

双香豆素抑制 SL-221 细胞增殖的差异代谢物分析

温雪梅^{1,2*}, 邵雪花^{2*}, 何翔宇¹, 秦子昕¹, 梁 赫¹,

徐玉辉¹, 路 伟^{1,3**}

(1. 新疆农业大学农学院, 棉花教育部工程研究中心, 新疆维吾尔自治区农林有害生物监测与安全防护重点实验室, 乌鲁木齐 830052; 2. 广东省农业科学院果树研究所, 农业农村部南亚热带果树生物学与遗传资源利用重点实验室, 广东省热带亚热带果树研究重点实验室, 广州 510640; 3. 中国农业科学院西部农业研究中心, 新疆昌吉 831100)

摘要: 为明确双香豆素 (DIC) 对斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 卵巢细胞 (SL-221) 代谢组的影响。本研究采用 CCK-8 和非靶向代谢组学技术研究双香豆素抑制 SL-221 细胞增殖的毒理机理。结果表明, 双香豆素对 SL-221 细胞表现出明显的抑制活性, 24 h 的抑制中浓度为 1.60 $\mu\text{g/mL}$, 且呈浓度依赖性; 此外, 双香豆素分别与 SC 79 和胰岛素共培养后, 均能提升细胞活力; 进一步通过非靶向代谢组学技术获得了 393 个差异代谢物, 双香豆素与对照相比上调了 364 个, 下调 29 个, 而 50% 以上的差异代谢物分布于氨基酸及其代谢物 (48.3%) 和甘油磷脂类 (14.2%) 中; 差异代谢物富集主要在氨基糖和核苷酸糖的代谢、不饱和脂肪酸的生物合成、糖的生物合成、淀粉和蔗糖等营养代谢途径中; 其中, 差异代谢产物肾上腺甾酮 (Adrenosterone)、LPC(12:0/0:0)、N,N-二环己基碳二亚胺 (N,N-dicyclohexylcarbodiimide) 和 L-缬氨酸-L-脯氨酸 (Val-Pro) 分别上调了 5 833.56 倍、15.47 倍、10.26 倍和 9.94 倍。本研究解析了双香豆素诱导斜纹夜蛾卵巢细胞增殖的代谢调控机制, 为该化合物的开发利用提供了理论依据。

关键词: 双香豆素; 斜纹夜蛾; 代谢组学; 细胞活性; 代谢通路

中图分类号: Q968.1;

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858(2024)00-0000-00

Differential metabolite analysis of SL-221 cell proliferation inhibited by dicoumarin

WEN Xue-Mei^{1,2*}, SHAO Xue-Hua^{2*}, HE Xiang-Yu¹, QIN Zi-Xin¹, LIANG He¹, XU Yu-Hui¹, LU Wei^{1,3**} (1. College of Agriculture, Xinjiang Agricultural University, Engineering Research

基金项目: 国家重点研发计划 (2022YFD1400304); 新疆维吾尔自治区重点研发专项 (2022B02033-1); 新疆维吾尔自治区“天山英才”三农骨干人才计划 (2023SNGGGCC032); 新疆棉花产业技术体系 (XJARS-03); 广东省基础与应用基础研究基金面上项目 (2021A1515012502)

*共同第一作者: 温雪梅, 女, 硕士研究生, 研究方向为棉花害虫绿色防控, E-mail: wxm19980628@sina.com; 邵雪花, 女, 博士, 副研究员, 研究方向为果树栽培、育种及病虫害防治研究, E-mail: sxh19831017@163.com

**通讯作者 Author for correspondence: 路伟, 男, 副教授, 研究方向为棉花害虫绿色防控, E-mail: teerakon@sina.com

收稿日期 Received: 2023-11-27; 接受日期 Accepted: 2024-05-22

Centre of Cotton, Ministry of Education, Key Laboratory of the Pest Monitoring and Safety Control of Crops and Forests of the University of the Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830052, China; 2. Institute of Pomology, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Biology and Utilization of Tropical Fruit Trees in South Asia, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Tropical and Subtropical Fruit Tree Research of Guangdong Province, Guangzhou 510640, China; 3. Western Agricultural Research Center, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changji 831100, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China)

Abstract: To clarify the impact of dicoumarin (DIC) on the metabolic profile ovarian cells of *Spodoptera litura* (SL-221), this study employed CCK-8 and non-targeted metabolomics techniques to investigate the toxicological mechanism of DIC in inhibiting SL-221 cells proliferation. The results showed that DIC exhibited significant inhibitory activity against SL-221 cells, with an inhibitory concentration of 1.60 $\mu\text{g/mL}$ at 24 h, and the inhibition was concentration-dependent. Furthermore, when co-cultured with SC 79 and insulin, DIC enhanced cell viability. Through non-targeted metabolomics analysis, a total of 393 differential metabolites were obtained, with 364 upregulated and 29 downregulated by DIC compared to the control. More than 50% of the differential metabolites were distributed in amino acids and their metabolites (48.3%) and glycerophospholipids (14.2%). The enriched differential metabolites were mainly involved in amino sugar and nucleotide sugar metabolism, unsaturated fatty acid biosynthesis, sugar biosynthesis, starch and sucrose metabolism, and other nutrient metabolism pathways. Among them, the differential metabolites adrenosterone, LPC (12:0/0:0), N,N-dicyclohexylcarbodiimide, and Val-Pro were upregulated by 5833.56, 15.47, 10.26, and 9.94 times, respectively. This study elucidated the metabolic regulatory mechanism underlying DIC-induced SL-221 cell proliferation and provided a theoretical basis for the development and utilization of this compound.

Key word: Dicoumarin; *Spodoptera litura*; metabolomics; cell viability; metabolic pathways

香豆素类化合物 (Coumarin, CM) 是一种来源于植物的苯并吡喃酮类化合物 (杨雪怡, 2022), 已被广泛应用于医药、化学试剂、食品和农业等多个领域 (李艳和陈新兵, 2013; 管淑霞等, 2022; 叶称连等, 2022; 彭莘媚等, 2023)。双香豆素 (Dicoumarin, DIC) 作为一种香豆素类化合物, 起初是作为抗凝血药物在临床上使用 (张韬等, 2012)。目前, 大

量研究发现双香豆素及其衍生物具有抗菌、抗肿瘤、抗炎和抗微生物 (Regal *et al.*, 2020; 魏静等, 2020; Monika *et al.*, 2021) 等多种生物活性。范继文等 (2021) 报道了 12 种双香豆素类天然产物衍生物 (BCM1~BCM12) 均能够显著抑制 3 种棉花病原菌的生长, 且 EC₅₀ 值均低于醚菌酯; 杨丽君等 (2019) 研究发现, 双香豆素衍生物 28 和单香豆素衍生物均对 HUTU80、4T1 和 PANC1 肿瘤细胞系活性具有明显的抑制效果。鉴于此, 众多科研人员针对香豆素类化合物的分离提取、化学合成和生物合成等方面已开展了广泛研究 (周元清, 2017; 王荣香等, 2022; 王慧彦等, 2023), 解决了该化合物的来源问题, 更好地促进了香豆素类化合物的应用推广。

斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 属鳞翅目夜蛾科的重要农业害虫之一, 其幼虫可取食大豆、番茄、甘薯、柑橘、辣椒、烟草、棉花及其他作物 (黄钧鸿等, 2019; 戴旭东和翟勤, 2023), 对我国农业生产构成重大威胁。化学农药的频繁使用导致了斜纹夜蛾抗药性的产生、环境污染及影响有益微生物与昆虫天敌等诸多问题 (桑松等, 2013; Tong *et al.*, 2013; 章金明等, 2014; Xu *et al.*, 2020), 亟需开展天然产物对斜纹夜蛾防治方面的研究工作。本团队前期研究结果表明, 双香豆素对斜纹夜蛾卵巢细胞 (SL-221) 具有明显地增殖抑制活性, 阻断其细胞周期, 并通过抑制营养信号途径诱导其程序性死亡 (秦子昕等, 2023), 这为双香豆素农用活性的研究开辟了新的视角。故本研究依此为切入点, 在 SL-221 细胞培养时对其营养信号途径进行干涉 (添加激活剂), 然后检测双香豆素对 SL-221 细胞活力的影响; 在此基础上, 通过代谢组学技术手段研究双香豆素胁迫斜纹夜蛾卵巢细胞代谢谱的扰动情况, 寻找差异代谢物和主要影响信号通路, 为斜纹夜蛾的绿色防控及双香豆素的开发利用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料与试剂

斜纹夜蛾卵巢细胞 (SL-221) 培养: 将复苏后稳定生长的 SL-221 细胞置于培养基中, 加入 3 mL 含 5% 胎牛血清的 SIM SF 昆虫培养基, 于 27°C 恒温培养箱中培养, 将传代至对数生长期、状态良好的细胞用于后续实验。

双香豆素由广东省农业科学院果树研究所优稀水果研究室提供, 纯度≥98%; 胎牛血清购自蒙马生物科技有限公司; SIM SF Expression Medium (MSF1)、胰岛素 (Insulin)、CCK-8 (MF128) 和二甲基亚砷 (Dimethyl sulfoxide, DMSO) 均购自北京索莱宝科技有限公司; SC 79 (SF2730) 购自碧云天生物科技有限公司; 甲醇 (色谱纯)、乙腈 (色谱纯) 购自

Merck; 甲酸（色谱纯）、甲酸铵（色谱纯）和氨水≥25% in H₂O 购自 Aladdin; PBS 缓冲液购自博奥森生物技术有限公司。供试仪器见表 1。

表 1 供试仪器

Table 1 Test instruments

仪器名称 Instrument name	型号 Model	生产公司 Production company
恒温培养箱 Thermostatic incubator	DH-360	北京科伟永兴仪器有限公司 Beijing Kewei Yongxing Instrument Co., Ltd
多功能酶标仪 Multimode microplate reader	Spark	上海帝肯实验器材有限公司 Shanghai Tecan Experimental Equipment Co., Ltd
超高效液相色谱 Ultra-performance liquid chromatography	ExionLC AD	上海 sciex 爱博才思分析仪器贸易有限公司 Shanghai SCIEX Aibo Caisi Analytical Instrument Trading Co., Ltd
串联质谱 Tandem mass spectrometry	QTRAP®	上海 sciex 爱博才思分析仪器贸易有限公司 Shanghai SCIEX Aibo Caisi Analytical Instrument Trading Co., Ltd

1.2 试验方法

1.2.1 CCK-8 法检测双香豆素对 SL-221 细胞的毒力

采用 CCK-8 法测定胰岛素和 SC 79 对 SL-221 细胞的毒力。取 100 μL SL-221 细胞接种至 96 孔板中，待细胞贴壁密度达 80%时，吸去原有培养基，加入不同浓度胰岛素和 SC 79 培养液，设置胰岛素为 1.562 5、3.125、6.25、12.5、25、50 和 100 μg/mL 7 个浓度处理；SC 79 为 0.062 5、0.125、0.25、0.5、1、2 和 4 μg/mL 7 个浓度处理，空白对照为无血清培养基（含 0.1% DMSO），置于 27°C 恒温箱中孵育 24 h。孵育结束后，每孔加入 10 μL CCK-8 溶液，继续避光孵育 3 h，于酶标仪 450 nm 处测定吸光度值，每个浓度设置 4 个复孔。

根据上述试验确定了胰岛素和 SC 79 的最适浓度后，将双香豆素分别与 SC 79 和胰岛素共培养 24 h，设置双香豆素为 1.562 5、3.125、6.25、12.5、25、50 和 100 μg/mL 7 个浓度处理，后续 CCK-8 检测同上，最后于 450 nm 处测定吸光度。

细胞活力 (%) = $[(A_{\text{加药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{零加药}} - A_{\text{空白}})] \times 100\%$ ，式中， $A_{\text{加药}}$ 为含有 SL-221 细胞、含药培养基和 CCK-8 孔的 OD 值； $A_{\text{空白}}$ 为含有 CCK-8，不含 SL-221 细胞和含药培养基孔的 OD 值； $A_{\text{零加药}}$ 为含有 SL-221 细胞、CCK-8 无含药培养基孔的 OD 值。

1.2.2 代谢组学检测

1.2.2.1 样品前处理

用 DMSO 将双香豆素配置成 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 待用。取 3 mL SL-221 细胞接种至细胞培养皿 ($d = 60 \text{ mm}$)，于 27°C 恒温箱培养过夜。试验前将原有培养基丢弃，加入含药培养基，置于 27°C 恒温箱内孵化 12 h。孵育结束后将细胞收集于 2 mL 离心管中，900 r/min 离心 4 min，弃上清。加入 1 mL PBS 反复冲洗细胞，冲洗结束后 900 r/min 离心 4 min，弃去上清液，此步骤重复 2 次；然后加入 500 μL 80% 甲醇（以下步骤需在冰上完成），并反复吹打使细胞呈悬浮状态；将离心管放入液氮内静置 5 min 后，在干冰上解冻 5 min，再使用涡旋仪混匀，此步骤重复 3 次。4°C 12 000 r/min 离心 10 min，取 300 μL 上清液转移到新离心管，放于 -20°C 冰箱中静置 30 min；静置完成后，4°C 12 000 r/min 离心 3 min，取 200 μL 上清液放于进样瓶中，最后上机分析。

1.2.2.2 色谱及质谱检测条件

数据采集系统主要包括超高效液相色谱 (Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC) 和串联质谱 (Tandem mass spectrometry, MS/MS)。液相色谱条件：Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C18 (1.8 μm , 2.1 mm \times 100 mm)；流动相 A 相为超纯水 (含 0.1% 甲酸)，B 相为乙腈 (含 0.1% 甲酸)；洗脱梯度条件设置为 0 min，水：乙腈 = (95：5, V/V)；11.0 min 为 10：90 V/V；12.0 min 为 10：90 V/V；12.1 min 为 95：5 V/V；14.0 min 为 95：5 V/V；流速为 0.4 mL/min；柱温为 40°C；每个样品取 2 μL 。

