

文章编号: 1001-6880(2013)12-1685-05

海滨锦葵籽粒蛋白的分离、纯化及其生物活性测定

张焕仕, 李思宇, 谢 银, 张鹤云*, 张太平, 钦 佩*

南京大学盐生植物实验室, 南京 210093

摘 要: 以海滨锦葵籽粒脱脂粉为原料, 采用超声波法、DEAE-纤维素柱层析、浓度梯度洗脱模式(洗脱液盐浓度分别为 0.1、0.25、0.4 mol/L)分离纯化得到三个蛋白组分; 再对 0.1 mol/L 盐洗脱蛋白进行超滤分离。采用 SDS-PAGE 测定纯化蛋白分子量的分布, 并利用 MTT 法测定蛋白的体外免疫和抗肿瘤活性。结果表明, 总水溶性蛋白得率为 1.12%; 0.25 mol/L 盐洗脱冻干粉的蛋白质量分数最高为 58.8%; 含量较高的蛋白质分子量分别为 23、32 和 60KD; 0.1 mol/L 盐洗脱蛋白表现出较好的促进脾淋巴细胞增殖和抑制 HepS 细胞增殖的作用。随着时间延长, 小于 30KD 的超滤蛋白组分对 HepS 细胞生长表现出显著或极显著抑制效果。

关键词: 海滨锦葵; 水溶性蛋白; 分离; 纯化; 生物活性

中图分类号: R284; R73-36

文献标识码: A

Separation, Purification and Bioactivities Determination of *Kosteletzkya virginica* Seed Protein

ZHANG Huan-shi, LI Si-yu, XIE Yin, ZHANG He-yun*, ZHANG Tai-ping, QIN Pei*

Halophyte Research Lab, Nanjing University, Nanjing 210093, China

Abstract: Degrease powder of *Kosteletzkya virginica* seeds were used as raw materials in this research. Three components of protein were purified by ultrasound, DEAE-cellulose column chromatography with gradient concentration desorption-mode (the concentrations of desorption salt were 0.1, 0.25 and 0.4 mol/L, respectively). 0.1 mol/L salt desorption components were further separated using ultrafiltration. Molecular weight distribution of three protein components were determined by SDS-PAGE. *In vitro* immunization and antitumor activities of proteins were tested by MTT assay. The results showed that the total soluble protein extraction rate was 1.12%; the highest protein mass percent was 58.8% from 0.25 mol/L salt desorption concentration; with higher levels of protein molecular weight 23, 32 and 60KD. 0.1 mol/L salt desorption protein (SDP) showed significant effects on promoting proliferation of splenic lymphocyte and inhibiting proliferation of mouse hepatoma cell (HepS). Components of smaller than 30KD showed significant and very significant inhibitory effects on proliferation of HepS cells with the increasing of time.

Key words: *Kosteletzkya virginica*; water-soluble protein; separation; purification; bioactivities

具有生物活性的多肽蛋白质是一类在生物体中具有特殊生理功能的化合物。它们不仅在调节机体功能上发挥重要的作用, 而且在抗艾滋病、癌症、心脑血管等疾病上也具有较高活性^[1-3]。多肽类药物的研究一直是药物研究中的一个活跃领域, 如何从天然动物、植物、微生物中发现活性多肽蛋白质类物质, 使之成为新药研究中的先导化合物一直是肽类研究的一个重要方向。海滨锦葵(*Kosteletzkya virginica* L. Presl) 原产美国东部沿海的特拉华州至得

克萨斯州的含盐沼泽地带, 是适宜海滨地区生长的多年生草本植物, 1992 ~ 1993 年由南京大学盐生植物实验室钦佩教授首次引入我国。研究发现海滨锦葵籽粒含蛋白质高达 27.4% ~ 29.6%, 可以作为油料、食品、饲料、保健品和其他工业用途的原料^[4]。近年来仅有少量研究表明海滨锦葵种子具有增强免疫, 降低血糖等功效, 基于探究其主要活性成分的研究较少。为探明其中的活性成分, 本实验以海滨锦葵籽粒中水溶性蛋白为研究对象, 采用现代分离技术和细胞学实验方法从中提取、分离并测试所得蛋白组分的体外免疫和抗肿瘤活性, 为进一步开发海滨锦葵籽粒活性蛋白的应用价值做出探索。

