

木蹄层孔菌化学成分及不同提取物体外抗肿瘤活性研究

陆勇芹¹, 周文明^{2*}, 王琦², 李玲玲²

(1. 西北农林科技大学 生命科学院; 2. 理学院, 陕西 杨陵 712100)

摘要:采用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、水饱和的正丁醇对木蹄层孔菌 95% 乙醇提取物进行分离, 运用 MTT 比色法对各提取物进行体外抗肿瘤活性的测定。结果表明氯仿提取物对 HeLa 细胞表现出较强的抑制作用, 在测定浓度范围内呈现出良好的剂量依赖性抑制作用, 而乙酸乙酯和正丁醇提取物在同一测定浓度范围内抑制作用不如氯仿提取物, 其中石油醚提取物抑制作用最弱。化学预试表明, 木蹄层孔菌中存在酚性成分, 有机酸, 糖、多糖和苷类, 内酯、香豆素及其苷类, 植物甾醇、萜类化合物, 蒽醌及其苷类。

关键词:木蹄层孔菌; 抗肿瘤活性; 提取物; MTT 法

中图分类号:S718.8 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-7461(2007)04-0131-04

A Preliminary Study on the Chemical Composition and Anticancer Effects of *Fomes fomentarius* in Vitro

LU Yong-qin¹, ZHOU Wen-ming², WANG Qi², LI Ling-ling²

(1. College of Life Science; 2. College of Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Different solvents were used to further fractionate 95% ethanol extract of *Fomes fomentarius*, i. e., petroleum ether, chloroform, ethyl acetate, and n-butanol. The anticancer activities of the different extracts in vitro were analysed with MTT method. The results showed that chloroform extract strongly inhibited proliferation of HeLa cells, and behaved significant dose-dependent response while the ethyl acetate extract and the n-butanol extract exhibited low anticancer activities in vitro. The petroleum ether extract was the lowest one for its anticancer activity. Chemical compositions of *F. fomentarius* were preliminarily examined. The results indicated that it contained phenols, organic acids, saccharides, polysaccharides, lactone, coumarinic lactone and its glycosides, steroids, triterpenoids, anthraquinones and its glycosides.

Key words: *Fomes fomentarius*; anticancer activity; extract; MTT method

木蹄层孔菌(*Fomes fomentarius*)又名火绒层孔菌,为担子菌纲,多孔菌目,多孔菌科(Polyporaceae)、层孔菌属(*Fomes*)真菌。木蹄层孔菌是世界性分布的木腐性真菌,危害多种阔叶树木^[1]。在18世纪和19世纪,曾被用来作为止血的膏药,在一些传统的药典中被用来作为针灸的工具。其药用部位为子实体,粗提物具有抗氧化性,利尿性,退烧,消积化,止痛,消炎和抗肿瘤等作用,已经被应用于传统药物^[2-3]。国内已有报道其乙醇粗提物对肿瘤细胞具有很强的抑制作用,但未做进一步研究。本实验通过试管法对其进行系统预试,初步确定其化学成分,同时对木蹄层孔菌 95% 乙醇提取物进行初步分

离,并采用 MTT 法,以体外培养的人体宫颈癌细胞(HeLa)为模型,测定不同提取物的体外抗肿瘤活性,初步确定了该菌抗肿瘤的活性提取物。

1 材料与方法

1.1 实验材料

木蹄层孔菌(*Fomes fomentarius* L. ex. Fr)子实体采自陕西太白山,经鉴定为多孔菌科层孔菌属木蹄层孔菌。将采集的木蹄层孔菌子实体于 45℃ 烘干,粉碎,备用。

1.2 主要药品与试剂

DMEM 为 GIBCO 公司产品,批号 No.