质谱条件：电喷雾离子源温度为 500°C，质谱电压为 5 500 V，离子源气体 I 55 psi，气体 II 60 psi，气帘气 25 psi，碰撞诱导电离 (Collision-activated dissociation, CAD) 参数设置为高，在三重四极杆 (Qtrap) 中，每个离子对是根据优化的去簇电压 (Declustering potential, DP) 和碰撞能 (Collision energy, CE) 进行扫描检测 (生弘杰等, 2023；郝宏伟等, 2023)。

1.3 数据分析

本试验利用软件 Analyst 1.6.3 处理质谱数据；采用正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 分析代谢物的变化；利用 R 软件对数据进行主成分分析 (PCA) 和差异代谢物聚类分析 (HCA)；差异代谢物采用 VIP ($\text{VIP} \geq 1$) 和绝对 Log^2FC ($|\text{Log}^2\text{FC}| \geq 1.0$) 进行测定，VIP 值从 OPLS-DA 结果中提取；利用 KEGG 化合物数据库 (<http://www.kegg.jp/kegg/compound>) 对鉴定出的代谢物进行注释；采用 Excel 2016 软件绘制相关图表；利用 Origin 2017 进行绘图。

2 结果与分析

2.1 CCK-8 法检测双香豆素对 SL-221 细胞存活率的影响

CCK-8 检测不同药物处理 SL-221 细胞 24 h 后的细胞活力，结果见图 1。从图 1-a 中可以看出，双香豆素浓度为 1.5625 $\mu\text{g/mL}$ 时便对 SL-221 细胞表现出明显的抑制作用，细胞活力为 53.10%；随着双香豆素浓度增加，细胞活力呈下降趋势（双香豆素浓度分别为 3.125、6.25、12.5、25、50 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 时，其细胞活力分别为 39.01%、20.42%、17.86%、11.25%、9.35%和 6.08%）；当不同浓度双香豆素中分别添加 4 $\mu\text{g/mL}$ SC 79（Akt 激活剂）后，发现细胞活力显著提高，增加幅度为 8.51%、7.56%、7.87%、7.38%、13.21%、13.37%、14.02%。图 1-b 表明在不同浓度双香豆素中分别添加 10 $\mu\text{g/mL}$ 胰岛素后，SL-221 细胞活力也明显提升，提升至 56.65 %、49.42%、27.70%、19.79%、16.97%、14.61%、11.51%。综上所述，4 $\mu\text{g/mL}$ SC 79 和 10 $\mu\text{g/mL}$ 胰岛素可显著提升双香豆素处理下的细胞活力。

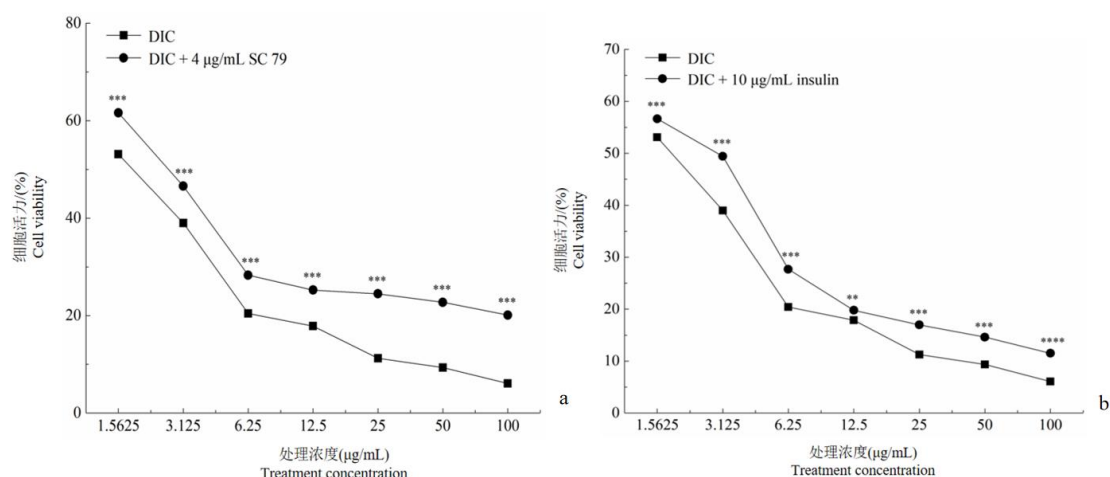


图 1 不同浓度双香豆素对 SL-221 细胞存活率的影响

Fig. 1 Effects of different concentrations of dicoumarin on SL-221 cell viability

注：a, DIC 和 DIC + 4 $\mu\text{g/mL}$ SC 79 处理组；b, DIC 和 DIC + 10 $\mu\text{g/mL}$ insulin 处理组。****, 与对照组相比, $P < 0.001$ 。Note: a, DIC and DIC + 4 $\mu\text{g/mL}$ SC79 treatment groups; b, DIC and DIC + 10 $\mu\text{g/mL}$ insulin-treated groups. ****, $P < 0.001$ compared to control.

2.2 代谢物组数据质量评估

2.2.1 样品质控分析

利用软件 Analyst 1.6.3 处理质谱数据。混样质控 QC 样本的总离子流图（Total ions current, TIC, 即每个时间点质谱图中所有离子的强度加和对时间所作的图）重叠展示如图 2 所示，代谢物检测总离子流的曲线重叠性高，即保留时间和峰强度均一致，表明质谱信号

