

Preliminary Study on the Effect of Crude Polysaccharide from *Brasenia schreberi* on HeLa Cell Growth

Jing Chen¹, Qiuyu Zhang^{1,2}, Guanghui Yu^{1,2*}

¹China *Brasenia schreberi* Research Institute, College of Life Sciences, South-Central University for Nationalities, Wuhan Hubei

²Hubei Provincial Key Laboratory for Protection and Application of Special Plants in Wuling Area of China, South-Central University for Nationalities, Wuhan Hubei
Email: *yusheen@163.com

Received: Feb. 11th, 2020; accepted: Mar. 6th, 2020; published: Mar. 17th, 2020

Abstract

To explore the inhibitory effect of crude *Brasenia schreberi* polysaccharides on HeLa cells, the crude polysaccharide (BSP) was extracted from the shoots of *Brasenia schreberi* in Lichuan City, Hubei Province. The inhibition rate was measured by MTT method, the cells were observed by AO-PI double staining, the different abnormal cell morphology was counted, and the expression of some cancer-related genes was detected by RT-qPCR. At the initial density of 2000 cells/well, HeLa cells were inhibited by 500 µg/mL BSP. With the increase of BSP concentration, the proportion of type I decreased and the proportion of type II, III and IV increased. When HeLa cells were treated with 250 µg/mL BSP for 12 hours, the relative expression levels of *p53*, *Cyclin D1*, *CDK2* and *CDK7* genes were about 2-fold of the control. The inhibitory effect of BSP on HeLa cells was time-dependent and concentration-dependent, and it would destroy cell membrane and change cell morphology. The inhibition may be related to the accumulation of *p53* and cyclin.

Keywords

Polysaccharides, *Brasenia schreberi*, HeLa, MTT, AO-PI

莼菜粗多糖对Hela细胞生长影响的初步研究

陈 晶¹, 张秋玉^{1,2}, 余光辉^{1,2*}

¹中南民族大学生命科学院, 中国莼菜研究所, 湖北 武汉

²中南民族大学, 武陵山区特色资源植物种质保护与利用湖北省重点实验室, 湖北 武汉
Email: *yusheen@163.com

*通讯作者。

摘要

为探究莼菜粗多糖对Hela细胞生长的抑制作用，本研究以湖北省利川市莼菜嫩芽为原材料，提取粗多糖(BSP)，通过MTT法测抑制率，AO-PI双染观察细胞，对不同非正常细胞形态进行计数，用RT-qPCR方法检测部分癌症相关基因表达情况。在2000个/孔细胞初始密度时，500 μg/mL BSP就对Hela细胞有抑制作用，2000 μg/mL BSP处理Hela细胞72 h，抑制率可达到96.88%。BSP诱导Hela细胞产生四种非正常形态，随BSP浓度升高，I型比例减小，II、III、IV型比例增大。250 μg/mL BSP处理Hela细胞12 h，p53、Cyclin D1、CDK2和CDK7基因相对表达水平均在2倍左右。BSP对Hela细胞的抑制作用呈时间浓度依赖，且会破坏细胞膜，改变细胞形态。抑制作用可能与p53及细胞周期等调控基因的积累有关。

