

灵芝总皂苷对结肠癌 HCT116 细胞的抑制作用

康佳茜, 刘艳红, 张玉瑶, 周中凯*

(天津科技大学 食品科学与工程学院, 天津 300457)

摘要: 为探究灵芝总皂苷提取物对结肠癌 HCT116 细胞的抑制作用和相关机制, 以灵芝子实体为原料, 醇提并纯化总皂苷, 通过 CCK8 法测定灵芝总皂苷提取物对结肠癌 HCT116 细胞的抑制效果, 同时采用流式细胞术检测细胞凋亡, 荧光分光光度计检测细胞内线粒体膜电位及细胞内活性氧含量, 实时荧光定量 PCR 检测凋亡相关基因 *p53*、*noax*、*bax*、*bcl-2*、*caspase-9* 和 *caspase-3* 的表达。结果显示, 与空白组相比, 灵芝总皂苷质量浓度为 40 mg/L 以上时, 可极显著地抑制 HCT116 细胞增殖, 且抑制效果与时间呈正相关。经灵芝总皂苷干预后, 细胞凋亡率显著增加, 当加入灵芝总皂苷的质量浓度为 150 mg/L 时, 其凋亡率达到 50.2%, 且灵芝总皂苷可显著降低细胞内线粒体膜电位, 增加细胞内活性氧含量, 增加促凋亡基因 *p53*、*noax*、*bax*、*caspase-9* 和 *caspase-3* 的表达, 降低抗凋亡基因 *bcl-2* 的表达。综上, 灵芝总皂苷对于结肠癌细胞具有显著抑制作用, 且其抑制效果可通过线粒体凋亡途径实现, 是值得进一步研究的抑结肠癌候选药物和食品添加剂。

关键词: 结肠癌; 灵芝皂苷; 抗肿瘤; 细胞凋亡; 线粒体膜电位

中图分类号: TS 201.2 文章编号: 1673-1689(2023)12-0090-08 DOI: 10.12441/spyswjs.20211010002

Inhibition of Colon Cancer Cell Line HCT116 by Total Saponins from *Ganoderma lucidum*

KANG Jiaxi, LIU Yanhong, ZHANG Yuyao, ZHOU Zhongkai*

(School of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: This study aimed to explore the inhibitory effect and related mechanisms of the extracted Lucid Ganoderma total saponins (LGTS) on colon cancer HCT116 cells. *Ganoderma lucidum* fruiting bodies were used as the raw materials, and the LGTS was extracted by alcohol and then purified. The inhibitory effect of LGTS on colon cancer HCT116 cells was detected by CCK8 method. Meanwhile, the state of cell apoptosis was detected by flow cytometry. The intracellular mitochondrial membrane potential and intracellular reactive oxygen species levels were recorded by fluorescence spectrophotometer. The expression of apoptosis-related genes such as *p53*, *noax*, *bax*, *bcl-2*, *caspase-9* and *caspase-3* were measured by real-time fluorescent quantitative PCR. The results showed that the concentration of LGTS above 40 mg/L could significantly inhibit the proliferation of

收稿日期: 2021-10-10 修回日期: 2021-12-25

基金项目: 天津市“一带一路”科技创新合作项目(18PTZWHZ00080)。

* 通信作者: 周中凯(1964—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品生物高效转化、新产品开发及营养代谢研究。

E-mail: zkzhou@tust.edu.cn

HCT116 cells compared with the blank group, with the inhibitory effect becoming positively correlated with time. Through the intervention of GLTS, the apoptosis rate of cells increased significantly. At a GLTS concentration of 150 mg/L, the apoptosis rate reached 50.2%. Additionally, GLTS significantly reduced the intracellular mitochondrial membrane potential, increased the intracellular reactive oxygen species levels, upregulated the expression of pro-apoptotic genes (*p53*, *noxa*, *bax*, *caspase-9* and *caspase-3*), and downregulated the expression of anti-apoptotic gene (*bcl-2*). In conclusion, GLTS have the significant inhibitory effect on colon cancer cells and the effect could be achieved through the mitochondrial apoptosis pathway, suggesting GLTS as promising candidates for further research as potential anti-colon cancer drugs and food additives.

Keywords: colon cancer, saponins from *Ganoderma Lucidum*, anti-tumor, cell apoptosis, mitochondrial membrane potential

灵芝(*Ganoderma lucidum*)是一种多孔菌科真菌的干燥子实体^[1],有安心神、健脾胃、益气血,以及治疗心悸、冠心病和肿瘤等功效^[2]。灵芝的多种功效主要是因其所含的多种活性成分,主要包括多糖类、皂苷类、氨基酸、生物碱和微量元素等。目前人们对于多糖和蛋白质等大分子活性物质的研究相对较多,由于皂苷类物质为次级代谢产物,有难分离纯化的特点,故对其研究相对较少,而灵芝皂苷作为灵芝的主要活性成分之一,具有保肝、抑制肿瘤、抗氧化、抑菌等功效^[3-5],而目前人们对其研究较少。有多项研究^[6-7]表明皂苷类物质作为自然界的一种有效活性物质,其资源的开发十分值得关注。

