

苦白蹄石油醚提取物对肿瘤细胞增殖与细胞周期的影响

李晓飞¹, 胡姗姗², 高君君², 朱欣婷¹, 刘云³

(1. 遵义医学院基础医学院, 贵州遵义 563099) (2. 遵义医学院药学院, 贵州遵义 563099)

(3. 遵义医学院医学与生物学研究中心, 贵州遵义 563099)

摘要:以磺酰罗丹明染色法(SRB)法研究苦白蹄石油醚提取物(PEFO)体外对人肝癌细胞 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增殖的影响。实验结果显示 PEFO 对三种肿瘤细胞都具有抑制作用, 且呈剂量效应关系; 其半数抑制浓度(IC₅₀)分别为 58.74、74.13、83.18 μg/mL, 对人肝癌细胞 SMMC-7721 表现出较强的抑制作用。通过倒置相差显微镜、透射电镜观察到 SMMC-7721 细胞经 PEFO 处理后, 其形态和细胞超微结构发生较大改变, 细胞出现核皱缩、贴壁性差、细胞裂解等现象; 且细胞线粒体发生肿胀, 胞质内出现大量空泡化结构。流式细胞术检测结果发现 SMMC-7721 细胞经 PEFO 处理后, S 期细胞减少, G₀/G₁ 期细胞增多, 出现了 G₀/G₁ 期阻滞。研究结果显示 PEFO 在体外能够抑制肿瘤细胞的增殖, 并初步推断有可能是通过抑制肿瘤细胞有氧代谢和干预细胞周期来实现抗肿瘤作用的。

关键词: 苦白蹄; 细胞增殖; 细胞周期; 人肝癌细胞 SMMC-7721

文章编号: 1673-9078(2013)8-1779-1783

Effect of Petroleum Ether Extracts from *Fomitopsis officinalis* (Vill.:Fr.)

Bond. on Tumor Cell Proliferation and Cell Cycle

LI Xiao-fei¹, HU Shan-shan², GAO Jun-jun², ZHU Xin-ting¹, LIU Yun³

(1. Basic Medical College, Zunyi Medical College, Zunyi 563099, China)

(2. Medical and Biological Research Center, Zunyi Medical College, Zunyi 563099, China)

(3. College of Pharmacy, Zunyi Medical College, Zunyi 563099, China)

Abstract: The sulforhodamine B (SRB) assay was employed to evaluate the anti-tumor effect of petroleum ether extracts from *Fomitopsis officinalis* (Vill.:Fr.) Bond (PEFO) on SMCC-7721, SGC-7901, and Hep-2 cell lines in vitro. The results showed PEFO inhibited the growth of three kinds of cells in dose-dependent manner with the IC₅₀ values on SMCC-7721, SGC-7901, and Hep-2 cells being of 58.74, 74.13 and 83.18 μg/mL, respectively. The SMCC-7721 cells exposed to PEFO obviously changed cell morphology and cellular ultrastructure. The SMCC-7721 cell presented wrinkled nuclei, poor cell adherent growth and cell lysis, while mitochondria swell and a large number of vacuoles in cytoplasm were observed by transmission electron microscope. The flow cytometry results revealed that SMCC-7721 cell decreased in S-phase and increased in G₀/G₁-phase, which arrested in G₀/G₁ phase. The study demonstrated that PEFO could inhibit cell proliferation in vitro, and the anti-tumor activity of PEFO might be achieved by inhibition of tumor cellular aerobic metabolism and intervention cell cycle.

Key words: *Fomitopsis officinalis* (Vill.:Fr.) bond; cell proliferation; cell cycle; SMMC-7721 cell

苦白蹄(*Fomitopsis officinalis* (Vill.:Fr.) Bond.) 是一种大型药用真菌, 又名落叶松茸、药用层孔菌,

收稿日期: 2013-03-28

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(黔科合J字LKZ[2010]48号)

