



田莹, 檀军, 赵帅, 郭建军. 九香虫水煎液主要成分分析及对乳腺癌细胞增殖的抑制作用 [J]. 环境昆虫学报, 2020, 42 (2): 299-305.

九香虫水煎液主要成分分析及对乳腺癌细胞增殖的抑制作用

田莹¹, 檀军^{1,2}, 赵帅¹, 郭建军^{1*}

(1. 贵州大学昆虫研究所, 贵州山地农业病虫害重点实验室, 贵阳 550025; 2. 遵义医科大学, 组织学与胚胎学教研室, 贵州遵义 563000)

摘要: 为检测九香虫水煎液对乳腺癌细胞体外增殖的影响及分析其主要成分, 通过制备九香虫水煎液, 利用 MTT 法、形态学观察及细胞划痕实验检测九香虫水煎液对人乳腺癌细胞 MDA-MB-453 及小鼠乳腺癌细胞 4T1 增殖和迁移的影响, 采用 GC-MS 技术分析九香虫水煎液的主要化学成分。结果表明, 九香虫水煎液对人乳腺癌 MDA-MB-453 及小鼠乳腺癌 4T1 细胞的体外增殖具有显著的抑制作用, 且呈剂量相关性, IC₅₀ 分别为 0.034、0.101 g/mL, 其对 4T1 细胞的迁移具有抑制作用。九香虫水煎液对乳腺癌细胞的增殖及迁移抑制作用可能与其中含有具抗肿瘤功效的反丁烯二酸、3,4-二羟基苯甲酸、腺苷、尿苷、棕榈酸等物质相关。

关键词: 九香虫; 水煎液; 成分; 乳腺癌

中图分类号: Q965.8; Q969.97

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2020) 02-0299-07

Main components and anti-proliferative activities of *Aspongopus chinensis* decoction on breast cancer cells

TIAN Ying¹, TAN Jun^{1,2}, ZHAO Shuai¹, GUO Jian-Jun^{1*} (1. Institute of Entomology, Guizhou University, Guizhou Provincial Key Laboratory for Agricultural Pest Management of the Mountainous Region, Guiyang 550025, China; 2. Department of Histology and Embryology, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China)

Abstract: To detect the effects of *Aspongopus chinensis* Dallas decoction on the proliferation of breast cancer cells and analyze the decoction's main components. MTT assay and morphological observation were used to detect the effects of decoction on the proliferation of MDA-MB-453 of human breast cancer cells and 4T1 of mouse breast cancer cells. The main chemical components of the decoction were analyzed by GC-MS. The results showed that the decoction caused a dose-dependent inhibition on the proliferation of MDA-MB-453 and 4T1 cells, and the IC₅₀ values were 0.034 and 0.101 g/mL, respectively. Moreover, the decoction could inhibit the migration of 4T1 cells. The inhibitory effect of the decoction on the proliferation and migration of breast cancer cells may be related to the presence of fumaric acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, adenosine, uridine and palmitic acid, etc.

Key words: *Aspongopus chinensis* Dallas; decoction; components; breast cancer

癌症已经成为严重威胁人类生命健康的头号杀手, 且发病率和死亡率急剧上升 (毛艳艳等, 2016)。《2018 年全球癌症报告》显示, 乳腺癌是女性中最常见的恶性肿瘤, 新增发病人数约 210 万

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81803968, 81360612)

作者简介: 田莹, 女, 1994 年生, 硕士研究生, 主要研究方向为药用昆虫资源开发及利用, E-mail: gs.tianyl8@gzu.edu.cn

* 通讯作者 Author for correspondence: 郭建军, 博士, 教授, 主要研究方向为资源昆虫学、节肢动物系统进化, E-mail: jjguo@gzu.edu.cn

收稿日期 Received: 2019-02-05; 接受日期 Accepted: 2019-05-27

人,发病率和死亡率分别占女性癌症患者的 24.2% 和 15%,高居首位 (Bray *et al.*, 2018)。乳腺癌的防控与治疗形势严峻。

昆虫类中药在治疗肿瘤中发挥重要的作用 (林璐璐等, 2009),九香虫 *Aspongopus chinensis* (Dallas, 1851) 即是其中一种 (张笠等, 2011)。九香虫始载于《本草纲目》,具有温中助阳、理气止痛的功效,是具有较高药食两用价值的昆虫 (蔡仁莲等, 2016)。现代医学证明其可用于治疗肝癌、胃癌、乳腺癌、结肠癌等 (徐波等, 2007; 范钦等, 2011; 檀军等, 2013; 杨佳琪等, 2017; Tan *et al.*, 2019),也有抗菌和抗氧化等功效 (中华本草编委会, 1999; 高颖晖等, 2015)。

