

# 桑黄总三萜的提取及其体外抗脑胶质瘤 U251 活性

谢江宁<sup>1,2</sup>, 宋素芬<sup>3</sup>, 李香<sup>4</sup>, 徐秀泉<sup>4\*</sup>

(1. 江苏大学临床医学院, 江苏 镇江 212013; 2. 江苏大学附属医院, 江苏 镇江 212001;  
3. 江苏大学京江学院, 江苏 镇江 212013; 4. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013)

**[摘要]** 目的: 优化药用真菌桑黄总三萜的超声提取工艺并测定其对脑胶质瘤 U251 生长的抑制作用。方法: 采用正交设计试验对超声辅助提取过程中影响桑黄总三萜得率的乙醇体积分数、超声时间、超声温度和料液比等因素进行优化; 采用 MTT 比色法测定桑黄总三萜对 U251 细胞株增殖的抑制率, 应用倒置相差显微镜观察桑黄总三萜对肿瘤细胞形态结构的影响。结果: 超声辅助提取桑黄总三萜的最佳工艺条件为 70% 乙醇, 超声提取 20 min, 温度 60 ℃, 料液比 1: 25。在此条件下, 桑黄总三萜提取率可达 9.40 mg·g<sup>-1</sup>。桑黄总三萜对脑胶质瘤 U251 细胞株有抑制增殖作用, 且表现出浓度依赖关系, 倒置相差显微镜下可见部分细胞形成凋亡小体。结论: 采用超声辅助提取桑黄总三萜时间短、得率高, 是一种高效、快捷的方法, 桑黄总三萜可抑制脑胶质瘤 U251 细胞株的增殖, 诱导肿瘤细胞凋亡。

**[关键词]** 桑黄; 总三萜; 正交设计; 脑胶质瘤 U251; 细胞凋亡

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)05-0024-03

## Extraction of Total Triterpenoids from *Phellinus igniarius* and Evaluation Its Inhibitory Activity on Human Glioblastoma U251 Cells *in vitro*

XIE Jinag-ning<sup>1,2</sup>, SONG Su-fen<sup>3</sup>, LI Xiang<sup>4</sup>, XU Xiu-quan<sup>4\*</sup>

(1. College of Clinic Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China;  
2. Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, China;  
3. College of Jingjiang, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China;  
4. College of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize ultrasonic-assisted extraction technology of total triterpenoids from *Phellinus igniarius*, and determine its inhibitory activity on human glioblastoma U251 cells *in vitro*. **Method:** Orthogonal test were implied to optimize ultrasonic-assisted extraction process with yield of total triterpenoids as index, the concentration of ethanol, ultrasonic temperature, extraction time and liquid-material ratio were optimized. MTT assay was used to determine inhibition rate of total triterpenoids on proliferation of U251 cells, Morphological changes of apoptosis of U251 cells were observed through inverted phase contrast microscope. **Result:** Optimum extraction conditions were determined as: the concentration of ethanol 70%, extraction time 20 min; extraction temperature 60 ℃, liquid-material ratio 1: 25, under these conditions, yield of total polyphenols reached 9.40 mg·g<sup>-1</sup>. Total triterpenoids from *P. igniarius* could inhibit hyperplasia of glioblastoma U251 cells in dose-dependent manner, apoptotic body formation were observed under inverted phase contrast microscope. **Conclusion:** Ultrasound-assisted extraction technology was an effective and rapid method for extracting total triterpenoids from *P. igniarius* with short time and high yield, total triterpenoids from *P. igniarius* could inhibit proliferation of glioblastoma U251 cells, and induced apoptosis on tumor cells.

**[收稿日期]** 20111018(008)

**[基金项目]** 镇江市社会发展项目(SH2010033); 江苏大学大学生科研立项项目(10A137)

**[第一作者]** 谢江宁, 副主任医师, 从事食管癌的预防和治疗研究, Tel: 15952900532

**[通讯作者]** \* 徐秀泉, 讲师, 硕士, 从事天然活性成分提取分离及活性研究, Tel: 0511-85038403, E-mail: xxq781026@sohu.com

[Key words] *Phellinus igniarius*; total triterpenoids; orthogonal test; glioblastoma U251 cells; apoptosis

桑黄是一种珍贵的药用真菌,生于杨、桦等树干上,分布于我国华北、东北西北及四川、云南等地,主要用于治疗血淋、脐腹涩痛、脱肛泄血不止、妇人劳损等症,在日本则作为利尿剂使用<sup>[1]</sup>。其多糖与酚类化合物具有显著的抗肿瘤、抗氧化活性<sup>[2-3]</sup>。Guei-Jane Wang 等<sup>[4-5]</sup>从桑黄中分离出 4 个羊毛脂烷型三萜类化合物,能够显著抑制脂多糖诱导的 NO 产生,表现出较强的抗炎活性,而炎症与肿瘤的形成密切相关。梁佳等<sup>[6]</sup>首次采用响应面分析法优化了桑黄总三萜的微波提取工艺,但采用超声提取桑黄总三萜的工艺及其抗肿瘤活性还未见报道。本实验采用超声辅助提取的方法,运用正交试验方法优化桑黄总三萜的提取工艺,并研究其对脑胶质瘤 U251 生长增殖的抑制作用,为该菌的深入研究提供理论依据。

