食品工业科技 半月刊
SCIENCE AND TECHNOLOGY OF FOOD INDUSTRY
权威 · 核心 · 领先 · 实用 · 全面
美国《化学文摘》CA
日本科学技术振兴机构数据库JST
北大核心期刊
中国生物医学文献系统SinoMed收录期刊
中国精品科技期刊
英国《食品科技文摘》FSTA
中国科技核心期刊CSTPCD
RCCSE中国核心学术期刊
中国农林核心期刊A

菱角壳黄酮提取工艺优化及抑肿瘤细胞增殖活性作用

雷秋琪，叶诗洁，黄永康，杨　过，周　敏，王宏勋，王丽梅

Optimization of Extraction Process of Flavonoids from Water Chestnut Shell and Effect on Anti-tumor Cell Proliferation Activity

LEI Qiuqi, YE Shijie, HUANG Yongkang, YANG Guo, ZHOU Min, WANG Hongxun, and WANG Limei

在线阅读 View online: https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021100178

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

酶法辅助热水浸提刺梨多糖工艺优化及其抗肿瘤活性研究

Optimization of Enzymatic-assisted Thermal Water Extraction of *Rosa roxburghii* Polysaccharide and Its Antitumor Activity

食品工业科技. 2021, 42(18): 98-105

粗毛纤孔菌液体发酵工艺优化及胞外多糖的抗菌和抗肿瘤活性

Optimization of Liquid Fermentation Process of *Inonotus hispidus* and Antibacterial and Antitumor Activities of Exopolysaccharides

食品工业科技. 2021, 42(5): 93-99

菱角壳分级萃取物对肿瘤细胞增殖及凋亡的影响

Effects of Proliferation and Apoptosis by Water Chestnut Shell Extracts on Tumor Cells

食品工业科技. 2019, 40(9): 295-301

植物细胞分裂素ortho-Topolin Riboside对人白血病细胞株THP-1的抗癌活性及机制初探

Antitumor Activity and Mechanism of Plant Cytokinin ortho-Topolin Riboside in Human Leukemia Cell Line THP-1

食品工业科技. 2020, 41(6): 299-304

线叶旋覆花总黄酮的提取工艺优化及其抗氧化活性分析

Optimization of Extraction Process of Total Flavonoids from *Inula lineariifolia* and Its Antioxidant Activity

食品工业科技. 2019, 40(22): 151-156,162

超声-闪式协同提取白及须根多糖工艺优化及其抗肿瘤活性

Optimization of Ultrasonic-Flash Synergistic Extraction and Antitumor Activity of Polysaccharide from Fibrous Root of *Bletilla striata*

食品工业科技. 2019, 40(20): 188-195,208

关注微信公众号，获得更多资讯信息

雷秋琪, 叶诗洁, 黄永康, 等. 菱角壳黄酮提取工艺优化及抑肿瘤细胞增殖活性作用 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 224−232. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100178

LEI Qiuqi, YE Shijie, HUANG Yongkang, et al. Optimization of Extraction Process of Flavonoids from Water Chestnut Shell and Effect on Anti-tumor Cell Proliferation Activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 224−232. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100178

· 工艺技术 ·

菱角壳黄酮提取工艺优化及抑肿瘤细胞增殖活性作用

雷秋琪[1], 叶诗洁[2], 黄永康[2], 杨　过[2], 周　敏[1,3], 王宏勋[2,3], 王丽梅[2,3,*]

（1.武汉轻工大学食品科学与工程学院, 湖北武汉 430023;
2.武汉轻工大学生命科学与技术学院, 湖北武汉 430023;
3.湖北省生鲜食品工程技术研究中心, 湖北武汉 430023）

摘　要: 本实验旨在优化菱角壳黄酮提取工艺，并考察其对人宫颈癌 Hela 细胞增殖的抑制作用。采用单因素实验考察了提取时间、料液比、乙醇浓度以及提取温度对菱角壳总黄酮得率的影响，并以菱角壳总黄酮得率为响应值进行响应面分析，得出菱角壳黄酮提取的最佳提取工艺。同时，采用 CCK-8 法测定菱角壳黄酮对人宫颈癌 Hela 细胞增殖的影响，并测定其 IC_{50} 值，考察菱角壳黄酮的抗肿瘤活性。结果表明，菱角壳黄酮最佳提取工艺为：提取时间 28 min、料液比 1∶33 g/mL、乙醇浓度 53%。在该条件下菱角壳粗提物总黄酮的提取率可达 3.455%±0.16%。5、100、200、400、800 μg/mL 浓度的菱角壳黄酮粗提物、纯化物溶液孵育均对 Hela 细胞增殖均具有较好的抑制作用，且存在时间和剂量依赖性。以作用时间 48 h 为例，菱角壳黄酮粗提物、菱角壳黄酮纯化物、5-Fu 的 IC_{50} 值分别为 271.46、268.16、152.09 μg/mL。因此，同等时间下，菱角壳黄酮提取物的对于 Hela 细胞的增殖抑制作用弱于阳性对照 5-Fu。

关键词: 菱角壳黄酮, 工艺优化, 人宫颈癌 Hela 细胞, 抗肿瘤活性

中图分类号: TS201.1　　**文献标识码:** B　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0224−09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100178

本文网刊:

Optimization of Extraction Process of Flavonoids from Water Chestnut Shell and Effect on Anti-tumor Cell Proliferation Activity

LEI Qiuqi[1], YE Shijie[2], HUANG Yongkang[2], YANG Guo[2], ZHOU Min[1,3], WANG Hongxun[2,3], WANG Limei[2,3,*]

（1.College of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China;
2.College of Life Science and Technology, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China;
3.Hubei Engineering Research Center for Fresh Food, Wuhan 430023, China）

Abstract: This experiment was to optimize the extraction process of water chestnut shell flavonoids and investigate its inhibitory effect on the proliferation of human cervical cancer Hela cells. A single factor experiment was used to investigate the effects of extraction time, material-to-liquid ratio, ethanol concentration and extraction temperature on the yield of total flavonoids in water chestnut shells, and response surface analysis was carried out based on the yield of total flavonoids in water chestnut shells to obtain the extraction of water chestnut shell flavonoids. At the same time, the CCK-8 method was used to determine the effect of water chestnut flavonoids on the proliferation of human cervical cancer Hela cells, and to determine its IC_{50} value to investigate the anti-tumor activity of water chestnut flavonoids. The experimental results showed that the best extraction process of water chestnut shell flavonoids was: extraction time 28 min, material-to-liquid ratio 1∶33 g/mL, and ethanol concentration 53%. Under these conditions, the extraction rate of total flavonoids in the crude

收稿日期: 2021−10−19

基金项目: 湖北省重点研发计划项目（2020BBB074）; 农产品加工与转化湖北省重点实验室开放课题（2018HBSQGDKFA03）。

作者简介: 雷秋琪（1997−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物, E-mail: 13746342732@qq.com。

*** 通信作者:** 王丽梅（1980−）, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 天然产物, E-mail: wanglimeiyx@163.com。

extract of water chestnut shell could reach 3.455%±0.16%. Incubation with the crude extract or purified solution of water chestnut shell flavonoids at concentrations of 5, 100, 200, 400, 800 μg/mL, all had a proliferation inhibitory effect on Hela cells, and there was a time and concentration dependence. Taking action time 48 h as an example, the IC_{50} values of the crude extract of water chestnut shell flavonoids, the purified material of water chestnut shell flavonoids, and 5-Fu were 271.46, 268.16, and 152.09 μg/mL, respectively. Therefore, at the same time, the inhibitory effect of water chestnut extract on the proliferation of Hela cells was weaker than that of the positive control 5-Fu.

