

灰树花子实体醇提物生物活性研究

马迪^{1,2}, 韩乐^{1,2}, 冯娜^{2*}, 韩伟^{1*}, 张劲松²

¹华东理工大学药学院, 上海 200237; ²上海市农业科学院食用菌研究所 国家食用菌工程技术研究中心
农业部南方食用菌资源利用重点实验室 上海市农业遗传育种重点开放实验室, 上海 201403

摘要: 对灰树花子实体 95% 乙醇提取物的不同萃取分部(石油醚分部、氯仿分部、乙酸乙酯分部、正丁醇分部和剩余分部)进行了化学成分的定性检验和体外抗肿瘤、抑制 DPP-IV 酶的活性研究。结果表明:灰树花子实体的醇提取物中可能含有生物碱、氨基酸或蛋白、有机酸、酚类或鞣质、甾体、萜醌等物质。石油醚分部、氯仿分部、乙酸乙酯分部和正丁醇分部对正常细胞 WPMY-1 的增殖无抑制作用而对三种肿瘤细胞 L1210、SW620、K562 全部或部分的增殖有一定的抑制作用,其中氯仿分部对 L1210 细胞增殖的抑制作用最强,其 IC₅₀ 达到 0.13 μg/mL。这说明这四个分部具有抗肿瘤活性。剩余分部对肿瘤细胞 L1210、K562 和正常细胞 WPMY-1 的增殖均具有抑制作用,说明该分部可能具有细胞毒性。灰树花子实体的氯仿分部、乙酸乙酯分部和正丁醇分部具有较强的抑制 DPP-IV 酶的活性,这三个萃取分部对 DPP-IV 酶抑制的 IC₅₀ 分别为 497.33、776.51、704.24 μg/mL,该结果说明此三个分部具有降血糖的潜力。

关键词: 灰树花;子实体;抗肿瘤活性;DPP-IV 酶抑制活性

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.03.003

Biological Activity of Ethanol Extract of *Grifola frondosa* Fruiting Bodies

MA Di^{1,2}, HAN Le^{1,2}, FENG Na^{2*}, HAN Wei^{1*}, ZHANG Jing-song²

¹School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; ²Shanghai Academy of Agricultural Sciences; National Research center for Technology and Engineering of Edible Fungi; Key Laboratory of Applied Mycological Resources and Utilization, Ministry of Agriculture, People's Republic of China; Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Shanghai 201403, China

Abstract: Five fractions (petroleum ether fraction, CHCl₃ fraction, EtOAc fraction, *n*-BuOH fraction and residual fraction) obtained from 95% ethanol extract of *Grifola frondosa* fruiting bodies were analyzed to identify the chemical components by the system preparative tests and screened for their antitumor and DPP-IV inhibitory activities. The results indicated that compounds such as alkaloids, amino acids or proteins, organic acids, phenols, tannins, steroids and anthraquinone existed in *G. frondosa* fruiting bodies. Petroleum ether fraction, CHCl₃ fraction, EtOAc fraction and *n*-BuOH fraction showed no inhibition to WPMY-1 normal cells but showed inhibition to the proliferations of L1210, SW620, K562 tumor cells in whole or part, especially CHCl₃ fraction showed strong inhibition to the proliferation of L1210 tumor cell at IC₅₀ of 0.13 μg/mL. It indicated that these 4 fractions had antitumor activity. The residual fraction showed inhibition to L1210, K562 tumor cells and WPMY-1 normal cells, which demonstrated the residual fraction had cytotoxicity. Moreover, CHCl₃ fraction, EtOAc fraction and *n*-BuOH fraction showed strong inhibitory activity to DPP-IV at IC₅₀ of 497.33, 776.51 μg/mL and 704.24 μg/mL respectively. These results indicated that these 3 fractions had probability of hypoglycemic activity.