收稿日期: 2012-11-16

接受日期: 2013-04-02

基金项目: 江苏省产学研联合创新资金项目(BY2012136)

* 通讯作者 Tel: 86-25-83592684, E-mail: qinpei@nju.edu.cn; cflab@126.com

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

海滨锦葵籽粒于 2009 年 10 月采自江苏大丰金海农场种植基地; 昆明种小白鼠, 雌雄各半, 体重 17~22 g, 由南京医科大学动物饲养中心提供, 清洁级; 肝癌 HepS 细胞株由中科院上海药物研究所提供, 本实验室培养传代。

10GPH 超声波细胞破碎仪, 美国 FISHER 公司; DG5033A 酶联免疫检测仪, 南京华东电子集团医疗装备有限公司; TG162W 型微量高速离心机, 长沙湘仪离心机仪器公司; CO₂ 培养箱, Thermo Forma 公司; UV2201 紫外分光光度计, 日本岛津公司; 电泳仪和电泳槽, BioRad 公司。低分子量标准蛋白(No. 17-0446-01), Amersham 公司产品; 牛血清白蛋白(BSA, V 组分), Sigma 公司产品; 考马斯亮蓝(R-250), AMRESCO 公司产品; 其它为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 海滨锦葵籽粒蛋白的初步提取、分离与纯化

取锦葵籽洗净、干燥、研成粉末样品, 取 50 g 于石油醚(100 mL×3) 80℃回流萃取, 去脂籽粒粉室温阴干, 4℃保存备用。取去脂籽粒粉以 1:20(w: v) 的比例加蒸馏水, 然后采用超声仪超声破碎细胞辅助蛋白提取, 超声条件: 温度 40℃, 功率 200 W, 时间 1h, 超声后用纱布过滤, 重复以上步骤, 收集滤液。

取处理好的 DEAE 纤维素装填 25 cm×4 cm 柱子, 以水覆盖, 装柱完毕后用 0.01 mol/L PBS(pH 6.5) 以稳定流速通过柱体直至达到平衡。将上述收集滤液以稳定流速缓慢的流入柱中, 使其吸附于柱上。上样完毕后采用 0.01 mol/L PBS(pH 6.5) 洗涤柱子, 用量为 2~3 个床体积。依次用浓度为 0.1、0.25、0.4 mol/L NaCl 的 PBS 洗脱液洗脱。收集洗脱流出的溶液, 采用 280 nm 紫外检测。将收集到的含盐蛋白组分溶液装透析袋对蒸馏水进行透析, 透析去盐后, 冷冻干燥得三个组分的粉末状蛋白样品, 称量并在 4℃下保存备用。

取上述 0.1 mol/L 盐洗脱组分, 经透析处理后, 再经截止分子量 3 万的超滤膜超滤, 而得到大于 3 万的蛋白组分和小于 3 万的蛋白组分, 在 4℃下保存备用。

1.2.2 海滨锦葵籽粒蛋白含量的测定

分别取 0.1、0.25、0.4 mol/L 盐洗脱冻干粉

4.8、5.4、5.5 mg, 加蒸馏水至 25 mL 得到待测蛋白溶液。以牛血清白蛋白为标准参比蛋白, 采用 Folin 酚法在 650 nm 处测定蛋白质浓度^[9], 最后通过稀释倍数计算得各冻干粉中蛋白质量分数。

1.2.3 SDS-PAGE 测定海滨锦葵籽粒蛋白相对分子量

选用标准 0.1 cm×10 cm×10 cm 凝胶板, 10% 丙烯酰胺分离胶, 5% 丙烯酰胺浓缩胶, 按 Laemmli 的方法在 pH 8.3 的电泳缓冲液中进行 20 mA 恒流电泳^[9]。电泳后的分离胶用考马斯亮蓝 R-250 染色, 10% (V/V) 甲醇: 10% (V/V) 冰醋酸脱色。以标准蛋白质相对分子质量的对数(lgMr) 为纵坐标, 相对迁移距离为横坐标作标准曲线。标准蛋白质分子量分别为: 118、90、50、34、26、19 KD。

