

文章编号:1001-6880(2014)3-0314-04

# 斑褐孔菌石油醚提取物体外抗肿瘤活性研究

胡姗姗<sup>1</sup>, 刘云<sup>2</sup>, 郭丹妮<sup>1</sup>, 朱欣婷<sup>2</sup>, 田应彪<sup>3\*</sup><sup>1</sup>遵义医学院药学院; <sup>2</sup>遵义医学院医学与生物学研究中心; <sup>3</sup>遵义医学院附属医院, 遵义 563000

**摘要:**探讨斑褐孔菌石油醚提取物(PEFP)体外抗肿瘤活性及其机制。采用磺酰罗丹明染色法(SRB法)考察PEFP对人肝癌细胞SMMC-7721、人胃癌细胞SGC-7901、人喉癌上皮细胞Hep-2增殖的影响。倒置相差显微镜、透射电镜观察PEFP作用SMMC-7721后的细胞形态及超微结构的变化;流式细胞术检测PEFP作用SMMC-7721后细胞周期的改变情况。实验结果显示PEFP对上述三种人恶性肿瘤细胞均表现出明显的抑制效果,且呈剂量效应关系,其半数抑制浓度( $IC_{50}$ )分别为52.72、69.18、58.88  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。取1/2  $IC_{50}$ 浓度的PEFP作用于SMMC-7721 48 h后,细胞形态结构及细胞周期发生改变, $G_0/G_1$ 期细胞增多,S期细胞明显减少。PEFP可能通过阻滞SMMC-7721细胞周期于 $G_0/G_1$ 期来抑制肿瘤细胞的增殖,具有较明显体外抗肿瘤活性。

**关键词:**斑褐孔菌;抗肿瘤;细胞增殖;细胞周期**中图分类号:**TS201.2**文献标识码:**A

## Anti-cancer Activity of Petroleum Ether Extracts of *Fuscoporia punctata* (Fr.) Cunn *in vitro*

HU Shan-shan<sup>1</sup>, LIU Yun<sup>2</sup>, GUO Dan-ni<sup>1</sup>, ZHU Xin-ting<sup>2</sup>, TIAN Ying-biao<sup>3\*</sup><sup>1</sup>Basic Medical College, Zunyi Medical College; <sup>2</sup>Medical and Biological Research Center, Zunyi Medical College;<sup>3</sup>Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China

**Abstract:** The objective of this study was to investigate the anti-cancer activity of petroleum ether extracts of *Fuscoporia punctata* (PEFP) and its *in vitro* anti-cancer mechanism. The sulforhodamine B (SRB) assay was employed to test the anti-tumor effect of PEFP on SMMC-7721, SGC-7901 and Hep-2 cell lines. Inverted phase contrast microscope and transmission electron microscopy were used to observe the changes of morphologic and ultrastructure of SMMC-7721 cells after treatment with PEFP. The changes of SMMC-7721 cells cycle were analyzed by flow cytometry (FCM). The results showed PEFP displayed obvious inhibitory effect on proliferation of the above-mentioned cells in a dose-dependent manner. The  $IC_{50}$  values were 52.72  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 69.18  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 58.88  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectively. After treatment with PEFP at the 1/2  $IC_{50}$  concentration for 48 h, the morphology and cell cycle of SMMC-7721 cells showed special changes. The cell cycle analysis revealed that SMMC-7721 cells increased in  $G_0/G_1$ -phase and decreased in S-phase cells. The SMMC-7721 cells were arrested in  $G_0/G_1$  phase. The study indicated PEFP can inhibit SMMC-7721 cells proliferation by blocking the cell cycle to  $G_0-G_1$  phase and had relatively obvious *in vitro* anti-cancer effect.

**Key words:** *Fuscoporia punctata* (Fr.) Cunn; anti-cancer; cell proliferation; cell cycle

斑褐孔菌[*Fuscoporia punctata* (Fr.) Cunn]为多孔菌科(*Polyporaceae*),褐孔菌属(*Fuscoporia*),又名层卧孔菌、斑点嗜蓝孢孔菌,生于阔叶树倒木上,主产于河北、吉林、江苏、陕西等地<sup>[1,2]</sup>。现代药理研究表明斑褐孔菌具有抗心肌缺血、调节心率、改善心功能、降压、阻滞肾上腺素能 $\beta$ -受体的作用,还具

