



液体发酵桦褐孔菌三萜类成分抑制肿瘤细胞活性研究

金黎达, 欧文斌, 徐向群

(浙江理工大学生命科学学院, 杭州 310018)

摘要: 探究桦褐孔菌液体深层发酵所得菌丝体中三萜类成分的抗肿瘤活性。采用高效液相色谱法鉴定桦褐孔菌液体深层发酵产物中含有 5 种已知具有肿瘤细胞生长抑制活性的三萜类成分, 采用 MTT 比色法分析三萜类成分对卵巢癌细胞 ES2、SKOV3 和肺癌细胞 A549 和 PC9 的生长活性的影响, 通过细胞周期和细胞凋亡实验研究三萜类成分对卵巢癌细胞和肺癌细胞增殖的影响。结果表明: 经过三萜类成分处理 3 d 和 6 d 的肿瘤细胞生长活性均被明显抑制, 对卵巢癌细胞 ES2 抑制的 IC_{50} 分别为 21.1 $\mu\text{g/mL}$ 和 17.6 $\mu\text{g/mL}$, 对 SKOV3 抑制的 IC_{50} 值分别为 33.8 $\mu\text{g/mL}$ 和 10.9 $\mu\text{g/mL}$; 对肺癌细胞 PC9 抑制的 IC_{50} 分别为 21.4 $\mu\text{g/mL}$ 和 19.7 $\mu\text{g/mL}$, 对 A549 抑制的 IC_{50} 值分别为 28.5 $\mu\text{g/mL}$ 和 23.5 $\mu\text{g/mL}$ 。细胞周期实验结果表明三萜类成分对 ES2、A549、PC9、SKOV3 的阻滞可能发生在 G0/G1 期, 在 16.0 $\mu\text{g/mL}$ 的三萜类成分处理下, PC9、A549、ES2、SKOV3 处在 G1 期的细胞比例与对照组中各细胞 G1 期的占比分别提高 32.3%、45.7%、10.9%、6.2%, S 期的细胞数降低 19.1%、57.3%、23.1%、17.5%。细胞凋亡结果表明, 经过药物处理 2 d 后, 三萜类成分能够有效的诱导卵巢癌细胞 ES2、SKOV3 和肺癌细胞 A549 和 PC9 的细胞凋亡, 进一步验证桦褐孔菌三萜类成分具有肿瘤抑制活性。

关键词: 桦褐孔菌; 液体深层发酵; 三萜; 肿瘤细胞抑制

中图分类号: Q936

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851 (2019) 01-0098-08

Preliminary study on tumor cell activity inhibition effect of triterpene from submerged fermentation of *Inonotus obliquus*

JIN Lida, OU Wenbin, XU Xiangqun

(School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018)

Abstract: This study aims to investigate the anticancer activity of triterpene from submerged fermentation of *Inonotus obliquus*. HPLC experiments showed that submerged fermentation products of *Inonotus obliquus* contained five triterpenes which could inhibit tumor cell growth. MTT colorimetric assay was used to analyze the influence of triterpenes on growth activity of ovarian cancer cells ES2 and SKOV3, and lung cancer cells A549 and PC9. Cell cycle and cell apoptosis experiments were carried out to investigate the effect of triterpenes on proliferation of ovarian cancer cells and lung cancer cells. The results showed that, growth activity of the cancer cells treated by triterpenes for 3d and 6d was obviously inhibited. The IC_{50} values of ES2 were 21.1 $\mu\text{g/mL}$ and 17.6 $\mu\text{g/mL}$, respectively; the IC_{50} values of SKOV3 were 33.8 $\mu\text{g/mL}$ and 10.9 $\mu\text{g/mL}$, respectively; the IC_{50} values of PC9 were 21.4 $\mu\text{g/mL}$ and 19.7 $\mu\text{g/mL}$, respectively; the IC_{50} values of A549 were 28.5 $\mu\text{g/mL}$ and 23.5 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The results of the cell cycle experiments showed that the inhibition of ES2, SKOV3, PC9 and A549 may occur in G0/G1 phase. After treatment with 16.0 $\mu\text{g/mL}$ triterpenes, the proportion of cells in G1 phase of PC9, A549,

收稿日期: 2018-05-22 网络出版日期: 2018-11-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(81728012); 浙江省自然科学基金项目(LY16B020013, LY18H160065)

作者简介: 金黎达(1993-), 男, 浙江绍兴人, 硕士研究生, 主要从事桦褐孔菌的研究。

通信作者: 徐向群, xuxiangqun@zstu.edu.cn

SKOV3 and ES2 increased by 32.3%, 45.7%, 10.9% and 6.2% respectively, compared with the control group, and the proportion of cells in S phase reduced 19.1%, 57.3%, 23.1% and 17.5%, respectively. Apoptosis results showed that after treatment with triterpenoid for 2d, triterpenes could effectively induce apoptosis of ES2, SKOV3, PC9 and A549, which further verifies the triterpenoids of *Inonotus obliquus* possess tumor cell inhibition activity.

