

解修超, 罗 强, 路宏朝, 等. 陕西佛坪木蹄层孔菌的挥发性成分及生物活性[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(1): 126–129.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.01.034

陕西佛坪木蹄层孔菌的挥发性成分及生物活性

解修超^{1,2}, 罗 强¹, 路宏朝¹, 陈文强^{1,2}, 邓百万^{1,2}

(1. 陕西理工大学生物科学与工程学院, 陕西汉中 723001; 2. 陕西省食药菌工程技术研究中心, 陕西汉中 723001)

摘要:为研究陕西佛坪木蹄层孔菌(*Fomes fomentarius*)中挥发性成分、抑菌及抗肿瘤细胞株 A549 的活性, 采用索氏回流法用乙醚对木蹄层孔菌中的挥发性成分进行提取, 通过气相色谱-质谱联用(gas chromatography-mass spectrometer, 简称 GC-MS)技术对提取的挥发性成分进行分离、检测并分析其化学组分; 利用滤纸片扩散法和 CCK-8 试剂盒法进行抑菌活性和对肿瘤细胞抑制效果的测定。结果显示, 从木蹄层孔菌的提取物中共鉴定出 7 种主要化学成分[酞酸二乙酯(37.82%)、十八烷醛(32.83%)、壬醛(11.98%)、9(11)-脱氢麦角酰苯甲酸酯(9.87%)等], 占总挥发性成分的 99.99%; 挥发性成分对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)作用较强, 对大肠埃希菌(*Escherichia coli*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)作用较弱; 对肿瘤细胞株 A549 具有较高的抑制作用, IC_{50} 为 268.675 mg/L。结果表明, 陕西佛坪木蹄层孔菌挥发性成分主要包括酯类和醛类, 其中酞酸二乙酯、壬醛、9(11)-脱氢麦角酰苯甲酸酯等挥发性组分尚未见报道; 提取物的抗肿瘤活性较强, 抑菌活性较弱, 具有进一步开发与综合利用的价值。

关键词:木蹄层孔菌; 挥发性成分; GC-MS; 抑菌活性; 抗肿瘤活性

中图分类号: S646.201 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)01-0126-03

木蹄层孔菌(*Fomes fomentarius*)别称火绒层孔菌, 为担子菌门(Basidiomycete)伞菌纲(Agaricomycetes)多孔菌目(Polyporales)多孔菌科(Polyporaceae)层孔菌属(*Fomes*)真菌, 是世界性分布的木腐性真菌。在 18、19 世纪, 曾被用来作为止血的膏药, 在传统的药典中被用来与针灸搭配治疗疾病; 其药用部位为子实体, 粗提物具有抗肿瘤、抗氧化、利尿、退烧、消积化、消炎止痛等作用, 已经被应用于传统药物的生产。

近年来, 陆勇芹等研究发现, 木蹄层孔菌乙醇提取物对肿瘤细胞具有很强的抑制作用^[1-2]。研究表明, 不同提取方法所获得的提取物组分具有部分差异, 其中报道过的化学成分包括有机酸、多糖、内酯、苷类、植物甾醇和萜类化合物等^[3]。刘量等用乙醇提取木蹄层孔菌子实体所得的提取物对 S₁₈₀ 腹腔积液瘤、人肺癌细胞 NCI-H 460 和人胃癌细胞 SGC-7901 均有较明显的抑制效果^[2,4]。陆勇芹等用石油醚等提取木蹄层孔菌所得的提取物对 Hela、H₂₂ 荷瘤、人肺癌(NCI-H 460)和胃腺癌(SGC-7901)等细胞株均具有较强的抑制效果^[1,3,5]。高慧灵等研究木蹄层孔菌中多糖对小鼠免疫功能的影响, 结果表明, 木蹄多糖可促进小鼠免疫细胞分泌细胞因子, 增强小鼠的体液免疫功能及巨噬细胞的吞噬功能^[6-7]。

本研究以陕西佛坪木蹄层孔菌为材料, 通过索氏提取及气相色谱-质谱联用(gas chromatography-mass spectrometer,

简称 GC-MS)技术, 分析子实体中挥发性物质的化学成分, 并对挥发性物质的抑菌和抗肿瘤活性进行研究, 以为陕西佛坪木蹄层孔菌资源的开发与利用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 木蹄层孔菌 木蹄层孔菌子实体样品(图 1)采自陕西佛坪自然保护区, 该自然保护区位于秦岭中段南坡(33°43'40"N, 107°46'05"E)。



