

苦白蹄乙醇提取物体外抗肿瘤活性研究

朱欣婷¹, 刘云^{2,*}, 胡姗姗³, 李常春³

(1.遵义医学院基础医学院,贵州遵义 563003;
2.遵义医学院医学与生物学研究中心,贵州遵义 563003;
3.遵义医学院药学院,贵州遵义 563003)

摘要:探讨苦白蹄乙醇提取物在体外的抗肿瘤活性。采用磺酰罗丹明染色法(SRB法)考察苦白蹄乙醇提取物对人肝癌细胞BEL-7404、人肺腺癌细胞H-1299、人胃腺癌细胞SGC-7901 3种人恶性肿瘤细胞的体外抗肿瘤活性。结果显示,苦白蹄乙醇提取物对BEL-7404、SGC-7901两株肿瘤细胞具有比较明显的抑制效果,其半数抑制浓度(IC_{50})分别为 $73.5\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $80\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,且抑制率随药物浓度的升高而增大,呈剂量效应关系,但对H-1299的抑制率相对较低。细胞周期实验显示,BEL-7404细胞在苦白蹄乙醇提取物的作用下, G_2/M 期的细胞比例呈下降趋势,S期细胞比例增大,细胞周期阻滞于S期。苦白蹄乙醇提取物具有比较明显的体外抗肿瘤活性。

关键词:苦白蹄,抗肿瘤,磺酰罗丹明染色法,细胞周期

Anti-tumor effect of ethanol extracts from *Fomitopsis officinalis* (Vill. : Fr.) Bond. in vitro

ZHU Xin-ting¹, LIU Yun^{2,*}, HU Shan-shan³, LI Chang-chun³

(1. Basic Medical College, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China;
2. Medical and Biological Research Center, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China;
3. College of Pharmacy, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China)

Abstract: The anti-tumor effect of ethanol extracts from *Fomitopsis officinalis* (Vill. : Fr.) Bond. on various human tumor cell lines in vitro was evaluated. The sulforhodamine B (SRB) assay was employed to evaluate the anti-tumor effect of ethanol extracts from *Fomitopsis officinalis* (Vill. : Fr.) Bond. on BEL-7404, H-1299 and SGC-7901 cells in vitro. The results showed that ethanol extracts displayed obvious inhibitory effect on the proliferation of BEL-7404 and SGC-7901 in a dose-dependent manner, while their inhibitory effect on H-1299 was not evident. The IC_{50} value of BEL-7404 and SGC-7901 were $73.5\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $80\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ respectively. The cell cycle of BEL-7404 treated by ethanol extracts changed. The ratio of cultured cell declined in G_2/M phase, while the cell in S phase increased. The cell cycle arrested in S phase. Ethanol extracts from *Fomitopsis officinalis* (Vill. : Fr.) Bond. had relatively obvious anti-tumor effect in vitro.

Key words: *Fomitopsis officinalis* (Vill. : Fr.) Bond.; anti-tumor; sulforhodamine B colorimetric assay; cell cycle

中图分类号:TS201.2

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2012)15-0071-04

苦白蹄(*Fomitopsis officinalis* (Vill. : Fr.) Bond.),又名阿里红、落叶松茸、药用层孔菌,为多孔菌科真菌药用拟层孔菌的子实体。它具有止咳平喘,祛风除湿,消肿止疼,利尿,解蛇毒等作用^[1],在我国河北、山西、云南、四川、吉林、黑龙江、内蒙古、甘肃、新疆、福建等地均有分布^[2]。国外文献报道苦白蹄具有抗炎的作用^[3],在俄罗斯及其它斯拉夫语地区的欧洲国家常被用于治疗肠胃疾病、癌症、支气管哮喘、盗汗等疾病^[4]。国内对苦白蹄的药理活性研究主要集中

在其多糖和水提物,资料显示苦白蹄多糖具有抗肿瘤^[5]、增强免疫力^[6-7]、清除氧自由基^[8]的作用,水提物能增加小鼠的抗应激能力,延长抗疲劳和耐缺氧时间,具有很好的补益作用^[9]。而苦白蹄乙醇提取物(以下简称EEF)的活性研究鲜有报道。本工作拟采用磺酰罗丹明染色法(SRB法)和流式细胞术对EEF抗肿瘤活性进行研究,为苦白蹄资源的研究开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

