

短葶山麦冬皂苷 DT-13 研究进展

张媛媛, 宁华蓉, 戚进, 寇俊萍*, 余伯阳

(中国药科大学中药复方研究室, 江苏省中药评价与转化重点实验室, 南京 211198)

摘要 短葶山麦冬 [*Liriope muscari* (Decne) Baily] 为山麦冬的基原植物之一。短葶山麦冬皂苷 DT-13 为其主要的活性成分, 具有抗肿瘤转移、增强免疫、抗炎等多种药理活性。本文对短葶山麦冬皂苷 DT-13 的化学结构、提取分离、含量测定、药理活性和安全性评价等进行综述, 进一步阐明短葶山麦冬皂苷 DT-13 的研究价值和应用前景。

关键词 短葶山麦冬; 麦冬皂苷; DT-13; 药理活性; 化学分析

中图分类号 R284.1; R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2014)05-0593-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20140516

Advances in the research on DT-13, a saponin of *Liriope muscari* (Decne) Baily

ZHANG Yuanyuan, NING Huarong, QI Jin, KOU Junping*, YU Boyang

Jiangsu Key Laboratory of TCM Evaluation and Translational Research, Department of Complex Prescription of Traditional Chinese Medicine, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract *Liriope Muscari* [*Liriope Muscari* (Decne) Baily], one of the original plant-loading varieties of *Radix Liriope*s included in “*China Pharmacopoeia*” (2010 ed), has various effects such as nourishing yin and promoting the secretion of body fluid, moistening lung and clearing away the heart-fire with the dried root. The saponin, DT-13, is the major active constituent of *Liriope tuberous* root, with a variety of pharmacological activities including anti-tumor metastasis, enhancing immunity, and anti-inflammation. In this paper, the chemical structure, content determination, pharmacological activities and safety evaluation of DT-13 were summarized. It suggests that DT-13 could be considered as a candidate drug with important research potentials and various promising application.

Key words *Liriope muscari* (Decne) Baily; saponin; DT-13; pharmacological activities; chemical analysis

This study was supported by China National Key High-Tech Innovation Project for the R&D of Nove Drugs during the Twelfth Five-year Plan Period (No. 2012ZX09102201-015), the National Natural Science Foundation of China (No. 81274131); and the General Financial Grant from China Postdoctoral Science Foundation (No. 2012M521150)

麦冬是百合科 (Liliaceae) 沿阶草属 (*Ophiopogon*) 植物麦冬 *Ophiopogon japonicus* (L. f.) Ker-Gawl. 的干燥块根, 为常用药材, 具有养阴生津、清心润肺的功效^[1], 其主要化学成分为甾体皂苷、高异黄酮类、酚酸、多糖等。现代药理研究表明, 麦冬具降血糖、抗氧化、抗衰老及抗心肌缺血、抗肿瘤等作用^[2-4]。麦冬历史上主产于四川三台地区和浙江慈溪地区, 另福建仙游地区和湖北襄阳地区所产短葶山麦冬 [*Liriope muscari* (Decne) Baily], 传统也作

为麦冬的替代品入药。《中华人民共和国药典》(1995年版)根据麦冬的种属及产地, 将福建仙游地区所产短葶山麦冬和湖北襄阳地区所产湖北麦冬从麦冬项下移出, 将二者另立于新增品种山麦冬项下。

现代研究显示, 短葶山麦冬中主要含有甾体皂苷类、萜类、酰胺生物碱类、脂肪酸类等化合物, 其中皂苷类化合物为该植物主要活性成分^[5]。短葶山麦冬皂苷 DT-13 (DT-13) 是以鲁斯可皂苷元为母核的甾体皂苷类成分, 为短葶山麦冬须根中含量最

* 收稿日期 2014-06-28 * 通信作者 Tel: 025-86185158 E-mail: junpingkou@cpu.edu.cn

基金项目 国家“十二五”重大新药创制科技重大专项资助项目 (No. 2012ZX09102201-015); 国家自然科学基金资助项目 (No. 81274131); 中国博士后基金资助项目 (No. 2012M521150)