Key words: water chestnut shell flavonoids; process optimization; human cervical cancer Hela cells; anti-tumor activity

菱角作为我国民间一种药用佳果已有几千年的历史[1]。根据《中华药海》所记载：“菱壳性味微苦、涩，性凉，入肺、脾、肠三经，具有解毒疗疮、涩肠止泻、清华湿热的功效”。《中药大辞典》记载：“菱壳可治腹泻、脱肛、痔疮、黄水疮、天泡疮”。研究表明，菱角壳具有抗肿瘤细胞增殖、抗氧化、抗菌、降糖和抗炎等作用[2−5]。在中国的民间用药中，菱角壳被用于辅助治疗癌症[6−10]。牛凤兰等[11]用富含三羟基苯甲酸二聚体粗菱壳水提物对 MFC 荷瘤小鼠进行体内实验，发现菱角壳水提物具有抑瘤效果而且存在量效关系。文献报道菱角壳中含有生物碱、酚酸类、萜类、黄酮类及多糖等功能成分[12−14]。李丽等[15]对东北菱黄酮类化合物的成分进行定性定量分析，发现其中可能含有黄酮苷或苷元、山奈酚、高良姜素的 2 个对映异构体以及多种其他成分。黄酮[16−17]具有抗氧化性[18−19]，可作为天然抗氧化剂用于食品行业。另外，黄酮还具有抗肿瘤、抗炎镇痛、保护肝脏等功效[20−25]，可用于相关疾病的药物开发。常见的黄酮提取方式有热水浸提法[26]、有机溶剂提取法[27]、超声波提取法[28−29]、酶解法[30]、膜分离提取法[31]、超临界流体萃取[32]。其中，热水浸提、有机溶剂提取法等是实验室常见提取工艺。主要依据相似相溶的原理[27]，一般具有操作简单、实验器材要求低、节约成本等诸多优点。另外，酶解法具有高度专一的特性，能够避免使用有机试剂且具有较高的提取率，但作用条件不便于调控。膜分离浓缩可以减少干燥时间，提高干燥效率。超临界 CO_2 萃取是目前国际上公认的先进物理萃取技术，主要是运用其溶剂力将超临界流体与萃取物接触，选择性分离提纯。但这三种提取方式均成本较高，不适于大规模生产。

根据目前的研究现状，黄酮已经广泛用于植物抗肿瘤活性的研究中[33]，但将菱角壳黄酮用于抗肿瘤活性的文献并不多见。其中 Hela 作为常见的人源肿瘤细胞[34−35]，也没有相关报道将其用于验证菱角壳黄酮的抗肿瘤活性。常见的用来检测肿瘤细胞增殖活性的方法有很多[36−37]，如：台盼蓝染色法、^3H 放射性同位素掺入法、MTT 法、细胞仪法等。MTT 法形成的蓝紫色结晶甲瓒（Formazan）物质不溶于水[28]，添加有机溶剂溶解后，因为弃去上清液的同时可能会丢失少部分的 Formazan，因此可能会产生误差。为了减少实验误差，目前更常用 CCK-8 法检测细胞增殖活性。CCK-8 法比 MTT 法对细胞浓度变化更敏感，测得的结果则更为准确。

因此，本研究以湖北洪湖菱角种植区所产的菱角取壳做为原料，采用单因素实验结合响应面分析法优化菱角壳黄酮提取工艺，运用 CCK-8 法检测菱角壳黄酮对人宫颈癌 Hela 细胞增殖的影响。拓展黄酮类物质的提取来源，为菱角壳黄酮的体外的抗肿瘤活性研究及菱角壳的开发利用理论基础。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

菱角壳（两角菱，Water chestnut shell）　湖北洪湖菱角种植地；人宫颈癌 Hela 细胞株　武汉百迈生物科技有限公司；无水乙醇（分析纯）、芦丁标品、亚硝酸钠（$NaNO_2$，分析纯）、硝酸铝（$Al(NO_3)_3$，分析纯）、氢氧化钠（NaOH，分析纯）　国药集团化学试剂有限公司；磷酸缓冲盐溶液（PBS）、DMEM（Dulbecco’s modified Eagle's medium）高糖培养基　塞默尔飞世尔生物化学制品有限公司；5-氟尿嘧啶（5-Fu）　sigma 公司；胎牛血清（Fetal Bovine Serum）　浙江天杭生物科技有限公司；青霉素链霉素溶液-双抗（后文均简称双抗）　上海斯信生物科技有限公司；胰蛋白酶（Trypsin）、乙二胺四乙酸（EDTA）　吉诺生物医药技术有限公司；二甲基亚砜（DMSO）　湖北百奥斯生物科技有限公司；细胞活力检测试剂盒（cell counting kit-8，CCK-8）　日本同仁试剂公司。

BL 2000F 型电子天平　上海升隆电子科技有限公司；PL402-L 型电子天平　梅特勒-托利多仪器有限公司；HH-S114 型电热恒温水浴锅　上海太仓精宏仪器设备有限公司；721-100 型紫外可见分光光度计　上海菁华科技仪器有限公司；T25 细胞培养瓶、冻存管　北京中创先锋科技有限责任公司；96 孔培养板　上海化科实验器材有限公司；CW-CJ-2FD 型双人单面净化工作台　苏州净化设备公司；SCHP-80 型 CO_2 培养箱　深圳市奥德玛电子科技有限公司；BX19-HK830 型倒置显微镜　奥林巴斯有限公司；SUNRISE 型酶标仪　奥地利 Tecan 公司；普通冰箱、−80 ℃ 低温冰箱　海尔集团；DHG-9145A 型电热恒温鼓风干燥箱　上海恒科学仪器有限公司；TGL-16GB 型离心机　北京医用离心机厂制造；GR60DA 型立式自动压力蒸汽灭菌锅　上海博迅实业有限公司医疗设备厂；SCIENTZ-12N 型真空冷冻干燥机　宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品处理 选用新鲜的菱角，摘去果肉，将菱角壳洗干净之后放在 40 ℃ 烘箱中烘干，用药物粉碎机粉碎，过 80 目筛得菱角壳粉，4 ℃ 下避光保存备用。

1.2.2 单因素实验 通过实验室原有实验基础以及相关文献资料，确定了对菱角壳总黄酮含量有明显影响的四个因素：提取时间、料液比、乙醇浓度、提取时间。

a：提取时间对菱角壳黄酮提取得率的影响：准确称取 15 份菱角壳粉，每份 1.0 g，置于 500 mL 三角瓶中，分为五个实验组，每组三个平行。选取浓度为 70% 的乙醇水溶液作为其提取溶剂，选取 1∶30 的料液比，将三角瓶分别放置在 50 ℃ 恒温水浴锅中提取，并分别提取 10、30、50、70、90 min，提取结束后用纱布进行过滤，得到样品液，冷却待测。

b：料液比对菱角壳黄酮提取得率的影响：选取浓度为 70% 的乙醇水溶液作为其提取溶剂，料液比分别为 1∶20、1∶30、1∶40、1∶50、1∶60，将三角瓶分别放置在 50 ℃ 恒温水浴锅中提取 50 min，其余实验操作与提取时间实验组相同。

c：乙醇浓度对菱角壳黄酮提取得率的影响：分别选取浓度为 30%、40%、50%、60%、70% 的乙醇水溶液作为其提取溶剂，料液比为 1∶30，将三角瓶分别放置在 50 ℃ 恒温水浴锅中提取 50 min，其余实验操作与提取时间实验组相同。

d：提取温度对菱角壳黄酮提取得率的影响：选取浓度为 70% 的乙醇水溶液作为其提取溶剂，料液比为 1∶30，将三角瓶分别放置在 40、50、60、70、80 ℃ 恒温水浴锅中提取 50 min，其余实验操作与提取时间实验组相同。

