

灵芝复合剂乙酸乙酯提取物的化学组成及其抗肿瘤活性

林晓亮¹, 李嘉辉², 龙洁怡¹, 梁明¹, 林洪宇², 张慧婷², 安泗谕², 刘果², 曹庸^{2*}

(1. 无限极(中国)有限公司, 广东广州 510403)(2. 华南农业大学食品学院, 广东省功能食品活性物重点实验室, 广东省天然活性物工程技术研究中心, 广东广州 510642)

摘要: 该文研究了灵芝复合剂乙酸乙酯提取物 (*Ganoderma lucidum* Complex Ethyl Acetate Extract, GCE) 的化学组成及抗肿瘤活性。GCE 由灵芝、菟丝子、五味子、党参 (质量比 50.3:25.2:15.7:8.8) 组成复合剂后再经乙酸乙酯萃取所得。试验采用超高压液相色谱飞行时间质谱联用仪 (UPLC-Q-TOF-MS) 分析其物质组成; 设空白组、模型组、阳性对照组、GCE 低、中、高剂量组。检测其抑瘤率, 脏器指数, 脾淋巴细胞增殖能力, 血清细胞因子。结果表明: GCE 主要由 11 种化合物组成: L- 焦谷氨酸、DL- 亮氨酸腺苷、D- 赤酮酸内酯、L- 正亮氨酸、邻苯三酚、2- 羟基-3- 甲基吡喃-4- 酮、绿原酸、3- (3,4,5- 三甲氧基苯基) 丙酸、槲皮素、五味子素; GCE 低、中、高剂量组 (50、100、200 mg/kg) H22 荷瘤小鼠的抑瘤率分别为 35.14%、38.25%、50.87%; 与模型组相比, GCE 低、中、高剂量均能显著促进小鼠脾淋巴细胞的增殖 ($P < 0.01$); GCE 高剂量能显著促进小鼠的 IL-6、TNF- α 和 IL-12 分泌 ($P < 0.05$)。结论, GCE 对 H22 荷瘤小鼠肿瘤有一定抑制作用, 该研究结果可为抗肿瘤功能的产品研发提供新思路。

关键词: 灵芝复合剂乙酸乙酯提取物; 化学组成; 小鼠模型; 抗肿瘤

文章编号: 1673-9078(2024)05-15-23

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.5.0468

Chemical Composition and Antitumor Activity of Ethyl Acetate Extracts from *Ganoderma lucidum* Compounds

LIN Xiaoliang¹, LI Jiahui², LONG Jieyi¹, LIANG Ming¹, LIN Hongyu², ZHANG Huiting², AN Siyu², LIU Guo², CAO Yong^{2*}

(1. Infinitus China Co. Ltd., Guangzhou 510403, China)(2. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Nutraceuticals and Functional Foods, Guangdong Natural Active Object Engineering Technology Research Center, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The chemical composition and antitumor activity of ethyl acetate extracts from *Ganoderma lucidum* compounds (GCE) were investigated. GCE was extracted using ethyl acetate from compounds of *Ganoderma lucidum*, *Cuscuta chinensis* Lam, *Schisandra chinensis*, and *Codonopsis pilosula* (at a mass ratio of 50.3:25.2:15.7:8.8). Ultra-

引文格式:

林晓亮, 李嘉辉, 龙洁怡, 等. 灵芝复合剂乙酸乙酯提取物的化学组成及其抗肿瘤活性[J]. 现代食品科技, 2024, 40(5): 15-23.

LIN Xiaoliang, LI Jiahui, LONG Jieyi, et al. Chemical composition and antitumor activity of ethyl acetate extracts from *Ganoderma lucidum* compounds [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(5): 15-23.

收稿日期: 2023-04-18

基金项目: 广东省自然科学基金-面上项目 (2020A1515010371)

作者简介: 林晓亮 (1983-), 男, 硕士, 工程师, 研究方向: 中药及保健品开发, E-mail: Ivan.Lin@infinitus-int.com; 共同第一作者: 李嘉辉 (1999-), 男, 硕士, 研究方向: 天然活性物分离纯化, 活性评价及作用机制, E-mail: 1264160149@qq.com

通讯作者: 曹庸 (1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然活性物的分离纯化鉴定及活性, E-mail: caoyong2181@scau.cn

high pressure liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS) was used to analyze its composition. Blank, model, positive control, and GCE-treated groups (low, medium, and high dosages) were established. The tumor inhibition rate, organ index, splenic lymphocyte proliferation capacity, and serum cytokine levels were measured. The results showed that GCE is mainly composed of 11 compounds: L-pyroglutamic acid, DL-leucine adenosine, D-erythroneolactone, L-norleucine, pyrogallol, 2-hydroxy-3-methylpyran-4-one, chlorogenic acid, 3-(3,4,5-trimethoxyphenyl) propionic acid, quercetin, and schisandrin. The tumor inhibition rates of H22 tumor-bearing mice in low-, medium-, and high-dose GCE-treated groups (at 50, 100 and 200 mg/kg) H22 were 35.14%, 38.25%, and 50.87%, respectively. Comparison of the model and treated groups revealed that low-, medium-, and high-dose GCE significantly promoted the proliferation of splenic lymphocytes ($P < 0.01$). A high dose of GCE could significantly promote the secretion of IL-6, TNF- α , and IL-12 in mice ($P < 0.05$). In short, GCE has certain inhibitory effects on the tumor of H22 tumor-bearing mice. The results of this study can provide insights into the development of antitumor products.