高的活性成分,具有较明确的抗肿瘤转移、抗炎、增强免疫等多种药理活性^[6-7],其研究工作先后获得国家“十一五”、“十二五”重大新药创制科技重大专项支持,DT-13 具有广阔的应用前景。本文重点对近年来 DT-13 的研究工作进行综述,从含量测定、吸收分布、药效、毒性等相关研究进行总结,以期为进一步新药创制提供参考依据。

1 DT-13 的研究现状

1.1 化学性质

DT-13 化学结构如图 1 所示,其为难溶于水的白色无定形固体,分子式: $C_{44}H_{70}O_{17}$, 相对分子质量: 871.467 6, 化学名称 25 (*R,S*) Ruscogenin-1-*O*-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-fucopyranoside)。1990 年余伯阳等^[8]报道的短葶山麦冬皂苷 C 为上述结构的 25*R* 单一构型化合物,其后吴昉等^[9]又从短葶山麦冬中分离得到 25 (*R,S*) 差向异构体混合物,并命名为 DT-13。由于该化合物在短葶山麦冬中主要以 25 (*R,S*) 混合构型天然存在,两种构型具有相似的化学性质和药理特性,在目前的研究中常对二者不做区分,并主要以 DT-13 为研究对象。

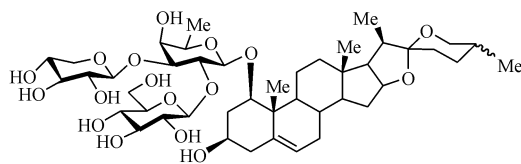


Figure 1 Chemical structure of DT-13

1.2 制备与分离

目前文献报道的 DT-13 的制备主要从中药短葶山麦冬块根或须根中提取分离所得。

分离方法 1: 取短葶山麦冬的干燥块根,用蒸馏水浸渍 5 h 后回流 3 次每次 3 h。收集合并 3 次的水提物并过滤,将滤液冻干成干粉。提取物用 D101 树脂柱分离,依次用蒸馏水,40% 乙醇和 80% 乙醇洗脱,收集 80% 乙醇洗脱液并真空浓缩至干,得到富含皂苷的部分。使用硅胶柱和交联葡聚糖 LH-20 对其进行色谱分析,洗脱液为氯仿-甲醇-水(65:20:5),洗脱得到 DT-13,其得率为 0.11% 左右^[10]。

分离方法 2: 取短葶山麦冬的干燥块状根粉末,用 75% 乙醇回流提取 3 h。EtOH 提取物集中和悬浮在水中,用大孔树脂 D101 色谱法去除多糖

和分离不同浓度 EtOH 的粗提物。提取液回收乙醇并浓缩,DT-13 得率为 0.45% 左右^[11]。

比较醇提和水提方法发现,醇提 DT-13 的得率要高于水提。进一步通过研究确定 DT-13 的最佳提取工艺为^[12]: 12 倍量 70% 乙醇,回流提取 3 次,每次 1 h;提取液回收乙醇后,用水分散至药液中 DT-13 的浓度为 0.1 mg/mL,上样液 pH 控制在 4~5 之间,提取液以每小时 1 倍柱体积的流速通过 D101 型大孔树脂吸附,树脂的最大吸附量为 4.6 mg/mL;分别用水、30% 乙醇除去杂质,75% 乙醇以每小时 1 倍柱体积的流速洗脱 6 h,收集 75% 部位,浸膏得率为 3%;用水稀释至密度为 1.02 g/mL,乙酸乙酯萃取,水层减压回收至干。粉末用 3 倍量硅胶分离,收集氯仿-甲醇-水(8.8:1.2:0.12)部分,减压旋干该部分得 DT-13 粗品;将粗品用甲醇-水重结晶,养晶 8~12 h,得到 DT-13 白色针状晶体。采用 HPLC-ELSD 法测定 DT-13 的纯度为 90% 以上。提示该制备方法所得 DT-13 得率稳定,纯度较高,适于工业化生产。

