

多汁乳菇人工繁育及抗肿瘤活性

胡先运¹, 王传明¹, 张根², 江家志¹, 龙友国¹, 余跃生¹

(1. 黔南民族医学高等专科学校, 贵州 都匀 558000;
2. 南京医科大学基础医学院, 南京 210029)

[摘要] **目的:**人工繁育了多汁乳菇,提取其子实体多糖,对其抗肿瘤活性进行研究。**方法:**采用热水浸提法提取多汁乳菇子实体多糖,取培养至对数生长期的 K562 细胞(细胞密度为 $8.0 \times 10^8/L$)于 96 微孔板中,分别加入多汁乳菇多糖浓度为 0,5,10,20,40,80,100 $mg \cdot L^{-1}$,分别培养 12,24,48,72 h,每组处理重复 3 次,采用 MTT 比色法,检测多汁乳菇多糖抑制 K562 细胞活性,采用扫描电镜以及琼脂糖凝胶电泳方法,研究促进癌细胞凋亡。**结果:**成功繁育了多汁乳菇,胡萝卜,松根能刺激菌丝生长,第 3 年开始出菇。多汁乳菇多糖具有一定的抗肿瘤活性,多汁乳菇多糖浓度越高,抑制作用越显著。当其浓度为 100 $mg \cdot L^{-1}$,作用时间为 72 h 时,达到最大的抑制率为 88.2%。多汁乳菇多糖促进 K562 细胞凋亡的扫描电镜以及 DNA ladder 进行了验证,发现多汁乳菇多糖促进癌细胞凋亡,细胞形态收缩,微绒毛显著减少,同时出现了特征性的 DNA ladder,并且随着多汁乳菇多糖浓度增加,产生较多的 DNA ladder,诱导了细胞凋亡。**结论:**多汁乳菇可作为一种潜在的食用菌和药用菌而开发利用。

[关键词] 多汁乳菇; 多糖; 人工栽培; 肿瘤细胞

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)22-0161-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014220161

Artificial Cultivation of *Lactarius volemus* and Their Inhibitory Effect on Tumor Cells

HU Xian-yun¹, WANG Chuan-ming¹, ZHANG Gen², JIANG Jia-zhi¹, LONG You-guo¹, YU Yue-sheng¹

(1. Department of Clinical Laboratory Medicine, Qiannan Medical College for Nationalities, Duyun 558000, China;
2. School of Basic Medical Sciences, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** Artificial cultivation and anti-tumor effects of polysaccharides extracted from the fruit bodies of *Lactarius volemus* were studied. **Method:** The polysaccharides of *L. volemus* were extracted with boiling water. The proliferation inhibition of *L. volemus* polysaccharides on K562 cells was adopted by 4, 5-dimethylthiazol (-2-yl) -2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) method. The tumor apoptosis was investigated by scanning electron microscope (SEM) and agarose gel electrophoresis. **Result:** Artificial cultivation of *L. volemus* was achieved successfully. The growth of *L. volemus* mycelium was stimulated by carrots and pine roots, and the fruiting bodies were obtained in the third year. Polysaccharides of *L. volemus* had some anti-tumor activity which inhibition effect was strengthened significantly with increasing polysaccharides concentration. The maximum inhibition rate was reached at 88.2% with concentration of *L. volemus* polysaccharides at 100 $mg \cdot L^{-1}$ after 72 h. We found *L. volemus* polysaccharides promoted K562 tumor cells apoptosis that cell morphology contraction, significant reduction in microvilli by SEM. Meanwhile DNA ladder was appeared by agarose gel electrophoresis, which strength enhanced with increasing concentration of *L. volemus* polysaccharides. **Conclusion:** *L. volemus* may be a potential source for medicinal and edible mushrooms.