Key words: *Inonotus obliquus*; submerged fermentation; triterpene; tumor cell inhibition

桦褐孔菌作为一种药用真菌,具有多种生物活性,被认为是一种珍贵的、具有极好疗效的药物^[1]。在桦褐孔菌中,起到活性作用的是多糖、多酚以及三萜类物质等^[2],这类物质在抗炎症、抗肿瘤、抗真菌、抗病毒、抗细菌、提高机体免疫力、保肝和抗氧化等方面都具有药物活性^[3-4]。在自然条件下桦褐孔菌的子实体所需要的生长条件较为苛刻,通常寄生在极寒条件下的桦树上,其子实体的生长周期长,需要十年及以上的时间,因此,实验室多采用液体深层发酵的方法来培养桦褐孔菌,并获得桦褐孔菌的菌丝体以及在菌丝体形成过程中产生的次生代谢产物^[5]。

癌症是一种极为严重、致死率极高的疾病,桦褐孔菌的子实体在被作为民间药物使用时,有作为抗肿瘤的治疗药物的记载^[6],桦褐孔菌的液体深层发酵所获得的菌丝体虽然和桦褐孔菌子实体的组成成分含量有所差别^[7],但是组成成分的类别大致相同^[8]。因此,桦褐孔菌液体深层发酵菌丝体的三萜提取物具有作为抗癌药物的研究价值^[9]。

近年来,国内外研究者对桦褐孔菌抗肿瘤作用的研究对象多数是桦褐孔菌提取物中的多糖成分^[10-11],而桦褐孔菌三萜类化合物作为研究对象的文献较少,本文通过对 4 种癌细胞以及一种正常肺细胞进行噻唑蓝(Thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT)检测分析,确定三萜类化合物对某些癌细胞的增殖具有抑制作用,并且与已知的几种三萜类抗肿瘤成分相比,以评价桦褐孔菌三萜成分的抗肿瘤活性的效果;进行细胞周期以及细胞凋亡实验分析,初步评价桦褐孔菌三萜类化合物对卵巢癌细胞 ES2、SKOV3 和肺癌细胞 PC9、A549 细胞周期及细胞凋亡的影响,并通过 HPLC 来进一步确定桦褐孔菌三萜类化合物中的具有抗癌活性的活性成分,为进一步分析其作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

活化培养基:麦芽浸膏 2.0 g,葡萄糖 2.0 g,蛋白胨 0.1 g,琼脂 2.0 g。

种子培养基:KH₂PO₄ 30.0 mg, MgSO₄ 20.0 mg, 酵母浸膏 0.3 g, 蛋白胨 50.0 mg, 葡萄糖 1.0 g。

基础培养基的配方参考文献^[12],具体为:玉米粉 5.3 g, 蛋白胨 0.3 g, CoCl₂ · 6H₂O 2.0 mg, KH₂PO₄ 0.1 g, MgSO₄ 20.0 mg, ZnSO₄ · 7H₂O 1.0 mg, K₂HPO₄ · 3H₂O 50.0 mg, FeSO₄ · 7H₂O 5.0 mg, CuSO₄ · 5H₂O 2.0 mg, MnSO₄ · 4H₂O 9.0 mg, 用蒸馏水定容至 100.0 mL。

原始细胞株: Besa2、SKOV3、PC9、A549、ES2 均由哈佛医学院 Fletcher 博士实验室保存。

实验试剂: Propidium Iodide (PI) 溶液购自 BD 公司, 牛血清、RPMI 1640、2.5% Trypsin-EDTA、PBS 缓冲液和 DMSO 购自鼎国生物有限公司。

1.2 菌种活化和发酵

菌种活化和发酵方法参考文献^[13],具体为:在超净台中用接种环把原始菌种接到麦芽浸膏琼脂(Malt extract broth, Mea)斜面培养基中,并将含有培养基的试管转移到相对湿度为 90.0%, 温度为 28 °C 的恒温恒湿箱中培养 10 d, 完成菌种的活化。在超净台中,用接种环从活化的菌种中挑取几块少量的菌丝体,接种到 Mea 培养基平板上,置温度为 28 °C、湿度为 90.0% 的恒温恒湿箱中,倒置培养。液体种子培养基在超净台中完成接种过程,放到恒温恒湿箱中培养 3~4 d, 培养条件为 25 °C、相对湿度 85.0%;最后将锥形瓶放到摇床之中进行培养,条件为 28 °C, 150 r/min。每瓶发酵培养基中加入 2.0 mL 的液体种子,放入 28 °C, 150 r/min 的气浴恒温振荡器中培养 7 d。

1.3 细胞培养

将冻存的细胞从液氮灌中取出,在 37 °C 水浴锅中快速解冻,在超净台中,吸取出冻存管中的细胞液并转移到 15.0 mL 的离心管中,加入 7.0 mL 的完全培养基混匀,1000 r/min 离心 5 min,弃上清液,用 5.0 mL 的完全培养基重新混匀细胞,将混匀后的细胞液转移到 T25 中,在 37 °C、5.0% CO₂ 的培养箱中静置培养。

弃去 T25 中的旧完全培养基;用 1.0 mL 的 PBS

溶液清洗;弃PBS,在T25中加入1.0 mL的2.5%胰酶(Trypsin-EDTA);在培养箱中静置消化5 min;消化完成后加入等量的完全培养基;收集细胞液并转移到离心管中,室温条件下1000 r/min离心5 min;弃去上清;加入10.0 mL或者15.0 mL的完全培养基,将细胞1:3的比例传代;培养箱中静置培养,培养条件为37 ℃和5.0% CO₂。