图1 木蹄层孔菌子实体

1.1.2 靶标菌株和肿瘤细胞株 大肠埃希菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)由陕西省食药菌工程技术研究中心提供; 肺癌肿瘤细胞株 A549, 由陕西理工大学维生素 D 生理与应用研究所提供。

1.1.3 仪器与试剂 气相色谱-质谱联用仪(GS6890N/

收稿日期: 2017-05-26

基金项目: 陕南秦巴山区生物资源综合开发协同创新中心研究项目[编号: QBXT-Z(P)-15-2]; 陕西省教育厅重点项目(编号: 13JS021)。

作者简介: 解修超(1978—), 男, 山东临沭人, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事微生物代谢产活性物质研究。Tel: (0916) 2641863; E-mail: 44557987@qq.com。

MSD5973N 型,美国安捷伦科技有限公司),高级研究显微镜(E600 型,日本 Nikon 公司),二氧化碳培养箱(Thermo3110 型,美国 Thermo 公司),酶标分析仪(TECAN infinite 200 PRO 型,瑞士 TECAN 公司),倒置生物显微镜[徕卡 DMIL/DFC450,德国徕卡(Leica)公司],数显式恒温培养箱(LRH-250-GS 型,广东省医疗器械厂);所用抗生素(青霉素和氯霉素)购自美国 MP Biomedicals 公司,分析纯试剂(乙醚,二甲基亚砜等)购自天津市科密欧化学试剂有限公司,培养基所需试剂购自陕西西安热默尔生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 挥发性成分提取 将木蹄层孔菌子实体置于 40℃ 烘箱中恒温干燥 48 h,干燥至恒质量,粉碎过 40 目筛备用。称取样品 40.0 g,用滤纸包裹后置于索氏提取器中,加入 300 mL 乙醚,加热至 40℃ 恒温,回流提取 8 h,相同温度回收乙醚,得挥发油样品。

1.2.2 GC-MS 检测 采用氢氧化钾-甲醇酯化法对样品进行处理,得到 GC-MS 检测用样^[3,8]。GC-MS 的检测条件:美国 J & W HP-5 弹性石英毛细管柱(0.25 mm × 30 m, 0.25 μm),程序升温(以 5℃/min 的速率由 50℃ 升至 240℃,恒温保持 2 min,进样口温度 200℃),GC 气化室温度为 250℃,载气为 99.99% 高纯度氦气,流速为 2.0 mL/min。质谱条件:离子源为电子电离源(electron ionization,简称 EI),电子轰击能量 70 eV,离子源温度 230℃。倍增电压 1.28 kV,质量扫描范围为 *m/z* 10 ~ 550,扫描速度 3.8 次/s^[9-10]。检测结果在美国 NIST11.lib 标准质谱图库检索确认其成分,得到总离子流图,运用峰面积归一化法并借助 G170LBA 化学工作站数据处理系统处理数据。

1.2.3 生物活性检测

1.2.3.1 抑菌活性检测 采用滤纸片扩散法^[10]测定样品对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和铜绿假单胞菌的抑制作用。取适量挥发性物质原液,分别配制成质量浓度为 200.0、100.0、50.0 g/L 的样品溶液,分别加入适量过氧化氢酶消除可能带来的活性影响。将直径为 6.0 mm 的无菌滤纸片置于各浓度样品上清液中浸湿,贴在涂有 30.0 μL 靶标菌悬液(菌悬液密度为 0.8 × 10⁶ ~ 1.2 × 10⁶ CFU/mL)的 LB 培养基平板上,对照组分别为无菌水、1% 苯扎溴铵溶液、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide,简称 DMSO)、青霉素和氯霉素,37℃ 恒温培养 24 h 后,观察并采用十字交叉测量法记录抑菌圈直径,测量各质量浓度样品在不同靶标菌平板上的抑菌圈直径。处理平行组、对照组分别设 5 个重复。