结肠癌是世界上第二大常见癌症和第三大致死癌症^[8]。由于人们生活方式及饮食习惯的改变,全球各地区结肠癌发病率逐年增多,因此结肠癌严重威胁着人们的健康^[9-10]。现有研究表明^[11],抑制肿瘤的发生机制多与抑制肿瘤细胞的增殖和诱导其凋亡相关。王理槐等通过实验证明重楼皂苷对于结肠癌细胞有明显的细胞毒性,表明皂苷类物质可有效抑制结肠癌细胞增殖并诱导其凋亡,但凋亡机制还有待进一步确定^[12]。目前的研究显示^[13-14],在哺乳动物细胞中细胞凋亡机制主要为两种途径:一种是由死亡受体介导的外源性途径;另一种是由 *Bcl-2* 家族介导并通过线粒体发挥作用的内源性途径,线粒体上的促凋亡因子可引起线粒体去极化,使线粒体膜电位降低,进而释放出细胞色素 c,而细胞色素 c 可使基因 *caspase-9* 活化,随后活化的 *caspase-9* 激活下游基因 *caspase-3*^[15],同时细胞内活性氧的增加也可促进 *caspase-3* 的激活^[16],进而导致细胞凋亡。

作者为探究灵芝总皂苷类物质对结肠癌的抑

制作用及相关机制,选用结肠癌 HCT116 细胞为实验对象,提取并纯化灵芝总皂苷,设置纯化前和纯化后两组实验干预物,对比两组干预物的抑制效果,初步研究灵芝总皂苷对于结肠癌的抑制作用,并探究相关的内源性凋亡机制,为灵芝总皂苷类物质资源开发及相关新药物研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

灵芝子实体切片:中国浙江龙泉澳中生物科技有限公司;结肠癌 HCT116 细胞、人正常结肠上皮细胞 NCM460:中国医学科学院北京协和医学院提供;胎牛血清:澳大利亚 MRC 公司;紫杉醇标准品、质量分数 0.25%胰蛋白酶、DMEM 培养基、线粒体膜电位试剂盒:中国 Solarbio 公司;CCK8 试剂盒:美国 MCE 公司;细胞凋亡试剂盒、活性氧检测试剂盒:中国 Meilunbio 公司;反转录试剂盒:美国 Thermo scientific 公司;PCR 扩增试剂盒:日本 TaKaRa 公司;引物:美国 GENEWIZ 公司。

1.2 仪器与设备

CKX41 倒置显微镜:日本 Olympus 公司;Biotek-SynergyHT 酶标仪:美国 Bio-Tek 公司;FACSCalibur 流式细胞仪:美国 Becton Dickinson 公司;Carye eclipse 荧光光度计:美国 Agilent 公司;ETC811PlusPCR 仪:中国东胜龙公司;StepOnePlus™ Real-Time PCR System 实时荧光定量 PCR 仪、Thermo ST8 ST8R 冷冻离心机:美国 Thermo 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 灵芝总皂苷的提取与纯化 灵芝切片经磨粉机打磨后过 20 目筛,灵芝子实体粉末用体积分

数 80.5% 的乙醇超声辅助提取,料液比为 1 g:50 mL,抽提产物经旋转蒸发浓缩至乙醇全部旋蒸出,真空冷冻干燥成粉末备用(此为纯化前灵芝总皂苷样品)。抽提产物经饱和正丁醇萃取 10 h 后,以去离子水稀释一倍,缓慢加入 D101 大孔树脂中,用体积分数 90% 的乙醇作为流动相洗脱,收集洗脱液,将洗脱液旋转蒸发浓缩,真空冷冻干燥成粉末备用(此为纯化后灵芝总皂苷样品)。采用香草醛高氯酸比色法^[17]测定纯化前后灵芝总皂苷质量分数,并采用超高效液相色谱-质谱联用技术^[18]对其成分进行定性分析。

1.3.2 细胞培养 HCT116 细胞培养于含体积分数 10% FBS 和 1% 青霉素-链霉素-两性霉素 B 的 DMEM 培养基中,置于 37 °C、含体积分数 5% 的 CO₂ 培养箱中培养,每 2 d 传代一次并观察细胞生长情况。

1.3.3 CCK8 法检测细胞增殖 取对数生长期的 HCT116 细胞,并以每孔 5×10^3 个细胞接种于 96 孔板中,培养 12 h 待细胞贴壁后加入药物。分别加入纯化前灵芝总皂苷提取物(记为 I)和纯化后灵芝总皂苷提取物(记为 P),使其终质量浓度均为 25、50、100、200、400 mg/L,每个质量浓度设置 5 个复孔,同时设置无药物处理组、无细胞空白组和阳性对照组(0.06 mg/L 紫杉醇),干预后分别培养 24、48、72 h。每孔加 10 μ L CCK-8 试剂孵育 3 h 后于 450 nm 处测定吸光度,并计算细胞增殖抑制率。