人肝癌细胞BEL-7404、人肺腺癌细胞H-1299、人胃腺癌细胞SGC-7901由遵义医学院医学与生物学研究中心提供;苦白蹄采自吉林省敦化市,60℃烘干、粉碎、过60目筛;RPMI-1640培养基、胎牛血清美国Hyclone公司;DMSO、胰蛋白酶、

收稿日期:2011-12-20 *通讯联系人

作者简介:朱欣婷(1980-),女,硕士,讲师,研究方向:生物活性成分的分离纯化。

基金项目:贵州省科技厅社会发展攻关项目(黔科合SY字[2011]3031)。

表 1 EEF 对 3 种肿瘤细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)Table 1 Effect of EEF on the proliferation of 3 kinds of tumour cells($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	EEF 浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	BEL-7404		H-1299		SGC-7901	
		OD 值	抑制率(%)	OD 值	抑制率(%)	OD 值	抑制率(%)
实验组	10	1.76 \pm 0.03 *	17.67	1.40 \pm 0.05 *	9.84	1.57 \pm 0.05 *	7.20
	20	1.70 \pm 0.05 *	21.77	1.39 \pm 0.04 *	11.64	1.54 \pm 0.04 *	9.92
	40	1.58 \pm 0.07 *	25.70	1.36 \pm 0.02 *	13.12	1.40 \pm 0.06 *	20.66
	60	1.36 \pm 0.05 *	42.37	1.32 \pm 0.03 *	16.70	1.34 \pm 0.05 *	28.10
	80	1.19 \pm 0.11 *	52.88	1.23 \pm 0.05 *	23.77	1.04 \pm 0.03 *	50.42
	100	0.96 \pm 0.10 *	67.08	1.09 \pm 0.04 *	35.25	0.95 \pm 0.03 *	57.84
阴性对照组	-	2.05 \pm 0.03	-	1.52 \pm 0.05	-	1.64 \pm 0.01	-
对照板(T_0)	-	0.43 \pm 0.01	-	0.30 \pm 0.02	-	0.44 \pm 0.02	-
溶剂对照组	-	1.87 \pm 0.06 *	10.88	1.37 \pm 0.04 *	12.30	1.50 \pm 0.03 *	12.40
阳性对照组(顺铂)	12.50	0.95 \pm 0.06 *	67.70	0.89 \pm 0.02 *	52.64	0.55 \pm 0.02 *	90.91

注:“-”表示无,“*”表示与阴性对照组比较, $p < 0.05$ 。

EDTA、Tris 美国 Amresco 公司;碘酰罗丹明 美国 Sigma 公司;顺铂 德州德药制药有限公司;GenMed 细胞周期流式细胞分析试剂盒 上海杰美基因医药有限公司;其余试剂 均为国产分析纯。

R-210 型旋转蒸发仪 瑞士 Buchi 公司;702 型超低温冰箱、3131 型 CO₂ 培养箱、全波长酶标仪 美国 Thermo 公司;Ti-S 倒置相差显微镜 日本 Nikon 公司;超纯水制备系统 美国 Millipore 公司;FACS Calibur 流式细胞仪 美国 BD 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 EEF 的制备 称取苦白蹄粉 100g, 加 10 倍量(料液比)的 95% 乙醇, 回流提取两次, 每次 3h。合并提取液抽滤两次, 减压浓缩至 1/10 体积, 4℃ 保存, 备用。

1.2.2 细胞的培养 细胞株 BEL-7404、H-1299、SGC-7901, 均采用 RPMI-1640 培养基(含 10% 胎牛血清), 37℃、5% CO₂ 培养。待细胞长至对数生长期, 弃去培养液, PBS 冲洗, 0.25% 胰蛋白酶消化, 加培养液吹打均匀成单细胞悬液, 按照 100 μL 细胞悬液(8000 个细胞, 其中 BEL-7404 为 10000 个细胞)接种于 96 孔培养板, 于 CO₂ 培养箱中培养。

1.2.3 碘酰罗丹明(sulforhodamine B, SRB)染色法^[10]