## 1 材料

UV-2550 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司),DHG-9145 型鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司),BS 110 S 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),TS100 Nikon 型倒置相差显微镜(日本 Nikon 公司),SPEETRA 型酶标仪(Molecular Devices)。

桑黄购自吉林省千百汇土特产有限公司,经江苏大学药学院宋晶博士鉴定为药用桑黄 *Phellinus igniarius* 干燥菌核,粉碎过 16 目筛备用。齐墩果酸对照品(批号 110709-200505,中国药品生物制品检定所),高氯酸、香草醛、冰醋酸等试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 标准曲线的绘制**<sup>[6]</sup> 准确称取干燥恒重的齐墩果酸对照品 20.2 mg 置于 100 mL 量瓶中,加入甲醇超声溶解,稀释至刻度摇匀,即得 202 mg·L<sup>-1</sup> 的对照品溶液,分别精确吸取该对照品溶液 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL 于 10 mL 量瓶中,水浴挥尽溶剂,加新鲜配制的 5% 香草醛-冰醋酸溶液 0.3 mL 和高氯酸 1 mL, 75 °C 反应 15 min, 冰水冷却,加冰醋酸至刻度,摇匀,在 550 nm 波长下测定吸光度。以齐墩果酸质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,得吸光度与质量浓度的回归方程  $A = 0.036C - 0.0094$  ( $R^2 = 0.9993$ ),结果表明齐墩果酸在 4.04 ~ 20.2 mg·L<sup>-1</sup> 与吸光度呈现良好线性。

**2.2 桑黄总三萜的提取及含量测定** 准确称取 1.0 g 桑黄粉末于 100 mL 锥形瓶中,加入一定体积

的乙醇,封口膜密封后在规定温度下超声提取一定时间,冷却至室温,离心,取样品适量,按照标准曲线项下测定样品吸光度,计算总三萜得率。根据单因素预试验结果,以影响桑黄三萜提取率的乙醇体积分数、超声时间、超声温度、料液比等因素为优化对象,进行 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验。因素与水平设计及结果分析见表 1 ~ 3。

表 1 桑黄总三萜超声提取工艺正交试验因素水平

水平	A 乙醇体积 分数/%	B 提取 时间/min	C 料液比	D 提取 温度/°C
1	50	15	1:20	40
2	60	20	1:25	50
3	70	25	1:30	60

表 2 桑黄总三萜超声提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	桑黄总三 萜提取率 /mg·g <sup>-1</sup>
1	1	1	1	1	7.82
2	1	2	2	2	8.84
3	1	3	3	3	8.72
4	2	1	2	3	9.24
5	2	2	3	1	8.18
6	2	3	1	2	8.72
7	3	1	3	2	8.62
8	3	2	1	3	9.12
9	3	3	2	1	7.70
K <sub>1</sub>	8.460	8.560	8.553	7.900	
K <sub>2</sub>	8.713	8.713	8.593	8.727	
K <sub>3</sub>	8.480	8.380	8.507	9.027	
R	0.253	0.333	0.086	1.127	

表 3 桑黄总三萜提取工艺方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	0.119	2	10.81	
B	0.167	2	15.18	
C(误差)	0.011	2	1.00	
D	2.043	2	185.73	<0.01

注:  $F_{0.01(2,2)} = 99.00$ 。

桑黄总三萜超声提取时间结果直观分析结果表明,影响总三萜提取率因素的主次顺序为  $D > B > A > C$ ,即在一定范围内,超声提取温度对总三萜提取率影响最大,其次是超声时间、乙醇体积分数,

料液比影响最小。桑黄总三萜超声提取的最佳工艺条件为  $A_2B_2C_2D_3$ , 即采用 25 倍量 70 % 乙醇 60 °C 超声提取 20 min。

**2.3 验证试验** 为验证桑黄总三萜超声提取正交设计方案最佳条件的适用性, 按照最佳试验条件重复试验 3 次, 计算是桑黄总三萜得率, 求其平均值为  $9.40 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 高于正交设计表中的各样品。

