

桦褐孔菌发酵液提取物对不同细胞株的药理作用

王兰英 黄芳 苏艳 宋爱荣*

(青岛农业大学, 山东省应用真菌重点实验室, 青岛 266109)

摘要 本文采用桦褐孔菌发酵液提取物(IOFE)对人肝癌细胞株 HepG₂、人胃癌细胞株 SGC7901、正常组织来源的人肝细胞 HL-7702, 进行体外细胞试验, 结果表明, IOFE 在低浓度处理条件下对 HepG₂ 和 SGC7901 均有抑制作用, 且对 SGC7901 抑制效果最好; 在高浓度条件下对 HepG₂ 和 SGC7901 的生长具有一定的促进作用; IOFE 对氟尿嘧啶损伤后的 HL-7702 具有非常高的修复作用, 随浓度的升高, 修复作用逐渐增强, 在高浓度 3 000 μg/ml 处理条件下, 修复率为 303.01%。因此, IOFE 对肿瘤细胞的作用表现可知提取物含有复杂的成分, 这些成分具有抑制或促进细胞增殖的作用, 随着浓度的升高促进作用的成分占优势, 但对正常细胞, 甚至化疗药物损伤后的细胞却有更好的促进作用。

关键词 桦褐孔菌; 抑制率; 修复率

桦褐孔菌 *Inonotus obliquus* (Fr.) Pilat 属于担子菌亚门、层菌纲、非褐菌目、多孔菌科、褐卧孔菌属, 俄语名: Chaga。它是生长在寒带的木腐菌, 生于白桦、银桦、赤杨等树干或树皮上, 形成不育的菌核^[1]。国内外学者对桦褐孔菌在抗肿瘤、抗病毒、防治糖尿病、增强免疫功能等方面进行了药理、药效的研究^[2-5], 但大多数采用的是桦褐孔菌子实体和菌丝体的提取物进行的。由于野生的桦褐孔菌稀少, 资源匮乏, 规模化生产就受到限制。本研究采用桦褐孔菌菌丝体进行液体发酵, 从而提取活性物质, 对人肝癌细胞株 HepG₂、人胃癌细胞株 SGC7901 进行了体外细胞毒试验; 对正常组织来源的人肝细胞 HL-7702 进行了氟尿嘧啶损伤后的修复作用研究, 为进一步开发桦褐孔菌抗肿瘤及抗肿瘤辅助药物的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

桦褐孔菌由山东省应用真菌重点实验室分离并保存。

1.2 细胞株

人肝癌细胞株 HepG₂ 和人胃癌细胞株 SGC7901 由山东省医药科学研究院提供、正常组织来源的人肝细胞 HL-7702 由中科院上海生物化学与细胞生物学研究所提供。

1.3 主要试剂和仪器

RPMI-1640 培养基(Gibco); 胎牛血清(杭州四

季青公司产品); MTT (Solarbio); 0.25% 胰蛋白酶 (Amresco); 氟尿嘧啶注射液(天津金耀氨基酸有限公司); DMSO(国产分析纯); L-谷氨酰胺(Sigma); HEPES (Amresco)全自动酶标仪(Bio-Tec, ELx800 通用型.); 倒置显微镜(Nikon, TE2000-S 型); CO₂ 培养箱(MMM Group); 超净工作台; 恒温水浴锅; KQ-500DE型超声波清洗仪(上海医科仪器厂); 全自动高压灭菌锅(MLS-3780 型)

1.4 液体菌种的制备

采用 PDA 加富培养基 200 ml, 分装于 500 ml 三角瓶中, 重复 5 次, 封口, 121 °C 高压灭菌 30 min。冷却后将桦褐孔菌菌种块接入液体培养基中, 27 °C, 200 r/min, 培养 96 h 后备用。

1.5 桦褐孔菌发酵液提取物(IOFE)的制备

采用 20 L 全自动小型发酵罐进行桦褐孔菌液体发酵, 培养基配方为: 1% 玉米淀粉, 2% 葡萄糖, 0.2% 蛋白胨, 0.1% KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄。实消冷却后接入桦褐孔菌液体菌种, 接种量为 10%, 27 °C, 200 r/min, 培养 8 天后, 将发酵液 pH 值调至 11~12, 在 100 °C 条件下提取 1 h, 过滤菌球, 将提取液浓缩至原体积的 1/10, 取 50 ml 浓缩液加入 4 倍体积的 85% 乙醇中进行醇沉, 静置 24 h 后, 取上清液至旋转蒸发器浓缩回收乙醇, 离心后的沉淀冷冻干燥, 称重。