Key words: *Grifola frondosa*; fruiting body; antitumor activity; DPP-IV inhibitory activity

灰树花 [*Grifola frondosa* (Dicks, ex Fr) S. F. Gray], 英文名 Maitake。有多种别称, 如贝叶多孔

菌、千佛菌、栗子蘑、莲花菇等, 日本称之为舞茸^[1]。隶属担子菌纲, 多孔菌目, 多孔菌科, 树花属, 是一种食、药兼用菌, 夏秋间常野生于栗树周围。目前在日本、韩国以及我国的河北、浙江、山东、福建、四川等地均有人工栽培^[2-4]。

对灰树花活性物质的研究主要集中在其多糖及

收稿日期: 2014-11-10 接受日期: 2015-01-23

基金项目: 上海市科技兴农重点攻关项目(2012-2-9)

* 通讯作者 Tel: 86-21-62201203; E-mail: fengna006@163.com

其生物活性上。日本神户药科大学的 Hiroaki Nanba 和东京药科大学的 Naohito Ohno 等学者对灰树花的多糖类物质进行了结构解析、药理活性等系统的实验研究。研究发现,灰树花中的多糖成分 D-组分、MD-组分、MZ-组分、grifolan LE 等,具有抗肿瘤、抗糖尿病、增强免疫等多种活性,后来,这些组分被成功用于了商业开发^[5-9]。

但到目前为止,人们对灰树花次级代谢产物的研究还较少,已见报道的仅从其中分离获得了三个甾醇类物质和一组脂肪酸类物质^[10],研究发现灰树花中的脂肪酸中含有棕榈酸、油酸和亚油酸对环氧合酶具有一定的抑制作用。

在本研究中,我们拟从灰树花的次生代谢产物入手,分析灰树花子实体中次生代谢物质的成分,并以抑制肿瘤细胞增殖和抑制 DPP-IV 酶的活性为实验模型,从灰树花次生代谢物质中寻找具有抗肿瘤、降血糖等生物活性的组分,探讨将灰树花中的活性次生代谢物质作为功能性食品开发的可能性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及细胞

灰树花(*Grifola frondosa*)子实体干品 5 kg,购自上海农业科学院百信食药菌科贸有限公司。

SW620:结肠癌细胞, L1210:小鼠淋巴细胞白血病细胞株, K562:慢性髓原白血病细胞, WPMY-1:正常人体前列腺细胞,以上细胞均购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。CHO:中国仓鼠卵巢巢细胞,购自美国菌种保藏中心(ATCC)。

1.1.2 主要试剂

95%乙醇、石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯和正丁醇为国药集团化学试剂有限公司分析纯试剂。

DMEM 培养基、RPMI 1640 培养基、MEM 培养基、胎牛血清和胰酶(含 0.25% EDTA)购自 GIBCO 公司;5-Fu [5-氟尿嘧啶,5-fluoro-2,4(1 h, 3 h) pyrimidinedione]、二甲亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)、抑二肽素 A (ILE-PRO-ILE)、Gly-Pro-7-Amido-4-methylcoumarin hydrobromide、PMSF、Triton X-100 购自 SIGMA 公司,链霉素、青霉素购自 AMERSCO 公司;ALamar Blue Assay kit 购自 BIOSOURCE 公司;96 孔培养板为 COSTAR 产品。

RPMI 1640 完全培养基配制:每升培养基中加入胎牛血清 100 mL,浓度为 1% 的双抗 10 mL(青霉

素 3 mg/mL,链霉素 5 mg/mL),过 0.22 $\mu\text{mol/L}$ 滤膜后,分装 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

DMEM 完全培养基配制:每升培养基中加入胎牛血清 10%,浓度为 1% 的双抗 10 mL(青霉素 3 mg/mL,链霉素 5 mg/mL),过 0.22 $\mu\text{mol/L}$ 滤膜后,分装 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

MEM 完全培养基配制:每升培养基中加入 G418 600 mg,浓度为 1% 的双抗 10 mL(青霉素 3 mg/mL,链霉素 5 mg/mL),FBS 100 mL,过 0.22 $\mu\text{mol/L}$ 滤膜后,分装 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.1.3 仪器

