

王不留行主要成分对小鼠乳腺上皮细胞增殖及 β -酪蛋白表达的影响

秦 君, 李庆章, 高学军

(东北农业大学乳品科学教育部重点实验室, 哈尔滨 150030)

摘要:【目的】以王不留行为试验材料, 寻找王不留行促进泌乳的有效成分, 为中药催乳针剂的研发提供理论依据。【方法】对王不留行3类主要成分(皂甙类、黄酮甙类及香豆素类)进行提取, 并用化学方法及薄层层析方法予以鉴定。将3种成分分别以不同浓度添加到细胞培养液, 采用MTT法检测3类成分对体外培养的小鼠乳腺上皮细胞增殖的作用, 运用荧光定量RT-PCR方法对细胞中 β -酪蛋白的表达进行检测, 用激光共聚焦显微技术对细胞周期蛋白cyclin D1和细胞信号通路中磷酸化stat5因子的表达进行检测, 最后通过动物实验进一步验证其有效成分的作用。【结果】王不留行皂甙类成分对小鼠乳腺上皮细胞的增殖有明显的抑制作用($P < 0.05$), 对小鼠乳腺上皮细胞 β -酪蛋白的表达无明显作用; 王不留行香豆素类成分对小鼠乳腺上皮细胞的增殖和 β -酪蛋白的表达均无明显作用; 王不留行黄酮甙类成分具有促进泌乳的作用, 可通过诱导周期蛋白cyclin D1的表达而促进小鼠乳腺上皮细胞的增殖, 并通过激活Jak-stat5信号通路诱导 β -酪蛋白基因的表达。【结论】黄酮甙类成分是王不留行促进泌乳的有效成分之一。

关键词: 王不留行; 皂甙; 黄酮甙; 香豆素; 乳腺上皮细胞; 功能

Effect of Main Components from *Semen Vaccariae* on Multiplication and Expression of Beta-Casein of Mouse Mammary Epithelial Cell *in vitro*

QIN Jun, LI Qing-zhang, GAO Xue-jun

(Key Laboratory of Dairy Science Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

Abstract: 【Objective】 The objective of this test is to find one or several effective components in promoting lactating of *Semen vaccariae*, so as to provide scientific basis for the research and exploitation of galactopoiesis with Chinese traditional medicine. 【Method】 The extracting methods of the three main components from *Semen vaccariae*, saponin, flavonoid glycoside and coumarin, and the identification by using chemical methods and chromatographic methods were studied. Add these components to cell cultural medium at different concentrations. Then their effects on multiplication of mouse mammary epithelial cells were detected by using the method MTT and the expression of beta-casein of mouse mammary epithelial cells was detected using real-time PCR. Furthermore, their mechanism was also studied. The expression of cyclin D1 and phosphatic stat5 was detected using laser scanning confocal microscope. Finally, the function of the effective component was validated through animal experiment. 【Result】 The result indicated that the components of saponin could restrain the multiplication of mouse mammary epithelial cells ($P < 0.05$), which had no influence on the expression of beta-casein ($P > 0.05$). The components of coumarin had no influence on both the multiplication of mouse mammary epithelial cells and the expression of beta-casein ($P > 0.05$). The components of flavonoid glycoside could promote the lactation of mouse. They could promote the multiplication of mouse mammary epithelial cells by activating the expression of cyclin D1 and regulate the expression of beta-casein by activating Jak-stat5. 【Conclusion】 Favonoid glycoside is one of the effective components of *Semen vaccariae* in promoting lactation of mouse.

收稿日期: 2007-06-18; 接受日期: 2007-10-08

基金项目: 黑龙江省教育厅博士专项科研基金(HLJBSDJ2004-15)和科教部“863”项目(2006AA10Z1A4)

作者简介: 秦 君(1982-), 女, 黑龙江哈尔滨人, 硕士研究生, 研究方向为动物生物化学与分子生物学。E-mail: happybarbara@126.com。通讯作者高学军(1969-), 男, 黑龙江阿城人, 教授, 研究方向为泌乳生物学与乳腺生物功能调控。Tel: 0451-55190635; E-mail: gaoxj5390@sina.com