作者简介: 李晓飞(1979-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为生物活性成分的分纯化

通讯作者: 刘云(1980-), 男, 副教授, 研究方向为生物活性成分的分纯化及药理学研究

为多孔菌科真菌药用拟层孔菌的子实体, 具有止咳平喘, 祛风除湿, 消肿止痛, 利尿, 解蛇毒等作用^[1]。在维吾尔族地区苦白蹄名为阿里红, 维吾尔医常用其治疗慢性支气管炎、腹痛、感冒、肺结核和各种癌症。以阿里红为主药的复方阿里红片和以阿里红为辅药的几种维吾尔复方制剂(止痛努加蜜膏、驱白派父甫云片、舒肢巴亚待都司片)均已收载到中华人民共和国药品标准维吾尔药分册^[2]。据国外文献报道, 苦白蹄具有抑菌^[3]、消炎的作用^[4], 而在俄罗斯等地区苦白蹄常

被用于治疗肠胃疾病、癌症、支气管哮喘、盗汗等疾病^[5]。国内对苦白蹄的研究多集中于苦白蹄的化学成分及其活性成分的筛选研究。资料显示苦白蹄的主要化学成分有多糖、萜烯类及皂苷类等。其中,苦白蹄多糖具有增强免疫力^[6-7]、清除氧自由基^[8]、抗氧化^[9]的作用,并且能显著增强 S180 荷瘤小鼠免疫功能,抑制 S180 肿瘤的增长^[10]。此外,冯薇^[11]利用现代制备色谱技术和分离方法从苦白蹄中获得了 34 个化合物,大多为萜类化合物,并通过体外实验筛选出具有抗肿瘤活性以及乙酸胆碱酯酶抑制活性的化合物。为了更好地开发利用这一药用真菌,本课题组着重于苦白蹄脂溶性成分在体外抑制肿瘤细胞增殖的研究,已于前期报道了苦白蹄乙醇提取物对人肝癌细胞 BEL-7404 具有明显的抑制作用^[12]。后期工作中,课题组继续以苦白蹄为研究对象,发现苦白蹄石油醚提取物对某些肿瘤细胞具有抑制作用,并从细胞周期和超微结构等角度探讨其作用机制,为苦白蹄的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

1.1.1 实验材料

人肝癌细胞 SMMC-7721、人胃癌细胞 SGC-7901、人喉癌上皮细胞 Hep-2 由遵义医学院医学与生物学研究中心馈赠;苦白蹄采自吉林省敦化市。

1.1.2 实验试剂与仪器

胎牛血清, RPMI-1640 培养基, 美国 Gibco 公司; 胰蛋白酶、DMSO、Tris, 美国 Amresco 公司; 磺酰罗丹明, 美国 Sigma 公司; GenMed 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; 链霉素, 青霉素, 哈药集团制药总厂; 其余试剂均为国产分析纯。

R-210 型旋转蒸发器, 瑞士 Buchi 公司; 3131 型 CO₂ 培养箱, 全波长酶标仪, 高速冷冻离心机, 美国 Thermo 公司; 倒置相差显微镜, 日本 Nikon 公司; 操净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; 电镜, 日本日立公司; FACS Calibur 流式细胞仪, 美国 BD 公司。96 孔板、25 cm² 培养瓶, 美国 Corning 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 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 用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 RPMI-1640 完全培养基

于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养。待细胞长满培养瓶底部, 弃去培养液, PBS 冲洗, 0.25% 胰蛋白酶消化, 以 1:3 传代培养。取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 苦白蹄石油醚提取物的制备

苦白蹄子实体风干、粉碎、过 60 目筛。称取其粉末 100 g, 以 1:10 的料液比加入石油醚 60 °C 连续回流提取两次, 每次 3 h。合并提取液, 减压旋转蒸发除去溶剂, 自然干燥至恒重得苦白蹄石油醚提取物 (以下简称 PEFO), 实验前精密称取 PEFO 10 mg, 200 μL DMSO 溶解, 临用前用完全培养基稀释成所需浓度。室温保存, 临用前用完全培养基稀释成所需浓度。

1.2.3 SRB 法测定 PEFO 对肿瘤细胞增殖的影响^[13]

取 SMMC-7721、SGC-7901、Hep-2 细胞, 以 8000 个/孔接种于 96 孔板中, 每种细胞接种两块, 一块为实验板 (T), 一块为对照板 (T₀)。培养 20 h 后, 对照板立即用预冷的 50% TCA 固定, 待测; 实验板加入终浓度分别为 10、20、40、60、80、100 μg/mL 的 PEFO, 每种浓度设 5 个重复, 另设置阴性对照组 (C), 继续培养 48 h。根据文献方法继续操作^[8], 530 nm 处测定各孔吸光度值, 按下列公式计算肿瘤细胞生长抑制率。采用改良寇氏法计算半数抑制浓度 (IC₅₀)。