1.2.3 Box-Behnken 试验设计 如表 1 所示，根据单因素实验的结果，结合 Box-Behnken 中心组合的试验来设计优化试验，分析影响菱角壳黄酮提取得率主要因素，得出最佳提取工艺。

表 1 响应面试验因素水平

Table 1 Response surface experimental factor level

水平	提取时间(min)	料液比(g/mL)	乙醇浓度(%)
−1	10	1∶20	40
0	30	1∶30	50
1	50	1∶40	60

1.2.4 总黄酮含量的测定方法：

1.2.4.1 制作标准曲线 分别准确量取 0.3 mg/mL 芦丁标准品溶液(无水乙醇溶解)1、2、3、4、5、6、7、8 mL 置于 25 mL 容量瓶中，取无水乙醇分别补充至 1 mL，加超纯水至 12.5 mL，再加入 5% $NaNO_2$ 溶液 0.7 mL，充分混合均匀，静置 5 min。再加入 10% $Al(NO_3)_3$ 溶液 0.7 mL，混合均匀，静置 6 min 后，加入 1 mol/L NaOH 溶液 5 mL。最后加入无水乙醇补充样液的总体积至 25 mL，混合均匀，静置 10 min。另取 1 mL 无水乙醇，按照相同步骤进行处理后作为空白对照，在最大吸收波长 510 nm 处，使用紫外可见分光光度计测定吸光度，以吸光度 Y 值为纵坐标(Y)，以相应试管中浓度 X(mg/mL)为横坐标(X)，绘制标准曲线，得出回归方程。

1.2.4.2 测定样品中总黄酮含量 取 1 mL 样品液(无水乙醇溶解)，置于 25 mL 容量瓶中，加超纯水至 12.5 mL，再加入 5% $NaNO_2$ 溶液 0.7 mL，混合均匀，静置 5 min。再加入 10% $Al(NO_3)_3$ 溶液 0.7 mL，混合均匀，静置 6 min，加入 1 mol/L NaOH 溶液 5 mL，最后加入无水乙醇水补液至 25 mL，摇匀之后再静置 10 min。直接取 1 mL 超纯水按照相同步骤进行处理后作为空白对照，在最大吸收波长 510 nm 处，使用紫外可见分光光度计测定吸光度，最后结合标准曲线计算测定样品中总黄酮浓度计算总黄酮提取得率。样品中总黄酮得率(%)$=\frac{C\times V}{m\times 1000}\times 100$。式中，C 为由标曲得出的总黄酮浓度，mg/mL；V 为样液总体积，mL；m 为菱角壳粉的质量，g。

1.2.5 菱角壳黄酮对 Hela 细胞增殖活性的影响

1.2.5.1 药品配制方法 a：培养基：以 DMEM 高糖培养基∶胎牛血清∶双抗=90∶10∶1 的比例，取 45 mL 的 DMEM 高糖培养基 5 mL 胎牛血清、0.5 mL 双抗配制成 50 mL 培养基。

b：冻存液：将 DMEM 高糖培养基、胎牛血清、DMSO 按照 7∶3∶1 比例混合配制成冻存液，密封保存于 4 ℃ 冰箱。

1.2.5.2 菱角壳黄酮纯化及样品配制 根据实验室研究基础以及现有研究成果[38−39]，采用 AB-8 大孔树脂对菱角壳黄酮粗体物进行纯化，以进行后续实验。预处理：将 AB-8 大孔吸附树脂用无水乙醇浸泡 24 h 以充分溶胀后，95% 乙醇冲洗至洗出液加 5 倍量超纯水时无白色浑浊，超纯水洗三次，密封保存，备用。再生：将使用过树脂用无水乙醇洗脱至无色后，0.5 mol/L 盐酸浸泡 2 h，水洗至中性，0.5 mol/L NaOH 浸泡 2 h，水洗至中性。纯化工艺为：将处理过的 AB-8 大孔吸附树脂加入 26×50 mm 层析柱中，吸附流速 0.8 mL/min，一次洗脱上样体积为 20 mL，样品浓度 10 mg/mL，用 70% 乙醇溶液洗脱，洗脱样品的流速为 0.8 mL/min，经纯化浓缩冻干后得到菱角壳黄酮纯化物。

菱角壳黄酮溶液的配制：按照 1.2.1 中得出的提取工艺进行菱角壳黄酮粗提取物的提取，并取一定量菱角壳黄酮粗提物按照上述方法进行纯化。分别称量 80 mg 菱角壳黄酮粗提物、菱角壳黄酮纯化物、5-Fu 溶解于 1 mL DMSO 溶液中，用 DMEM 培养基分别稀释到 50、100、200、400、500、600、700、800 μg/mL。黄酮不溶于水，可溶于 DMSO，而 DMSO 溶液本身对细胞具有毒害作用，以 DMSO 作为溶剂配置相应浓度的药品时，其浓度不可高于 0.5%。

1.2.5.3　Hela 细胞复苏　将冻存于−80 ℃ 冰箱装有 Hela 细胞的冻存管取出后迅速放入 37 ℃ 水浴锅中快速解冻，解冻后立即停止水浴，将冻存管移入超净工作台，用移液枪轻轻吹打细胞使之悬浮混匀，将冻存管所有细胞转移到离心管中离心（1000 r/min，5 min），离心结束后弃去离心管中的上清液。在离心管中加入 1 mL DMEM 高糖培养基，用移液枪轻轻吹打离心管底部，使底部细胞悬浮并与 DMEM 高糖培养基充分混匀。将细胞转移到 T25 细胞培养瓶中，加入 4 mL DMEM 高糖培养基，将瓶盖拧紧，水平划十字摇匀后将培养瓶放入 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。放入培养箱之前注意用 75% 酒精喷洒培养瓶，以达到灭菌目的。放入培养箱之后适度将瓶盖拧紧后再回转半圈，以达到与培养箱通气目的。每 24 h 换液一次：把培养基吸出，加 1 mL PBS，盖上瓶盖轻轻摇动后弃去 PBS，反复清洗三次，在培养瓶中加入 5 mL DMEM 高糖培养基，最后放入 37 ℃、5% CO_2 培养箱培养。

1.2.5.4　细胞传代　首先在倒置显微镜下观察，将融合度大于 90% 的培养瓶挑出，弃去培养基，向培养瓶中加入 1 mL PBS 清洗细胞，随后弃去 PBS，反复三次，在培养瓶中加入 1 mL 胰蛋白酶消化 1 min，立即弃去胰蛋白酶。在培养瓶中加入 1 mL DMEM 高糖培养基，终止消化，用移液枪将瓶壁上剩余的细胞轻轻吹打使之脱落。将培养瓶中的细胞转移到 15 mL 离心管内，1000 r/min 离心 5 min，弃去上清液。按照适当密度在离心管中加入 2~3 mL 培养基，用移液枪轻轻吹打使离心管底部细胞浮起，再将离心管中细胞转移 1 mL 至装有 4 mL 培养基的 T25 瓶内，轻轻摇匀，定期观看细胞生长状态。Hela 细胞传代培养若干代后，待 Hela 细胞处于对数生长期时，细胞活力增强，细胞密度明显增大，此时的细胞就可以用于 CCK-8 法测定药物对肿瘤细胞的增殖抑制作用。