Key words: ethyl acetate extracts from *Ganoderma lucidum* compounds; chemical composition; mouse model; antitumor

灵芝是灵芝科、灵芝属真菌，具有增强免疫力、抗肿瘤、护肝、抗氧化等多种生物活性^[1]。多糖、三萜类化合物是灵芝的主要活性成分，国内外学者对灵芝活性研究已深入到分子水平^[2-4]。菟丝子的活性成分主要是黄酮、酚酸、多糖类物质，具有免疫调节、抗衰老、改善内分泌及雌激素样等作用^[5,6]，目前菟丝子的抗肿瘤活性鲜有报道。五味子具有改善心血管、加强免疫力、抗菌抑菌等方面的活性作用，主要活性成分为木脂素、多糖类物质^[7]。党参的活性研究多报道于多糖类物质，陈嘉屿等^[8]研究表明党参多糖对小鼠移植性肿瘤 S180 的生长具有显著的抑制作用。大量研究表明，香菇多糖 (Lentinan, LEN) 对鼠肝癌细胞 H22、鼠肉瘤细胞 S180、人乳腺癌细胞 MCF-7 等癌细胞的生长具有显著的抑制作用^[9-12]。

研究表明，多种植物乙酸乙酯提取物有较好的抗肿瘤活性。张春梅^[13]的体外细胞活性研究表明，木贼干燥地上部分的乙酸乙酯萃取部分对人宫颈癌细胞 (Hela) 与人肝癌细胞 (Hep G2) 显示了较强抗肿瘤活性。崔玮等^[14]用甘青虎耳草乙酸乙酯提取物研究体内抗癌试验，结果表明提取物对小鼠 H22 肝癌原位移植瘤具有显著的抑制作用。现代药理研究表明，单一品种的天然产物可能对某一生理效应有明显作用，而多种天然产物的复合物在发挥活性作用时可能呈现协同性。张志超等^[15]测定了食用菌复合多糖和单一多糖清除 DPPH 自由基及还原能力，结果显示，复合多糖 (猴头菇多糖:平菇多糖:香菇多糖:杏鲍菇多糖=4:3:2:1) 抗氧化能力大于其他复合多糖组和猴头菇单一多糖组。复合型天然产物的抗肿瘤活性研究是目前的研究热点，彭樱^[16]研究

发现参苓白术散能有效调节肿瘤凋亡的促进或抑制因子的表达，进而减缓 H22 肝癌移植瘤化疗模型小鼠肿瘤的生长。不同品种不同剂量天然产物配伍呈现的药理活性会有所差异，发挥活性作用的有效成分和协同增效机制还有待进一步明确。同时，国内外学者对灵芝、菟丝子、五味子、党参的多糖研究较多，但对乙酸乙酯提取物的研究未见报道，因此 GCE 的物质组成和抗肿瘤活性研究具有重要意义。

本试验通过超高压液相色谱飞行时间质谱联用仪 (UPLC-Q-TOF-MS) 技术对 GCE 的化学组成进行定性分析，建立 H22 荷瘤小鼠模型，研究 GCE 对 H22 荷瘤小鼠抑瘤率、免疫器官指数、脾淋巴细胞增殖能力、免疫细胞因子表达的影响。为 GCE 有效成分、功能活性的药食同源开发利用提供理论基础和科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料与仪器

乙腈 (质谱级)、甲酸 (质谱级)，赛默飞世尔；肿瘤坏死因子 - α (TNF- α) 试剂盒、白介素 -6 (IL-6) 试剂盒、白介素 -12 (IL-12) 试剂盒，深圳欣博盛生物科技公司。

灵芝、菟丝子、五味子、党参、香菇多糖，无限极 (中国) 有限公司。SPF 级 Balb/C 雄性小鼠 (6~8 周龄)，体质量 18~22 g，浙江维通利华实验动物技术有限公司 (生产许可证号: SCXK(浙)2019-0001)。试验小鼠饲养于华南农业大学动物中心 (实验动物使用许可证: SYXK(粤)2019-0136)，试验方案均通过华南农业大学动物伦理委员会批准 (审批编号:

2021B074)。小鼠 H22 肝癌细胞, 武汉大学中国典型培养物保藏中心。

UPLC-Q-TOF-MS, 安捷伦科技(中国)有限公司; Enspire2003 多功能酶标仪, 珀金埃尔默仪器有限公司; FD-1PF 真空冷冻干燥机, 美国赛默飞科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 灵芝复合剂乙酸乙酯提取

灵芝复合剂由灵芝、菟丝子、五味子、党参按质量比 50.3:25.2:15.7:8.8 组成, 称取灵芝复合剂加入乙酸乙酯超声萃取 1 h, 多次萃取后混合萃取液, 减压旋蒸挥干上清液, 冻干后得到的 GCE 于 4 °C 冰箱保存。

1.2.2 GCE 化学组成分析

采用 UPLC-Q-TOF-MS 鉴定 GCE 化学组成^[17]。取 10 mg GCE 样品溶于 1 mL 80% (体积分数) 甲醇溶液, 14 000 r/min 下离心 15 min, 上清液过 0.22 μm 滤膜后进行质谱检测和分析。

利用 Compound Discoverer 软件对 GCE 定性数据进行数据库信息搜索和物质匹配, 并通过 mzCloud 在线数据库进行确认。

色谱条件: 色谱柱为 Shim-packScepterC18-120 (150 mm×2.1 mm, 1.9 μm, 日本岛津公司)。流动相 A 为 0.1% (体积分数, 下同) 甲酸水溶液; 流动相 B 为 0.1% 甲酸乙腈溶液。流动相洗脱梯度: 0~2 min, 保持 5% 浓度 B 流动相; 2~30 min 内升至 95% 浓度 B 流动相; 30~35 min, 保持 95% B 流动相; 35~40 min, 5% B 流动相平衡 5 min。流动相流速 0.4 mL/min, 色谱柱温度 35 °C, 自动进样器温度 4 °C, 进样 5 μL。

质谱条件: 电喷雾离子源, 正离子模式质谱扫描范围 m/z 70~1 050, 鞘气流速 35 arb, 喷针电压 4.5 kV, 毛细管电压 49 V, 毛细管温度 350 °C。

1.2.3 动物试验

1.2.3.1 动物试验分组及灌胃剂量

H22 荷瘤小鼠模型及灌胃剂量参照已报道方法^[18]。试验小鼠在适应实验室环境一周后, 按体重随机分配, 每组 8 只, 每只小鼠在右后肢皮下窝进行皮下注射接种 0.2 mL 肿瘤细胞悬液, 每只接种约 2×10^6 个肿瘤细胞, 接种 7~14 d 左右后肢皮下有米粒状突起。当 $ab^2/2$ 大于 50 mm³ (a : 肿瘤长径; b : 肿瘤短径), 即小鼠建模成功。阳性对照组采用香

菇多糖, 低、中、高各剂量样品组灌胃均使用蒸馏水配制成适当浓度。空白组和模型组小鼠均灌胃等体积的蒸馏水。动物试验连续 10 d 对试验建模成功小鼠进行灌胃, 每天一次 (早上 8:00)。小鼠分组和灌胃量具体见表 1。