1.3 含量测定

甾体皂苷因无紫外吸收,检测较为困难。关于短葶山麦冬皂苷的含量测定的报道较少,主要有薄层扫描法、比色法和 HPLC-ELSD 法等^[13-14]。

丁锐等^[14]采用 HPLC-ELSD 法,检测结果显示短葶山麦冬皂苷 C 进样量在 1.04~8.34 μ g 范围内线性良好;平均回收率为 95.8%,RSD 为 1.5%。此方法简便,准确,可用于短葶山麦冬中 DT-13 的定量分析。胡正芳等^[14]也利用 HPLC-ELSD 法测定不同产地和采收期短葶山麦冬块根中 DT-13 的含量。结果显示各产地的样品中 DT-13 的含量差异不显著,其中福建惠安、仙游所产短葶山麦冬的 DT-13 含量较高。从不同采收期的结果来看,1~3 月虽然 DT-13 含量较高,但短葶山麦冬产量很低;进入 4 月后含量有所下降,但短葶山麦冬块根膨大增加,生物产量急速增大;到 5 月份含量也开始上升。因此认为 5 月份应为短葶山麦冬的最佳采收期。该方法可快速、准确测定 DT-13 的含量,为控制短葶山麦冬的药材质量及最佳采收时间的确定提供了科学依据。

1.4 DT-13 的吸收与分布

Chen 等^[15]采用 LC-MS 法测定大鼠体内的 DT-13 含量。使用 Ultimate C₁₈ 色谱柱分离测定大鼠血浆中的 DT-13。该方法应用于药代动力学,研究在静脉注射和灌胃后大鼠血浆中的 DT-13。结果显示

大鼠体内 DT-13 经历了长时间的吸收而缓慢消除,口服生物利用度较低(5.51%)。为提高 DT-13 的水溶性,促进药物的吸收,充分发挥其药理作用,袁红坤等^[16]制备了 DT-13 固体脂质纳米粒(DT-13-SLN),并采用单因素试验初选 DT-13-SLN 的制备条件,以正交设计优化 DT-13-SLN 的处方和制备工艺,为 DT-13 的进一步应用提供一定参考依据。

另外,顾文叶等^[17]利用制备纯化 DT-13 的单克隆抗体,对 DT-13 的细胞内定位进行研究。结果显示 DT-13 在不同的细胞内表现出不同的作用特点。DT-13 对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)基本无细胞毒性,且细胞生长及形态正常,给药后迅速进入胞浆,然后逐渐进入细胞核并长时间蓄积;对人宫颈癌细胞能更迅速地进入细胞核并长时间蓄积。表明 DT-13 可能作用于细胞核而发挥其药理作用,且对肿瘤细胞的作用更迅速。

1.5 药理活性及其作用机制

1.5.1 抗肿瘤及抗肿瘤转移作用 研究结果显示 DT-13 具有较好的抗肿瘤及抑制肿瘤转移的作用。余伯阳等^[18]研究表明:小鼠腹腔注射或者皮下注射 20 mg/kg DT-13 对 S180 肉瘤有抑瘤作用,小鼠腹腔注射 10 mg/kg DT-13 对艾氏腹水瘤也有显著抑瘤活性。DT-13 具有较明显的体外抗肿瘤细胞增殖的能力,对于不同的肿瘤细胞株,其作用强度也不同^[19]。对于肝癌 SMMC-7721、宫颈癌 HeLa、肺癌 A549、乳腺癌 MDA-MB-435 细胞,DT-13 的 IC_{50} 分别为 17, 38, 67 和 0.783 $\mu\text{mol/L}$ 。研究表明,DT-13 抑制肿瘤细胞增殖具有选择性,其抑制肿瘤细胞 MDA-MB-435 细胞增殖的能力强于其他细胞株。说明 DT-13 具有开发成抗乳腺癌药物的潜力。

另外,肿瘤细胞的黏附和迁移在肿瘤侵袭和转移中是至关重要的步骤。黏附是肿瘤转移反应的首要环节,是肿瘤转移发生的重要因素。在肿瘤浸润和转移过程中,肿瘤细胞脱离原发灶迁移到继发灶,从而完成肿瘤的转移^[20]。研究人员选用人乳腺癌细胞 MDA-MB-435 成功建立了抗肿瘤转移药物筛选模型,并筛选了 1 260 种化合物,经过初筛、复筛和体内评价,发现 DT-13 对组织因子(TF)的抑制作用比较明显,并具有一定的抗肿瘤转移作用。DT-13 在体外浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时对 TF 的抑制率为 60.0%;同时 DT-13 在给药剂量为 10, 5 mg/kg 时可抑制体内肺肿瘤转移,阳性药 5-Fu 在 25 mg/kg 剂量下也