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

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

注: X_m: lg 最大剂量; I: lg(最大剂量/相临剂量); P: 阳性反应率之和; P_m: 最大阳性反应率; P_n: 最小阳性反应率。

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

取 SMMC-7721 细胞以 20000 个/瓶接种到 25 cm² 培养瓶中, 培养 20 h 后, 弃去培养液, 加入终浓度为 IC₅₀ 的 PEFO 4 mL, 并设置阴性对照组。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。

1.2.5 透射电镜观察 PEFO 对 SMMC-7721 细胞超微结构的影响

取 SMMC-7721 细胞以 20000 个/瓶接种到 25 cm² 培养瓶中, 培养 20 h 后, 弃去培养液, 加入终浓度为 1/2 IC₅₀ 的 PEFO 4 mL, 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。

1.2.6 流式细胞仪分析 PEFO 对 SMMC-7721 细胞周期分布的影响

取 SMMC-7721 细胞以 20000 个/瓶接种到 25 cm² 培养瓶中, 培养 20 h 后, 弃去培养液, 分别加入终浓

度为 1/2 IC₅₀、IC₅₀ 的 PEFO 4 mL, 并设置阴性对照组, 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, 收集所有细胞, 加入 1 mL GenMed 清理液, 300 g 离心, 弃上清液。加入 500 μL 的 GenMed 染色工作液 1, 混匀, 37 °C 避光孵育 1 h, 再加入 500 μL GenMed 染色工作液 2, 混匀, 流式细胞仪检测细胞周期。

1.2.7 统计方法

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 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。

2 结果与讨论

2.1 PEFO 对三种肿瘤细胞增殖的影响

PEFO 对 SMMC-7721、SGC-7901、Hep-2 三种肿瘤细胞增殖的抑制作用如表 1 所示, 均表现出一定的抑制作用。当 PEFO 浓度分别为 10、20 μg/mL, 对三种细胞的抑制作用都较弱; 当浓度逐渐升高时, 抑制作用也逐渐增强, 呈剂量效应关系。当 PEFO 浓度为 100 μg/mL 时, 对 SGC-7901、Hep-2 的抑制率分别为 64.89%、41.81%, 而对 SMMC-7721 的抑制率高达 99.13%。经改良寇氏法计算其 IC₅₀ 分别为 58.74、74.13、83.18 μg/mL。PEFO 对人肝癌细胞 SMMC-7721 的抑制作用最为明显。

表 1 PEFO 对 3 种肿瘤细胞增殖的影响

Table 1 The effect of PEFO on the proliferation of 3 kinds of tumour cells

组别	PEFO 浓度 (μg/mL)	SMMC-7721		SGC-7901		Hep-2	
		OD 值	抑制率/%	OD 值	抑制率/%	OD 值	抑制率/%
对照板	-	0.26±0.00	-	0.31±0.00	-	0.25±0.00	-
阴性对照组	-	1.41±0.05	-	1.62±0.02	-	1.90±0.05	-
实验组	10	1.32±0.02*	7.83	1.54±0.07*	6.11	1.82±0.03*	4.85
	20	1.26±0.09*	13.04	1.47±0.04*	11.45	1.68±0.03*	13.25
	40	1.05±0.07*	31.3	1.35±0.03*	20.61	1.58±0.04*	19.4
	60	0.74±0.03*	59.26	1.13±0.07*	37.4	1.44±0.04*	27.88
	80	0.62±0.08*	68.7	0.97±0.04*	49.23	1.31±0.07*	35.76
	100	0.27±0.02*	99.13	0.77±0.05*	64.89	1.21±0.06*	41.81

注: “-”表示无, “*”表示与阴性对照组比较, P<0.05。

2.2 对 SMMC-7721 细胞形态的影响

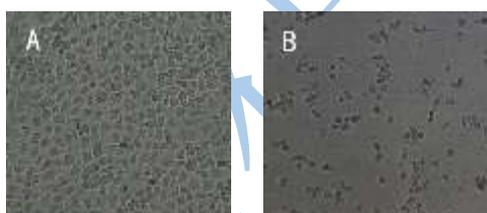


图 1 PEFO 对 SMCC-7721 细胞形态结构的影响 (×100)