取对数生长期的 NCM460 细胞,以每孔 5×10^3 个细胞接种于 96 孔板中,培养 12 h 待细胞贴壁后加入药物,设置同 HCT116 细胞相同的实验组,干预培养 48 h。每孔加 10 μ L CCK-8 试剂孵育 3 h 后于 450 nm 处测定吸光度,并计算细胞增殖率。

1.3.4 细胞形态观察 采用灵芝总皂苷提取物进行 HCT116 细胞的半数抑制质量浓度实验。设置实验组:I70(加纯化前灵芝总皂苷提取物,使其终质量浓度为 70 mg/L)、I150(加纯化前灵芝总皂苷提取物,使其终质量浓度为 150 mg/L)、P70(加纯化后灵芝总皂苷提取物,使其终质量浓度为 70 mg/L)、P150(加纯化后灵芝总皂苷提取物,使其终质量浓度为 150 mg/L),同时设置空白组和阳性对照组(0.06 mg/L 紫杉醇)。培养 48 h 后于倒置显微镜下直接观察细胞形态。

1.3.5 流式细胞术检测细胞凋亡 收集培养 48 h 的 I70、I150、P70、P150、空白组和阳性对照组实验细胞。按说明加入 Annexin V-FITC 和 PI 染液并于

室温避光孵育 15 min 后进行流式细胞仪检测,分析细胞凋亡率。

1.3.6 荧光分光光度计检测细胞内线粒体膜电位 收集培养 48 h 的 I70、I150、P70、P150、空白组和阳性对照组实验细胞,按说明加入 JC-1 染色液,37 °C 孵育 20 min。孵育结束后用 JC-1 染色缓冲液洗去多余染液,用荧光分光光度计检测 JC-1 单体和聚合体吸光度(A)。A_单:激发波长 490 nm,发射波长 530 nm;A_聚:激发波长 525 nm,发射波长 590 nm。以 A_聚和 A_单的比值(A_聚/A_单)评估 $\Delta\Psi_m$ 水平。

1.3.7 荧光分光光度计检测细胞内活性氧(reactive oxygen species,ROS)含量 收集培养 48 h 的 I70、I150、P70、P150、空白组和阳性对照组实验细胞,按说明加入配制好的 DCFH-DA 染液,37 °C 避光孵育 25 min,孵育结束后用适量 PBS 缓冲液洗去多余染料,用荧光分光光度计检测荧光强度(激发波长 488 nm,发射波长 525 nm)。

1.3.8 实时荧光定量 PCR 检测基因表达 收集培养 48 h 的 I70、I150、P70、P150 和空白组实验细胞。按试剂盒说明提取总 RNA,并测定其浓度及纯度。按照反转录试剂盒说明将提取出的总 RNA 反转录合成 cDNA,以 cDNA 为模板按照说明进行 qRT-PCR 扩增检测。以 β -actin 为内参,采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算 mRNA 相对表达量。引物序列见表 1。

1.4 统计学方法

用 SPSS 26.0 进行统计分析,以 3 次实验结果的平均数 \pm 标准差表示,采用单因素方差对数据进行分析, $P < 0.05$ 为统计学上组间差异显著, $P < 0.01$ 为统计学上组间差异极显著。

2 结果与分析

2.1 灵芝总皂苷提取纯化结果

经香草醛高氯酸比色法测定纯化前灵芝总皂苷质量分数为 9.28%,纯化后灵芝总皂苷质量分数为 38.91%。

经液质分析,纯化前灵芝总皂苷提取物主要含有皂苷类、多酚类、生物碱、芳香类化合物、羧酸类及其衍生物和有机酸及其衍生物。相较于纯化前,纯化后灵芝总皂苷提取物中,皂苷类物质质量分数明显提高,纯化后的灵芝总皂苷提取物除含有主要活性物质皂苷类外,还含有一些醇溶性杂质,主要为:有机氧化物、脂质、脂肪酰类、芳香类化合物和

表 1 引物序列
 Table 1 Sequences of RT-qPCR primers

基因	引物
<i>p53</i>	F:5'-CTTTGAGGTGCGTGTGTTGTG-3' R:5'-GTTTCTTCTTTGGCTGGGA-3'
<i>noax</i>	F:5'-TGAAGGGAGATGACCTGTGATTAG-3' R:5'-ACTGAAAAGCAAAACACCAAAAAC-3'
<i>bax</i>	F:5'-TTTCTGACGGCAACTTCAACTG-3' R:5'-GCCACAAAGATAATCACGCTC-3'
<i>bcl-2</i>	F:5'-GGAGCGTCAACAGGGAGATG-3' R:5'-GATGCCGGTTCAGGTAATCAG-3'
<i>caspase-3</i>	F:5'-TCGGTCTGCTACAGATGTCG-3' R:5'-CTTCAACATGGCTCAGAAGC-3'
<i>caspase-9</i>	F:5'-GCCAGGCAGCTGATCATAGA-3' R:5'-TCAAGAGCACCGACATCACC-3'
<i>p21</i>	F:5'-GGCAGACCAGCATGACAGATT-3' R:5'-GCGGATTAGGCTTCCTCTT-3'
<i>β-actin</i>	F:5'-TGAAGGGAGATGACCTGTGATTAG-3' R:5'-ACTGAAAAGCAAAACACCAAAAAC-3'

