

灵芝三萜通过 Wnt/ β -catenin 信号通路对肝癌细胞增殖和凋亡的影响

蔡 蕤
(郑州市第七人民医院药学部, 河南 郑州 450000)

摘要: **目的** 灵芝三萜通过 Wnt/ β -catenin 信号通路对肝癌细胞增殖和凋亡的影响。**方法** 灵芝三萜 (10、50、100 $\mu\text{g/mL}$) 作用 HepG2 人肝癌细胞 24、48、72 h, MTT 和流式细胞仪检测细胞增殖和凋亡。100 $\mu\text{g/mL}$ 灵芝三萜作用 HepG2 细胞 24、48、72 h, Western blot 检测 c-myc、cyclinD1、caspase-3、caspase-8、 β -catenin、p-GSK-3 β 蛋白表达。分别以 20 $\mu\text{mol/L}$ XAV-939、20 mmol/L LiCl 及 100 $\mu\text{g/mL}$ 灵芝三萜联合 20 mmol/L LiCl 干预 HepG2 细胞, MTT 和流式细胞仪分别检测细胞增殖和凋亡。**结果** 灵芝三萜 (10、50、100 $\mu\text{g/mL}$) 抑制 HepG2 细胞增殖 ($P<0.05$), 诱导细胞凋亡 ($P<0.05$)。100 $\mu\text{g/mL}$ 灵芝三萜作用 HepG2 细胞 24、48、72 h, 细胞 caspase-3、caspase-8 蛋白表达上调 ($P<0.05$), 而 c-myc、cyclinD1、 β -catenin、p-GSK-3 β 蛋白表达下调 ($P<0.05$)。20 $\mu\text{mol/L}$ XAV-939 干预能抑制细胞增殖并诱导细胞凋亡 ($P<0.05$), 20 mmol/L LiCl 则能在一定程度上减弱灵芝三萜对 HepG2 细胞增殖的抑制和细胞凋亡的诱导作用 ($P<0.05$)。**结论** 灵芝三萜能够通过 Wnt/ β -catenin 信号通路调节 c-myc、cyclinD1、caspase-3、caspase-8 蛋白表达, 抑制肝癌细胞增殖并诱导细胞凋亡。**关键词:** 灵芝三萜; 肝癌; Wnt/ β -连环蛋白信号通路; 增殖; 凋亡
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2020)05-1320-05
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.05.041

肝癌是世界常见的消化系统恶性肿瘤, 其发病率和死亡率呈上升趋势^[1]。据统计, 2015 年全球肝癌发病率为 85 万, 死亡率为 81 万 (高居世界恶性肿瘤第 2 位), 其中, 乙型肝炎病毒感染和酗酒是引起肝癌患者死亡的主要原因^[2-3]。虽然肝癌的临床治疗有手术、放疗、化疗、免疫治疗等多种形式, 但其发病隐匿、易转移、复发率高, 且放、化疗治疗不良反应较大, 在改善肝癌患者生存率方面仍面临巨大挑战^[4-5]。

传统中医药疗法是我国的特色治疗方式, 应用范围广^[6]。灵芝 *Ganoderma Lucidum* 是我国的一种传统名贵药材, 具有补益五脏、止咳平喘、养肝护肝、补气安神的功效^[7]。灵芝三萜是灵芝的主要成分之一, 常用于肿瘤的辅助治疗^[8]。已有研究^[9]表明, 灵芝三萜能够增强紫杉醇对乳腺癌细胞增殖的抑制和凋亡的作用, 抑制异种移植瘤生长。本研究通过研究灵芝三萜对 HepG2 人肝癌细胞增殖、凋亡及 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响, 探讨灵芝三萜预防及治疗肝癌的作用。

1 材料

1.1 细胞株 HepG2 人肝癌细胞 (批号 HB-8065) 购自美国模式培养物保存所。

1.2 药物与试剂 灵芝三萜 (纯度为 99%) 购自杭州甬洛生物科技有限公司, 溶解于二甲基亚砜; 胎牛血清 (批号 12483012)、胰蛋白酶 (批号 20230)、二甲基亚砜 (批号 TS-20688) 购自美国 Thermo Fisher 公司; RPMI-1640 培

