

• 综述 •

鬼臼毒素的生物合成及药理活性研究进展

蒲香谷, 江丽洁, 陈籽亦, 刘巨钊*, 崔琦* (浙江中医药大学, 杭州 310053)

摘要: 鬼臼毒素是来源于鬼臼属植物的芳基萜类木脂素化合物, 是鬼臼属植物的次级代谢产物, 同时也是植物来源的药用天然产物, 具有广谱抗肿瘤活性, 目前对鬼臼毒素的相关研究较少。中国是鬼臼属植物的多样性中心和分布中心, 为保护其现有资源, 鬼臼毒素的生物合成特别是合成生物学研究逐渐成为当今研究的新方向。鬼臼毒素及其类似物具有强烈细胞毒性, 对多种肿瘤细胞、病毒、细菌的增殖均有良好的抑制效果, 广泛应用于各类肿瘤的临床治疗。本文对鬼臼属植物在中国的植物分布进行归纳总结, 对鬼臼毒素的生物合成步骤、应用及生物学研究进行综述, 同时概述了鬼臼毒素的药理活性, 以期对鬼臼资源的应用、鬼臼毒素的合成、鬼臼类药物的开发提供参考。

关键词: 鬼臼毒素; 鬼臼属植物; 生物合成; 抗肿瘤

中图分类号: R914.4 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2024)11-1557-11

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20231335

引用本文: 蒲香谷, 江丽洁, 陈籽亦, 等. 鬼臼毒素的生物合成及药理活性研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2024, 41(11): 1557-1567.

Research Progress on Biosynthesis and Pharmacological Activity of Podophyllotoxin

PU Xianggu, JIANG Lijie, CHEN Ziyi, LIU Juzhao*, CUI Qi* (Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: Podophyllotoxin is an aryl naphthalene lignan-like secondary metabolite, which is widely existed in plants of the *Podophyllum*. It exhibits a broad spectrum of antitumor activity and holds significant clinical value as a medicinal natural product of plant origin. This review discusses podophyllotoxin from three aspects: plant distribution, biosynthesis and pharmacological effects. Distribution of podophyllotoxin in nature: Podophyllotoxin and its analogues are mainly found in 12 genera of three families, which are Berberidaceae, Linaceae and Cupressaceae, respectively. They are mostly distributed in East Asia and North America, especially in China, which is not only the diversity center of the *Podophyllum*, but also the distribution center. Among all these plants, the genera *Dysosma* and *Sinopodophyllum* are the focus of the relevant research. Biosynthesis of podophyllotoxin: In order to take the alleviation of the pressure of podophyllotoxin that is in short supply of natural resources, and to protect its existing resources, the biosynthesis of podophyllotoxin, especially synthetic biology, has gradually become a new direction of current research. Compared with chemical synthesis which has the shortcoming of low synthesis efficiency, high production cost and cumbersome steps, biosynthesis has a variety of advantages. It's not limited by resources, easy to cultivate on a large scale and has fast production speed, low production cost and simple genetic manipulation, so there is a broader prospect for the exact purpose of biosynthetic development. The biosynthesis of podophyllotoxin is divided into four steps in general, including the synthesis of coniferyl alcohol, the synthesis of matairesinol, the synthesis of deoxypodophyllotoxin and the synthesis of podophyllotoxin. It requires various enzymes catalyzed during the synthesis process, such as pinoreisnol-lariciresinol reductase(PLR), secoisolariciresinol dehydrogenase(SDH) and others. At present, by means of synthetic biology, heterologous production of natural drugs in microbial cell factories, the synthesis of the intermediate coniferyl alcohol has been achieved in *Escherichia coli* with an increased yield of $(124.9 \pm 5.1) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, and the concentration of (-)-pluviatolide was elevated to $137 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. In addition, *p*-coumaric acid in *Saccharomyces cerevisiae* was obtained to $71.71 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, and in a tobacco plant production chassis, highly purified (-)-deoxypodophyllotoxin was increased to $0.71 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (dry weight) after chromatographic separation. Overall, the utilization of biosynthesis can significantly increase the yield of podophyllotoxin and improve the research and production efficiency of anti-tumor drugs greatly, which brings a more effective strategy for the treatment of related diseases. The pharmacological activity of podophyllotoxin: Podophyllotoxin and its analogues have strong cytotoxicity and they exert good inhibitory effects on the proliferation of multifarious tumor cells, viruses and bacteria. So they are widely applied to the clinical treatment of various types of

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82204552); 中国博士后科学基金项目 (2021M692893, 2021M702927); 浙江省自然科学基金项目 (LQ24H280009); 浙江省中医药科技计划项目 (2023ZR087)

作者简介: 蒲香谷, 女 E-mail: 859124466@qq.com *通信作者: 刘巨钊, 男, 博士, 副研究员 E-mail: zcmujzliu@163.com 崔琦, 女, 博士, 助理研究员 E-mail: zcmucq@163.com

tumors, such as colorectal cancer, lung cancer, cervical cancer, hemangioma, breast cancer, esophageal cancer, etc. The molecular mechanism of its cancer treatment is mainly in the G₁, G₂/M to block the cell cycle to make drugs work. Meanwhile, podophyllotoxin has relatively significant toxic side effects and drawbacks that can't be ignored as a drug with superior therapeutic effect on specific diseases, which tends to increase the risk of bone marrow suppression, chromosomal aberrations and so forth. In conclusion, this literature sums up the distribution of podophyll plants in China, making review of the biosynthetic steps, applications, and biological research of podophyllotoxin, and outlines the pharmacological activity of podophyllotoxin. It aims to set the foundation for the reasonable application of podophyllotoxin resources, the efficient synthesis of podophyllotoxin, and the development of *Podophyllum* drugs which are highly effective and low toxic. At the same time, this paper gives full play to the clinical medicinal value of podophyllotoxin, which has important influence and far-reaching significance in the treatment of malignant diseases, and promotes the modernization of traditional Chinese medicine.

KEYWORDS: podophyllotoxin; *Podophyllum* plant; biosynthesis; antitumor

鬼臼毒素 (podophyllotoxin), 化学名为 5R-5,8,8a,9-四氢-9-羟-5-(3,4,5-三甲氧苯基) 呋喃 (3',4':6,7) 萘并-[2,3-d]-1,3-间二氧杂环烯-6(5aH)-酮, 化学结构式见图 1, 是一种分布极其广泛的天然木脂素类化合物, 多存在于小檗科鬼臼属、桃儿七属、山荷叶属及北美桃儿七属植物中^[1]。1880 年科学家首次分离出鬼臼毒素, 并在 1951 年确定了结构式, 随后科研人员不断对其进行研究, 20 世纪末至 21 世纪初期, 逐步确定了鬼臼毒素的生物合成途径, 植物体外自源合成受到了广泛关注^[2], 而随着 21 世纪合成生物学的发展应用, 细胞工厂实现了鬼臼毒素的异源合成。2017 年首次在大肠杆菌中设计了松柏醇人工合成途径, 2019 年在烟草植物中实现了 (-)-去氧鬼臼毒素毫克级合成^[3], 为解决鬼臼类植物资源短缺、合成效率低的问题提供了科学方法。鬼臼毒素及其类似物具有抗肿瘤、抗病毒、抑菌等活性, 其中抗肿瘤作用最显著, 目前鬼臼毒素化学半合成衍生物依托泊苷和替尼泊苷已应用于多种肿瘤的临床治疗, 取得了较好的成效。鬼臼毒素临床价值突出, 而中国作为鬼臼亚科植物多样性中心和分布中心, 鬼臼资源极具开发潜力, 因此本文将从鬼臼毒素及其类