收稿日期:2007-01-22 修回日期:2007-03-28

作者简介:陆勇芹(1982-),女,陕西蒲城人,硕士研究生,研究方向为天然产物化学。

* 通讯作者:周文明(1966-),男,湖南桑植人,博士,副教授,硕士生导师,主要从事有机合成和天然产物化学方面的研究。

1107011;新生牛血清(NBS),郑州佰安生物工程有
限公司,批号 01106;十二烷基硫酸钠(SDS)为西安
化学试剂厂产品,批号 980312;胰岛素为北京鼎国
生物技术有限责任公司,噻唑蓝(3-[4,5-dimethylth-
iazol-2-yl]-2,5 diphenyltetrazolium broide, MTT)为
sigma 分装,原产品编号为 15500;其余试剂均为市
售分析纯。

1.3 细胞系

Hela 细胞株购自军事医学科学院病毒研究所。
培养于含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基中(内含
青霉素 100 U/mL,链霉素 100 U/mL),在 37,5%
CO₂ 条件下培养,每 2~3 d 传一代。

1.4 化学成分系统预试^[4]

1.4.1 供试样品的制备 水提取液:称取木蹄层孔
菌子实体样品 10 g,加入蒸馏水 100 mL,在室温浸
泡过夜,滤液 10 mL 用于检查氨基酸、多肽和蛋白质
等。剩余样品渣及浸液在 60℃ 水浴中加热 10 min,
立即过滤。此液用于检查糖、多糖、皂甙、甙类和鞣
质等。

酸性乙醇提取液:称取木蹄层孔菌子实体样品
10 g,加入 70 mL 0.5% 盐酸乙醇溶液,在水浴上回
流 10 min,乘热过滤,得酸性乙醇提取液。此液用检
查酚性成分、有机酸和生物碱等。

甲醇提取液:称取木蹄层孔菌子实体样品 10 g,
加入 70 mL 甲醇,在水浴上回流 10 min,乘热过滤,
滤液供检查黄酮及其甙类、蒽醌及其甙类、强心甙、
香豆素及其甙类、内脂、酯类、挥发油、植物甾醇和油
脂类等。

乙醚提取液:称取木蹄层孔菌子实体 5 g 粗粉,
加乙醚 50 mL,水浴回流 20 min,滤液浓缩至 5 mL,
检测内酯、油脂和挥发油。

1.4.2 试管预试法 向盛有供试液的试管中加入
相关试剂,根据颜色、沉淀、荧光等反应现象判断某
化学成分的存在。

1.4.3 圆形滤纸层析法 用毛细管吸取不同的提
取液在圆形滤纸上点样,使乙醇从中心展开,待乙醇
挥发后,喷以不同显色剂。根据出现的颜色、斑点或
产生的荧光,判断样品的成分。

1.5 不同提取溶剂样品的制备

称 3.5 kg 已粉碎的木蹄层孔菌子实体,用 95%
工业酒精与样品 10: 1 的比例进行超声波提取,每
次提取 1 h,共 3 次。浓缩回收工业酒精,得乙醇浸
膏;再加水悬浮,依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、水
饱和的正丁醇进行萃取,减压浓缩得石油醚提取物、
氯仿提取物、乙酸乙酯提取物、正丁醇提取物。

1.6 试样制备

分别称取各溶剂提取物 50 mg,先溶于少量无
水乙醇,通过超声和加热的办法使其充分完全溶
解,临用前以 DMEM 为基础培养基 + 20% 新生牛血
清 + 1% 的 SDS 为稀释液将其稀释为 50、100、250、
500 和 1 000 μg/mL。

1.7 MTT 法测定不同溶媒提取物的抗肿瘤作用^[5]

将肿瘤细胞 hela,以 5 × 10³/孔接种于 96 孔
板,置 CO₂ 培养箱(5% CO₂,饱和湿度,37℃)中培
养 24 h 后,每孔加入不同终浓度的药物 200 μL,空
白对照组加 200 μL 稀释液,置 CO₂ 培养箱(5%
CO₂,饱和湿度,37℃)继续培养 48 h,每孔加入 MTT
(5 mg/mL)20 μL,37℃ 孵育 6 h,然后吸出 100 μl 液
体,再加 100 μl 甲臍溶解剂(SDS 液:SDS10 g 溶解
于 100 mL 的四蒸水中,用 10 mol/L HCl 调至为 0.
01 mol/L 的 HCl) 37℃ 过夜,在酶标仪(型号
Elx800UV)上测 OD 值(双波:450 nm、490 nm)。

