

樟芝菌丝体的不同提取方法及其抗肿瘤活性的研究

刘 华^{1,2}, 贾 薇¹, 张劲松¹

1(上海市农业科学院食用菌研究所, 上海, 201106) 2(南京农业大学生命科学院微生物系, 江苏 南京, 210095)

摘 要 采用不同的方法对樟芝菌丝体进行提取, 使用高效液相(HPLC)对提取物进行了分析, 选定乙醇为提取溶剂; 并用不同浓度的乙醇在不同时间下提取樟芝菌丝体, 确定 95% 乙醇超声波提取的三萜产量最高, 在 1g 菌丝体中可以获得 25.24mg 的三萜; 并对其进行体外抗肿瘤活性试验, 结果表明, 80% 乙醇浸提 18h, 在 50 μ g/mL 时, 体外对小鼠淋巴瘤白血病细胞 L1210 和人肠癌细胞 SW620 都有很强的抑制作用。

关键词 樟芝, 菌丝体, 三萜, 高效液相, 抗肿瘤活性

樟芝(*Antrodia camphorata*, *Antrodia cin-namonea*) 又称牛樟菇、牛樟芝、樟内菇、红樟菇等, 是一种珍稀的药用菌^[1]。具有保肝、抗肿瘤、抗氧化、免疫调节、解毒、抗炎等功效^[2], 有很好的药用价值, 近年来已逐渐成为国内外研究和开发的热点。

三萜类物质为樟芝的主要活性成分之一, 具有明确的抗肿瘤等药理作用。Cheng 等在樟芝子实体的提取物中发现 7 种新的以麦角甾烷和羊毛甾烷为骨架的三萜类化合物^[3]; 据报道, 从樟芝子实体中提取的甾类化合物 zhankuic acid A 对 P388 鼠白血病细胞有明显的抑制作用^[4]; 樟芝菌丝体三氯甲烷提取物 Maleic2、Maleic3 在体外对小鼠 Lewis 肺癌细胞有明显的抑制作用^[5]; Hseu 等报道樟芝菌丝体水提取物对白血病 HL-60 细胞有明显的细胞毒性^[6]。由于樟芝是台湾特有的珍稀野生药用真菌, 且专一性地寄生于牛樟树上, 目前还无法进行人工栽培, 难以获得樟芝的子实体, 利用液态深层发酵大量获得樟芝菌丝体来取代樟芝子实体是目前最经济、最环保的方法, 且所得的菌丝体活性接近子实体^[7]。本实验首次采用高效液相(HPLC)法研究同一溶剂不同方法提取的样品, 并利用相对保留值 α 以及相对保留面积 S_r 等参数对图谱进行分析, 并对提取的样品进行体外抗肿瘤试验, 获得了具有体外抗肿瘤活性组分的提取方法, 为今后开发抗肿瘤辅助药物提供初步的基础研究。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

1.1.1 樟 芝

斜面菌株, 由上海农科院食用菌研究所菌种保藏中心保藏。

1.1.2 细胞株

L1210 小鼠淋巴白血病细胞来自 ATCC, SW620 人肠癌细胞来自 ATCC, 均由本实验室传代。

1.2 试 剂

RPMI1640 培养基、胎牛血清、DMSO(二甲基亚砷)均购于 GZBCO 公司; 青霉素、链霉素、5-Fu(5-氟脲嘧啶)均购于 Amersco 公司; Alamar Blue 试剂购于 Biosource 公司)。其他均为分析纯试剂。

1.3 仪 器

Eppendorf Centrifuge 5415D; Centrifuge 5810R 离心机、BP3100S 电子天平(Sartorius 公司); WATERS 2695 alliance 高效液相色谱仪(WATERS 公司); 二氧化碳培养箱(Thermo Forma 公司); Synergy HT 酶标仪(BIO-TEK 公司); 显微镜、细胞计数仪(BECKMAN-COULTER 公司)。