似物的植物分布、生物合成以及药理活性 3 个方面进行综述, 以期对鬼臼资源的合理开发、鬼臼毒素的临床应用提供参考。

1 鬼臼类植物的分布

鬼臼, 味辛温, 具有悠久的药用历史, 最早见于《神农本草经》: 一名爵犀, 一名马目毒公, 一名鬼臼, 杀蛊毒鬼注, 精物, 辟恶气不祥, 逐邪, 解百毒^[4]。研究显示小檗科 (Berberidaceae) 是目前已知唯一含有鬼臼毒素及其类似物的植物类群, 含四属为鬼臼属 (*Dysosma*)、桃儿七属 (*Sinopodophyllum*)、山荷叶属 (*Diphylleia*)、北美桃儿七属 (*Podophyllum*)^[1], 另有研究报道少量见于其他属, 如亚麻科亚麻属 (*Linum*), 柏科刺柏属 (*Juniperus*)、崖柏属 (*Thuja*)、澳柏属 (*Callitris*), 唇形科山香属 (*Mesosphaerum*)、百里香属 (*Thymus*)、香科科属 (*Teucrium*)、荆芥属 (*Nepeta*) 等^[5-7]。

鬼臼属分布于中国南方地区, 为中国特有属, 其中除八角莲 (*Dysosma versipellis*) 为广布种外, 其余均为地方特有种。八角莲的分布最西从喜马拉雅东起, 为西藏八角莲 (*Dysosma tsayuensis*), 最东部至中国东南地区与中国台湾, 为六角莲 (*Dysosma pleiantha*), 中间从云贵高原东部至三峡地区间断分布八角莲属植物的不同分化种类^[8]。桃儿七属仅包括桃儿七 (*Sinopodophyllum hexandrum*), 又称大黄鬼臼, 主要分布于中国西南部 (云南、四川) 和西北部 (陕西、甘肃) 以及喜马拉雅地区 (西藏)^[9]。山荷叶属包括北美东南部的伞花山荷叶 (*Diphylleia cymosa*)、日本的日本山荷叶 (*Diphylleia grayi*) 和中国的南方山荷叶 (*Diphylleia sinensis*) 3 个种^[10], 南方山荷叶分布于中国湖北、山西、四川等中西部地区^[11]。北美桃儿七属仅包括北美桃儿七 (*Podophyllum peltatum*), 分布于北美东部。鬼臼毒素及其类似物的植物分布见表 1。

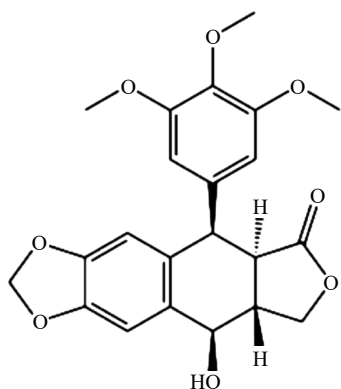


图 1 鬼臼毒素的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of podophyllotoxin

表 1 鬼臼毒素及其类似物的植物分布

Tab. 1 Plant distribution of podophyllotoxin and its analogues

科属	植物种类	材料来源	植物分布	参考文献
小檗科北美桃儿七属	<i>P. peltatm</i>	根状茎	北美东部	[12]
小檗科桃儿七属	<i>S. hexandrum</i>	/	中国西部、锡金、尼泊尔、不丹、印度北部、巴基斯坦、阿富汗东部、克什米尔	[13]
小檗科鬼臼属	<i>D. versipellis</i>	根状茎	中国	[12,14]
	<i>D. pleiantha</i>	根状茎	中国台湾、浙江、福建、安徽、江西、湖北、湖南、广东、广西、四川、河南	[12,14]
	<i>D. veitchii</i>	/	中国四川、贵州、云南	[12]
	<i>D. aurantioculis</i>	/	中国云南	[12]
	<i>D. difformis</i>	/	中国四川、贵州、湖北、湖南、广西	[12]
	<i>D. majoense</i>	/	中国华南地区	[12]
小檗科山荷叶属	<i>D. sinensis</i>	/	中国湖北、陕西、甘肃、云南、四川	[15]
柏科刺柏属	<i>J. sabina</i>	针叶	中国西北部、欧洲南部至中亚	[12]
	<i>J. virginina</i>	针叶	北美	[12]
	<i>J. lucayana</i>	针叶	古巴、巴哈马、美国	[12]
	<i>J. silicicola</i>	针叶	美国	[12]

鬼臼属植物多分布于东亚和北美，尤其是中国，为鬼臼属植物分布中心。鬼臼类植物相关研究也以桃儿七属和中国特有种鬼臼属为重点：桃儿七内鬼臼毒素含量高，分布于喜马拉雅地区，有望成为鬼臼毒素及其类似物植物提取的重要来源；鬼臼属分布广泛，不同产地鬼臼属内鬼臼毒素含量不等，平均含量较高，可成为鬼臼毒素及其类似物植物提取的主要来源。对鬼臼属植物分布特点的研究能为鬼臼资源的保护与合理利用带来更多可能性，同时能进一步实现鬼臼属植物的高效提取，缓解鬼臼毒素自然资源紧缺的压力，并为鬼臼毒素的工业化生产提供重要参考。

2 鬼臼毒素的生物合成

一直以来鬼臼毒素的获得主要依赖植物提取，随着鬼臼资源的过度开发，野生鬼臼属植物已成为国家珍稀濒危保护植物^[16]。为保护现有资源，科研人员着手研究鬼臼毒素及其类似物合成方式，来满足人们日益增长的需求。目前化学合成的研究大致可分为 3 种途径： γ 氧酯路线、二羧基羧酸路线和串联共轭加成路线。化学合成克服了从植物中提取鬼臼毒素含量低等困难，突破天然来源的限制，有利于精确分子结构，为后续结构改造和修饰奠定基础，以生产出自然界分离不到的活性类似物^[17]。20 世纪 60 年代，瑞士山道士公司先后半合成了 VP₁₆ 和 VM₂₆，之后又以其为原型合成了一系列新的糖基衍生物，如以 VP₁₆ 为前体合成的 bodipy-etoposide^[18]。但其仍有一定局限性，化学全合成步骤繁琐，且由于鬼臼毒素分子

具有 4 个手性中心，1 个反式内酯环和 C1 位轴向相接的芳基取代基团，反式内酯环极易变成稳定的顺式而生成鬼臼苦素，从而失去活性，使得化学合成效率低下、成本增加，难以实现工业化生产，而化学半合成需要以鬼臼类木脂素作为前体，无法从根本上解决问题，因此需要探索更高效的合成途径。

生物合成由于具有不受资源限制、生产成本低、生产速度快、遗传操作简单、易于大规模培养以及环境友好等优势，逐渐成为鬼臼毒素生产的新方式，并且被更广泛地应用。虽然当前合成生物学研究仍处于比较初级的阶段，存在元件数量少等难题^[19]，但越来越多的科研人员致力于此，取得了较好的进展。近年来，基于生物技术的植物代谢工程快速发展，如植物细胞或器官培养、真菌发酵等方法，为鬼臼毒素创新性开发合成提供全新思路^[20-21]。

2.1 鬼臼毒素的生物合成步骤

鬼臼毒素生物合成步骤见图 2，主要分为 4 步：①松柏醇的合成；②松柏醇合成罗汉松脂酚；③罗汉松脂酚合成去氧鬼臼毒素；④去氧鬼臼毒素合成鬼臼毒素及其类似物^[22]。

2.1.1 合成松柏醇 在植物细胞质内，松柏醇的合成一般由苯丙氨酸 (phenylalanine) 脱氢、羧化获得。而在生物合成中，苯丙氨酸在苯丙氨酸氨基裂合酶 (phenylalanine ammonialyase, PAL) 作用下脱氨基转化为肉桂酸 (cinnamic acid)，再依次由肉桂酸-4-羟化酶 (cinnamic acid 4-hydroxylase, C4H)、