养液 (批号 21875-091) 购自美国 Gibco 公司; XAV-939 通路抑制剂 (批号 S1180) 购自美国 Selleck Chemicals 公司; LiCl 通路激活剂 (批号 A100416) 购自上海生工生物工程股份有限公司; Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒 (批号 40302ES20) 购自上海翊圣生物科技有限公司; 双蒸水 ddH₂O (批号 PER 018-1) 购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司; PVDF 膜 (批号 BSP0161)、BCA 试剂盒 (批号 PC0020)、RIPA 裂解液 (批号 R0020) 购自北京索莱宝科技有限公司; MTT (批号 M2129) 购自美国 Sigma 公司; 兔抗人 p-GSK-3 β 多克隆抗体 (批号 SC-11757)、兔抗人 β -catenin 多克隆抗体 (批号 NBP1-32239)、兔抗人 GAPDH 多克隆抗体 (批号 LS-C108027)、ECL 化学发光试剂盒 (批号 36208ES60) 购自上海焱翎生物科技有限公司; 兔抗人 c-myc 多克隆抗体 (批号 EPR17924)、兔抗人 cyclin D1 多克隆抗体 (批号 EPR2241)、兔抗人 caspase-3 多克隆抗体 (批号 ab13847)、兔抗人 caspase-8 多克隆抗体 (批号 ab25901) 购自英国 Abcam 公司。

1.3 仪器 MCO-18AC 型 CO₂ 培养箱购自日本 SANYO 公司; 流式细胞仪购自美国 BD 公司; HBS-1096B 型酶标仪购自南京德铁实验设备公司。

2 方法

2.1 细胞培养 使用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱中培养 HepG2 细胞, 每隔 2 d 换液 1 次。

2.2 MTT 检测

2.2.1 不同浓度灵芝三萜对 HepG2 细胞增殖的影响 待细胞生长至对数期,收集 HepG2 细胞,胰酶消化并重悬,调整细胞浓度为 $1\times 10^6/\text{mL}$ 并接种至 96 孔板。将细胞分为灵芝三萜低、中、高剂量组 (10 、 50 、 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$),按不同分组加入灵芝三萜处理 HepG2 细胞 24、48、72 h,加入 $20\text{ }\mu\text{L}$ 质量浓度为 5 mg/mL 的 MTT,继续孵育 4 h;弃去多余培养基,加入 $150\text{ }\mu\text{L}$ 二甲基亚砷振荡反应 10 min,酶标仪检测 490 nm 处吸光度值 (OD)。每组 6 个复孔,实验重复 5 次。

2.2.2 灵芝三萜通过 Wnt/ β -catenin 信号通路影响 HepG2 细胞增殖 待细胞生长至对数期,收集 HepG2 细胞,胰酶消化并重悬,调整细胞浓度为 $1\times 10^6/\text{mL}$ 并接种至 96 孔板。将细胞分为对照组 (DMSO)、灵芝三萜组 ($100\text{ }\mu\text{g/mL}$)、XAV-939 组 ($20\text{ }\mu\text{mol/L}$ 抑制剂)、LiCl 组 (20 mmol/L 激活剂)、灵芝三萜+ ddH_2O 组 ($100\text{ }\mu\text{g/mL}+\text{ddH}_2\text{O}$)、灵芝三萜+LiCl 组 ($100\text{ }\mu\text{g/mL}+20\text{ mmol/L}$ 激活剂);细胞分别按不同分组加入药物处理 24、48、72 h,MTT 处理按照“2.2.1”项下 MTT 处理方法。每组 6 个复孔,实验重复 5 次。

2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡

2.3.1 不同浓度灵芝三萜对 HepG2 细胞细胞凋亡的影响 按照“2.2.1”项下分组处理细胞,细胞常规培养 24、48、72 h 后,加入胰酶消化,于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 、 300 g 条件下离心,收集细胞,利用 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒,依次加入 $5\text{ }\mu\text{L}$ Annexin V-FITC 和 $10\text{ }\mu\text{L}$ PI,轻轻混匀后于室温避光孵育 15 min,置流式细胞仪检测细胞凋亡。

表 1 不同浓度灵芝三萜对 HepG2 细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	$OD_{490\text{ nm}}$			
	0 h	24 h	48 h	72 h
对照组	0.13 ± 0.02	0.37 ± 0.02	0.53 ± 0.04	0.70 ± 0.04
灵芝三萜低剂量组	0.13 ± 0.03	$0.29\pm 0.03^*$	$0.37\pm 0.04^*$	$0.47\pm 0.05^*$
灵芝三萜中剂量组	0.13 ± 0.01	$0.24\pm 0.02^{* \#}$	$0.30\pm 0.02^{* \#}$	$0.34\pm 0.04^{* \#}$
灵芝三萜高剂量组	0.13 ± 0.02	$0.18\pm 0.02^{* \# \Delta}$	$0.21\pm 0.04^{* \# \Delta}$	$0.25\pm 0.03^{* \# \Delta}$