呈现类似效应^[21-22]。同时针对肿瘤细胞对细胞外基质的黏附和侵袭,采用 RNA 干扰技术、qRT-PCR 和 Western blot 对 DT-13 的体内外抗肿瘤转移作用及分子机制研究进行研究。结果显示,在正常氧浓度条件下,DT-13 在 0.1 ~ 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内对细胞黏附和迁移没有显著影响;缺氧条件下,DT-13 能抑制缺氧诱导的 MDA-MB-435 细胞对 vitronectin 的黏附,抑制缺氧诱导的细胞侵袭,抑制低氧诱导的 $\alpha\beta 3$ 整合素,TF 和早期生长反应基因 1(Egr-1)的表达,并能减少缺氧条件下基质金属蛋白-9(MMP-9)的分泌,提示 DT-13 通过调节 Egr-1 进而影响 TF,抑制缺氧状态下 MDA-MB-435 细胞的转移^[7]。DT-13 在 10 ~ 30 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内还可抑制 MDA-MB-435 细胞的增殖、黏附和入侵体外,下调 MMP-2/9 的表达和分泌,并抑制 p38 的磷酸化^[23]。同时,DT-13 可抑制 MDA-MB-435 细胞中血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、趋化因子受体 5(C-C chemokine receptor type 5, CCR5)和缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)的蛋白和 RNA 水平表达,发挥其抑制肿瘤转移的作用^[24]。另外,DT-13 在 10, 30 $\mu\text{mol/L}$ 时,可显著地抑制人肺癌 A549 细胞的黏附与侵袭,并对 A549 细胞中 MMP-2/9 的表达均有抑制作用,提示 DT-13 可能通过抑制 MMP-2/9 的表达,发挥其抑制肿瘤转移的作用^[25]。

同时,裸鼠的体内研究进一步证实^[24],DT-13 可抑制乳腺癌的肺转移。在将肿瘤细胞 MDA-MB-435 注射进雌性裸鼠 14 d 后,灌胃给予的 DT-13,在浓度为 5 和 10 mg/kg 剂量范围内的 DT-13 组小鼠的肿瘤体积有显著降低。同时通过尾静脉注射阳性对照药拓扑替康(Topotecan)2 mg/kg,小鼠的肿瘤体积与重量均有显著降低。

研究显示,DT-13 具有抑制血管生成的活性。DT-13 在浓度范围为 0.01 ~ 1 $\mu\text{mol/L}$ 在常氧和缺氧情况下不会影响 HUVEC 增殖,但在浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 时可抑制管腔形成,在浓度为 0.1 和 1 $\mu\text{mol/L}$ 时可抑制内皮细胞的迁移;此外,从鸡胚绒毛尿囊膜的模型观察到 DT-13 在体内能显著降低血管密度,DT-13 抑制缺氧引起的缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α),磷酸化细胞外信号调节激酶 p-ERK1/2 和 p-Akt 水平的增加;DT-13 抑制血管内皮生长因子分泌;此外,DT-13 降低磷酸化血管内

皮生长因子受体2水平和血管内皮生长因子诱导p-Akt,从而抑制血管内皮生长因子诱导的迁移和腔管形成以抑制血管生成^[26]。

1.5.2 抗血栓作用 血栓是恶性肿瘤患者的一种常见并发症,它预示恶性肿瘤患者预后较差。有研究显示,肿瘤细胞直接浸润或释放炎症细胞因子损伤内皮细胞,全身和局部缺氧化疗、放疗、介入和手术等治疗损伤内皮细胞,使其抗血栓作用降低而其促血栓作用增强;同时TF等相关因子的释放,也会影响肿瘤细胞的生长和转移^[27]。田友清等^[28]通过小鼠或大鼠结扎下腔静脉造成的静脉血栓模型来研究DT-13的抗血栓活性。研究表明下腔静脉组织血栓部位的IL-6和TF的基因表达增加,灌胃给予DT-13剂量为2.0和4.0 mg/kg,可抑制结扎小鼠下腔静脉诱导的静脉血栓形成;同时灌胃给予DT-13剂量为1.4 mg/kg,可抑制结扎大鼠下腔静脉诱导的静脉血栓形成,并下调下血栓部位的IL-6和TF的基因表达。结果提示,DT-13可通过其抗血栓活性来防治肿瘤的并发症。