植物激素,虽然还含有生物碱和多酚类活性物质,但质量分数相较于纯化前都有大幅度减少(见表2)。

表 2 灵芝醇提取物各成分质量分数
 Table 2 *Ganoderma lucidum* alcohol extract ingredient mass fraction

成分	质量分数/%	
	样品纯化前	样品纯化后
皂苷类	9.28±0.03	38.91±0.01
多酚类	4.23±0.02	0.89±0.00
生物碱	3.21±0.01	0.53±0.00
芳香类化合物	17.98±0.02	8.63±0.03
羧酸及其衍生物	13.33±0.05	11.56±0.02
有机酸及其衍生物	20.18±0.04	13.68±0.05
脂肪酰类	22.34±0.02	15.43±0.04
其他杂质	9.47±0.03	10.35±0.06

为排除其他活性物质可能带来的干扰,设置纯化前和纯化后两组实验进行比较,相同质量浓度灵芝提取物作用于细胞时,由于纯化后皂苷类物质质量分数提高且其他活性物质质量分数减少,当纯化后的干预物对于 HCT116 细胞的抑制效果优于纯化前时,则表明皂苷类物质的作用效果优于其他活性物质,且为主要作用物质。

2.2 灵芝总皂苷提取物质量浓度对 HCT116 细胞增殖的影响

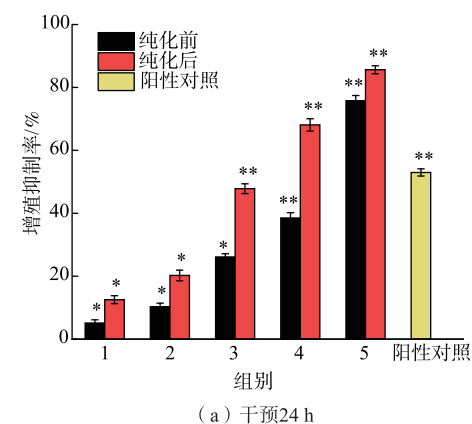
如图 1 所示,随着灵芝总皂苷提取物质量浓度

不断增加,HCT116 细胞增殖抑制率也不断增加,且在相同质量浓度下,作用时间与抑制率呈正相关。两组干预物进行比较,纯化后的灵芝总皂苷提取物较纯化前的抑制效果更明显。作用 48 h 后,纯化前灵芝总皂苷提取物对 HCT116 细胞的半数抑制质量浓度为 150 mg/L,而纯化后仅需 70 mg/L($P<0.05$)。作用 72 h 后,纯化后灵芝总皂苷质量浓度为 50 mg/L 时,可极显著抑制 HCT116 细胞的增殖。

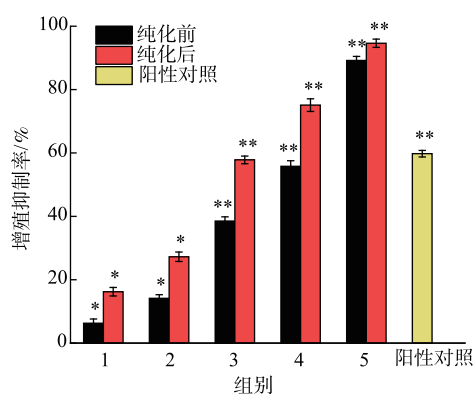
在实验所测范围内,灵芝总皂苷提取物对人正常结肠上皮细胞 NCM460 无细胞毒性作用(见图 2),因此对于正常细胞无毒性的灵芝总皂苷提取物可进行接下来的促凋亡实验。

2.3 灵芝总皂苷提取物质量浓度对 HCT116 细胞形态的影响

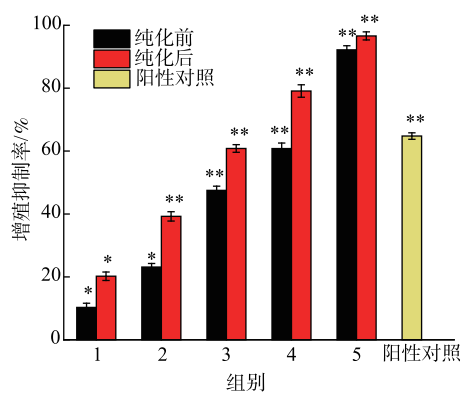
显微镜观察结果显示(见图 3),不同质量浓度灵芝总皂苷提取物作用于 HCT116 细胞 48 h 后,细胞出现典型的凋亡特征,其中纯化前灵芝总皂苷质量浓度为 70 mg/L 时,细胞出现皱缩现象;质量浓度达到 150 mg/L 时,细胞进一步变小,细胞皱缩现象更加明显。纯化后灵芝总皂苷质量浓度为 70 mg/L 时,细胞增殖受到影响,细胞皱缩变小程度较纯化前更加明显;当质量浓度达到 150 mg/L 时,出现了细胞核固缩现象,见图 3。