1.6 主要成分的测定

收稿日期: 2010-01-04 接受日期: 2010-03-11

山东省科技攻关项目资助(No.2007GG2009017)

* 通讯作者。Tel: 0532-86080687, E-mail: airongsong@163.com

糖含量的测定(蒽酮-硫酸比色法)、蛋白质含量的测定(凯氏定氮法)。

1.7 溶液的配制

1.7.1 RPMI-1640 完全培养基 RPMI-1640 基础培养基 +10% 胎牛血清 +1% 双抗。

1.7.2 待测样品 称取 0.12 g IOFE 定容于 10 ml 蒸馏水中使终浓度为 3 000 $\mu\text{g/ml}$, 滤菌, 再依次稀释成 1 500 $\mu\text{g/ml}$ 、750 $\mu\text{g/ml}$ 、187.5 $\mu\text{g/ml}$ 、93.75 $\mu\text{g/ml}$ 。五个浓度梯度分别编号为: IOFE5、IOFE4、IOFE3、IOFE2、IOFE1。

1.7.3 氟尿嘧啶溶液 取氟尿嘧啶注射液 1 ml 加入 249 ml 的无菌水, 即 100 $\mu\text{g/ml}$ 的氟尿嘧啶阳性对照液。

1.8 细胞培养

将细胞置于 RPMI-1640 完全培养基中培养, 条件为 5% CO_2 , 37 \pm 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 。待细胞铺满瓶底, 进行消化、传代。

1.9 MTT 比色法检测细胞增殖^[6]

1.9.1 检测 IOFE 对正常组织来源的人肝细胞株 HL-7702 的细胞毒作用 取对数生长期细胞, 制成悬液, 并调浓度至 $1\times 10^4\sim 5\times 10^4$ 个/ml, 接种于 96 孔培养板。每孔加 150 μl , 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中培养 24 h 后, 分别加入 50 μl 不同浓度的 IOFE, 阳性对照(5-Fu)和阴性对照(蒸馏水), 每个处理设 5 个重复。MTT 比色法检测细胞增殖, 按以下公式计算细胞毒百分抑制率。以药品的浓度为横坐标, 抑制率为纵坐标作图, 用相应软件计算出半数毒性浓度(TC_{50}): 细胞毒百分率(%) = $(1 - \text{实验孔 } A_{570} / \text{对照孔 } A_{570}) \times 100\%$

1.9.2 检测 IOFE 对人肝癌细胞株 HepG₂ 和人胃癌细胞株 SGC7901 的增殖影响 实验方法同上, 按以下公式计算细胞生长抑制率: 细胞生长抑制率(%) = $(\text{对照孔 } A_{570} - \text{实验孔 } A_{570}) / \text{对照孔 } A_{570} \times 100\%$

1.9.3 检测 IOFE 对正常组织来源的人肝细胞株 HL-

7702 损伤后的修复作用 取对数生长期的 HL-7702 制成 $1\times 10^4\sim 5\times 10^4$ 个/ml 细胞悬液, 将悬液与氟尿嘧啶以 4:1 的体积比混合均匀, 致细胞损伤, 并将此悬液按上述方法接种于 96 孔培养板中, 24 h 后, 分别加入 50 μl 不同浓度的 IOFE, 设阴性对照(蒸馏水), 每个处理重复 5 次, MTT 比色法检测细胞增殖, 按以下公式计算细胞损伤恢复率: 细胞损伤恢复率(%) = $(\text{实验孔 } A_{570} - \text{对照孔 } A_{570}) / \text{对照孔 } A_{570} \times 100\%$

2 结果

2.1 IOFE 中蛋白质及糖含量

由表 1 可知: 由此法获得的提取物糖含量较多, 为抗肿瘤作用的成分分析提供一定的依据。

2.2 IOFE 对 HL-7702 细胞的毒性

由表 2 可知, 除 CK 外, IOFE 在(93.75~3 000 $\mu\text{g/ml}$)浓度之间均无细胞毒性, 且浓度越高, 细胞毒百分率负值越大, 且不存在半数毒性浓度。说明 IOFE 无细胞毒作用。