Fig.1 The effect of PEFO on the cell morphology of SMCC-7721

注: A-阴性对照组; B-实验组 (58.74 μg/mL)

如图 1A 所示, 未经 PEFO 处理的细胞折光性好, 细胞贴壁好, 形态完整。而经 IC₅₀ 浓度处理 48 h 后的细胞出现细胞核皱缩, 细胞变圆变亮, 细胞贴壁性变差或悬浮在培养液中的现象, 还有部分细胞裂解, 在培养液中可以见到细胞碎片, 与凋亡的细胞形态类似, 如图 1B 所示。

2.3 对 SMMC-7721 细胞超微结构的影响

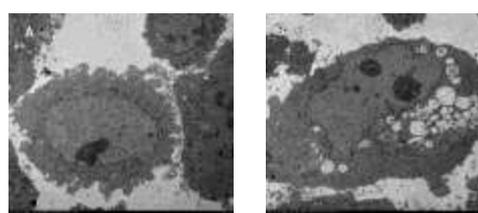


图 2 PEFO 对 SMCC-7721 细胞超微结构的影响

Fig.2 The effect of PEFO on the cellular ultrastructure of SMCC-7721

注: A-阴性对照组; B-实验组 (29.37 μg/mL)。

透射电镜结果显示, 对照组细胞 (图 2A) 具有肝癌细胞的一般特性, 表面微绒毛丰富, 加药组细胞 (图 2B) 的细胞核形态不规则, 线粒体肿胀, 嵴断裂, 胞质内出现大量空泡化结构, 细胞表面绒毛消失。由于线粒体是细胞赖以生存的“动力工厂”, 线粒体的肿胀、嵴断裂和空泡化会严重影响到线粒体功能, 使癌细胞

能量代谢直接被破坏或抑制，进而促使肿瘤细胞朝坏死或凋亡的方向发生。提示 PEFO 抑制癌细胞的生长有可能与抑制肿瘤细胞有氧代谢有关。

2.4 对 SMMC-7721 细胞周期分布的影响

表 2 PEFO 对人肝癌细胞 SMMC-7721 细胞周期的影响

Table 2 The effect of PEFO on the cell cycle of SMCC-7721

组别	PEFO 浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	G ₀ /G ₁ %	S%	G ₂ /M%
阴性对照组	0	60.95 \pm 2.00	30.96 \pm 1.22	8.09 \pm 1.01
实验组	29.37	59.03 \pm 1.65	31.57 \pm 1.34	9.13 \pm 0.39
	58.74	71.15 \pm 1.28*	18.39 \pm 1.39*	10.45 \pm 0.63*