**2.4 桑黄总三萜的抗脑胶质瘤 U251 活性分析** 以二甲基亚砜 (DMSO) 助溶, 将桑黄总三萜依次对半稀释成系列浓度梯度, 调整各浓度中 DMSO 含量一致, 过滤除菌。取对数生长期的脑胶质瘤 U251 细胞株, 胰酶 24 h 消化后, 将细胞密度调整为  $1 \times 10^4$  个/L。在 96 孔细胞培养板中, 每孔加入  $100 \mu\text{L}$  细胞悬液, 培养 24 h 后加入  $100 \mu\text{L}$  不同浓度梯度的桑黄总三萜 (质量浓度分别为 0, 50, 100, 200, 400  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 培养 48 h 后, 吸弃孔内培养基, 加入  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  MTT 100 mL, 37 °C 继续培养 4 h, 弃去上清, 加入 DMSO 150 mL, 摇床摇匀, 1 h 后用酶标仪测 570 nm 处的吸光度 (A), 记录结果并计算抑制率。抑制率 =  $[(A_{\text{对照组}} - A_{\text{给药组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}})] \times 100\%$ , 并计算其  $\text{IC}_{50}$  值。同时在光学显微镜下观测细胞的形态变化, 结果见图 1, 2。

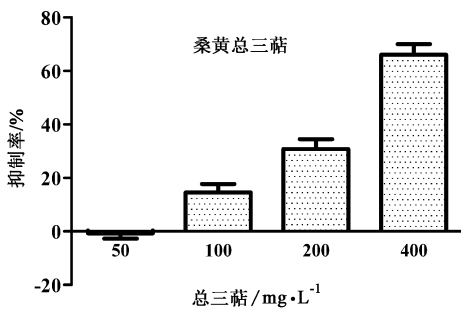
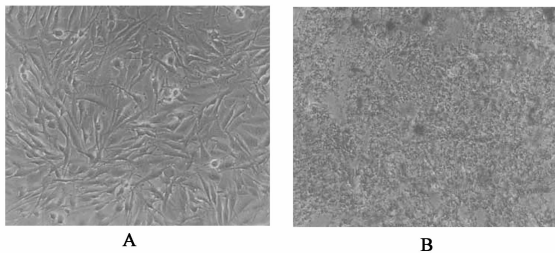


图 1 桑黄总三萜对脑胶质瘤 U251 细胞株的抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )



A. 阴性对照组; B.  $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  桑黄总三萜处理组

图 2 脑胶质瘤 U251 细胞株倒置相差显微 ( $\times 100$ )

结果可知桑黄总三萜 100, 200, 400  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  对脑胶质瘤 U251 细胞株的增殖均有抑制作用, 且呈浓度依赖关系, 各组抑制率间均有显著性差异, 48 h

桑黄总三萜的  $\text{IC}_{50}$  为  $275.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。对照组肿瘤细胞增殖旺盛, 细胞贴壁性良好, 各剂量组肿瘤细胞胞质浓缩, 体积缩小, 呈圆形或不规则形, 部分细胞中形成凋亡小体。

### 3 讨论

将单因素试验和正交设计有效结合对超声辅助提取桑黄总三萜的工艺条件进行优化, 获得最佳提取工艺, 这与单因素预试验结果基本一致: 桑黄三萜母核结构中多含羟基, 具有一定极性, 采用 70 % 乙醇提取较为合适, 提高超声提取温度和时间在一定的范围内可以提高桑黄三萜的得率, 工艺切实可行。梁佳<sup>[6]</sup>等采用微波法提取方法提取桑黄菌丝体总三萜获得最佳工艺条件为 80% 乙醇提取 10 min、微波功率为 600 W。超声提取方法同微波提取方法相同, 提取方法简单, 具有提取效率高、时间短、无需加热等优点, 是一种较理想的提取桑黄总三萜的方法。桑黄总三萜可抑制脑胶质瘤 U251 细胞株的增殖, 并呈现剂量依赖性, 其作用机制可能与诱导肿瘤细胞凋亡有关。该研究结果为珍惜药用真菌桑黄的深入研究提供了良好的理论依据。

### [参考文献]

- [1] 莫顺燕, 杨永春, 石建功. 桑黄化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2003, 28(4): 339.
- [2] Wang Y, Wang S J, Mo S Y, et al. Phelligidimer A, a Highly oxygenated and unsaturated 26-membered macrocyclic metabolite with antioxidant activity from the fungus *Phellinus igniarius* [J]. Org Lett, 2005, 7(21): 4733.
- [3] Wei Dong, Li Ning, Lu W D. Tumor-inhibitory and liver-protective effects of *Phellinus igniarius* extracellular polysaccharides [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2009, 25: 633.
- [4] Wang G J, Tung-Hu Tsai, Tun-Tschu Chang, et al. Lanostanes from *Phellinus igniarius* and their iNOS inhibitory activities [J]. Planta Med, 2009, 75: 1602.
- [5] Grivennikov Sergei I, Greten Florian R, Karin Michael. Immunity, inflammation, and cancer [J]. Cell, 2009, 139(7): 1315.
- [6] 梁佳, 孙梦伊, 张腾, 等. 响应曲面法优化桑黄菌丝体中三萜的微波提取工艺 [J]. 中国农学通报 2011, 27(10): 235.
- [7] 潘春丽. 桦褐孔菌三萜化合物提取工艺的优选 [J]. 生物加工过程, 2008, 6(4): 36.

[责任编辑 仝燕]