有凝血活性,可治疗心绞痛、痛经闭经等疾症<sup>[3-5]</sup>。在预实验中,课题组发现斑褐孔菌提取物表现出较好的体外抗肿瘤活性,课题组由此推测斑褐孔菌可能含有抗肿瘤活性的先导化合物。本研究对其极性较小的石油醚提取部分进行了抗肿瘤活性的初探,旨在为后期捕捉具有抗肿瘤活性的先导化合物以及为其能在临床应用提供实验依据。

## 1 材料、试剂与仪器

### 1.1 实验材料

人肝癌细胞SMMC-7721、人胃癌细胞SGC-

收稿日期:2013-03-15 接受日期:2013-09-11

基金项目:贵州省科技厅、遵义医学院、遵义市科技局联合资金项目(2010-48)

\*通讯作者 Tel:86-852-8608770; E-mail:tybczh@163.com

7901、人喉癌上皮细胞 Hep-2 由遵义医学院医学与生物医学研究中心馈赠,斑褐孔菌采自吉林省敦化市。

## 1.2 主要试剂

RPMI-1640 培养基、胎牛血清,美国 Gibco 公司;DMSO、胰蛋白酶、青霉素、链霉素、Tris,美国 Amresco 公司;碘酰罗丹明,美国 Sigma 公司;GenMed 通用型细胞周期流式细胞分析试剂盒,上海杰美基因医药科技有限公司;其余试剂均为国产分析纯。

## 1.3 主要仪器

702 型超低温冰箱、3131 型 CO<sub>2</sub> 培养箱、全波长酶标仪,美国 Thermo 公司;R-210 型旋转蒸发仪,瑞士 Buchi 公司;倒置相差显微镜,日本 OLYMPUS 公司;H-7650 型透射电镜,日本日立公司;FACS Calibur 流式细胞仪,美国 BD 公司。

## 2 实验方法

### 2.1 斑褐孔菌石油醚提取物的制备

斑褐孔菌子实体 60 ℃烘干、粉碎、过 60 目筛。称取斑褐孔菌粉末 100 g,1 L 石油醚 60 ℃连续回流提取两次,每次 3 h。合并提取液,减压旋转蒸除溶剂,自然干燥后得斑褐孔菌石油醚提取物(以下简称 PEFP)200 mg。实验前精密称取 PEFP 10 mg,100 μL DMSO 溶解,临用前用完全培养基稀释成所需浓度。

### 2.2 细胞培养

人肝癌细胞 SMMC-7721、人胃癌细胞 SGC-7901、人喉癌上皮细胞 Hep-2 用 RPMI-1640 完全培养基(含 10% 胎牛血清,100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素)于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱常规培养。待细胞生长至对数生长期,弃培养液,PBS 冲洗,0.25% 胰蛋白酶消化,以 1:3 比例传代继续培养。

### 2.3 SRB 法测定 PEFP 的对肿瘤细胞增殖的影响

取对数生长期 SMMC-7721、SGC-7901、Hep-2 细胞,消化后调整细胞浓度为 80000 个/mL,每种细胞平行接种两块 96 孔板,分别为对照板(实验组:T<sub>0</sub>)和实验板(实验组:T)。每孔加入细胞悬液 100 μL,平板周围一圈加入 200 μL PBS,十字交叉摇匀,置培养箱培养 20 h 后,对照板细胞用预冷的 50% 三氯乙酸(TCA)固定,待测;同时实验板中加入 PEFP 100 μL(PEFP 终浓度分别为 10、20、40、60、80、100 μg/mL),阴性对照孔(阴性对照组:C)加完全培养基,阳性对照空(顺铂:10 μg/mL),每组设 5 个复

孔。继续培养 48 h 后取出培养板,TCA 固定 1 h,去离子水洗板,自然干燥,SRB 染色,10 min 后用醋酸洗板,自然干燥,200 μL Tris 液溶解,530 nm 处测吸光度值(OD 值),按下列公式计算生长抑制率<sup>[6]</sup>。采用改良寇氏法计算 PEFP 对三种细胞的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)。

$$\text{肿瘤细胞生长抑制率} = \left[ 1 - \frac{OD(T) - OD(T_0)}{OD(C) - OD(T_0)} \right] \times 100\%$$

$$\text{改良寇氏法计算公式: } \lg IC_{50} = X_m - I [P - (3 - P_m - P_n)/4]$$

X<sub>m</sub>:lg 最大剂量;I:lg(最大剂量/相临剂量);P:阳性反应率之和;P<sub>m</sub>:最大阳性反应率;P<sub>n</sub>:最小阳性反应率。