注：“*”表示与阴性对照组比较， $P < 0.05$ 。

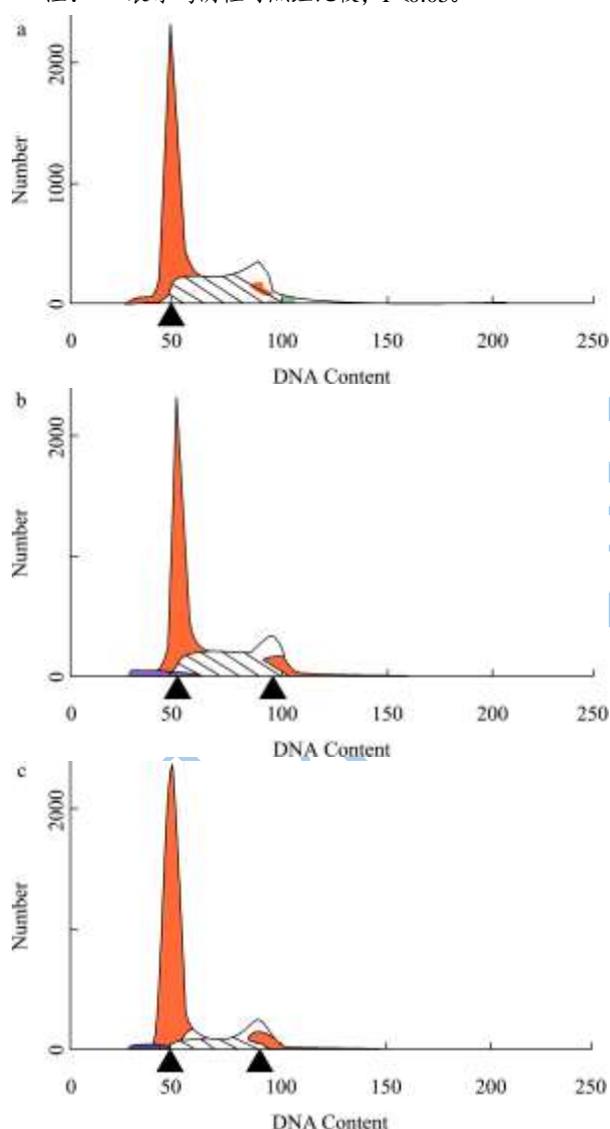


图 3 PEFO 对 SMMC-7721 细胞 DNA 含量的影响

Fig.3 The effect of PEFO on the DNA content of SMCC-7721

注：a-阴性对照组；b-实验组（29.37 $\mu\text{g/mL}$ ）；c-实验组（58.74 $\mu\text{g/mL}$ ）

如表 2 所示，SMMC-7721 细胞经 1/2 IC_{50} 浓度的

PEFO 处理 48 h 后，细胞周期改变不明显，但经 IC_{50} 浓度的 PEFO 处理 48 h 后，细胞周期具有较大的改变，G₀/G₁ 期的细胞增加，S 期的细胞减少，降幅达 41.44%，细胞阻滞于 G₀/G₁ 期。

肿瘤细胞的产生通常是因为逃逸了正常细胞增殖的调控体系而自主地无限生长，大多数抗肿瘤药物为细胞周期特异性药物，主要杀伤处于增殖期的肿瘤细胞。本实验通过流式细胞技术揭示了 PEFO 作用 SMMC-7721 后，G₀/G₁ 期细胞增加，S 期细胞减少，G₂/M 期细胞无明显变化，PEFO 可引起 SMMC-7721 细胞 G₀/G₁ 期阻滞。此外，肿瘤的发生和发展不仅是肿瘤增殖和分化异常所致，而且还是肿瘤细胞凋亡异常的结果。从 PEFO 处理 SMMC-7721 后的 DNA 含量直方图（图 3）可以看到，G₀-G₁ 期峰前有一定亚二倍体峰的出现，即凋亡峰。此现象提示经 PEFO 处理后的 SMMC-7721 细胞可能发生了少量的凋亡，而诱导肿瘤细胞凋亡已成为肿瘤治疗的一个新热点^[14]。但是，PEFO 可引起 SMMC-7721 细胞周期阻滞、细胞凋亡的具体机制还有待进一步研究。

3 结论

3.1 本次实验通过回流提取法获得苦白蹄石油醚提取物（PEFO），采用 SRB 法进行体外抗肿瘤活性筛选，发现 PEFO 对人肝癌细胞 SMMC-7721、人胃癌细胞 SGC-7901 和人喉癌上皮细胞 Hep-2 三种肿瘤细胞均有明显抑制作用，且抑制作用呈剂量效应关系，其 IC_{50} 分别为 58.74、74.13、83.18 $\mu\text{g/mL}$ 。其中，PEFO 对人肝癌细胞 SMMC-7721 的抑制作用最为明显。因此选取 SMMC-7721 细胞株作为研究对象，从细胞形态、超微结构以及细胞周期的改变情况来观察 PEFO 可能存在的抗肿瘤作用机制。通过显微镜观察发现，经 PEFO 作用后的 SMMC-7721 细胞出现细胞核皱缩、细胞贴壁性差、细胞裂解等现象。透射电镜观察结果显示 SMMC-7721 细胞的线粒体发生肿胀，胞质内出现大量空泡化结构。流式细胞技术显示 PEFO 作用 SMMC-7721 后，G₀/G₁ 期细胞增加，S 期细胞减少，G₂/M 期细胞无明显变化，G₀-G₁ 期峰前有一个小的亚二倍体峰（凋亡峰）出现。上述实验结果表明 PEFO 在体外能够抑制肿瘤细胞的增殖，并初步推断其机制有可能是通过抑制肿瘤细胞有氧代谢和干预细胞周期来实现抑制肿瘤细胞增殖的效果。