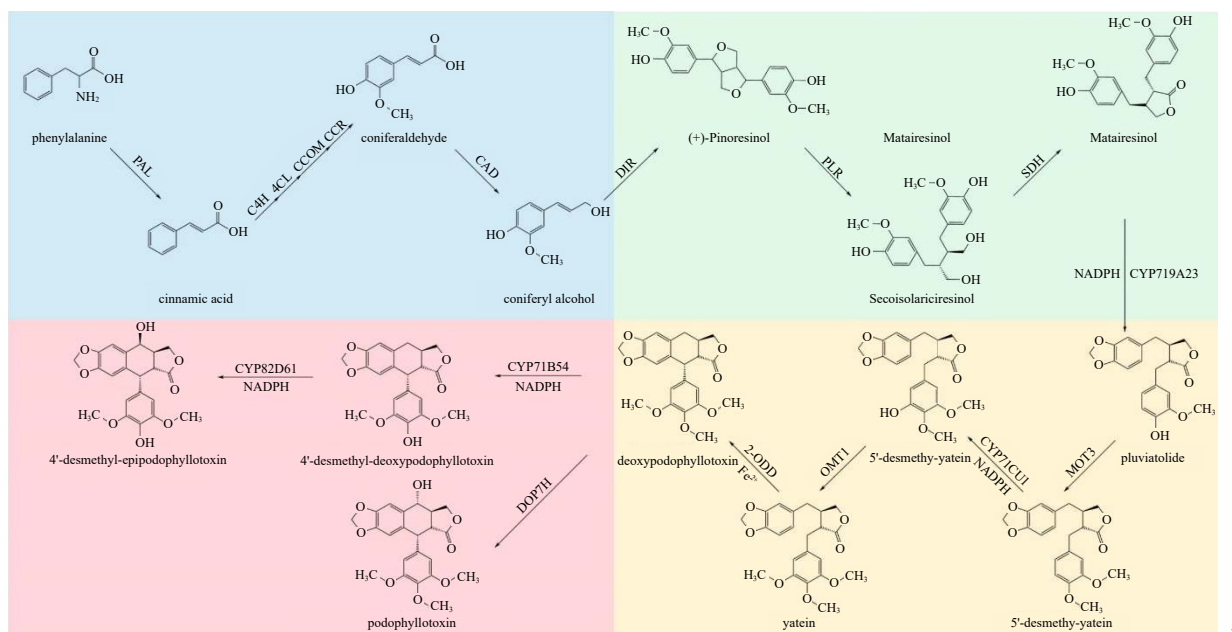


图2 鬼臼毒素的生物合成

Fig. 2 Biosynthesis of podophyllotoxin

香豆酯-4-CoA 连接酶 (4-coumarate CoA ligase, 4CL)、咖啡酰辅酶 A 甲基转移酶 (caffeoyl-CoA O-methyltransferase, CCOM)、肉桂酰辅酶 A 还原酶 (cinnamoyl-CoA reductase, CCR) 等催化转化为松柏醛 (coniferaldehyde), 最后在肉桂醇脱氢酶 (cinnamyl alcohol dehydrogenase, CAD) 的作用下生成松柏醇 (coniferyl alcohol)。

2.1.2 合成罗汉松脂酚 罗汉松脂酚是鬼臼毒素生物合成的关键前体物质, 而控制其合成的关键酶是松脂酚-落叶松脂醇还原酶 (pinoresinol-lariciresinol reductase, PLR) 和开环异落叶松脂醇脱氢酶 (secoisolariciresinol dehydrogenase, SDH)。Dirigent 蛋白 (Dirigent protein, DIR) 催化两分子松柏醇偶联生成 (+)-松脂酚 (pinoresinol), 再由松脂酚-落叶松脂醇还原酶在细胞质中两步还原, 通过 (+)-落叶松脂醇 (lariciresinol) 生成 (-)-开环异落叶松脂醇 (secoisolariciresinol); 继而由开环异落叶松脂醇脱氢酶催化生成 (-)-罗汉松脂酚 (matairesinol)。

2.1.3 合成去氧鬼臼毒素 峨参 (*Anthriscus sylvestris*) 的示踪试验展示罗汉松脂酚生产亚太因的反应过程^[23]: 细胞色素 P450 酶可以催化 (-)-罗汉松脂酚为 (-)-pluviatolide, OMT3 可催化 (-)-pluviatolide 的 C-4'羟基甲基化生成 (-)-5'-去甲氧基

亚太因 (5'-desmethoxy-yatein), CYP71CU1 催化 (-)-5'-去甲氧基亚太因 C-5'羟化生成 (-)-5'-去甲基亚太因 (5'-desmethoxy-yatein), 甲基转移酶 OMT1 进一步催化 C-5'羟基甲基化生成 (-)-亚太因 (yatein)。最后 2-酮戊二酸/Fe(II)-依赖性双加氧酶 Phex30848 (2-ODD) 催化 (-)-亚太因生成去氧鬼臼毒素 (deoxypodophyllotoxin)。

2.1.4 合成鬼臼毒素 科研人员通过对亚麻属植物细胞培养系添加一系列前体物质发现, 去氧鬼臼毒素是鬼臼毒素、6-甲氧基鬼臼毒素 (6-methoxypodophyllotoxin) 和 4'-去甲基表鬼臼毒素 (4'-demethylepipodophyllotoxin) 生物合成的共同前体^[24]。一方面, 去氧鬼臼毒素可以在 7-羟基酶 (deoxypodophyllotoxin 7-hydroxylase, DOP7H) 的作用下生成鬼臼毒素; 另一方面, CYP71BE54 能够催化 (-)-去氧鬼臼毒素, 合成 (-)-4'-去甲基去氧鬼臼毒素, CYP82D61 能够催化 (-)-4'-去甲基去氧鬼臼毒素生成 (-)-4'-去甲基表鬼臼毒素。

2.2 合成生物学手段合成鬼臼毒素

研究发现, 从鬼臼类植物桃儿七的根中提取得到的鬼臼毒素有效成分含量占到植物干重的 4.3%; 通过 MS 培养基对桃儿七细胞组织进行培养, 当培养基中含有氮素 60 mmol、磷酸盐 1.25 mmol、葡萄糖 60 g·L⁻¹ 时, 鬼臼毒素的积累

量可高达 $5.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ；通过生物转化法可使鬼臼毒素产量增至 $130 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ [2]。鬼臼毒素是鬼臼属植物的次级代谢产物，上述基于自身植物的生产方法各具利弊，但都存在植物中含量低的问题，因此科研人员不断探索新的生产方法来提高其产量，为新药研发提供前体物质。合成生物学，即利用微生物细胞工厂异源生产天然药物，已成为当今的热点领域，被认为是解决天然药物资源稀缺问题的可行方法 [25]。利用合成生物学已实现了在烟草中合成 (-)-去氧鬼臼毒素以及在大肠杆菌和酵母中合成鬼臼毒素中间物，合成途径见图 3。

2.2.1 在大肠杆菌中合成 Kuo 等 [26] 为了提高松脂酚直接生成 (-)-罗汉松脂酚的转化率，减少中间产物 (-)-开环异落叶松脂醇对转化率的影响，从而提高终产物鬼臼毒素的合成效率，建立了高效的松脂酚生成 (-)-罗汉松脂酚生物转化体系，克隆了 PLR 和 SDH 的编码基因。体外生物转化结果表明，融合蛋白 PLR-SDH 的转化效率 (49.8%) 高于单独表达 PLR 和 SDH 的转化效率 (17.7%)，然而融合蛋白 SDH-PLR 转化时只形成中间产物 (-)-开环异落叶松脂醇；体内生物转化结果表明，含有 PLR-SDH 的重组大肠杆菌将松脂酚完全转化为 (-)-罗汉松脂酚，且无需辅助因子。苯丙氨酸在细胞