研究表明,九香虫血淋巴具有抑制乳腺癌和胃癌细胞增殖的作用 (檀军等, 2013; 杨佳琪等, 2017),但九香虫血淋巴提取工艺较复杂,稳定性较差。九香虫在临床上的用药形式主要为水煎液 (刘庆芳, 2002),其制备工艺简单,经过高温煎煮,药物稳定性较高,通过煎煮的方式可使药物活性成分充分释放和溶解于汤剂中。然而,高温煎煮又可导致部分蛋白变性、物质降解等,影响药效,哪些物质可能发挥主要的抗癌功效等仍然未知。因而本研究通过高温煎煮九香虫粉末,制备九香虫水煎液,检测其对乳腺癌细胞体外增殖的影响,分析九香虫水煎液主要成分,并讨论分析其主要成分与其主要功效之间的关系,为九香虫深层次开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

九香虫 (购自贵州省凯里市,置于恒温干燥箱烘干备用),人乳腺癌细胞系 MDA-MB-453 及小鼠乳腺癌细胞系 4T1 购自中科院上海细胞库。

1.2 主要试剂耗材

L-15 培养基 (武汉博士德生物工程有限公司),RPMI-1640 培养基 (美国赛默飞公司),胎牛血清 (杭州四季青),甲醇 (德国 CNW Technologies 公司),L-2-氯苯丙氨酸 (上海恒柏生物科技有限公司),0.22 μm 针管式过滤器 (美国密理博公司),色谱柱 (美国安捷伦公司)。

1.3 实验仪器

202 型电热恒温干燥箱 (北京永光明医疗仪器厂),超低温冰箱 (美国赛默飞公司),Heraeus

Fresco17 离心机 (美国赛默飞公司),倒置相差显微镜 (厦门麦克奥迪有限公司),7890A 气相色谱仪 (美国安捷伦公司),PEGASUS HT 质谱仪 (美国力可公司),PS-60AL 超声仪 (深圳雷德邦电子有限公司),LNG-T98 真空干燥仪 (太仓华美生化仪器厂),酶联免疫检测仪 (美国赛默飞公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 样品制备

九香虫活虫以纯水清洗两遍,滤纸吸干虫体表面水分,置于电热恒温干燥箱中 80 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤 4 h 后研磨成粉末,称取 20 g 虫粉,加入 80 mL 纯水,室温浸泡 30 min 后于砂锅中煎煮 40 min,最后小火浓缩成浓度为 0.5 g/mL 的九香虫水煎液。将九香虫水煎液以 6 000 \times g 离心 10 min,吸取上清液并用 0.22 μm 滤头过滤除菌, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

取 200 μL 九香虫水煎液于 1.5 mL 离心管中,加入 800 μL 甲醇,再加入 5 μL L-2-氯苯丙氨酸 (1 mg/mL 溶于纯水中) 作为内标,涡旋 30 s。于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 条件静置 10 min,冰水浴条件下超声 5 min,以 12 000 \times g 离心 15 min,小心吸取上清液 400 μL ,在真空干燥仪中干燥。向干燥后的物质加入甲氧胺盐试剂 (甲氧胺盐酸盐,溶于吡啶 20 mg/mL),轻轻混匀后,放入烘箱中 80 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。向每个样品中加入 BSTFA (含有 1% TMCS, v/v),将混合物 70 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1.5 h,随机上机检测。

1.4.2 人乳腺癌细胞 MDA-MB-453 细胞及小鼠乳腺癌细胞 4T1 培养

人乳腺癌 MDA-MB-453 使用含 10% 胎牛血清 (FBS),1% 青链霉素混合液的 L-15 培养基,置于 37 $^{\circ}\text{C}$,空气相培养箱中培养。小鼠乳腺癌 4T1 细胞使用含 10% FBS,1% 青链霉素混合液的 RPMI-1640 培养基,置于 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 培养箱中培养,取对数生长期的细胞进行实验。

1.4.3 形态学观察法及 MTT 法检测九香虫水煎液对乳腺癌细胞增殖的抑制作用

使用 0.25% 胰酶消化处于对数生长期的 MDA-MB-453、4T1 细胞,用细胞计数仪测定细胞密度,调整细胞密度为 1×10^5 个/mL,分别接种于 96 孔培养板中,每孔 100 μL 。实验设置实验组、对照组 (无药物组) 及空白组 (无细胞组)。用对应培养基将九香虫水煎液稀释成生药浓度梯度为 0.02、0.04、0.06、0.08、0.1 g/mL,并用 0.22 μm 滤头过滤除菌。24 h 后,弃旧培养液,加入上述浓度梯度的水煎液,每个浓度设 5 个重复。水煎液