关键词

多糖，莼菜，Hela，MTT，AO-PI

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

多糖是由十个以上单糖通过糖苷键结合形成的大分子物质，广泛存在于动物、植物、微生物中。和DNA、蛋白质等大分子一样，多糖是植物维持正常生理活动必不可少的重要物质。有大量关于多糖的研究显示出植物多糖具有广泛的药理作用，如免疫调节、抗肿瘤作用、抗氧化、抗病毒、降血糖、降脂和抗辐射作用。比如，啤酒花(*Humulus lupulus*)多糖能显著促进MC3T3-E1细胞的增殖、分化和矿化，具有成骨作用[1]。灰树花(*Grifola frondosa*)多糖通过TLR4-MyD88-IKKβ-NF-κBp65信号途径激活巨噬细胞[2]。野生仙人掌(*Opuntia dillenii* Haw)多糖能抑制SK-MES-1细胞的生长，诱导细胞周期S期阻滞，还可引起细胞凋亡[3]。凹顶藻(*Laurencia obtusa*)多糖对丙型肝炎病毒(HCV)的抑制率达82.36%，马尾藻(*Sargassum vulgare*)多糖对自由基的清除剂能力高达81.5% [4]。西府海棠(*Malus micromalus*)多糖对羟自由基、DPPH自由基和超氧阴离子均有不同程度的清除作用，还能提高抗氧化酶系统的活性，发挥一定的抗衰老作用[5]。桑树(*Morus alba* L.)枝多糖可通过调节胰内JNK/p38途径发挥明显的降血糖作用[6]。芦荟(*Aloe vera*)多糖可能通过Keap1/Nrf2/ARE信号通路对NGF激活的皮肤神经细胞PC12的UVB损伤具有修复作用[7]。

莼菜(*Brasenia schreberi*)属睡莲科莼属，多年生水生植物，是中国历史悠久的药食兼用的珍贵蔬菜。莼菜嫩芽外裹有一层厚厚的透明胶质，其中的主要成分多糖[8]，也是莼菜嫩芽药用价值的主要来源。莼菜味甘性寒，具有清热、利水、消肿、解毒的功效。治热痢、黄疸、痈肿、疔疮，胃病(包括慢性胃炎，胃溃疡，胃癌等)。《医林纂要》载“除烦，解热，消痰”。《本草纲目》记载，莼菜可以消渴热痹，和鲫鱼作羹时下气止呕，补大小肠虚气，治热疽，厚肠胃，安下焦，逐水解毒。研究表明，莼菜多糖具有降血糖[9]、降血脂[10]以及抗氧化活性[11]，而莼菜多糖对癌症的抑制作用未见详实报道。本实验以湖北省利川市莼菜嫩芽为原材料，提取粗多糖，初步探究了莼菜粗多糖对Hela细胞生长的影响，提高莼菜综合利用的可能途径。

2. 材料和方法

2.1. 实验材料

新鲜莼菜嫩芽于 2018 年 7 月在湖北省利川市佛宝山基地和凉雾基地采摘, 冰盒保鲜运回。Hela 细胞 (GDC009) 购自中国典型培养物保藏中心武汉大学保藏中心。

2.2. 莼菜嫩芽粗多糖提取

新鲜莼菜嫩芽, 用自来水缓流冲洗 3 min, 灭菌超纯水洗涤三次。放入 0.1 mol/L NaOH 溶液中, 料液比 1:2 (w/v), 60℃ 搅拌提取 1.5 h; 提取液冷却至室温, 过 200 目网筛, 去除大块残渣。抽滤, 取上清, 用 HCl 调节溶液 pH 至 7.0。Sevag 法[12]除蛋白, 用分液漏斗分离有机相和无机相, 重复至离心后无蛋白层。收集上层水相, 12,000 rpm 常温离心 10 min, 留取上清, 得莼菜粗多糖蛋白质层, 加入四倍体积 95% 乙醇, 4℃ 醇析过夜, 然后 12,000 rpm, 4℃ 离心, 取沉淀。用超纯水溶解沉淀, 12,000 rpm, 4℃ 离心, 取上清, 分装, 冷冻干燥, 得莼菜粗多糖固体(BSP)。

2.3. Hela 细胞复苏与传代培养

取出冻存于液氮中的 Hela 细胞, 迅速 37℃ 水浴融化, 将 1 mL 冻存液转至 T25 细胞培养瓶, 加 4 mL DMEM 培养基, 在 37℃ 的 5% CO₂ 气氛中培养。次日用 5 mL PBS 轻柔洗涤细胞, 换新鲜 DMEM 培养基。待细胞长至约 10⁶ 个/mL 时(占瓶底 85% 左右), 吸弃旧培养基, 5 mL PBS 轻柔洗涤细胞, 加入 1 mL 胰酶(含 EDTA) 37℃ 消化约 2 min, 吸弃胰酶, 加入 2 mL DMEM 培养基, 吹匀, 根据所需比例留存细胞悬液, 补新鲜 DMEM 培养基至 5 mL。

