

都 君,张 红,陈 屏. 血红铆钉菇子实体化学成分 GC-MS 分析及石油醚萃取物抗肿瘤活性组分筛选[J]. 江苏农业科学,2019,47(10):197-201. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.10.044

血红铆钉菇子实体化学成分 GC-MS 分析及石油醚萃取物抗肿瘤活性组分筛选

都 君¹, 张 红¹, 陈 屏¹

(吉林农业大学教育部食药菌工程研究中心,吉林长春 130118)

摘要:为了分析血红铆钉菇子实体的化学成分并对其石油醚萃取物进行抗肿瘤活性筛选。试验采用气相色谱-质谱联用法(GC-MS),通过硅胶柱层析对石油醚萃取物进行组分分离,采用 CCK-8 法测定各组分对人肺癌细胞(NCI-H460)和人胃癌细胞(SGC-7901)的增殖抑制作用。结果表明,从血红铆钉菇子实体中共鉴定出 60 个化合物,占提取物总量的 96.074%。主要以烷烃类、醛酮类、酯类、脂肪酸类为主,分别占 13.503%、17.317%、17.777%、25.738%。石油醚萃取物经硅胶柱层析分离共得 8 个组分(A、B、C、D、E、F、G、H),其中组分(A、B、C、H)对人肺癌细胞(NCI-H460)有增殖抑制作用,组分(A、B、C、F、H)对人胃癌细胞(SGC-7901)有增殖抑制作用,并均呈浓度依赖性。组分(A、B、C、H)对人肺癌细胞(NCI-H460)的 IC_{50} 分别为 790.46、842.05、876.12、1 479.55 $\mu\text{g/mL}$,组分(A、B、C、F、H)对人胃癌细胞(SGC-7901)的 IC_{50} 分别为 619.29、465.45、1 137.88、1 096.11、754.48 $\mu\text{g/mL}$ 。说明通过对血红铆钉菇子实体 GC-MS 分析及抗肿瘤活性筛选,石油醚萃取物组分(A、B、C、F、H)具有一定的抗肿瘤活性,可能含有抗肿瘤活性的单体化合物。

关键词:血红铆钉菇;气相色谱-质谱;细胞增殖;脂肪酸;硅胶柱色谱;癌细胞

中图分类号: O657.63 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)10-0197-04

血红铆钉菇 [*Chroogomphus rutilus* (Schaeff.) O. K. Mill.] 属担子菌亚门牛肝菌目铆钉菇科(Gomphidiaceae)铆钉菇属(*Chroogomphus*),分布于中国(吉林、黑龙江、辽宁、河北、山西、云南、四川、西藏、广东、湖南等地区)、日本、欧洲及北美等地^[1],主要生长于北温带^[2]。其子实体呈铆钉状且菌肉为酒红色,故名血红铆钉菇。在我国东北地区俗称松树伞、松蘑、红蘑、松树钉、肉蘑、鸡血蘑^[3],其营养价值极高,深受人们喜爱,是现今仍不能人工驯养的野生食用菌珍品^[4]。此外,血红铆钉菇具有很好的药理活性,具有神经元保护作用、抗氧化、抗病原菌作用,促生长等功效,还具有降血糖和抗癌等作用^[5-6]。因此,血红铆钉菇具有很大的开发价值。本试验通过气相色谱-质谱技术对血红铆钉菇化学成分进行分析研究及抗肿瘤活性的筛选,为血红铆钉菇的进一步开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

试验于吉林农业大学教育部食药菌工程研究中心(2015 年 12 月至 2017 年 12 月)进行。血红铆钉菇干品由吉

林农业大学中药材学院包海鹰教授鉴定。

气相色谱-质谱联用仪,旋转蒸发仪 RE-5210(上海亚荣生化仪器厂),循环水式多用真空泵 S-B95A(湖南省巩义市英峪仪器厂)、电子天平 AL-104[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]、恒温水浴锅 HH4(金坛市江南仪器厂)、CO₂ 培养箱 BPN-80CH 型(上海一恒科学仪器有限公司)、680 型酶联免疫酶标仪(美国 Bio Rad 公司)、离心机 TD4ZWS(上海安亭科学仪器制造厂)、XD-101 型倒置显微镜(南京江南永新光学有限公司)。