(a) 干预24 h



(b) 干预48 h

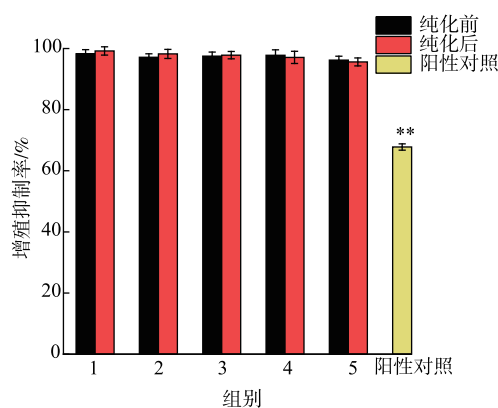


(c) 干预72 h

图中1、2、3、4、5 分别表示灵芝总皂苷提取物质量浓度为25、50、100、200、400 mg/L; 与阳性对照组比较,*表示 $P<0.05$,**表示 $P<0.01$ 。

图1 灵芝总皂苷提取物质量浓度对 HCT116 细胞增殖抑制率的影响

Fig. 1 Effects of different mass concentrations of *Ganoderma lucidum* saponins extracts on the proliferation inhibition rate of HCT116 cells



图中1、2、3、4、5 分别表示灵芝总皂苷提取物质量浓度为25、50、100、200、400 mg/L; 与阳性对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图2 灵芝总皂苷提取物质量浓度对 NCM460 细胞增殖抑制率的影响

Fig. 2 Effects of different mass concentrations of *Ganoderma lucidum* saponins extracts on the proliferation of inhibition rate NCM460 cells

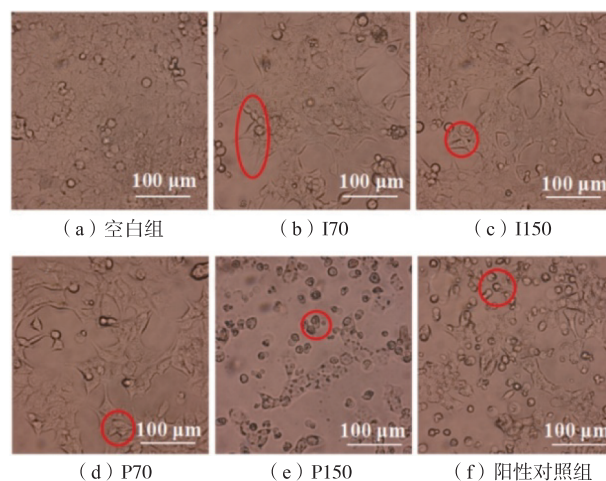


图3 灵芝总皂苷提取物质量浓度对 HCT116 细胞形态的影响

Fig. 3 Effects of different mass concentrations of *Ganoderma lucidum* saponins extracts on the morphology of HCT116 cells

2.4 灵芝总皂苷提取物质量浓度对 HCT116 细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测结果显示(见图4、图5),不同质量浓度灵芝总皂苷提取物作用于 HCT116 细胞48 h 后,随着质量浓度的增加,细胞凋亡率也在不断增加,且相同质量浓度下,纯化后灵芝总皂苷提取物的促凋亡效果更明显。纯化前灵芝总皂苷质量浓度为70 mg/L 时,其凋亡率为18.4%,而纯化后为

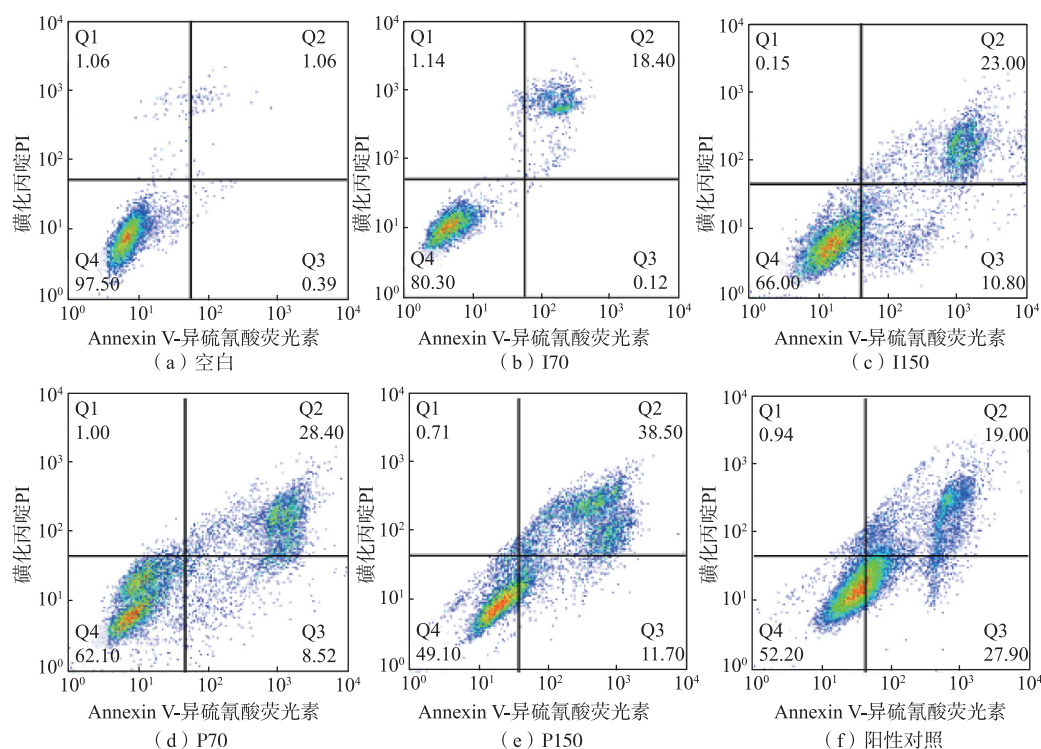
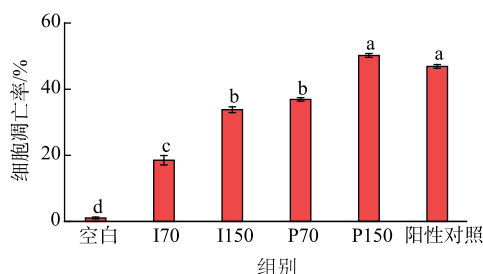