2.4. MTT 法测定 Hela 细胞生长曲线

待细胞密度长至 10⁶ 个/mL 左右时, 吸弃旧培养基, 5 mL PBS 轻柔洗涤细胞, 加入 1 mL 胰酶(含 EDTA) 37℃ 消化约 2 min, 吸弃胰酶, 加入 2 mL DMEM 培养基, 吹匀。对细胞悬液进行计数, 将细胞悬液稀释成 1000 个/mL、2500 个/mL、5000 个/mL、7500 个/mL、1 × 10⁴ 个/mL、2 × 10⁴ 个/mL、2.5 × 10⁴ 个/mL、5 × 10⁴ 个/mL、1 × 10⁵ 个/mL, 96 孔板每孔 200 μL 细胞稀释液, 每个浓度六个重复孔。培养 24~168 h 后, 每孔加入 20 μL MTT (5 mg/mL)。37℃ 孵育 4 h 后, 吸净培养上清液, 每孔加入 150 μL 二甲基亚砷(DMSO), 90 rpm 震荡 10 min, 用酶标仪测定 490 nm 处吸光度。

2.5. MTT 法测 BSP 对细胞生长抑制率

细胞活力的测定按照 Zhang *et al.* 的方法进行[13]。Hela 细胞长至 10⁶ 个/mL 左右时, 吸弃旧培养基, 5 mL PBS 轻柔洗涤细胞, 加入 1 mL 胰酶(含 EDTA) 37℃ 消化约 2 min, 吸弃胰酶, 加入 2 mL DMEM 培养基, 吹匀。对细胞悬液进行计数, 根据需要体积稀释细胞悬液至 2 × 10⁴ 个/mL。将细胞分为以下 4 组: 1) 零对照组, 只含培养基; 2) 阴性对照组, 加入细胞, 不加多糖; 3) 阳性对照组: 加入细胞, 50 μg/mL 5'-Fu (5'-氟尿嘧啶); 4) 实验组, 加入细胞和不同浓度多糖溶液。除零对照组 100 μL DMEM 培养基外, 96 孔板每孔加入 100 μL 细胞稀释液, 6 个重复孔。周围一圈填 200 μL PBS 溶液。4~6 h 细胞贴壁, 零对照组和阴性对照组每孔加 100 μL 2 × 多糖溶液。每隔 12 h 测一组 490 nm 处吸光值。用以下公式计算细胞的抑制率:

细胞抑制率 = (Ac - A1)/(Ac - A0) × 100%; A0: 空白组吸光度; A1: 实验组(包含阳性对照组)吸光度; Ac: 阴性对照组吸光度。

2.6. 吖啶橙 - 碘化丙啶(AO-PI)双染

吖啶橙(AO)用 PBS 配制 5 mg/mL 储存液, 过滤除菌。同样方法配制 3 mg/mL PI 储存液。使用时, 将 1 μ L AO 和 1 μ L PI 储存液加入 1 mL PBS 混匀。用培养皿(3 cm, Nest)培养细胞, BSP 处理一定时间后, 吸净培养皿上清, 加入 500 μ L 染液, 立即在荧光显微镜下观察细胞, 蓝光激发。

2.7. RT-qPCR

细胞总 RNA 的提取按照总 RNA 小量制备试剂盒的方法进行。用反转录试剂盒对提取的总 RNA 进行逆转录, 获得用于实时荧光定量 PCR 的 cDNA。实时荧光定量 PCR 采用 2xT5 Fast qPCR Mix (SYBR Green I)试剂盒, 按照说明书进行操作, 引物见表 1。RT-qPCR 采用三步法, 反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 1 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 53 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10~15 s, 40 次循环。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算相对表达量。