稳定性较好，仪器稳定性高，数据重复性和可靠性强。

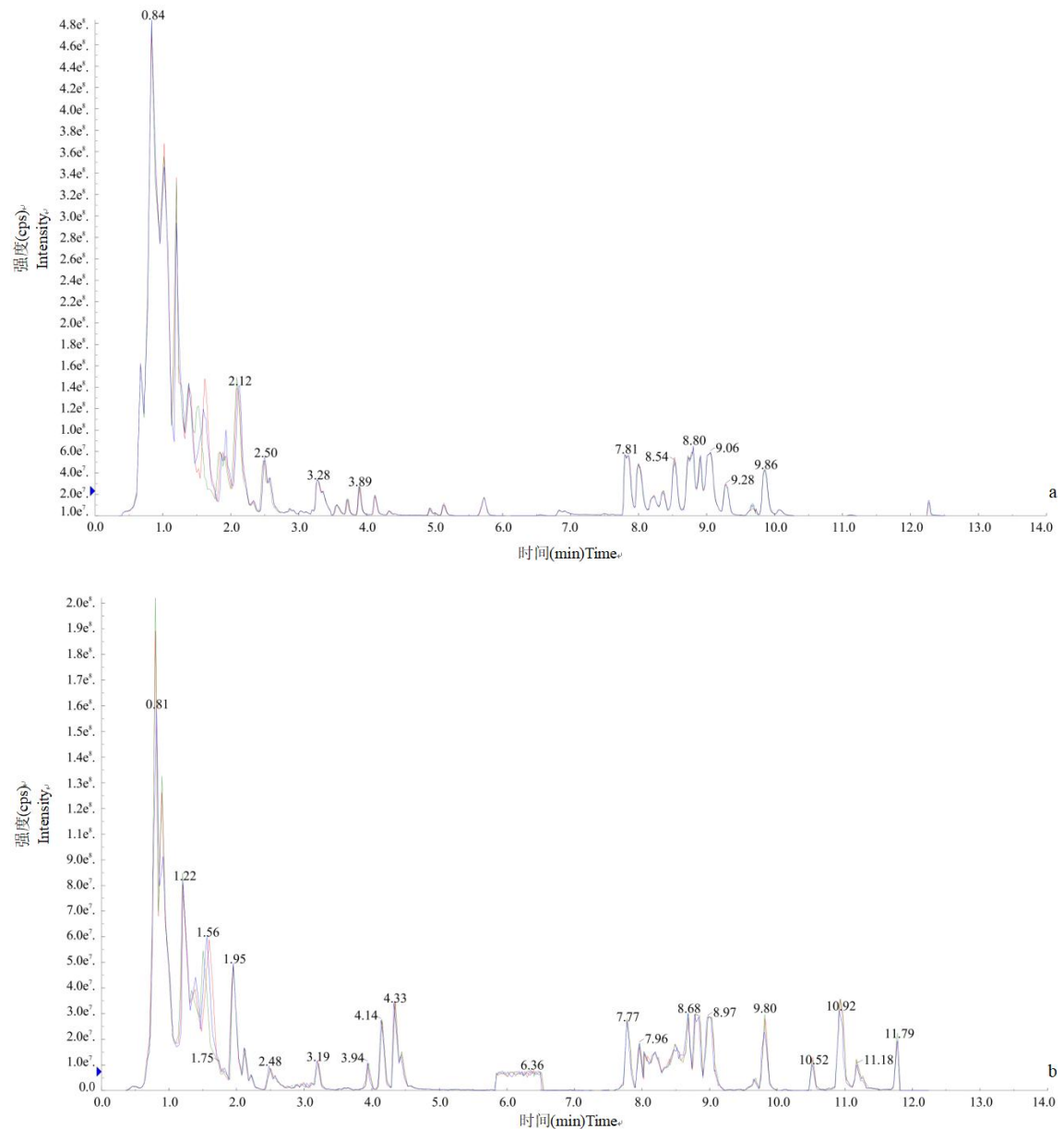


图 2 QC 样品质谱检测总离子流重叠图 (TIC)

Fig. 2 Overlap diagrams pf total ion chromatogram detected by mass spectrometry of QC samples

注：a，负离子模式下进行检测；b，在正离子模式下进行检测；横坐标，代谢物测定时检测产物的残留时间 (Rt, 残留时间)；纵坐标，离子测定时的离子流强度 (强度单位为 Cps, 每秒计数)。Note: a, Detection in negative ion mode; b, Detection in positive ion mode; Abscissa, the residual time of the detected product during metabolite determination (Rt, residual time); Ordinate, the intensity of the ion current at the time of ion measurement (intensity in Cps, counted per second).

2.2.2 OPLS-DA 分析

通过分析 OPLS-DA 评价模型，进一步检测所有样本间的差异代谢物是否准确。

OPLS-DA 评价模型的预测参数有 R^2X 、 R^2Y 和 Q^2 ，其中， R^2X 和 R^2Y 分别表示所建模型对 X 和 Y 矩阵的解释率， Q^2 表示模型的预测能力，这三个指标越接近于 1 时表示模型越稳定可靠， $Q^2 > 0.5$ 时可认为是有效的模型， $Q^2 > 0.9$ 时为出色的模型。OPLS-DA 验证图中， $R^2X = 0.794$ 、 $R^2Y = 0.999$ 和 $Q^2 = 0.955$ 均表现出良好的拟合和预测能力（图 3），说明差异代谢物分析比较准确。

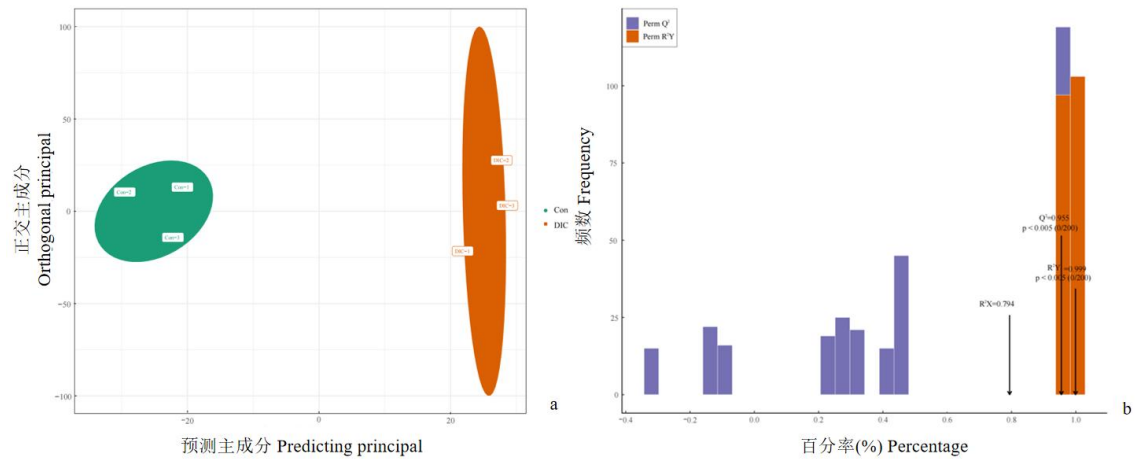


图 3 正离子模式下 OPLS-DA 得分图及 OPLS-DA 置换检验图

Fig. 3 OPLS-DA score in positive ion mode and OPLS-DA displacement test plot

注：a，OPLS-DA 得分图；横坐标，预测主成分；纵坐标，正交主成分；图中的每个点表示一个样品，同一个组的样品使用同一种颜色表示；b，OPLS-DA 检验图；横坐标表示模型 R^2Y 、 Q^2 值；纵坐标表示模型分类效果出现的频数；图中橙色，随机分组模型 R^2Y ；紫色，随机分组模型 Q^2 ；黑色箭头，原始模型的 R^2X 、 R^2Y 和 Q^2 值。Note: a, OPLS-DA score plot; Abscissa, predicted principal component; Ordinate, orthogonal principal component; Each dot in the plot represents a sample, and samples from the same group are represented by the same color; b, OPLS-DA test diagram; The abscissa represented the R^2Y and Q^2 values of the model; The ordinate represented the frequency of the model's classification effect; Orange in the figure, randomized model R^2Y ; purple, randomized model Q^2 ; Black arrows, R^2X , R^2Y , and Q^2 values for the original model.