内可进一步转化为酪氨酸，酪氨酸可以转化为对香豆醇 (即对羟基肉桂醇)，再进一步生成鬼臼毒素重要中间产物松柏醇。Chen 等 [27] 选择高效酶构建酪氨酸合成对香豆醇的合成途径，在优化条件下对香豆醇产量可达到 $(501.8 \pm 41.4) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ，并通过引入羟化酶和甲基转移酶，进一步扩展了该途径以生产松柏醇。另外为解决羟化酶混染导致酪氨酸形成不稳定中间产物致使碳源损失这一问题，该项目组设计了微生物共培养以尽量减少 HpaBC 对酪氨酸的影响，最终使松柏醇产量提高至 $(124.9 \pm 5.1) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ，从而使鬼臼毒素的得率增加。Decembrino 等 [28] 设计了一种在大肠杆菌中通过 3 种中间体将松脂酚转化为 (-)-pluviatolide 的生物合成路线。(-)-Pluviatolide 是木脂素生物合成中的重要中间化合物，通过罗汉松脂酚氧化产生，由 CYP719A23 催化，该酶能在大肠杆菌中表达并对氧化还原反应进行优化。连翘松脂醇还原酶 (FiPLR)、足叶草半松脂醇脱氢酶 (PpSDH) 和 CYP719A23 与 NADPH 依赖性还原酶共同表达，以确保 P450 活性，经过 4 次连续且无须中间分离的生物转化，得到 (-)-pluviatolide，其浓度为 $137 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (ee $\geq 99\%$ ，分离收率 76%)。

2.2.2 在酵母中合成 对香豆酸即对羟基肉桂

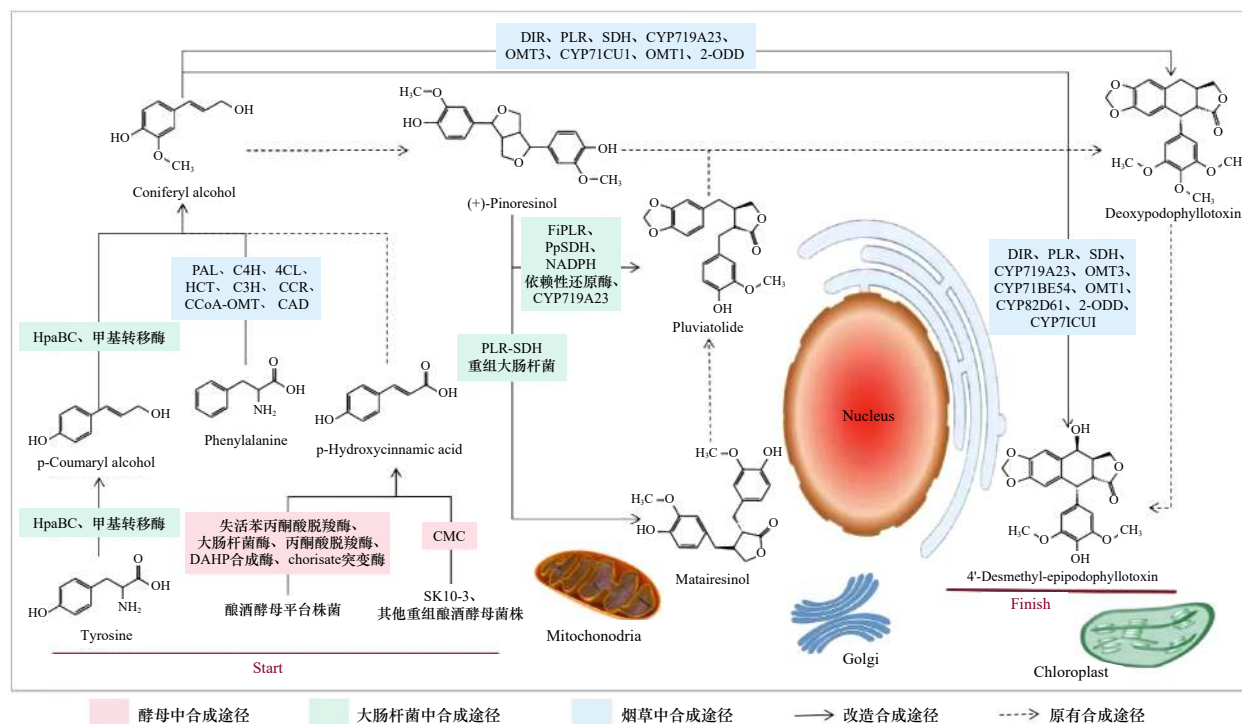


图 3 利用合成生物学手段合成鬼臼毒素的途径

Fig. 3 Synthesis of podophyllotoxin by means of synthetic biology

酸,是松柏醇的生物合成前体^[3]。Rodriguez 等^[29]开发了一株高产对香豆酸的酿酒酵母平台菌株,利用失活苯丙酮酸脱羧酶、丙酮酸脱羧酶减少副产物的形成,再过表达 DAHP 合成酶、chorisate 突变酶以及来自大肠杆菌的酶,最终得到对香豆酸高产的酿酒酵母,最高滴度为 $(1.93\pm0.26)\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,从而进一步提高松柏醇的得率,最终提高鬼臼毒素的合成率。Cai 等^[30]将羧甲基纤维素(carboxymethyl cellulose, CMC)作为唯一碳源,使代谢工程酿酒酵母菌株 SK10-3 与其他重组酿酒酵母菌株共培养,得到 $30\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CMC 培养基中的对香豆酸浓度为 $71.71\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,比单培养时提高 155.9 倍。

2.2.3 在烟草中合成 Lau 等^[31]通过在烟草中共表达的 10 个基因(*DIR*、*PLR*、*SDH*、*CYP719A23*、*OMT3*、*CYP71CUI*、*2-ODD*、*OMT1*、*CYP82D61*、*CYP71BE54*),重建了松柏醇生成(-)-4'-去甲基表鬼臼毒素的途径,首次使烟草中的依托泊苷元的生产成为可能,并且跳过中间几步合成途径直接生成终产物,减少了中间产物对合成效率的影响,有利于得到高产率的 4'-去甲基表鬼臼毒素。Schultz 等^[32]报道了在烟草中以毫克规模生产(-)-去氧鬼臼毒素的途径,通过对松柏醇合成途径和去氧鬼臼毒素合成途径的 16 个基因以及 4'-去甲基表鬼臼毒素合成途径的 *CYP71BE5* 和 *CYP82D61* 的表达,使(-)-去氧鬼臼毒素的积累达到 $4.3\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (干重),并使色谱分离后的高纯度(-)-去氧鬼臼毒素达到 $0.71\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (干重),简化合成步骤,减少中间产物对终产物得率以及纯度的影响,得到高含量高纯度的去氧鬼臼毒素和 4'-去甲基表鬼臼毒素,从而提高鬼臼毒素的得率,证明了毫克级的全生物合成可获得化疗药物依托泊苷的前体。

2.3 鬼臼毒素生物合成的应用

生物合成在天然产物的生成中发挥着越来越重要的作用,研究鬼臼毒素及其类似物的生物合成,极大地提高了抗肿瘤药的研发与生产效率,为疾病治疗带来更有效的策略。Liu 等^[33]设计了一种在催化量的 Au(I) 络合物的活化下构建鬼臼毒素 4-O-糖苷键的高效方法,并基于这一方法实现了临床使用的抗肿瘤试剂依托泊苷和替尼泊苷的简明合成,总产率分别高达 18% 和 9%。另外,通过生物合成途径可不断探索鬼臼毒素衍生物类

的抗肿瘤药,根据疾病的发病机制针对性地研发新药,提升药物筛选效率,为肿瘤的临床治疗提供帮助。

3 鬼臼毒素的生物活性

目前对鬼臼毒素生物活性研究较少,因此本研究主要叙述其在抗肿瘤、抗病毒、杀菌等方面的重要价值,以期后续科研工作者进行研究提供理论基础。通过对鬼臼毒素与去氧鬼臼毒素化学结构式的比较(图 4)可以发现,鬼臼毒素 C16 和 C17 之间为羰基, O1、O3 和 O14 均为环氧基, O30 为羟基,容易形成氢键,增强分子活性;而 O24、O26、O28 为甲氧基,形成氢键的可能性小,不利于鬼臼毒素的活性发挥;另外化合物中的苯环与游离的氨基酸反应会形成 π 键,使化合物活性增强。去氧鬼臼毒素 O30 上的羟基缺失,使其所在苯环与氨基酸结合的可能性更大,化合物活性更好,科研人员对其药理活性的研究较鬼臼毒素更为深入,有更为广阔的发展前景。