1.4 培养基条件

斜面培养基(质量浓度): 20% 土豆, 2% 葡萄糖, 1% 琼脂。

液体种子培养基(质量浓度): 20% 土豆, 2% 葡萄糖。

发酵培养基(质量浓度): 4% 葡萄糖, 0.6% 豆饼粉, 0.05% $MgSO_4$, 0.1% K_2HPO_4 , V_{B1} 100mg/L, pH 自然。

肿瘤细胞培养基: 在 RPMI1640 培养基中加 10% 加热灭活的小牛血清, 100 IU/mL 青霉素, 100 μ g/mL 链霉素和 0.44g/L 的谷氨酰胺。

1.5 方 法

1.5.1 种子液的制备

樟芝菌株复壮后, 制备一级种子液, 按 20% 的质

第一作者: 硕士研究生(贾薇为通讯作者)。

收稿日期: 2008-07-09

量浓度接种量制备二级种子液。

1.5.2 菌丝体的收集

将二级种子液接入发酵培养基中,接种量为20%,装液量为100 mL/250 mL三角瓶,转速100 r/min,26℃恒温培养6 d,发酵结束后,发酵液用滤布过滤,菌丝用蒸馏水洗5~6次,收集菌丝于65℃烘箱烘干。

1.5.3 樟芝菌丝体粗三萜提取方法

(1)1 g 樟芝菌丝体样品中加50 mL 甲醇静置12 h,过滤。

(2)1 g 樟芝菌丝体样品中加50 mL 乙醇静置12 h,过滤。

(3)1 g 樟芝菌丝体样品中加50 mL 甲醇超声波提取3 h,过滤。

(4)1 g 樟芝菌丝体样品中加50 mL 体积分数为95%的乙醇超声波提取3 h,过滤。

(5)1 g 樟芝菌丝体样品中加入50 mL 蒸馏水沸水浴3 h,过滤。

(6)1 g 樟芝菌丝体样品中加入50 mL 5%的NaHCO₃溶液超声波提取3 h,离心机4 000 r/min离心5 min。

将不同方法提取的浸提液分别取5 mL,水浴蒸干,加1.0 mL 色谱级甲醇溶解,1×10⁴ r/min离心5 min,取上清进行HPLC分析。

1.5.4 高效液相(HPLC)条件

色谱柱条件:YMC-ODS-AQ C18柱(46 mm×

300 mm,5μm),

流动相:A(V(甲醇):V(冰醋酸)=99:1;B为V(蒸馏水):V(冰醋酸)=99:1;A:B=48:52,柱温:30℃,时间:60min,流速为1 mL/min,进样量:5μL,检测波长254nm,洗脱时间60min。

1.5.5 不同浓度乙醇提取方法

分别取1 g 菌丝体样品加入50 mL 不同浓度的乙醇按以下方法提取,过滤,取上清液水浴蒸干,计算提取物干重。

A:70%乙醇超声波提取3 h; B:80%乙醇超声波提取3 h; C:95%乙醇超声波提取3 h; D:80%乙醇浸提12 h; E:80%乙醇浸提18 h; F:80%乙醇浸提24 h。

1.5.6 肿瘤细胞生长抑制试验^[8]

2 结果与分析

2.1 樟芝菌丝体提取方法的比较

对采用6种方法提取的菌丝体提取物进行HPLC分析,结果如图1所示。用甲醇静置过夜(1)、乙醇静置过夜(2)、甲醇超声波提取(3)和95%的乙醇超声波提取(4)的提取物HPLC图谱中峰的高度基本相同,峰数也基本相同,各峰的分离度也好,而用沸水和NaHCO₃提取,峰比较少,峰高比较矮,分离度不好,又考虑到甲醇较乙醇毒性更强的特点,本试验就采用乙醇超声波提取法。另外,由于樟芝中的多数三萜特有吸收峰在250nm左右,因此在HPLC试验中选择了254nm的UV检测波长(以下实验同)。