Synergy HT 多功能酶标仪(BIO-TEK 公司);二氧化碳培养箱(THERMO FORMA 公司);细胞计数仪(BECKMAN-COULTER 公司);超低温冰箱(THERMO FORMA 公司);倒置荧光显微镜(OLYMPUS 公司),20 L 旋转蒸发仪(上海贝凯生物化工设备有限公司),1 L 旋转蒸发仪(BüCHI 公司)。

1.2 方法

1.2.1 灰树花子实体的提取和萃取

将灰树花子实体干品 5 kg,用 95%乙醇等体积、常温浸提 48、24、24 h,将提取液合并减压浓缩获得提取物 553.15 g。

将 95%醇提物用 80%乙醇复溶制成混悬液,依次用等体积的石油醚,氯仿,乙酸乙酯,正丁醇分别萃取 3 次。蒸馏浓缩或减压浓缩后分别获得石油醚分部 207.50 g,氯仿分部 39.37 g,乙酸乙酯分部 65.27 g,正丁醇分部 231.21 g,剩余分部 231.21 g。

将制备获得的灰树花子实体待测组分分别溶于二甲亚砜(DMSO),配制成 10、20、40、100 mg/mL 四种不同浓度的溶液。

1.2.2 灰树花子实体各萃取分部的定性检验

参照文献^[11]配制定性检验所需试剂。将萃取的各部分分别作生物碱、氨基酸或蛋白、有机酸、酚类或鞣质、甾体、黄酮体、萜醌等物质的定性检验。用碘化铋钾、硅钨酸试剂做生物碱的定性检定,用茚三酮试剂做氨基酸或蛋白的定性检定,用费林试剂做糖类的定性检验,用溴酚蓝试剂做有机酸物质的定性检定,用 1% 三氯化铁、香草醛-盐酸试剂做酚类或鞣质物质的定性检定,三氯化锑-醋酐-浓硫酸试剂用作检测甾类物质,用三氯化铝、浓氨水做黄酮体物质的定性检定,用 1% 硼酸、10% 氢氧化钾做萜醌类物质的定性检定。

1.2.3 抗肿瘤活性及细胞毒性测定

SW620 细胞、L1210 细胞和 WPMY-1 细胞培养于 DMEM 完全培养液中, K562 细胞培养于 RPMI 1640 完全培养液中, 以上细胞在 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度下, 于培养箱内培养传代, 取对数生长期细胞用于实验。

取 L1210 细胞、SW620 细胞、WPMY-1 细胞和 K562 细胞, 用 0.25% 的胰酶 37 °C 下将 SW620 细胞、WPMY-1 细胞消化 1 ~ 5 min, 用培养基终止, 然后分别用培养基 DMEM、RPMI 1640 将四种细胞稀释成为 2 × 10⁴/mL 的单细胞悬液, 分别加入 96 孔培养板中, 每孔加入 199 μL, 置于培养箱中 6 h 后, 加入 1 μL 浓度为 10、20、40、100 mg/mL 的待测样品, 每浓度三个重复。阴性对照为 1 μL 的 DMSO, 阳性对照为 4 mg/mL 的 5-Fu DMSO 溶液。培养 48 h 后, 取出在每孔加入 30 μL 的 0.1 mg/mL 的 Alamar blue 试剂, 置培养箱中继续培养 6 h 后, 用酶标仪在 570 nm 和 600 nm 波长处测吸光度 (A) 值。根据 Alamar Blue 试剂的公式计算各种样品对肿瘤细胞 L1210、K562、SW620 和正常细胞 WPMY-1 增殖的抑制率。

$$\text{细胞抑制率}(\%) = \left\{ 1 - \frac{117216 \times A_{(570)}(\text{样品}) - 80586 \times A_{(600)}(\text{样品})}{117216 \times A_{(570)}(\text{对照}) - 80586 \times A_{(600)}(\text{对照})} \right\} \times 100\%$$