细胞增殖和细胞毒性试剂盒 CCK-8(广州贝博生物科技有限公司)、0.25% 胰蛋白酶(上海索莱宝生物科技有限公司)、乙醇和石油醚(分析级,北京化工厂)。

1.2 试验方法

1.2.1 气相色谱-质谱分析条件 (1)气相色谱条件。色谱柱:DB-5 型石英毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 nm);升温程序:起始温度 8℃,升温速率 1℃/min,升温至 15℃,升温速率至 3℃/min,升温达到 250℃,升温速率达到 10℃/min,待温度升高到 280℃时持续 5 min;氮气流速为 1.0 mL/min;分流比为 50:1。(2)质谱条件。质量扫描范围:质荷比 20~880;电子轰击离子源;电子能为 70 eV;电压为 0.75 kV;电子源温度为 2℃。

1.2.2 CCK-8 法抗肿瘤活性组分筛选 (1)样品制备 血红铆钉菇干品粉碎,95%乙醇按 1:4(体积分数)量回流提取 2 次,每次 3 h,合并提取液,减压浓缩得乙醇浸膏。乙醇浸膏挥干后加蒸馏水混悬,加入石油醚按 1:1(体积分数)量萃取,石油醚萃取物减压浓缩得石油醚浸膏。将石油醚浸膏用丙酮溶解,与硅胶(100~200 目)按 1:2 伴样,干法上硅胶柱

收稿日期:2018-01-02

基金项目:国家重点基础研究发展计划(编号:2014CB138304);吉林省教育厅“十二五”科学技术研究项目(编号:2015 第 194 号)。

作者简介:都 君(1992—),男,吉林白山人,硕士研究生,主要从事天然药物化学研究。E-mail:1139310164@qq.com。

通信作者:陈 屏,博士,讲师,主要从事天然药物化学研究。E-mail:chenping201707@126.com。

(73 mm×305 mm),流动相为石油醚-乙酸乙酯[A(9:1)、B(8:2)、C(7:3)],四氯甲烷-甲醇[D(10:0)、E(9:1)、F(8:2)、G(7:3)、H(0:10)],合并相同比例组分,减压浓缩,共得 8 个组分(A、B、C、D、E、F、G、H)。(2)抗肿瘤活性筛选 采用 CCK-8 法,以人肺癌细胞(NCI-H460)和人胃癌细胞(SGC-7901)为受试对象。取 2 种细胞的对数生长期细胞,用 0.25% 的胰蛋白酶消化,计数,分别配成细胞悬液接种于 96 孔培养板中,每孔加细胞悬液 100 μL(细胞密度分别为 6.00×10³、3.25×10⁴ 个/mL),置 37℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。24 h 后试验组分别加入配制好的 8 个组分(A、B、C、D、E、F、G、H) 10 μL,浓度梯度分别为 400.000 0、200.000 0、100.000 0、50.000 0、25.000 0、12.500 0、6.250 0、3.125 0、1.562 5 μg/mL。每个梯度设 6 个重复。空白组为 100 μL 培养液,对照组为 100 μL 细胞。置 37℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中继续培养。24 h 后,每孔加入 10 μL

CCK-8 试剂盒,培养 3 h 后,用海标仪在 450 nm 波长下测定 D 值。抑制率计算公式为抑制率=1-[(实验组-空白组)/(对照组-空白组)]×100%。