### 2.4 倒置相差显微镜观察 PEFP 对 SMMC-7721 细胞形态结构的影响

取对数生长期细胞,消化后调整细胞浓度为 10000 个/mL,取细胞悬液 2 mL 接种到 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶,培养 20 h 后弃培养液,加入 4 mL 浓度为 1/2 IC<sub>50</sub> 的 PEFP,并设阴性对照组。48 h 后倒置相差显微镜观察 SMMC-7721 细胞形态结构的变化情况。

### 2.5 透射电镜观察 PEFP 对 SMMC-7721 细胞超微结构的影响

取对数生长期细胞,消化后调整细胞浓度为 10000 个/mL,取细胞悬液 2 mL 接种到 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶,培养 20 h 后弃培养液,加入 4 mL 浓度为 1/2 IC<sub>50</sub> 的 PEFP,并设置阴性对照组。继续培养 48 h 后,4% 戊二醛固定,透射电镜待检。

### 2.6 流式细胞仪分析 PEFP 对 SMMC-7721 细胞周期分布的影响

实验前细胞处理及分组同实验方法 2.5,每组三个重复,继续培养 48 h。随后按 GenMed 细胞周期试剂盒说明书操作。收集细胞,加入 1 mL 预冷的 GenMed 清理液,300 g 离心 5 min,弃上清液。加入 500 μL 预冷的 GenMed 1 号工作液(由 500 μL GenMed 裂解液和 2.5 μL 的 GenMed 染色液以及 10 μL 的 GenMed 去干扰剂组成),小心混匀,避光孵育 1 h,再加入 500 μL 2 号工作液(由 500 μL 的 GenMed 保存液和 4 μL 的 GenMed 染色液组成),混匀;移入细胞流式仪专用测试管。流式细胞仪待检。

### 2.7 统计方法

实验结果以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,统计分析采用 SPSS19.0 软件,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。

### 3 实验结果

#### 3.1 PEFP 对三种肿瘤细胞增殖的影响

由表 1 可知, PEFP 对 SMMC-7721、SGC-7901、Hep-2 三种肿瘤细胞表现出较为明显的抑制作用, 抑制率随 PEFP 浓度的增加逐渐上升, 且呈剂量效

应关系。其中, PEFP 对 SMMC-7721 的抑制作用最明显, 在  $40 \mu\text{g}/\text{mL}$  时, 抑制率高达 46.96%, 而在  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  浓度时, 细胞趋于完全死亡。浓度为  $80 \mu\text{g}/\text{mL}$  时, 抑制率和阳性对照相当。PEFP 对三种细胞的  $\text{IC}_{50}$  分别为  $52.72, 69.18, 58.88 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表 1 PEFP 对三种肿瘤细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 1 Effect of PEFP on the proliferation of 3 tumor cells ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

| 组别<br>Group                   | PEFP 浓度<br>PEFP<br>concentration<br>( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) | SMMC-7721         |                               | SGC-7901          |                               | Hep-2             |                               |
|-------------------------------|---|-------------------|-------------------------------|-------------------|-------------------------------|-------------------|-------------------------------|
|                               |   | OD 值<br>OD value  | 抑制率<br>Inhibition rate<br>(%) | OD 值<br>OD value  | 抑制率<br>Inhibition rate<br>(%) | OD 值<br>OD value  | 抑制率<br>Inhibition rate<br>(%) |
| 对照组 Control (T <sub>0</sub> ) | -   | $0.26 \pm 0.00$   | -                             | $0.31 \pm 0.00$   | -                             | $0.25 \pm 0.00$   | -                             |
| 阴性对照组 Negative control (C)    | -   | $1.41 \pm 0.05$   | -                             | $1.41 \pm 0.03$   | -                             | $1.68 \pm 0.07$   | -                             |
| 实验组 Sample (T)                | 10  | $1.30 \pm 0.04^*$ | 9.57                          | $1.29 \pm 0.03^*$ | 10.91                         | $1.42 \pm 0.05^*$ | 18.18                         |
|                               | 20  | $1.16 \pm 0.06^*$ | 21.74                         | $1.24 \pm 0.03^*$ | 15.45                         | $1.35 \pm 0.06^*$ | 23.08                         |
|                               | 40  | $0.87 \pm 0.04^*$ | 46.96                         | $1.11 \pm 0.04^*$ | 27.28                         | $1.27 \pm 0.04^*$ | 28.67                         |
|                               | 60  | $0.62 \pm 0.06^*$ | 68.70                         | $0.88 \pm 0.04^*$ | 48.19                         | $0.90 \pm 0.06^*$ | 54.54                         |
|                               | 80  | $0.40 \pm 0.06^*$ | 86.96                         | $0.77 \pm 0.03^*$ | 58.19                         | $0.62 \pm 0.06^*$ | 74.13                         |
|                               | 100   | $0.28 \pm 0.01^*$ | 99.98                         | $0.67 \pm 0.07^*$ | 62.28                         | $0.47 \pm 0.02^*$ | 84.62                         |
| 顺铂 Cis-platinum               | 10  | $0.46 \pm 0.05^*$ | 82.44                         | $0.46 \pm 0.02^*$ | 86.50                         | $0.57 \pm 0.01^*$ | 77.37                         |

注: “-”表示无; \* 与阴性对照组比较,  $P < 0.05$ 。

Note: “-” indicates not detected; \* compare with negative control,  $P < 0.05$ .