Key words: *Semen vaccariae*; Saponin; Flavonoid glycoside; Coumarin; Mammary epithelial cells; Function

0 引言

【研究意义】中国奶牛业普遍存在产乳量低、奶牛发病率高等特点, 使用抗生素及一些化学合成药物作为饲料添加剂来防治奶牛疾病、提高奶牛生产性能具有毒副作用大、残留高、易产生抗(耐)药性和致畸、致癌、致突变等弊端, 严重危害人体健康。中药源自天然, 具有毒副作用小、无残留、不易产生耐药性等特点, 已广泛应用于中国奶牛业。催乳中药作为饲料添加剂能够提高奶牛乳产量, 但效果缓慢, 如采用静脉注射或肌肉注射, 能够快速而准确的发挥作用, 且用量和用药时间具有可控性。【前人研究进展】王不留行是石竹科麦蓝菜 *Vaccaria segetalis* (Neck) Garcke 的种子, 资源丰富, 除华南外, 全国各地都有分布, 以河北产量为最大。王不留行为传统中药, 有行血通经, 催生下乳, 消肿敛疮等功效, 疗效显著, 《本草纲目》有“穿山甲、王不留, 妇人服了乳长流”的说法。除具有催乳功能外, 王不留行还可以治疗痛经、闭经、带状疱疹, 也可治疗小便不利、淋漓涩痛、儿童多动症、突发性耳聋等疾病^[1-8]。王不留行含皂甙、黄酮甙、香豆素、环肽以及生物碱类等多种化合物。桑圣民等^[9-16]从王不留行的乙醇提取物中分离得到 27 个化合物, 张荣平等^[17]分离并鉴定了 4 个环肽化合物, 鲁静等^[18]分离鉴定了刺桐碱和异肥皂草苷。Itokawa 等^[19-21]发现环肽具有雌激素样活性, Shoemaker 等^[22]发现王不留行浸提物具有抗癌活性。【本研究切入点】本试验对王不留行皂甙类、黄酮甙类以及香豆素类成分进行提取鉴定, 以不同浓度添加到细胞培养液, 运用 MTT、荧光定量 RT-PCR、激光共聚焦显微技术等方法检测 3 种成分对小鼠乳腺上皮细胞增殖及 β -酪蛋白表达的影响, 并对其机理进行研究, 最后通过动物试验验证有效成分的作用。【拟解决的关键问题】寻找一种(或几种)能显著促进乳腺上皮细胞增殖或促进乳蛋白的表达的有效成分, 即促进乳的产生, 为中药催乳针剂的研发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

昆明种远交系小白鼠: 3 月龄, 分娩后 3~6 d, 购自哈尔滨医科大学。

酶标仪 (GF-M2000, 山东高密彩虹仪器公司)、

实时荧光定量 PCR 仪 (ABI Prism[®]7300, 美国 ABI)、激光扫描共聚焦显微镜 (TC SP2 AOBS, 德国 Leica 公司)、倒置显微镜 (X50-S8F2, 奥林巴斯公司)、CO₂ 培养箱 (CO-150, New Brunswick Scientific 公司)。

DMEM 培养基 (Gibco)、M199 培养基 (Sigma)、优级胎牛血清 (中国医学科学院生物工程研究所)、I 型胶原酶 (Invitrogen)、透明质酸酶 (Sigma)、MTT (Amresco)、DEPC (Amresco)、牛血清白蛋白 (Sigma)、免疫荧光染色试剂盒—抗兔 Cy2 (碧云天)、胰岛素 (Sigma)、催乳素 (Sigma) 等。

1.2 试验方法

1.2.1 中药王不留行主要成分的提取与鉴定 王不留行皂甙类成分与黄酮甙类成分采用溶剂萃取法进行提取, 香豆素类成分采用酸碱法进行提取。3 种成分分别用物理化学方法与薄层层析方法进行鉴定, 具体方法及试验结果参见文献^[23]。