1.2.4 DPP-IV 抑制作用检测

CHO 细胞培养于 MEM 完全培养基中, 取对数生长期细胞用于实验。用碧云天 P0013 裂解液加入

1 mM PMSF, 冰上裂解 30 min, 每隔 5 min 震荡一次, 提取二肽基肽酶 IV (Dipeptidyl peptidase IV, DPP-IV)。实验采用 70 mM Gly-Pro-7-Amido-4-methylcoumarin hydrobromide 作荧光底物^[12], 2.7 mg/mL (8 mM) ILE-PRO-ILE 作阳性对照药。待测样品浓度为 20、40、100 mg/mL。为防止某些天然产物有荧光显色, 故需设置空白组。实验分为 6 组, 每组设三个平行, 分别为: 空白对照组 (98 μL 缓冲液 + 2 μL 底物); 阴性对照组 (5 μL DPP-IV + 93 μL 缓冲液 + 2 μL 底物); 阳性对照组 (1 μL 抑制剂 + 5 μL DPP-IV + 92 μL 缓冲液 + 2 μL 底物); 阳性空白对照组 (1 μL 抑制剂 + 97 μL 缓冲液 + 2 μL 底物); 样品组: (1 μL 样品 + 5 μL DPP-IV + 92 μL 缓冲液 + 2 μL 底物); 样品空白对照组 (1 μL 样品 + 97 μL 缓冲液 + 2 μL 底物)。按照样品 (或阳性对照药)、DPP-IV、缓冲液、底物的顺序依次加入 96 孔板内, 每孔总体积 100 μL, 置于 37 °C 和 5% CO₂ 培养 1 h 后, 用酶标仪于激发波长 380 nm、发射波长 460 nm 处检测 OD 值, 根据下式计算抑制率:

$$\text{抑制率}\% = \left[\frac{(\text{OD 阴性对照} - \text{OD 空白对照}) - (\text{OD 样品或阳性对照} - \text{OD 样品空白对照或阳性空白对照})}{(\text{OD 阴性对照} - \text{OD 空白对照})} \right] \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 定性检定结果

灰树花子实体醇提物各萃取分部的定性检验结果见表 1。

表 1 灰树花子实体醇提物各萃取分部的化合物定性检定

Table 1 System preparative tests on five fractions obtained from ethanol extract of *G. Frodosa* fruiting bodies

检测物质 Compound	试剂 Reagent	萃取分部 Fractions				
		PEE	CE	EAE	n-BuE	RE
生物碱 Alkaloid	碘化铋钾 Wagner's reagent	+	+	+	+	-
	硅钨酸 Tungstosilicic acid	+	+	+	-	-
糖类 Saccharides	费林 Fehling's solution	-	-	-	+	+
氨基酸、蛋白 Amino acid and protein	茚三酮 Ninhydrin	-	-	-	+	+
有机酸 Organic acid 酚类化合物和鞣质 Phenolic and tannins	溴酚蓝 Bromophenol blue	-	+	+	+	+
	1% 三氯化铁 Ferric trichloride (1%)	-	-	-	-	-
	香草醛-盐酸 Vanillic aldehyde- hydrochloric acid	-	+	-	+	+
甾体 (或三萜) Sterides (or terpene)	三氯化锑 Antimony butter	+	+	+	-	-
	醋酐-浓硫酸 Acetic anhydride-concentrated sulphuric acid	+	+	+	-	-
黄酮体 Flavonoids	1% 三氯化铝 AlCl ₃ (1%)	-	-	-	-	-
	浓氨水 Ammonia	-	-	-	-	-

蒽醌 Anthraquinone	1% 硼酸 Boric acid(1%)	+	+	-	-	-
	10% 氢氧化钾 Potassium hydroxide(10%)	+	+	-	-	-

注:其中,“+”表示阳性结果,“-”表示阴性结果。“PEE”表示石油醚萃取分部,“CE”表示氯仿萃取分部,“EAE”表示乙酸乙酯萃取分部,“n-BuE”表示正丁醇萃取分部,“RE”表示萃取剩余分部。下同。

Note:“+” indicates positive result;“-” indicates negative results.“PEE” means petroleum ether fraction,“CE” means CHCl₃ fraction,“EAE” means EtOAc fraction,“n-BuE” means n-Butanol fraction,“RE” means Residual fraction. The same below.