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与灵芝三萜低剂量组比较,# $P<0.05$;与灵芝三萜中剂量组比较, $\Delta P<0.05$ 。

3.2 不同浓度灵芝三萜对 HepG2 细胞凋亡的影响 与对照组比较,灵芝三萜组细胞凋亡率增加 ($P<0.05$),且浓度越高,细胞凋亡越多,见表 2。 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 灵芝三萜对

表 2 不同浓度灵芝三萜对 HepG2 细胞凋亡的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	凋亡率/%		
	24 h	48 h	72 h
对照组	7.92 ± 0.35	6.39 ± 0.04	8.64 ± 0.61
灵芝三萜低剂量组	$10.05\pm 1.51^*$	$13.64\pm 1.05^*$	$14.47\pm 1.15^*$
灵芝三萜中剂量组	$16.60\pm 0.90^{* \#}$	$20.52\pm 1.65^{* \#}$	$25.35\pm 2.14^{* \#}$
灵芝三萜高剂量组	$21.59\pm 1.24^{* \# \Delta}$	$24.82\pm 1.79^{* \# \Delta}$	$31.89\pm 2.53^{* \# \Delta}$

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与灵芝三萜低剂量组比较,# $P<0.05$;与灵芝三萜中剂量组比较, $\Delta P<0.05$ 。

3.3 灵芝三萜对 HepG2 细胞增殖、凋亡相关蛋白表达的影响 与对照组比较,灵芝三萜 ($100\text{ }\mu\text{g/mL}$) 作用 HepG2 细胞 24、48、72 h, c-myc、cyclinD1 蛋白表达下调 ($P<0.05$), caspase-3、caspase-8 蛋白表达上调 ($P<0.05$),

2.3.2 灵芝三萜通过 Wnt/ β -catenin 信号通路影响 HepG2 细胞凋亡 按照“2.2.2”项下分组处理细胞,按照“2.3.1”项下流式细胞仪术方法检测细胞凋亡。

2.4 Western blot 检测 按照“2.2.2”项下对照组、灵芝三萜组分组,细胞培养 24、48、72 h,使用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液置于冰上进行裂解, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $12\text{ }000\text{ g}$ 离心 20 min,以提取蛋白。通过 BCA 试剂盒测定蛋白浓度,取 $40\text{ }\mu\text{g}$ 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后将蛋白样品电转至 PVDF 膜上,将膜在含 5 % 脱脂奶粉的 TBST 液中室温封闭 1 h;之后分别加入兔抗人 c-myc 多克隆抗体 ($1:1\text{ }000$)、兔抗人 cyclinD1 多克隆抗体 ($1:1\text{ }000$)、兔抗人 caspase-3 多克隆抗体 ($1:500$)、兔抗人 caspase-8 多克隆抗体 ($1:500$)、兔抗人 p-GSK-3 β 多克隆抗体 ($1:500$)、兔抗人 β -catenin 多克隆抗体 ($1:500$)、兔抗人 GAPDH 多克隆抗体 ($1:1\text{ }000$), $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜;膜洗涤后加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗室温孵育 2 h;用 TBST 洗膜,ECL 试剂盒显示条带。以 GAPDH 为内参,检测蛋白表达,实验重复 3 次。

2.5 统计学分析 采用 SPSS 22.0 统计软件,数据以 ($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 不同浓度灵芝三萜对 HepG2 细胞增殖的影响 不同浓度灵芝三萜分别作用 HepG2 细胞 24、48、72 h,灵芝三萜抑制 HepG2 细胞增殖 ($P<0.05$),且浓度越高,抑制作用越强。见表 1。

HepG2 细胞增殖的抑制作用和细胞凋亡的促进作用最强,选取 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 灵芝三萜进行后续实验。

见图 1、表 3。

3.4 灵芝三萜对 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达的影响 与对照组相比,灵芝三萜 ($100\text{ }\mu\text{g/mL}$) 作用 HepG2 细胞 24、48、72 h, β -catenin、p-GSK-3 β 蛋白表达

