抑制效果明显增强,见图3(A,B)。赤霉素 A_3 和赤霉素 A_5 对人食管癌Eca109细胞作用24,48,72 h后抑制细胞增殖效果始终较弱,且抑制效果类似,见图3(C,D)。丝石竹皂苷元和齐墩果酸对人食管癌Eca109细胞作用24,48,72 h后抑制细胞增殖效果始终较强,且抑制效果类似,见图3(E,F)。从化学结构上看赤霉素 A_3 和赤霉素 A_5 的化学结构非常相似,且其抗人食管癌Eca109细胞活性均较弱,说明赤霉素类

化合物结构相似导致其抗食管癌活性类似,由此初步判断,赤霉素类化合物不是新疆阿魏菇抗食管癌有效萜类成分。丝石竹皂苷元和齐墩果酸结构非常相似,均为五环三萜,且抗人食管癌Eca109细胞活性均较强,由于其他五环三萜类结构与此二者相似,推测可能具有类似的抗食管癌活性,但有待于进一步实验验证。综上所述,阿魏菇抗食管癌有效萜类主要是以灵芝酸类为主的三萜类化合物。此结果与本课题组前期研究一致^[1,7-8]。



A. 青蒿素; B. 叶绿醇; C. 赤霉素 A_3 ; D. 赤霉素 A_5 ; E. 丝石竹皂苷元; F. 齐墩果酸

图3 阿魏菇Fr_{2,3,1}组分中6种萜类对人食管癌Eca109细胞增殖的影响

Fig. 3 Effect of 6 terpenoids in Fr_{2,3,1} components of *Pleurotus ferulatus* on proliferation of human esophageal cancer Eca109 cells

4 讨论

阿魏菇是产自新疆的一种可食用大型菌类,当地民间常被作为癌症治疗药物^[1-6]。随着研究的逐渐深入,发现阿魏菇提取物可抑制多种肿瘤细胞的增殖,诱导凋亡,并可增强机体免疫力。本课题组前期研究表明阿魏菇醇提取物中的主要活性成分是萜类、皂苷类化合物;阿魏菇粗三萜可诱导人食管癌Eca109细胞凋亡,且上调细胞色素C(Cyt-C),B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)相关的X蛋白(Bax),葡萄糖调节蛋白78(GRP78),磷酸化真核起始因子2 α (p-

eIF2 α),转录因子C/EBP同源蛋白(CHOP)的水平,下调Bcl-2的水平,显著增加剪切型含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase)-9,Caspase-3,聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(PARP)的含量,并可通过线粒体途径诱导人食管癌Eca109细胞的凋亡和内质网应激^[9-10]。萜类作为药用真菌的主要活性成分之一^[11],其主要分为单萜、倍半萜、二萜及三萜类,约有4万种植物和动物的萜类化合物已得到确认^[23]。

本课题组通过超声辅助法有效提升了阿魏菇三萜类成分提取率^[1],采用硅胶柱色谱、制备型薄层

色谱技术对PFEP-E中抗食管癌有效阿魏菇萜类化合物进行分离纯化,得到有效抗人食管癌Eca109细胞的活性Fr_{2-3:1}组分。由于UPLC-Q/TOF-MS技术可得到精确相对分子质量,在成分鉴别,特别是在无对照品的成分鉴别领域应用广泛^[24-27],因此,本文采用UPLC-Q/TOF-MS技术,结合Metlin, MassBank, PubChem等在线网络数据库及相关文献报道对分离纯化后Fr_{2-3:1}组分进行了化学成分鉴定。本研究首次对新疆阿魏菇抗人食管癌Eca109细胞的活性组分进行分析鉴定,共鉴定出52种萜类化合物,这52种萜类化合物均首次在该食用菌中被分离鉴定。由含量分析结果可知,二萜类和三萜类是阿魏菇有效萜类的主要组成成分,两者共占总萜类的86.64%,赤霉素类是阿魏菇二萜类的主要组成成分,灵芝酸类是阿魏菇三萜类的主要组成成分。