作用 24 h 后, 利用倒置相差显微镜拍摄细胞形态图。48 h 后每孔加 MTT (5 g/L) 20 μ L, 继续放入细胞培养箱培养 4 h 后, 吸去上清液, 每孔加 200 μ L 二甲基亚砷 (DMSO), 置于恒温摇床 37 $^{\circ}$ C 震荡 10 min 以彻底溶解紫色结晶。使用酶标仪在 570 nm 波长条件检测吸光度 (OD) 值。每组实验重复 3 次。计算细胞增殖率, 增殖率 (%) = (实验组 OD 值 - 空白组 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白组 OD 值) \times 100, 并用 SPSS 17.0 分别计算九香虫水煎液对两种细胞的半数抑制浓度 (IC₅₀)。

1.4.4 细胞划痕法观察九香虫水煎液对小鼠乳腺癌细胞 4T1 细胞迁移的影响

取对数生长期的 4T1 细胞消化并接种于 24 孔板 (细胞密度为 4×10^4 个/孔), 置于培养箱中培养。待细胞生长 90% 融合时, 用 200 μ L 吸头沿每个孔的中轴划痕, 划痕后用无菌 PBS 洗涤 3 次。用 RPMI-1640 培养液稀释九香虫水煎液, 加入水煎液浓度分别为 0、0.02、0.04、0.06、0.08、0.1 g/mL, 每个浓度 3 个复孔。分别在 0 h 和 24 h 用倒置相差显微镜拍照, 观察各组细胞迁移情况, 每组实验重复 3 次。采用 Image J 及 SPSS 17.0 软件对实验结果进行统计分析。细胞迁移率 (%) = (0 h 划痕宽度 - 24 h 划痕宽度) / 0 h 划痕宽度 \times 100。

1.4.5 GC-MS 测定九香虫水煎液主要成分

气相色谱条件: 采用 DB-5MS 毛细管色谱柱

(30 m \times 250 μ m \times 0.25 μ m); 载气为高纯度氦气, 前进样口流速 3 mL/min; 柱流速为 1 mL/min; 进样量为 1 μ L。初始温度 50 $^{\circ}$ C, 持续 1 min, 然后以 10 $^{\circ}$ C/min 的速率上升到 310 $^{\circ}$ C, 保持 8 min; 质谱条件: 前进样口、传输线和离子源温度是分别是 280、280 和 250 $^{\circ}$ C; 离子源为 EI; 电子能量 70 eV; 质谱数据在全扫描模式下获得, 质量扫描范围 m/z 为 50 ~ 500。

1.5 数据处理

实验数据应用统计软件 SPSS 17.0 进行单因素方差分析, 所有数据使用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 水煎液对乳腺癌细胞增殖抑制的作用

不同浓度九香虫水煎液作用于乳腺癌 MDA-MB-453 细胞 24 h 后, 通过细胞形态观察和 MTT 实验检测九香虫水煎液对 MDA-MB-453 细胞增殖的抑制作用。MDA-MB-453 细胞形态图 (图 1) 显示, 0.04 ~ 0.10 g/mL 浓度组细胞皱缩, 体积变小, 细胞贴壁能力降低, 漂浮细胞较多, 对照组和 0.02 g/mL 浓度组细胞呈饱满的圆形, 贴壁细胞数量较多, 细胞轮廓清晰。