图4 细胞凋亡散点图

Fig. 4 Apoptosis scatter plot

38.4%;纯化前灵芝总皂苷质量浓度为 150 mg/L 时,细胞凋亡率为 33.8%,纯化后的凋亡率可达到 50.2%。



不同字母表示不同样本同一指标差异显著 ($P < 0.05$)。

图5 灵芝总皂苷提取物质量浓度对 HCT116 细胞凋亡的影响

Fig. 5 Effects of different mass concentrations of *Ganoderma lucidum* saponins extracts on HCT116 cell apoptosis

2.5 灵芝总皂苷提取物质量浓度对 HCT116 细胞内线粒体膜电位的影响

内源性凋亡途径中,线粒体发挥着重要作用,而线粒体膜电位是评价线粒体状态的重要指标之一。从图 6 可以看出,不同质量浓度灵芝总皂苷提

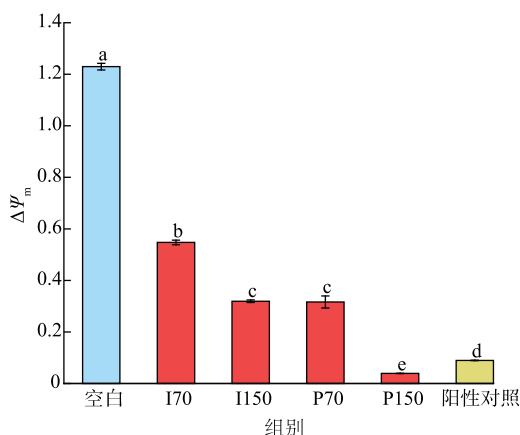
取物作用于 HCT116 细胞 48 h 后,细胞内线粒体膜电位均显著降低,且相同质量浓度下,纯化后灵芝总皂苷提取物作用的细胞线粒体膜电位更低,进一步证明灵芝总皂苷提取物对于 HCT116 细胞的促凋亡作用可通过内源性凋亡途径发挥作用。

2.6 灵芝总皂苷提取物质量浓度对 HCT116 细胞内活性氧的影响

ROS 在线粒体凋亡途径中发挥着重要作用,过量的 ROS 会影响细胞内氧化还原反应平衡,诱导细胞凋亡。图 7 显示,不同质量浓度灵芝总皂苷提取物作用于 HCT116 细胞 48 h 后,随着质量浓度的增加,细胞内 ROS 明显增加,相同质量浓度灵芝总皂苷提取物干预后,纯化后灵芝总皂苷提取物作用的细胞内 ROS 含量均高于纯化前,其中经过 150 mg/L 纯化后灵芝总皂苷提取物处理的细胞,其细胞内 ROS 含量达到最高。

2.7 灵芝总皂苷提取物调节 HCT116 细胞中基因的表达

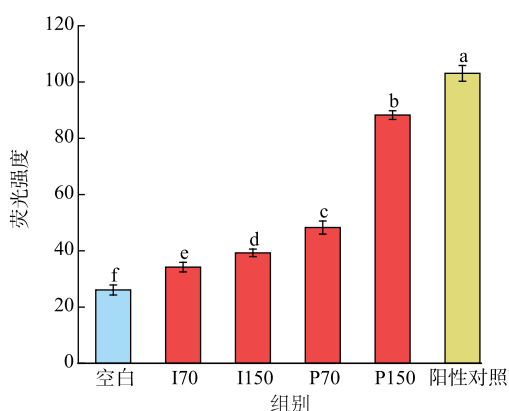
RT-qPCR 结果显示(见图 8),与空白组相比,灵芝总皂苷提取物明显增加了促凋亡相关基因 *bax* 和 *noxa* 的表达,降低了抗凋亡相关基因 *bcl-2* 的表