Table 1. Primers of RT-qPCR
表 1. RT-qPCR 引物

引物名称	引物序列(5'→3')
<i>GAPDH-F</i>	GGAGTCCACTGGCGTCTTCA
<i>GAPDH-R</i>	GTCATGAGTCTTCCACGATACC
<i>P53-F</i>	CCTGGATTGGCCAGACTGC
<i>P53-R</i>	TTTTTCAGGAAGTAGTTTCCATAGGT
<i>Cyclin D1-F</i>	AAAGAATTTGCACCCCGCTG
<i>Cyclin D1-R</i>	GACAGACAAAGCGTCCCTCA
<i>CDK2-F</i>	TCTTTGCTGAGATGGTGACTCG
<i>CDK2-R</i>	CACTTGGGGAAACTTGGCTTG
<i>CDK7-F</i>	GAAGTGGGTGTTGGAGGCTT
<i>CDK7-R</i>	TAACGCTTTGCCCGAGACTT

3. 结果

3.1. 生长曲线确定 2000 个/孔作为 HeLa 细胞培养的起始密度

HeLa 细胞在初始密度低于 2000 个/孔时, 72 小时内吸光值低于 0.3, 初始密度大于 2000 个/孔时, 吸光值在 72 小时时超过 0.7, 均不能使吸光值与细胞密度保持良好的线性关系(图 1)。初始密度为 2000 个/孔时, 处理时间 24~72 h 范围内, 吸光值和培养时间能呈良好的线性关系, 且吸光值在 0.3~0.7 的范围内, 能够保证吸光值和细胞密度呈较好的线性关系初始浓度(图 1)。所以后续的细胞实验选用 2000 个/孔作为起始密度。

3.2. BSP 对 HeLa 细胞生长的抑制呈现时间和剂量依赖效应

细胞活力测定结果表明, BSP 对 HeLa 细胞的生长抑制作用, 呈时间和浓度依赖性, 随 BSP 浓度升高, 处理时间增加, 抑制率升高(图 2)。在 BSP 浓度为 500 μ g/mL 时, 开始有抑制作用, 处理 72 h, 抑制率达 13.58%; BSP 浓度为 1500 μ g/mL 时, 相同处理时间较 1000 μ g/mL 抑制率提高一倍左右; 2000 μ g/mL BSP 处理 12 h 时, 抑制率已经达到 24.60%, 处理 72 h 抑制率高达 96.88% (图 2)。实验结果表明, 所有浓度 BSP 处理 HeLa 细胞 12 h~48 h 抑制率增长明显, 48 h 后抑制率增长缓慢。