2.3 IOFE 对 HepG₂ 及 SGC7901 细胞的抑制作用结果

由表 3 可以看出, IOFE 在 93.75~3 000 $\mu\text{g/ml}$ 浓度之间, 随着浓度的减小, 对 HepG₂ 和 SGC7901 的抑制作用逐渐增强, 且在同一浓度下, 对 SGC7901 抑制率大于 HepG₂。但随着浓度升高, IOFE 却表现出对两种细胞增殖起促进作用。说明 IOFE 中含有对细胞生长起促进和抑制作用的两类成分, 需要进一步分离、纯化。

2.4 IOFE 对 HL-7702 的损伤后修复作用结果

图 1 所示, IOFE 对损伤后的 HL-7702 的生长具有极大的修复作用, 在 93.75~3 000 $\mu\text{g/ml}$ 浓度范围

Table 1 Protein and sugar contents of IOFE

Sample	Protein (%)	Total sugar (%)	Reducing sugar (%)
IOFE	20.71	36.83	19.90

Table 2 Cell mediated cytotoxicity of IOFE on HL-7702 cell lines

Group	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancy (A)	Cell cytotoxicity rate (%)	Toxicity on inhalation (TC_{50})
IOFE1	93.8	1.8764 \pm 0.0071*	-8.95%	-
IOFE2	187.5	1.9584 \pm 0.0147*	-13.72%	-
IOFE3	750.0	2.0920 \pm 0.0541*	-21.47%	-
IOFE4	1 500.0	2.3034 \pm 0.0114*	-33.75%	-
IOFE5	3 000.0	2.4336 \pm 0.0220*	-41.31%	-
CK	-	1.7222 \pm 0.0490	0.00%	-
CTX	100.0	1.2042 \pm 0.1127*	30.08%	-

Values are expressed as mean \pm SD. CK (negative), CTK (positive); * P <0.01, vs control.

Table 3 Inhibition effect of IOFE on HepG₂ and SGC7901 cell lines

Group	concentration (μg/ml)	HepG ₂		SGC7901	
		Absorbancy (A)	Inhibition rate (%)	Absorbancy (A)	Inhibition rate (%)
IOFE1	93.8	1.9722±0.1479	3.96	1.4744±0.0989*	10.45
IOFE2	187.5	2.0414±0.1118	0.59	1.6102±0.0829	2.20
IOFE3	750.0	2.5698±0.0768*	-25.14	1.9110±0.0642	-16.07
IOFE4	1 500.0	2.8094±0.0356*	-36.80	1.9414±0.0838*	-17.92
IOFE5	3 000.0	2.8910±0.0575*	-40.78	1.9458±0.1092*	-18.19
CK	-	2.0536±0.1282	0.00	1.6464±0.1430*	0.00
CTX	100.0	1.4108±0.1243*	31.30	1.0510±0.0708*	36.16

Values are expressed as mean±SD. CK (negative), CTX (positive); *P<0.01, vs control.

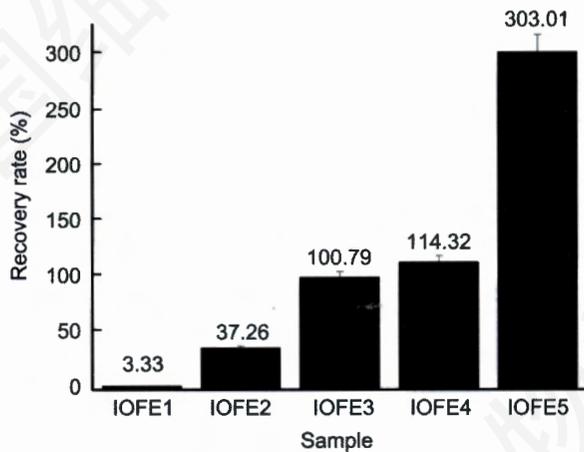


Fig.1 Recovery effect of IOFE on HL-7702 cell lines

内, 随浓度的升高, 修复作用逐渐增强。说明 IOFE 可以有效修复被化疗药物损伤的正常细胞, 因此可作为化疗药物的辅助药物。

3 讨论

研究表明, 在 93.75~3 000 μg/ml 浓度范围内, IOFE 对正常组织来源的人肝细胞 HL-7702 无细胞毒作用, 而对人肝癌细胞株 HepG₂、人胃癌细胞株 SGC7901 具有促进和抑制双重作用。与李英秀等^[4]采用桦褐孔菌子实体提取物对胃癌进行研究得到的结果具有相符之处, 也就是提取物在低浓度条件下均有抑制肿瘤细胞增殖的作用, 而本研究通过发酵手段获得的提取物, 在高浓度时的促进细胞增殖作用, 表明了提取物中的成分及浓度不同、药理活性也表现不同。研究已经发现, IOFE 中含有丰富的蛋白质和小分子的还原糖、萜类、脂肪酸等, 而这些物质有的抑制癌细胞的增殖, 有的却促进增殖, 本研究的意义就在于此。已经证实桦褐孔菌提取液中的三萜类, 尤其是桦褐孔菌醇对 Walker256 癌肉瘤细胞、MCF-7 人乳腺癌细胞和 P388 白血病细胞有明显的抑制作