接种细胞时, 每种细胞平行接种两块 96 孔板, 一块为对照板(T_0), 另一块为实验板。CO₂ 培养箱中培养 20h 后, 将对照板(T_0)取出, 用预冷的 50% 三氯乙酸(TCA)固定, 待测。实验板中加入 EEF(终浓度分别为 10、20、40、60、80、100 μg · mL⁻¹), 并设阴性对照组(C), 实验组(T), 阳性对照组(为 12.5 μg · mL⁻¹ 顺铂), 溶剂对照组。每组设 5 个复孔, 继续培养 48h 后取出培养板, 以预冷 50% TCA 固定(终浓度为 10%), 1h(4℃)后以去离子水冲洗, 自然晾干, 用 100 μL 0.4% 的 SRB 染色, 10min 后用 0.1% 醋酸冲洗、晾干, 最后用 200 μL 10mmol · L⁻¹ 的缓冲 Tris 碱液(pH 10.5)溶解, 在酶标仪上选择 530nm 处测吸光度值(OD 值), 按照下列公式计算生长抑制率。

肿瘤细胞生长抑制率(%)

$$= [1 - \frac{\text{OD}(T) - \text{OD}(T_0)}{\text{OD}(C) - \text{OD}(T_0)}] \times 100$$

1.2.4 不同浓度 EEF 对细胞形态的影响 浓度分别

为 10、20、40、60、80、100 μg · mL⁻¹ EEF 分别作用三种细胞 48h 后, 倒置显微镜观察细胞的生长及形态变化。

1.2.5 流式细胞术检测细胞周期 选取 IC₅₀ 最小的细胞株作为研究对象, 取该细胞悬液 2mL 置 25cm² 培养瓶, 放入细胞培养箱中培养 20h, 加入 EEF, 使其终浓度分别为 1/2 IC₅₀、IC₅₀, 继续培养 48h。随后收集细胞并离心, 按 GenMed 细胞周期流式细胞分析试剂盒说明书操作。加入 1mL 预冷的 GenMed 清液, 离心, 弃上清液。加入 1mL 预冷的 GenMed 固着液, 混匀。放入 4℃ 冰箱孵育 16h, 离心, 弃上清液。加入 500 μL GenMed 染色工作液, 混匀, 37℃ 避光孵育 45min, 放入 4℃ 冰箱待测。检测前移入细胞流式仪专用测试管, 流式细胞仪检测细胞周期。

1.2.6 统计学方法 采用 SPSS16.0 统计软件, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, $p < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 EEF 对 3 种肿瘤细胞增殖的影响

EEF 对 3 种肿瘤细胞增殖的抑制作用见表 1。从表 1 可知, 当 EEF 浓度为 10 μg · mL⁻¹ 时对 BEL-7404 细胞表现出比较明显的抑制作用, 且 EEF 对其生长抑制作用在 10~100 μg · mL⁻¹ 的浓度范围内与剂量呈正相关。以 EEF 浓度为横坐标, 抑制率为纵坐标作回归曲线, 得方程 $y = 0.5537x + 9.306$ ($R^2 = 0.9742$), 经计算得半数抑制浓度 (IC₅₀) 为 73.5 μg · mL⁻¹。当 EEF 浓度达到 100 μg · mL⁻¹ 时对 H-1299 抑制率只有 35.25%, 说明 EEF 对 H-1299 细胞增殖的抑制作用不明显。当 EEF 浓度达到 40 μg · mL⁻¹ 时, 对 SGC-7901 细胞增殖表现出明显的抑制作用, 同时实验结果也显示其半数抑制浓度 (IC₅₀) 为 80 μg · mL⁻¹。

2.2 不同浓度 EEF 对人肝癌细胞 BEL-7404 细胞形态的影响

图 1 为 EEF 对 BEL-7404 细胞株作用 48h 后的观察结果。从图 1 中可以看出, 当 EEF 浓度为 10 和 20 μg · mL⁻¹ 时, 细胞数目略减少, 大多数细胞仍然存活, 未见到细胞数量的明显变化。当 EEF 浓度为 40