1.4 香草醛-冰醋酸法分析含量

三萜的测定方法参考文献^[14],具体为:用无水乙醇溶解8.0 mg的白桦脂醇标准品,并定容到50.0 mL,配制成标准溶液;将上述溶液振荡、摇匀,选取不同浓度的标准品溶液;将标准品在沸水中蒸干,然后加入5%的香草醛冰醋酸溶液,每管加入0.2 mL;再在每管中加入0.8 mL的高氯酸,充分混匀;在恒温水浴锅中70 ℃反应15 min,反应完成后放入冰水浴中静置5 min;加入4.0 mL的乙酸乙酯,混匀;将试管中的溶液,置于紫外分光光度计551.0 nm处测定其吸光度,获得标准曲线。

样品总三萜含量的测定:液体深层发酵桦褐孔菌的菌丝体,在烘箱中烘干;用粉碎机研磨成粉末状,并过60目筛子;精确从菌丝体粉末中称取0.1 g,放到10.0 mL的离心管中;加入2.0 mL的异丙醇后用超声波破碎仪进行破壁(每个试管的破壁总时长为4 min,间歇时间为3 s);破壁结束之后,向离心管中加入6.0 mL的异丙醇使得试管中的提取剂达到8.0 mL,在50 ℃的恒温水浴锅中水浴1 d;根据上述步骤再重复两次后合并上清液,取0.1 mL上清液溶液进行和获得标准曲线相同的实验,测定吸光度。

1.5 MTT 测定肿瘤细胞生长抑制率

收集对数生长期的细胞,在细胞计数板中计算收集细胞的总数;向96孔板中每孔加入稀释后的细胞液100.0 μL,控制每孔中细胞数量约为5000个;放到培养箱中静置培养12 h;将96孔板中的培养基更换成不同浓度的含药培养基(设立5个平行组,并且设有空白对照组);继续放入培养箱中培养3 d或者6 d;向96孔板中加入20.0 μL的MTT溶液,孵育4 h;取出96孔板,并吸去孔内的培养液;向96孔板中的对照组以及实验组的孔中加入150.0 μL二甲亚砜,放到摇床中低速振荡10 min,使得96孔板中的甲臞充分溶解;用酶标仪测定各孔在490.0 nm下的OD值^[15],数据用GraphPad Prism 6处理。

1.6 细胞周期分析

将T25中的细胞传代到六孔板中,在培养箱内

继续培养1 d,向六孔板中加入不同浓度(4.0、16.0 μg/mL)的药物,并设立对照组(按4.0%添加异丙醇);经过含药培养基培养3 d之后,取出六孔板,收集六孔板中的旧培养基到15.0 mL的无菌离心管中;用1.0 mL的PBS清洗并转移到相同的离心管中;向六孔板每孔中加入1.0 mL的胰酶消化细胞5 min后收集到对应的离心管中,编号记录相应的药物浓度;在室温下,对15.0 mL离心管进行离心,转速为1000 r/min,持续5 min,弃去上清液;加入1.0 mL预冷的PBS溶液,轻轻吹打离心管中细胞重悬混匀;将含有细胞的PBS溶液转移到1.5 mL的离心管中,并进行标记,在1000 r/min转速下持续离心5 min,弃去上清液;加入1.0 mL的预冷PBS,重复两次上述步骤;每个离心管中加入1.0 mL的75%乙醇,混匀,放到4 ℃冰箱中固定过夜;2 d后离心弃上清,加入1.0 mL预冷的PBS清洗2遍,加入0.5 mL的PI染料,避光染色30 min;在流式细胞仪中检测经过不同浓度三萜类成分处理,4种细胞的细胞周期G1期、S期以及G2期细胞数量占比的变化;实验数据通过CFlow软件处理,具体方法参考文献^[16]。

1.7 细胞凋亡分析

将T25中的细胞传代到六孔板中,在培养箱内继续培养1 d,向六孔板中加入不同浓度(4.0、16.0 μg/mL)的药物,并设立对照组(按4.0%添加异丙醇);经过含药培养基培养2 d之后,取出六孔板,收集六孔板中的旧培养基到15.0 mL的无菌离心管中;用1.0 mL的PBS清洗并转移到相同的离心管中;向六孔板每孔中加入1.0 mL的胰酶消化细胞5 min后收集到对应的离心管中,编号记录相应的药物浓度;在室温下,对15.0 mL离心管进行离心,转速为1000 r/min,持续5 min,弃去上清液;加入1.0 mL预冷的PBS溶液,轻轻吹打离心管中细胞重悬混匀;将含有细胞的PBS溶液转移到1.5 mL的离心管中,并进行标记,在1000 r/min转速下持续离心5 min,弃去上清液;加入1.0 mL的预冷PBS,重复两次上述步骤;每管中加入1.0 mL 1×Binding buffer(保证细胞数量大于1.0×10⁶个);取100.0 μL细胞悬液,加入Annexin V和7-ADD各3.0 μL,室温避光孵育15 min;加入400.0 μL 1×Binding buffer后在BD流式仪中检测经过不同浓度的三萜类成分处理,4种细胞的早期凋亡细胞、晚期凋亡细胞、死细胞以及活细胞数量占比的变化情况;数据用CFlow软件处理。