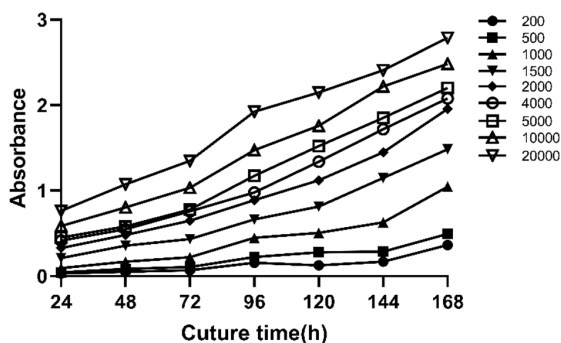


Figure 1. Growth curve of HeLa cells

图 1. HeLa 细胞生长曲线

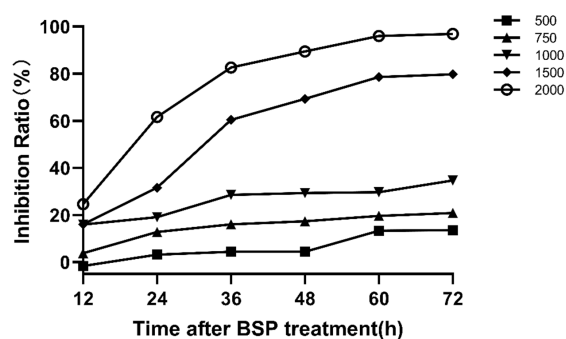
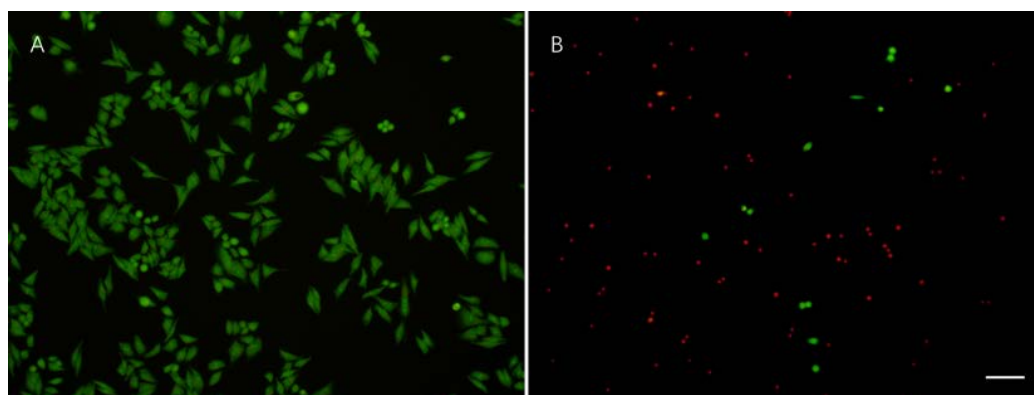


Figure 2. Inhibition of BSP on HeLa cells

图 2. BSP 对 HeLa 细胞生长抑制率

3.3. BSP 导致 HeLa 细胞皱缩变圆

用 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSP 处理 HeLa 细胞 48 h, 含 10%胎牛血清 DMEM 高糖培养基处理 48 h 的 HeLa 细胞作为对照组。用 AO-PI 双染料对细胞进行染色处理, 绿色的为活细胞, 红色的为死细胞。可以看到对照组细胞均为绿色(图 3(A)), 绝大部分细胞形态都为清晰的梭形; 用 BSP 处理后的 83%的细胞被染成红色, 已完全失去梭形形态, 变为圆形, 少量被染成绿色的细胞也呈圆形, 17%的细胞被染成绿色, 且保持梭形(图 3(B))。