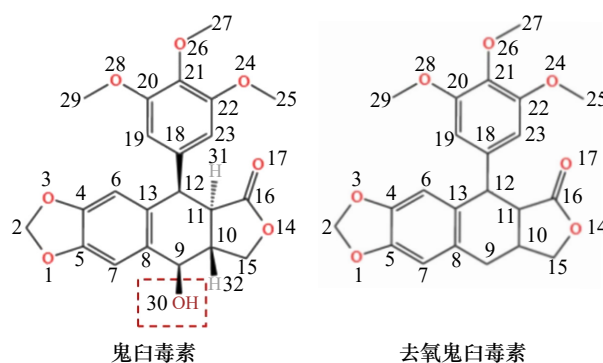


图 4 鬼臼毒素与去氧鬼臼毒素的化学结构式

Fig. 4 Chemical structural formulas of podophyllotoxin and deoxypodophyllotoxin

3.1 抗肿瘤

研究表明,鬼臼毒素的具体作用如下:①阻碍细胞微管的聚合,使染色体无法分离,细胞分裂在中期停止,从而阻止有丝分裂^[34-37];②抑制拓扑异构酶 II 活性,形成稳定的 DNA 拓扑异构酶 II-药物分子复合物,导致 DNA 链断裂,使 DNA 重组异常^[38];③减少细胞对各类核苷如胸腺嘧啶、尿嘧啶、腺嘌呤、鸟嘌呤等的摄取,从而抑制细胞 DNA、RNA 以及蛋白质的合成;④鬼臼毒素有 2 个相连的芳香环,能形成活泼的氧自由基,干扰细胞氧化还原系统^[39]。本研究主要介绍其在结直肠癌、肺癌、宫颈癌、血管瘤、乳腺癌

和食管癌中的作用,具体分子靶点见表2。去氧鬼臼毒素对直肠癌、肺癌、乳腺癌、骨肉瘤、胃癌、前列腺癌、宫颈癌等肿瘤具有生长抑制或细胞毒作用^[40],作用通路见图5。

3.1.1 结直肠癌 结直肠癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一,病死率在中国恶性疾病中居第5位,晚期或复发患者的治疗难度较大,因此研发抗结直肠癌的药物相当重要。鬼臼毒素以浓度依赖性方式抑制结直肠癌细胞系 HCT116 的生长和集落形成,并诱导细胞凋亡。*N*-乙酰-L-半胱氨酸(*N*-acetyl-cysteine, NAC)预处理试验、Western blotting 表明鬼臼毒素能上调丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)的磷酸化水平,同时在 ROS 的介导下诱导 HCT116 细胞凋亡。此外鬼臼毒素能诱导线粒体膜电位的丧失和多胱天蛋白酶的激活。通过 MTT 法、流式细胞术发现鬼臼毒素在 HCT116 细胞系中能诱导细胞凋亡,使细胞周期停滞在 G₁ 期,并且提高 MAPK 的磷酸化水平。综上所述鬼臼毒素通过 ROS 的表达和 p38 MAPK 信号通路的激活诱导细胞 G₁ 期、G₂/M 期阻滞和凋亡^[41-42]。去氧鬼臼毒素由于 O30 上羟基的缺失,活性更好,对结直肠癌细胞 DLD1、Caco2 和 HT29 具有更强的细胞毒活性,对 HCT116 细胞的活性影响值得进一步研究。

3.1.2 肺癌 肺癌是世界上发病率和相关死亡率最高的癌症,其治疗以分子靶向治疗为主。Oh 等^[43]发现鬼臼毒素可直接与细胞间质上皮转换因子(c-MET)相互作用,抑制激酶活性,进一步诱导 HCC827GR 细胞凋亡,但对 EGFR 激酶活性没有显著影响。鬼臼毒素能显著抑制 HCC827GR 细胞的细胞活力,而其处理的 HCC827 细胞的细胞活力>80%。膜联蛋白 V/7-AAD 双染色法表明鬼臼毒素通过下调 Cyclin B1、Cdc2 和上调 p27 剂量依赖性诱导 HCC827GR 细胞 G₂/M 周期阻滞。此外鬼臼毒素处理诱导了 Mcl-1、Survivin 和 Bcl-xl 的 Bad 表达的下调,进而激活了多个 Caspases,同时还诱导了 HCC827GR 细胞 Caspase 依赖性凋亡。研究表明去氧鬼臼毒素能促进人非小细胞肺癌细胞 A549 的凋亡^[44]、抑制 NCIH358 的增殖和体外迁移^[45]等,细胞毒性较鬼臼毒素更为广泛,更具临床研究意义。

3.1.3 宫颈癌 宫颈癌为全球女性第四大肿瘤,

宫颈癌对女性健康的危害及防治是全世界面临的重要公共卫生问题^[46]。Wang 等^[47]研究了鬼臼毒素对人宫颈癌 HeLa 细胞生长的抑制作用和蛋白质表达的变化。蛋白质组学技术发现鬼臼毒素显著调控了 7 种蛋白质,其中下调 CALR、PDIA3、HDGF、RCN1 的表达,上调 NPM1、TPI1、SOD1 的表达。7 种蛋白在凝胶内采用胰蛋白酶消化后,利用基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)进行肽质量指纹识别,其中 PDIA3、HDGF 蛋白在细胞通信和信号转导途径中发挥作用,另外 5 种蛋白参与蛋白质代谢。结果表明鬼臼毒素对肿瘤细胞生长的影响与代谢相关蛋白显著相关,可通过调节功能蛋白表达抑制 HeLa 细胞生长,并诱导细胞凋亡。因此鬼臼毒素同去氧鬼臼毒素一样,是一种潜在的治疗宫颈癌的重要药物。

3.1.4 血管瘤 海绵状血管瘤是一种伴有发育异常的血管畸形,肝海绵状血管瘤(hepatic cavernous hemangioma, HCH)是肝脏常见的良性肿瘤,发生率为 0.4%~20%,占肝良性肿瘤的 70% 左右^[48]。Zhang 等^[49]通过 MTT 法发现鬼臼毒素能抑制 HCEC 活性,并呈剂量依赖性和时间依赖性;通过 TUNEL 法和 DNA ladder 法发现其能诱导 HCEC 凋亡。此外鬼臼毒素对裸鼠血管瘤样肿块的异常血管也有破坏作用。因此鬼臼毒素可能是一个很有前途的抗血管瘤候选药物。

3.1.5 乳腺癌 乳腺癌是全球发病率最高的恶性肿瘤之一,严重危害广大女性的身心健康,对于临床肿瘤的防治也是一个巨大挑战^[50]。Chattopadhyay 等^[51]将从基底鬼臼细胞培养产生的鬼臼毒素应用于人乳腺癌细胞系(MCF-7),1 nmol·L⁻¹的鬼臼毒素能够抑制肿瘤细胞的生长,并且当鬼臼毒素应用于细胞生长初期时,其抑制作用最为显著。Zhang 等^[52]证实鬼臼毒素不仅能抑制三阴性乳腺癌的迁移和侵袭,还能影响细胞周期,诱导细胞凋亡。他们利用 GEO 数据库,经过拓扑网络分析、聚类分析、分子对接筛选,最终确定 *PLK1*、*CCDC20*、*CDK1* 为关键靶基因。qRT-PCR 结果显示,药物诱导后, *PLK1*、*CDC20* 和 *CDK1* mRNA 水平下降,上游 *P53* 表达升高,说明通过调节 *P53* 抑制 *PLK1*、*CDC20* 和 *CDK1* 在细胞周期中的表达通路。另有研究证明,去氧鬼臼毒素可作为治疗耐药型乳腺癌的药物,