[Key words] *Lactarius volemus*; polysaccharides; artificial cultivation; tumor cells

[收稿日期] 20140329(009)

[基金项目] 贵州省教育厅科研基金项目(黔教科 20090114);黔南医专科研基金项目(QNYZ200905)

[第一作者] 胡先运,在读博士,副教授,从事药物生物化学研究及开发,Tel:0854-8308035,E-mail:huxianyun2004@163.com

野生多汁乳菇子实体富含人体必需氨基酸及微量元素、无致突变性的野生食用菌^[1-4],子实体具有增强机体免疫力、抗病毒、抗辐射等生物学功能^[5-7],是具有很高开发价值的优质野生食用、药用菌。有研究表明多汁乳菇多糖提取物对肉瘤 S-180 和艾氏腹水癌具有抑制作用^[2]。本文对多汁乳菇的人工驯化以及子实体多糖提取物对白血病肿瘤细胞 K562 生长抑制影响进行了初步探讨,为开发利用多汁乳菇提供依据。

1 材料

1.1 细胞株 人白血病细胞株 K562(南京医科大学细胞生物学教研室提供)。

1.2 试剂与仪器 胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司,批号 121112),RPMI-1640 培养基(Invitrogen 公司,批号 785914),四氮唑蓝(MTT)(FLUCA 公司),CO₂ 培养箱(上海力申公司),超净工作台(无锡一净净化设备有限公司),扫描电子显微镜(SEM)(日本日立公司 S-3000N 型)。

1.3 药物 多汁乳菇 *Lactarius volemus* Fr. 子实体于 2012 年 8 月采自贵州省都匀市平浪镇,经黔南民族师范学院邓功成教授鉴定为多汁乳菇。

2 方法

2.1 多汁乳菇人工繁育栽培料配置 选用下列 I ~ V 种不同的栽培料配方。配方 I:玉米 200 g,胡萝卜 300 g,松根 300 g,洋葱 200 g,平菇 500 g,土豆 2 000 g,一支硫酸庆大霉素;II:玉米 200 g,胡萝卜 300 g,松根 300 g,洋葱 200 g,平菇 500 g,土豆 2 000 g,一份 50% 多菌灵可湿性粉剂;III:玉米 200 g,胡萝卜 200 g,松根 200 g,洋葱 200 g,平菇 500 g,土豆 2 000 g,一支硫酸庆大霉素;IV:玉米 200 g,胡萝卜 200 g,松根 200 g,洋葱 200 g,平菇 500 g,土豆 2 000 g,一份 50% 多菌灵可湿性粉剂;V:玉米 200 g,胡萝卜 300 g,松根 300 g,洋葱 200 g,平菇 500 g,蔗糖 1 500 g,一支硫酸庆大霉素。将 I ~ V 种培养料,加入尿素 20 g,食盐 5 g,稀释 1 000 倍备用,pH 6.0,灭菌,冷却至室温。将多汁乳菇子实体粉碎成糊状,拌匀搅入上述稀释 1 000 倍的培养料中,静置 1 夜,使菌丝充分激化。将上述培养料播种于针叶混交林中,播种深度约为 8 cm,覆土。

2.2 多汁乳菇多糖制备 多汁乳菇多糖的提取,采用热水浸提法抽提水溶性多糖。称取一定量烘干至恒重的多汁乳菇样品,粉碎后加 40 倍水,90 °C 浸提 2 h,醇沉 2 次。后用 5% 的三氯乙酸沉淀蛋白,活性炭吸附脱色处理后,DEAE-纤维素 52 柱层析,部分

收集洗脱液,以苯酚-硫酸法测定多糖含量。多糖得率为 2.2%,纯度为 87.5%。

2.3 对 K562 细胞增殖的影响 K562 细胞在含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液中常规培养,取处于对数生长期的 K562 细胞培养进行增殖抑制实验,细胞密度为 8.0×10^5 /L。对照组:常规培养;多汁乳菇多糖组:在 96 孔板培养体系中,加入多汁乳菇多糖(终质量浓度分别为 0,5,10,20,40,80,100 mg·L⁻¹)。分别培养 12,24,48,72 h,采用 MTT 比色法,测定多汁乳菇多糖抑制 K562 肿瘤细胞活性,每组重复 3 次。根据测定的 570 nm 吸光度(A),检测不同多糖浓度作用不同时间对细胞增殖的影响,按照下列公式计算细胞生长抑制率。

$$\text{细胞生长抑制率} = (1 - \text{实验组平均 } A / \text{对照组平均 } A) \times 100\%$$

2.4 诱导 K562 细胞凋亡结构观察 取对数生长期的 K562 细胞进行分组培养,实验组:加入多汁乳菇多糖质量浓度为 100 mg·L⁻¹,对照组:常规培养,在培养 48 h 取样,经 4% 多聚甲醛固定 1 h,滴加在硅片上,烘干,扫描电镜观察与摄片,加速电压为 10 kV。