1.5.3 抗炎和免疫调节作用 体外研究显示,DT-13在0.01~1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内,可显著抑制肿瘤坏死因子(TNF- α)或丙二醇甲醚醋酸酯(PMA)诱导的髓样白血病细胞(HL-60)与人脐静脉内皮细胞(ECV304)黏附作用;体内按4 mg/kg剂量灌胃给药,DT-13对二甲苯诱导的小鼠耳郭肿胀和角叉菜胶或组胺诱导小鼠足跖肿胀,也具有显著抑制活性^[29]。另外,在抗原激发迟发型变态反应前或后,腹腔注射DT-13剂量为10,20 mg/kg时均能显著地抑制2,4,6-三硝基氯苯所致的小鼠接触性皮炎,对二甲苯及巴豆油所致的小鼠耳壳炎症反应也有显著的抑制作用;但不影响小鼠体重,高剂量时有一定的抑制胸腺的趋势,却能明显增加脾脏和肾上腺重量,表明DT-13具有较强的抗炎免疫药理活性^[30]。DT-13及其皂苷元可抑制由concanavalin A诱导的淋巴细胞增殖及其与细胞基质的黏附^[6],并拮抗淋巴细胞黏附到细胞外基质,从而达到抑制炎症的作用。据报道,干扰蛋白激酶C通路以封锁淋巴细胞黏附到细胞外基质可能为其DT-13抗炎活性的机制之一^[31]。

1.5.4 心血管保护作用 血管内皮细胞凋亡参与了各种由血管损伤引起的病理生理过程及相关疾病,如:动脉粥样硬化、糖尿病、缺血/再灌注损伤

等^[32]。麦冬广泛用于临床以预防心血管疾病^[33],其皂苷类成分具有显著的血管内皮细胞保护作用,可从多环节多途径调节血管内皮功能的障碍^[34]。有报道指出,DT-13可通过抑制cleaved caspase-3和cleaved PARP的表达,改善线粒体膜电位来抑制血管内皮细胞的凋亡;DT-13参与PI3K/Akt信号通路,加入Akt的抑制剂LY294002,DT-13的作用减弱^[35]。上述研究提示,DT-13可通过抑制异常的内皮细胞凋亡而治疗心血管疾病。

另外,有学者应用标准的全细胞膜片钳技术,直接测量暴露在DT-13的成年大鼠缺氧心肌细胞的钙电流 $I_{\text{Ca,L}}$,结果表明,DT-13能减少成年大鼠心肌细胞 $I_{\text{Ca,L}}$ 。DT-13的这种 $I_{\text{Ca,L}}$ 抑制效应是浓度依赖型而且与频率无关^[36],提示DT-13的心血管效应也可能和缺氧的状况下L型钙通道密切相关。

1.5.5 改善肝损伤 据报道^[6],DT-13在10,20 mg/kg浓度范围内对实验性肝损伤有保护作用,可显著降低肝损伤时的迟发型过敏反应,可抑制 CCl_4 预处理的肝细胞毒性。提示DT-13可提高肝浸润淋巴细胞选择性导致的功能障碍引起的免疫肝损伤。

1.6 安全性评价

有研究从急性毒性、长期毒性、遗传毒性、生殖/发育毒性等方面,对DT-13进行了初步安全性评价。结果显示,DT-13在0.01~1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内体外对人正常肝、内皮细胞生长无明显影响^[26]。体内1次灌胃给予小鼠/大鼠的耐受量大于5 g/kg,提示其无明显急性毒性;DT-13在每皿0.05~500 g范围内,对测试菌株测试菌株TA97、TA98、TA100和TA102无致突变性;1250~5000 mg/kg体内给药对小鼠骨髓微核无明显影响;将DT-13以每日10,60,360 mg/kg(约相当于临床拟使用剂量的10,60,360倍)灌胃给予大鼠90 d,试验期间大鼠未出现DT-13导致的死亡;大鼠外观体征、行为活动均未出现明显异常;高剂量组雌性大鼠体重在给药两周后与空白对照组相比显著下降,但在停药14 d后恢复期观察中恢复正常;部分生化指标有一定改变,但均不具有剂量效应关系,并在停药后14 d恢复正常。大鼠主要脏器的组织病理学检查发现,各给药组与正常组相比,无明显差异,未见明显病变^[10]。研究结果提示,在相应试验条件下,DT-13无急性中毒的危险性,不具有明