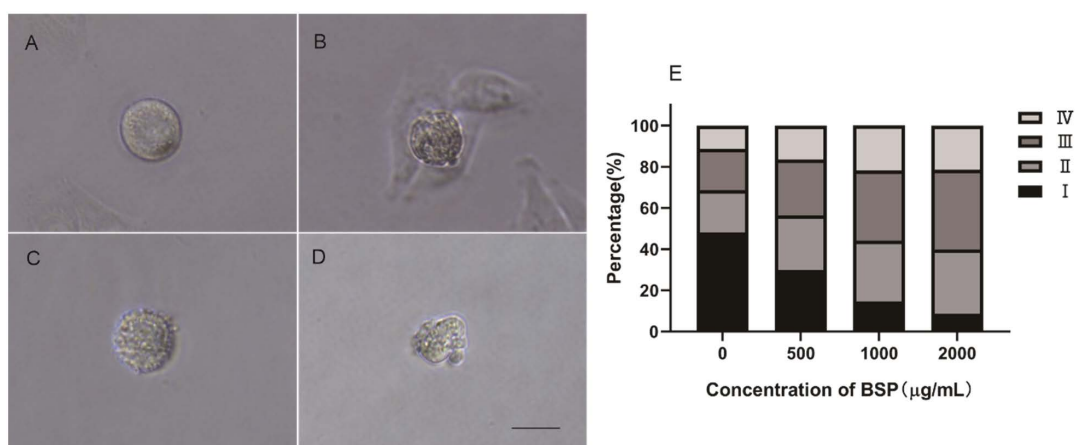
(A) 对照组; (B) 实验组 Bar = 50 μm 。

Figure 3. AO-PI Staining

图 3. AO-PI 双染

3.4. BSP 诱导 HeLa 产生四种非正常形态细胞

BSP 处理 HeLa 后, 在 10×物镜下观察到大量细胞皱缩变圆, 在 40×物镜下观察变圆的细胞, 按形态可分为四种。第一种是细胞变圆, 但细胞膜光滑完整(图 4(A)), 记为 I。第二种是细胞膜出现少量突起(图 4(B)), 细胞内部密度不均匀, 记为 II。第三种是有许多突起伸出细胞膜(图 4(C)), 记为 III。第四种是细胞皱缩成不规则形状, 呈现小泡形态(图 4(D)), 记为 IV。BSP 系列浓度(500~2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理 48 h 后的 HeLa 后, 细胞形态统计分析表明, 随着 BSP 浓度从 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 上升到 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, I 型细胞从 48.04% 下降到 8.62%, II 型细胞从 20.59% 上升到 31.19%, III 型细胞从 20.00% 上升到 38.72%, IV 型细胞从 11.37% 上升到 21.47% ($n > 500$) (图 4(E))。



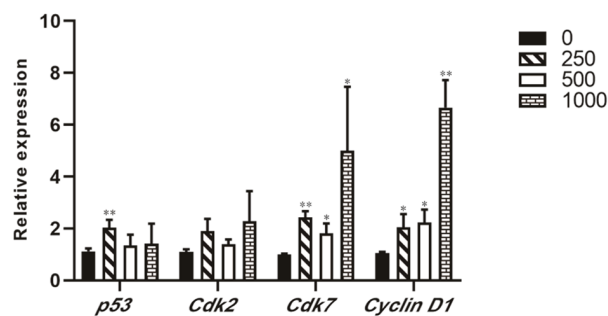
(A) I 型; (B) II 型; (C) III 型; (D) IV 型; (E) BSP 处理 48 h 后对四种非正常细胞类型的数量统计。Bar = 20 μm 。

Figure 4. Four types of abnormal morphology induced by BSP

图 4. BSP 诱导的四种非正常形态细胞

3.5. BSP 诱导部分癌症相关基因表达上调

分别用 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度 BSP 处理 HeLa 细胞 12 h 后, 用 RT-qPCR 检测细胞 *p53*, *Cyclin D1*, *CDK2*, *CDK7* 的相对表达水平, 用 *GAPDH* 作为内参基因。所用引物见表 1。在三个浓度下, *p53* 和 *CDK2* 均保持 2 倍左右相对表达水平。在 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, *Cyclin D1* 和 *CDK7* 的表达水平是对照的 2 倍, 但是 BSP 浓度上升到 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后, *Cyclin D1* 相对表达水平上升到 7 倍, *CDK7* 相对表达水平上升到 5 倍(图 5)。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 5. Relative expression level of some cancer related genes

图 5. 部分癌症相关基因相对表达水平

4. 讨论

本研究的结果初步表明, BSP 对 HeLa 细胞的抑制作用呈时间和浓度依赖性, 浓度越高, 处理时间越长, 抑制作用越强。AO-PI 双染和非正常形态统计结果显示, BSP 处理后, HeLa 细胞的形态发生改变, 由正常的梭形皱缩变圆, 细胞膜也有一定程度改变。