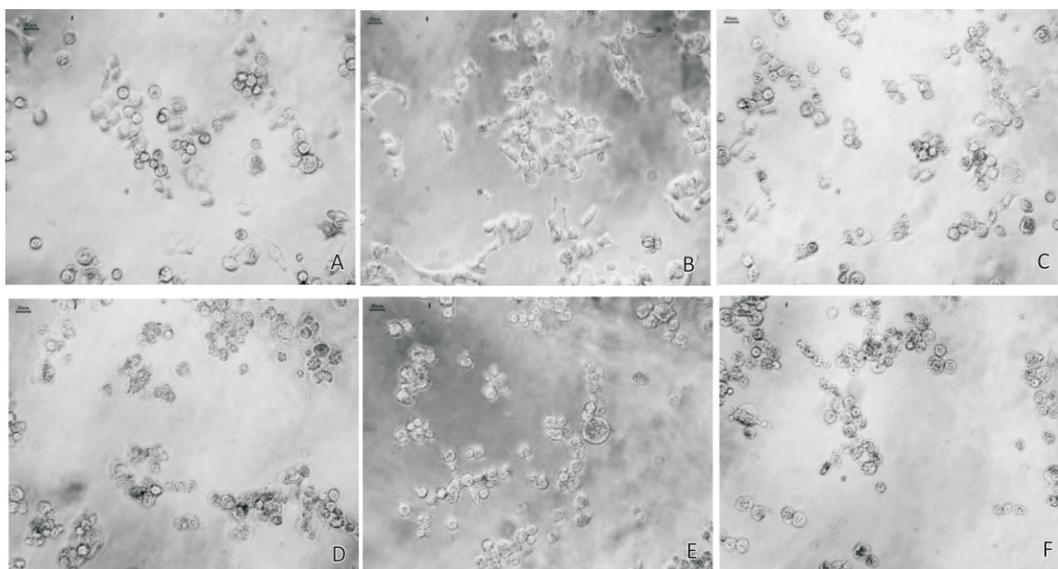


图 1 九香虫水煎液作用 24 h 对 MDA-MB-453 细胞形态的影响

Fig. 1 Effects of *Aspongopus chinensis* decoction on the morphology of MDA-MB-453 cells for 24 h

注: A-F 分别为 0、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 g/mL, 200 \times 。Note: A to F reflects 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10 g/mL, 200 \times .

MTT 检测结果显示, 九香虫水煎液可显著抑制 MDA-MB-453 及 4T1 细胞的生长 ($P < 0.05$)。结果表明九香虫水煎液具有抑制人乳腺癌细胞 MDA-MB-453、小鼠乳腺癌细胞 4T1 增殖的作用, 且呈浓度依赖性, 九香虫水煎液作用于 MDA-MB-453、4T1 细胞的 IC_{50} 浓度分别为 0.034、0.101 g/mL。

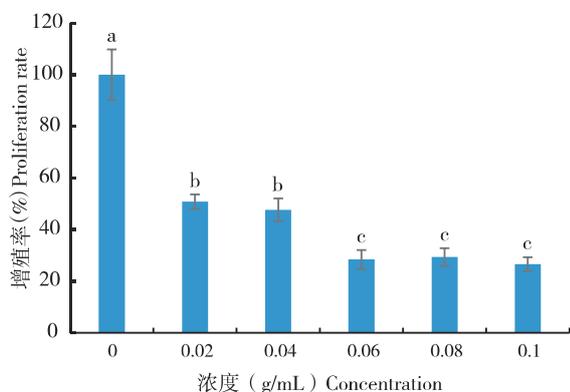


图2 九香虫水煎液作用 48 h 对 MDA-MB-453 细胞增殖的影响 ($P < 0.05$)

Fig. 2 Effect of *Aspongopus chinensis* decoction on the proliferation of MDA-MB-453 cells for 48 h ($P < 0.05$)

2.2 九香虫水煎液对 4T1 细胞迁移的影响

4T1 划痕实验结果显示, 对照组 4T1 细胞迁移

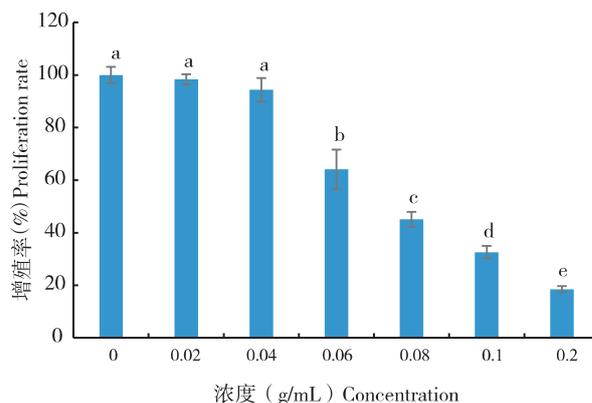


图3 九香虫水煎液作用 48 h 对 4T1 细胞增殖的影响 ($P < 0.05$)

Fig. 3 Effect of *Aspongopus chinensis* decoction on the proliferation of 4T1 cells for 48 h ($P < 0.05$)

率为 $42.67\% \pm 0.88\%$, 浓度为 0.02、0.04 g/mL 水煎液作用于 4T1 细胞 24 h 后迁移率分别为 $18.33\% \pm 4.91\%$ 和 $8.67\% \pm 2.85\%$, 加样浓度为 0.06、0.08、0.10 g/mL 水煎液作用于 4T1 细胞 24 h 后大量细胞漂浮, 呈弥散状, 无法测得迁移率。对照组迁移距离显著大于实验组 ($P < 0.05$), 表明九香虫水煎液可显著抑制 4T1 细胞的迁移能力。