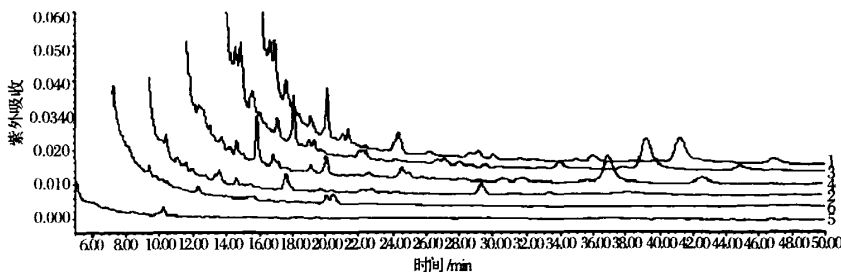


图1 樟芝菌丝体提取方法 HPLC 图谱

2.2 不同浓度乙醇提取方法的比较

由图2可知,即使是同一种溶剂,不同浓度和不同的提取时间所得的三萜产量是不同的,95%乙醇超声波(C)提取的三萜产量最高,在1 g 菌丝体中可以提取获得25.24 mg的三萜(以齐墩果酸计)。为以后进一步分离纯化三萜类化合物提供理论依据。

樟芝菌丝体样品在上述实验条件下,其色谱峰较密集,见图3。因此,在色谱图上选择一个特定色谱

峰,该峰应具有位于色谱图较中心位置、较高的强度及为所有样品所共有的特征,以此峰作为参考峰,在此基础上求出其他所有色谱峰的相对保留值。其计算公式为: $\alpha = t_{ri} / t_{rs}$ 。其中 t_{ri} 为待测峰的绝对保留时间, t_{rs} 为参考峰的绝对保留时间。相对面积计算公式为: $S_i / \% = (\text{待测峰 } i \text{ 的相对面积} / \text{标准样品的总面积}) \times 100$ 。我们选取了6 min以后相对面积大于1的图谱进行分析,其中,80%乙醇浸提24 h方

法提取的三萜样品的液相色谱图谱如图 4 所示。

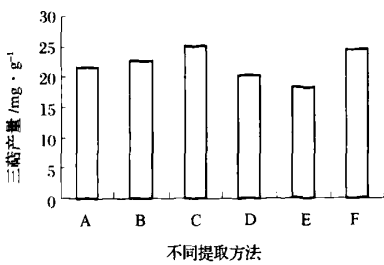


图 2 不同提取方法提取三萜的产量

基于 80%乙醇浸提 24h 方法提取物的色谱峰总面积较大,峰数较多且具有代表性,将其指定为标准,以求出待测峰 i 的相对面积。将样品中各组分的相对保留值 α 按大小排列,并在每个 α 值项下标出该组分的相对面积 S_i ,再将不同样品中具有相同 α 值的 S_i 做比较分析如表 1 所示。表中无对应的相对面积 S_i 时表示该样品不具有该 α 值的色谱峰。这样,将样品中各组分的相对保留值 α 按大小排列,并在每个 α 值项下标出该组分的相对面积 S_i ,就组成了樟芝菌丝体提取物的指纹图谱的相对保留值表,见表 1。