2.3 代谢物的鉴定与分类

对试验样本的代谢物进行结构鉴定，共得到 1 135 种代谢物，包含氨基酸及其衍生物、有机酸及其衍生物、核苷酸及其代谢物、甘油磷脂类、碳水化合物及其代谢物、杂环化合物、苯及衍生物、醇和胺类、脂肪酰类、辅酶和维生素、激素及激素相关物质及胆汁酸 12 大类活性物质（表 2）。其中，代谢物种类最多的为氨基酸及其衍生物，有 436 种，占代谢物总数的 38.4%，其次为有机酸及其衍生物和核苷酸及其代谢物，分别占代谢物总数的 12.4% 和 10.7%；甘油磷脂类、碳水化合物及其代谢物、杂环化合物和苯及衍生物的数量占代谢物总

数的 5~7%；而醇和胺类、脂肪酰类、辅酶和维生素、激素及激素相关物质和胆汁酸的数量相对较少，占代谢物总数的 5%以下。

表 2 主要代谢物分类和数量

Table 2 Type and number of major metabolite

分类 Type	数量 Number	所占比例 (%) Percentage
氨基酸及其衍生物 Amino acid and its metabolites	436	38.4
有机酸及其衍生物 Organic acid and its derivatives	141	12.4
核苷酸及其代谢物 Nucleotide and its metabolites	122	10.7
甘油磷脂类 Glycerophospholipids	76	6.6
碳水化合物及其代谢物 Carbohydrates and its metabolites	74	6.5
杂环化合物 Heterocyclic compounds	65	5.7
苯及衍生物 Benzene and substituted derivatives	59	5.1
醇、胺类 Alcohol and amines	53	4.6
脂肪酰类 Fatty Acyls	51	4.4
辅酶和维生素 CoEnzyme and vitamins	24	2.1
激素及激素相关物质 Hormones and hormone related compounds	12	1
胆汁酸 Bile acids	9	0.7

2.4 差异代谢物的鉴定分析

为研究双香豆素处理组与对照组的差异，通过 OPLS-DA 并结合 T 检验，来筛选差异表达的代谢物。选取 $VIP \geq 1$ ，同时满足 $Fold\ change \geq 2$ 或 < 0.5 ， $P < 0.05$ 的特征代谢物，这类代谢物即是双香豆素诱导 SL-221 细胞代谢紊乱和毒性机制的相关标志物。对照组与双香豆素处理组结果相比，共发现 393 种代谢物发生了显著的差异变化 ($P < 0.05$)，其中 364 种代谢物上调，29 种代谢物下调，而 50% 以上的差异代谢物主要分布于氨基酸及其代谢物 (48.3%) 和甘油磷脂类 (14.2%)，剩余的分布在核苷酸及其代谢物、有机酸及其衍生物、碳水化合物及其代谢物等化合物中 (表 3)。图 4 直观地表达了差异代谢物相对含量的变化，选取了 VIP 值排名前 50 的差异代谢物进行展示。与对照相比，表达上调的差异代谢物有 45 种，其中肾上腺甾酮 (Adrenosterone)、LPC(12:0/0:0)、N,N-二环己基碳二亚胺 (N,N-dicyclohexylcarbodiimide) 和 L-缬氨酸-L-脯氨酸 (Val-Pro) 等显著上调了 5 833.56、15.47、10.26 和 9.94 倍；表达下调的有 5 种，其中 DL-肉碱 (DL-Carnitine) 下调最显著，

与对照相比下调了 0.38 倍。

表 3 差异代谢物分类和数量

Table 3 Type and number of differential metabolites

分类 Type	数量 Number	所占比例 (%) Percentage	上调 Up	下调 Down
氨基酸及其代谢物 Amino acid and its metabolites	190	48.3	184	6
甘油磷脂类 Glycerophospholipids	56	14.2	55	6
核苷酸及其代谢物 Nucleotide and its metabolites	40	10.1	36	4
有机酸及其衍生物 Organic acid and its derivatives	22	5.5	19	3
碳水化合物及其代谢物 Carbohydrates and its metabolites	19	4.8	13	3
脂肪酰类 Fatty Acyls	19	4.8	16	2
杂环化合物 Heterocyclic compounds	13	3.3	11	1
醇、胺类 Alcohol and amines	12	3	11	1
苯及其衍生物 Benzene and substituted derivatives	10	2.5	9	1
辅酶和维生素 CoEnzyme and vitamins	5	1.2	4	1
激素及激素相关物质 Hormones and hormone related compounds	4	1.0	4	0
胆汁酸 Bile acids	1	0.2	1	0
色胺、胆碱、色素 Tryptamines,Cholines,Pigments	1	0.2	1	0
其他 Others	1	0.2	1	0



图4 VIP 值排名前 50 的差异代谢物

Fig. 4 VIP values top 50 differential metabolites

注：横坐标为分组，纵坐标为差异代谢物相对含量（原始峰面积）；Con，对照组；DIC，处理组。Note: The abscissa was the group, and the ordinate was the relative content of the differential metabolite (original peak area); Con, control group; DIC, treatment group.

2.5 差异代谢物 KEGG 通路注释

为进一步明确差异代谢物参与的生物过程和涉及的代谢通路，利用 KEGG 数据库对差异代谢物进行代谢通路富集分析，分析计算各个通路代谢物富集度的显著性水平，以 $P <$

0.05 为条件进行筛选。结果显示对照组与双香豆素处理组样品中差异代谢物被注释到 95 条代谢途径上（表 4），主要分布在代谢途径（ko01100）、核苷酸代谢（ko01232）、ABC 转运蛋白途径（ko02010）、辅因子的生物合成（ko01240）、嘌呤代谢（ko00230）、核苷酸和糖的生物合成（ko01250）、氨基糖和核苷酸糖的代谢（ko00520）、氨基酸的生物合成（ko01230）、不饱和脂肪酸的生物合成（ko01040）、淀粉和蔗糖代谢（ko00500）、碳水化合物消化吸收（ko04973）及胰岛素抵抗（ko04931）等途径（表 3）。其中，被 KEGG 注释到的代谢途径（ko01100）下的代谢物数目最多，为 72 个，主要有 6-磷酸山梨糖醇、胞苷 5'-二磷酸、4-羟基-3-甲氧基苯基乙酸、4-胍基丁酸、L-胱氨酸等代谢物；其次为核苷酸代谢途径（ko01232），差异代谢物为 15 个，包括胞苷 5'-二磷酸、鸟苷、黄嘌呤和次黄嘌呤等代谢物；ABC 转运蛋白途径（ko02010），差异代谢物为 14 个，包括 D-(+)-蔗糖、D-海藻糖、肌苷、L-胱氨酸和麦芽糖等代谢物。

表 4 KEGG 各通路差异代谢物统计表

Table 4 Statistical table of differential metabolites by KEGG pathway

信号通路	ko 号	数量	所占比例 (%)
Kegg pathway	Ko ID	Number	Percentage
代谢途径 Metabolic pathways	ko01100	72	82.76
核苷酸代谢途径 Nucleotide metabolism	ko01232	15	17.24
ABC 转运蛋白 ABC transporters	ko02010	14	16.09
辅因子的生物合成 Biosynthesis of cofactors	ko01240	14	16.09
嘌呤代谢 Purine metabolism	ko00230	11	12.64
核苷酸和糖的生物合成 Biosynthesis of nucleotide sugars	ko01250	9	10.34
氨基糖和核苷酸糖的代谢 Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	ko00520	9	10.34
嘧啶代谢 Pyrimidine metabolism	ko00240	8	9.20
氨基酸的生物合成 Biosynthesis of amino acids	ko01230	6	6.90
酪氨酸代谢 Tyrosine metabolism	ko00350	6	6.90
不饱和脂肪酸的生物合成 Biosynthesis of unsaturated fatty acids	ko01040	5	5.75
淀粉和蔗糖代谢 Starch and sucrose metabolism	ko00500	5	5.75
D-氨基酸代谢 D-Amino acid metabolism	ko00470	5	5.75
半胱氨酸和蛋氨酸的代谢 Cysteine and methionine metabolism	ko00270	5	5.75