1.2.5.5　细胞冻存　取对数生长期细胞，冻存前 2 h 换液一次，用胰蛋白酶消化制成细胞悬浮液，转移到离心管中离心（1000 r/min、5 min）后弃去上清液。在离心管中添加 1.5 mL 冻存液，用移液枪轻轻吹打细胞，使之悬浮并与冻存液混匀后，将细胞转移至冻存管中。用封口膜密封，贴上标签，标记名称、时间。实行分阶段降温：4 ℃ 保存 2 h，随后−20 ℃ 保存 2 h，最后将细胞转移至−80 ℃ 下冻存。

1.2.5.6　CCK-8 法测定菱角壳黄酮对 Hela 细胞增殖抑制作用　实验开始前首先用胰蛋白酶消化细胞，将细胞制成悬浮液，置于 15 mL 离心管中离心（1000 r/min，5 min），最后在离心管中加入 8 mL 培养基。将浓度为 1×10^5 cells/mL 的 Hela 细胞悬浮液接种 96 孔培养板，取三瓶细胞分别接种于三个 96 孔培养板，每个孔加入 100 μL 细胞液。一个培养板用 3 种药品，每种药品有 5 个浓度，每一个浓度 5 个复孔，同时设置 5 个空白对照孔。三个培养板置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中 48 h，使孔板中细胞生长状态同步，培养期间有换液步骤。48 h 后，向培养板中分别加入 200 μL 浓度分别为 50、100、200、400、800 μg/mL 的菱角壳黄酮粗提物、菱角壳黄酮纯化物、5-Fu。其中 5-Fu 作为阳性对照，另外加入 200 μL 培养基作为空白对照，分别培养 12、24、48 h。达到适当时间后移除孔板中的培养基，加入 100 μL 新鲜培养基，避光加入 10 μL CCK-8 试剂，置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中孵育 3 h，用酶标仪于 450 nm 条件下读数，测出 OD 值。按照以下计算公式计算细胞增殖抑制率：细胞增殖抑制率（IC%）$=\left(1-\frac{OD_{实验组}}{OD_{对照组}}\right)\times100\%$。其中，$OD_{实验组}$值：菱角壳黄酮提取物或 5-Fu 处理孔的 OD 值；$OD_{对照组}$值：无药物处理孔的 OD 值。

根据不同样品不同浓度对 Hela 细胞的增殖抑制率，选择抑制率在 50% 左右的浓度范围，进一步试验得出半抑制质量浓度，即 IC_{50} 值。以样品浓度作为横坐标，抑制率 IC% 为纵坐标，作线性回归方程，分别计算菱角壳黄酮粗提物、纯化物，以及 5-Fu 作用 12、24、48 h 的 IC_{50} 值。

1.3　数据处理

本文中，单因素实验与响应面试验的实验组样品平行次数与测试平行次数均为 3 次，而 CCK-8 法测定菱角壳黄酮对 Hela 细胞增殖抑制作用的实验中，均复孔 5 次，以均值表示最终结果。利用 Excel 2020、SPSS16.0、Design ExpertV8.0.6.1 软件进行数据分析以及绘图处理。

2　结果与分析

2.1　单因素实验结果分析

2.1.1　提取时间对菱角壳黄酮得率的影响　如图 1 所示，在实验组中，提取时间为 30 min 时菱角壳黄酮得率最高为 3.04%。当提取时间小于 30 min 时，菱角壳黄酮提取得率随着提取时间的增加而上升成，而后，随着提取时间增加，菱角壳黄酮得率会随之下降。原因可能是提取时间过长，使得原料中的其他醇溶性物质被溶解，进而导致杂质增加，使得黄酮提取率下降。因此，选择提取时间 10、30、50 min 作为响

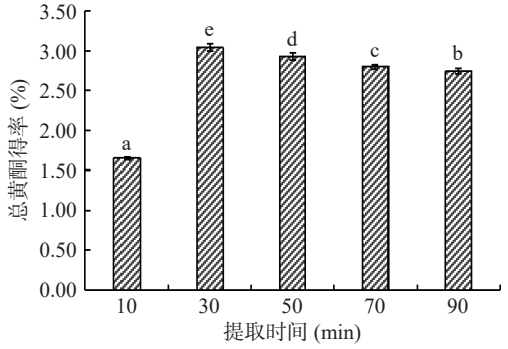

图 1　提取时间对菱角壳黄酮提取得率的影响

Fig.1　Effect of extraction time on the extraction yield of water chestnut flavonoids

应面试验的因素水平。提取时间的变化对菱角壳黄酮提取得率的影响极显著(P<0.01)，以上结果表明提取时间对菱角壳黄酮得率有影响。

2.1.2　料液比对菱角壳黄酮得率的影响结果分析　如图 2 所示，在实验组中，料液比为 1∶30 g/mL 时菱角壳黄酮提取效果最佳，此时的菱角壳黄酮得率为 3.13%。料液比超过 1∶30 g/mL 之后，菱角壳黄酮得率呈下降趋势。产生这种现象的原因可能是溶剂用量少时，提取不够充分，但随着溶剂增多，其它杂质的溶出率也会增大。因此，选择料液比 1∶20、1∶30、1∶40 g/mL 作为响应面试验的因素水平。料液比的变化对菱角壳黄酮得率的影响极显著(P<0.01)，以上结果表明料液比对菱角壳黄酮得率有影响。

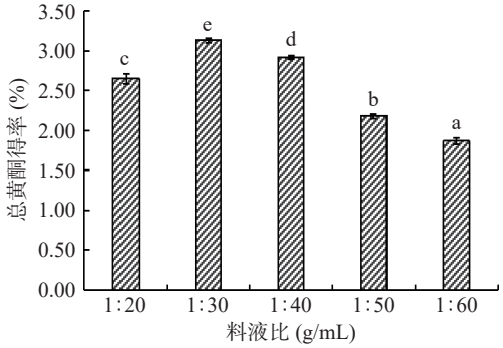

图 2　料液比对菱角壳黄酮提取得率的影响

Fig.2　Effect of the ratio of material to liquid on the extraction yield of water chestnut flavonoids

2.1.3　乙醇浓度对菱角壳黄酮得率的影响结果分析　由图 3 所示，在实验组中，乙醇浓度为 50% 时菱角壳黄酮提取得率最高为 3.20%。当乙醇的浓度超出 50% 时，菱角壳中总黄酮得率与乙醇浓度成反比。原因可能是乙醇浓度过高，某些醇溶性杂质和脂溶性物质的溶出率会增大，使黄酮类物质的溶出受到影响，从而造成菱角壳黄酮的提取率下降。因此，选择乙醇浓度 40%、50%、60% 作为响应面实验的因素水平。乙醇浓度的变化对菱角壳黄酮得率的影响极显著(P<0.01)，以上结果表明乙醇浓度对菱角壳黄酮得率有影响。

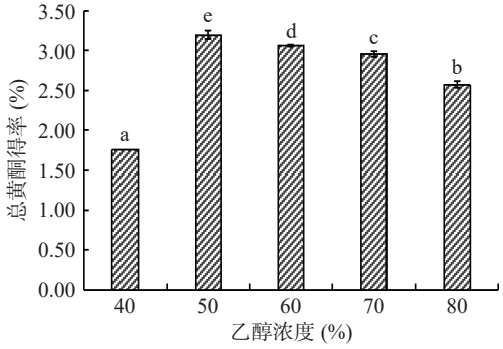

图 3　乙醇浓度对菱角壳黄酮提取得率的影响

Fig.3　Effect of ethanol concentration on the extraction yield of water chestnut flavonoids