定性鉴定的结果显示,灰树花的石油醚分部中含有生物碱类物质,甾类(或三萜)物质和蒽醌类物质;灰树花的氯仿分部中含有生物碱类物质,甾类物质和蒽醌类物质;灰树花的乙酸乙酯萃取物中含有生物碱类物质和甾类物质;灰树花的正丁醇萃取物中含有氨基酸、蛋白类物质和有机酸类物质,还可能含有生物碱和酚类化合物(或鞣质);灰树花剩余的

水溶性分部中含有氨基酸、蛋白类物质、糖类物质和有机酸类物质,还可能含有酚类化合物(或鞣质)。

2.2 灰树花子实体醇提物各萃取分部的抗肿瘤活性及细胞毒性检测结果

灰树花子实体醇提物各萃取分部对肿瘤细胞及正常细胞的抑制作用见表2(表中 IC₅₀ 值单位均为 μg/mL)。

表2 灰树花子实体醇提物各萃取分部抑制细胞增殖的 IC₅₀ 值

Table 2 IC₅₀ of inhibition to cells' proliferation by 5 fractions obtained from ethanol extract of *G. Frodosa* fruiting bodies

细胞 Cell	L1210	SW620	K562	WPMY-1
PEE	18.19	128.34	104.18	-
CE	0.13	85.66	133.26	-
EAE	-	-	90.26	-
n-BuE	-	518.70	109.03	-
RE	7.26	-	127.74	206.08

注:“-”表示样品对细胞的增殖无抑制活性。

Note:“-” indicates no inhibitory activity of samples on cell proliferation.

实验结果表明,灰树花子实体的石油醚萃取分部 and 氯仿萃取分部对肿瘤细胞 L1210、SW620、K562 的增殖均有较强抑制作用,但对正常细胞 WPMY-1 的增殖无抑制作用。灰树花子实体的乙酸乙酯萃取分部仅对肿瘤细胞 K562 的增殖有抑制活性,其正丁醇萃取分部对肿瘤细胞 K562、SW620 的增殖有抑制活性,但这两个分部对正常细胞 WPMY-1 的增殖无抑制作用。灰树花子实体的剩余水溶性分部对肿瘤细胞 L1210、K562 的增殖有抑制活性,对正常细胞 WPMY-1 的增殖也有抑制作用。这表明灰树花子实体的石油醚萃取分部、氯仿萃取分部、乙酸乙酯萃取分部和正丁醇萃取分部对肿瘤细胞的增殖有抑制活性,即上述分部可能具有抗肿瘤的生物学活性。而其剩余水溶性分部因其对肿瘤细胞和正常细胞的增殖均有抑制作用,可能具有细胞毒性。

2.3 灰树花子实体醇提物各萃取分部对 DPP-IV 酶的抑制作用

灰树花子实体醇提物各萃取分部对 DPP-IV 酶的抑制作用结果见图1。

从实验结果来看,灰树花子实体的各萃取物均能一定程度地抑制 DPP-IV 酶的生物活性,尤其是

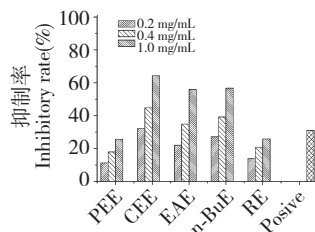


图1 灰树花子实体醇提物各萃取分部 DPP-IV 酶的抑制作用

Fig. 1 Inhibitory activity of 5 fractions obtained from ethanol extract of *G. frodosa* fruiting bodies on DPP-IV

灰树花子实体的氯仿萃取部分、乙酸乙酯萃取部分、正丁醇萃取部分,在作用浓度为 0.4 mg/mL 时,其对 DPP-IV 酶的抑制率就超过了阳性对照药(31.10%),这三个萃取物对 DPP-IV 酶活性的半数抑制率分别为 497.33、776.51、704.24 μg/mL。

3 结论

我国已成为世界上最大的食用菌生产国和出口国,经过近年来的高速发展,目前食用菌产业正面临着产能过剩,利润过低的窘境。而将食用菌产品进行深加工,进行功能性食品甚至是保健品的开发,则