1.2.2 3 种成分对小鼠乳腺上皮细胞增殖的影响

1.2.2.1 小鼠乳腺上皮细胞的体外培养 取分娩后 3~6 d 小白鼠断颈处死, 75%乙醇消毒全身后置蜡板上, 用大头针固定四肢, 沿正中线剪开皮肤, 切下左右乳腺组织, 剪成小块, 放入消化液, 37℃消化 1.5 h, 将消化液过滤, 离心, 得到细胞。用 20%FCS 的生长液悬浮, 然后离心, 清洗细胞 3 遍, 以 $1 \times 10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$ 的细胞密度置入培养瓶中培养。

1.2.2.2 乳腺上皮细胞的鉴定 将贴壁后细胞于 200×倒置显微镜下观察, 进行形态学鉴定。同时进行免疫荧光染色, 激光共聚焦显微镜观察, 进行角蛋白—18 鉴定。

1.2.2.3 MTT 法检测细胞增殖活力 将体外培养的细胞接种于 96 孔培养板, 每孔 100 μl 细胞生长液, 分别加入 3 种成分至终浓度分别为 20、50、100、200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。用 MTT 法检测细胞增殖活力。

1.2.2.4 黄酮甙类成分对细胞周期蛋白 cyclin D1 表达的影响 试验组在细胞生长液中添加 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 黄酮甙类成分, 体外培养 12 h, 对照组正常培养 12 h。离心收集细胞, 进行 cyclin D1 的免疫荧光染色, 激光共聚焦显微镜观察。

1.2.3 3 种成分对小鼠乳腺上皮细胞 β -酪蛋白表达的影响

1.2.3.1 提取细胞总 RNA 并反转录生成 cDNA 分别

将3种成分以 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度加入体外培养的小鼠乳腺上皮细胞,培养12 h,用Trizol试剂抽提细胞中的总RNA。取 $2\text{ }\mu\text{g}$ RNA进行反转录。

1.2.3.2 荧光定量PCR检测 β -酪蛋白的表达 β -酪蛋白基因上游引物: TCACTCCAGCATCCAGTCACA, 下游引物: GGCCCAAGAGATGGCACCA, 扩增片段大小为126 bp。内参照GAPDH基因上游引物: ACTCCCCTCTTCCACCTTC, 下游引物: TCTTGCTCAGTGCCTTGC, 扩增片段大小为185 bp。扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳。

1.2.3.3 黄酮甙类成分对磷酸化stat5因子表达的影响 试验组在细胞生长液中添加 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 黄酮甙类成分,体外培养12 h;对照组正常培养12 h,离心收集细胞,进行磷酸化stat5因子的免疫荧光染色,激光共聚焦显微镜观察。

1.2.4 动物试验 将王不留行黄酮甙类成分溶于生理盐水中,终浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$,过滤除菌, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。取分娩后母鼠10只,自分娩当天起将每窝仔鼠调整为8只。参照文献[24]测量泌乳量,于泌乳7 d后每日同一时间将母鼠与仔鼠分离6 h,用天平称全窝仔鼠重量,然后将仔鼠送回母鼠身边哺乳,吮吮2 h后再次称仔鼠窝重,两次窝重之差即为8 h泌乳量,每天测量1次,连续测量3 d,将3 d测得的8 h泌乳量相加即得泌乳总量。第4天起按照 $10\text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体重皮下注射制备的注射液,连续注射3 d,采用相同方法测得3 d泌乳总量。

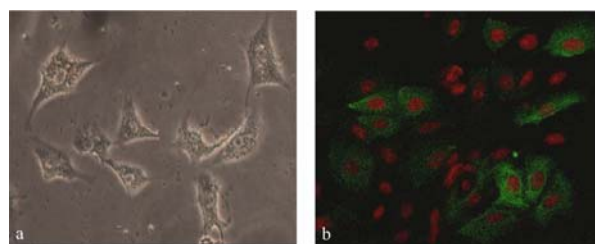
2 结果与分析

2.1 3种成分对小鼠乳腺上皮细胞增殖的影响

2.1.1 小鼠乳腺上皮细胞的鉴定 贴壁后细胞呈现多角型,为典型的上皮细胞特性,见图1-a。试验所培养的乳腺上皮细胞均有较强的角蛋白-18表达,符合乳腺上皮细胞特性,见图1-b。