2.5 细胞凋亡 DNA 琼脂糖凝胶电泳 取对数生长期 K562 细胞,接种于 96 孔板中培养,加入多汁乳菇多糖质量浓度为 0,5,20,40,60,100 mg·L⁻¹,处理 48 h 后,按 DNA ladder 提取试剂盒说明书提取 DNA。用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳,观察、摄影。

3 结果与分析

3.1 多汁乳菇人工繁育 将 I ~ V 种培养料分区块随机、均匀的喷施在松、栎混交林中,喷施深度为 10 cm,覆土踏实。5 种配方培养料出菇情况见表 1,可以看出,配方 I,III,V 在第 1,2 年是多汁乳菇菌丝生长发育阶段,第 3 年开始出菇,且有逐年增加趋势,配方 I 出菇较多,配方 V 出菇较少,可能与胡萝卜,松根更能刺激菌丝生长,土豆相对葡萄糖更能适合多汁乳菇菌丝生长;而配方 II,IV 不能生长多汁乳菇,可能由于多菌灵影响了多汁乳菇菌丝体的发育。

多汁乳菇的生物学形态特征如图 1,子实体中等至较大。菌盖直径 4 ~ 12 cm,幼时扁半球形,琥珀褐色至深紫梨色或暗土红色,边缘内卷。乳汁白色,不变色。菌褶白色或带黄色,伤处变褐黄色,菌柄长 3 ~ 8 cm,粗 1.2 ~ 3 cm,近圆柱形,表面近光滑,同盖色,内部实心。

3.2 多汁乳菇多糖含量及对 K562 细胞增殖影响 通过热水浸提法,对多汁乳菇的多糖提取,纯化,

表 1 不同配方对多汁乳菇出菇量的影响

生长时间	出菇产量/g				
	配方 I	配方 II	配方 III	配方 IV	配方 V
第二年	0	0	0	0	0
第三年	200	0	100	0	100
第四年	300	0	150	0	100

用苯酚-硫酸法测定所得样品多糖含量,其质量百分含量为 87.5%,同时采用 MTT 比色法,对不同浓度的多汁乳菇多糖作用于 K562 细胞后,如表 2 所示,作用相同时间时,对细胞的生长具有不同程度的抑制作用,多汁乳菇多糖浓度越高,抑制作用越显著,显著性差异 $P < 0.05$ 。在同一多糖浓度下,随着作用时间延长,对细胞抑制作用增强,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。当多汁乳菇多糖质量浓度为 60 ~ 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,在 48 h 抑制率最佳;当多汁乳菇多糖质量浓度 $< 60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,72 h 抑制率最佳。

表 2 多汁乳菇多糖对不同培养时间 K562 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞增殖抑制率/%				
	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
0	-	-	-	-	-
5	2.0 ± 0.1	2.1 ± 0.1	2.3 ± 0.1	2.8 ± 0.1	4.1 ± 0.1
10	3.5 ± 1.0	4.4 ± 1.2	5.2 ± 1.2	5.8 ± 1.2	7.2 ± 1.2
20	10.1 ± 1.3	15.3 ± 1.3	18.2 ± 1.5	23.5 ± 1.4	30.6 ± 1.4
40	18.2 ± 1.4	22.2 ± 1.6	29.6 ± 1.6	35.7 ± 1.6	40.5 ± 1.6
60	20.1 ± 1.4	23.6 ± 1.6	35.3 ± 1.7	40.2 ± 1.7	55.3 ± 1.7
80	25.6 ± 1.5	28.4 ± 1.7	40.4 ± 1.8	60.3 ± 1.9	70.1 ± 2.2
100	30.3 ± 1.6	34.5 ± 1.7	60.2 ± 1.8	87.6 ± 2.0	88.2 ± 2.3