BSP 处理 HeLa 细胞 12 h 就有一定的抑制作用, 到 48 h 抑制率增长趋于平缓, 说明在 12 h 甚至之前就已经有相关基因发生变化。*p53* 基因编码一种包含转录激活、DNA 结合和寡聚结构域的肿瘤抑制蛋白。这种基因的突变与多种人类癌症有关, 包括遗传性癌症, 如李·弗劳门尼综合征[14]。有研究发现灵芝多糖对大肠癌细胞突变型 *p53* 抑癌作用有恢复作用[15]。BSP 在 250 $\mu\text{g/mL}$ 浓度处理 12 h, *p53* 基因相对表达水平增加 1 倍, 说明 BSP 确实能够刺激 *p53* 基因的表达, 从而抑制癌细胞增殖。

Cyclin D1 基因编码的蛋白质属于高度保守的细胞周期蛋白家族, 是 CDK 激酶的调节因子。该基因编码的细胞周期蛋白与 CDK4 或 CDK6 形成复合物, 并作为其调节亚单位发挥作用, 其活性是细胞周期 G1/S 转换所必需的。大英素通过 *Cyclin D1/CDK4* 介导的途径抑制 MCF-7 和 MDA-MB-468 乳腺癌细胞的增殖[16]。*Cyclin D1* 的表达水平显示 BSP 对 HeLa 的抑制作用可能与细胞周期相关蛋白积累有关。

CDK2 基因编码细胞周期蛋白依赖性激酶 2 (*CDK2*), 该蛋白是细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶复合物的催化亚单位, 它调节整个细胞周期的进展。这种蛋白的活性在 G1 到 S 期转变过程中尤为重要。*CDK2* 通过 DNA 损伤、细胞内转运、蛋白质降解、信号转导、DNA 和 RNA 代谢和翻译等途径与蛋白质相互作用并磷酸化。*CDK2* 及其调节亚单位在许多人类癌症中被解除调节, 研究表明 *CDK2* 抑制在具有明确遗传特征的肿瘤子集中引起抗肿瘤活性[17]。所以 *CDK2* 的表达水平提高也显示了 BSP 对 HeLa 的抑制作用。

CDK7 基因编码的蛋白是细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶(CDK)家族的成员, 是细胞周期进程的重要调控因子。该蛋白与细胞周期素 H 和 MAT1 形成三聚体复合物, 发挥 CDK 激活激酶(CAK)的作用。*CDK7* 的抑制扰乱了小细胞肺癌(SCLC)的细胞周期进程, 诱导 DNA 复制应激和基因组不稳定, 同时触发免疫应答信号。这些肿瘤的内在事件激发由 T 细胞诱导的强大的免疫监视程序, 而通过增加免疫检查点阻断, 免疫监视程序进一步增强[18]。BSP 处理后, HeLa 细胞内 *CDK7* 表达水平增高正是其通过增加免疫检查点阻断发挥抑制作用的体现之一。

本研究初步证实了 BSP 对 HeLa 细胞的生长具有抑制作用, 但作用浓度偏大, 可能是因为粗多糖中多糖组分多导致, 后期还需对 BSP 进行分离纯化, 筛选出抑制作用贡献最大的组分, 并详细探究 BSP 对癌细胞发挥抑制作用的机理。

基金项目

中央高校基本科研业务费专项基金项目莼菜综合开发利用关键技术(CZP17051)。

参考文献

- [1] Chen, X., Li, T., Qing, D., *et al.* (2019) Structural Characterization and Osteogenic Bioactivities of a Novel *Humulus lupulus* Polysaccharide. *Food & Function*, **11**, 1165-1175. <https://doi.org/10.1039/C9FO01918A>
- [2] Hou, L., Meng, M., Chen, Y. and Wang, C. (2017) A Water-Soluble Polysaccharide from *Grifola frondosa* Induced Macrophages Activation via TLR4-MyD88-IKK β -NF- κ B p65 Pathways. *Oncotarget*, **8**, 86604-86614. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21252>
- [3] Li, W., Wu, D., Wei, B., *et al.* (2014) Anti-Tumor Effect of Cactus Polysaccharides on Lung Squamous Carcinoma Cells (SK-MES-1). *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, **11**, 99-104. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v11i5.16>
- [4] Gheda, S.F., El-Adawi, H.I. and El-Deeb, N.M. (2016) Antiviral Profile of Brown and Red Seaweed Polysaccharides Against Hepatitis C Virus. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, **15**, 483-491.