表 1 动物实验组别和灌胃剂量

Table 1 Animal experiment group and gavage dose

组别	灌胃剂量
空白组 (Normal)	蒸馏水
模型组 (Model)	蒸馏水
阳性对照组 (LEN)	100 mg/(kg·d)
灵芝复合剂乙酸乙酯提取物低剂量 (GCEL)	50 mg/(kg·d)
灵芝复合剂乙酸乙酯提取物中剂量 (GCEM)	100 mg/(kg·d)
灵芝复合剂乙酸乙酯提取物高剂量 (GCEH)	200 mg/(kg·d)

1.2.3.2 体重测定

小鼠建模成功后, 依次记录各组别小鼠灌胃的第 1、3、5、7、9、10 天的体质量。

1.2.3.3 小鼠抑瘤率测定

末次灌胃 24 h 后 (第 11 天), 小鼠称重后 CO₂ 麻醉处死, 剥离肿瘤组织, 按 (1) 公式计算抑瘤率。

$$A = \frac{B-C}{B} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

A —抑瘤率;

B —模型组肿瘤质量, g;

C —干预组肿瘤质量, g。

1.2.3.4 小鼠脏器指数测定

末次灌胃 24 h 后 (第 11 天), 取小鼠胸腺、脾脏, 分别称量湿重并记录。按 (2)、(3) 公式分别计算胸腺指数和脾脏指数。

$$T_a = \frac{M_{\text{胸}}}{M_{\text{鼠}}} \times 100\% \quad (2)$$

$$T_b = \frac{M_{\text{脾}}}{M_{\text{鼠}}} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

T_a —胸腺指数, %;

T_b —脾脏指数, %;

$M_{\text{胸}}$ —胸腺质量, g;

$M_{\text{脾}}$ —脾脏质量, g;

$M_{\text{鼠}}$ —小鼠质量, g。

1.2.3.5 肿瘤组织和肝脏组织病理学观察

将肿瘤组织和肝脏组织剥离后固定于多聚甲醛溶液, 包埋、切片、脱蜡后 HE 染色, 完成镜检。

1.2.3.6 H22荷瘤小鼠脾淋巴细胞增殖能力测定

参照《允许保健食品声称的保健功能目录 非营养素补充剂（2020年版）（征求意见稿）》^[19]中脾淋巴细胞增殖 MTT 法测定的方法。无菌条件下收集各组 H22 荷瘤小鼠脾淋巴细胞配制脾淋巴细胞悬液，进行细胞计数，调整细胞密度为每毫升 2×10^6 个。使用 24 孔细胞培养板，细胞培养箱培养后加入 MTT 液，用酶标仪测定波长在 570 nm 条件下吸光度，得到小鼠脾淋巴细胞增殖能力结果。

1.2.3.7 细胞因子含量检测

按照试剂盒说明书步骤，采用酶联免疫吸附试验检测小鼠血清上清中肿瘤坏死因子（TNF）- α ，白介素（IL）-6、白介素（IL）-12 的质量浓度。

1.3 数据处理与分析

SPSS 22.0 软件被用来分析多组数据间在统计学上的数据统计和显著性，采用单因素方差分析，数据以“平均值 \pm 标准差”表示，以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义，并以 Origin 2022 制作图表。与 Model 组比较 * $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与 Normol 组比较 # $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ ，并以 Origin 2022 制作图表。

2 结果与讨论

2.1 GCE液质联用分析结果

采用本研究所建立的色谱条件对 GCE 溶液进行分析，GCE 正离子模式下的 UPLC-Q-TOF-MS 总离子流见图 1。通过数据库匹配到的物质数量为 12 697 个，进一步对 GCE 定性数据进行数据库信息搜索和物质匹配，最终得到 11 种主要的小分子化合物：L- 焦谷氨酸、DL- 亮氨酸腺苷、D- 赤酮酸内酯、L- 正亮氨酸、邻苯三酚、2- 羟基 -3- 甲基吡喃 -4- 酮、绿原酸、3-（3,4,5- 三甲氧基苯基）丙酸、槲皮素、五味子素。具体结果见表 2。

五味子素（Schisandrin）是五味子的主要成分之一，有研究报道五味子素具有抗氧化、抗炎、保护肝脏细胞等多种药理活性^[20]；五味子素可通过调节 JAK/STAT 和凋亡途径预防癌症，也可在荷瘤小鼠中抑制癌细胞的迁移^[21]。L- 正亮氨酸及其衍生物与 hnRNP2/B1 蛋白相互作用，抑制 E- 钙粘蛋白两种抑制剂 Twist1 和 Snail 的表达，促进 E- 钙粘蛋白的表达，从而抑制胃癌和乳腺癌细胞的转移^[22]。有研究报道槲皮素具有抗氧化、抗肿瘤、抗炎症、抗

菌和预防心脑血管疾病等作用^[23]，槲皮素和绿原酸是菟丝子的活性功效成分^[24]，槲皮素可通过调节多种细胞信号传导通路，如 NF κ B 途径、MAPK 途径、PI3K-AKT 途径和 mTOR 抑制致癌物质活化酶的活性^[25,26]。结合以往文献报道，灵芝、五味子、菟丝子、党参水提物或醇提物的抗肿瘤活性有较多研究，其抗肿瘤作用的活性成分主要为多糖类等大分子物质，而灵芝、五味子、菟丝子、党参乙酸乙酯提取物的抗肿瘤活性还未见报道，五味子素、L- 正亮氨酸、槲皮素、绿原酸等具有抗肿瘤活性的小分子物质在本试验中可能发挥主要抗肿瘤作用。