1.8 HPLC 测定已知三萜含量

分别称量 200.0 μg 的 3 β -hydroxy-lanosta-8, 24-dien-21-al、白桦脂醇、桦褐孔菌醇和栓菌酸(其中白桦脂醇购于 sigma),分别配置成 2.0 mg/L 的标准溶液,分别取 500.0 μL 上述标准溶液将其混合,用甲醇调整混合溶液浓度,使其混合溶液最终浓度分别为 10.0、50.0、100.0、150.0 $\mu\text{g/L}$ 和 250.0 $\mu\text{g/L}$,将溶液通过 2.2×10^{-4} mm 的有机微孔滤器,将其置于 HPLC 中梯度洗脱,流动相为水和乙腈,柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$,进样量为 20.0 μL ,每组上样 3 次,以浓度为横坐标,平均峰面积为纵坐标,获得标准曲线,将对照组与实验组所提取的三萜稀释到之后,按上

述方法进样,并分析成分。

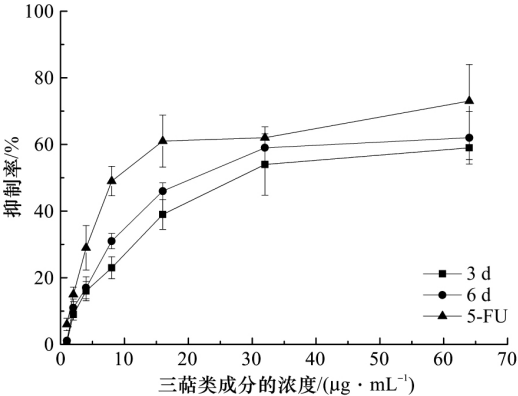
1.9 统计学方法

所有结果数据都设立至少三个平行组,并加入标准差,用 $\pm SD$ 表示, $p < 0.05$ 为有统计学差异, $p < 0.01$ 为有显著统计学差异, $p < 0.001$ 为有极其显著的统计学差异, IC_{50} 值采用 GraphPad Grism 6 计算。

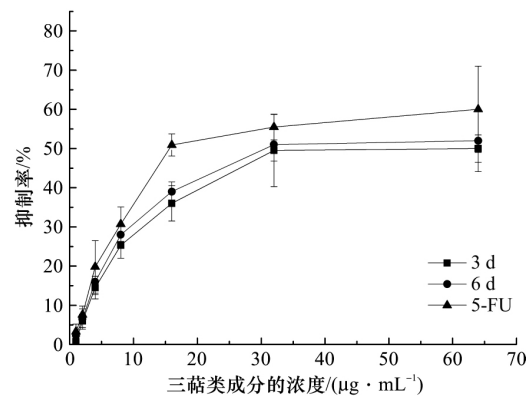
2 结果与分析

2.1 肿瘤细胞抑制率

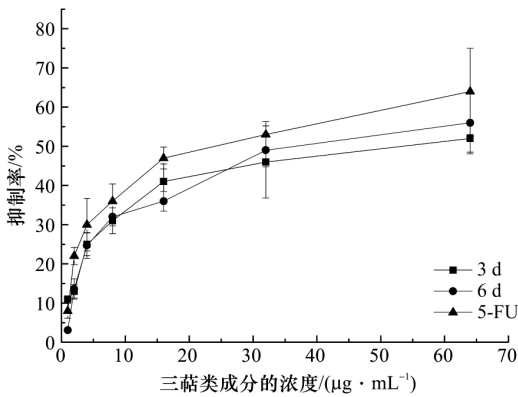
添加不同浓度的三萜类成分处理 3 d 和 6 d 后,对卵巢癌细胞 SKOV3、ES2 和肺癌细胞 PC9、A549 以及正常肺细胞 Besa2 的抑制作用效果如图 1 所示。