2.1.4　提取温度对菱角壳黄酮得率的影响结果分析　如图 4 所示，在实验组中，提取温度为 60 ℃ 时，菱角壳黄酮提取效果最佳，对应总黄酮提取率为 3.11%。当提取温度变化时，40、50、70 ℃ 处理，以及 60、70 ℃ 处理之间对于菱角壳黄酮提取得率的影响差异并不显著(P>0.05)。以上结果表明提取温度对菱角壳黄酮提取得率没有影响，因此在进行响应面试验设计时可以舍去对该因素的讨论，固定提取温度为 60 ℃。

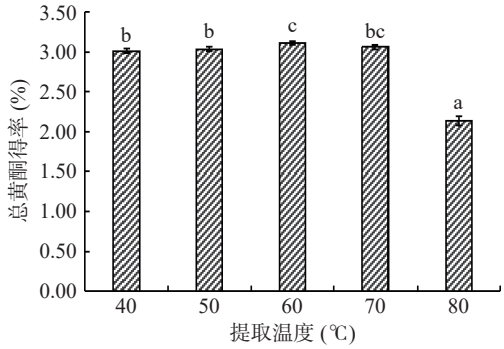

图 4　提取温度对菱角壳总黄酮提取得率的影响

Fig.4　Effect of extraction temperature on the extraction yield of total flavonoids from water chestnut shell

2.2　响应面试验结果分析

2.2.1　响应面试验结果　根据 Design Expert 软件提供的模型，选取提取时间(X_1, min)、料液比(X_2, g/mL)、乙醇的浓度(X_3, %)为变量因素，设定响应值为菱角壳总黄酮得率(Y, %)，响应面试验结果如表 2：

表 2　响应面试验结果

Table 2　Response surface experimental design and results

实验号	X_1	X_2	X_3	Y
1	−1	−1	0	2.720
2	−1	1	0	2.395
3	1	−1	0	2.343
4	1	1	0	1.909
5	0	−1	1	3.311
6	0	−1	−1	2.735
7	0	1	−1	2.631
8	0	1	1	2.803
9	−1	0	−1	2.429
10	1	0	−1	1.953
11	−1	0	1	2.621
12	1	0	1	2.254
13	0	0	0	3.427
14	0	0	0	3.412
15	0	0	0	3.518
16	0	0	0	3.453
17	0	0	0	3.409

2.2.2　回归模型建立及方差分析　通过 Design-Expert 软件进行回归分析得到回归方程：$Y=-9.77070+0.11095X_1+161.07200X_2+0.34237X_3-0.10900X_1X_2+1.36250E-004X_1X_3-0.80800X_2X_3-2.07225E-003X_1^2-1748.16000X_2^2-3.00650E-003X_3^2$，$R^2$=0.9960。如表 3 所示，模型 P<0.0001，达到极显著水平；失拟项

P>0.05，表示方程拟合度良好。方差分析的结果表明提取时间、料液比和乙醇浓度对菱角壳黄酮得率的影响均极显著（P<0.01）。$P(X_1X_2)$>0.05、$P(X_1X_3)$>0.05、$P(X_2X_3)$<0.01，由此证明，料液比（X_2）和乙醇浓度（X_3）的交互作用对菱角壳黄酮得率的影响显著，其余交互作用的影响不显著。

2.2.3　两两因素交互作用分析　为了使结果更直观，做出三维空间图进行进一步的分析：响应面坡度越陡峭，表明响应值对于条件的改变越敏感，该因素对菱角壳黄酮得率的影响越大；反之则表明该因素对菱角壳黄酮得率的影响越小。如图 5 所示，在各因素两两交互作用对总黄酮得率的影响中，提取时间与料液比的交互作用显著，提取时间与乙醇浓度、料液比与乙醇浓度的交互作用对菱角壳黄酮得率的影响不显著，这与方差分析的结果一致。

2.2.4　优化工艺的验证实验　通过 Design-Expert 软件设计响应面试验优化菱角壳黄酮提取工艺的条件，结果显示最佳提取工艺：提取时间 27.65 min、料液比 1∶33.33 g/mL、乙醇浓度 53.13%，对应的总黄酮得率为 3.512%。为了实际操作可行，将最佳工艺条

表 3　回归模型方差分析

Table 3　Analysis of variance of regression model

方差来源	自由度	方差	均方差	F	$Pr>F$
模型	9	4.710	0.520	193.040	<0.0001
X_1	1	0.360	0.360	134.220	<0.0001
X_2	1	0.230	0.230	86.680	<0.0001
X_3	1	0.190	0.190	71.020	<0.0001
X_1X_2	1	2.970E-003	2.970E-003	1.100	0.3300
X_1X_3	1	2.970E-003	2.970E-003	1.100	0.3300
X_2X_3	1	0.041	0.041	15.050	0.0061
X_1^2	1	2.890	2.890	1067.28	<0.0001
X_2^2	1	0.310	0.310	115.900	<0.0001
X_3^2	1	0.380	0.380	140.410	<0.0001
残差误差	7	0.019	2.711E-003		
失拟项	3	0.011	3.626E-003	1.790	0.2880
纯误差	4	8.095E-003	2.024E-003		
总和	16	4.730			