2.1.2 MTT法检测细胞增殖活力 由表1可知,皂甙类成分(除 $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)均显著低于对照组($P<0.05$),表明王不留行皂甙类成分有抑制小鼠乳腺上皮细胞增殖的作用。黄酮甙类成分均显著高于对照组($P<0.05$),表明王不留行黄酮甙类成分具有促进小鼠乳腺上皮细胞增殖的作用。香豆素类成分与对照组间差异不显著($P>0.05$),表明王不留行香豆素类成分对小鼠乳腺上皮细胞的增殖没有作用。

2.1.3 黄酮甙类成分对cyclin D1表达的影响 试验结果见图2和表2。试验组与对照组分别取10个视野,



a: 贴壁后的小鼠乳腺上皮细胞(200 \times); b: 小鼠乳腺上皮细胞角蛋白的表达(200 \times)

a: Cultured mouse mammary epithelial cells (200 \times); b: Expression of keratin-18 in cultured mouse mammary epithelial cells (200 \times)

图1 小鼠乳腺上皮细胞的鉴定

Fig. 1 Identification of mouse mammary epithelial cell

表1 王不留行3种成分的细胞增殖MTT法(平均值 \pm 标准差)

Table 1 The result of MTT for three components (Mean \pm SD)

| 浓度 Concentration ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) | 吸光值 Absorbance | | |
|--|--------------------|-------------------------------|--------------------|
| | 皂甙类成分 Saponin | 黄酮甙类成分 Flavonoid glycoside | 香豆素类成分 Coumarin |
| 0 | 0.462 \pm 0.014a | 0.479 \pm 0.016a | 0.448 \pm 0.020 |
| 20 | 0.448 \pm 0.007a | 0.500 \pm 0.017b | 0.437 \pm 0.004 |
| 50 | 0.422 \pm 0.016b | 0.501 \pm 0.006b | 0.445 \pm 0.017 |
| 100 | 0.356 \pm 0.009c | 0.515 \pm 0.005b | 0.442 \pm 0.010 |
| 200 | 0.326 \pm 0.007d | 0.543 \pm 0.006c | 0.434 \pm 0.006 |

同一列数字右侧不同小写字母间表示差异显著($P<0.05$)

Different letters in each vertical line mean that the difference is significant compared with contrast at the 0.05 level

表2 黄酮甙类成分对cyclin D1表达的影响

Table 2 Effect of flavonoid glycoside on expression of cyclin D1

| 组别 Group | 平均每个细胞 cyclin D1 表达量 Expression of cyclin D1 per cell |
|---------------|--|
| 对照组 Control | 16.835 \pm 2.492 |
| 实验组 Treatment | 22.477 \pm 1.716* |

*表示两组数据间差异显著($P<0.05$)。表4、表5同

*Means that difference is significant compared with contrast at the 0.05 level. The same as Table 4 and Table 5

cyclin D1表达的荧光强度用Image Pro 5.0 Plus软件进行分析,用每个视野的总光密度值表示cyclin D1的表达强度,除以每个视野的细胞个数,即为平均每个细胞的表达量。由表2可见,试验组与对照组差异显著,表明王不留行黄酮甙类成分能促进cyclin D1的表达。

2.2 3种成分对小鼠乳腺上皮细胞 β -酪蛋白表达的影响

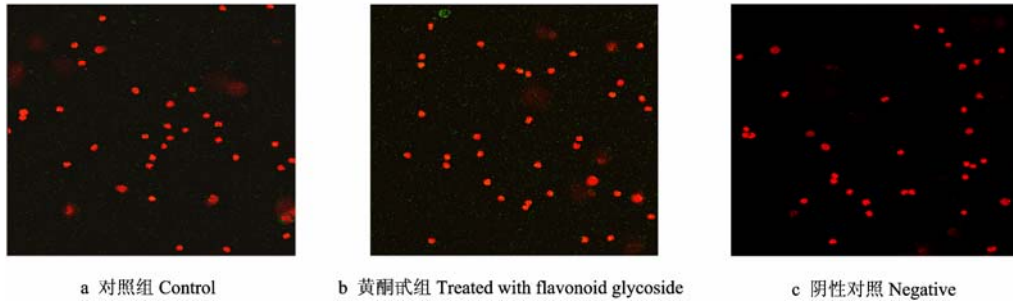


图 2 小鼠乳腺上皮细胞 cyclin D1 的表达

Fig. 2 Expression of cyclin D1 in cultured mouse mammary epithelial cells

2.2.1 荧光定量 PCR 检测 β -酪蛋白的表达 本试验采用相对定量的方法, $2^{-\Delta Ct}$ 为目的基因的相对表达量, 试验结果见表 3。由表 3 可见, 黄酮甙组与空白组差异显著, 表明王不留行黄酮甙类成分能促进 β -酪蛋白的表达。扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果见图 3。