2 结果与分析

2.1 血红铆钉菇子实体 GC-MS 分析结果

对血红铆钉菇子实体进行 GC-MS 分析,其总离子流图如图 1 所示,通过 NIST 库进行自动检索与标准物质谱图进行对比分析,并结合质谱裂解规律确定其化学成分。从血红铆钉菇子实体中分析出 60 个化合物(表 1),且以烃类、醛酮类、酯类、脂肪酸类为主,分别占 13.503%、17.317%、17.777%、25.738%,占检出总量 74.335%。血红铆钉菇子实体中以脂肪酸为主要成分,含量较多的是正戊酸(11.236%)、十六烷酸(4.020%)、十四烷酸(2.055%)、十五烷酸(1.388%)。

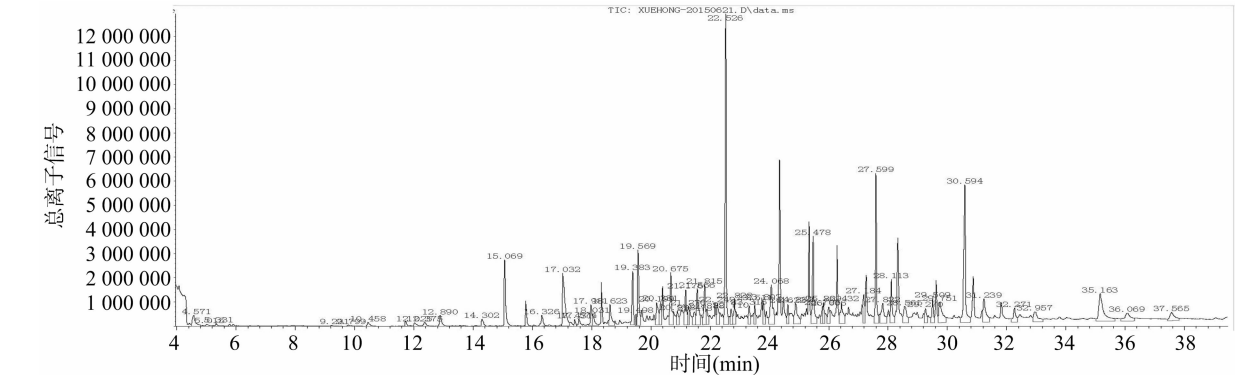


图1 血红铆钉菇 GC-MS 总离子流

表 1 血红铆钉菇 GC-MS 挥发性组分分析

峰号	保留时间 (min)	中文名	英文名	分子式	含量 (%)
1	4.567	异戊醛	3-methyl butanal	C ₅ H ₁₀ O	1.001
2	5.017	3-丁烯-2-酮	methyl vinyl ketone	C ₄ H ₆ O	0.183
3	5.332	2,3-丁二酮	2,3-butanedione	C ₄ H ₆ O ₂	0.141
4	9.234	乙酰基环己烯	1-(1-cyclohexen-1-yl)-1-ethanone	C ₈ H ₁₂ O	0.048
5	9.798	4-甲基-3-戊烯醛	4-methyl-3-pentene-1-one	C ₆ H ₁₀ O	0.122
6	10.457	2-丁酮	2-butanone	C ₄ H ₈ O	0.285
7	12.026	3-甲基-2-丁烯醛	3-methyl-2-butenal	C ₅ H ₈ O	0.256
8	12.379	1-烯丙基环己烯	1-(2-propenyl)-cyclohexene	C ₉ H ₁₄	0.318
9	12.886	2,7-二甲基氧杂卓	2,7-dimethyl-oxepine	C ₈ H ₁₀ O	0.726
10	14.301	3-亚甲基-1,1-二甲基-2-乙烯基环己烷	2-ethenyl-1,1-dimethyl-3-methylene-cyclohexane	C ₁₁ H ₁₈	0.446
11	15.066	甲基庚烯酮	6-methyl-5-hepten-2-one	C ₈ H ₁₄ O	2.835
12	16.329	正十四烷	tetradecane	C ₁₄ H ₃₀	0.684
13	17.036	冰醋酸	acetic acid	C ₂ H ₄ O ₂	3.959
14	17.428	乙酰氧基-2-丙酮	acetox-2-propanone	C ₅ H ₈ O ₃	0.258
15	17.572	呋喃甲醛	furfural	C ₅ H ₄ O ₂	0.427
16	17.983	正十五烷	pentadecane	C ₁₅ H ₃₂	0.785
17	18.031	E-9-十四碳-1-醇	(E)-9-tetradecen-1-ol	C ₁₄ H ₂₈ O	0.800
18	18.623	苯甲醛	benzaldehyde	C ₇ H ₆ O	1.190
19	19.379	正十六烷	hexadecane	C ₁₆ H ₃₄	2.059
20	19.494	反式石竹烯	caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	0.438
21	19.570	1-(2-甲基-1-环戊烯基)乙酮	1-(2-methyl-1-cyclopenten-1-yl)-ethanone	C ₈ H ₁₂ O	3.081
22	20.201	(E)-β-金合欢烯	(E)-7,11-dimethyl-3-methylene-1,6,10-dodecatriene	C ₁₅ H ₂₄	1.484