3.2 课题组前期已报道了苦白蹄的乙醇提取物可以抑制多种肿瘤细胞的增殖，尤其是对肝癌细胞 BEL-7404 的体外增殖表现出较强的抑制作用^[12]。此次实验发现极性更小的苦白蹄石油醚提取物对肝癌细

胞 SMMC-7721 具有非常明显的抑制作用, 推测苦白蹄可能会在肝癌防治方面具有一定的开发潜力。

参考文献

- [1] 中华本草编委会. 中华本草(第一卷)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999
Academy of Chinese materia medica (the first volume) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999
- [2] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准维吾尔药分册[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1999:42
- [3] Naranmandakh Sh, Bayarmaa E, Undarmaa B, et al. Antibacterial active compounds of the fungus *Fomitopsis officinalis* (Vill. ex Fr.) Bond. et Singer [J]. Mongolian Journal of Chemistry, 2010, 11(37): 159
- [4] Paul Stamets. Antipox Properties of *Fomitopsis officinalis* (Vill.: Fr.) Bond. et Singer (*Agarikon*) from the Pacific Northwest of North America [J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2005, 7(3): 495-506
- [5] Solomon P Wasser. A book review: The fungal pharmacy: Medicinal mushrooms of western Canada [J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2008, 10(1): 97-100
- [6] 丛媛媛, 阿地力·阿不力孜, 帕丽达·阿不力孜, 等. 维药阿里红多糖的提取及免疫活性研究[J]. 中国现代应用药学, 2010, 27(7): 569-571
Cong Y Y, Abulizi A, Abulizi P, et al. Studies on Extraction and the Immunity Activity of Polysaccharide from *Fomes officinalis* Ames [J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2010, 27(7): 569-571
- [7] 邹利娅·伊明, 帕丽达·阿不力孜, 白丽, 等. 阿里红多糖对小鼠免疫功能的影响[J]. 新疆医科大学学报, 2003, 26(6): 563-565
Wu L Y, Abulizi A, Bai L, et al. The immune-potentiating effect of *fomes officinalis* polysaccharides [J]. Journal of Xinjiang Medical University, 2003, 26(6): 563-565
- [8] 依巴代提·托乎提, 玛依努尔·吐尔逊, 苏巴提·吐尔地, 等. 阿里红多糖对氧自由基的清除作用[J]. 新疆医科大学学报, 2006, 29(1): 15-17
Tuohuti I, Turdui S, Tuerxun M, et al. Scavenging activity of *fomes officinalis* polysaccharides on oxygen free radicals [J]. Journal of Xinjiang Medical University, 2006, 29(1): 15-17
- [9] 夏国强. 阿里红多糖抗氧化作用研究[J]. 新疆医学, 2010, 40(12): 51-53
Xia G Q. Anti-oxidative effect of *officinalis* polysaccharides [J]. Xin Jing Medical Journal, 2010, 40(12): 51-53
- [10] 郭淑英, 冯波, 孙雪松, 等. 阿里红多糖的提取工艺研究及抗肿瘤作用初探[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(9): 2191-2192
Guo S Y, Feng B, Sun X S, et al. Extraction of polysaccharide of *fomes officinalis* Ames and its anti-tumor activity [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2010, 20(9): 2191-2192
- [11] 冯薇. 层孔菌属药用真菌阿里红和木蹄的化学成分与生物活性研究[D]. 北京: 北京协和医院中国医学科学院, 2010
Feng W. Study on the constituents and bioactivities of medicinal fungus *Fomes officinalis* and *Fomes fomentarius* [D]. Beijing: Peking Union Medical College Hospital Chinese Academy of Medical Sciences, 2010
- [12] 朱欣婷, 刘云, 胡姗姗, 等. 苦白蹄乙醇提取物体外抗肿瘤活性研究[J]. 食品工业技术, 2012, 33(15): 71-73
Zhu X T, Liu Y, Hu S S, et al. Anti-tumor effects of ethanol extracts from *Fomitopsis officinalis* (Vill.: Fr.) Bond. in vitro [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(15): 71-73
- [13] Vanicha Vinchai, Kanyawin Kirtikara. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening [J]. Nature Protocols, 2006, 1(3): 1112-1116
- [14] Tan T T, White E. Therapeutic targeting of death pathways in cancer: mechanisms for activating cell death in cancer cells [J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2007, 615: 81-104