2.2.2 黄酮甙类成分对磷酸化 stat5 因子表达的影响 试验结果见图 4 和表 4, 试验组与对照组差异显

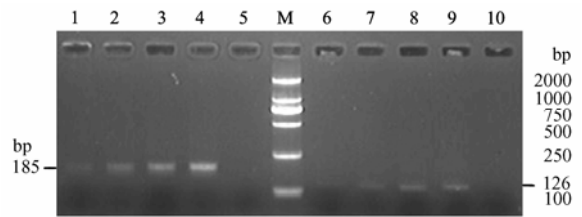
表 3 王不留行 3 种成分对 β -酪蛋白的表达的影响

Table 3 Effect of three components on the expression of β -casein

| 组别 Group | β -酪蛋白的表达量 Express of beta-casein |
|--------------------------|--|
| 空白组 Control | 1.3726 \pm 0.0307 |
| 皂甙组 Saponin | 1.3714 \pm 0.0156 |
| 黄酮甙组 Flavonoid glycoside | 1.8327 \pm 0.0175* |
| 香豆素组 Coumarin | 1.3681 \pm 0.0227 |

*表示与空白组数据间差异显著 ($P < 0.05$)

* Means that difference is significant compared with contrast at the 0.05 level



M: Marker; 1~5: GAPDH 基因; 6~10: β -酪蛋白基因; 1、6: 皂甙组; 2、7: 黄酮甙组; 3、8: 香豆素组; 4、9: 无处理组; 5、10: PCR 空白组

M: Marker; 1-5: GAPDH gene; 6-10: β -casein; 1, 6: Saponin group; 2, 7: Flavonoid glycoside group; 3, 8: Coumarin group; 4, 9: Group of no treatment; 5, 10: Group of PCR blank

图 3 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 3 PCR product of GAPDH and β -casein

著, 表明黄酮甙类成分能促进磷酸化 stat5 因子的表达。

2.3 动物试验

结果见表 5, 用药后母鼠 3 d 总泌乳量明显高于用药前 3 d 总泌乳量 ($P < 0.05$), 说明王不留行黄酮甙类成分能增加小鼠乳汁分泌量。

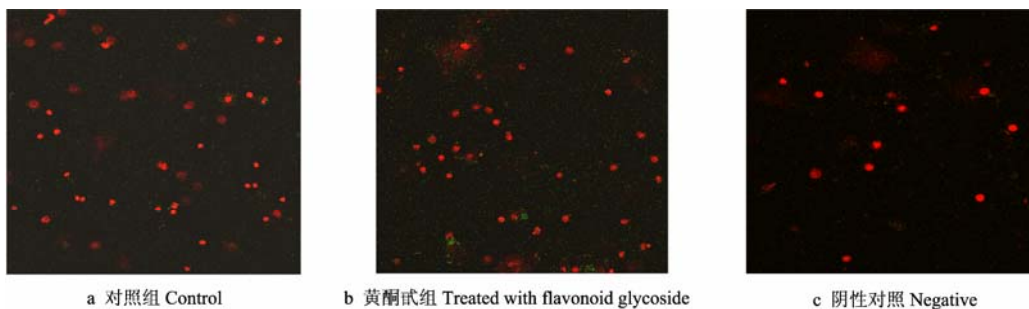


图 4 小鼠乳腺上皮细胞磷酸化 stat5 的表达

Fig. 4 Expression of phosphatase stat5 in cultured mouse mammary epithelial cells