用^[7]。

而李碗珍等^[5]获得的桦褐孔菌液体发酵提取物是以清除自由基活性为指标, 对发酵条件进行优化的, 与本研究以糖含量为指标确定发酵及提取条件的目的不同, 因此获得提取物的活性作用将有很大区别, 正是因为桦褐孔菌具有活性成分的多样性, 为我们进一步分离与纯化 IOFE, 从而确定其体外作用机制提供了宝贵的参考。

本研究显示 IOFE 对氟尿嘧啶损伤后正常组织来源的人肝细胞 HL-7702 的生长具有极大的修复作用, 且对 HL-7702 无细胞毒作用, 这在肿瘤的治疗方面, 具有较高的应用价值, 可作为抗肿瘤的辅助药物, 用来修复化疗药物给患者机体造成的极大损伤。关于桦褐孔菌提取物作为一种抗肿瘤辅助药物还有待于在临床上进行深入研究。

参考文献(References)

- 1 黄年来. 俄罗斯神秘的民间药用真菌——桦褐孔菌. 中国食用菌 2002; 21(4): 7-8.
- 2 Ichimura T, Watanabe O, Maruyama S. Inhibition of HIV-1 protease by water-soluble lignin-like substance from an edible mushroom, *Fuscoporia obliqua*. *Biosci Biotechnol Biochem* 1998; 62(3): 575-7.
- 3 Kahlos K, Tikka V, Hiltunen R. Effect of cysteine on the production of inotodiol and other lipids in *Inonotus obliquus* grown *in vitro*. *Planta Med* 1993; 59(7 Suppl): A657.
- 4 李英秀, 崔基成, 孙东植, 高元哲, 崔永. 桦褐孔菌提取物对胃癌 MGC-803 细胞株的抗增殖与诱导凋亡作用. *菌物研究* 2003; 1(1): 1-23.
- 5 李碗珍, 胡凤林, 万水霞, 耿德贵, 桂琳, 杨成, 等. 桦褐孔菌发酵及其提取物清除自由基活性的研究. *生物学杂志* 2006; 23(4): 22-5.
- 6 程宝鸾. 动物细胞培养技术. 广州: 华南理工大学出版社, 2000, 205.
- 7 Kahlos K, Kangas L, Hiltunen R. Antitumor activity of some compounds and fractions from an n-hexane extract of *Inonotus obliquus*. *Acta Pharm Fenn* 1987; 96(1): 33-44.

Effects of *Inonotus obliquus*'s Fermentation Liquid Extraction on Different Cell Lines

Lan-Ying Wang, Fang Huang, Yan Su, Ai-Rong Song*

(Shandong Provincial Key Laboratory of Applied Mycology, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract Fermentation liquid extraction samples of *Inonotus obliquus*'s strains (IOFE) were initially chosen to test the cell activity *in vitro* using hominal's liver cancer cell line HepG₂, the hominal's stomach cancer cell line SGC7901 and the normal hominal's liver cell HL-7702. The result indicated that the HepG₂ and the SGC7901 could be inhibited in the low consistency, comparatively, the inhibition effect on SGC7901 was better than on HepG₂; the extraction not only had no inhibition effect on the multiplication of the HepG₂ and the SGC7901, but also had definite auxo-action; Although fermentation liquid extraction of *Inonotus obliquus*'s strains had the lower inhibition effect on HepG₂ and the SGC7901, it had the greatly repair effect on the postinjury HL-7702, and the repair function increased along with the strengthen of the concentration. In the high concentration 3 000 µg/ml, the repair rate was 303.01%. It followed that IOFE could be used as an antineoplastic ancillary drug to repair the greatly injury on patient by the chemotherapeutics in the treatment of oncotherapy.

Key words *Inonotus obliquus*; inhibition rate; recovery rate

Received: January 4, 2010

Accepted: March 11, 2010

This work was supported by the Project of Science and Technology of Shandong Province (No.2007GG2009017)

*Corresponding author. Tel: 86-532-86080687, E-mail: airongsong@163.com