续表 1

峰号	保留时间	中文名	英文名	分子式	含量 (%)
23	20.335	2,6,10,14-四甲基十五烷	2,6,10,14-tetramethyl-pentadecane	C ₁₉ H ₄₀	1.223
24	20.679	正十七烷	heptadecane	C ₁₇ H ₃₆	2.594
25	20.899	2,6-二甲基-6-(4-甲基-3-戊烯基)双环[3.1.1]庚-2-烯	2,6-dimethyl-6-(4-methyl-3-pentenyl)bicyclo[3.1.1]hept-2-ene	C ₁₅ H ₂₄	0.800
26	21.176	(Z,E)-3,7,11-三甲基-1,3,6,10-十二碳四烯	(Z,E)-3,7,11-trimethyl-1,3,6,10-dodecatetraene	C ₁₅ H ₂₄	1.900
27	21.272	9-(1-甲基亚乙基)-1,5-环十一碳二烯	9-(1-methylethylidene)-1,5-cycloundecadiene	C ₁₄ H ₂₂	0.715
28	21.482	(E)-3,7-二甲基-2,6-辛二烯醛	(E)-3,7-dimethyl-2,6-octadienal	C ₁₀ H ₁₆ O	0.917
29	21.569	6-异亚丙基-1-甲基-二环[3.1.0]己烷	6-isopropylidene-1-methyl-bicyclo[3.1.0]hexane	C ₁₀ H ₁₆	2.355
30	21.817	植烷	2,6,10,14-tetramethyl-hexadecane	C ₂₀ H ₄₂	1.740
31	21.884	正十八烷	octadecane	C ₁₈ H ₃₈	0.837
32	22.247	(E)-3-(4,8-二甲基-3,7-壬二烯基)呋喃	(E)-3-(4,8-dimethyl-3,7-nonadienyl)-furan	C ₁₅ H ₂₂ O	1.229
33	22.525	正戊酸	valeric acid	C ₅ H ₁₀ O ₂	11.236
34	22.706	6,10-二甲基-5,9-十一双烯-2-酮	6,10-dimethyl-5,9-undecadien-2-one	C ₁₃ H ₂₂ O	0.789
35	22.831	7,11-二甲基十二-2,6,10-三烯-1-醇	7,11-dimethyldodeca-2,6,10-trien-1-ol	C ₁₄ H ₂₄ O	1.043
36	23.318	(6E)-2,6-二甲基-8-(3-甲基-2-呋喃)-2,6-辛烯	(6E)-2,6-dimethyl-8-(3-methyl-2-furyl)-2,6-octadiene	C ₁₅ H ₂₂ O	0.925
37	23.510	黑蚁素	(E)-3-(4,8-dimethyl-3,7-nonadienyl)-furan	C ₁₅ H ₂₂ O	0.808
38	23.806	环氧化蛇麻烯	humulene oxide II	C ₁₅ H ₂₄ O	0.997
39	24.064	10-十三烯醋酸酯	Z-10-tetradecen-1-ol acetate	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	2.844
40	24.619	(Z)- ψ -紫罗兰酮	(Z)- ψ -ionone	C ₁₃ H ₂₀ O	0.742
41	24.887	顺式-8,11,14-二十碳三烯酸甲酯	cis-8,11,14-eicosatrienoic acid methyl ester	C ₂₁ H ₃₆ O ₂	1.928