1.2.3.2 抗肿瘤活性检测 采用 CCK-8 法^[11]测定样品的抗肿瘤活性。取对数期肺癌肿瘤细胞株 A549,经过血球计数板计数后使细胞液密度达到 5 × 10⁴ 个/mL,然后接入 96 孔板中,每孔接 100 μL (肿瘤细胞数约 5 000 个/孔),取相应质量组分挥发油样品用滤头过滤除菌,分别溶于适量二甲基亚砜中(最终 DMSO 的质量分数 < 1%)^[12],加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基充分稀释溶解药物,作为试验组样品。37℃ 培养 24 h 使细胞贴壁,试验组每孔各加入含相应质量浓度挥发性物质的培养液 200.0 μL,5 孔重复,样品挥发油设 5 个倍比质量浓度梯度,分别为 32.0、64.0、128.0、256.0、512.0 mg/L,以含 1% DMSO 的等量培养基作空白对照,其他

操作步骤均与试验组相同。37℃ 继续培养,分别在培养 24、48 h 时置于显微镜下观察肺癌肿瘤细胞株 A549 的生长情况。48 h 后向每孔中加入 CCK-8 试剂 10.0 μL,继续同温培养 1 ~ 8 h,用酶标分析仪检测加入 CCK-8 试剂后 1、2、4、8 h 各孔在 450 nm 处的吸光度。按以下公式计算各浓度挥发油对肿瘤细胞株 A549 的抑制率:肿瘤细胞生长抑制率 = (1 - 试验组 *D*_{450 nm}/空白对照组 *D*_{450 nm}) × 100%。

采用 SPSS 19.0 软件进行曲线拟合,最终得半数抑制率所需挥发油质量浓度 IC₅₀。

2 结果与分析

2.1 挥发性成分的提取

取样品 40.00 g,以乙醚作为溶剂,采用索氏提取法回流提取 12 h,得到具有特殊香味的红褐色透明状挥发油 2.33 g,经计算得率为 5.83%。

2.2 挥发性成分的化学组成与分析

对木蹄层孔菌的挥发性成分进行 GC-MS 检测,得样品中挥发性成分的相对含量,结果如表 1 所示。由表 1 可知,经多重比对共检测出 7 种主要化学成分,占总挥发性成分的 99.99%,主要成分为酞酸二乙酯(37.82%)、十八烷醛(32.83%)、壬醛(11.98%)、9(11)-脱氢麦角酞苯甲酸酯(9.87%),此 4 种成分占总检测挥发油成分的 92.50%。

表 1 木蹄层孔菌挥发性成分的化学组成与含量

序号	化合物名称	分子式	相对分子质量	相对含量 (%)
1	壬醛	C ₉ H ₁₈ O	142	11.98
2	酞酸二乙酯	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	222	37.82
3	十八烷醛	C ₁₈ H ₃₆ O	268	32.83
4	棕榈酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	1.96
5	2-十九烷酮	C ₁₉ H ₃₈ O	282	3.99
6	十七醛	C ₁₇ H ₃₄ O	254	1.54
7	9(11)-脱氢麦角酞苯甲酸酯	C ₃₅ H ₄₆ O ₂	498	9.87

2.3 木蹄层孔菌挥发性成分的生物活性

2.3.1 抑菌活性 以 4 种细菌作为靶标菌,对挥发性成分进行抑菌活性研究。试验结果(表 2)表明,各质量浓度挥发油表现出不同程度的抑菌活性。由表 2 可知,木蹄层孔菌挥发油对 4 种靶标细菌抑制活性均较弱,不同质量浓度的抑菌效果具有一定剂量-效应依赖关系。其中挥发油质量浓度为 200.0 g/L 时,对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径达 10.27 mm,对大肠埃希菌、铜绿假单胞菌和枯草芽孢杆菌表现较弱的抑制活性。

2.3.2 抗肿瘤活性 将加入相应质量浓度挥发油的肿瘤细胞置于 37℃、含 5% CO₂ 的培养箱中培养,分别在培养 24、48 h 时观察肿瘤细胞的生长状况,结果如图 2 至图 5 所示。由图 2 至图 5 可知,试验组在培养 24 h 后,肿瘤细胞数量与同期空白对照相比明显减少,形态相对皱缩,部分细胞裂解;48 h 时相对数量继续减少,大部分细胞出现裂解现象;空白对照组中的肿瘤细胞在 48 h 内数量持续增加,形态近椭圆形,贴壁生长,易聚集成群。经显微观察,试验组与对照组的 5 孔平行重复同一时期未见明显差异。