表2 EEF 对人肝癌细胞 BEL-7404 细胞周期的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 2 Effect of EEF on the cell cycle of BEL-7404 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	药物浓度($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	G_0/G_1 (%)	S(%)	G_2/M (%)
空白对照组	0	65.57 ± 4.45	25.63 ± 2.69	8.80 ± 1.77
实验组	36.75	65.46 ± 2.20	$31.06 \pm 2.20^*$	3.44 ± 0.23
	73.50	65.04 ± 2.08	30.74 ± 2.02	4.22 ± 0.35

注：“*”表示与空白对照组比较， $p < 0.05$ 。

和 $60 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时，细胞数量明显减少，部分细胞死亡，仍有一部分细胞存活，其中一部分贴壁生长状态差。当 EEF 浓度为 80 和 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时，大部分细胞出现凋亡或坏死，仅剩余极少数细胞，并且这些细胞贴壁较差，形态不规则或变为圆形，有的已经固缩。与阳性组相比较，EEF 浓度为 80、 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时，镜下细胞生长状况与阳性对照组相似。此外，不同浓度的 EEF 作用于其余两株细胞后，也同样出现随着提取物浓度的增加，细胞数量减少，细胞贴壁差或不能贴壁生长等现象，但 H-1299 细胞数量减少和贴壁差的程度不及 BEL-7404 和 SGC-7901 明显。

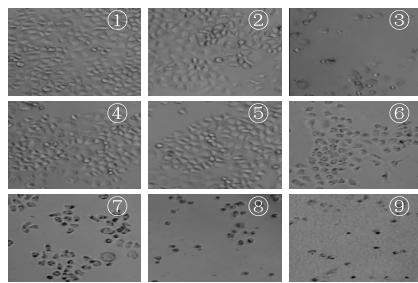


图1 EEF 对人肝癌细胞 BEL-7404 细胞形态的影响($\times 100$)

Fig.1 Effect of EEF on the cellular morphology of BEL-7404 ($\times 100$)

注：①-阴性对照组；②-溶剂组；③-阳性对照组(顺铂)；④-药物组($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)；⑤-药物组($20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)；⑥-药物组($40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)；⑦-药物组($60 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)；⑧-药物组($80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)；⑨-药物组($100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

2.3 EEF 对人肝癌细胞 BEL-7404 细胞周期的影响

EEF 处理 BEL-7404 细胞 48h 后对细胞周期有较大的影响。由表 2 和图 2 结果可知，与空白对照组比较， G_0/G_1 期的细胞比例基本保持稳定； G_2/M 期的细胞比例呈下降趋势，从空白对照组的 8.80%，降至 $1/2 IC_{50}$ 浓度时的 3.44%，降幅达 60.9%；S 期细胞从空白对照组的 25.63%，增至 $1/2 IC_{50}$ 浓度时的 31.06%，增幅达 21.19%。实验结果表明 EEF 处理 BEL-7404 细胞能使 G_2/M 期的细胞减少，S 期细胞增大，细胞出现 S 期阻滞。

3 结论与讨论

本文研究了 EEF 的体外抗肿瘤活性。结果表明，EEF 对 BEL-7404、H-1299 和 SGC-7901 细胞均具有抑制生长的作用。其中，对 H-1299 的抑制作用较弱，对 BEL-7404 的抑制作用较强，说明 EEF 对肿瘤细胞的抑制具有一定的选择性。形态学观察表明 EEF 对 BEL-7404 细胞的增殖具有明显抑制作用。

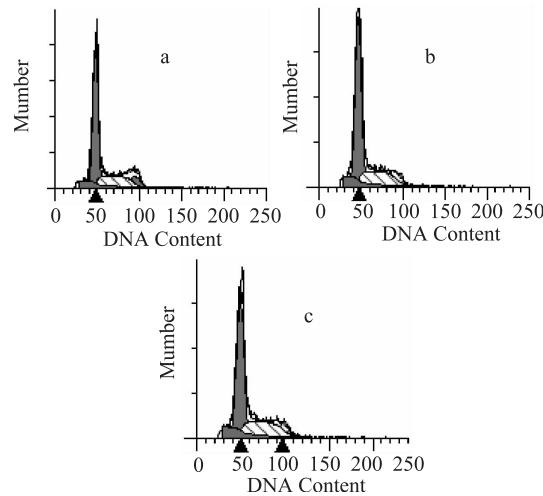


图2 EEF 对 BEL-7404 细胞 DNA 含量的影响

Fig.2 Effect of EEF on the DNA content of BEL-7404

注：a-空白对照组；b-实验组($36.75 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)；c-实验组($73.50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