表 4 黄酮甙类成分对磷酸化 stat5 因子表达的影响

Table 4 Effect of flavonoid glycoside on expression of cyclin D1

| 组别 Group | 平均每个细胞磷酸化 stat5 的表达量 Expression of phosphatic stat5 per cell |
|---------------|---|
| 对照组 Control | 12.3543±1.5581 |
| 实验组 Treatment | 25.5693±2.2152* |

表 5 黄酮甙类成分对小鼠泌乳量的影响

Table 5 Effect of flavonoid glycoside on the lactation of mouse

| 组别 Group | 母鼠数量(只) Number | 剂量 Dose (ml·kg ⁻¹) | 总泌乳量 Total quantity of lactating (g) |
|------------------------|-------------------|--------------------------------------|--|
| 用药前 Pre-treatment | 10 | 10 | 5.4674±0.1362 |
| 用药后 After treatment | 10 | 10 | 5.8433±0.1892* |

3 讨论

3.1 王不留行主要成分对小鼠乳腺上皮细胞增殖的影响

在真核细胞的细胞周期调控中, G₁~S 期之间的限制点是细胞内外信号经传递、整合、汇集到细胞核, 对细胞增殖进行调控的关键点, 而细胞周期蛋白 cyclin D1 可促进细胞通过此限制点。王不留行黄酮甙类成分能够促进小鼠乳腺上皮细胞中 cyclin D1 的表达, 从而促进细胞增殖。另外, 王不留行皂甙类成分对小鼠乳腺上皮细胞的增殖具有抑制作用, 体外培养 2~3 d 可见大量细胞死亡, 数量剧减。这与王不留行皂甙具有抗早孕、诱导黄体细胞凋亡的作用^[25]相一致。

王不留行黄酮甙类与皂甙类成分对细胞增殖具有截然相反的作用, 这两种成分是如何协同发挥作用的, 有待进一步研究。

3.2 王不留行主要成分对小鼠乳腺上皮细胞泌乳的影响

乳蛋白、乳糖和乳脂构成乳的主要组分, 其中乳蛋白是乳中最重要的成分。乳中的主要蛋白质几乎含有机体所有的必需氨基酸。在西方国家乳蛋白及其产品提供 20%~30% 的食物蛋白。乳蛋白的变化可以反映乳腺的机能变化, 从乳蛋白的变化可了解乳腺细胞代谢情况, 辅助疾病的诊断。酪蛋白是乳腺上皮细胞合成的乳中特有的一组磷蛋白, 含有大量的磷和钙。酪蛋白含有几乎全部必需氨基酸, 是新生幼仔最具营养价值的蛋白质, 还能增加新生幼仔对钙磷的吸收。

本试验对乳腺上皮细胞中 β-酪蛋白的表达进行检测, 以此蛋白质作为一个指标来研究王不留行 3 种成分对泌乳及乳营养成分的影响。在 3 种成分中, 只有黄酮甙类成分能够通过更强的激活细胞信号通路 Jak2-stat5 而促进 β-酪蛋白的表达。据文献[26]报道, 许多乳蛋白都是通过此细胞信号通路得到表达的, 由此笔者推论王不留行黄酮甙类成分能够促进多种乳蛋白的表达, 但尚需进一步试验证实。

4 结论

研究结果表明, 王不留行黄酮甙类成分是王不留行有效成分之一, 具有促进泌乳的作用, 它通过诱导周期蛋白 cyclin D1 的表达而促进小鼠乳腺上皮细胞的增殖, 并通过激活 Jak-stat5 信号通路诱导 β-酪蛋白基因的表达; 皂甙类成分对小鼠乳腺上皮细胞的增殖有明显的抑制作用, 并随浓度的增加而抑制作用增强, 对小鼠乳腺上皮细胞 β-酪蛋白的表达无明显作用; 香豆素类成分对小鼠乳腺上皮细胞的增殖和 β-酪蛋白的表达均无明显作用。