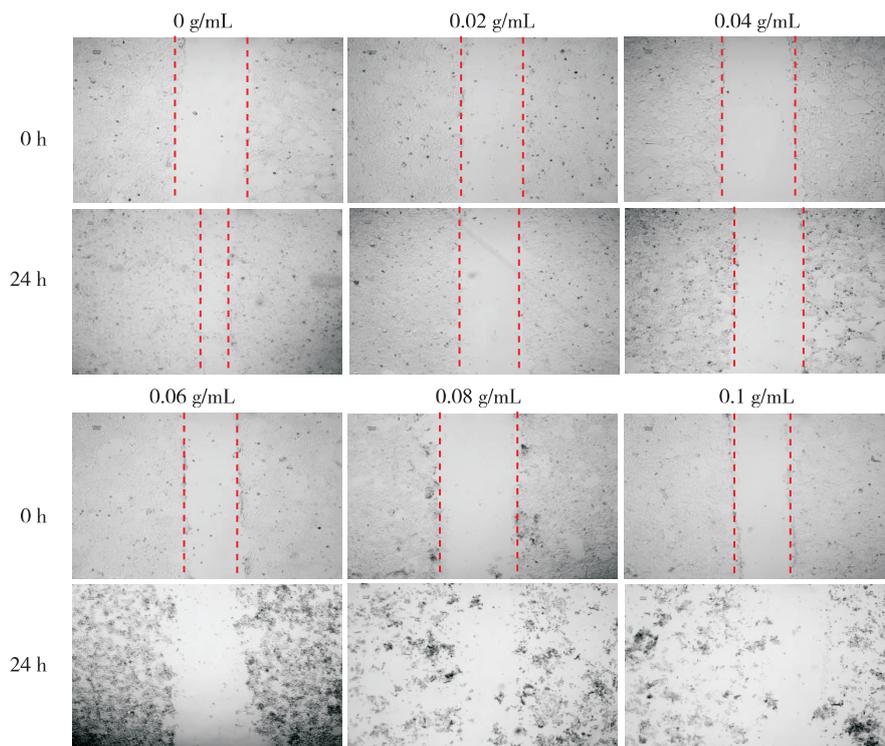


图4 九香虫水煎液作用 0 h 和 24 h 对 4T1 细胞迁移影响的形态图 (40 ×)

Fig. 4 Morphological diagram of *Aspongopus chinensis* decoction on migration of 4T1 cells at 0 h and 24 h (40 ×)

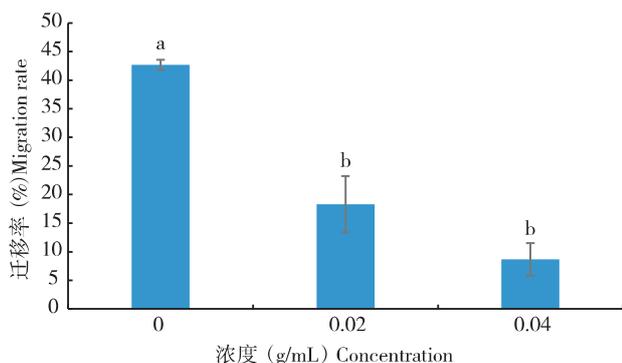


图5 九香虫水煎液作用 24 h 对 4T1 细胞迁移的影响 ($P < 0.05$)

Fig. 5 Effect of the *Aspongopus chinensis* decoction on the migration of 4T1 cells at 0 h and 24 h ($P < 0.05$)

2.3 GC-MS 测定九香虫水煎液主要成分

使用 ChromaTOF 软件对质谱数据进行了峰提取、基线矫正、解卷积、峰积分等分析 (Kind *et al.*, 2009)。根据离子流色谱图 (图 6), 使用 PubChem 和 KEGG 数据库, 包括质谱匹配及保留时间指数匹配, 对物质进行定性分析, 共分析得出 455 种物质。根据峰面积归一化法得出各成分相对含量。根据数据库匹配相似性 ≥ 800 , 筛选相对含量较高的 20 种化合物 (表 1)。其中, 3,4-二羟基苯甲酸 (0.88%)、尿苷 (0.77%)、反丁烯二酸 (0.72%)、腺苷 (0.61%)、棕榈酸 (0.61%) 等物质可能与其能够抑制乳腺癌细胞增殖有关。