半乳糖代谢 Galactose metabolism	ko00052	5	5.75
胆汁分泌物 Bile secretion	ko04976	4	4.60
碳水化合物消化吸收 Carbohydrate digestion and absorption	ko04973	4	4.60
糖尿病性心肌病 Diabetic cardiomyopathy	ko05415	3	3.45
癌症中的胆碱代谢 Choline metabolism in cancer	ko05231	3	3.45
胰岛素抵抗 Insulin resistance	ko04931	3	3.45
味觉转导 Taste transduction	ko04742	3	3.45
生热作用 Thermogenesis	ko04714	3	3.45
烟酸盐和烟酰胺代谢 Nicotinate and nicotinamide metabolism	ko00760	3	3.45
亚油酸代谢 Linoleic acid metabolism	ko00591	3	3.45
甘油磷脂代谢 Glycerophospholipid metabolism	ko00564	3	3.45
新霉素、卡那霉素和庆大霉素的生物合成 Neomycin, kanamycin and gentamicin biosynthesis	ko00524	3	3.45
组氨酸代谢 Histidine metabolism	ko00340	3	3.45
赖氨酸降解 Lysine degradation	ko00310	3	3.45
抗坏血酸和醛代谢 Ascorbate and aldarate metabolism	ko00053	3	3.45
戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化 Pentose and glucuronate interconversions	ko00040	3	3.45
癌症中心碳代谢 Central carbon metabolism in cancer	ko05230	2	2.30
蛋白质消化吸收 Protein digestion and absorption	ko04974	2	2.30
唾液分泌物 Salivary secretion	ko04970	2	2.30
肾素分泌 Renin secretion	ko04924	2	2.30
脂肪细胞脂肪分解的调节 Regulation of lipolysis in adipocytes	ko04923	2	2.30
催乳素信号通路 Prolactin signaling pathway	ko04917	2	2.30
多巴胺能神经突触 Dopaminergic synapse	ko04728	2	2.30
缝隙链接 Gap junction	ko04540	2	2.30
血管平滑肌收缩 Vascular smooth muscle contraction	ko04270	2	2.30
铁死亡 Ferroptosis	ko04216	2	2.30
神经活性配体-受体相互作用 Neuroactive ligand-receptor interaction	ko04080	2	2.30
硫代谢 Sulfur metabolism	ko00920	2	2.30
维生素 B6 新陈代谢 Vitamin B6 metabolism	ko00750	2	2.30

脂质代谢 Ether lipid metabolism	ko00565	2	2.30
磷酸肌醇代谢 Inositol phosphate metabolism	ko00562	2	2.30
磷酸生物合成 Teichoic acid biosynthesis	ko00552	2	2.30
牛磺酸和低牛磺酸的代谢 Taurine and hypotaurine metabolism	ko00430	2	2.30
苯丙氨酸, 酪氨酸和色氨酸的生物合成 Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	ko00400	2	2.30
苯丙氨酸代谢 Phenylalanine metabolism	ko00360	2	2.30
咖啡因代谢 Caffeine metabolism	ko00232	2	2.30
果糖和甘露糖代谢 Fructose and mannose metabolism	ko00051	2	2.30
化学致癌作用-受体激活 Chemical carcinogenesis-receptor activation	ko05207	1	1.15
酒精中毒 Alcoholism	ko05034	1	1.15
苯丙胺类成瘾 Amphetamine addiction	ko05031	1	1.15
可卡因成瘾 Cocaine addiction	ko05030	1	1.15
帕金森氏症 Parkinson disease	ko05012	1	1.15
维生素的消化和吸收 Vitamin digestion and absorption	ko04977	1	1.15
近端小管碳酸氢盐回收 Proximal tubule bicarbonate reclamation	ko04964	1	1.15
醛固酮的合成与分泌 Aldosterone synthesis and secretion	ko04925	1	1.15
胰高血糖素信号通路 Glucagon signaling pathway	ko04922	1	1.15
催产素信号通路 Oxytocin signaling pathway	ko04921	1	1.15
甲状腺激素合成 Thyroid hormone synthesis	ko04918	1	1.15
胰岛素分泌 Insulin secretion	ko04911	1	1.15
光转导 Phototransduction	ko04744	1	1.15
嗅觉转导 Olfactory transduction	ko04740	1	1.15
长期抑郁症 Long-term depression	ko04730	1	1.15
GABA 能突触 GABA ergic synapse	ko04727	1	1.15
突触囊泡周期 Synaptic vesicle cycle	ko04721	1	1.15
昼夜节律运动 Circadian entrainment	ko04713	1	1.15
血小板活化 Platelet activation	ko04611	1	1.15
心肌细胞肾上腺素能信号传导 Adrenergic signaling in cardiomyocytes	ko04261	1	1.15
溶酶体 Lysosome	ko04142	1	1.15

HIF-1 信号通路 HIF-1 signaling pathway	ko04066	1	1.15
cAMP 信号通路 cAMP signaling pathway	ko04024	1	1.15
CGMP-PKG 信号通路 cGMP-PKG signaling pathway	ko04022	1	1.15
2-氧羧酸代谢 2-Oxocarboxylic acid metabolism	ko01210	1	1.15
碳代谢 Carbon metabolism	ko01200	1	1.15
叶酸生物合成 Folate biosynthesis	ko00790	1	1.15
核黄素代谢 Riboflavin metabolism	ko00740	1	1.15
硫胺素代谢 Thiamine metabolism	ko00730	1	1.15
C5-支链二元酸代谢 C5-Branched dibasic acid metabolism	ko00660	1	1.15
丁酸代谢 Butanoate metabolism	ko00650	1	1.15
乙醛酸和二羧酸代谢 Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	ko00630	1	1.15
甘油酯代谢 Glycerolipid metabolism	ko00561	1	1.15
谷胱甘肽代谢 Glutathione metabolism	ko00480	1	1.15
B-丙氨酸代谢 Beta-Alanine metabolism	ko00410	1	1.15
色氨酸代谢 Tryptophan metabolism	ko00380	1	1.15
精氨酸和脯氨酸代谢 Arginine and proline metabolism	ko00330	1	1.15
赖氨酸生物合成 Lysine biosynthesis	ko00300	1	1.15
单细菌素生物合成 Monobactam biosynthesis	ko00261	1	1.15
甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢 Glycine, serine and threonine metabolism	ko00260	1	1.15
丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢 Alanine, aspartate and glutamate metabolism	ko00250	1	1.15
精氨酸生物合成 Arginine biosynthesis	ko00220	1	1.15
类固醇激素生物合成 Steroid hormone biosynthesis	ko00140	1	1.15
柠檬酸循环 (TCA 循环) Citrate cycle (TCA cycle)	ko00020	1	1.15