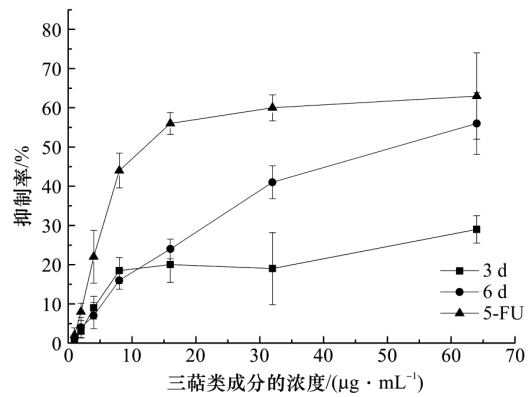
(a) 三萜类成分对A549细胞株生长的影响



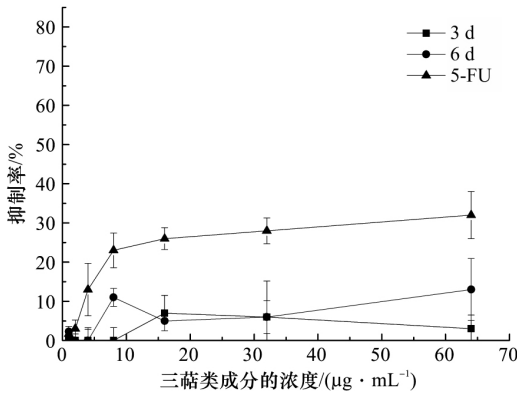
(b) 三萜类成分对ES2细胞株生长的影响



(c) 三萜类成分对PC9细胞株生长的影响



(d) 三萜类成分对SKOV-3细胞株生长的影响



(e) 三萜类成分对Besa2细胞株生长的影响

图 1 三萜类成分对 5 种肿瘤细胞抑制作用

图1表明,桦褐孔菌三萜类成分对卵巢癌和肺癌细胞的抑制效果较明显,并且呈现出和浓度正相关的趋势,同时对 Besa2 细胞的抑制效果并不明显。通过 GraphPad Grism 6 进行计算之后,获得三萜类成分对 5 种癌细胞的 IC_{50} 值,结果如表 1 所示,抑制卵巢癌细胞 ES2 增殖的 IC_{50} 分别为 21.1 $\mu\text{g/mL}$ 和 17.6 $\mu\text{g/mL}$ 、抑制 SKOV3 增殖的 IC_{50} 值分别为 33.8 $\mu\text{g/mL}$ 和 10.9 $\mu\text{g/mL}$;抑制肺癌细胞 PC9 增殖的 IC_{50} 分别为 21.4 $\mu\text{g/mL}$ 和 19.7 $\mu\text{g/mL}$ 、抑制 A549 增殖的 IC_{50} 值分别为 28.5 $\mu\text{g/mL}$ 和 23.5 $\mu\text{g/mL}$ 。以 5-氟尿嘧啶(5-FU)作为阳性对照药物,由表 1 中所列 IC_{50} 值知,5-Fu 对肿瘤细胞的增殖抑制能力要明显强于两种不同处理时间的三萜,但对正常肺细胞 Besa2 的极大损伤,具有明显的副作用。

2.2 细胞周期实验

不同浓度的三萜类成分处理 4 种肿瘤细胞 3 d 后收集细胞,在流式细胞仪中进行细胞周期分析,结

果如表 2 所示。由表 2 可知,肺癌细胞 PC9、A549 和卵巢癌细胞 ES2、SKOV3 经过三萜类成分处理,随着桦褐孔菌提取物的浓度升高,4 种细胞的 S 期和 G2/M 期的比例降低,G0/G1 期的比例提高,表明在 G0/G1 期细胞周期受到阻滞,其中 A549 的变化最为明显;经过 16 $\mu\text{g/mL}$ 三萜类成分处理的 PC9、A549、ES2、SKOV3 与对照相比各细胞处在 G1 期的细胞数分别提高 32.3%、45.7%、10.9%、6.2%,S 期的细胞数降低 19.1%、57.3%、23.1%、17.5%。

表 1 抑制五种细胞增殖的 IC_{50}

细胞株	3 d 的 IC_{50} 值/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	6 d 的 IC_{50} 值/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	3 d 的 5-FU IC_{50} 值/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
A549	28.5	23.5**	11.3
PC9	21.4	19.7	10.2
ES2	21.0	17.6**	10.1
SKOV3	42.5	18.4***	15.0

注:**表示 $p < 0.01$,***表示 $p < 0.001$

表 2 三萜类成分对 5 种细胞细胞周期影响

细胞周期 所占比例	三萜类成分浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)											
	PC9			A549			SKOV3			ES2		
	0.0	4.0	16.0	0.0	4.0	16.0	0.0	4.0	16.0	0.0	4.0	16.0
G1 期/%	35.8±0.9	42.6±1.7	47.4±1.7	53.3±1.6	56.8±0.3	77.7±1.7	55.0±1.9	59.8±2.6	61.0±1.4	66.6±1.1	67.2±0.5	70.7±0.6
S 期/%	51.5±3.3	46.3±2.5	41.7±4.0	26.1±2.6	22.5±1.3	11.1±5.0	26.4±2.3	22.6±1.6	20.3±1.6	20.3±0.9	18.7±0.5	16.7±0.3
G2 期/%	12.7±4.2	11.1±6.0	11.9±2.5	20.6±3.1	20.7±0.1	11.2±2.5	18.6±1.3	17.6±0.7	18.7±0.8	13.1±1.7	14.1±0.6	12.6±2.2

2.3 细胞凋亡实验

用不同浓度的三萜类成分处理 4 种肿瘤细胞 2 d 后收集细胞,在流式细胞仪中测定细胞凋亡情形,结果如表 3 显示,肺癌细胞 PC9、A549 和卵巢癌细胞 SKOV3、ES2 的凋亡比例均有所增加,高于未加入三萜类成分。细胞不同状态的分布如图 2 所示,

经过三萜类成分处理 4 种肿瘤细胞之后,在早期凋亡和晚期凋亡象限中的细胞比例明显增多;经过三萜类成分处理,不仅会引起 4 种肿瘤细胞的细胞凋亡,在死亡细胞象限中的细胞比例也提高。因此,除了引起细胞凋亡之外,三萜类成分的细胞毒性也可能是其药效的方式之一。