- [5] Yang, H., Hua, J.-L. and Wang, C. (2019) Anti-Oxidation and Anti-Aging Activity of Polysaccharide from *Malus micromalus* Makino Fruit Wine. *International Journal of Biological Macromolecules*, **121**, 1203-1212. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.096>
- [6] Xu, L., Yang, F., Wang, J., et al. (2015) Anti-Diabetic Effect Mediated by *Ramulus mori* Polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, **117**, 63-69. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.09.052>
- [7] Yuan, L., Duan, X., Zhang, R., et al. (2019) Aloe Polysaccharide Protects Skin Cells from UVB Irradiation through Keap1/Nrf2/ARE Signal Pathway. *Journal of Dermatological Treatment*, **21**, 1-9. <https://doi.org/10.1080/09546634.2019.1591579>
- [8] Kakuta, M. and Misaki, A. (1979) Polysaccharide of “Junsai (*Brasenia schreberi* J. F. Gmel)” Mucilage: Constitution and Linkage Analysis. *Agricultural and Biological Chemistry*, **43**, 993-1005. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.43.993>
- [9] Feng, S., Luan, D., Ning, K., et al. (2019) Ultrafiltration Isolation, Hypoglycemic Activity Analysis and Structural Characterization of Polysaccharides from *Brasenia schreberi*. *International Journal of Biological Macromolecules*, **135**, 141-151. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.129>
- [10] Kim, H., Wang, Q., Shoemaker, C.F., et al. (2014) Polysaccharide Gel Coating of the Leaves of *Brasenia schreberi* Lowers Plasma Cholesterol in Hamsters. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, **5**, 56-61. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2014.10.003>
- [11] Xiao, H., Cai, X., Fan, Y., et al. (2016) Antioxidant Activity of Water-Soluble Polysaccharides from *Brasenia schreberi*. *Pharmacognosy Magazine*, **12**, 193-197. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.186343>
- [12] 赵淑杰, 郑丽宁, 路飘飘, 等. Sevag 法脱鹿药多糖蛋白工艺条件优化[J]. 中国兽药杂志, 2017, 51(4): 25-29.
- [13] 陈淑梅. 高良姜素诱导人乳头瘤病毒阳性的宫颈癌细胞凋亡实验研究[J]. 中草药, 2017, 48(5): 941-945.
- [14] Pitolli, C., Wang, Y., Candi, E., et al. (2019) p53-Mediated Tumor Suppression: DNA-Damage Response and Alternative Mechanisms. *Cancers (Basel)*, **11**, 1983. <https://doi.org/10.3390/cancers11121983>
- [15] Jiang, D., Wang, L., Zhao, T., et al. (2017) Restoration of the Tumor-Suppressor Function to Mutant p53 by *Ganoderma lucidum* Polysaccharides in Colorectal Cancer Cells. *Oncology Reports*, **37**, 594-600. <https://doi.org/10.3892/or.2016.5246>
- [16] Hamzeloo-Moghadam, M., Aghaei, M., Abdolmoham Madi, M.H., et al. (2019) Anticancer Activity of Britannin through the Downregulation of *Cyclin D1* and CDK4 in Human Breast Cancer Cells. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, **15**, 1424. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.274081>
- [17] Tadesse, S., Anshabo, A.T., Portman, N., et al. (2019) Targeting CDK2 in Cancer: Challenges and Opportunities for Therapy. *Drug Discovery Today*, **25**, 406-413. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.12.001>
- [18] Zhang, H., Christensen, C.L., Dries, R., et al. (2019) CDK7 Inhibition Potentiates Genome Instability Triggering Anti-tumor Immunity in Small Cell Lung Cancer. *Cancer Cell*, **37**, 37-54.e9.