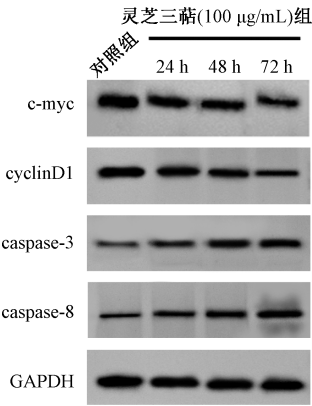


图 1 Western blot 检测各组细胞增殖、凋亡相关蛋白

表 3 灵芝三萜对 HepG2 细胞增殖、凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	c-myc			cyclinD1			caspase-3			caspase-8		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
对照组	1.00±0.10	1.00±0.08	1.00±0.07	1.00±0.06	1.00±0.08	1.00±0.05	1.00±0.07	1.00±0.09	1.00±0.07	1.00±0.04	1.00±0.07	1.00±0.08
灵芝三萜组	0.64±0.09 *	0.41±0.07 *	0.35±0.06 *	0.73±0.13 *	0.45±0.06 *	0.29±0.04 *	2.11±0.13 *	2.81±0.18 *	3.05±0.23 *	2.35±0.12 *	3.11±0.35 *	4.11±0.34 *

注:与对照组比较, * $P<0.05$ 。

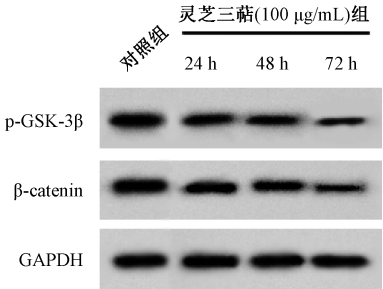


图 2 Western blot 检测各组 β -catenin、p-GSK-3 β 蛋白

表 4 灵芝三萜对 β -catenin、p-GSK-3 β 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	β -catenin			p-GSK-3 β		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
对照组	1.00±0.06	1.00±0.06	1.00±0.06	1.00±0.08	1.00±0.06	1.00±0.06
灵芝三萜组	0.58±0.07 *	0.42±0.08 *	0.32±0.05 *	0.64±0.07 *	0.44±0.07 *	0.36±0.05 *

注:与对照组比较, * $P<0.05$ 。

表 5 Wnt/ β -catenin 信号通路对 HepG2 细胞增殖和凋亡的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	OD _{490 nm}			凋亡率/%		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
对照组	0.36±0.02	0.50±0.04	0.69±0.07	8.17±0.68	5.37±0.79	7.64±0.83
XAV-939 组	0.19±0.03 *	0.23±0.02 *	0.30±0.04 *	19.89±1.79 *	25.58±1.79 *	29.64±1.79 *
Li Cl 组	0.50±0.03 *	0.69±0.06 *	0.96±0.05 *	3.44±0.65 *	2.42±0.47 *	5.93±0.85 *

注:与对照组比较, * $P<0.05$ 。

表 6 灵芝三萜通过 Wnt/ β -catenin 信号通路对 HepG2 细胞增殖、凋亡的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	OD _{490 nm}			凋亡率/%		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
对照组	0.36±0.03	0.50±0.05	0.71±0.03	8.78±0.45	6.75±0.81	6.92±0.69
灵芝三萜组	0.17±0.02 *	0.22±0.03 *	0.26±0.05 *	19.52±0.63 *	25.37±1.58 *	34.75±3.23 *
灵芝三萜+ddH ₂ O 组	0.16±0.02	0.22±0.02	0.26±0.03	21.56±0.40	25.63±2.44	31.53±2.89
灵芝三萜+LiCl 组	0.25±0.04	0.36±0.04 [#]	0.50±0.04 [#]	10.55±0.95 [#]	12.56±1.21 [#]	14.55±1.65 [#]

注:与对照组比较, * $P<0.05$;与灵芝三萜+ddH₂O 组比较, [#] $P<0.05$ 。

生^[11-13]。灵芝三萜具有降血糖、降血脂、增强免疫、抗肿瘤等药理作用,可由担子菌门、伞菌纲、灵芝科灵芝中提

下调 ($P<0.05$)。提示 100 $\mu\text{g/mL}$ 灵芝三萜可能影响 HepG2 细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路。见图 2、表 4。