表 3 三萜类成分处理对肿瘤细胞凋亡影响

不同细胞 状态所占 比例	三萜类成分浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)											
	PC9			A549			SKOV3			ES2		
	0.0	4.0	16.0	0.0	4.0	16.0	0.0	4.0	16.0	0.0	4.0	16.0
UL/%	0.5±0.5	0.9±0.1	0.7±0.1	0.4±0.1	0.5±0.2	0±0.1	0.2±0.1	0.1±0.1	0±0.1	0.7±0.9	0.3±0.1	0.2±0.1
UR/%	3.9±0.4	4.5±0.6	9.6±1.2	2.0±0.3	1.9±0.7	2.4±1.1	0.5±0.2	3.9±0.5	7.0±0.8	3.3±0.9	1.6±0.5	3.5±0.8
LL/%	90.6±0.6	76.8±2.7	65.7±5.1	96.4±1.4	88.6±3.3	82.6±5.2	97.2±0.2	73.8±10	59.4±4.2	94.7±1.9	83.7±3.3	68.9±3.0
LR/%	5.0±1.2	17.8±3.7	20.8±4.8	1.2±0.3	9.0±0.2	15.0±2.1	2.1±0.4	22.2±5.0	33.6±5.6	1.4±0.1	14.4±3.4	27.4±4.7

注:表中 LL 代表左下方区域为活细胞,LR 代表右下方区域为早期凋亡细胞,UL 代表左上方区域为晚期凋亡细胞,UR 代表右上方区域为死细胞

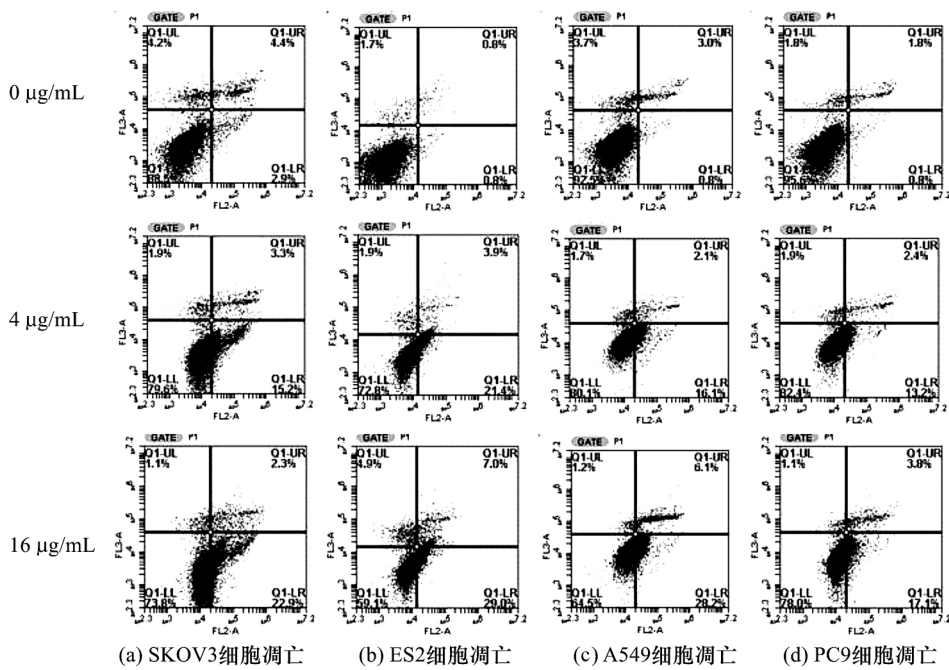


图 2 不同浓度三萜成分处理对 4 种肿瘤细胞凋亡的影响

2.4 三萜类成分中已知化合物的含量

将三萜类成分稀释到 250.0 $\mu\text{g/mL}$ 进行 HPLC 分析,结果如图 3 所示。由图 3 可知,在三萜类成分中,的确含有白桦脂醇、栓菌酸、桦褐孔菌醇、 3β -hydroxy-lanosta-8,24-dien-21-al 和羊毛甾醇,三萜类成分中所占的比例分别为 1.2%、2.6%、2.4%、0.4 和 27.9%。液体发酵桦褐孔菌菌丝体中所提取的三萜类成分含有白桦脂醇、栓菌酸、桦褐孔菌醇、 3β -hydroxy-lanosta-8,24-dien-21-al 和羊毛甾醇。白桦脂醇、栓菌酸和桦褐孔菌醇具备一定的抗癌活性^[17-19],因此桦褐孔菌菌丝体所提取的三萜产生抗癌作用可能是通过这 3 种三萜成分中的一种或者几种达到的。