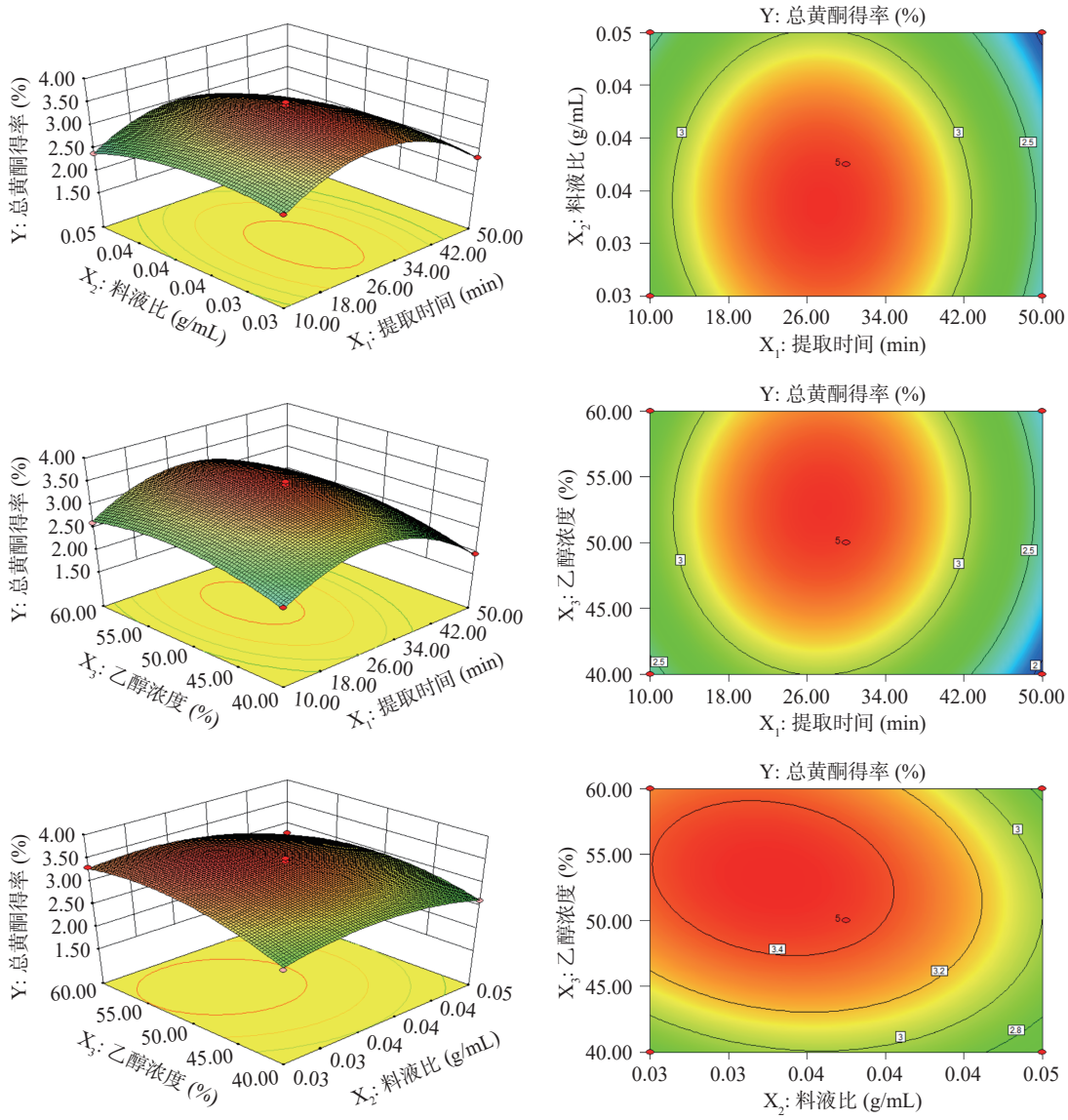

图 5　各因素两两交互作用对总黄酮得率的影响

Fig.5　Effect of the interaction of various factors on the yield of total flavonoids

件修正为：提取时间 28 min、料液比 1∶33 g/mL、乙醇浓度 53%，对应的总黄酮得率为 3.512%，对该工艺条件下进行验证，重复实验三次，得到菱角壳总黄酮得率为 3.455%±0.16%。实际值与模型预测值相近，表明该模型具有一定的可行性。

2.3 菱角壳黄酮对 Hela 细胞增殖的影响

2.3.1 不同药物不同条件对 Hela 细胞增殖的影响

根据不同浓度、不同作用时间的菱角壳黄酮粗提物溶液、菱角壳黄酮纯化物溶液、5-Fu 溶液对 Hela 细胞增殖的抑制率，评价菱角壳黄酮对 Hela 细胞的增殖抑制效果。5-Fu，即胸苷酸合成酶抑制药，是尿嘧啶 5 位上的氢被氟取代的衍生物。5-Fu 在细胞内转变为 5-氟尿嘧啶脱氧核苷酸（5F-dUMP），而抑制脱氧胸苷酸合成酶，阻止脱氧尿苷酸（dUMP）甲基化转变为脱氧胸苷酸（dTMP），从而影响 DNA 的合成。此外，5-FU 在体内可转化为 5-氟尿嘧啶核苷，以伪代谢产物形式掺入 RNA 中干扰蛋白质的合成，从而干扰细胞增殖，可作为阳性对照。

根据表 4 可知菱角壳黄酮粗提物、纯化物均对 Hela 细胞具有抑制作用，这种抑制作用在实验范围内，均弱于阳性对照 5-Fu。同时，菱角壳提取物对 Hela 细胞增殖的抑制作用与提取物的浓度、作用时间均呈正相关，会随着作用时间的增加或作用浓度的升高而增长。本文中的实验组参数范围内，并未出现高浓度或长时间抑制作用。此外，药物浓度低至 50 μg/mL 时，作用相同时间，5-Fu 抑制率>菱角壳黄酮粗提物抑制率>菱角壳黄酮纯化物溶液抑制率，；当药物浓度在 100~800 μg/mL 时，5-Fu 溶液抑制率>菱角壳黄酮纯化物抑制率>菱角壳黄酮粗提物溶液抑制率。出现这种现象的原因可能是，低浓度的菱角壳黄酮对于 Hela 细胞的毒性作用不明显，需要浓度累积，并且由于其对于微生物的抑制作用反而会为 Hela 细胞提供更好的生长环境。黄酮类物质对于 Hela 细胞等肿瘤细胞具有一定的细胞毒性，可通过促进细胞凋亡来抑制其增殖。根据现有文献报道[40−41]，大多数情况下这种抑制作用，有一定的浓度依赖，与本文的研究结果一致。

表 4 不同药物不同条件下对 Hela 细胞增殖的抑制作用

Table 4 Inhibitory effects of different drugs on the growth of Hela cells under different conditions

药物种类	浓度（μg/mL）	抑制率（%）		
		12 h	24 h	48 h
空白对照组	0	0.00	0.00	0.00
菱角壳黄酮粗提物	50	7.07	13.39	20.80
	100	13.34	15.74	26.60
	200	33.29	39.26	42.31
	400	43.18	49.66	51.27
	800	53.31	61.70	76.92
菱角壳黄酮纯化物	50	6.22	7.24	10.05
	100	16.10	18.95	22.77
	200	20.45	22.84	40.50
	400	44.42	46.38	65.10
	800	59.25	63.03	74.16
5-Fu	50	8.32	23.29	30.34
	100	11.41	26.16	42.45
	200	23.08	58.24	57.58
	400	45.91	62.74	66.43
	800	54.31	71.27	75.75

2.3.2 不同药物抑制 Hela 细胞的 IC_{50} 值 IC_{50} 值[42−43]（half maximal inhibitory concentration）是指示某一物质（主要指抑制剂）或者药物在抑制某些生物程序的时半量。在凋亡方面，可以理解为一定浓度的某种药物诱导细胞凋亡率达到 50%，该浓度称为 50% 抑制浓度，即凋亡细胞与全部细胞数之比等于 50% 时所对应的浓度。IC_{50} 值可以用来衡量药物诱导凋亡的能力，即诱导能力越强，该数值越低。

根据表 5 可知随着作用时间的增加，菱角壳黄酮粗提物、纯化物、5-Fu 的 IC_{50} 值逐渐下降，则进一步证明在已验证的 48 h 处理时间内，菱角壳黄酮粗提物、菱角壳黄酮纯化物、5-Fu 对 Hela 细胞的增殖抑制作用均有时间依赖性，呈极显著正相关（$P<0.01$）。同时，以作用时间达到 48 h 为例，菱角壳黄酮粗提物、菱角壳黄酮纯化物、5-Fu 的 IC_{50} 值分别为：271.46、268.16、152.09 μg/mL。菱角壳黄酮纯化物 IC_{50} 值低于菱角壳黄酮粗提物，同时，菱角壳黄酮粗提物、纯化物的 IC_{50} 值均高于 5-Fu。进一步验证说明在实验范围内，菱角壳黄酮纯化物对 Hela 细胞的增殖抑制作用高于菱角壳粗提物，菱角壳提取物对 Hela 细胞的抑制作用均弱于阳性对照 5-Fu。且，不同药物对 Hela 细胞 IC_{50} 值得影响差异显著（$P<0.05$）。

表 5 不同药物对 Hela 细胞增殖抑制作用的 IC_{50} 值

Table 5 Inhibitory effect of purified water chestnut shell flavonoids on the growth of Hela cells

药物种类	IC_{50}值		
	12 h	24 h	48 h
菱角壳黄酮粗提物	600.73^{Cb}	409.35^{Bb}	271.46^{Ac}
菱角壳黄酮纯化物	550.81^{Ca}	473.04^{Bc}	268.16^{Ab}
5-Fu	602.00^{Cc}	238.39^{Ba}	152.09^{Aa}

注：不同大写字母表示相同药物不同时间的IC_{50}值差异极显著，$P<0.01$；不同小写字母表示，相同时间不同药物的IC_{50}值差异显著，$P<0.05$。