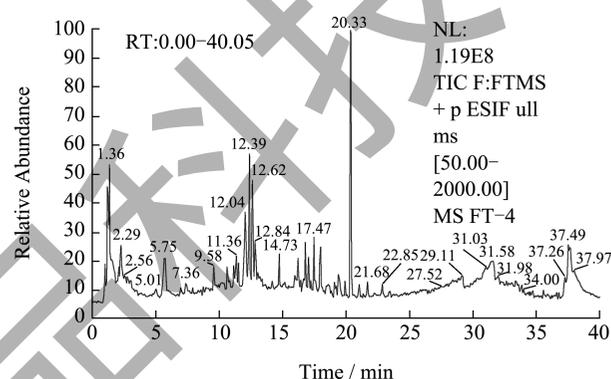


图 1 GCE 正离子模式下的总离子流图

Fig.1 Total ion flow diagram in the positive ion mode of ethyl acetate extract

2.2 GCE对H22荷瘤小鼠肿瘤生长的影响

2.2.1 试验小鼠体质量变化

试验期间，小鼠饮食、排泄等生理活动未见异常情况，各组分小鼠 1~10 d 体质量变化如图 2 所示。干预期间各组小鼠体质量均无显著性差异变化（ $P > 0.05$ ），说明 GCE 可在不影响小鼠体质量的前提下抑制肿瘤的生长。

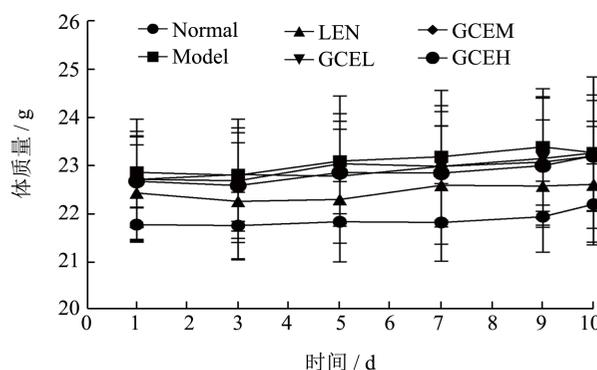


图 2 小鼠体质量趋势图

Fig.2 Mouse body weight trend chart of mice

表 2 GCE化学成分的高分辨液质分析结果

Table 2 Results of high resolution liquid quality analysis of the chemical composition of ethyl acetate extract of *Ganoderma lucidum* compound

No.	Name	Formula	Calc Mw	m/z	RT/min	Area(Max)
1	L- 焦谷氨酸	C ₅ H ₇ NO ₃	129.042 47	130.049 74	1.586	138 512 630.5
2	DL- 亮氨酸	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.094 58	132.101 85	2.383	69 175 029.39
3	腺苷	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	267.096 73	268.104	2.456	102 682 038.3
4	D- 赤酮酸内酯	C ₄ H ₆ O ₄	118.027 89	136.061 74	2.46	57 043 385.84
5	L- 正亮氨酸	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.094 56	132.101 84	2.62	107 308 890.5
6	邻苯三酚	C ₆ H ₆ O ₃	126.031 47	127.038 76	5.493	381 626 636.2
7	2-羟基-3-甲基吡喃-4-酮	C ₆ H ₆ O ₃	126.031 49	127.038 76	7.334	146 839 951.1
8	绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.094 62	355.101 9	9.762	53 445 846.96
9	3-(3,4,5-三甲氧基苯基)丙酸	C ₁₂ H ₁₆ O ₅	240.089 71	241.096 98	11.666	133 213 606.4
10	槲皮素	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.042 19	303.049 47	12.279	74 612 718.31
11	五味子素	C ₂₄ H ₃₂ O ₇	432.214 33	415.211	20.476	379 569 618.7

2.2.2 抑瘤率

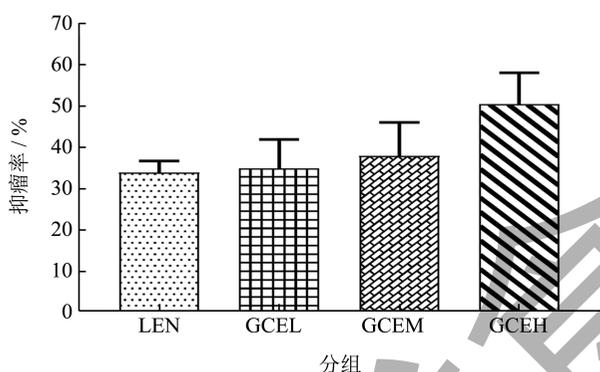


图 3 小鼠抑瘤率

Fig.3 The tumor suppressor rate

图 3 是不同剂量 GCE 对 H22 荷瘤小鼠抑瘤率的影响结果, LEN、GCE 低、中、高剂量处理小鼠抑瘤率分别为 34.11%、35.14%、38.25%、50.87%, 同等剂量 (100 mg/kg) 干预下 GCE 处理小鼠抑瘤率较阳性对照组高, 抑瘤率随 GCE 剂量增加而增大, 呈剂量效应。张琪琳等^[18]在 100 mg/kg 剂量的香菇多糖干预下, H22 荷瘤小鼠抑瘤率为 39.85%, 本试验的香菇多糖干预组小鼠抑瘤率与张的研究无较大差异。在以往报道中, 灵芝提取物具有较好的抗肿瘤活性, 南婷婷^[27]研究发现, 灵芝中性三萜低、中、高剂量 (125、250、500 mg/kg) 处理 H22 荷瘤小鼠抑瘤率分别为 22.50%、35.25%、55.73%。张莘莘^[28]研究发现, 低、中、高剂量黑灵芝多糖 (50、100、200 mg/kg) 对 S180 荷瘤小鼠抑瘤率分别为 26.56%、37.68%、48.06%, 根据中草药抗肿瘤有效

性的标准 (抑瘤率 > 30%)^[29], 再对比以往灵芝提取物抗肿瘤活性研究, 表明低、中、高剂量 GCE 均具有较好的抑制肿瘤生长的作用, 抑瘤率最高的小鼠组别为 GCE 高剂量干预组, 现代药理研究表明, 天然产物的抗肿瘤活性往往与多种成分相关, 再结合抗肿瘤作用机制多靶点多通路的特点, 故推测 GCE 在发挥抗肿瘤作用时呈现协同作用。

2.2.3 胸腺指数与脾脏指数

脏器指数能够直接反映试验动物的机体健康情况, 胸腺和脾脏的萎缩变化表明免疫系统和脏器功能衰退。对不同试验分组动物的胸腺指数和脾脏指数的测定研究, 结果如图 4 所示。与空白对照组相比, 模型组胸腺指数、脾脏指数均极显著降低 ($P < 0.01$), 表明小鼠接种 H22 肿瘤细胞后, 胸腺、脾脏显著萎缩, 机体免疫功能紊乱。与模型对照组相比, GCE 低、中、高剂量组胸腺指数、脾脏指数均有不同程度地提高, 说明 GCE 对 H22 荷瘤小鼠脾脏、胸腺器官具有一定的保护作用。