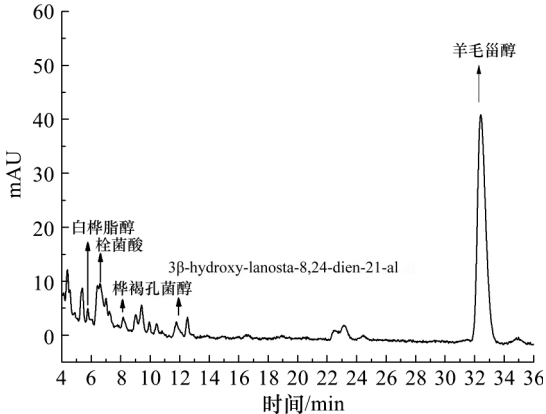


图 3 桦褐孔菌液体深层发酵三萜类成分的 HPLC 分析

3 讨论

Dong 等^[20]发现 4 种新的羊毛甾烷型三萜,对

肿瘤细胞株 MG-803 和 HepG2 的 IC_{50} 值有 42.9 $\mu\text{g/mL}$ 和 44.1 $\mu\text{g/mL}$;Ma 等^[21]利用人参水提取物进行抗癌活性实验,其中一种三萜化合物对 HL-60 和 HepG2 的 IC_{50} 值分别为 11.5 $\mu\text{g/mL}$ 和 23.1 $\mu\text{g/mL}$;刘红兵等^[22]从风杨中提取分离出一种化合物,该化合物在对 K562 细胞有十分显著的抑制效果,并且测定出 IC_{50} 值为 13.6 $\mu\text{g/mL}$ 。与已报到的三萜化合物对肿瘤细胞增殖能力相比,本文研究所得结果桦褐孔菌三萜类成分对 4 种肿瘤细胞增殖的抑制效果较明显,因此桦褐孔菌三萜作为一种癌细胞的抑制的药源是可行的。

细胞周期中 G1 其主要为 S 期合成 DNA 所需 RNA 和蛋白质进行准备,G0/G1 期阻滞说明三萜化合物影响肿瘤细胞在 G1/S 期的检查点,DNA 合成所需的关键蛋白以及关键基因受到抑制^[23],因此,肿瘤细胞就被阻滞在细胞周期中的 G0/G1 期,同时三萜类化合物就可能在细胞凋亡相关的调控点中,对控制细胞凋亡的基因进行诱导,使肿瘤细胞发生自我凋亡^[24]。在细胞周期中,有许多参与对细胞周期调控的因子,通过对细胞周期调控基因 Cyclin D1、Cyclin E1、CDK2 和 CDK4 的抑制以及对 P27 基因的促进可以达到对 G0/G1 期阻滞的效果^[25-27],三萜类成分对肺癌细胞 A549、PC9 和卵巢癌细胞 SKOV3、ES2 细胞的阻滞作用可能就是通过影响上述调控因子来达到阻滞细胞周期的效果。细胞凋亡实验选用 Annexin V 和 7-ADD 试剂进行染色,以此来测定细胞的凋亡比例,其中 Annexin V 用来检

测细胞是否凋亡,7-ADD 用来检测细胞是否存活,两种染色剂就可以将细胞分成活细胞、死细胞、早期凋亡细胞和晚期凋亡细胞四种^[28]。本文中经过不同浓度三萜类成分处理之后的4种细胞的凋亡比例均有所增加,说明加入三萜类成分之后,促进卵巢癌细胞(ES2,SKOV3)和肺癌细胞(PC9,A549)的细胞凋亡。

通过 HPLC 实验,鉴定桦褐孔菌菌丝体中的三萜类成分,主要成分中桦褐孔菌醇具有良好的抗突变抗氧化活性^[29],白桦脂醇的衍生物白桦脂酸能够诱导细胞凋亡来达到抗肿瘤的效果^[30],栓菌酸能够通过调节 P-糖蛋白的表达起到抗肿瘤效果^[31],后续实验中,尝试进一步对三萜类成分进行纯化分离,将其分成具有不同极性的9种成分,栓菌酸的一种成分,具有比未纯化之前更加有效的肿瘤抑制活性。因此栓菌酸可能是桦褐孔菌三萜类成分中起到肿瘤抑制活性的成分之一,但仍需进一步实验确定其成分以及另外几种更有效分部的结构才能更好了解桦褐孔菌三萜类成分的抗肿瘤机制。

4 结 论

本文鉴定桦褐孔菌液体深层发酵的三萜产物,并研究抑制肿瘤细胞株生长效果,主要结果如下:

a)三萜类成分具有良好的肿瘤抑制活性,对抑制肺癌细胞 A549、PC9,卵巢癌细胞 ES2、SKOV3 增殖、引起细胞周期 G0/G1 期阻滞和诱导细胞凋亡都具有良好的效果;

b)桦褐孔菌中存在白桦脂醇、栓菌酸、桦褐孔菌醇、 3β -hydroxy-lanosta-8,24-dien-21-al 和羊毛甾醇5种具备抑制肿瘤细胞株生长效果的活性成分。

本文通过鉴定桦褐孔菌中存在多种具备抗癌活性的物质,为研究桦褐孔菌深层发酵三萜类成分的肿瘤抑制效果奠定基础。

参考文献:

- [1] 陈程,徐向群.桦褐孔菌子实体三萜单体的分离及鉴定[J].浙江理工大学学报,2015,33(3):264-268.
- [2] 董爱荣,刘雪峰,宋福强.桦褐孔菌子实体与菌丝体营养成分比较分析[J].食品科学,2015,36(14):96-101.
- [3] Mothana R A, Awadh A N, Jansen R, et al. Antiviral lanostanoid triterpenes from the fungus *Ganoderma pfeifferi*[J]. Fitoterapia,2003,74(1-2):177-180.
- [4] 李喜范,李军,刘鑫.桦褐孔菌的药用价值及人工段木培养技术[J].食药用菌,2014(2):99-101.
- [5] 苏跃稳,路鹏,郭群群.食用菌液体深层发酵的研究进展[J].食品安全质量检测学报,2016,7(2):645-650.
- [6] Kim Y O, Park H W, Kim J H, et al. Anti-cancer effect and structural characterization of endo-polysaccharide from cultivated mycelia of *Inonotus obliquus* [J]. Life Sciences,2006,9(1):72-80.
- [7] 张振宇,田雪梅,卜祥辉.桦褐孔菌提取物体外抗肿瘤作用研究[C]//刘杏忠,中国菌物学会会员代表大会暨2011年学术年会,北京:中国菌物学会,2011:104-105.
- [8] Xu X, Zhang X, Chen C. Stimulated production of triterpenoids of *Inonotus obliquus* using methyl jasmonate and fatty acids [J]. Industrial Crops & Products,2016,85(7):49-57.
- [9] 董爱荣,刘雪峰,宋福强.桦褐孔菌子实体与菌丝体营养成分比较分析[J].食品科学,2015,36(14):96-101.
- [10] 李雪,王金玲,潘景芝.桦褐孔菌胞外多糖抗肿瘤作用研究[C]//李玉,中国菌物学会2009学术年会论文摘要集,北京:中国菌物学会,2009:101-103
- [11] 姚雪松,弥春霞.药用真菌桦褐孔菌的研究进展[J].吉林农业,2016,(1):80-80.
- [12] Wasser S P. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms [J]. Applied Microbiology & Biotechnology,2011,89(5):1323-1332.
- [13] 张昕.液体深层发酵桦褐孔菌三萜类化合物的鉴定和生物合成的促进[D].杭州:浙江理工大学,2016:58-63.
- [14] 黄秀香,袁霞,林翠梧.分光光度法测定毛老虎茎中三萜酸的总含量[J].时珍国医国药,2007,18(2):297-298.
- [15] 田志刚,张建华.MTT 法在检测细胞因子与细胞毒效应中的应用[J].中国肿瘤生物治疗杂志,1994,1(1):74-79.
- [16] 王晓波,刘珍清,崔巍.流式细胞术检测细胞周期实验样品制备条件的研究[J].现代检验医学杂志,2013,28(1):95-97.
- [17] Yang S J, Liu M C, Xiang H M, et al. Synthesis and invitro antitumor evaluation of betulin acid ester derivatives as novel apoptosis inducers[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2015, 102 (18): 249-255.
- [18] Zhang Q, Huang N, Wang J, et al. The H⁺/K⁺-ATPase inhibitory activities of Trametenolic acid B from *Trametes lactinea* (Berk.) Pat, and its effects on gastric cancer cells [J]. Fitoterapia, 2013, 89 (3): 210-217.
- [19] Zhang X, Bao C, Zhang J. Inotodiol suppresses proliferation of breast cancer in rat model of type 2 diabetes mellitus via downregulation of β -catenin signaling[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018, 99(3):142-150.

- [20] Dong H J, Xue Z Z, Geng Y L, et al. Lanostane triterpenes isolated from epidermis of *Poria cocos*[J]. *Phytochemistry Letters*, 2017,22(12):102-106.
- [21] Ma L Y, Yang X W. Six new dammarane-type triterpenes from acidic hydrolysate of the stems-leaves of *Panax ginseng* and their inhibitory-activities against three human cancer cell lines [J]. *Phytochemistry Letters*, 2015,13:406-412.
- [22] 刘红兵,崔承彬,蔡兵.东京枫杨中三萜类化合物的分离鉴定与抗肿瘤活性[J]. *中国药物化学杂志*, 2004, 14 (3):165-168.
- [23] 林兆民.五种苔类植物的化学成分及其抗肿瘤活性研究[D].济南:山东大学,2014:173-191.
- [24] 李国辉,钟庆庆,沈涛.没药中环阿尔廷烷型三萜抑制前列腺肿瘤细胞增殖的研究[J]. *中药材*, 2013, 36(10): 1640-1643.
- [25] 詹雄宇,陈奇彪,吕秀秀.小檗碱增强表柔比星诱导 T24 细胞 G0/G1 期阻滞的作用机制[J]. *中国病理生理杂志*, 2017, 33(6):1048-1052.
- [26] 易婷娇.猫人参总皂苷对小鼠肝癌皮下移植瘤的抑制作用和对肝癌细胞周期的影响[D].上海:第二军医大学,2009:14-29.
- [27] 刘如明.灵芝酸的结构修饰及其新型衍生物的抗肿瘤机制研究[D].上海:华东理工大学,2012:13-28.
- [28] 朱家晴.胃肠道间质瘤 CK2 和 KIT 的协同靶向研究[D].杭州:浙江理工大学,2016:26-30.
- [29] Ham S S, Kim S H, Moon S Y, et al. Antimutagenic effects of subfractions of Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) extract[J]. *Mutation Research*, 2009, 672 (1):55-59.
- [30] Mullauer F B, Kessler J H, Medema J P. Betulin is a potent anti-tumor agent that is enhanced by cholesterol [J]. *Plos One*, 2009, 4(4):1-8.
- [31] Zhang Q, Wang J, He H, et al. Trametenolic acid B reverses multidrug resistance in breast cancer cells through regulating the expression level of P-glycoprotein[J]. *Phytotherapy Research* Ptr, 2014, 28 (7):1037-1044.

(责任编辑:唐志荣)