3.3 多汁乳菇多糖诱导后 K562 细胞扫描电镜结构观察 同时扫描电镜观察正常 K562 细胞,和在 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 多汁乳菇多糖处理 48 h 后的 K562 细胞,发现在低倍扫描电镜下,正常培养的 K562 细胞多呈圆形,分布较多,较少的细胞凋亡所产生的碎片(图 2A);而在较高倍数扫描电镜下,表面不光滑,有丰富的微绒毛及小泡状突起(图 2B)。当用 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 多汁乳菇多糖处理 48 h 后观察,在低倍扫描电镜下,细胞明显减少,出现较多的细胞碎片(图 2C),在较高扫描电镜下观察(图 2D),细胞收缩,微绒毛显著减少,形成多个大小不等的凋亡小体。

3.4 凋亡细胞的 DNA 断裂 多汁乳菇多糖质量浓度为 0, 5, 20, 40, 60, 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理血癌 K562 细胞,48 h 后的 DNA 凝胶电泳结果如图 3 所示,空白(0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)处理的 K562 细胞,无 DNA 梯形条带

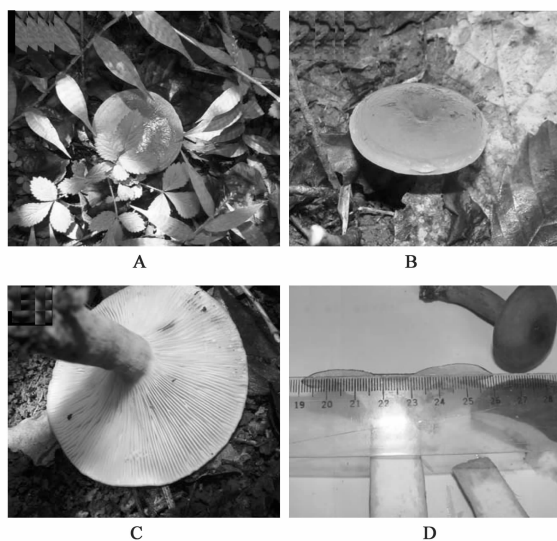


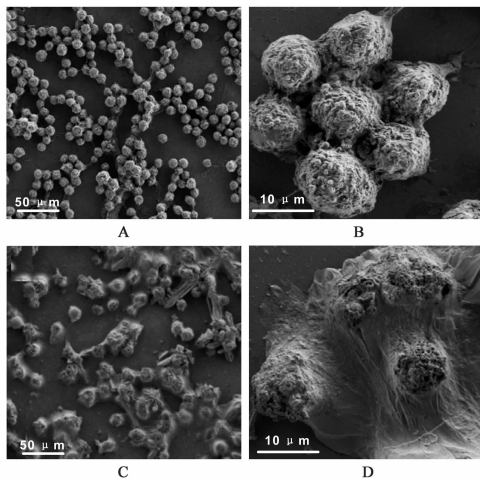
图 1 多汁乳菇图(A,B. 正面图;C. 背面图;D. 截面图)

当多汁乳菇多糖浓度浓度为 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,作用时间为 72 h 时,达到最大的抑制率(88.2%)。

(DNA ladder) 出现,细胞没有出现凋亡现象,这与 MTT 细胞抑制率,以及电镜图片相吻合;笔者采用 5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 多汁乳菇多糖处理的 K562 细胞,也无明显的 DNA 梯形条带出现,这可能多汁乳菇多糖剂量较小,不足以使细胞产生凋亡;当用多汁乳菇多糖质量浓度为 20, 40, 60, 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理 48 h 后,产生典型的 DNA ladder,浓度越大,产生的 DNA ladder 条带越清晰,说明肿瘤细胞凋亡越多。

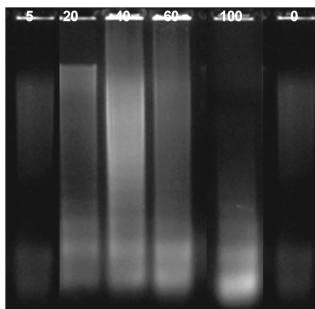
4 讨论

多汁乳菇为外生菌根菌,与松、栲树、山毛榉、栎等形成外生菌根,对于这些植物来说,多汁乳菇为外生菌根菌的存在是十分有利的,与植物为互利的共生关系,本文采用菌根合成和特制菌种及菌剂等,成功人工繁育了多汁乳菇,胡萝卜,松根能刺激菌丝生长,第三年开始出菇,为利用开发多汁乳菇打下坚实基础。