经 GCE 高剂量干预后, 胸腺指数较模型组极显著性提高 ($P < 0.01$), 胸腺指数的恢复可促进小鼠 T 淋巴细胞的发育、分化进而提升机体的抗肿瘤能力。GCE 低、中、高剂量组较模型组脾脏指数极显著性提高 ($P < 0.01$), 且显著性高于正常组小鼠 ($P < 0.05$)。以往研究报道, 200 mg/kg 黑灵芝多糖对 S180 荷瘤小鼠胸腺和脾脏的损伤不但有显著的恢复作用, 而且还可促进胸腺和脾脏的发育, 使胸腺和脾脏指数显著超过正常组小鼠水平^[28]。相较

正常组小鼠，白术多糖在 200 mg/kg 浓度干预下可显著促进脾脏发育、改善免疫器官的结构与功能，提高机体的免疫应答能力^[30]。表明 H22 荷瘤小鼠经 GCE 干预后，不但使脾脏指数恢复到正常组小鼠水平，而且还可促进脾脏生长发育，使其结构功能更完善。因此 GCE 可通过降低癌细胞对胸腺、脾脏脏器的影响，促进脾脏、胸腺脏器指数恢复进而发挥抗肿瘤作用。其中脏器指数恢复效果最好的是 GCE 高剂量组小鼠。

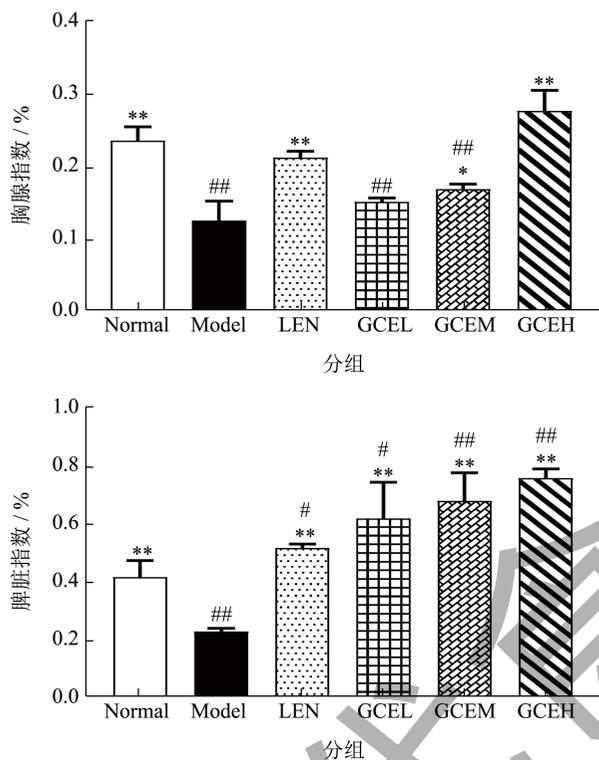


图 4 小鼠胸腺指数和脾脏指数

Fig.4 Thymus index and spleen index

注：与 Model 组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ；与 Normol 组比较 # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ ，下同。

2.2.4 肿瘤组织和肝脏HE染色结果

H22 荷瘤小鼠各组肿瘤组织切片结果如图 5 所示，模型组肿瘤组织中的 H22 肝癌细胞排列密集，生长旺盛，细胞核大且清晰。而各干预组肿瘤组织的细胞生长受到明显抑制，异核明显，排列疏松无规则，有大面积坏死区域，细胞数量较模型组明显减少，肿瘤 HE 染色图直观的反映了 H22 荷瘤小鼠各组别的抗肿瘤效果，其中抑瘤效果最好的是 GCE 高剂量组。五味子提取物干预高剂量组 (40 mg/kg) H22 荷瘤小鼠肿瘤组织 HE 染色结果显示，大部分细胞膜损坏或融合，形态不完整，表明五味子提取物对肿瘤细胞可能伴有杀伤作用^[31]，这与 GCE 干

预荷瘤小鼠 HE 染色结果相似。

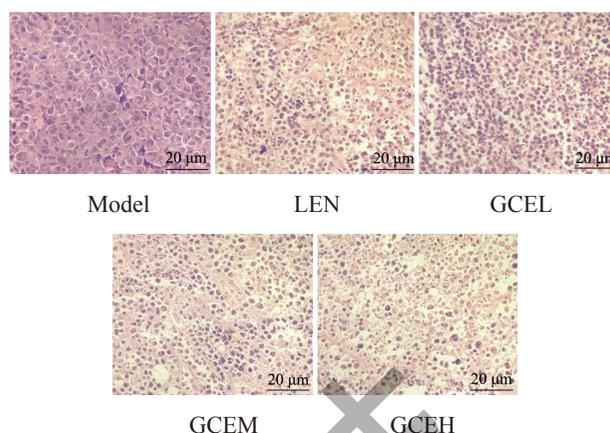


图 5 各组别 H22 荷瘤小鼠肿瘤组织病理形态图
Fig.5 Histopathological morphology pattern of H22 tumor-bearing mice in each group (HE staining, ×40)

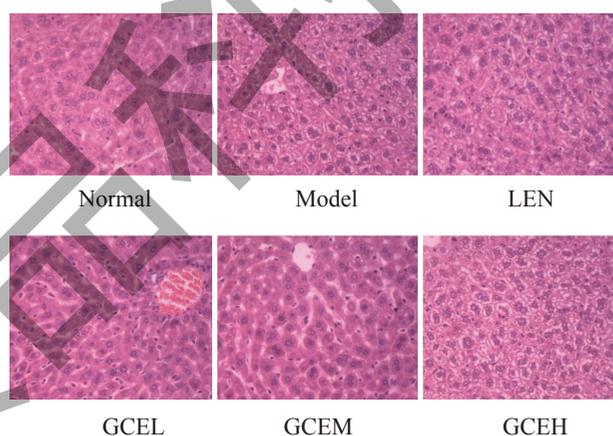


图 6 小鼠肝组织学改变

Fig.6 Histological changes of mouse liver (HE staining, ×40)