42	25.795	3,7,11-三甲基-1,6,10-三烯-十二酸甲酯	3,7,11-trimethyl-1,6,10-dodecatrien-3-yl ester formic acid	C ₁₆ H ₂₆ O ₂	0.714
43	25.833	苯甲酸2-乙基己酯	benzoic acid,2-ethylhexyl ester	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	0.781
44	26.005	十二烷二酸二甲酯	dodecanedioic acid dimethyl ester	C ₁₄ H ₂₆ O ₄	0.817
45	26.436	正癸酸	n-decanoic acid	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	1.729
46	27.181	乙酰丙酸	4-oxo-pentanoic acid	C ₅ H ₈ O ₃	1.413
47	27.602	法尼基丙酮	(E,E)-6,10,14-trimethyl-5,9,13-pentadecatrien-2-one	C ₁₈ H ₃₀ O	5.063
48	27.822	金合欢醇	(E,E)-farnesol	C ₁₅ H ₂₆ O	1.846
49	28.109	棕榈酸丁酯	hexadecanoic acid butyl ester	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	2.059
50	28.568	十二烷酸	dodecanoic acid	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	1.600
51	29.266	香叶基芳樟醇	geranyl linalool	C ₂₀ H ₃₄ O	0.792
52	29.505	2,6-二甲基-2,6-辛二烯-1,8-二醇二乙酸酯	2,6-dimethyl-2,6-octadiene-1,8-diol diacetate	C ₁₄ H ₂₂ O ₄	1.071
53	29.754	苯乙酸	benzeneacetic acid	C ₈ H ₈ O ₂	2.232
54	30.595	硬脂酸异丁酯	octadecanoic acid 2-methylpropyl ester	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	7.563
55	31.236	十四烷酸	tetradecanoic acid	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	2.055
56	32.268	香叶基香叶醇	geranylgeraniol	C ₂₀ H ₃₄ O	1.055
57	32.957	十五烷酸	pentadecanoic acid	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	1.388
58	35.166	十六烷酸	n-hexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	4.020
59	36.064	11-烯-十六烷酸	z-11-hexadecenoic acid	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	1.478
60	37.566	5,9,13-三甲基-4,8,12-三烯十四-1-醇	5,9,13-trimethyl-4,8,12-tetradecatrien-1-ol	C ₁₇ H ₃₀ O	1.250