显的长期毒性,不具有明显遗传毒性和生殖/发育毒性,即 DT-13 具有较好的安全性,为其临床应用于抗肿瘤转移奠定基础。

2 展 望

DT-13 是短葶山麦冬中的主要活性甾体皂苷之一,关于其化学结构、提取分离、测定方法、药理活性等研究取得了一定的成果。就目前的研究发现,DT-13 可采用药材地下部位作为原料,实现药用资源的节约与合理利用,制备工艺简便、经济、可控,适宜于工业化大规模生产。DT-13 具有较明确

的抗肿瘤转移作用,DT-13 可作用于肿瘤细胞,抑制其黏附、侵袭和迁移;作用于内皮细胞,抑制缺氧和常氧下鸡胚尿囊膜和大鼠动脉环血管形成;DT-13 还可影响肿瘤微环境,通过抑制肿瘤间质成纤维细胞,抑制肿瘤细胞的黏附以及抑制内皮细胞管腔形成;从而影响多环节、多途径,发挥抑制肿瘤转移作用,其可能的作用机制概括为图 2。另外,DT-13 还有调节免疫、抗炎、抗血栓等药理活性,有利于肿瘤的综合治疗。同时,体内外研究表明,DT-13 无明显的毒性作用,使用安全,具有开发成高效低毒抗肿瘤新药的潜力。

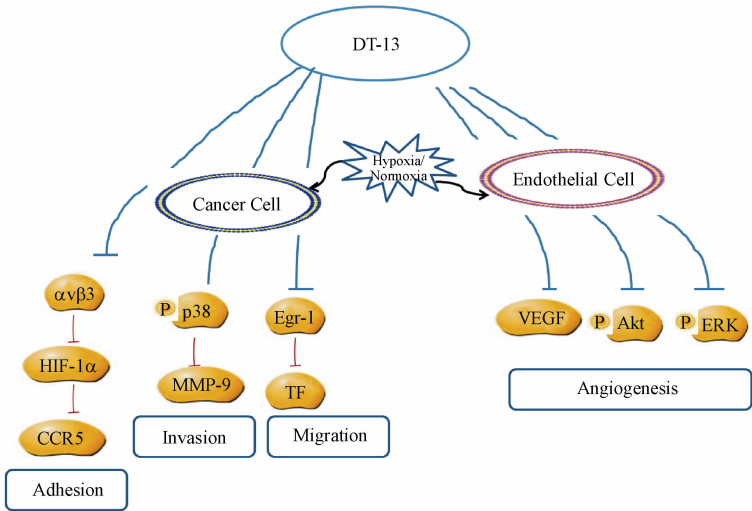


Figure 2 Schematic diagram of DT-13 on tumor metastasis

但是,关于 DT-13 的研究仍存在许多待探讨的问题,如 DT-13 高疗效与低生物利用度的矛盾,仍有待通过探讨胃肠道代谢调控等途径进一步解决。另一方面,关于 DT-13 作用机制与作用靶点的研究,尚缺少较深入与较明确的报道。综合利用信息学、化学、生物学与影像学等多学科交叉技术,制备以 DT-13 为探针的小分子荧光探针、亲和介质或同位素标记等方法,进一步识别 DT-13 在体内发挥其药效的关键功能蛋白,确证其抗肿瘤及肿瘤转移活性的作用靶点,阐释相关信号通路,以期为创制具有自主知识产权、安全有效、作用机制明确的中药一类新药奠定基础。

参 考 文 献

[1] Yu BY, Xu GJ. Studies on resource utilization of Chinese drug Dwarf Lilyturf (*Ophiopogon japonicus*) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1995, 26(4): 205 – 210.

[2] Chen X, Tang J, Xie W, et al. Protective effect of the polysaccharide from *Ophiopogon japonicus* on streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 94(1): 378 – 385.