3 结论与讨论

双香豆素作为自然界中一类重要的天然有机化合物，因具有 2H-1-苯并吡喃-2-酮结构而具备多种生物活性（王晴等，2005）。本团队前期研究发现，双香豆素通过抑制营养信号途径（PI3K/mTOR）诱导 SL-221 细胞程序性死亡（秦子昕等，2023），该信号通路的起始元件为胰岛素受体（Insulin receptor, InR）。InR 属于营养信号通路中起关键作用的跨膜蛋白受体，广泛分布于动物组织和细胞中，且在生物体内高度保守，可调控机体的生长发育、细

胞增殖、细胞凋亡、神经元活动等多种生物学反应 (Wallace, 2005)。胰岛素是控制关键能量功能 (如糖脂代谢) 的主要激素, 当胰岛素与受体 InR 结合后, 引起 α 亚单位构象改变, 与 β 亚单位的胞内结构域结合, 激活胞内酪氨酸激酶, 促使胰岛素受体发生自磷酸化, 激活胰岛素信号通路的重要因子, 进而影响细胞增殖和凋亡。本研究利用胰岛素与双香豆素共培养 SL-221 细胞 24 h, 发现胰岛素可显著提升双香豆素抑制下的 SL-221 细胞活力, 主要通过胰岛素发生竞争, 阻止与胰岛素受体的正常结合, 从而干扰营养途径, 进一步影响下游底物的活性, 最终抑制其细胞增殖。

Akt 信号途径是胰岛素的主要下游信号通路, 参与细胞增殖、凋亡和葡萄糖代谢等多个生物学过程, 胰岛素可激活 Akt 信号途径, 即激活 Akt 磷酸化可促进细胞增殖, 反之则抑制细胞增殖 (雍芳等, 2022)。针对 Akt 的研究通常会引入其磷酸化激活剂, 如 SC 79, 它能够与 Akt 的 PH 结构域结合而增强 Akt 信号传导, 对细胞具有一定的保护作用 (Jo *et al.*, 2012)。朱建良研究发现 SC 79 可激活 Akt, 并且显著抑制 MPP⁺和鱼藤酮诱导的 SH-SY5Y 细胞活力降低和细胞死亡 (朱建良, 2020)。宋建治等 (2022) 研究证明 SC 79 可以增强细胞活性和抑制细胞凋亡, 从而进一步抑制地塞米松诱导的成骨细胞凋亡和程序性坏死。为检测双香豆素是否通过激活 Akt 磷酸化而抑制细胞增殖, 本研究也使用 SC 79 与双香豆素共培养 SL-221 细胞 24 h 后, 发现 SC 79 可显著提升双香豆素抑制下的 SL-221 细胞活力, 这与前人研究结果相似。综上, 双香豆素可通过胰岛素信号通路抑制 Akt 磷酸化, 从而干扰细胞增殖。

代谢组结果发现经双香豆素处理后, SL-221 细胞体内共有 393 种代谢物发生了差异变化, 其中氨基酸及其衍生物、脂类、糖类及碳水化合物等营养代谢产物显著上调, 这与双香豆素竞争胰岛素受体抑制 Akt 磷酸化息息相关, 因为竞争胰岛素受体, 会促使该受体通过负反馈而表达上调, 激活其免疫系统使体内营养物质在短期内贮存增加 (雍芳等, 2022)。这与前人的研究结果相似, 如王珂欣等 (2017) 通过代谢组分析发现苦参碱能显著调节细胞内外亮氨酸、缬氨酸、甘氨酸等差异代谢物, 对 SMMC-7721 细胞的氨基酸代谢起到一定的上调作用; 周游 (2020) 发现印楝素对桔小实蝇幼虫体内的氨基酸代谢、碳水化合物代谢、核苷酸代谢、脂肪酸代谢以及维生素与辅因子代谢途径均有显著影响。

综上所述, 本文通过 CCK-8 和代谢组学技术解析了双香豆素通过 InR/Akt 信号通路干扰细胞代谢途径 (核苷酸代谢、嘌呤代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢), 抑制 SL-221 细胞增殖。

参考文献 (References)

- Dai XD, Zhai Q. Control effects of four insecticides on *Spodoptera exigua*, *Spodoptera litura* [J]. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 2023, 29 (2): 109-112. [戴旭东, 翟勤. 4种杀虫剂对花椰菜甜菜夜蛾和斜纹夜蛾的防治效果 [J]. 安徽农学通报, 2023, 29 (2): 109-112]
- Fan JW, Li WZ, Liang H, *et al.* Antimicrobial activity of dicoumarins natural product derivatives against three cotton pathogens [J]. *Journal of Xinjiang Agricultural University*, 2021, 44 (6): 429-435. [范继文, 李维政, 梁赫, 等. 双香豆素类天然产物衍生物对3种棉花病原菌的抑菌活性 [J]. 新疆农业大学学报, 2021, 44 (6): 429-435]
- Guan SX, Lin XC, Du Y. Determination of vanillin, methyl vanillin, ethyl vanillin and coumarin in food by high performance liquid chromatography [J]. *Food Safety Guide*, 2022, 20: 71-73, 77. [管淑霞, 林新传, 都颖. 高效液相色谱法测定食品中香兰素、甲基香兰素、乙基香兰素以及香豆素的研究 [J]. 食品安全导刊, 2022, 20: 71-73, 77]
- Hao HW, Chen YQ, He J, *et al.* Identification of lipid components in *ganoderma lucidum* by ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem quaternary mass spectrometry [J]. *Mycosystema*, 2023, 42 (5): 1175-1184. [郝宏伟, 陈意琪, 何姣, 等. 超高效液相色谱-电喷雾串联四级杆质谱鉴定灵芝中脂质成分 [J]. 菌物学报, 2023, 42 (5): 1175-1184]
- Huang JH, Zhang MQ, Feng QL, *et al.* Comparison of olfactory and gustatory genes between *Spodoptera frugiperda* and *Spodoptera litura* [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2019, 41 (5): 937-946. [黄钧鸿, 张铭淇, 冯启理, 等. 草地贪夜蛾与斜纹夜蛾嗅觉味觉相关基因的比较分析 [J]. 环境昆虫学报, 2019, 41 (5): 937-946]
- Jo H, Mondal S, Tan D, *et al.* Small molecule-induced cytosolic activation of protein kinase Akt rescues ischemia-elicited neuronal death [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109 (26): 10581-10586.
- Li Y, Chen XB. Application of coumarin compounds [J]. *Beijing Agriculture*, 2013, 30: 14-15. [李艳, 陈新兵. 香豆素类化合物的应用 [J]. 北京农业, 2013, 30: 14-15]
- Monika H, Slavka HA, Eva K, *et al.* Synthesis of new biscoumarin derivatives, in vitro cholinesterase inhibition, molecular modelling and antiproliferative effect in A549 human lung carcinoma cells [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22 (8): 3830.
- Peng XM, Wang JH, He YJ, *et al.* Research progress on antimicrobial activity of coumarins heterocyclic compounds [J]. *Chemical Reagents*, 2023, 45 (2): 11-21. [彭莘媚, 王江河, 贺银菊, 等. 香豆素类杂环化合物的抗微生物活性研究进展 [J]. 化学试剂, 2023, 45 (2): 11-21]
- Qin ZX, Shao XH, Liang H, *et al.* Mechanism of dicoumarin-induced programmed death of ovarian cells in *Spodoptera litura* [J]. *Plant Protection*, 2023, 49 (1): 96-107. [秦子昕, 邵雪花, 梁赫, 等. 双香豆素诱导斜纹夜蛾卵巢细胞程序性死亡的机理研究 [J]. 植物保护, 2023, 49 (1): 96-107]
- Renal MKA, Safa SB, El-metwally SA, *et al.* Synthesis and antimicrobial activity of some new coumarin and dicoumarol derivatives [J]. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 2020, 57 (3): 1368-1378.