抑制率 = (1 - 实验组 OD 值/对照 OD 值) ×
100%

1.8 统计学方法

采用 DPS v3.01 专业版软件进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 化学成分系统预试结果

表 1 木蹄层孔菌化学成分预试结果
Table 1 Results of preliminary examination of
chemical *Fomes fomentarius*

项 目	预 试 结 果	
	A (试管法)	B (圆形滤纸法)
酚性成分	+	+
有机酸	+	+
鞣质	+	-
生物碱	-	-
氨基酸、多肽和蛋白质	-	-
糖、多糖和苷类	+	+
皂苷	-	-
黄酮类及其苷类	+	-
内酯、香豆素或其苷类	+	+
植物甾醇、三萜成分	+	+
蒽醌及其苷类	+	+
挥发油、油脂	-	-

注:“+”表示阳性反应,“-”表示阴性反应。
由表 1 可知,木蹄层孔菌中存在酚性成分,有机
酸,糖、多糖和苷类,内酯、香豆素及其苷类,植物甾
醇、萜类化合物,蒽醌及其苷类。可能含有鞣质,黄
酮类及其苷类。

2.2 不同溶剂提取物重量及提取率

不同溶剂提取物称重,计算提取率(相对于总
生药量)结果见表 2。

表2 不同溶剂提取物重量及得率

Table 2 The weighe and percentage of differect extract

提取溶剂	提取物状态	提取物重量/g	提取率/%
石油醚	褐色浸膏	26	7.4
氯仿	褐色浸膏	35	10.0
乙酸乙酯	褐色浸膏	8	2.2
正丁醇	褐色浸膏	56	16.0

2.3 不同溶剂提取物对 Hela 肿瘤细胞增殖的作用

经与细胞共育 48 h 后,发现不同浓度的提取物处理 Hela 细胞,随浓度的增加其抑制率也增加,在测定浓度范围内表现为剂量依赖性抑制。其中氯仿提取物在 1 000 μg/mL 时抑制率高达 77.37%,乙酸乙酯提取物 1 000 μg/mL 时达到 69.63%,正丁醇提取物表现出较弱的抑制作用,石油醚提取物抑制作用最弱。可见氯仿提取物和乙酸乙酯提取物在体外对肿瘤细胞有很强的细胞毒活性(表 3)。

表3 木蹄层孔菌不同提取物对 Hela 细胞作用 48 h 后的抑制率

Table 3 The inhibitory effect on hela cells of *Fomes fomentarius* differect extract

浓度/ (μg·mL ⁻¹)	石油醚	氯仿	乙酸乙酯	正丁醇
CK 方数据	0	0	0	0
50	6.77**	17.6**	18.38**	9.67**
100	9.28**	37.91**	27.66**	26.69**
250	18.37**	42.36**	49.13**	41.78**
500	21.86**	50.29**	53.77**	48.16**
1000	26.31**	77.37**	69.63**	54.35**

注: ** $P < 0.01$, CK 为对照

2.4 不同提取物对 Hela 细胞增殖作用的比较^[6]

用 Sigma Plot 5.0^[7] 分析其作用 48 h 后各提取物的 IC_{50} 值。石油醚提取物的 IC_{50} 为 6 939.134 μg/mL,氯仿提取物的 IC_{50} 为 303.083 μg/mL,乙酸乙酯为 337.954 μg/mL,正丁醇的为 574.715 μg/mL。比较各提取物对 Hela 细胞 IC_{50} 值,发现氯仿提取物对 Hela 细胞增殖抑制作用最强,乙酸乙酯物次之,正丁醇不明显,石油醚提取物最弱。由此提示木蹄层孔菌子实体对 Hela 细胞的有效部位可能在氯仿和乙酸乙酯,其中氯仿提取物是最具有活性成分。