BI等^[28]研究发现唇形科植物冬凌草中的二萜化合物冬凌草素对人胃癌细胞SNU-216具有抑制存活、迁移和促进凋亡的能力,且对正常细胞HEK293的活性无影响。科罗素酸(CA)为枇杷叶中的天然三萜酸,在前列腺癌异种移植模型中诱导细胞凋亡并抑制肿瘤生长,对正常细胞和组织毒性有限^[29]。这些研究提示阿魏菇中的抗肿瘤成分可能是二萜和三萜类化合物,为了明确其抗肿瘤有效萜类成分,经抗人食管癌Eca109细胞活性验证,初步明确了叶绿醇,赤霉素A₃,齐墩果酸等6种二萜和三萜类化合物的抗食管癌活性。虽然赤霉素类含量较多,但从抗人食管癌Eca109细胞活性试验结果来看,赤霉素A₃和赤霉素A₅的抗食管癌活性较弱,因其赤霉素类化合物的化学结构类似,可以推断赤霉素类不是新疆阿魏菇抗食管癌的有效萜类成分。研究发现灵芝酸类具有抗肿瘤活性^[18-22],由抗人食管癌Eca109细胞活性试验结果可知,青蒿素、叶绿醇、齐墩果酸和丝石竹皂苷元具有较好的抗食管癌活性,因此,最终明确了灵芝酸类为主的三萜类化合物和部分其他萜类化合物是新疆阿魏菇抗食管癌有效萜类成分。这将为新疆阿魏菇萜类化合物作为抗肿瘤药物进一步的开发及对功能性食品的研制提供理论依据,并有助于有效提升阿魏菇的附加产值。目前,新疆阿魏菇化学成分尚未完全得到分离与鉴定,尤其是萜类成分,因此明确何种新疆阿魏菇萜类化合物才具有此种活性或是哪些萜类化合物起到相互作用而发挥良好的抗肿瘤活性尚需深入研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 王为兰,陈开旭,刘军,等. 阿魏菇醇提物抗肿瘤功效及三萜类成分的提取[J]. 生物技术通报, 2016, 32(7):206-216.
- [2] WANG W L, CHEN K X, LIU Q, et al. Suppression of tumor growth by *Pleurotus ferulae* ethanol extract through induction of cell apoptosis, and inhibition of cell proliferation and migration[J]. PLoS One, 2014, 9(7):e102673.
- [3] LI J Y, LI J Y, AIPIRE A, et al. The combination of *Pleurotus ferulae* water extract and CpG-ODN enhances the immune responses and antitumor efficacy of HPV peptides pulsed dendritic cell-based vaccine [J]. Vaccine, 2016, 34(31):3568-3575.
- [4] TSAI S Y, HUANG S J, LO S H, et al. Flavour components and antioxidant properties of several cultivated mushrooms[J]. Food Chem, 2009, 113(2): 578-584.
- [5] ALAM N, YOON K N, LEE J S, et al. Consequence of the antioxidant activities and tyrosinase inhibitory effects of various extracts from the fruiting bodies of *Pleurotus ferulae* [J]. Saudi J Biol Sci, 2012, 19(1): 111-118.
- [6] LI J Y, YUAN P F, WANG X H, et al. Purification, characterization and bioactivities of polysaccharides from *Pleurotus ferulae* [J]. Food Funct, 2017, 8(5): 1905-1914.
- [7] YANG Y, FU C S, ZHOU F F, et al. Chemical composition, antioxidant and antitumor activities of sub-fractions of wild and cultivated *Pleurotus ferulae* ethanol extracts[J]. Peer J, 2018, 6:e6097.
- [8] YANG Y, LUO X Y, MAYILA Y S, et al. Ergosterol peroxide from *Pleurotus ferulae* inhibits gastrointestinal tumor cell growth through induction of apoptosis via reactive oxygen species and endoplasmic reticulum stress[J]. Food Funct, 2020, 11(5): 4171-4184.
- [9] 王磊,张富春,刘军. 阿魏菇乙酸乙酯相三萜类化合物对食管癌Eca109细胞的增殖抑制及机制[J]. 食品科学, 2019, 40(23):189-198.
- [10] 王磊,张富春,刘军. 阿魏菇总三萜、齐墩果酸和紫杉醇的体外抗结肠癌作用研究[J]. 国际生物医学工程杂志, 2019, 42(6):451-483.
- [11] SALVADOR J A R, LEAL A S, VALDEIRA A S, et al. Oleanane-, ursane-, and quinone methide friedelane-type triterpenoid derivatives: recent advances in cancer treatment[J]. Eur J Med Chem, 2017, 142:95-130.
- [12] BI X X, HAN L, QU T G, et al. Anti-inflammatory