表 2 木蹄层孔菌挥发性成分对 4 种靶标菌的抑菌情况

处理	抑菌圈直径 (mm)			
	大肠埃希菌	金黄色葡萄球菌	铜绿假单胞菌	枯草芽孢杆菌
挥发性成分:50 g/L	7.08	8.83	8.17	6.50
100 g/L	7.83	8.93	7.00	8.50
200 g/L	8.67	10.27	8.92	8.90
对照组:DMSO	6.75	6.32	6.48	6.35
水	0.00	0.00	0.00	0.00
青霉素	24.58	33.83	0.00	22.33
氯霉素	28.58	31.83	18.50	27.08
1% 苯扎溴铵溶液	18.83	22.33	10.23	15.33

注:表中数据为 5 个平行组的平均数值;滤纸片直径为 6.00 mm;0 为未产生抑菌圈;1 000 单位/mg 青霉素用无菌水稀释,1 000 单位/mg 氯霉素用 DMSO 稀释,浓度均为 25.0 mg/mL。

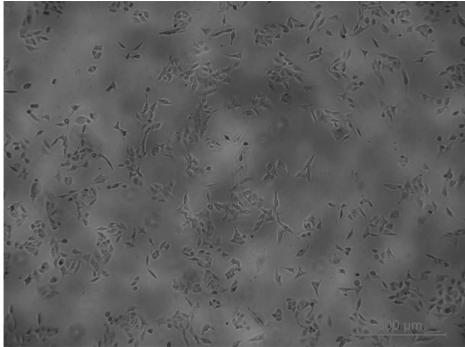


图2 加入 512 mg/L 药液 24 h 后肿瘤细胞株A549 形态

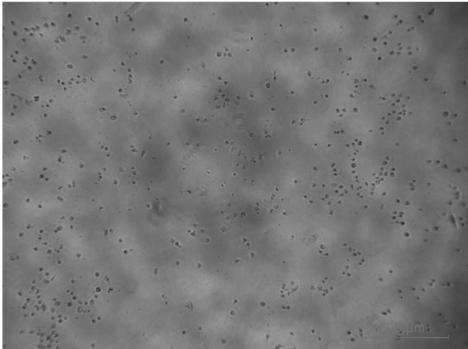


图3 加入 512 mg/L 药液 48 h 后肿瘤细胞株A549 形态

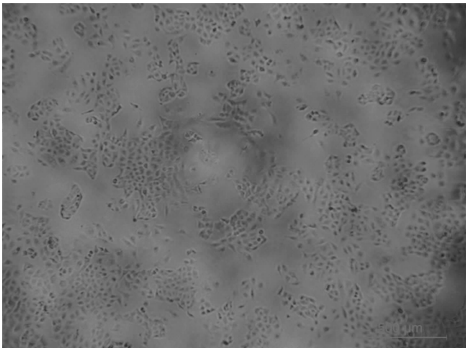


图4 空白对照组 24 h 后肿瘤细胞株A549 形态

通过 CCK - 8 法测定不同浓度挥发油对肺癌肿瘤细胞株 A549 的抗肿瘤活性,在 450 nm 处测量样品的吸光度。试验

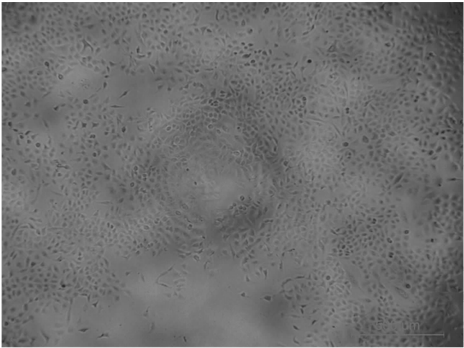


图5 空白对照组 48 h 后肿瘤细胞株A549 形态

结果(图 6)表明,提取物对肺癌肿瘤细胞株 A549 的抑制率与样品浓度之间呈剂量 - 效应依赖关系,对照组加入 CCK - 8 试剂 4 h 后的吸光度为 2.683。

由图 6 可知,木蹄层孔菌挥发性成分可明显抑制肺癌肿瘤细胞株 A549 的生长,并且随着样品浓度升高,对肺癌肿瘤细胞株 A549 的抑制效应升高,抑制率最高达 76.73%。其中随着添加量倍比的增高,抑制效应的相应强度明显上升,较高浓度时抑制率的增长逐渐变缓。由挥发油浓度与肺癌肿瘤细胞株 A549 抑制率之间的量效关系生成的对数拟合曲线计算得到 $IC_{50} = 268.675 \text{ mg/L}$ 。