3 讨论

Hitoshi 等很早就报道了从木蹄层孔菌中分离出的多糖成分对小鼠艾氏腹水癌具有有效的抗肿瘤作用^[8]。肿瘤的发生机制不仅涉及肿瘤细胞的失控性增殖,而且与细胞凋亡有关,细胞凋亡在肿瘤生长过程中起负调控作用,可以遏制肿瘤迅速生长;自由基反应与肿瘤的发生和发展过程密切相关,在复杂的癌变过程中可能起重要作用^[9],MDA 是脂质过氧化的主要分解产物,MDA 含量升高实际上是氧自

由基产生过多,脂质过氧化物增多的表现。近年来研究表明木蹄层孔菌子实体乙醇提取物能明显提高肿瘤细胞的凋亡率,提示其体外的抗肿瘤活性可能与提高肿瘤细胞的凋亡率有关;能显著降低肝脏、肾脏 MDA 含量,说明其抗肿瘤作用可能与其能减轻体内脂质过氧化程度从而减轻细胞的损伤程度有关^[10]。这些实验研究,为进一步研究木蹄层孔菌子实体抗肿瘤作用提供了实验依据。

从抗肿瘤活性方面证实,木蹄层孔菌子实体的不同提取物在所用浓度下对肿瘤细胞均有不同程度的抑制作用,氯仿和乙酸乙酯提取物是木蹄层孔菌子实体抗肿瘤作用的主要部位,由此可确定木蹄层孔菌子实体中存在天然抗肿瘤活性物质,但是本试验只选取了体外生长的 Hela 细胞进行了研究,有一定的局限性,因此有必要扩大试验肿瘤细胞范围,并进行活体抗肿瘤实验。石油醚和正丁醇提取物抑制效果不明显或以其他的作用机制发挥抗肿瘤作用,有待于进一步研究。

1982 年 Mosmman 首先报道用 MTT 法来检测细胞活性,以后又有研究人员用此法测定抗癌药物对肿瘤增殖活性的效应。该方法简便、实验周期短(一般只需 4~6 d)、所需细胞数目较少、人为误差小,所得资料较精确,且无放射性污染,因此它也就成为药物筛选的主要手段^[5]。针对以前对木蹄层孔菌子实体抗肿瘤研究都是以乙醇提取物为材料,对木蹄层孔菌子实体中抗肿瘤活性化合物的研究很有必要,所以对其抗肿瘤活性部位的筛选是进一步研究其抗肿瘤活性成分的关键。

本研究采用 MTT 法,以人体宫颈癌细胞(Hela)为筛选模型,以体外抗肿瘤活性为指标,对木蹄层孔菌子实体不同溶剂提取物抗肿瘤活性进行了筛选。结果表明,氯仿和乙酸乙酯提取物是木蹄层孔菌子实体抗肿瘤作用的主要部位,要确定其活性部位含有的抗肿瘤活性成分,还要对其主要活性部位的化学成分进行分离、提取和纯化,此项工作正在进行中。从目前的研究状况来看,木蹄层孔菌子实体在抗肿瘤方面有很好的应用前景,对其中的抗肿瘤活性成分有待进一步研究。

参考文献:

[1] 程东升,山口岳广,王志娟,等. 两类木蹄层孔菌在酶蛋白水平上的遗传转化[J]. 菌物系统,2000,19(1): 81-86.
[2] Roussel B,Rapior S,charot C,et al. History of the therapeutic uses of the tinder polypore, *Fomes fomentarius* (L.:Fr.) [J]. Rev Hist pharm (paris), 2002, 50(336): 599-614.
[3] Jeong-Sook lee. Effect of *Fomes fomentarius* supplementation on antioxidant enyme activities, blood glucose , and lipid profile in

- streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Nutrition Research*, 2005, 25: 187-195.
- [4] 中国医学科学院药物研究所编. 中草药有效成分的研究(第一分册)提取、分离、鉴定和含量测定[M]. 北京:人民卫生出版社, 1972. 11-24.
- [5] 李明勇, 黄佩春, 孔霞. MTT 法测定口虾蛄提取物的体外抗肿瘤活性[J]. *现代肿瘤医学*, 2005, 13(3): 336-337.
- [6] 吴斌, 吴德康, 陈坚波. 广东石豆兰不同提取部位体外抗肿瘤实验研究[J]. *南京中医药大学学报*, 2004, 20(2): 114-115.
- [7] 李小民, 蒋芹, 谢晓东, 等. MTT 法测定癌细胞对抗癌药物敏感型的实验研究[J]. *四川肿瘤防治*, 2000, 13(3): 145-147.
- [8] 吴霞, 杨俊山. 层孔菌属化学成分与生物活性研究概述[J]. *中国药学杂志*, 2005, 40(12): 885-887.
- [9] 王三龙, 蔡兵, 崔承彬, 等. 中草药及其活性成分抗肿瘤的研究进展[J]. *中草药*, 2003, 9(9): 14.
- [10] 刘量, 周守标, 郑维发. 木蹄层孔菌乙醇提取物对肿瘤细胞的抑制作用[J]. *癌变·畸变·突变*, 2005, 17(2): 104-106.

(上接第 127 页)

- [6] Larson P R, Isebrands J G. The plastochron index as applied to developmental studies of cottonwood [J]. *Can. J. Forest Res*, 1971(1): 1-11.
- [7] 高俊凤. 植物生理学实验技术[M]. 西安:世界图书出版公司, 2000.
- [8] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding [J]. *Annal Biochem*, 1976, 72:248-254.
- [9] 陈毓荃. 生物化学实验方法和技术[M]. 北京:科学出版社, 2002.
- [10] Kumar J, Rathi A S, Panwar M S. Biochemical changes in pearl millet leaves due to rust infection [J]. *Forage Research, Indian Society of Forage Research, Hisar, India*; 2002, 28(2): 67-69.
- [11] 李盾, 王振中, 林孔勋. 锈菌侵染后花生体内主要生化指标的变化及其与抗性之间的关系[J]. *华南农业大学学报*, 1995, 16(1): 68-75.
- [12] Lyles W E, Futrell M C, Atkins I M. Relationship between reaction to race 15B of stem rust and reducing sugars and sucrose in wheat [J]. *Phytopathology*, 1959, 49: 254-256.
- [13] 曾永三, 王振中. 豇豆与锈菌互作中的活性氧代谢研究[J]. *植物病理学报*, 2004, 32(2): 146-153.
- [14] 刘娟, 王智忻, 汪宜萱, 等. 小麦在叶锈菌侵染过程中过氧化物酶及多酚氧化酶活性的变化[J]. *河北农业大学学报*, 1989, 12(3): 41-46.
- [15] 魏益宁. 毛白杨叶片受马褂棚锈菌侵染以后多酚氧化酶和过氧化物酶活性及同工酶谱带变化趋势的研究[J]. *北京林学院学报*, 1984(3): 76-95.
- [16] 樊自红. 过氧化物酶和苯丙氨酸解氨酶与毛白杨抗性的关系[J]. *植物病理学报*, 1989, 19(2): 95-100.
- [17] 江彤, 杨建卿, 高明, 等. 不同抗病性烟草罹黑胥病后几种酶的活性及丙二醛含量的变化[J]. *安徽农业大学学报*, 2006, 33(2): 218-221.
- [18] Kravets A F, Lisovii M P, Shelekova L M, et al. Peroxidase activity in the inheritance of hypersensitivity of wheat to brown rust [J]. [Ukrainian] *Zakhist Roslin*, 1977, 24: 47-53.
- [19] 李盾, 王振中, 林孔勋. 花生体内多种生化因子对抗锈病性的综合作用[J]. *华南农业大学学报*, 1996, 17(2): 44-49.