且其抗肿瘤活性远强于依托泊苷^[39]，表明鬼臼毒素和去氧鬼臼毒素均可以作为抗乳腺癌药物进行进一步开发研究。

3.1.6 食管癌 食管癌是临床难治性恶性肿瘤之一，发病率高且早期无典型症状，若及时发现并给予有效治疗则生存率高，中晚期食管癌则生存率差。早期食管癌以手术治疗为主，进展期主要采用化疗、放疗、新辅助治疗、免疫联合化疗等多学科治疗^[53]。Yoon 等^[54]探讨了鬼臼毒素对食道鳞状细胞癌 (esophageal squamous cell carcinoma,

ESCC) 细胞的抗肿瘤作用机制，通过不断增加鬼臼毒素的浓度促使 ESCC 细胞的生长和独立于锚定的集落数量显著减少，在 0.17~0.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 内对 KYSE 30、KYSE 70、KYSE 410、KYSE 450 和 KYSE 510 5 种 ESCC 细胞显示出较高的抗肿瘤功效。鬼臼毒素可导致细胞周期的 G₂/M 期阻滞以及细胞凋亡，同时显著提高 ROS 的合成，并引发线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 的损失，以及各种 Caspases 的激活。此外鬼臼毒素通过 ROS 的表达提高了 c-Jun

表 2 鬼臼毒素在不同癌细胞中的分子靶点
Tab. 2 Molecular targets of podophyllotoxin in different cancer cells

肿瘤类型	肿瘤细胞	分子靶点	阻滞细胞周期	文献
结直肠癌	HCT116	ROS↑, p38 MAPK↑	G ₁ , G ₂ /M	[41-42]
肺癌	HCC827GR	Cyclin B1↓, Cdc2↓, p27↑	G ₂ /M	[44]
		Mcl-1↓, Survivin↓, Bcl-xl↓, Caspases↑	—	[44]
宫颈癌	HeLa	CALR↓, PDIA3↓, HDGF↓, RCN1↓, NPM1↑, TPI1↑, SOD1↑	—	[47]
血管癌	HCEC	—	—	[49]
乳腺癌	MCF-7	PLK1↓, CDC20↓, CDK1 mRNA↓, P53↑	—	[52]
食管癌	KYSE 30、KYSE 70、KYSE 410、KYSE 450、KYSE 510	ROS↑, MMP↓, Caspases↑	G ₂ /M	[54]
		JNK↑, p38↑, ER↑	—	[54]
		Bad↑, Bcl↓	—	[54]

注：↑升高；↓降低。
Note: ↑Increase; ↓lower.

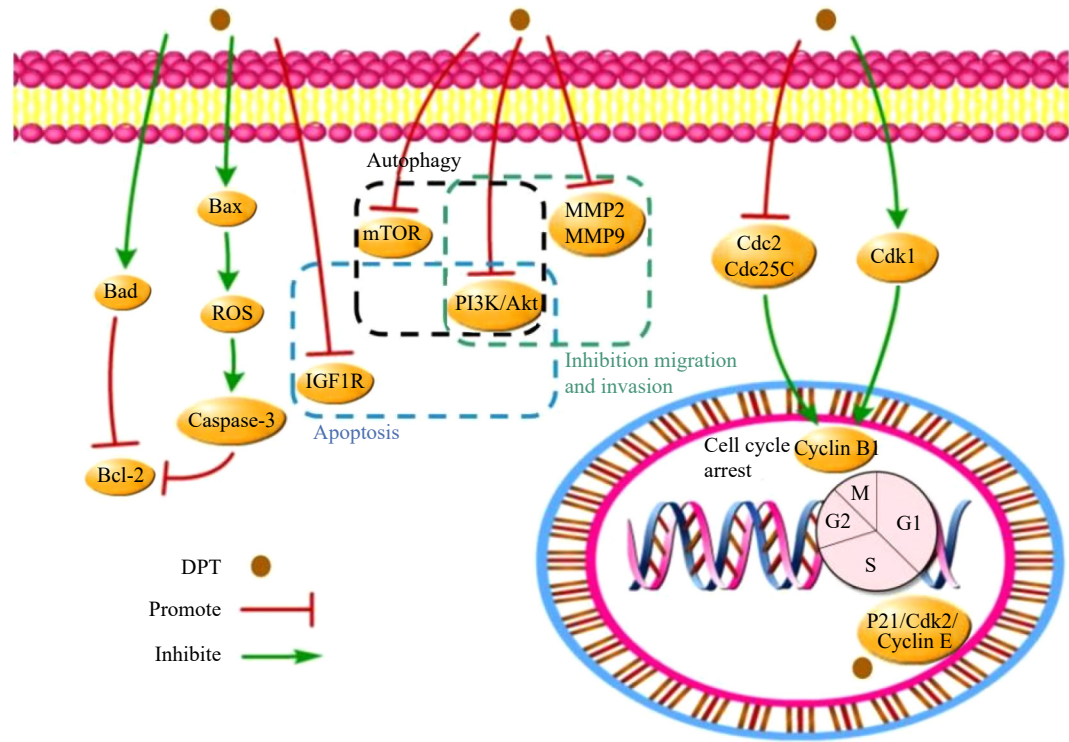


图 5 去氧鬼臼毒素的抗肿瘤作用通路
Fig. 5 Antitumor pathway of deoxypodophyllotoxin

N-末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK)、p38 的磷酸化水平和内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 应激标记蛋白的表达, 通过 MMP 的损失、Bad 水平的升高和 Bcl 水平的降低诱导 ESCC 细胞死亡。另外细胞色素 C 与 Apaf-1 一起释放到细胞质中, 诱导了多种 Caspases 的激活。总之, 实验结果揭示了鬼臼毒素通过调节 ROS 介导的线粒体和内质网应激依赖机制导致 ESCC 细胞凋亡, 表明鬼臼毒素是一种很有前景的抗 ESCC 药物。

3.2 抗病毒作用

鬼臼毒素具有抗病毒作用, 广泛应用于相关皮肤病、性病的治疗。目前浓度为 0.5% 的鬼臼毒素已成为治疗尖锐湿疣首选药, 也被证实对人乳头状瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 的 DNA 有强大破坏作用^[55]。实验证明对鬼臼毒素及其衍生物进行结构修饰, 如 A 环亚甲二氧基化、D 环内酯化、E 环苯亚甲二氧基开环及 C4 环修饰, 可以达到抑制艾滋病病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 的复制的作用, 其中 A 环亚甲二氧基开环及甲基化、4'-位去甲基化修饰得到的 4 个化合物 $EC_{50} > 0.001 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 治疗指数 > 120, 具有较好的抗 HIV 潜力^[56-57]。

3.3 杀菌作用

熊铁一等^[58]从八角莲中提取出富集总木脂素和总黄酮的化合物, 进行悬液定量杀菌试验和真菌杀灭试验等多种实验, 研究对大肠杆菌 (8 099)、金黄色葡萄球菌 (ATCC6538)、白色念珠菌 (ATCC10231) 这 3 种常见菌种的杀灭作用, 实验结果表明悬液对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌杀灭率为 100%, 对白色念珠菌杀灭率为 93.35%, 证实鬼臼毒素对以上 3 种常见菌种均有较好的杀灭作用。

3.4 不良反应

虽然鬼臼毒素对特定疾病治疗效果优越, 其衍生物依托泊苷和替尼泊苷具有强抗肿瘤活性被广泛用于临床治疗, 但这些药物自身存在着不可忽视的弊端, 例如生物利用度差、胃肠道不良反应以及易产生耐药性等^[59]。另外, 调查研究发现, 鬼臼毒素类药物具有较为显著的不良反应, 其中骨髓抑制颇为常见且有剂量限制。Pedersen-Bjergaard^[60]指出使用有效剂量的药物也有可能增加骨髓增生异常、继发性急性髓性白血病以及染色体畸变的风险。因此开发更高效低毒的类似物