各试验组小鼠肝脏切片结果如图 6 所示，空白对照组、模型组、阳性对照组、GCE 干预组小鼠肝组织结构状态正常，细胞核、细胞边界清晰排列有序，未见组织破坏、细胞坏死，炎症细胞因子浸润等病理学改变，肝脏 HE 染色结果表明 H22 肝癌细胞的生长增殖和 GCE 干预并未对小鼠肝脏产生显著影响。

2.2.5 H22荷瘤小鼠脾淋巴细胞增殖能力测定

当 T 淋巴细胞受 ConA 刺激后发生母细胞增殖反应，增殖细胞中的线粒体水解酶可将 MTT 分解为兰紫色结晶，其光密度值能反映细胞的增殖情况^[32]。GCE 对脾淋巴细胞增殖的影响结果如图 7 所示。与空白组相比，模型对照组极显著抑制小鼠脾淋巴细胞的增殖 ($P < 0.01$)，表明小鼠接种 H22 肝癌后，癌细胞会显著影响脾淋巴细胞增殖从而破坏小鼠免疫功能。而经 GCE 干预后，GCE 低、中、

高剂量组相较于模型组均能极显著促进小鼠脾淋巴细胞的增殖 ($P < 0.01$), 并显著高于正常组小鼠脾淋巴细胞增殖 OD 值 ($P < 0.05$), 淋巴细胞增殖趋势随 GCE 浓度的升高而升高, 两者之间呈良好的量效关系。研究表明, 黑灵芝多糖低、中、高剂量 (50、100、200 mg/kg) 均能显著促进 S180 荷瘤小鼠脾淋巴细胞的增殖 ($P < 0.05$), 进而发挥抗肿瘤作用^[28]。三种不同五味子炮制品低、中、高浓度 (50、100、200 mg/L) 均能促进小鼠脾淋巴细胞增殖, 使脾淋巴细胞增殖 OD 值高于正常组小鼠水平^[33]。说明 GCE 能有效恢复并促进脾淋巴细胞增殖进而提高 H22 荷瘤小鼠抗肿瘤能力, 其中脾淋巴细胞增殖能力最强的是 GCE 高剂量组。

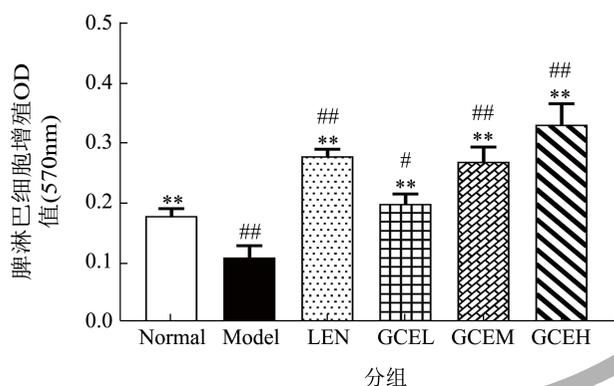


图7 脾淋巴细胞增殖 OD 值

Fig.7 Splenic lymphocytes OD value

2.2.6 细胞因子含量检测

IL-6 可促进 T 细胞生长、T 辅助细胞分化, 以及由 T 细胞介导的细胞毒性的发展^[34]。TNF- α 是直接参与巨噬细胞肿瘤细胞杀伤的最重要介质, 可诱导程序性细胞死亡, 同时使正常细胞不受损伤^[35]。IL-12 又名自然杀伤细胞刺激因子, 主要由巨噬细胞、B 细胞产生, 能促进 T 细胞和 NK 细胞的分化和增殖, IL-12 细胞因子被认为是最有效的抗肿瘤细胞因子之一, 在抗肿瘤方面发挥着重要作用^[36]。

各组别小鼠血清细胞因子浓度结果如图 8 所示, 模型对照组小鼠血清中 TNF- α 和 IL-6 水平相较于空白对照组均极显著降低 ($P < 0.01$)。相较于模型组, GCE 中、高剂量组血清中 TNF- α 水平极显著升高 ($P < 0.01$), TNF- α 分泌增加可导致肿瘤细胞相关蛋白失活, 从而抑制肿瘤细胞的生长和促进肿瘤细胞凋亡^[37]。经 GCE 干预后, GCE 低、中、高剂量组相较于模型组 IL-6 水平显著升高 ($P < 0.05$), 其中、高剂量组 IL-6 水平极显著升高 ($P < 0.01$)。研究发现, TNF- α 的分泌可有效促进相关免疫细胞

分泌 IL-6, 进而协同促进细胞凋亡, 可以减轻炎症, 提高 H22 荷瘤小鼠的抗肿瘤能力^[38]。相较于空白组, 模型组 IL-12 水平显著降低 ($P < 0.05$)。经 GCE 干预后荷瘤小鼠 IL-12 水平有一定提高, 呈剂量效应, GCE 高剂量组 IL-12 水平相较模型组有显著提升 ($P < 0.05$)。党参多糖干预可显著促进 S180 荷瘤小鼠外周血中 IL-6 和 TNF- α 分泌, 刺激免疫细胞增殖分化, 增加抗肿瘤作用^[39]。参芪五味子颗粒可调节 H22 肝癌荷瘤小鼠血清 TNF- α 含量并发挥抗肿瘤作用^[40]。结合以往研究, GCE 可能通过促进免疫细胞分泌细胞因子直接或间接发挥抗肿瘤作用。其中三种细胞因子提升最显著的是 GCE 高剂量组小鼠。