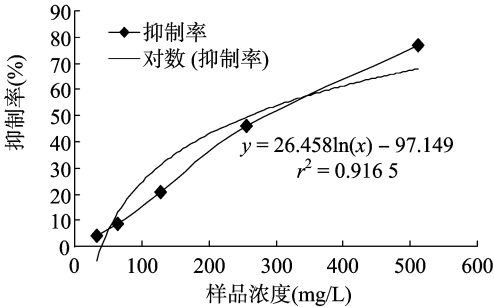


图6 木蹄层孔菌挥发性成分对肺癌肿瘤细胞株 A549 的量效关系

3 讨论

本研究利用 GC - MS 技术分析并检测陕西佛坪木蹄层孔菌中 7 种挥发性成分,结果显示,主要为酯类和醛类,并且 7 种有效成分的总含量占总挥发性成分的 99.99%,其中含量超过 2.00% 的化学成分有 5 种,占全部鉴定成分的 96.50%,且大部分挥发性成分在其他研究中尚未见报道,如杜德尧等用石油醚、乙醇、甲醇和三氯甲烷等提取试剂时^[3,5],均未获得本研究所检测到的部分有效成分,并且酞酸二乙酯、壬醛、9(11) - 脱氢麦角酰苯甲酸酯在木蹄层孔菌成分分析中属首次获得。笔者分析这可能与木蹄层孔菌寄生树种、生长条件和提取试剂等有关。

笔者对陕西佛坪木蹄层孔菌的挥发性成分进行抑菌及抗肿瘤活性研究。试验结果表明,挥发油样品对供试 4 种靶标菌中的大肠埃希菌、铜绿假单胞菌和枯草芽孢杆菌抑制活性较弱,对金黄色葡萄球菌抑菌效果较强。在抗肿瘤活性检测中,样品对肺癌肿瘤细胞株 A549 显示较高的抗肿瘤活性。经细胞形态跟踪观察发现,48 h 内挥发油对肿瘤细胞生长的抑制作用表现稳定并持续增加;另外,随着样品浓度的倍比增

江雪彬,胡开利,吴雪芹,等. 叶片结构与烟丝结构的相关关系[J]. 江苏农业科学,2018,46(1):129-132.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.01.035

叶片结构与烟丝结构的相关关系

江雪彬^{1,2}, 胡开利³, 吴雪芹³, 朱建新³, 韩 明³, 杨永杰², 李 晓², 姚二民²

(1. 湖北中烟武汉卷烟厂, 湖北武汉 430051; 2. 郑州轻工业学院食品与生物工程学院, 河南郑州 450000;

3. 河南中烟工业有限责任公司安阳卷烟厂, 河南安阳 455006)

摘要:为研究叶片结构对烟丝结构的影响规律,对叶片结构各指标与烟丝结构各指标进行相关性分析,建立叶片结构与烟丝结构关系模型。结果表明:(1)大片率的增加有助于提高整丝率,降低碎丝率,但同时也会导致长丝率增加,中丝率降低。中片率和小片率的增加,均会导致切后碎丝率增加,中丝率与中片率呈显著正相关关系。(2)建立叶片结构各指标与烟丝结构各指标之间的关系模型,对于长丝率指标: $y_1 = 0.172x_1 - 0.146x_2 - 0.300x_3 - 0.256x_4 + 61.063$;对于短丝率指标: $y_3 = -0.115x_1 + 0.098x_2 + 0.112x_3 + 0.095x_4 + 13.700$;对于碎丝率指标: $y_4 = -0.010x_1 + 0.009x_2 + 0.010x_3 + 0.009x_4 + 1.460$;对于整丝率指标: $y_5 = 0.135x_1 - 0.115x_2 - 0.131x_3 - 0.112x_4 + 84.893$ 。由上述模型计算出的烟丝结构各指标与实测值吻合程度较好(长丝率 $R^2 = 0.923$,短丝率 $R^2 = 0.973$,碎丝率 $R^2 = 0.958$,整丝率 $R^2 = 0.967$),表明这些模型能够较好地预测不同结构叶片切后烟丝的尺寸分布。

关键词:叶片结构;烟丝结构;相关性分析;关系模型

中图分类号: S572.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)01-0129-04

叶片片型和结构决定烟丝结构,烟丝结构是影响卷烟质量的重要因素之一^[1-2]。打叶复烤过程中,控制合理的叶片片型、结构是保障卷烟质量稳定性的前提,明确叶片结构与叶