仍然具有非常好的发展前景。当前各国学者致力于对鬼臼毒素的化学结构进行修饰, 在更好地发挥其药理活性的同时降低不良反应, 已经取得了较大进展。

4 展望

中国是鬼臼资源多样化中心, 但其生药资源日渐匮乏, 且鬼臼毒素全合成步骤繁琐、效率低下, 因此研究鬼臼毒素的生物合成无疑成为当前研究的突破要点。鬼臼毒素是一种抗肿瘤天然产物, 具有细胞毒性, 可抑制细胞有丝分裂, 因而对肿瘤细胞、病毒、细菌等具有一定杀伤作用, 其中抗肿瘤作用主要表现在抗直肠癌、肺癌、乳腺癌等方面, 但研究表明其类似物去氧鬼臼毒素的抗肿瘤活性更好。

鬼臼资源在国内外均有分布, 鬼臼毒素对肿瘤具有较好生长抑制或细胞毒作用, 其衍生物依托泊苷、替尼泊苷已作为抗肿瘤药物用于临床治疗, 且药用价值显著。然而鬼臼毒素并未受到足够重视, 相关研究较少, 希望未来鬼臼毒素可入药典, 以得到更多关注, 发挥天然药物作用, 同时对于恶性疾病的治疗有重大意义。

但是鬼臼毒素应用价值的开发利用仍然具有较强的局限性, 值得科研人员进一步研究。首先目前对鬼臼属植物研究较少, 且主要集中在八角莲属、桃儿七属植物的提取, 对其余领域研究尚不完全, 日后希望有更多科研工作者能够投入精力开展相关研究, 探索植物内鬼臼毒素的高效提取, 缓解鬼臼毒素自然资源减少的压力; 其次在植物合成方面, 解析合成途径以期增加鬼臼毒素含量, 寻找更多合成生物学途径; 此外深入研究鬼臼毒素在抗不同种类肿瘤上的作用, 并对其进行结构修饰, 研发合成高效低毒新药, 提高鬼臼毒素的临床药物应用价值, 对鬼臼毒素新作用的开发具有至关重要的影响, 同时能够促进其在医疗方面的积极应用, 充分发挥药用价值, 为医学发展奠定基础。

REFERENCES

- [1] LU J N, CHENG H, FAN J J, et al. DNA molecular identification of Chinese herbal materials of *Dysosma* by ITS2 barcode sequence[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2018, 49(16): 3907-3911.
- [2] WANG Y X. Cloning and prokaryotic expression of genes involved in the biosynthetic pathways of podophyllotoxin and

- its precursor coniferol from *Sinopodophyllum hexandrum*[D]. Kunming: Yunnan Normal University, 2022.
- [3] MENG Z, YAO T T, ZHAO W, et al. Research progress in biosynthesis of podophyllotoxin and its derivatives[J]. *Chin J Biotechnol*(生物工程学报), 2021, 37(6): 2026-2038.
 - [4] 马继兴. 神农本草经辑注[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 367.
 - [5] JAVADIAN N, KARIMZADEH G, SHARIFI M, et al. Effect of ploidy level on podophyllotoxin content and expression of genes related to its biosynthesis in callus cultures of *Linum album*[J]. *Biologia*, 2022, 77(9): 2449-2458.
 - [6] SATAKE H, KOYAMA T, BAHABADI S E, et al. Essences in metabolic engineering of lignan biosynthesis[J]. *Metabolites*, 2015, 5(2): 270-290.
 - [7] MEIRA P R, DAVID J P, DE O RIBEIRO E M, et al. Abiotic factors influencing podophyllotoxin and yatein overproduction in *Leptochloa macrostachys* cultivated *in vitro*[J]. *Phytochem Lett*, 2017, 22: 287-292.
 - [8] 马君, 江露, 陈虎, 等. 中药八角莲的研究进展[J]. *湖北医药学院学报*, 2020, 39(1): 96-100.
 - [9] LIU Y Y, LI C X, FENG H S, et al. Optimization of ultrasonic extraction of podophyllotoxin from *Sinopodophyllum hexandrum* by response surface methodology[J]. *Chin Wild Plant Resour*(中国野生植物资源), 2020, 39(4): 11-16,31.
 - [10] YE W Q. Phylogenomic and biogeographic study of an anticancer herbaceous subfamily podophylloideae[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2020.
 - [11] QIU Z D, JIN Q H, GUO M Q. Optimization of the extraction process of podophyllotoxin from *Diphylleia sinensis* H. L. Li by response surface methodology[J]. *Plant Sci J*(植物科学学报), 2017, 35(5): 774-782.
 - [12] LEI Z, YANG G Y, YE F, et al. Determination of podophyllotoxin in *Dysosma versipellis* by UPLC[J]. *China Pharm*(中国药师), 2013, 16(4): 548-549.
 - [13] LIU W. Phytochemical diversity of *Sinopodophyllum hexandrum* and mining of genes involved in podophyllotoxin biosynthesis[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2015.
 - [14] ZHANG C N, YANG G Y, WEI J B, et al. Study progress in one of traditional Chinese medicine "Guijiu" source plants: *Diphylleia sinensis*[J]. *China Pharm*(中国药师), 2016, 19(7): 1358-1363.
 - [15] CUI Y W, SONG X M, LI Y Z, et al. Establishment of HPLC fingerprint of *Diphylleia sinensis* and determination of 12 components[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2020, 51(19): 5041-5047.
 - [16] CANTRELL C L, ZHELJAZKOV V D, CARVALHO C R, et al. Dual extraction of essential oil and podophyllotoxin from creeping juniper(*Juniperus horizontalis*)[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e106057.
 - [17] LIU Y Q, LIU X, LIU J, et al. Seed dormancy and germination in endangered plant *Dysosma versipellis*(hance) M. Cheng[J]. *Chin Agric Sci Bull*(中国农学通报), 2014, 30(10): 203-206.
 - [18] CAO L. Study on optimize fermentation conditions for producing podophyllotoxin from endophytic fungi[D]. Xi'an: Northwest University, 2007.
 - [19] CHAO E K, SU X Y, CHEN S L, et al. Study on cell factory synthesis of active components from medicinal plants[J]. *Mod Chin Med*(中国现代中药), 2019, 21(11): 1464-1474.
 - [20] BAHABADI S E, SHARIFI M, MURATA J, et al. The effect of chitosan and chitin oligomers on gene expression and lignans production in *Linum album* cell cultures[J]. *J Med Plants*, 2014(13): 46-53.
 - [21] CHEN D J, LIU H M, YANG J, et al. Research process on active constituents of endophyte[J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2013, 24(7): 1730-1732.
 - [22] GUO S H, LI M, CHEN Y C, et al. Establishment of callus culture system of *Sinopodophyllum emodi* and determination of podophyllotoxin[J]. *Chin Agric Sci Bull*(中国农学通报), 2018, 34(22): 72-76.
 - [23] YAMAMURA M, NODA S, HATTORI T, et al. Characterization of lignocellulose of *Erianthus arundinaceus* in relation to enzymatic saccharification efficiency[J]. *Plant Biotechnol*, 2013, 30(1): 25-35.
 - [24] MARQUES J V, KIM K W, LEE C, et al. Next generation sequencing in predicting gene function in podophyllotoxin biosynthesis[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(1): 466-479.
 - [25] JIANG F L, GONG T, CHEN J J, et al. Synthetic biology of plants-derived medicinal natural products[J]. *Chin J Biotechnol*(生物工程学报), 2021, 37(6): 1931-1951.
 - [26] KUO H J, WEI Z Y, LU P C, et al. Bioconversion of pinoreosinol into matairesinol by use of recombinant *Escherichia coli*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80(9): 2687-2692.
 - [27] CHEN Z Y, SUN X X, LI Y, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for microbial synthesis of monolignols[J]. *Metab Eng*, 2017(39): 102-109.
 - [28] DECEMBRINO D, RICKLEFS E, WOHLGEMUTH S, et al. Assembly of plant enzymes in *E. coli* for the production of the valuable (-)-podophyllotoxin precursor (-)-pluviatolide[J]. *ACS Synth Biol*, 2020, 9(11): 3091-3103.
 - [29] RODRIGUEZ A, KILDEGAARD K R, LI M J, et al. Establishment of a yeast platform strain for production of p-coumaric acid through metabolic engineering of aromatic amino acid biosynthesis[J]. *Metab Eng*, 2015(31): 181-188.
 - [30] CAI M, LIU J Y, SONG X F, et al. De novo biosynthesis of p-coumaric acid and caffeic acid from carboxymethyl-cellulose by microbial co-culture strategy[J]. *Microb Cell Fact*, 2022, 21(1): 81.
 - [31] LAU W, SATTELY E S. Six enzymes from mayapple that complete the biosynthetic pathway to the etoposide aglycone[J]. *Science*, 2015, 349(6253): 1224-1228.
 - [32] SCHULTZ B J, KIM S Y, LAU W, et al. Total biosynthesis for milligram-scale production of etoposide intermediates in a plant chassis[J]. *J Am Chem Soc*, 2019, 141(49): 19231-19235.
 - [33] LIU H, LIAO J X, HU Y, et al. A highly efficient approach to construct (epi)-podophyllotoxin-4-O-glycosidic linkages as well as its application in concise syntheses of etoposide and teniposide[J]. *Org Lett*, 2016, 18(6): 1294-1297.
 - [34] NOOR R, ZAHOOR A F, IRFAN M, et al. Transition metal catalyzed hiyama cross-coupling: Recent methodology developments and synthetic applications[J]. *Molecules*, 2022, 27(17): 5654.