1.2.4 MTT 法测定蛋白生物活性

取各组分冻干粉, 加蒸馏水配制成适当浓度的溶液, 过滤除菌后测浓度并在无菌条件下用 1640 培养液分别稀释至 20、50、100、200 μg/mL 4 个浓度用于免疫活性和抗肿瘤活性测试。两组超滤蛋白则分别稀释为 1、5、10、25 μg/mL 4 个浓度用于抗肿瘤活性测试。

1.2.4.1 免疫活性测试

于无菌条件下, 取 17~22 g 体重小鼠的脾和胸腺, 置于滤网上加适量培养液研磨, 用 Hanks 洗涤, 制成单个细胞悬液, 1800 rpm 离心 5 min, 去上清, 将细胞悬浮在 5 mL 的 RPMI-1640 培养液(内含 10% 小牛血清) 中, 用血球计数板进行细胞计数, 调整胸腺细胞和脾细胞浓度分别为 1×10^7 个/mL 和 2×10^7 个/mL, 各自加入一块 96 孔板中(100 μL/孔, A8 孔加入 100 μL 不含细胞的 1640 培养基)。随后加入用 1640 培养基稀释的不同浓度蛋白样品(80 μL/孔, 每列对应一个组分排, 每孔加入 20 μL co-nA)。将板置于恒温培养箱(37℃, 5% CO₂) 内, 培养 24 h 后每孔加 2.5 mg/mL 的 MTT 10 μL, 继续培养 4 h, 再加入 20% SDS 溶液 40 μL/孔, 培养过夜。次日在酶标仪上测定吸光度值, A8 孔用于调零。

1.2.4.2 抗肿瘤活性测试

于无菌条件下, 取已感染肿瘤小鼠的腹腔液, 加 Hanks 洗涤, 制成单个细胞悬液, 1800 rpm 离心 5 min, 去上清, 将细胞悬浮 5 mL 的 RPMI-1640 培养基(内含 10% 小牛血清) 中, 用血球计数板进行细胞计数, 调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL, 加入 3 块 96 孔板中(80 μL/孔, A8 孔加入 80 μL 不含细胞的

1640 培养基)。随后加入用 1640 培养基稀释的不同浓度活性蛋白样品(80 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 每列对应一个组分的一个浓度), A8 孔和 D、E 两排加 1640 培养基 80 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 作为对照。将板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱内, 三块板分别培养 24、48、72 h。到时间后每孔加入 2.5 mg/mL 的 MTT10 μL , 继续培养 4 h, 再加入 20% SDS 溶液 40 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 培养过夜。分别次日在酶标仪上测定吸光度值, A8 孔用于调零。

1.3 数据分析

用 Excel2010 进行数据统计整理, 用 SPSS18.0 进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 锦葵籽蛋白含量检测

本实验通过细胞破碎和超声辅助提取得到粗活性蛋白, 然后利用离子交换层析进一步分离纯化活性蛋白, 并依次用浓度为 0.1、0.25、0.4 mol/L 的 NaCl 洗脱液洗脱, 最后冷冻干燥得到三个组分的冻干粉, 其质量分别为 0.272、0.742、0.26 g。经检验, 0.25 mol/L 盐洗脱冻干粉的蛋白质量分数最高为 58.8%, 次之是 0.1 mol/L 盐洗脱冻干粉为 31.9%,

含量最小的是 0.4 mol/L 盐洗脱冻干粉为 14.9%。经计算可知, 本次实验得蛋白总量为 0.562 g, 分离纯化蛋白得率为 1.12%。

2.2 SDS-PAGE 分子量鉴定

SDS-PAGE 结果表明, 0.1 mol/L 盐洗脱组分中分子量为 23 KD 和 32 KD 的蛋白含量较高, 0.25 mol/L 和 0.4 mol/L 盐洗脱组分中分子量为 23 KD 和 60 KD 的蛋白含量较高(图 1)。

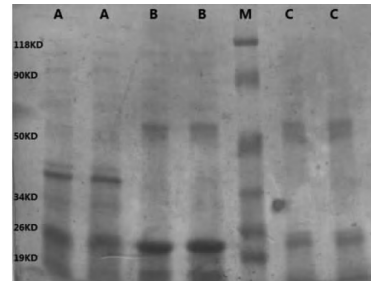


图 1 海滨锦葵籽粒蛋白电泳图谱

Fig. 1 Electrophoretogram of *Kosteletzkya virginica* seed protein
A: 0.1 mol/L 盐洗脱蛋白; B: 0.25 mol/L 盐洗脱蛋白; C: 0.4 mol/L 盐洗脱蛋白; M: 标准蛋白
A: 0.1 mol/L salt desorption protein (SDP); B: 0.25 mol/L SDP; C: 0.4 mol/L SDP; M: Standard protein.