表 1 九香虫水煎液主要化合物成分

Table 1 Main compound components of *Aspongopus chinensis* decoction

编号 No.	CAS 号 CASnumber	相对分子质量 Uniquemass	化合物名称 Name	保留时间 (min) Retentiontime	含量 (%) Content
1	72-18-4	144	缬氨酸 Valine	9.7400	4.17
2	492-27-3	231	犬尿喹啉酸 Kynurenic acid	19.7333	3.20
3	3226-65-1	128	L-蛋氨酸亚砷 L-methionine sulfoxide	16.8240	1.80
4	70-26-8	142	鸟氨酸 Ornithine	14.9240	1.59
5	63-91-2	192	苯丙氨酸 Phenylalanine	15.0720	1.55
6	73-22-3	202	色氨酸 Tryptophan	21.0133	1.31
7	660-88-8	174	5-氨基缬氨酸 5-Aminovaleric acid	15.0893	1.19
8	110-60-1	174	腐胺 Putrescine	16.3320	1.15
9	372-75-8	157	瓜氨酸 Citrulline	17.2520	0.95
10	66-22-8	241	尿嘧啶 Uracil	11.4400	0.93
11	73-24-5	264	腺嘌呤 Adenine	17.7133	0.91
12	99-50-3	193	3,4-二羟基苯甲酸 3,4-Dihydroxybenzoic acid	17.2053	0.88
13	50-99-7	74	葡萄糖 Glucose	17.9827	0.86
14	107-95-9	102	β -丙氨酸 Beta-Alanine	9.3800	0.80
15	58-96-8	169	尿苷 Uridine	22.9720	0.77
16	110-17-8	245	反丁烯二酸 Fumaric acid	11.6013	0.72
17	87-99-0	217	木糖醇 Xylitol	15.9213	0.71
18	58-61-7	236	腺苷 Adenosine	24.4147	0.61
19	1957-10-3	132	棕榈酸 Palmitic acid	19.4827	0.61
20	56-86-0	156	谷氨酸 Glutamic acid	14.9760	0.59

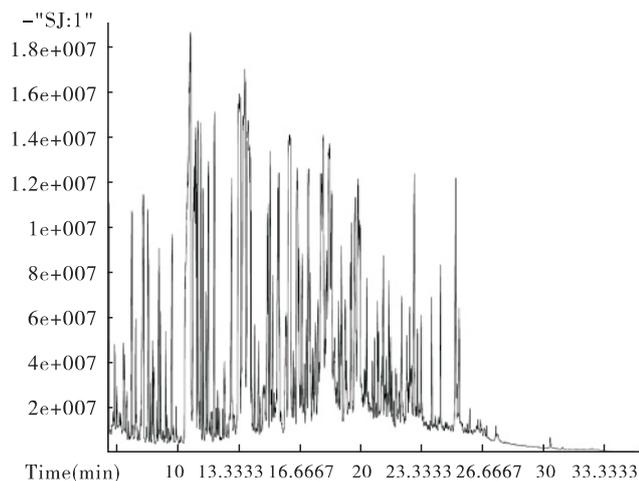


图6 九香虫水煎液总离子流量 (TIC) 图

Fig. 6 Total ion flow diagram of *Aspongopus chinensis* decoction

3 结论与讨论

3.1 九香虫水煎液含有抗菌、抗氧化、镇痛、助阳等活性成分

九香虫水煎液 GC-MS 分析结果显示, 其中含量较多的物质有反丁烯二酸、鸟氨酸、腐胺、瓜氨酸、3,4-二羟基苯甲酸、尿苷、腺苷、棕榈酸等。反丁烯二酸具有镇痛及抗菌的作用 (吴素香等, 2012; 董璠榕等, 2019), 鸟氨酸与瓜氨酸在体内可转化为精氨酸, 精氨酸、腐胺具有提高精子活性的作用 (Morales *et al.*, 2003), 这几种物质的作用与《本草纲目》所记载的九香虫“理气止痛, 温中助阳”之功效相符。3,4-二羟基苯甲酸广泛存在于天然药物中, 具有抗菌、抗氧化、抗炎症和抗肿瘤的作用 (Yin *et al.*, 2009; Gutiérrez-Larraínzar *et al.*, 2012; Palafox-Carlos *et al.*, 2012; Del *et al.*, 2014), 其抗菌和抗氧化的作用与中华本草编委会 (1999) 和高颖晖等 (2015) 结论一致。

3.2 九香虫水煎液可抑制乳腺癌细胞体外增殖

本实验研究结果显示, 九香虫水煎液对乳腺癌细胞体外增殖与迁移具有显著的抑制作用 (如图 1~图 5), 结合 GC-MS 分析结果, 在九香虫水煎液中检测到了反丁烯二酸、3,4-二羟基苯甲酸、腺苷、尿苷、棕榈酸 (如表 1)。反丁烯二酸、3,4-二羟基苯甲酸具有抗肿瘤作用 (Yin *et al.*, 2009; 吴素香等, 2012), 腺苷是抗肿瘤核苷类的前体 (刘洋等, 2012), 尿苷可以调节乳腺癌细胞

的分化、增殖与凋亡 (Mujoomdar *et al.*, 2004); 棕榈酸可抑制肝癌细胞增殖与促进其凋亡 (Nagata *et al.*, 2015)。上述物质均可能与九香虫水煎液能够抑制乳腺癌细胞增殖有关。