#### 3.2 PEFP 对 SMMC-7721 细胞形态的影响

如图 1A 所示, 阴性对照组的细胞生长旺盛, 细胞膜完整, 形态规则, 细胞贴壁紧密。而如图 1B 所示, 细胞经  $1/2 \text{ IC}_{50}$  浓度的 PEFP 作用 48 h 后, 细胞数量明显减少, 细胞间的连接减少, 细胞体积变小、变圆、变亮, 大部分细胞凋亡或坏死, 细胞膜破裂, 悬浮在培养液中。

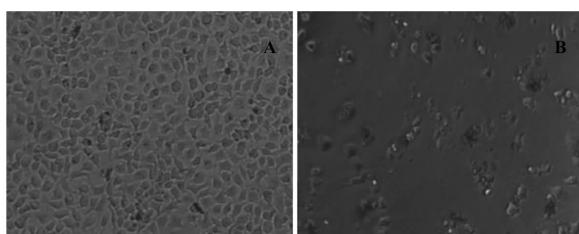


图 1 PEFP 对 SMMC-7721 细胞形态的影响 ( $\times 100$ )

Fig. 1 Effect of PEFP on the cellular morphology of SMMC-7721 ( $\times 100$ )

注: A-阴性对照组; B-实验组( $26.36 \mu\text{g}/\text{mL}$ )

Note: A- Negative control group; B-Sample group ( $26.36 \mu\text{g}/\text{mL}$ )

#### 3.3 PEFP 对 SMMC-7721 细胞超微结构的影响

细胞经  $1/2 \text{ IC}_{50}$  浓度的 PEFP 作用 48 h 以后, 对

照组(图 2A)细胞核浆并无异常, 胞质内染色质丰富, 可见多个核仁, 胞浆内线粒体丰富, 嵴致密, 绒毛结构清晰; 实验组(图 2B)细胞核明显缩小, 异染色质消散, 线粒体肿胀, 空泡化, 绒毛断裂消失。

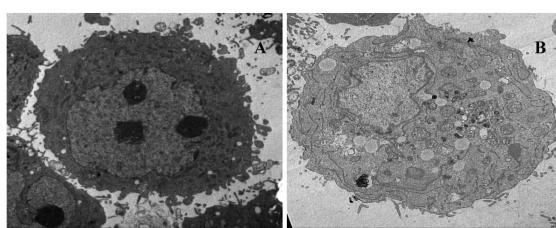


图 2 PEFP 对 SMMC-7721 细胞超微结构的影响

Fig. 2 Effect of PEFP on the cellular ultrastructure of SMMC-7721

注: A-阴性对照组; B-实验组( $26.36 \mu\text{g}/\text{mL}$ )

Note: A- Negative control group; B-Sample group ( $26.36 \mu\text{g}/\text{mL}$ )

#### 3.4 PEFP 对 SMMC-7721 细胞周期的影响

如表 2 和图 3 所示, 细胞经  $1/2 \text{ IC}_{50}$  浓度的 PEFP 作用后,  $G_0/G_1$  期细胞增多, S 期细胞明显减少。出现  $G_0/G_1$  期阻滞。

表 2 PEFP 对人肝癌细胞 SMCC-7721 细胞周期的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 2 Effect of PEFP on the cell cycle of SMCC-7721 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 组别<br>Group               | PEFP 浓度<br>PEFP concentration<br>( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) | $G_0/G_1$<br>(%)   | S<br>(%)           | $G_2/M$<br>(%)  |
|---------------------------|--|--------------------|--------------------|-----------------|
| 阴性对照组<br>Negative control | 0  | 61.95 $\pm$ 2.07   | 30.96 $\pm$ 1.23   | 8.09 $\pm$ 1.01 |
| 实验组<br>Sample             | 26.36  | 66.34 $\pm$ 2.56 * | 24.03 $\pm$ 3.98 * | 9.62 $\pm$ 1.42 |

\* :与阴性对照组比较,  $P < 0.05$ 。

\* : Compare with Negative control,  $P < 0.05$ .