抑制肿瘤增殖的机制主要有两种：一种是促进其凋亡，另一种是通过干预细胞周期而抑制生长。在细胞周期中， G_1 期、S 期和 G_2 期之间存在着影响细胞周期的调控点，有些药物能通过影响这些调控点来干预细胞增殖。本实验流式细胞术检测细胞周期发现，未处理的 BEL-7404 细胞增殖情况良好，EEF 作用于 BEL-7404 细胞后出现了 S 期阻滞，提示细胞进入 S 期后，EEF 可能影响了细胞周期的某些调控点，干扰细胞从 S 期正常进入 G_2 期，从而抑制细胞增殖。

研究中测定细胞增殖时采用了 SRB 法，该法是美国国立癌症研究所(National Cancer Institute, NCI)筛选抗癌药物的一种新方法^[1]。SRB 法是利用蛋白质染色原理，避开了某些肿瘤细胞还原酶活力低下，难以采用四甲基偶氮唑盐(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)比色法这一难题，且能克服 MTT 法成色反应的时间依赖性，SRB 测定结果几乎不随时间而变^[12-13]，不失为一种筛选抗癌药物的好方法。

本实验结果显示苦白蹄乙醇提取物在体外具有良好的抗肿瘤活性，该结果丰富了苦白蹄药理活性的内容，并为开发利用这一药用真菌资源，寻找新的天然药物的有效部位或成分提供了理论依据。

参考文献

- [1] 中华本草编委会. 中华本草(第一卷)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999; 531-532.
- [2] Andrzej C, Viktor A M, Nadezhda U. *Fomitopsis officinalis* on (下转第 78 页)

劣变程度的指标。

表 7 210℃下 S_{21}/S_{22} 和 O/P 的变化趋势

Table 7 The trends of S_{21}/S_{22} and O/P at 210℃

时间(h)	S_{21}/S_{22}	O/P
0	3.844	0.91
2	77.78	0.88
4	79.33	0.92
6	79.83	0.22
8	82.52	0.86
10	99.98	0.87

3 结论

在 150、180、210℃ 不同时间下,介电常数可以快速有效地对煎炸棕榈油进行品质分析。弛豫时间 $T_{21}、T_{22}$ 可以用来辨别棕榈油是否经过高温煎炸处理。在 150、180℃ 下,弛豫峰面积比例(S)之比 S_{21}/S_{22} 与对应的油酸和棕榈酸比值(O/P)在不同时间下的变化趋势相似呈显著正相关性,分别为: $p < 0.05, p < 0.01$;但在 210℃ 下, S_{21}/S_{22} 与 O/P 变化规律相差较大且无相关性。因此,在 150℃ 和 180℃ 下,弛豫图谱中的组分分布 S_{21}/S_{22} 可以用于煎炸棕榈油品质分析,而在 210℃ 下, S_{21}/S_{22} 则无法有效用于监测煎炸棕榈油的劣变程度。