3 结论

以菱角壳黄酮粗提物中的总黄酮提取得率为评价指标，优化所得最佳工艺参数为：提取时间 28 min、料液比 1∶33 g/mL、乙醇浓度 53%。在该条件下，菱角壳黄酮的提取率为 3.455%±0.16%。其中，提取温度对最终得率的影响不显著（$P>0.05$），提取时间、料液比、乙醇浓度对于最终结果的影响均极显著（$P<0.01$）。两两交互，仅提取时间与料液比的交互作用对最终菱角壳黄酮粗提物中的总黄酮提取得率影响极显著（$P<0.01$）。通过此工艺提取所得菱角壳黄酮粗提物，以及经过进一步分离纯化的菱角壳黄酮纯化物均能够有效抑制 Hela 细胞的增殖，说明菱角壳黄酮提取物具有一定的抗肿瘤活性。结合抑制率的

变化趋势可知，菱角壳黄酮提取物抑制 Hela 细胞活性对浓度和作用时间有依赖性。在一定范围内，其抑制作用与提取物浓度和作用时间均呈正相关。菱角壳作为菱角生产企业的下脚料，每年产量颇多，直接丢弃会造成了较大的资源浪费。本研究可以对菱角壳以及其它类似的农副产品资源开发利用提供参考。

参考文献

[1] 周光雄，吴志敏，杨政红，等. 菱角皮中鞣质类成分研究[J]. 时珍国医国药，2010，21(6)：1414−1415. [ZHOU G X, WU Z M, YANG Z H, et al. Study on tannins in water chestnut skin[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica, 2010, 21(6): 1414−1415.]

[2] 江燕. 菱角壳化学成分及体外生物活性研究 [D]. 杭州：浙江工业大学，2019. [JIANG Y. Study on the chemical composition and *in vitro* biological activity of water chestnut shell[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2019.]

[3] 左袁袁，吕寒，简暾昱，等. 菱角壳化学成分及其药理作用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报，2019，21(4)：94−99. [ZUO Y Y, LÜ H, JIAN T Y, et al. Research progress on the chemical constituents and pharmacological effects of water chestnut shells[J]. Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2019, 21(4): 94−99.]

[4] 牛凤兰，陈林，宋德锋，等. 菱角的化学成分及药效活性研究进展[J]. 中药材，2009，32(12)：1926−1929. [NIU F L, CHEN L, SONG D F, et al. Research progress on the chemical composition and pharmacodynamic activity of water chestnut[J]. Chinese Medicinal Materials, 2009, 32(12): 1926−1929.]

[5] 董晶莱，高广春. 菱角壳的化学成分和药理活性研究进展[J]. 嘉兴学院医学院学报，2009，8(10)：23−27. [DONG J L, GAO G C. Research progress on the chemical constituents and pharmacological activities of water chestnut shells[J]. Journal of Jiaxing University Medical College, 2009, 8(10): 23−27.]

[6] 任青. 菱角壳提取物的抗癌研究及其胃漂浮片的研制 [D]. 天津：天津大学，2010. [REN Q. Anti-cancer research of water chestnut shell extract and development of gastric floating tablets [D]. Tianjin: Tianjin University, 2010.]

[7] WU C H, DING Y Z. Study of different extracts from water caltrop shells on inhibiting lung cancer cell line A549[J]. Journal of TCM Univ of Hunan, 2012, 32(1): 27−30.

[8] 林秋生. 菱壳生物活性成分分析及抗胃癌机制研究 [D]. 杭州：浙江大学，2013. [LIN Q S. Analysis of bioactive components of rhizome and study on anti-gastric cancer mechanism[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2013.]

[9] NING Y, YU H N, ZHOU X M, et al. Optimal process for semi-bionic extraction of bioactive compounds against gastric cancer from water chestnut shell by uniform designation[J]. Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci.), 2011, 37(3): 332−337.

[10] DONG J L, GAO G C. Review on the phytochemical and pharmacological study of trapa shell[J]. Journal of Jiaxing University, 2014, 26(26): 68−71.

[11] 牛凤兰，李晨旭，董威严，等. 菱壳水提物对胃癌细胞抑制作用的实验研究 [J]. 白求恩医科大学学报，2001，27(5): 495−496. [NIU F L, LI C X, DONG W Y, et al. Experimental study on the inhibitory effect of water extract of water chestnut shells on gastric cancer cells[J]. Journal of Baiqiuen Medical University, 2001, 27(5): 495−496.]

[12] 李亚军，梁忠厚. 黄酮类化合物提取研究进展[J]. 粮食与油脂，2021，34(11)：14−17. [LI Y J, LIANG Z H. Research progress on the extraction of flavonoids[J]. Food and Oils, 2021, 34(11): 14−17.]

[13] 刘冬敏，王建辉，刘永乐. 菱角壳中黄酮、总酚和皂苷的提取及其抗氧化性研究[J]. 食品安全质量检测学报，2016，7(9)：3668−3672. [LIU D M, WANG J H, LIU Y L. Extraction of flavonoids, total phenols and saponins from water chestnut shells and their antioxidant properties[J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection, 2016, 7(9): 3668−3672.]

[14] TULYAHAN V, BOONDEE K, MAHAWANICH T. Characteristics of starch from water chestnut (*Trapa bispinosa* Roxb.)[J]. Journal of Food Biochemistry, 2005, 29(4): 337−348.

[15] 李丽，李杰民，盛金凤，等. 超声波提取罗汉果渣中的黄酮优化工艺研究[J]. 食品研究与开发，2016，37(15)：61−65. [LI L, LI J M, SHENG J F, et al. Study on the optimization technology of ultrasonic extraction of flavonoids from Luo Han Guo pomace[J]. Food Research and Development, 2016, 37(15): 61−65.]

[16] 胡金颖，代立霞，张丹参，等. 酸枣仁中黄酮类物质药理作用研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志，2021，35(10)：785−786. [HU J Y, DAI L X, ZHANG D S, et al. Research progress on the pharmacological effects of flavonoids in jujube seed[J]. Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology, 2021, 35(10): 785−786.]

[17] 李志平，李护护. 银杏叶中黄酮类化合物的提取和分离[J]. 中国油脂，2021，46(2)：131−134. [LI Z P, LI H H. Extraction and separation of flavonoids from ginkgo biloba leaves[J]. China Oils and Fats, 2021, 46(2): 131−134.]

[18] 陈惠卿，陈惠婷，张颖，等. 乙醇法制备葛花醇提物的工艺优化及其抗氧化活性[J]. 福建轻纺，2021(10)：2−8,11. [CHEN H Q, CHEN H T, ZHANG Y, et al. Process optimization and antioxidant activity of ethanol extracts of *Pueraria lobata* flower prepared by ethanol[J]. Fujian Textile, 2021(10): 2−8,11.]

[19] 李鹏婧，柳旭光，龙海荣，等. 超声波辅助提取菱角壳总黄酮及抗氧化性研究[J]. 食品科技，2011，36(1)：167−171. [LI P J, LIU X G, LONG H R, et al. Ultrasonic-assisted extraction of total flavonoids from water chestnut shells and their antioxidant properties[J]. Food Science and Technology, 2011, 36(1): 167−171.]

[20] 高慧，付强，孙洁，等. 黄酮类化合物及其纳米制剂在肿瘤防治中的研究进展[J]. 肿瘤代谢与营养电子杂志，2020，7(3)：362−365. [GAO H, FU Q, SUN J, et al. Research progress of flavonoids and their nano-preparations in tumor prevention and treatment[J]. Electronic Journal of Tumor Metabolism and Nutrition, 2020, 7(3): 362−365.]

[21] LISKOVA A, SAMEC M, KOKLESOVA L, et al. Flavonoids as an effective sensitizer for anti-cancer therapy: Insights into multi-faceted mechanisms and applicability towards individualized patient profiles[J]. The EPMA Journal, 2021(prepublish): 21−22.