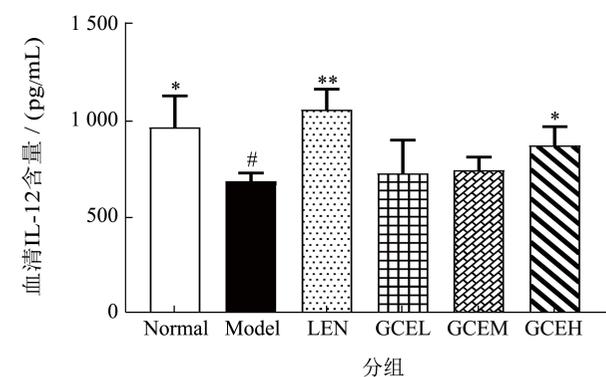
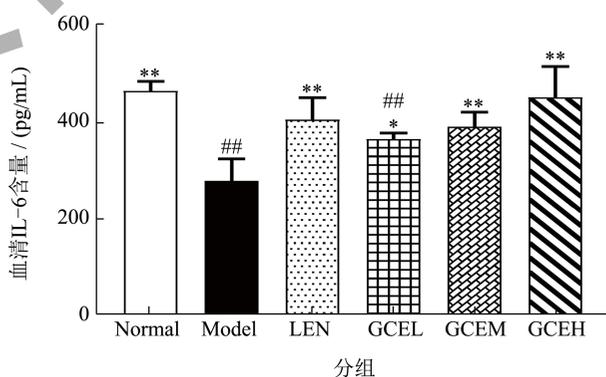
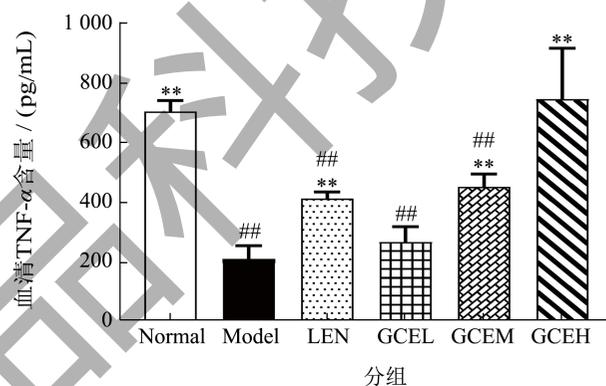


图8 小鼠血清肿瘤坏死因子、白细胞介素 6 和白细胞介素 12

Fig.8 Mouse serum TNF- α , IL-6 and IL-12

3 结论

本试验采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术对 GCE 进行物质组成鉴定, 得到 11 种主要的小分子化合物: L- 焦谷氨酸、DL- 亮氨酸腺苷、D- 赤酮酸内酯、L- 正亮氨酸、邻苯三酚、2- 羟基-3- 甲基吡喃-4- 酮、绿原酸、3- (3,4,5- 三甲氧基苯基) 丙酸、槲皮素、五味子素。根据已报道文献, 五味子素、L- 正亮氨酸、槲皮素、绿原酸是植物重要的抗肿瘤活性成分, 可能对 GCE 抗肿瘤作用有积极贡献, 而其他小分子化合物是否具有抗肿瘤活性有待进一步研究; 小鼠体内试验表明, GCE 低、中、高剂量组 (50、100、200 mg/kg) H22 荷瘤小鼠抑瘤率分别为 35.14%、38.25%、50.87%, 同等剂量处理下 (100 mg/kg) GCE 组小鼠抑瘤率为 38.25%, 高于阳性对照香菇多糖组小鼠的 34.11%, 根据中草药抗肿瘤有效性的标准 (抑瘤率 > 30%), 表明 GCE 具有较好的抗肿瘤作用; 胸腺和脾脏是生物体内重要的免疫器官, GCE 高剂量组可极显著提升 H22 荷瘤小鼠的胸腺指数和脾脏指数 ($P < 0.01$), 表明 GCE 可促进 H22 肝癌细胞干扰下的免疫器官恢复, 该结果与以往报道的灵芝提取物抗肿瘤试验一致; 脾淋巴细胞是参与机体体液免疫的重要细胞, IL-6、TNF- α 和 IL-12 是参与体液免疫和抗肿瘤作用的细胞因子, GCE 各剂量组能极显著促进小鼠脾淋巴细胞的增殖 ($P < 0.01$), GCE 各剂量组可有效促进 H22 荷瘤小鼠的免疫细胞分泌 IL-6、TNF- α 和 IL-12, 表明 GCE 可能通过促进小鼠脾淋巴细胞增殖和调节 IL-6、TNF- α 、IL-12 分泌直接或间接抑制 H22 肝癌细胞的生长。低、中、高三个剂量相比, GCE 高剂量组具有更强的抗肿瘤活性。

天然产物复配物的活性研究已成为目前的研究热点, 在实际生产应用中, 多种天然产物的复配可发挥更全面的生物活性, 降低生产成本, 备受市场青睐, 本试验研究结果可为灵芝、五味子、菟丝子、党参的抗肿瘤作用提供科学依据, 但植物提取物成分复杂, 抗肿瘤作用通路和靶点众多, 关键活性成分和抗肿瘤作用机制还有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] 张淑香, 王萌影, 刘学伟, 等. 复方灵芝降糖胶囊大鼠给药长期毒性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(17): 146-151.
- [2] 陈文华, 程显好, 谭会颖, 等. 灵芝多糖的药理作用及其机制研究进展[J]. 中国药房, 2018, 29(24): 3446-3450.
- [3] WANG T, XIE Z, HUANG Z, et al. Total triterpenoids from *Ganoderma lucidum* suppresses prostate cancer cell growth by inducing growth arrest and apoptosis [J]. Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences], 2015, 35: 736-741.
- [4] SHAO Y, QIAO L, WU L, et al. Structure identification and anti-cancer pharmacological prediction of triterpenes from *Ganoderma lucidum* [J]. Molecules, 2016, 21(5): 678.
- [5] 汪小莉, 张雨婷, 张影, 等. 菟丝子本草考证[J]. 中药材, 2022, 45(2): 476-484.
- [6] 张馨元, 孙向明, 宋辉, 等. 菟丝子总黄酮的提取方法筛选及其雌激素活性研究[J]. 中国药理学杂志, 2021, 56(1): 23-28.
- [7] 邢楠楠, 屈怀东, 任伟超, 等. 五味子主要化学成分及现代药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(15): 210-218.
- [8] 陈嘉屿, 胡林海, 吴红梅, 等. 党参多糖对荷瘤小鼠免疫应答及抑瘤作用研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2015, 22(17): 1357-1362.
- [9] WANG K, ZHANG Q, LIU Y, et al. Structure and inducing tumor cell apoptosis activity of polysaccharides isolated from *Lentinus edodes* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(41): 9849-9858.
- [10] ZHANG Y, LI Q, SHU Y, et al. Induction of apoptosis in S180 tumour bearing mice by polysaccharide from *Lentinus edodes* via mitochondria apoptotic pathway [J]. Journal of Functional Foods, 2015, 15: 151-159.
- [11] LI W, WANG J, HU H, et al. Functional polysaccharide lentinan suppresses human breast cancer growth via inducing autophagy and caspase-7-mediated apoptosis [J]. Journal of Functional Foods, 2018, 45: 75-85.
- [12] 张玉, 张琪琳, 王静林, 等. 香菇多糖构效关系、抗肿瘤作用机制及药代动力学研究进展[J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(7): 804-812.
- [13] 张春梅. 木贼乙酸乙酯提取物抗肿瘤活性成分研究[D]. 延吉: 延边大学, 2012.
- [14] 崔玮, 丁玲强, 曾巧英. 甘青虎耳草乙酸乙酯提取物对小鼠肝癌细胞及原位移植瘤的抑制作用[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 463-469.
- [15] 张志超, 吴迷, 田笑, 等. 四种食用菌复合多糖体外协同抗氧化活性研究[J]. 湖北农业科学, 2018, 57(3): 78-80.
- [16] 彭樱. 参苓白术散对H22肝癌移植瘤化疗模型小鼠协同促凋亡作用研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2017.
- [17] ZHAO X, HENGCHAO E, DONG H, et al. Combination of untargeted metabolomics approach and molecular networking analysis to identify unique natural components in wild *Morchella* sp. by UPLC-Q-TOF-MS [J]. Food Chemistry, 2022, 366: 130642.