3.5 Wnt/ β -catenin 信号通路对 HepG2 细胞增殖、凋亡的影响 20 $\mu\text{mol/L}$ XAV-939 干预 HepG2 细胞 24、48、72 h,抑制 HepG2 细胞增殖 ($P<0.05$),促进细胞凋亡率增加 ($P<0.05$);而 20 mmol/L LiCl 干预 HepG2 细胞 24、48、72 h,促进 HepG2 细胞增殖 ($P<0.05$),抑制细胞凋亡率 ($P<0.05$)。见表 5。

3.6 灵芝三萜通过 Wnt/ β -catenin 信号通路影响 HepG2 细胞增殖、凋亡 单独以 100 $\mu\text{g/mL}$ 灵芝三萜作用 HepG2 细胞 24、48、72 h 能明显抑制细胞增殖 ($P<0.05$),并诱导细胞凋亡 ($P<0.05$);而 100 $\mu\text{g/mL}$ 灵芝三萜联合 20 mmol/L

LiCl 干预 HepG2 细胞 24、48、72 h,细胞存活较灵芝三萜 + ddH₂O 组升高 ($P<0.05$),同时细胞凋亡率降低 ($P<0.05$)。见表 6。

4 讨论

肝癌的发病率占世界恶性肿瘤的第 6 位,其中我国肝癌患者占一半以上^[10]。肝癌的发生与酗酒、丙型肝炎病毒感染、乙型肝炎病毒感染、身体质量指数 (BMI)、糖尿病等因素有关,肝炎病毒疫苗接种、肝脏疾病早期筛查、使用中草药增强细胞免疫功能等方式能有效预防肝癌的发

取^[14]。迄今为止,已有 400 多个化合物从灵芝中分离并鉴定,其中 150 多个为三萜类化合物,灵芝三萜是灵芝提取

物中的主要活性成分^[15-17]。有文献^[18]报道,灵芝三萜能够阻滞细胞周期、诱导细胞凋亡和自噬、抑制肿瘤转移和血管生成,从而发挥抑癌作用。Yue 等^[19]研究发现,灵芝三萜通过参与细胞增殖、氧化应激、钙信号转导等生物过程在宫颈癌细胞中发挥抑癌作用;同时,Thyagarajan 等^[20]研究发现,灵芝三萜能够调节自噬效应蛋白 Beclin 1 表达,抑制 p38 丝裂原活化蛋白激酶磷酸化,用于结肠癌的临床治疗。本研究低、中、高剂量的灵芝三萜均能有效抑制 HepG2 人肝癌细胞增殖并诱导细胞凋亡,且浓度越高、抑制或诱导作用越强。

Wnt 信号通路自 20 世纪 80 年代被发现以来,已成为细胞信号传导领域研究的热点,包括经典 Wnt (Wnt/ β -catenin) 信号通路和非经典信号通路,在细胞增殖、分化、凋亡等过程中起重要作用^[21]。 β -catenin 是 Wnt/ β -catenin 信号通路中的关键分子,Wnt 蛋白与卷曲蛋白(Fzd)、低密度脂蛋白受体相关蛋白 5/6 或糖原合成酶激酶 3 β (GSK-3 β) 等跨膜受体结合,将 Wnt 信号传递至胞质蛋白,使 β -catenin 由细胞质转移至细胞核,与 T 细胞转录因子/淋巴样增强因子等核内转录因子结合而激活 c-myc、细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1)、半胱氨酸蛋白酶 (caspase) 等下游靶基因^[22-24]。Wnt/ β -catenin 信号通路与结直肠癌、胃癌等多种肿瘤发展有关。据报道,GSK-3 β 、 β -catenin 在结直肠癌组织中异常表达,调节 GSK-3 β 、 β -catenin 表达水平可抑制细胞增殖和转移^[25];激活 Wnt/ β -catenin 信号通路则促进胃癌细胞的迁移和侵袭,与胃癌预后不良有关^[26]。本研究,100 μ g/mL 灵芝三萜能够上调 HepG2 细胞中 caspase-3、caspase-8 蛋白表达并下调 c-myc、cyclinD1、 β -catenin 和 p-GSK-3 β 蛋白表达,抑制细胞增殖并诱导凋亡。20 μ mol/L XAV-939 干预能抑制 HepG2 细胞增殖并促进凋亡,而 20 mmol/L LiCl 干预则结果相反。使用 20 mmol/L LiCl 干预能在一定程度上减弱灵芝三萜对 HepG2 细胞增殖的抑制和细胞凋亡的诱导作用。

综上所述,灵芝三萜能够抑制肝癌细胞增殖并诱导凋亡,其机制可能是通过 Wnt/ β -catenin 信号通路调节下游靶标 c-myc、cyclinD1、caspase-3、caspase-8 表达,从而调节细胞周期和细胞凋亡。

参考文献:

[1] Ryerson A B, Ehemann C R, Altekruse S F, *et al.* Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2012, featuring the increasing incidence of liver cancer[J]. *Cancer*, 2016, 122 (9): 1312-1337.