2.2 抗肿瘤活性组分筛选

2.2.1 血红铆钉菇石油醚萃取物各组分对人肺癌细胞(NCI-H460)增殖的抑制作用 由表2可知,血红铆钉菇石油醚萃取物8个组分中,组分A、B、C、H对人肺癌细胞NCI-H460的增殖具有明显的抑制作用,在浓度400 $\mu\text{g/mL}$

时抑制率最大,分别为38.99%、31.52%、29.72%、23.37%。且组分A、B、C、H的抑制率随剂量的增加而提高,具有良好的剂量-效应关系。通过SPSS计算其IC₅₀分别为790.46、842.05、876.12、1479.55 $\mu\text{g/mL}$ 。而组分D、E、F、G没有明显的增殖抑制作用。

表 2 石油醚萃取物 8 个组分对人肺癌细胞 (NCI-1460) 的增殖抑制作用

组别	抑制率 (%)								
	400 μg/mL	200 μg/mL	100 μg/mL	50 μg/mL	25 μg/mL	12.5 μg/mL	6.25 μg/mL	3.125 μg/mL	1.562 5 μg/mL
空白	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5-Fu				26.11					
A	38.99	29.83	28.83	25.94	20.73	18.82	15.99	12.42	10.36
B	31.52	29.91	27.26	22.92	20.59	16.86	15.14	12.58	11.76
C	29.72	26.64	22.49	18.27	15.21	10.35	9.69	7.51	7.57
D	9.93	-6.27	-7.35	-2.3	-6.18	-19.49	-18.35	-14.65	-22.15
E	3.98	-11.01	-14.65	-20.63	-18.66	-34.77	-6.51	-23.05	-27.92
F	-5.83	-10.82	-19.44	-5.26	-19.49	-8.04	-17.78	-17.84	-17.28
G	8.82	1.74	-30.88	-24.81	-17.67	-7.14	-14.23	-22.78	-23.41
H	23.37	19.89	16.45	15.92	12.09	10.46	9.59	8.69	5.34

注:5-Fu 表示五氟尿嘧啶。

2.2.2 血红铆钉菇石油醚萃取物各组分对人胃癌细胞 (SGC-7901) 增殖的抑制作用 由表 3 可知,血红铆钉菇石油醚萃取物 8 个组分中,组分 A、B、H 对人胃癌细胞 SGC-7901 的增殖具有明显的抑制作用,在浓度为 400 μg/mL 时,抑制率最大,分别为 43.27%、47.74%、41.22%。组份 C、F 也具有一定的增殖抑制作用,在浓度为 400 μg/mL 时,抑制

率分别为 29.19%、33.49%。且组份 A、B、C、F、H 的增殖抑制作用均随剂量的增加而提高,具有良好的剂量-效应关系。通过 SPSS 计算其 IC₅₀ 分别为 619.29、465.45、1 137.88、1 096.11、754.48 μg/mL,而组份 D、E、G 并没有明显的抑制作用。

表 3 石油醚萃取物 8 个组分对人胃癌细胞 (SGC-7901) 的增殖抑制作用

组别	抑制率 (%)								
	400 μg/mL	200 μg/mL	100 μg/mL	50 μg/mL	25 μg/mL	12.5 μg/mL	6.25 μg/mL	3.125 μg/mL	1.562 5 μg/mL
空白	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5-Fu				49.25					
A	43.27	37.11	35.41	31.19	25.05	22.06	12.82	10.91	8.11
B	47.41	41.43	36.42	31.09	21.60	16.73	14.58	11.67	9.68
C	29.19	21.17	17.50	14.39	11.66	5.45	3.49	2.22	0.19
D	5.13	-13.41	7.79	-12.7	-22.81	-30.43	-19.98	7.22	6.27
E	11.49	-28.76	-23.17	-20.1	-20.58	-38.59	-33	-30.45	-21.96
F	33.49	29.68	25.36	21.38	15.25	9.73	2.61	-10.22	-15.37
G	8.28	-18.5	-31.59	-25.04	-30.74	-29.18	-37.1	-27.69	-23.7
H	41.22	35.41	31.39	29.76	22.79	15.78	11.21	8.28	7.68

3 讨论

本试验通过 GC-MS 分析了血红铆钉菇子实体中的挥发性成分,共鉴定出 60 个化合物,以烷烃类、醛酮类、酯类、脂肪酸类为主,分别占 13.503%、17.317%、17.777%、25.738%,占检出总量 74.335%。其主要成分为正十七烷 (2.594%)、甲基庚烯酮 (2.835%)、硬酯酸异丁酯 (7.563%)、正戊酸 (11.236%)、十六烷酸 (2.844%)。有研究表明脂肪酸具有抗炎、抗肿瘤、抗动脉粥样硬化、抗氧化等作用^[7]。血红铆钉菇具有抗肿瘤、抗氧化、抗菌、促生长、神经元保护等多种药理活性,而这些生物活性与其具有丰富的脂肪酸类化合物可能有着一定的联系^[8-12]。