是提高食用菌产品附加值的一个有效途径。食药真菌有别于其他中药资源之处在于,它既可以作为药物用于治疗 and 预防疾病,也可以作为普通食品食用,具有安全性。对食药真菌资源进行功能性食品的开发,完全符合新食品资源开发“天然、营养、保健”的原则。

本研究选取三种肿瘤细胞 L1210、SW620、K562 和一种正常细胞 WPMY-1 作为实验对象,考察了灰树花子实体的 95% 乙醇提取物各萃取分部对细胞增殖的抑制作用,探讨其抗肿瘤作用的可能性。DPP-IV 酶由于降解胰高血糖素样肽-1 从而使得人体血糖升高,因此我们研究了灰树花子实体的乙醇提取物各萃取分部对 DPP-IV 酶的抑制作用来考察其降血糖的潜力。从本研究的结果可知,灰树花子实体的乙醇提取物的石油醚和氯仿萃取分部中含有生物碱、甾类(或三萜)和蒽醌类物质,这些物质具有体外抑制肿瘤细胞增殖的生物活性,尤其是氯仿萃取分部,还具有较好的抑制 DPP-IV 酶的活性。灰树花子实体乙醇提取物的乙酸乙酯萃取分部和正丁醇萃取分部中含有氨基酸、蛋白类物质、糖类和有机酸类物质,这些萃取物对个别肿瘤细胞也具有抑制其增殖的活性,也能够抑制 DPP-IV 酶的活性。这些研究为我们开发灰树花中次生代谢产物作为功能性食品提供了理论依据。我们也将继续对灰树花子实体的乙醇提取物中的活性分部作进一步的深入研究。

参考文献

- Liu ZW(刘振伟),Shi XJ(史秀娟). Research and development of *Grifola frondosa* (maitake). *Edi Fun* (食用菌), 2001,4:5-6.
- Chao YJ(晁岳江). The artificial efficient cultivation techniques of *Grifola frondosa* (maitake). *Agric Knowledge* (农业知识),2013,2:20-21.
- Chen Q(陈强),Huang CY(黄晨阳). Situation of mushroom industry in Japan. *Edi Fun China* (中国食用菌),2013,32:67-69.
- Sheng CG(盛春鸽),Pan CL(潘春磊),Zhang HF(张后凤),*et al.* The development situation of edible mushroom industry in South Korea. *Edi Fun China* (中国食用菌), 2014,4:61-64.
- Nanba H,Hamaguchi A,Kuroda H. The chemical structure of an antitumor polysaccharide in fruit bodies of *Grifola frondosa* (maitake). *Chem Pharm Bull* (Tokyo), 1987,3:1162-1168.
- Nanba H,Kubo K. Antitumor substance extracted from *Grifola*. US:US5854404,1998-12-29.
- Kubo K,Aoki H,Nanba H. Anti-diabetic activity presentation the fruit body of *Grifola frondosa* (Maitake). *Biol Pharm Bull*,1994,8:1106-1110.
- Tada R,Adachi Y,Ishibashi KI,*et al.* An unambiguous structural elucidation of a 1,3- β -D-glucan obtained from liquid-cultured *Grifola frondosa* by solution NMR experiments. *Carbohydr Res*,2009,3:400-404.
- Okazaki M,Adachi Y,Ohno N,*et al.* Structure-activity relationship of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans in the induction of cytokine production from macrophages *in vitro*. *Biol Pharm Bull*, 1995,10:1320-1327.
- Zhang YJ,Mills GL,Nair MG. Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant compounds from the mycelia of the edible mushroom *Grifola frondosa*. *J Agric Food Chem*,2002,26:7581-7585.
- Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences(中国科学研上海药物研究所). Chinese Herbal Medicine Effective Components Extraction and Separation, Second Edition(中草药有效成分提取与分离,第二版). Shanghai Science and Technology Press,1983.9-19.
- Kato T,Nagatsu T,Kimura T,*et al.* Fluorescence assay of X-prolyl dipeptidyl-aminopeptidase activity with a new fluorogenic substrate. *Ori Res Art Biochem Med*,1978,3:351-359.