九香虫经过高温煎煮仍然具有抑制乳腺癌细胞增殖的活性, 通过 GC-MS 检测, 九香虫水煎液主要成分中具有抗癌活性的成分较多, 便于探究其药理药效和筛选抗癌活性成分。但九香虫水煎液中具体是何种物质起主要的抗肿瘤作用及其抗肿瘤的机制尚需进一步实验研究。本研究采用的 4T1 细胞系有很强的远处转移能力, 可用于构建乳腺移植瘤动物模型, 该模型的细胞生长和远处转移与人类乳腺癌 IV 期十分相似, 已被成功运用到了恶性肿瘤治疗药物的研究中 (Yang *et al.*, 2012), 九香虫水煎液可显著抑制该细胞的增殖与迁移, 可为后期探究九香虫水煎液对小鼠乳腺癌的体内抑制作用提供参考。

参考文献 (References)

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, *et al.* Global cancer statistics 2018: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2018, 68 (6): 394-424.
- Cai RL, Tan J, Fan DT, *et al.* Research on medicinal and edible value of *Aspongopus chinensis* Dallas after being novelly processed [J]. *Journal of Zunyi Medical University*, 2016, 39 (4): 345-349. [蔡仁莲, 檀军, 范定涛, 等. 基于新型加工方法的九香虫药食两用价值研究 [J]. 遵义医学院学报, 2016, 39 (4): 345-349]
- Chinese Materia Medica Editorial Board of the State Administration of TCM. Chinese Materia Medica, Vol. 9 [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Press, 1999: 173-174. [国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草 (第9册) [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 173-174]
- Del CM, Varano B, Scazzocchio B, *et al.* Protocatechuic acid inhibits human dendritic cell functional activation: Role of PPAR γ up-modulation [J]. *Immunobiology*, 2014, 219 (6): 416-424.
- Dong AR, Miao JJ, Guo CH, *et al.* Antibacterial effect of benzoic acid, fumaric acid and its compound acids against common pathogenic bacteria *in vitro* [J]. *Journal of Southwest Minzu University (Natural Science Edition)*, 2019, 45 (1): 36-41. [董璠榕, 苗建军, 郭春华, 等. 苯甲酸、富马酸及其复合物对常见致病菌体外抑菌效果的研究 [J]. 西南民族大学学报 (自然科学版), 2019, 45 (1): 36-41]
- Fan Q, Wei H, Cai HB, *et al.* Effects of the serum containing *Aspongopus chinensis* Dallas on the expression of SW480 apoptosis associated factor FADD and P53 [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 39 (13): 7828-7831. [范钦, 魏辉, 蔡红兵, 等. 九香虫含药血清对人结肠癌细胞 SW480 凋亡相关因子