采用硅胶柱层析对血红铆钉菇石油醚提取物进行分离,得到 8 个组分。通过 CCK-8 法测定各组分对人肺癌细胞 (NCI-H460) 和人胃癌细胞 (SGC-7901) 的增殖抑制作用,其中组分 A (石油醚:乙酸乙酯=9:1)、B (石油醚:乙酸乙酯=8:2)、C (石油醚:乙酸乙酯=7:3)、H (四氯甲烷:甲醇=0:1) 对 2 种肿瘤细胞均具有比较明显的增殖抑制作用,

组分 F (四氯甲烷:甲醇=8:2) 对人胃癌细胞 (SGC-7901) 具有一定的增殖抑制作用,而对人肺癌细胞 (NCI-H460) 无明显效果。组分 D (四氯甲烷:甲醇=1:0)、E (四氯甲烷:甲醇=9:1)、G (四氯甲烷:甲醇=7:3) 对 2 种细胞均无明显抑制效果。可以说明组分 A、B、C、F、H 为抗肿瘤活性组分,可能含有抗肿瘤活性的单体化合物,有待进一步开发研究。

参考文献:

[1]周崇莲,韩桂之,周玉芝,等. 几种松树外生菌根真菌的研究[J]. 生态学报,1983,3(2):103-109.
[2]刘志民. 现代实用毒物分析[M]. 北京:人民卫生出版社,1984:347-348.
[3]陈添兴. 南京紫金山大型菌物多样性研究[D]. 南京:南京师范大学,2012.
[4]卯晓岚. 食用珊瑚菌[J]. 中国食用菌,1987(1):22-24.
[5]戴玉成. 中国东北野生食药真菌图志[M]. 北京:科学出版社,2007.
[6]刘钟栋. 食品添加剂[M]. 南京:东南大学出版社,2006:221.

张 蕾,郝婧玮,宛春雷,等. 桦褐孔菌多糖的提取工艺优化及对人肝癌细胞 HepG2 脂肪堆积的影响[J]. 江苏农业科学,2019,47(10):201-204. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.10.045

桦褐孔菌多糖的提取工艺优化 及对人肝癌细胞 HepG2 脂肪堆积的影响

张 蕾,郝婧玮,宛春雷,柴军红,赵 玥,王 鑫,王 雪

(牡丹江师范学院生命科学与技术学院,黑龙江牡丹江 157011)

摘要:通过 $L_9(3^4)$ 正交试验,通过 MTT 法选取桦褐孔菌多糖对 HepG2 细胞的安全浓度,检测不同浓度的桦褐孔菌多糖对胞内 TG 蛋白的影响,及桦褐孔菌多糖减轻细胞内脂质堆积的作用。结果表明,桦褐孔菌多糖最佳条件为 1 g : 15 mL 的料液比,在温度 30 ℃ 下提取 30 min,超声功率为 480 W。桦褐孔菌多糖可明显减轻 HepG2 细胞内脂质堆积,显著降低细胞中 TG 的含量,其中 600 mg/L 桦褐孔菌多糖对 TG 的清除率达 24.57%,脂滴数量明显减少。说明桦褐孔菌多糖具有良好的体外降脂活性,对脂肪肝有较好的预防效果。

关键词:桦褐孔菌;多糖;HepG2 细胞;甘油三酯;脂肪堆积;清除率;脂滴数量

中图分类号: R284 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)10-0201-04

非酒精性脂肪肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 的主要特征是肝细胞内脂肪的变性以及脂质的贮积,但同时无过量饮酒史的临床病理综合征^[1]。经常伴有中心性的肥胖、高血脂症,对胰岛素的抵抗能力以及对糖的耐受异常等方面代谢综合征,严重危害人类的健康^[2-4]。近年来,对 NAFLD 的研究很多,但对其发病机制的研究尚不清楚。因此,寻找到有效治疗 NAFLD 的药物非常重要。