[3] Wang XM, Sun RG, Zhang J, et al. Structure and antioxidant activity of polysaccharide POJ-U1a extracted by ultrasound from *Ophiopogon japonicus* [J]. *Fitoterapia*, 2012, 83(8): 1 576 – 1 584.

[4] Li N, Zhang JY, Zeng KW, et al. Anti-inflammatory homoisoflavonoids from the tuberous roots of *Ophiopogon japonicus* [J]. *Fitoterapia*, 2012, 83(6): 1 042 – 1 045.

[5] Cheng ZH, Wu T, Yu BY, et al. The research on the chemical composition of *Liriope muscari* (Decne) Bail. [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(6): 823 – 826.

[6] Wu FH, Cao J, Jiang J, et al. Ruscogenin glycoside (Im-3) isolated from *Liriope muscari* improves liver injury by dysfunctioning liver-infiltrating lymphocytes [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2001, 53(5): 681 – 688.

[7] Sun L, Lin SS, Zhao RP, et al. The saponin monomer of dwarf lilyturf tuber, DT-13, reduces human breast cancer cell adhesion and migration during hypoxia via regulation of tissue factor [J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(7): 1 192 – 1 198.

- [8] Asano T, Murayama T, Hirai Y, *et al.* Comparative studies on the constituents of ophiopogonis tuber and its congeners. VIII. Studies on the glycosides of the subterranean part of *Ophiopogon japonicus* Ker-Gawler cv. Nanus [J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 1993, **41**(3): 566–570.
- [9] Wu T, Chen ZH, Yu BY, *et al.* Quantitative determination of the main saponin content in Hubei Liriope (*Liriope spicata* var. *prolifera*) by HPLC-ELSD [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2000, **31**(3): 175–177.
- [10] Ma ST, Kou JP, Yu BY. Safety evaluation of steroidal saponin DT-13 isolated from the tuber of *Liriope muscari* (Decne.) Bailey [J]. *Food Chem Toxicol*, 2011, **49**(9): 2 243–2 251.
- [11] Hu ZF, Jiang C, Qin MJ, *et al.* Determination of 25(R,S) ruscogenin 1-O- β -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 2) [β -D-xylopyranosyl (1 \rightarrow 3)] β -D-fucopyranoside in *Liriope muscari* from different habitats and different harvest time by HPLC-ELSD [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2010, **35**(19): 2 508–2 510.
- [12] Yu BY, Yuan WW, Qi J. Preparation methods of DT-13: CN, 102180932B [P]. 2013-03-13.
- [13] Li LZ, Yu BY. Analyse of the totalsaponin in *Liriope muscari* by colorimetry [J]. *Strait Pharm J (海峡药学)*, 2005, **17**(13): 44.
- [14] Ding R, Di TY, Wang GL, *et al.* HPLC-ELSD determination of ruscogenin 1-O- β -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 2) [β -D-xylopyranosyl (1 \rightarrow 3)] β -D-fucopyranoside in *Liriope muscari* (Decne.) Bailey [J]. *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 2011, **31**(1): 127–130.
- [15] Chen LL, Yuan WW, Hu ZF, *et al.* Determination and pharmacokinetics of DT-13 in rat plasma by LC-MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, **56**(3): 650–654.
- [16] Yuan HK, Lu X, Zhong WY. Preparation of *Liriope muscari* Bailey saponins C solid lipid nanoparticle [J]. *Pharm Care Res (药学服务与研究)*, 2007, **7**(6): 413–416.
- [17] Gu WY, Zhang J, Liu JH. Study on the distribution in cells by ophiopogonin C [J]. *Pharm Biotechnol (药物生物技术)*, 2013, **20**(4): 336–339.
- [18] Yu BY, Yin X, Rong ZY, *et al.* Biological activities of ruscogenin 1-O- β -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 2) [β -D-xylopyranosyl (1 \rightarrow 3)] β -D-fucopyranoside from tuberous roots of *Liriope muscari* (Decne.) Bailey [J]. *J China Pharm Univ (中国药科大学学报)*, 1994, **25**(5): 286–288.