- FADD · p53 表达作用的研究 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39 (13): 7828 – 7831]
- Gao YH, Zhou WH, Dou P, et al. The effects of ethanol extract from *Aspongopus chinensis* on the activities of antioxidant enzymes in skeletal muscle of exercised rats and their gene expression levels [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2015, 31 (12): 146 – 149. [高颖晖, 周万红, 窦鹏, 等. 九香虫醇提物对运动大鼠骨骼肌抗氧化酶活性及其基因表达水平的影响 [J]. 生物技术通报, 2015, 31 (12): 146 – 149]
- Gutiérrez - Larráinzar M, Rúa J, Caro I, et al. Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of natural phenolic compounds against foodborne pathogens and spoilage bacteria [J]. *Food Control*, 2012, 26 (2): 555 – 563.
- Kind T, Wohlgemuth G, Lee DY, et al. FiehnLib: Mass spectral and retention index libraries for metabolomics based on quadrupole and time-of-flight gas chromatography/mass spectrometry [J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81 (24): 10038 – 10048.
- Lin LL, Niu CY, Lei CL. Progress in research on anticancer medicinal insects [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2009, 20 (3): 620 – 622. [林璐璐, 牛长纓, 雷朝亮. 抗癌药用昆虫研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20 (3): 620 – 622]
- Liu QF. Modern clinical research and application of *Aspongopus chinensis* Dallas [J]. *Journal of Henan University (Medical Science)*, 2002, 21 (4): 66 – 67. [刘庆芳. 九香虫现代临床研究与应用 [J]. 河南大学学报 (医学科学版), 2002, 21 (4): 66 – 67]
- Liu Y, Li MH, Xing XH. Recent progress in research and development of nucleoside analogues as anticancer agents [J]. *Chinese Journal of New Drugs*, 2012, 21 (21): 2493 – 2498. [刘洋, 李明花, 邢向红. 核苷类抗肿瘤药物研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2012, 21 (21): 2493 – 2498]
- Mao YY, Gao LB. Report on global development of antitumor drugs (2016) [J]. *Science & Technology Review*, 2016, 34 (11): 21 – 24. [毛艳艳, 高柳滨. 全球抗肿瘤药物研发报告 (2016) [J]. 科技导报, 2016, 34 (11): 21 – 24]
- Morales ME, Rico G, Bravo C, et al. Progressive motility increase caused by L - arginine and polyamines in sperm from patients with idiopathic and diabetic asthenozoospermia [J]. *Ginecol Obstet Mex*, 2003, 71: 297 – 303.
- Mujoomdar M, Bennett A, Hoskin D, et al. Adenosine stimulation of proliferation of breast carcinoma cell lines: Evaluation of the [³H] thymidine assay system and modulatory effects of the cellular microenvironment *in vitro* [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2004, 201 (3): 429 – 438.
- Nagata Y, Ishizaki I, Waki M, et al. Palmitic acid, verified by lipid profiling using secondary ion mass spectrometry, demonstrates anti-multiple myeloma activity [J]. *Leukemia Research*, 2015, 39 (6): 638 – 645.
- Palafox-Carlos H, Gil-Chávez J, Sotelo-Mundo RR, et al. Antioxidant interactions between major phenolic compounds found in “Ataulfo” mango pulp: Chlorogenic, gallic, protocatechuic and vanillic acids [J]. *Molecules*, 2012, 17 (11): 12657 – 12664.
- Tan J, Guo JJ, Wei C, et al. The inhibitory effects of haemolymph from *Aspongopus chinensis* Dallas on *in vitro* proliferation of gastric carcinoma cell SGC - 7901 [J]. *Journal of Mountain Agriculture and Biology*, 2013, 32 (2): 119 – 122. [檀军, 郭建军, 魏超, 等. 九香虫血淋巴对胃癌 SGC - 7901 细胞体外增殖的抑制作用 [J]. 山地农业生物学报, 2013, 32 (2): 119 – 122]
- Tan J, Tian Y, Cai RL, et al. Antiproliferative and proapoptotic effects of a protein component purified from *Aspongopus chinensis* Dallas on cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Evidence - Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/8934794>.
- Wu ML, Jin DC. The antibacterial activity of the haemolymph and the purified haemo - protein from *Aspongopus chinensis* [J]. *Chinese Bulletin of Entomology*, 2005, 42 (3): 315 – 318. [吴玛莉, 金道超. 九香虫血淋巴及其纯化蛋白抑菌活性的研究 [J]. 昆虫知识, 2005, 42 (3): 315 – 318]
- Wu SX, Chen SH, Lu GY, et al. Study on content changes of fumaric acid in *Sarcandrae* [J]. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2019, 27 (2): 348 – 351. [吴素香, 陈素红, 吕圭源, 等. 肿节风药材反丁烯二酸含量的动态变化研究 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 27 (2): 348 – 351]
- Xu B, Zhu GH, Xia JT, et al. Influence of Chinese herb aitongke on the proliferation, apoptosis and Rb gene expression of hepatoma a carcinoma cells Hep G2 [J]. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering*, 2007, 11 (12): 2253 – 2256. [徐波, 朱光辉, 夏金堂, 等. 中药痛克对人肝癌细胞 Hep G2 增殖、凋亡及 Rb 基因表达的影响 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11 (12): 2253 – 2256]
- Yang JQ, Tan J, Cao ML, et al. The inhibitory effect of haemolymph from *Aspongopus chinensis* Dallas on growth of human breast cancer MCF - 7 by CCK - 8 [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2017, 39 (1): 193 – 197. [杨佳琪, 檀军, 曹米兰, 等. CCK - 8 法检测九香虫血淋巴对人乳腺癌 MCF - 7 细胞增殖的抑制作用 [J]. 环境昆虫学报, 2017, 39 (1): 193 – 197]
- Yang S, Zhang JJ, Huang XY. Mouse models for tumor metastasis [J]. *Methods Mol. Biol.*, 2012, 928: 221 – 228.
- Yin MC, Lin CC, Wu HC, et al. Apoptotic effects of protocatechuic acid in human breast, lung, liver, cervix, and prostate cancer cells: Potential mechanisms of action [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57 (14): 6468 – 6473.
- Zhang L, Guo JJ. The current research situation of *Aspongopus chinensis* Dallas resources and its utilization [J]. *Journal of Southwest China Normal University*, 2011, 36 (5): 151 – 155. [张笠, 郭建军. 九香虫资源及其利用研究 [J]. 西南师范大学学报, 2011, 36 (5): 151 – 155]