桦褐孔菌 (*Phaeoascus obliquus* J. Schroet), 别称白桦茸,被誉为“西伯利亚灵芝”,为真菌门担子菌亚门层菌纲非褐菌目多孔菌科褐卧孔菌属,是一种非常珍稀而名贵的药用真菌,生长在温度相对较低的俄罗斯西伯利亚地区的原始森林中,不能人工栽培,非常稀少,颜色呈深栗色,常在树皮破损及伤节处形成肉瘤状菌核,菌块性状为近球形或不定形状块;研究发现,其化学成分包含多糖类化合物、芳香物质、多酚类化合物、三萜类化合物等物质^[5-8],具有重要的药用价值。从 16 世纪至今,桦褐孔菌一直被作为一种民间药物来治疗糖尿病、高血压、抗衰老等,具有显著的效果^[9-10]。对于非酒精性

脂肪肝病的治疗,目前还尚未见相关的研究报道。本试验通过模拟临床上 NAFLD 的病理特点,通过优化提取桦褐孔菌多糖提取物,将其作用于 HepG2 细胞,从细胞水平上来评价桦褐孔菌多糖提取物对细胞脂质堆积的影响,以及对细胞内甘油三酯含量的影响,从而揭示其在防治非酒精性脂肪肝方面的药用价值。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

桦褐孔菌购于黑龙江省绥芬河市;MTT、TG 试剂盒、油酸、油红 O 和细胞裂解液购于上海源叶生物科技有限公司;DMEM 细胞培养基、血清、胰蛋白酶等细胞试剂购于 Hylone 公司;乙醇、异丙醇购于北京化工厂;HepG2 细胞笔者所在实验室传代保存,由哈尔滨工业大学赠送;粉碎机 (戴声设备有限公司)、超声波清洗机 (杭州法兰特超声波科技有限公司,总功率 800 W)、电子天平 (QUINTIX224-1CN Sartorius, R210)、旋转蒸发器 (瑞士 BUCHI)、电子显微成像系统 (CX31 Olympus)、酶标仪 (Synergy HTX BioTek)、静音混合器 (MT-360 其林贝尔)。

1.2 桦褐孔菌多糖的提取及测定

将桦褐孔菌粉末过筛,准确称取 5 g 溶于醇浓度为 30% 的乙醇中,在一定时间、温度、料液比和超声波功率下振荡处理一定时间,用 80% 乙醇沉淀多糖后,4 000 r/min,离心 7 min 后取上清液,减压浓缩至浸膏后水浴至干,得粗制多

antioxidant polysaccharides from the fruiting bodies of *Chroogomphus rutilus* (Schaeff. : Fr.) O. K. Miller by Box- Behnken statistical design[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 82(1): 209-214.

[11] 栾庆书,金若忠,云丽丽,等. 血红铆钉菇对土传病原菌抑菌性研究[J]. 辽宁林业科技, 2005(6): 13-16, 55.

[12] 李艳红,姜 勇,王文杰,等. 有机碳和无机碳对 3 种真菌胞外酸性磷酸酶和蛋白酶活性的影响[J]. 植物研究, 2013, 33(4): 404-409.

收稿日期: 2018-11-03

基金项目: 黑龙江省教育厅科研备案项目 (编号: 1352MSYQN002);

黑龙江省大学生创新创业训练计划 (编号: 201810233045); 黑龙江省牡丹江市科学技术计划 (编号: Z2016s0024)。

作者简介: 张 蕾 (1984—), 女, 黑龙江东宁人, 博士, 讲师, 主要从事微生物与生物化学研究。E-mail: swxzlz@126.com。

[7] 胡 锐, 李宝莉. 传统药物中脂肪酸的药理活性和现代研究[J].

中外医疗, 2008(27): 135-136.

[8] 祝鹤鸣, 吴艳玲, 李 雪, 等. 血红铆钉菇子实体对人肝星状细胞 LX-2 和人肝癌细胞 Hep G2 增殖的影响[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(15): 6651-6653.

[9] 张雪倩, 孙 红, 王立安, 等. 色钉菇粗多糖对小鼠 DA 能神经元 MPTP 损伤的保护作用[J]. 菌物学报, 2011, 30(1): 77-84.

[10] Sun Y X, Liu J C, Kennedy J F. Extraction optimization of