表 1 海滨锦葵籽粒蛋白对小鼠脾淋巴细胞和胸腺淋巴细胞增殖的影响 ($n \geq 10$)

Table 1 Effects of *Kosteletzkya virginica* seed protein on mouse spleen lymphocytes and thymus lymphocyte proliferation

浓度 Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.1 mol/L 盐洗脱 0.1 mol/L SDP		0.25 mol/L 盐洗脱 0.25 mol/L SDP		0.4 mol/L 盐洗脱 0.4 mol/L SDP	
	B-Cell	T-Cell	B-Cell	T-Cell	B-Cell	T-Cell
10	0.44 $\pm$ 0.01 **	0.12 $\pm$ 0.02	0.38 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.03	0.41 $\pm$ 0.01	0.20 $\pm$ 0.02
25	0.45 $\pm$ 0.02 **	0.11 $\pm$ 0.02	0.41 $\pm$ 0.02	0.19 $\pm$ 0.02	0.43 $\pm$ 0.03	0.19 $\pm$ 0.03
50	0.45 $\pm$ 0.02 **	0.11 $\pm$ 0.02	0.40 $\pm$ 0.01	0.17 $\pm$ 0.03	0.41 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.01
100	0.44 $\pm$ 0.01 **	0.06 $\pm$ 0.01	0.38 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.02	0.45 $\pm$ 0.03	0.08 $\pm$ 0.02
CK	0.39 $\pm$ 0.04	0.21 $\pm$ 0.03	0.39 $\pm$ 0.04	0.21 $\pm$ 0.03	0.39 $\pm$ 0.04	0.21 $\pm$ 0.03

注: B-Cell: 脾淋巴细胞, T-Cell: 胸腺淋巴细胞, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$ 。

Note: B-Cell: spleen lymphocytes, T-Cell: thymus lymphocyte, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$.

2.3 锦葵籽蛋白生物活性测试结果

2.3.1 免疫活性测试

MTT 法测得蛋白对小鼠脾淋巴细胞和胸腺淋巴细胞增殖的影响见表 1。结果表明, 三个组分对

胸腺淋巴细胞增殖并未显示促进作用。而 0.1 mol/L 盐洗脱组分对脾淋巴细胞有显著的促进作用, 但无明显的量效关系。0.25 mol/L 盐洗脱组分和 0.4 mol/L 盐洗脱组分对脾细胞促进作用不显著。

表 2 海滨锦葵籽粒蛋白对 HepS 细胞生长的抑制作用 ($n \geq 10$)

Table 2 Effects of *Kosteletzkya virginica* seed protein on HepS cell proliferation ($n \geq 10$)

浓度 Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.1 mol/L 盐洗脱蛋白 0.1 mol/L SDP			0.25 mol/L 盐洗脱蛋白 0.25 mol/L SDP			0.4 mol/L 盐洗脱蛋白 0.4 mol/L SDP		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
10	0.90 $\pm$ 0.15	0.76 $\pm$ 0.12	0.40 $\pm$ 0.03	0.93 $\pm$ 0.06	0.82 $\pm$ 0.04	0.46 $\pm$ 0.04	0.92 $\pm$ 0.07	0.83 $\pm$ 0.09	0.48 $\pm$ 0.08

25	0.83±0.03***	0.60±0.05***	0.19±0.04**	1.00±0.04	0.83±0.11	0.53±0.06	0.85±0.07	0.72±0.12	0.45±0.05
50	0.78±0.05***	0.57±0.05***	0.00±0.00***	0.91±0.07	0.75±0.08	0.43±0.06	0.85±0.08**	0.70±0.06	0.32±0.06
100	0.71±0.06***	0.03±0.01***	0.00±0.00***	0.81±0.06**	0.66±0.08**	0.36±0.05	0.54±0.04***	0.50±0.03***	0.21±0.01**
CK	0.92±0.06	0.72±0.07	0.24±0.04	0.92±0.06	0.72±0.07	0.24±0.04	0.92±0.06	0.72±0.07	0.24±0.04

注:与空白对照组比较,**P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001。
Note: Compare with control,**P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001.