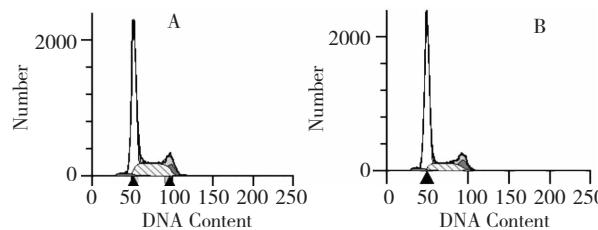


图 3 PEFP 对 SMCC-7721 细胞 DNA 含量的影响

Fig. 3 Effect of PEFP on the DNA content of SMCC-7721

注:A-阴性对照组;B-实验组(26.36  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

Note: A- Negative control group; B- Sample group (26.36  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

## 4 讨论

斑褐孔菌在民间是作为一种用于治疗冠心病的药用真菌<sup>[7]</sup>,以它为原料制成的冠脉乐片已用于临床治疗心绞痛,但对于斑褐孔菌的药用价值的研究和利用不应仅限于此,还有待挖掘。本实验以石油醚为溶剂,提取其弱极性成分 PEFP。利用 SRB 法证实了 PEFP 对人肝癌细胞 SMMC-7721、人胃癌细胞 SGC-7901、人喉癌上皮细胞 Hep-2 三种人恶性肿瘤细胞的体外增殖具有明显的抑制作用,且呈剂量效应关系。其中,PEFP 对人肝癌细胞 SMMC-7721 的抑制作用最强,IC<sub>50</sub> 为 52.72  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。细胞周期与肿瘤的关系是近年来抗肿瘤药物研究的热点,人类恶性肿瘤的分子特征是细胞周期调节失控,引起细胞分化的缺乏和细胞生长的失常,导致细胞无限增殖<sup>[8,9]</sup>。在实验中,课题组继续考察了 PEFP 抑制 SMMC-7721 细胞体外增殖可能的机制。本实验通

过流式细胞仪监测了 PEFP 对 SMMC-7721 细胞周期的影响,发现 PEFP 能使 SMMC-7721 细胞 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞增多,S 期细胞减少。由此推测 PEFP 能阻止 SMMC-7721 细胞由 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期向 S 期转变,将细胞阻滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期,从而阻断细胞的生长与分裂,抑制细胞增殖,但引起 SMMC-7721 细胞 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期阻滞的机制还有待研究。从 G<sub>1</sub> 期进入 S 期是细胞增殖周期中的一个限速位点,临床使用的很多抗肿瘤药物可以引起肿瘤细胞的 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期阻滞<sup>[10]</sup>。由实验结果我们推测,PEFP 中可能会分离获得高效抑制 SMMC-7721 细胞增殖的单体化合物,此工作将会陆续开展。此次研究结果丰富了我国大型真菌斑褐孔菌的药理活性研究内容,并为进一步的开发利用这一药用真菌资源提供了理论依据。

## 参考文献

- Wu XL(吴兴亮). Fungi of Tropical China(中国热带真菌). Beijing:Science Press,2009. 584.
- Mao XL(卯晓岚). Macromycetes of China(中国蕈菌). Beijing:Science Press,2009. 584.
- Guo YM(郭豫梅), Guo MJ(郭梅杰). Comparative research on flavonoid content in different fermentative productions of *Fuscoporia punctata* Cunn.. *Technl Dev Chem Ind*(化工技术与开发),2008,37:9-11.
- Li YJ(李永鉴). Blocking effect of *Suscoporia punctata* (Fr) Cunn tablet on  $\beta$ -receptor. *J Fujian Coll Tradit Chin Med*(福建中医药学报),1993,3:227-229.
- Liu PJ(刘鹏举), Shu Y(舒英), Tang Y(唐咏), et al. Coagulant activity of agglutinins for 17 kinds of fungi. *J Liaoning Forest Sci Technol*(辽宁农业科技),2009,1:37-38.
- Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc*,2006,1:1112-1116.
- Ying JZ(应建浙), Mao XL(卯晓岚), Ma QM(马启明), et al. Illustrates Handbook of Chinese Medicinal Mushroom(中国药用真菌图鉴). Beijing:Science Press,1987. 167.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000,100:57-70.
- Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science*,1994,266:1821-1828.
- Schwartz GK, Shah MA. Targeting the cell cycle: A new approach to cancer therapy. *J Clin Oncol*,2005,23:9408-9421.