References

- [1] 谭闽英. 王不留行外用治疗带状疱疹 59 例报告. 中国乡村医药, 2006, 13(6): 51.
Tan M Y. Report of curing 59 cases of herpes zoster by external *Semen Vaccariae*. *Chinese Journal of Rural Medicine and Pharmacy*, 2006, 13(6): 51. (in Chinese)
- [2] 张爱霞, 孟洪霞, 刘敏. 王不留行治疗带状疱疹 26 例. 李时珍国医国药, 2000, 11(7): 652.
Zhang A X, Meng H X, Liu M. Report of curing 26 cases of herpes zoster by *Semen Vaccariae*. *Lishizhen Medicine and Medica Research*, 2000, 11(7): 652. (in Chinese)
- [3] 于清, 顾梯成, 陈小芬, 夏敏. 王不留行子耳压治疗儿童多动症 33 例. 上海中医药杂志, 2001, (10): 38.
Yu Q, Gu T C, Chen X F, Xia M. Ear-points application with cowherb seed for infantile hyperkinetic syndrome: a report of 30 cases. *Shanghai Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2001, (10): 38. (in Chinese)
- [4] 刘福官, 施建蓉, 张怀琼, 冯爱成. 王不留行治疗突发性耳聋的临床和实验研究. 中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志, 2000, 8(1): 4-8.
Liu F G, Shi J R, Zhang H Q, Feng A C. Clinical and experimental research on the treatment of sudden hearing loss by Wang Bu Liu Xing (WBLX, Cow-fat seed). *Chinese Otorhinolaryngological Journal of Integrative Medicine*, 2000, 8(1): 4-8. (in Chinese)
- [5] 刘福官, 张怀琼, 冯爱成. 王不留行口服液治疗突发性耳聋的临床研究. 上海中医药杂志, 1998, 11: 22-23.