丝结构的关系是打叶复烤后片烟结构优化的关键^[3]。近年来,国内外学者对叶片结构与叶丝结构的关系开展了大量研究。罗登山等通过综述叶片结构对卷烟质量影响的研究进展指出,影响叶片结构的主要因素为烟叶原料的物理特性、加工工艺和加工设备等,同时不同尺寸叶片的比例变化会对烟丝结构产生影响,并随之影响卷烟的卷制质量^[3]。刘志平等对叶片大小与叶丝尺寸关系进行探讨发现,>12.7 mm 的叶片对 >3.2 mm 的叶丝有显著影响,≤12.7 mm 的叶片对 ≤1.4 mm 的叶丝有显著影响^[4]。Jakob Stephen 利用响应面

收稿日期:2016-08-02

基金项目:河南中烟科技创新重大专项(编号:ZW2014034)。

作者简介:江雪彬(1992—),女,河南洛阳人,硕士研究生,研究方向为烟草加工工艺。E-mail:908680318@qq.com。

通信作者:姚二民,教授,主要从事烟草科学教学和研究。E-mail:46440195@qq.com。

加,肿瘤细胞的抑制率与样品浓度之间呈剂量-效应依赖关系,IC₅₀为268.675 mg/L。本研究采用 CCK-8 法进行细胞增殖检验,避免使用准确度不高、易出现假阳性和步骤繁琐等缺点的 MTT 法,同时,万文婷等报道 CCK-8 法检验细胞增殖效果较 MTT 法更佳^[13]。因此,排除了部分假阳性的干扰,使研究结果更加准确可靠。木蹄层孔菌的挥发性成分主要为酯类和醛类等,有较好的抗肿瘤活性和一定的抑菌活性,可为陕西佛坪木蹄层孔菌资源的开发与综合利用提供一定的理论指导,而关于本研究挥发油中的抑菌有效成分、最低拮抗浓度及抑菌机制还有待进一步探究。

参考文献:

- [1] 陆勇芹,周文明,王 琦,等. 木蹄层孔菌化学成分及不同提取物体外抗肿瘤活性研究[J]. 西北林学院学报,2007,22(4):131-134.
- [2] 刘 量,郑维发,周守标. 木蹄层孔菌乙醇提取物体内抗肿瘤活性及其对荷瘤鼠免疫功能的影响[J]. 徐州医学院学报,2007,27(8):497-499.
- [3] 李旭阳,包海鹰. 木蹄层孔菌子实体提取物对 H22 荷瘤小鼠体内抗肿瘤活性的影响[J]. 菌物研究,2013,11(3):202-206.
- [4] 黄天姿,杜德尧,陈永强,等. 木蹄层孔菌子实体化学成分及对肿

- 瘤细胞的抑制作用的研究[J]. 菌物学报,2012,31(5):775-783.
- [5] 杜德尧,陈永强,陈先晖,等. 木蹄层孔菌石油醚组分的成分分析及抗肿瘤活性研究[J]. 药物分析杂志,2011(2):261-265.
- [6] 高慧灵,雷林生,余传林,等. 木蹄层孔菌多糖对小鼠免疫功能的影响[J]. 南方医科大学学报,2009,29(3):458-461.
- [7] 周桂保,高慧灵,丁佩娥,等. 木蹄层孔菌多糖对免疫抑制小鼠免疫功能及细胞因子产生的影响[J]. 广东药学院学报,2011,27(1):60-64.
- [8] 杨怀文. 迈入二十一世纪的中国生物防治[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2005:504-506.
- [9] 郭 华,侯冬岩,回瑞华,等. 环棱褐孔菌挥发性化学成分的分析[J]. 鞍山师范学院学报,2005,7(6):49-51.
- [10] 解修超,陈文强,邓百万,等. 三尖杉种仁挥发油的化学成分及生物活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013(10):76-80.
- [11] 张会鲜,何琪杨. CCK-8 法检测药物影响肿瘤细胞增殖的优化研究[J]. 药学研究,2016,35(2):63-66.
- [12] 陈文强,刘兆迪,程贤利,等. 三尖杉内生真菌次生代谢产物的活性成分分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2015(12):54-57.
- [13] 万文婷,李 宁,刘 静,等. CCK-8 法与 MTT 法检测人前列腺癌 PC3 细胞活性的比较研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(12):3046-3048.