- [19] Zhang YY. The comparison of DT-13 and ophiopogonin-D on anti-tumor metastasis [D]. Nanjing: China Pharmaceutical University, 2012.
- [20] Pu X, Ma C, Yin G, *et al.* Cell adhesion and invasion inhibitory effect of an ovarian cancer targeting peptide selected via phage display *in vivo* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, **443**(3): 858–863.
- [21] Yuan ST, Sun L, Yu BY, *et al.* Application of ophiopogonin cin pharmacy: CN, 101352448B [P]. 2010-12-22.
- [22] Yuan ST, Sun L, Zhang LY, *et al.* High throughput screening model for anti-metastasis drug: CN, 101376907 [P]. 2009-03-04.
- [23] Zhang YY, Liu JH, Kou JP, *et al.* DT-13 suppresses MDA-MB-435 cell adhesion and invasion by inhibiting MMP-2/9 via the p38 MAPK pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2012, **6**(5): 1 121–1 125.
- [24] Zhao RP, Lin SS, Yuan ST, *et al.* DT-13, a saponin of dwarf lilyturf tuber, exhibits anti-cancer activity by down-regulating C-C chemokine receptor type 5 and vascular endothelial growth factor in MDA-MB-435 cells [J]. *Chin J Nat Med*, 2014, **12**(1): 24–29.
- [25] Zhang YY, Liu JH, Kou JP, *et al.* DT-13, a steroidal saponin from *Liriope muscari* L. H. Bailey, suppresses A549 cells adhesion and invasion by inhibiting MMP-2/9 [J]. *Chin J Nat Med (中国天然药物)*, 2012, **10**(6): 436–440.
- [26] Zhao RP, Sun L, Lin SS, *et al.* The saponin monomer of dwarf lilyturf tuber, DT-13, inhibits angiogenesis under hypoxia and normoxia via multi-targeting activity [J]. *Oncol Rep*, 2013, **29**(4): 1 379–1 386.
- [27] Lima LG, Monteiro RQ. Activation of blood coagulation in cancer: implications for tumour progression [J]. *Biosci Rep*, 2013, **33**(5): 701–710.
- [28] Tian YQ, Ma ST, Lin B, *et al.* Anti-thrombotic activity of DT-13, a saponin isolated from the root tuber of *Liriope muscari* [J]. *Indian J Pharmacol*, 2013, **45**(3): 283–285.
- [29] Tian YQ, Kou JP, Li L, *et al.* Anti-inflammatory effects of aqueous extract from Radix *Liriope muscari* and its major active fraction and component [J]. *Chin J Nat Med (中国天然药物)*, 2011, **9**(3): 222–226.
- [30] Xu Q, Wang R, Yu BY. Effects of ruscogenin fucopyranoside on the delayed type hypersensitivity and inflammatory reactions [J]. *J China Pharm Univ (中国药科大学学报)*, 1993, **24**(2): 98–101.
- [31] Liu J, Chen T, Yu BY, *et al.* Ruscogenin glycoside (Lm-3) isolated from *Liriope muscari* inhibits lymphocyte adhesion to extracellular matrix [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2002, **54**(7): 959–965.
- [32] Hong D, Bai YP, Gao HC, *et al.* Ox-LDL induces endothelial cell apoptosis via the LOX-1-dependent endoplasmic reticulum stress pathway [J]. *Atherosclerosis*, 2014, **235**(2): 310–317.
- [33] Jiang FR, Zhang X, Fan J. Advance study on the pharmacology of *Ophiopogon* [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med (中医药学刊)*, 2006, **24**(2): 236–237.
- [34] Song JX, Kou JP, Huang YL, *et al.* Ruscogenin mainly inhibits nuclear factor-kappaB but not Akt and mitogen-activated protein kinase signaling pathways in human umbilical vein endothelial cells [J]. *J Pharmacol Sci*, 2010, **113**(4): 409–413.
- [35] Qiu C, Jozsef L, Yu BY, *et al.* Saponin monomer 13 of dwarf lilyturf tuber (DT-13) protects serum withdrawal-induced apoptosis through PI3K/Akt in HUVEC [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, **443**(1): 74–79.
- [36] Tao J, Wang H, Zhou H, *et al.* The saponin monomer of dwarf lilyturf tuber, DT-13, reduces L-type calcium currents during hypoxia in adult rat ventricular myocytes [J]. *Life Sci*, 2005, **77**(24): 3 021–3 030.