- Liu F G, Zhang H Q, Feng A C. Clinical research on the treatment of sudden hearing loss by Wang Bu Liu Xing. *Shanghai Journal of Traditional Chinese Medicine*, 1998, 11: 22-23. (in Chinese)
- [6] 刘继林. 催乳通经良药—王不留行. *家庭医药*, 2004, (4): 15.
- Liu J L. A good hemagogue and lactogenic medicine—*Semen Vaccariae*. *Home Medicine*, 2004, (4): 15. (in Chinese)
- [7] 周 俊, 付宜和. 王不留行的临床新用途. *时珍国医国药*, 2001, 12: 560-562.
- Zhou J, Fu Y H. New clinical function of *Semen Vaccariae*. *Lishizhen Medicine and Medica Research*, 2001, 12: 560-562. (in Chinese)
- [8] 李 帆, 梁敬钰. 王不留行的研究进展. *海峡药学*, 2007, 19(3): 1-5.
- Li F, Liang J Y. Research progress of *Vaccaria segetalis*. *Strait Pharmaceutical Journal*, 2007, 19(3): 1-5. (in Chinese)
- [9] 桑圣民, 夏增华, 毛士龙, 劳爱娜, 陈仲良. 中药王不留行中黄酮甙类成分研究. *中国中药杂志*, 2000, 25(4): 221-222.
- Sang S M, Xia Z H, Mao S L, Lao A N, Chen Z L. Studies on the flavonol glycosides from the seeds of *Vaccaria segetalis*. *China Journal of Chinese Materia*, 2000, 25(4): 221-222. (in Chinese)
- [10] 桑圣民, 劳爱娜, 王洪诚, 陈仲良, 史丽萍, 夏 薇. 中药王不留行化学成分的研究. *天然产物研究与开发*, 1998, 10(4): 1-3.
- Sang S M, Lao A N, Wang H C, Chen Z L, Shi L P, Xia W. Studies on the constituents of *Vaccaria Segetalis* (Neck) Garcke. *Natural Product Research and Development*, 1998, 10(4): 1-3. (in Chinese)
- [11] 桑圣民, 劳爱娜, 王洪诚, 陈仲良. 中药王不留行化学成分研究 (II). *中草药*, 2000, 31(3): 169-170.
- Sang S M, Lao A N, Wang H C, Chen Z L. Studies on the constituents of *Vaccaria Segetalis* (Neck) Garcke (II). *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2000, 31(3): 169-170. (in Chinese)
- [12] 桑圣民, 毛士龙, 劳爱娜, 陈仲良. 中药王不留行化学成分研究III. *天然药物化学*, 2000, 12(3): 12-15.
- Sang S M, Mao S L, Lao A N, Chen Z L. Studies on the chemical constituents of the seeds of *Vaccaria Segetalis* (Neck) garckeIII. *Natural Product Research and Development*, 2000, 12(3):12-15. (in Chinese)
- [13] Sang S M, Lao A N, Wang H C, Chen Z L, Uzawa J, Fujimoto Y. Triterpenoid saponins from *Vaccaria segetalis*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 1999, 1(3): 199-205.
- [14] Sang S M, Lao A N, Chen Z L, Uzawa J, Fujimoto Y. Three new triterpenoid saponin from the seeds of *Vaccaria segetalis*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 2000, 2(3): 187-193.
- [15] Xia Z H, Zou M L, Sang S M, Lao A N. Segetoside L, A new triterpenoid saponin from *Vaccaria segetalis*. *Chinese Chemical Letters*, 2004, 15(1): 55-57.
- [16] Sang S M, Zou M L, Lao A N, Chen Z L, Uzawa J, Fujimoto Y. A new triterpenoid saponin from the seeds of *Deccaria segetalis*. *Chinese Chemical Letters*, 2000, 11(1): 49-52.
- [17] 张荣平, 邹 澄, 谭宁华, 周 俊. 王不留行环肽研究. *云南植物研究*, 1998, 20(1): 105-112.
- Zhang R P, Zou C, Tan N H, Zhou J. Cyclopeptide from *Vaccaria segetalis*. *Acta Botanica Yunnanica*, 1998, 20(1): 105-112. (in Chinese)
- [18] 鲁 静, 林一星, 马双成. 中药王不留行中刺桐碱和异肥皂草苷分离鉴定和测定. *药物分析杂志*, 1998, 18(3): 163-165.
- Lu J, Lin Y X, Ma S C. Separation, identification and determination of hypaphorine and isosaponarin in *Semen Vaccariae*. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 1998, 18(3): 163-165. (in Chinese)
- [19] Itokawa H, Yun Y, Morita H, Takeya K, Yamada K. Estrogen-like activity of cyclic peptides from *Vaccaria segetalis* extracts. *Planta Medica*, 1995, 61: 561-562.
- [20] Morita H, Yun Y S, Takeya K, Itokawa H, Shiota O. Thionation of segetalins A and B, cyclic peptides with estrogen-like activity from seeds of *Vaccaria segetalis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 1997, 5: 631-636.
- [21] Yun Y S, Morita H, Takeya K, Itokawa H. Cyclic peptides from higher plants. 34. Segetalins G and H, structures and estrogen-like activity of cyclic pentapeptides from *Vaccaria segetalis*. *Journal of Natural Products*, 1997, 60(3): 216-218.
- [22] Shoemaker M, Hamilton B, Dairkee S H, Cohen I, Campbell M J. *In vitro* anticancer activity of twelve Chinese medicinal herbs. *Phytherapy Research*, 2005, 19: 649-651.
- [23] 秦 君, 高学军, 彭科峰. 中药王不留行三种成分的提取与鉴定. *中国科技论文在线*, 200609-443(<http://www.paper.edu.cn/>).
- Qin J, Gao X J, Peng K F. Abstraction and identifying of three components from a traditional Chinese medicine Wangbuliuxing. *Sciencepaper Online*, 200609-443 (<http://www.paper.edu.cn/>). (in Chinese)
- [24] 李传勋, 孙丽晶, 周 琴, 高广猷. 泌乳宝冲剂催乳作用的实验研究. *大连医科大学学报*, 2002, 24(4): 250-252.
- Li C X, Sun L J, Zhou Q, Gao G Q. Promoting effect of Mirubaogranules on lactation. *Journal of Dalian Medical University*, 2002, 24(4): 250-252. (in Chinese)
- [25] Sang S M, Lao A N, Leng Y, Cao L, Chen Z L, Uzawa J, Shiyeo Y, Fujimoto Y. A new triterpenoid saponin with inhibition of luteal cell from seeds of *Vaccaria segetalis*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 2002, 4(4): 297-301.
- [26] Watson C J, Burdon T G. Prolactin signal transduction mechanisms in the mammary gland: the role of the Jak/Stat pathway. *Reviews of Reproduction*, 1996, 1(1): 1-5.