- [18] 张琪琳. 香菇多糖的结构鉴定及抗肿瘤作用机制研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2015.
- [19] 田明, 杜锐, 王茜, 等. 国外保健食品类似产品功能声称管理及对我国食品声称管理的启示[J]. 中国食品学报, 2022, 22(12): 399-404.
- [20] 白晓蕾, 宋琳, 郑远武, 等. 五味子醇甲药理研究进展[J]. 实用中医内科杂志, 2021, 35(2): 18-20.
- [21] LIN X, ATTAR R, MOBEEN I, et al. Regulation of cell signaling pathways by schisandrin in different cancers: Opting for “Swiss Army Knife” instead of “Blunderbuss” [J]. Cellular and Molecular Biology, 2021, 67(2): 25-32.
- [22] HE T, JIN M, XU C, et al. The homeostasis-maintaining metabolites from bacterial stress response to bacteriophage infection suppress tumor metastasis [J]. Oncogene, 2018, 37(43): 5766-5779.
- [23] 冯亚莉, 卢令攀, 翟广玉. 槲皮素衍生物抗肿瘤活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(15): 3565-3574.
- [24] 赵唯年, 潘新波, 赵丽娟, 等. 不同炮制方法对菟丝子醇提取物中总黄酮、总多糖及7种成分的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2022, 29(11): 97-103.
- [25] KIM D H, KHAN H, ULLAH H, et al. MicroRNA targeting by quercetin in cancer treatment and chemoprotection [J]. Pharmacological Research, 2019, 147: 104346.
- [26] ZIZKOVA P, STEFEK M, RACKOVA L, et al. Novel quercetin derivatives: from redox properties to promising treatment of oxidative stress related diseases [J]. Chemico-Biological Interactions, 2017, 265: 36-46.
- [27] 南婷婷. 灵芝中性三萜组分的制备、质量控制及抗肿瘤活性的研究[D]. 福州: 福建医科大学, 2015.
- [28] 张莘莘. 黑灵芝多糖的抗肿瘤活性及其分子机制初探[D]. 南昌: 南昌大学, 2014.
- [29] 廖子君, 南克俊, 韩军, 等. 现代肿瘤治疗药物学[M]. 西安: 世界图书出版西安公司, 2002.
- [30] 陈非玥, 洪龙胜, 李婉雁, 等. 白术多糖对小鼠胸腺与脾脏指数、组织结构及p38/MAPK信号通路的影响[J]. 动物医学进展, 2021, 42(12): 43-49.
- [31] 王艳杰, 李冀, 周迎春, 等. 五味子多糖对H22荷瘤小鼠肿瘤组织病理结构及总蛋白质组的影响[J]. 中医药导报, 2016, 22(7): 17-20.
- [32] 谭建蓉, 李文桂, 覃婷. 日本血吸虫重组*Bb(pGEX-Sj32)*疫苗诱导BALB/c鼠脾细胞增殖、亚群及细胞因子的动态变化[J]. 南方医科大学学报, 2015, 35(2): 202-207.
- [33] 徐月, 葛会奇, 高慧, 等. 五味子不同炮制品对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(14): 116-119.
- [34] BRADDOCK M, QUINN A. Targeting IL-1 in inflammatory disease: new opportunities for therapeutic intervention [J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2004, 3(4): 330-340.
- [35] LEE S H, SEO D I, KIM H S, et al. Regulation of TNF- α , AKT and COX-2 by resveratrol in MCF-7 breast cancer cells [J]. Journal of Cancer Prevention, 2012, 17(2): 121-127.
- [36] HERNANDEZ-ALCOCEBA R, POUTOU J, BALLESTEROS-BRIONES M C, et al. Gene therapy approaches against cancer using *in vivo* and *ex vivo* gene transfer of *interleukin-12* [J]. Immunotherapy, 2016, 8(2): 179-198.
- [37] 雷一鸣, 杨逸冬, 谭嗣伟, 等. TNF- α 通过内质网应激信号通路诱导肝癌细胞自噬并促进增殖的研究[J]. 新医学, 2017, 48(11): 770-774.
- [38] 钱丽丽, 闫秀明, 张慧, 等. *miR-370*靶向*FoxO1*抑制TNF- α 诱导的肝癌细胞增殖、迁移和侵袭[J]. 中国老年学杂志, 2020, 40(9): 1957-1961.
- [39] 吴红梅, 苟于强, 胡林海, 等. 纹党参多糖联合环磷酰胺对S180荷瘤小鼠抗肿瘤增效机制的研究[J]. 西部中医药, 2016, 29(4): 17-21.
- [40] 贾丽君, 单煜, 戴伟, 等. 参芪五味子颗粒对肝癌荷瘤小鼠免疫抑制调节的影响[J]. 右江医学, 2022, 50(9): 647-652.