不同字母表示不同样本同一指标差异显著 ($P < 0.05$)。

图 6 灵芝总皂苷提取物质量浓度对 HCT116 细胞内线粒体的影响

Fig. 6 Effects of different mass concentrations of *Ganoderma lucidum* saponins extracts on mitochondria in HCT116 cells



不同字母表示不同样本同一指标差异显著 ($P < 0.05$)。

图 7 灵芝总皂苷提取物质量浓度对 HCT116 细胞内活性氧的影响

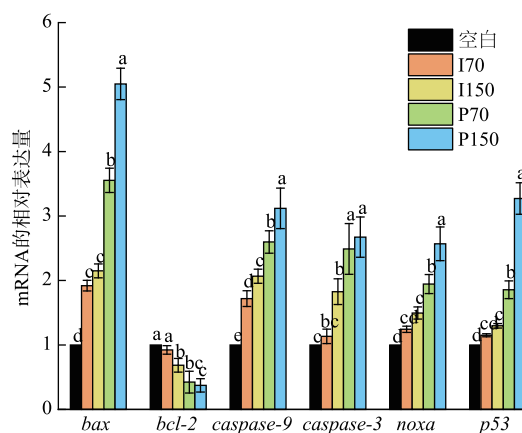
Fig. 7 Effects of different mass concentrations of *Ganoderma lucidum* saponins extracts on reactive oxygen species (ROS) in HCT116 cells

达,且随着药物的加入,凋亡激活基因 *caspase-3* 和 *caspase-9* 的相对表达量变高,细胞凋亡相关基因 *p53* 也显著增多。纯化后的干预物对于这 6 种基因的调节作用较纯化前更加明显,进一步证明了灵芝总皂苷提取物对于结肠癌细胞的促凋亡效果。

参考文献:

[1] 李玲,孙元章,李刚. 灵芝生物活性成分及其药理作用研究进展[J]. 南方农业,2019,13(4):50-55.

LI L, SUN Y Z, LI G. Advances in bioactive constituents and pharmacological effects of *Ganoderma lucidum* [J]. South China



不同字母表示不同样本同一指标差异显著 ($P < 0.05$)。

图 8 灵芝总皂苷提取物质量浓度对相关基因的影响

Fig. 8 Effects of different mass concentrations of *Ganoderma lucidum* saponins extracts on related genes

3 结语

皂苷类物质作为一种自然界中重要的活性物质,存在于众多中草药植物中。作者通过设置纯化前和纯化后两组实验干预物,比较分析以证明灵芝醇提总皂苷对于结肠癌细胞 HCT116 的抑制作用。结果表明,纯化后灵芝总皂苷对于 HCT116 细胞增殖的抑制效果更加明显,且促凋亡效果也更加显著。说明灵芝醇提产物中总皂苷类物质的抑制效果优于其他物质。在此基础上,进一步探究灵芝总皂苷类物质对结肠癌 HCT116 细胞的抑制机制。结果显示,灵芝总皂苷提取物可有效促进结肠癌细胞凋亡,其可能的途径为增加细胞内 ROS 的含量,降低细胞内线粒体膜电位,使线粒体发生去极化变化,导致其通透性发生改变,进而导致细胞色素 c 从线粒体中释放出来,活化 *caspase-9*,激活 *caspase-3*,最终导致癌细胞的死亡。细胞凋亡是一个复杂的过程,涉及一系列基因的激活、蛋白质的表达和多种物质的调控,各个途径并不是独立存在的,而是相互作用的,故具体的作用机制还需要进一步深入研究。作者初步证实灵芝总皂苷促 HCT116 细胞凋亡的效果可通过内源性线粒体途径实现,该结果为后续灵芝总皂苷资源的研究提供了一定的科学依据。