参考文献

- [1] 石永峰.棕榈油在煎炸过程中的劣变及对生物机体的影响[J].西部粮油科技,1999,24(5):48-50.
- [2] 陈锋亮,魏益民,钟耕.大豆油高温煎炸质变过程的研究[J].中国油脂,2006,31(8):19-22.
- [3] Inoue C, Hagure Y, Ishikawa M, et al. The dielectric property of soybean oil in deep-fat frying and the effect of frequency[J]. Journal of Food Science, 2002, 67(3): 1126-1129.
- [4] 李阳,钟海雁,李晓燕.煎炸用油品质变化及测定方法研究进展[J].食品与机械,2008,24(6):148-151.
- (上接第 73 页)
- siberian larch in the urals[J].Mycologist,2003,17(3):116-120.
- [3] Paul stamets.Antipox properties of *Fomitopsis officinalis*(Vill.: Fr.) Bond.et singer(Agarikon) from the pacific northwest of north America[J].International Journal of Medicinal Mushrooms,2005,7(3):495-506.
- [4] Solomon P Wasser. A book review: The fungal pharmacy: Medicinal mushrooms of western Canada[J].International Journal of Medicinal Mushrooms,2008,10(1):97-100.
- [5] 郭淑英,冯波,孙雪松,等.阿里红多糖的提取工艺研究及抗肿瘤作用初探[J].中国卫生检验杂志,2010,20(9):2191-2192.
- [6] 丛媛媛,阿地力·阿不力孜,帕丽达·阿不力孜,等.维药阿里红多糖的提取及免疫活性研究[J].中国现代应用药学,2010,27(7):569-571.
- [7] 邹利娅·伊明,帕丽达·阿不力孜,白丽,等.阿里红多糖对小鼠免疫功能的影响[J].新疆医科大学学报,2003,26(6):563-565.
- [5] 陈慰宗,宋应谦,忽满利.食用油介电常数随加热时间和温度变化的实验[J].西北大学学报:自然科学版,2000,30(4):300-301.
- [6] Hu Lizhi, Toyoda K, Ihara I. Dielectric properties of edible oils and fatty acids as a function of frequency, temperature, moisture and composition [J]. Journal of Food Engineering, 2008, 88: 151-158.
- [7] 邵小龙,朱将伟,李云飞.批量甜玉米低场核磁共振数据的统计分析[J].上海交通大学学报,2011,45(1):144-148.
- [8] 李然,李振川,陈珊珊,等.应用低场核磁共振研究绿豆浸泡过程[J].食品科学,2009,30(15):137-141.
- [9] Guo Wenchuan, Liu Yi, Zhu Xinhua, et al. Dielectric properties of honey adulterated with sucrose syrup[J].Journal of Food Engineering,2011,107:1-7.
- [10] 周凝,刘宝林,王欣,等.米糠毛油掺伪食用植物油的低场核磁共振检测[J].食品与发酵工业,2011,37(8):177-181.
- [11] Suleiman AE - RM, El - Makhzangy A, Ramadan M F. Antiradical performance and physicochemical characteristics of vegetable oils upon frying of French fries: a preliminary comparative study[J].J Food lipids,13(3):259-276.
- [12] Nick Kalogeropoulos, Fotini N Salta, Antonia Chiou, et al. Formation and distribution of oxidized fatty acids during deep-and pan-frying of potatoes[J].Eur J Lipid Sci Technol,2007,109:1111-1123.
- [13] Geeta Bansal, Weibiao Zhou, Philip J Barlow, et al. Performance of palm olein in repeated deep frying and controlled heating processes[J].Food Chemistry,2010,121:338-347.
- [14] Elham Tabee, Margaretha Ja gerstad, Paresh C Dutta. Frying quality characteristics of french fries prepared in refined olive oil and palm olein[J].J Am Oil Chem Soc,2009,86:885-893.
- [15] 吴雅茹.五种天然抗氧化剂对大豆油氧化的影响[D].北京:中国农业大学,2006.
- [8] 依巴代提·托乎提,玛依努尔·吐尔逊,苏巴提·吐尔地,等.阿里红多糖对氧自由基的清除作用[J].新疆医科大学学报,2006,29(1):15-17.
- [9] 王颖,吕巡贤,余佳林,等.新疆药用层孔菌补益作用的研究[J].新疆农业大学学报,2002,25(1):40-41.
- [10] Vanicha Vinchai, Kanyawin Kirtikara. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening[J].Nature Protocols, 2006, 1(3):1112-1116.
- [11] Skehan P, Storeng R, Scudiero D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer - drug screening [J]. J of Nat Cancer Ins, 1990, 82(13):1107-1112.
- [12] 刘思思,鲁大鹏.SRB 法检测 As_2O_3 对 KB 细胞和 Tea8113 细胞毒性的研究[J].口腔颌面外科杂志,2010,20(1):13-15.
- [13] 周思朗,屈艳妮,张健,等.SRB 法与 MTT 法细胞计数应用比较[J].中国现代医学杂志,2005,15(17):2615-2617.