- Sang S, Wang Z, Qi JW, *et al.* Research progress on drug resistance of *Spodoptera litura* [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2013, 35 (6): 808-814. [桑松, 王政, 齐江卫, 等. 斜纹夜蛾抗药性研究进展 [J]. 环境昆虫学报, 2013, 35 (6): 808-814]
- Sheng HJ, Lu SW, Zhen XA, *et al.* Identification and comparative analysis of metabolites in grape seeds based on broadly targeted metabolomics [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2023, 56 (7): 1359-1376. [生弘杰, 卢素文, 郑暄昂, 等. 基于广泛靶向代谢组学的葡萄种子代谢物鉴定与比较分析 [J]. 中国农业科学, 2023, 56 (7): 1359-1376]
- Song JZ, Xu LS, Zhang C, *et al.* Mechanism of Akt activator SC79 in inhibiting dexamethasone-induced apoptosis and programmed necrosis in osteoblasts [J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2022, 26 (29): 4699-4703. [宋建治, 徐礼森, 张晨, 等. Akt 激活剂 SC79 抑制地塞米松诱导成骨细胞凋亡和程序性坏死的作用机制 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26 (29): 4699-4703]
- Tong H, Su Q, Zhou XM, *et al.* Field resistance of *Spodoptera litura* to organophosphates, pyrethroids, carbamates and four newer chemistry insecticides in Hunan, China [J]. *Journal of Pest Science*, 2013, 86 (3): 599-609.
- Wallace DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: A dawn for evolutionary medicine [J]. *Annual Review of Genetics*, 2005, 39 (1): 359-407.
- Wang HY, Su MY, Zhu CH. Research progress on the synthesis of coumarins [J]. *Chemical Research and Application*, 2023, 35 (1): 28-38. [王慧彦, 苏梦洋, 朱陈浩. 香豆素类化合物合成研究进展 [J]. 化学研究与应用, 2023, 35 (1): 28-38]
- Wang KX, Gao L, Zhou YZ, *et al.* 1H-NMR metabolomics study of matrine against hepatocellular carcinoma cell proliferation [J]. *Chinese Herbal Medicine*, 2017, 48 (20): 4275-4283. [王珂欣, 高丽, 周玉枝, 等. 苦参碱抗肝癌细胞增殖的 1H-NMR 代谢组学研究 [J]. 中草药, 2017, 48 (20): 4275-4283]
- Wang Q, Cheng ST, Chen J. Role of dicoumarin in HBx-mediated growth and proliferation of hepatocellular carcinoma cells and its mechanism [J]. *Chinese Journal of Cell Biol*, 2021, 43 (5): 991-1002. [王晴, 程胜桃, 陈娟. 双香豆素在 HBx 介导的肝癌细胞生长增殖中的作用及其机制研究 [J]. 中国细胞生物学学报, 2021, 43 (5): 991-1002]
- Wang RX, Song J, Sun B, *et al.* Research progress on the function and biosynthesis of coumarin compounds [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 42 (12): 79-90. [王荣香, 宋佳, 孙博, 等. 香豆素类化合物功能及生物合成研究进展 [J]. 中国生物工程杂志, 2022, 42 (12): 79-90]
- Wei J, Feng YP, Zheng Q, *et al.* Screening of antitumor activity of dicoumarin in vitro and a preliminary study on its mechanism [J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2020, 55 (12): 2904-2910. [魏静, 冯跃平, 郑茜, 等. 双香豆素体外抗肿瘤活性筛选及相关机制初探 [J]. 药学报, 2020, 55 (12): 2904-2910]
- Xu ZS, Xue Y, Zhang L, *et al.* Screening of isaria isolates for controlling the pupae and second-instar larvae of *Spodoptera litura* [J]. *Plant Protection*, 2020, 46 (5): 93-101.
- Yang LJ, Ding C, Gao C, *et al.* Biological activity of dicoumarin derivatives [J]. *Foreign Medicine (Antibiotic Volume)*, 2019, 40(1):

- 56-64. [杨丽君, 丁超, 高川, 等. 双香豆素衍生物的生物活性 [J]. 国外医药(抗生素分册), 2019, 40 (1): 56-64]
- Yang XY. Synthesis of Coumarins and Their Antibacterial and Antioxidant Activities [D]. ShanXi: Northwest A&F University, 2022. [杨雪怡. 香豆素类化合物的合成及其抗菌和抗氧化活性研究 [D]. 陕西:西北农林科技大学, 2022]
- Ye CL, Chen JC, Wu H, *et al.* Research progress on anti-inflammatory activity of coumarin [J]. *Modern Medicine and Health*, 2022, 38 (23): 4063-4065, 4069. [叶称连, 陈进聪, 吴龙火, 等. 香豆素抗炎活性的研究进展 [J]. 现代医药卫生, 2022, 38 (23): 4063-4065, 4069]
- Yong F, Yan ML, Zhao SQ, *et al.* Functional research progress of fibroblast growth factor 21 [J]. *Chemistry of Life*, 2022, 42 (3): 513-521. [雍芳, 闫美淋, 赵淑琴, 等. 成纤维细胞生长因子 21 的功能研究进展 [J]. 生命的化学, 2022, 42 (3): 513-521]
- Zhang JM, Zhang PJ, Huang F, *et al.* Susceptibility of *Spodoptera liturae* to several types of insecticides in Zhejiang vegetable area [J]. *Journal of Zhejiang Agricultural Sciences*, 2014, 26 (1): 110-116. [章金明, 张蓬军, 黄芳, 等. 浙江菜区斜纹夜蛾对几类杀虫剂的敏感性 [J]. 浙江农业学报, 2014, 26 (1): 110-116]
- Zhang T, Li H, Yu H, *et al.* Synthesis of novel dicoumarin compounds [J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2012, 39 (18): 47-48. [张韬, 李洪启, 于辉, 等. 新型双香豆素化合物的合成 [J]. 广东化工, 2012, 39 (18): 47-48]
- Zhou Y. Metabolomic Study of Azadirachtin on Larvae of Fruit Fly Orange [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2020. [周游. 印楝素对桔小实蝇幼虫的代谢组学研究 [D]. 广州: 华南农业大学, 2020]
- Zhou YQ. Synthesis and Properties of Novel Coumarins [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2017. [周元清. 新型香豆素类化合物的合成与性质研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2017]
- Zhu JL. Mechanism of Inhibition of MPP⁺ and Rotenone-Induced Oxidative Damage in Dopaminergic Neurons by Novel Akt Activator SC79 [D]. Suzhou: Soochow University, 2020. [朱建良. 新型 Akt 激活剂 SC79 抑制 MPP⁺和鱼藤酮诱导的多巴胺能神经元氧化损伤的机制研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2020]