- [35] ALAM S B, KULKA M. Internalization of benzyloquinoline alkaloids by resting and activated bone marrow-derived mast cells utilizes energy-dependent mechanisms[J]. *Inflamm Res*, 2022, 71(3): 343-356.
- [36] XIONG J, JIANG J W, CHAO G K, et al. Synthesis, characterization and antitumor activity of glycine derivatives containing 5-fluorouracil[J]. *Fine Chem(精细化工)*, 2011, 28(3): 265-269.
- [37] FAN H L. Anticancer active components identification from *Dysosma versipellis*-liquorice based on composition-activity relationship[D]. Tianjin: Tianjin University, 2018.
- [38] LALALEO L, ALCAZAR R, PALAZON J, et al. Comparing aryltetralin lignan accumulation patterns in four biotechnological systems of *Linum album*[J]. *J Plant Physiol*, 2018(228): 197-207.
- [39] 金成胜, 金甲, 黄僊. 鬼臼毒素及衍生物抗肿瘤等研究进展[J]. *中外医学研究*, 2009, 7(11): 60-62.
- [40] 司盈盈, 柴站, 孙彦君, 等. 去氧鬼臼毒素生物活性研究进展[J]. *中药材*, 2022, 45(1): 255-259.
- [41] LEE S O, KWAK A W, LEE M H, et al. Picropodophyllotoxin induces G1 cell cycle arrest and apoptosis in human colorectal cancer cells via ROS generation and activation of p38 MAPK signaling pathway[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2021, 31(12): 1615-1623.
- [42] LEE S O, JOO S H, KWAK A W, et al. Podophyllotoxin induces ROS-mediated apoptosis and cell cycle arrest in human colorectal cancer cells via p38 MAPK signaling[J]. *Biomol Ther*, 2021, 29(6): 658-666.
- [43] OH H N, KWAK A W, LEE M H, et al. Targeted inhibition of c-MET by podophyllotoxin promotes caspase-dependent apoptosis and suppresses cell growth in gefitinib-resistant non-small cell lung cancer cells[J]. *Phytomedicine*, 2021(80): 153355.
- [44] PARK B R, LEE S A, MOON S M, et al. Anthriscin-induced caspase-dependent apoptosis through IGF1R/PI3K/AKT pathway inhibition in A549 human non-small lung cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2018, 39(6): 2769-2776.
- [45] CHEN Z H, QIU X C, LIN S F, et al. Research on mechanisms of deoxypodophyllotoxin-induced inhibition of cell proliferation and migration in human lung cancer NCI-H358 cells[J]. *Tianjin Med J(天津医药)*, 2016, 44(5): 568-572.
- [46] CAI H L, YUAN W G, SUN H X. Prevalence and prevention strategies of cervical cancer in the world and China[J]. *Chin Clin Oncol(临床肿瘤学杂志)*, 2023, 28(1): 90-93.
- [47] WANG B C, CHEN L F, ZHEN H, et al. Proteomic changes induced by podophyllotoxin in human cervical carcinoma HeLa cells[J]. *Am J Chin Med*, 2013, 41(1): 163-175.
- [48] WANG X F, ZHANG J D, XIAO H. Clinical characteristics and pathological analysis of hepatic cavernous hemangioma[J]. *Med Inf(医学信息)*, 2019, 32(17): 170-173.
- [49] ZHANG W J, WU L Q, LIU H L, et al. Abnormal blood vessels formed by human liver cavernous hemangioma endothelial cells in nude mice are suitable for drug evaluation[J]. *Microvasc Res*, 2009, 78(3): 379-385.
- [50] SHAO Z B, YANG B L, WU J. Progress of important clinical trials of breast cancer in China in 2022[J]. *China Oncol(中国癌症杂志)*, 2023, 33(2): 103-109.
- [51] CHATTOPADHYAY S, BISARIA V S, PANDA A K, et al. Cytotoxicity of *in vitro* produced podophyllotoxin from *Podophyllum hexandrum* on human cancer cell line[J]. *Nat Prod Res*, 2004, 18(1): 51-57.
- [52] ZHANG W F, LIU C, LI J, et al. Target analysis and mechanism of podophyllotoxin in the treatment of triple-negative breast cancer[J]. *Front Pharmacol*, 2020(11): 1211.
- [53] WEN L, ZHANG B. Treatment status and trend analysis of esophageal cancer[J]. *J Med Inf(医学信息)*, 2022, 35(18): 165-168.
- [54] YOON G, LEE M H, KWAK A W, et al. Podophyllotoxin isolated from *Podophyllum peltatum* induces G2/M phase arrest and mitochondrial-mediated apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cells[J]. *Forests*, 2019, 11(1): 8.
- [55] WANG X G, TANG Y H. Clinical study on treatment of palmoplantar warts using cryotherapy combined with 0.5% podophyllotoxin tincture and cryotherapy alone[J]. *China Med Pharm(中国医药科学)*, 2019, 9(2): 62-64.
- [56] YAN M J, SHEN A G, CHENG C, et al. Studied on the expression of β -1, 4-galactosyltransferase I, II and V in astrocytoma SHG-44 treated by etoposide[J]. *Pract J Cancer(实用癌症杂志)*, 2005, 20(1): 8-11.
- [57] HAJIMIRI M, SHAHVERDI S, KAMALINIA G, et al. Growth factor conjugation: Strategies and applications[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2015, 103(2): 819-838.
- [58] XIONG T Y, YANG S, LUO Y. Preparation of dysosma lotion and research of its bactericidal effect[J]. *China Med Pharm(中国医药科学)*, 2013, 3(1): 46-47.
- [59] LI D Y. Synthesis of podophyllotoxin derivatives and *in vitro* antitumor activity[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2021.
- [60] PEDERSEN-BJERGAARD J. Radiotherapy- and chemotherapy- induced myelodysplasia and acute myeloid leukemia. A review[J]. *Leuk Res*, 1992, 16(1): 61-65.

收稿日期: 2023-05-15
(本文责编: 曹粤锋)