- effects, SAR, and action mechanism of monoterpenoids from Radix Paeoniae Alba on LPS-stimulated RAW264.7 cells [J]. *Molecules*, 2017, 22(5):715.
- [13] MAFUD A C, SILVA M P N, MONTEIRO D C, et al. Structural parameters, molecular properties, and biological evaluation of some terpenes targeting *Schistosoma mansoni* parasite [J]. *Chem Biol Interact*, 2016, 244:129-139.
- [14] GALLE M, CRESPO R, KLADNIEW B R, et al. Suppression by geraniol of the growth of A549 human lung adenocarcinoma cells and inhibition of the mevalonate pathway in culture and *in vivo*: potential use in cancer chemotherapy [J]. *Nutr Cancer*, 2014, 66(5):888-895.
- [15] XIE W, HAN C, ZHENG Z Q, et al. Determination of gibberellin A₃ residue in fruit samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2011, 127(2):890-892.
- [16] MODUGNO F, RIBECHINI E, COLOMBINI M P. Chemical study of triterpenoid resinous materials in archaeological findings by means of direct exposure electron ionisation mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Sp*, 2010, 20(11):1787-1800.
- [17] PANG N, MALIKE D, LIU H. Simultaneous determination of main bioactive components in *Rosa multiflora* Thunb. and their fragmentation study by LC-MS [J]. *Chromatographia*, 2009, 70(7):1253-1257.
- [18] 杜国华,王宏旭,闫征,等. 灵芝三萜化合物的抗肿瘤靶点预测与活性验证 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(3):517-522.
- [19] GILL B S, NAVGEET A, KUMAR S. Ganoderic acid targeting multiple receptors in cancer: *in silico* and *in vitro* study [J]. *Tumor Biol*, 2016, 37(10):14271-14290.
- [20] WENG C J, CHAU C F, HEIEH Y S, et al. Lucidenic acid inhibits PMA-induced invasion of human hepatoma cells through inactivating MAPK/ERK signal transduction pathway and reducing binding activities of NF-kappaB and AP-1 [J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29(1):147-156.
- [21] CHEN N H, LIU J W, ZHONG J J. Ganoderic acid T inhibits tumor invasion *in vitro* and *in vivo* through inhibition of MMP expression [J]. *Pharmacol Rep*, 2010, 62(1):150-163.
- [22] SHAO C S, ZHOU X H, ZHENG X X, et al. Ganoderic acid D induces synergistic autophagic cell death except for apoptosis in ESCC cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 262:113213.
- [23] TANG Y, WU H, SHAO B Z, et al. Celosins inhibit atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice and promote autophagy flow [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 215:74-82.
- [24] 高天元,雷雨恬,唐国琳,等. 药用鸡矢藤药材化学成分分析的UPLC-Q-TOF-MS分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(17):134-141.
- [25] ZOU L, ZHANG Y, LI W, et al. Comparison of chemical profiles, anti-inflammatory activity, and UPLC-Q-TOF/MS-based metabolomics in endotoxic fever rats between synthetic borneol and natural borneol [J]. *Molecules*, 2017, 22(9):1446.
- [26] 黄浩洲,仇敏,唐进法,等. 基于UPLC-Q-TOF-MS^E技术的三勒浆口服液上清液及沉淀部分化学成分分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(14):143-151.
- [27] 吴茵,百万军,魏欣. 基于UPLC-Q-TOF-MS技术分析木蝴蝶中化学成分 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(2):196-200.
- [28] BI E X, LIU D Q, LI Y X, et al. Oridonin induces growth inhibition and apoptosis in human gastric carcinoma cells by enhancement of p53 expression and function [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2018, 51(12):e7599.
- [29] MA B, ZHANG H, WANG Y, et al. Corosolic acid, a natural triterpenoid, induces ER stress-dependent apoptosis in human castration resistant prostate cancer cells via activation of IRE-1/JNK, PERK/CHOP and TRIB3 [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1):210.

[责任编辑 刘德文]