[22] WANG J G, JIAN W J, LI Y, et al. Nobiletin promotes the pyroptosis of breast cancer via regulation of miR-200b/JAZF1 axis[J]. The Kaohsiung Journal of Medical Sciences, 2021, 37(7): 572−582.

[23] GANAI S A, SHEIKH F A, BABA Z B, et al. Anticancer activity of the plant flavonoid luteolin against preclinical models

of various cancers and insights on different signalling mechanisms modulated[J]. Phytotherapy Research: PTR, 2021, 35(7): 3509−3532.

[24] 王雪, 刘景楠, 夏顺利, 等. 中药总黄酮抗肿瘤活性及机制的研究现状[J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(4): 484−486,496. [WANG X, LIU J N, XIA S L, et al. Research status of anti-tumor activity and mechanism of total flavonoids of traditional Chinese medicine[J]. Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 2021, 37(4): 484−486,496.]

[25] 许地元, 叶萍, 李海丽, 等. 苞叶雪莲总黄酮提取工艺优化及其粗提物抗肿瘤活性[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(4): 130−134. [XU D Y, YE P, LI H L, et al. Optimization of the extraction process of the total flavonoids of *Saussurea praecox* and the anti-tumor activity of the crude extract[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2021, 49(4): 130−134.]

[26] 刘冬敏, 王建辉, 刘永乐, 等. 菱角壳中总黄酮提取工艺的优化[J]. 食品与机械, 2016, 32(5): 173−176. [LIU D G, WANG J H, LIU Y L, et al. Optimization of extraction process of total flavonoids in water chestnut shells[J]. Food and Machinery, 2016, 32(5): 173−176.]

[27] LI C B, XU M Y, CHEN Y, et al. Extraction of flavonoids from sword flower and methodology of its preparations[J]. International Journal of Food Science and Biotechnology, 2021, 6(1).

[28] 王艳, 张铁军. 微波萃取技术在中药有效成分提取中的应用[J]. 中草药, 2005, 36(3): 67. [WANG Y, ZHANG T J. Application of microwave extraction technology in the extraction of effective components of traditional Chinese medicine[J]. Chinese Herbal Medicine, 2005, 36(3): 67.]

[29] LIAO J Q, GUO Z R, YU G C. Process intensification and kinetic studies of ultrasound-assisted extraction of flavonoids from peanut shells[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2021, 76: 56−61.

[30] 许一平, 王新功, 梁伟玲, 等. 酶解-超声偶联法提取桔梗茎叶总黄酮的工艺研究[J]. 化工管理, 2020(29): 19−20,34. [XU Y P, WANG X G, LIANG W L, et al. Study on the technology of extracting total flavonoids from *Platycodon grandiflorum* stems and leaves by enzymolysis-ultrasonic coupling[J]. Chemical Management, 2020(29): 19−20,34.]

[31] 郑菲艳, 洪佳敏, 徐晓俞, 等. 木豆叶提取液膜分离纯化研究[J]. 福建农业学报, 2016, 31(10): 1122−1125. [ZHENG F Y, HONG J M, XU X Y, et al. Study on separation and purification of pigeon pea leaf extract with liquid membrane[J]. Fujian Journal of Agriculture, 2016, 31(10): 1122−1125.]

[32] 牛凤兰, 黄占有, 吴秀华, 等. 菱角挥发成分超临界萃取及GC-MS方法检测[J]. 中国公共卫生, 2009, 25(1): 119−120. [NIU F L, HUANG Z Y, WU X H, et al. Supercritical extraction and GC-MS detection of volatile components of water chestnut[J]. Chinese Public Health, 2009, 25(1): 119−120.]

[33] SHIREEN A, FERDUSEE A M, MOUTIUR R M, et al. Computational and experimental studies to optimize the extraction of flavonoids from mango powder using response surface methodology[J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2021 (prepublish): 1−12.

[34] 刘瑞芳, 张志迪, 陈梦茜, 等. PHF19对宫颈癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响[J]. 牡丹江医学院学报, 2021, 42(3): 8−12. [LIU R F, ZHANG Z D, CHEN M X, et al. The effect of PHF19 on the proliferation, invasion and migration of cervical cancer cells[J]. Journal of Mudanjiang Medical College, 2021, 42(3): 8−12.]

[35] 邓春玲, 朱坤, 刘涛瑞, 等. 敲低葡萄糖-6-磷酸酶催化亚基(G6PC)阻断AKT/mTOR通路抑制宫颈癌HeLa细胞增殖、侵袭和迁移[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2021, 37(6): 520−526. [DENG C L, ZHU K, LIU T R, et al. Knockdown of the glucose-6-phosphatase catalytic subunit (G6PC) blocks the AKT/mTOR pathway and inhibits the proliferation, invasion and migration of cervical cancer HeLa cells[J]. Cells and Journal of Molecular Immunology, 2021, 37(6): 520−526.]

[36] TOMINAGA H, ISHIYAMA M, OHSETO F, et al. A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay[J]. Anal Commun, 1999, 36(1): 47−50.

[37] LIU A Q, XIA L. Comparative study on the optimal experiment conditions between CCK-8 and MTT in rabbit fibroblasts[J]. Medical Innovation of China, 2013, 10(2): 12−13.

[38] 李玉霞, 尚庆坤, 许蕾蕾. AB-8大孔树脂对菱角壳黄酮提取物的吸附性能研究[J]. 北华大学学报(自然科学版), 2006(5): 403−406. [LI Y X, SHANG Q K, XU L L. Study on the adsorption performance of AB-8 macroporous resin to the extract of water chestnut shell flavonoids[J]. Journal of Beihua University (Natural Science Edition), 2006(5): 403−406.]

[39] 徐晶, 陈再兴, 袁昌鲁. 大孔吸附树脂富集纯化黄芩总黄酮的工艺研究[J]. 中医药学刊, 2006(9): 1648−1649. [XU J, CHEN Z X, YUAN C L. Study on the process of enrichment and purification of total flavonoids from *Scutellaria baicalensis* Georgi with macroporous adsorption resin[J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2006(9): 1648−1649.]

[40] 李新明, 李群. 大枣黄酮的抗菌与抗肿瘤活性研究[J]. 农产品加工, 2020(22): 12−14. [LI X M, LI Q. Research on antibacterial and antitumor activities of jujube flavonoids[J]. Agricultural Products Processing, 2020(22): 12−14.]

[41] 李亚男. 黄芪抗肿瘤的有效成分及作用机制的研究进展[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2017. [LI Y N. Research progress on anti-tumor active ingredients and mechanism of astragalus [D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2017.]

[42] 袁燕, 李艳红, 段先乐, 等. 蒜头果蛋白对HeLa细胞体外抗肿瘤活性及稳定性研究[J]. 云南民族大学学报(自然科学版), 2021, 30(5): 454−458. [YUAN Y, LI Y H, DUAN X L, et al. *In vitro* anti-tumor activity and stability of *Allictocarpus* protein on HeLa cells[J]. Journal of Yunnan Nationalities University (Natural Science Edition), 2021, 30(5): 454−458.]

[43] 王姗姗, 刘明, 刘英, 等. MTT法测定多柔比星和氟尿嘧啶及顺铂对肝癌耐药细胞Bel-7402/ADM的IC_{50}值[J]. 医药报, 2010, 29(5): 579−581. [WANG S S, LIU M, LIU Y, et al. MTT method to determine the IC_{50} value of doxorubicin, fluorouracil and cisplatin on the resistance of liver cancer cell Bel-7402/ADM[J]. Medical Journal, 2010, 29(5): 579−581.]