[2] Akinyemiju T, Abera S, Ahmed M, *et al.* The burden of primary liver cancer and underlying etiologies from 1990 to 2015 at the global, regional, and national level: results from the global burden of disease study 2015[J]. *Jama Oncol*, 2017, 3 (12): 1683-1691.

[3] Sia D, Villanueva A, Friedman S L, *et al.* Liver cancer cell of origin, molecular class, and effects on patient prognosis[J].

Gastroenterology, 2017, 152(4): 745-761.

[4] Mokdad A A, Singal A G, Yopp A C. Treatment of liver cancer [J]. *JAMA*, 2016, 5(9): 301-309.

[5] 刘 珍,邓天好,程华初,等.原发性肝癌临床治疗新进展[J]. *湖南中医杂志*, 2018, 34(7): 207-210.

[6] 高 斯,赵相轩,卢再鸣.中药化合物治疗肝细胞肝癌分子机制的研究进展 [J]. *现代肿瘤医学*, 2018, 26(16): 2631-2635.

[7] 张瑞婷,周 涛,宋潇潇,等.灵芝活性成分及其药理作用的研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2018, 46(3): 18-19; 22.

[8] Shao Y, Qiao L, Wu L, *et al.* Structure identification and anti-cancer pharmacological prediction of triterpenes from *Ganoderma lucidum*[J]. *Molecules*, 2016, 21(5): 678.

[9] 张志强,夏 笠,熊小文,等.灵芝三萜组分增强紫杉醇诱导 HER2⁺乳腺癌细胞凋亡的研究[J]. *福建医科大学学报*, 2016, 50(1): 1-5.

[10] Qiu W, Shi J, Guo L, *et al.* Medical expenditure for liver cancer in urban China: a 10-year multicenter retrospective survey (2002-2011) [J]. *J Cancer Res Ther*, 2018, 14(1): 163-170.

[11] Campbell P T, Newton C C, Freedman N D, *et al.* Body mass index, waist circumference, diabetes, and risk of liver cancer for U. S. adults[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(20): 6076-6083.

[12] Chuang S C, Lee Y C, Hashibe M, *et al.* Interaction between cigarette smoking and hepatitis B and C virus infection on the risk of liver cancer: a meta-analysis [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2016, 19(5): 1261-1268.

[13] Chang M H. Prevention of hepatitis B virus infection and liver cancer[J]. *Recent Results Cancer Res*, 2014, 193(35): 75-95.

[14] 孙培龙,陶文扬,何晋浙.灵芝中三萜类化合物的研究进展[J]. *食药用菌*, 2016, 24(2): 76-81.

[15] Yan Z, Xia B, Qiu M H, *et al.* Fast analysis of triterpenoids in *Ganoderma lucidum* spores by ultra-performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry [J]. *Biomed Chromatogr*, 2013, 27(11): 1560-1567.

[16] Wei Z H, Duan Y Y, Qian Y Q, *et al.* Screening of ganoderma, strains with high polysaccharides and ganoderic acid contents and optimization of the fermentation medium by statistical methods [J]. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2014, 37(9): 1789-1797.

[17] Zhao Z Z, Yin R H, Chen H P, *et al.* Two new triterpenoids from fruiting bodies of fungus *Ganoderma lucidum*[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2015, 17(7): 750-755.

[18] Wu G S, Guo J J, Bao J L, *et al.* Anti-cancer properties of triterpenoids isolated from *Ganoderma lucidum*-a review[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2013, 22(8): 981-992.

[19] Yue Q X, Song X Y, Ma C, *et al.* Effects of triterpenes from *Ganoderma lucidum* on protein expression profile of HeLa cells [J]. *Phytomedicine*, 2010, 17(8-9): 606-613.

[20] Thyagarajan A, Jedinak A, Nguyen H, *et al.* Triterpenes from *Ganoderma lucidum* induce autophagy in colon cancer through