2.3.2 抗肿瘤活性测试

MTT 法测得蛋白对 HepS 细胞生长的抑制作用见表 2 和表 3。结果表明,三个盐洗脱蛋白组分中只有 0.1mol/L 盐洗脱组分对 HepS 细胞生长有显著抑制作用,且作用强度与浓度、时间关系成显著正相关关系。其中除 10 μg/mL 浓度外,其他浓度对 HepS 细胞生长的抑制作用都达到极显著水平,且 40 μg/mL 和 80 μg/mL 两个浓度在处理时间达到 72 h 时可以完全灭活 HepS 细胞。0.25 mol/L 盐洗

脱组分和 0.4 mol/L 盐洗脱组分在低浓度时对 HepS 细胞生长没有显著抑制作用,但当浓度增大到 100 μg/mL 时表现出显著抑制作用,且随处理时间延长而增强了抑制作用。与对照相比较,分子量大于 30KD 的超滤蛋白组分在各个浓度下对 HepS 细胞生长有抑制趋势,但各浓度的抑制作用随时间的延长没有显著性差异。小于 30KD 的超滤蛋白组分在处理 24 h 时对 HepS 细胞生长未表现抑制作用,但随着时间延长则表现显著或极显著抑制。

表 3 0.1 mol/L 盐洗脱蛋白超滤组分对 HepS 细胞生长的抑制作用(*n*≥10)

Table 3 Effects of ultra filtration component of 0.1 mol/L salt desorption proteinon HepS cell proliferation (*n*≥10)

浓度 Concentration (μg/mL)	>30KD 蛋白 >30KD protein			<30KD 蛋白 <30KD protein		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
1	0.93±0.08	0.94±0.22	0.71±0.08	1.04±0.11	0.78±0.12**	0.63±0.08*
5	1.00±0.05	0.91±0.11	0.69±0.12	1.01±0.19	0.82±0.05*	0.62±0.09*
10	0.91±0.05	0.86±0.07	0.72±0.11	1.08±0.12	0.77±0.13***	0.58±0.10***
25	0.96±0.09	0.85±0.05	0.69±0.12	0.86±0.12	0.77±0.08***	0.51±0.06***
CK	0.99±0.12	0.93±0.09	0.72±0.10	0.99±0.12	0.93±0.09	0.72±0.10

注:与空白对照组比较,**P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001。
Note: Compare with control,**P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001.

3 讨论和结论

本试验采用三个盐浓度洗脱蛋白,其中 0.25 mol/L 盐溶液洗脱冻干粉的蛋白质量分数最高。这验证了苏拔贤所报道的蛋白质提取盐浓度在 0.02 ~ 0.2 ml/L^[8]。赵梅和丁霄林运用单因素和正交实验确定了甘薯水溶性糖蛋白的最佳提取工艺条件^[9]。本试验仅就海滨锦葵籽粒蛋白提取分离进行了探索性研究,导致水溶性蛋白得率不高。在将来的研究中应加强对该物种籽粒蛋白的分离、纯化工艺研究和改善,探寻盐浓度、时间、料液比等最佳参数,从而提高得率和纯度。此外,在分离提纯中为保持蛋白的活性,应选择适当的石油醚浸出法去脂时的温度、pH 值以及在超声波法破裂细胞时对蛋白的化学保护。

免疫活性测试表明海滨锦葵籽粒中的活性蛋白含有能增强体液免疫的活性成分,而无明显增强细

胞免疫的成分。体外抗肿瘤活性实验表明,0.1 mol/L 盐洗脱组分对 HepS 细胞的生长有显著的抑制作用,而且作用强度与浓度、时间关系成显著正相关。0.25 mol/L 盐洗脱组分和 0.4 mol/L 盐洗脱组分对 HepS 细胞生长没有显著抑制作用,但当它们浓度增大到 100 μg/mL 时显现出抑制作用,推测原因应该是在这两个浓度洗脱时得到的蛋白组分可能含有少量表现抑制活性的蛋白,当浓度增大到一定程度时表现和 0.1 mol/L 盐洗脱组分相同活性。利用 0.1 mol/L 盐洗脱蛋白样品经超滤后所得大于 30 KD 和小于 30 KD 的蛋白组分进行抑制肿瘤细胞生长测试结果表明,其主要活性成分为小于 30 KD 的组分。综合电泳图谱特征推测约 23 KD 的活性蛋白体外抑制肿瘤细胞增殖作用最大。