A,B. 正常 K562 细胞;C,D. 多汁乳菇多糖处理 K562 细胞

图 2 100 mg·L⁻¹ 多汁乳菇多糖处理
K562 细胞 48 h 的组织结构观察



5,20,40,60,100,0 代表多汁乳菇多糖质量浓度 (mg·L⁻¹)

图 3 不同浓度多汁乳菇多糖处理
K562 细胞 48 h 的 DNA ladder 凝胶电泳

血癌是严重危害人类生命健康的造血系统恶性肿瘤,其生物学特征是造血细胞增殖失控,而造成异常分化细胞大量增殖。促进血癌细胞凋亡作为抗肿瘤药物作用机制的研究指标已成为近年来人们关注的重要指标。目前,研究表明,多糖作为抗肿瘤药物进行了研究,也成为当前研究抗肿瘤药物研究热点^[8-10]。通过提取多汁乳菇子实体粗多糖,对其体外抗血癌 K562 细胞活性的进行研究,结果发现,多汁乳菇多糖具有一定的抗肿瘤活性,最大抑制率可达 88.2%,随着加入多汁乳菇多糖浓度的增加和培养时间的延长,细胞增殖抑制越明显。认为多汁乳菇多糖是抑制血癌细胞增殖的天然药物,有深入研究的价值和广阔的临床应用前景。

由体内外因素触发的细胞内预存的死亡程序而导致的细胞死亡过程称为细胞凋亡。血癌发生的重要因素之一就是正常凋亡过程障碍。多汁乳菇多糖促进血癌 K562 细胞凋亡,以扫描电镜以及 DNA ladder 进行了验证,发现多汁乳菇多糖促进癌细胞凋亡,同时出现了特征性的 DNA ladder,并且随着多汁乳菇多糖浓度增加,产生较多的 DNA ladder,诱导了细胞凋亡。当然多汁乳菇多糖在体外具有抗肿瘤活性,且机制尚待进一步研究,其在体内实验会受到其他各种复杂因素的综合作用,存在体内、外的实验结果有时不一致的情况,因此还需要更多的体内、外实验及临床研究来开发治疗肿瘤中的应用,以期能开发其药用价值。

[参考文献]

[1] 周庆珍,苏维词. 贵州野生多汁乳菇营养成分分析[J]. 营养学报,2003,25(2):169.

[2] 柯丽霞. 红汁乳菇和多汁乳菇的化学成分及其开发利用前景[J]. 贵州师范大学学报:自然科学版,2000,23(4):193.

[3] 刘佳,高敏,殷忠. 贵州野生多汁乳菇氨基酸成分及致小鼠突变性实验[J]. 预防医学情报杂志,2007,23(2):230.

[4] Pavel K, Lubomir S. A review of trace element concentrations in edible mushrooms [J]. Food Chem, 2000, 69(3):273.

[5] 刘佳,高敏,向红,等. 野生多汁乳菇的抗辐射作用[J]. 中国公共卫生,2006,22(4):453.

[6] 刘佳,高敏,俞红. 贵州野生多汁乳菇对小鼠免疫功能影响[J]. 中国公共卫生,2007,23(3):291.

[7] Liu P G, Yu F Q, Wang X H, et al. The cultivation of *Lactarius volemus* in China [J]. Acta Bot Yunnan, 2009(suppl X VI):115.

[8] Wang Z H, Lu C X, Wu C Q, et al. Polysaccharide of *Boschniakia rossica* induces apoptosis on laryngeal carcinoma Hep2 cells [J]. Gene, 2014, 536(1):203.

[9] Wasser S P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 60(3):258.

[10] Tabata K, Ito W, Kojima T, et al. Ultrasonic degradation of schizophyllan, an anti-tumor polysaccharide produced by *schizophyllum-commune* fries [J]. Carbohydr Res, 1981, 89(1):121.

[责任编辑 聂淑琴]