- Agriculture**, 2019, 13(4):50-55. (in Chinese)
- [2] 谢怡琼,王琪瑞,孙思雅,等. 灵芝的药理作用和临床应用研究进展[J]. 临床医学研究与实践, 2020, 5(10):191-193.
XIE Y Q, WANG Q R, SUN S Y, et al. Research progress on the pharmacological effects and clinical applications of *Ganoderma lucidum*[J]. **Clinical Research and Practice**, 2020, 5(10):191-193. (in Chinese)
- [3] YUE Q X, GUAN S H, XIE F B, et al. Interaction of *Ganoderma* triterpenes with docetaxel and cisplatin in cytotoxicity against human carcinoma cells[J]. **Chinese Journal of Natural Medicines**, 2008, 6(5):367-371.
- [4] PATERSON R R M. *Ganoderma* - a therapeutic fungal biofactory[J]. **Phytochemistry**, 2006, 67(18):1985-2001.
- [5] YEN G C, WU J Y. Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from *Ganoderma tsugae* [J]. **Food Chemistry**, 1999, 65(3):375-379.
- [6] KUOK Q Y, YE H C Y, SU B C, et al. The triterpenoids of *Ganoderma tsugae* prevent stress-induced myocardial injury in mice[J]. **Molecular Nutrition and Food Research**, 2013, 57(10):1892-1896.
- [7] 郝萌萌,王金艳,冯娜,等. 灵芝子实体中不同极性的三萜体外抗肿瘤及抗炎活性比较[J]. 菌物学报, 2019, 38(6):917-925.
HAO M M, WANG J Y, FENG N, et al. *In vitro* antitumor and anti-inflammatory activities of triterpenoids with different polarity in the fruiting bodies of *Ganoderma lingzhi*[J]. **Mycosystema**, 2019, 38(6):917-925. (in Chinese)
- [8] TAN Y J, LEE Y T, YEONG K Y, et al. Anticancer activities of a benzimidazole compound through sirtuin inhibition in colorectal cancer[J]. **Future Medicinal Chemistry**, 2018, 10(17):2039-2057.
- [9] 朱磊,赵阳,韩仕峰,等. 术前血清 CEA 和 CA19-9 水平检测对结肠癌术后早期复发转移的预测价值[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(8):1170-1174.
ZHU L, ZHAO Y, HAN S F, et al. Predictive significance of preoperative serum CEA and CA19-9 determination in early recurrence/metastasis of colon cancer after operation[J]. **Chinese Journal of General Surgery**, 2015, 24(8):1170-1174. (in Chinese)
- [10] 钟秀宏,王月华,蒋林哲,等. 结肠癌早期诊断及预防措施[J]. 中国慢性病预防与控制, 2019, 27(5):387-390.
ZHONG X H, WANG Y H, JIANG L Z, et al. Early diagnosis and preventive measures of colon cancer[J]. **Chinese Journal of Prevention and Control of Chronic Diseases**, 2019, 27(5):387-390. (in Chinese)
- [11] 赵珍东,夏黎,杨炳伟,等. 丫蕊花甾体皂苷 YB16 诱导人结肠癌细胞凋亡作用[J]. 中国公共卫生, 2019, 35(8):1032-1035.
ZHAO Z D, XIA L, YANG B W, et al. Apoptosis of human colon cancer cells induced by steroidal saponin YB16 of *Ypsilandra thibetica*[J]. **Chinese Journal of Public Health**, 2019, 35(8):1032-1035. (in Chinese)
- [12] 王理槐,徐倩,孙银辉. 重楼皂苷 VII 对人结肠癌细胞株的抑制增殖及诱导凋亡作用研究[J]. 中国医药, 2020, 15(1):92-95.
WANG L H, XU Q, SUN Y H. Polyphyllin VII inhibits proliferation of colon cancer cells and induces apoptosis[J]. **China Medicine**, 2020, 15(1):92-95. (in Chinese)
- [13] 张少净,刘安军,王鹏飞,等. 硒酸壳聚糖通过线粒体途径诱导 A549 细胞凋亡的初步研究[J]. 现代食品科技, 2017, 33(4):46-51.
ZHANG S J, LIU A J, WANG P F, et al. Preliminary study of seleno-chitosan-induced apoptosis in A549 cells through a mitochondrial signaling pathway[J]. **Modern Food Science and Technology**, 2017, 33(4):46-51. (in Chinese)
- [14] 吕万林,周红秋,朱益灵,等. 醇沉金蝉花粗多糖对宫颈癌细胞的增殖抑制作用及可能机制[J]. 江苏大学学报(医学版), 2021, 31(2):152-157.
LYU W L, ZHOU H Q, ZHU Y L, et al. Inhibitory effect and mechanism of crude polysaccharide from *Cordyceps cicadae* on proliferation of cervical cancer cells[J]. **Journal of Jiangsu University(Medicine Edition)**, 2021, 31(2):152-157. (in Chinese)
- [15] ZHANG C, JIA X J, BAO J L, et al. Polyphyllin VII induces apoptosis in HepG2 cells through ROS-mediated mitochondrial dysfunction and MAPK pathways[J]. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 2016, 16(1):1-12.
- [16] DHARMARAJA A T. Role of reactive oxygen species (ROS) in therapeutics and drug resistance in cancer and bacteria[J]. **Journal of Medicinal Chemistry**, 2017, 60(8):3221-3240.
- [17] 韦兴英,郭晓农,韦良贞,等. 藜麦总皂苷的提取及其抗氧化活性研究[J]. 中兽医医药杂志, 2020, 39(3):16-20.
WEI X Y, GUO X N, WEI L Z, et al. Extraction and antioxidant activity of total saponins from *Chenopodium quinoa*[J]. **Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine**, 2020, 39(3):16-20. (in Chinese)
- [18] 王妮,张娜,黄鑫,等. 高效液相色谱与质谱联用技术在西洋参皂苷成分分析中的应用[J]. 人参研究, 2018, 30(5):29-32.
WANG N, ZHANG N, HUANG X, et al. Application of HPLC and HPLC-MS in ginsenosides analysis of *Panax quinquefolium* L [J]. **Ginseng Research**, 2018, 30(5):29-32. (in Chinese)