综上所述,推测 0.1 mol/L 盐洗脱蛋白中分子量约 23 KD 的活性蛋白体外抑制肿瘤细胞增殖的作用最大,所以极具继续探索和研究的价值。后续

研究应包括以下几个方面: (1) 进一步改善该活性蛋白的分离、纯化工艺 (2) 应用现代技术和分子生物学同蛋白研究相结合, 深入鉴定活性蛋白三维结构并研究该结构与生理生化机制的关系。 (3) 不同蛋白联合应用以及与抗菌素联用等对动物生产性能、免疫学、内分泌学方面的影响机制。

参考文献

- 1 Yasuda-Kamatani Y, Kobayashi M, Yasuda A, et al. A novel D'Amino acid-contain peptide, fluidal, coexists with fulicin gene-related peptides in *Achatina Atria*. *Peptides*, 1997, 18: 347-354.
- 2 Tamamura H, Murakami T, Masuda M. et al. Structure-actively relationships of an anti-HIV peptide, T22. *Biochem Biophys Res Com*, 1994, 205: 1729-1735.
- 3 Xu JX(徐家喜), Jin S(金声). Studies on the separation, sequence determination and synthesis of the water-soluble peptides from *Papaver Somniferum* L. *Acta Chim Sinica* (化学学报), 1995, 53: 822-827.
- 4 Ruan CJ(阮成江), Qin P(钦佩), Chen JW(陈景文), et al. Analysis of nutritive compositions in the seeds of *Kosteletzkya virginica*. *Acta Agron Sinica* (作物学报), 2004, 30: 901-905.
- 5 Wang JZ(汪家政), Fan M(范明). Protein Technical Manual(蛋白质技术手册). Beijing: Science Press, 2001. 189-210.
- 6 Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227: 680-685.
- 7 Su BX(苏拔贤). Biochemistry Preparation Techniques(生物化学制备技术). Beijing: Science Press, 1998. 31.
- 8 Zhao M(赵梅), Ding XL(丁霄林). Study on extraction process of sweet potato glycoprotein. *Food Res Dev* (食品研究与开发), 2005, 26: 77-79.
- 6 Zeng WG, Liang WZ, Tu GS. Chemical study of alkaloids from *Corydalis bungeana*. *Planta Med*, 1987, 53: 418-420.
- 7 Xu W, Song QS, Wang P, et al. Chemical constituents of the leaves and twigs of *Ficushispida*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2010, 22: 1003-1005.
- 8 Zhang GL, Pan WE, Peng SL, et al. Studies on the medical isoquinoline alkaloids I. Alkaloids of *corydalis trachycarpa maxim*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 1989, 2: 1-5.
- 9 Li Y, Li XF, Kim SK, et al. Golmaenone, a new diketopiperazine alkaloid from the Marine-Derived fungus *Aspergillus* sp.. *Chem Pharm Bull*, 2004, 52: 375-376.
- 10 Anis E, Anis I, Ahmed S, et al. α -Glucosidase inhibitory constituents from *Cuscuta reflexa*. *Chem Pharm Bull*, 2002, 50: 112-114.
- 11 Liao LP, Li P. Compounds from leaf of *Ilex purpurea* Hassk. *J China Pharm Univ*, 2004, 35: 205-206.
- 12 Duan CL, Yong YJ, Jiang Y, et al. Liposoluble chemical constituents from the fibrous root of *Ophiopogon japonicas*. *J Chin Pharm Sci*, 2009, 18: 236-239.
- 13 Wang DY, Liu EG, Feng YJ. Study on the Flavonoid Constituents from the Bark of *Myrica rubra*. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2008, 19: 1149-1150.
- 14 Sang SM, Lao AN, Wang YS, et al. Antifungal constituents from the seeds of *Allium fistulosum* L.. *J Agric Food Chem*, 2002, 50: 6318-6321.

(上接第 1668 页)