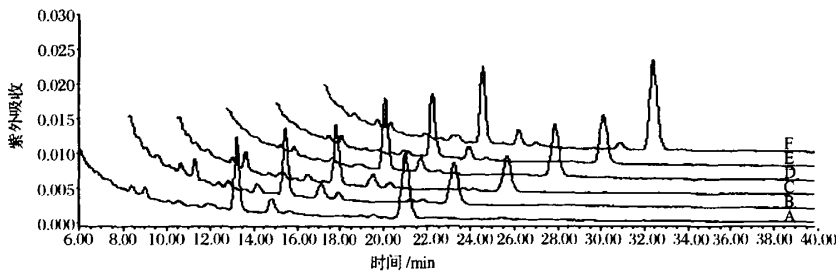


图 3 不同浓度乙醇及不同提取时间提取的菌丝成分的 HPLC 图谱

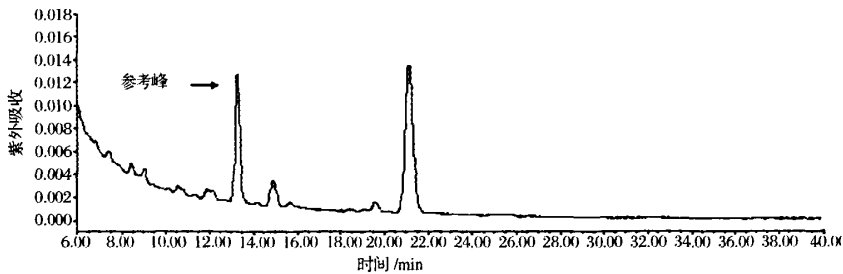


图 4 80%乙醇浸提 24 小时后樟芝菌丝体样品的液相色谱图谱

表 1 六种不同方法提取的三萜 HPLC 指纹图谱分析

α	S_i					
	A	B	C	D	E	F
0.63	0.001 8	—	—	0.001 5	0.001 4	—
0.64	0.004 2	—	—	—	—	0.001 2
0.68	0.003 5	—	—	0.002 0	0.002 1	0.001 5
0.69	—	0.004 2	0.001 4	—	—	—
0.80	0.000 15	—	—	—	—	0.000 91
0.90	0.002 5	0.001 5	—	—	0.001 7	0.001 8
1.00	0.017 3	0.020 7	0.236 7	0.020 2	0.021 4	0.016 8
1.12	0.004 2	—	—	0.004 2	—	0.003 6
1.13	0.005 2	—	0.005 1	—	—	—
1.58	0.015 4	—	—	0.026 4	—	—
1.59	—	0.018 0	0.026 1	—	0.025 0	0.029 1
总峰数	10	9	4	6	6	8

2.3 抑制肿瘤细胞生长试验结果

2.3.1 对小鼠淋巴白血癌细胞 L1210 的抑制作用

由图 5 可以看出,在 $10\mu\text{g/mL}$ 时,除了 D 方法提取物对 L1210 没有抑制作用外,其他的对 L1210 都有抑制作用,但抑制作用不明显;在 $50\mu\text{g/mL}$ 时, A、D、E、F 四种方法提取物对 L1210 均有较强的抑制作用,抑制率超过了 50%,而 B、C 两种方法的提取物对 L1210 的抑制作用不明显;在 $200\mu\text{g/mL}$ 时,除了 B 外,其他方法提取物对 L1210 的抑制作用都很强,并且 E 的抑制率超过了阳性对照 5-FU,但在此浓度下,显微镜观察所有样品均有析出现象,可能会对测试结果有影响。

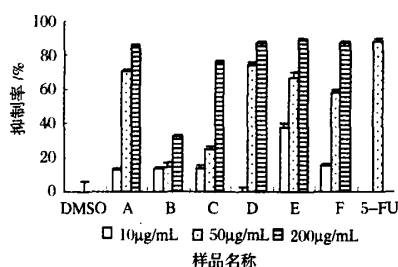


图 5 樟芝菌丝体不同浓度乙醇及不同时间提取物对 L1210 的抑制作用

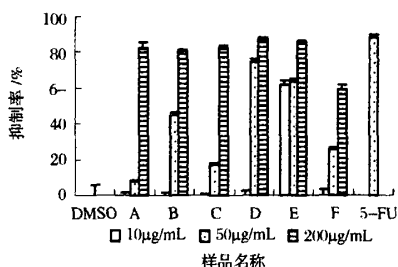


图 6 樟芝菌丝体不同浓度乙醇及不同时间提取物对 SW620 的抑制作用

2.3.2 对肠癌细胞 SW620 的抑制作用

由图 6 可以看出,在 $10\mu\text{g/mL}$ 时,只有 E 方法提取的样品对 SW620 有抑制作用外,其余的对 SW620 都没有抑制作用;在 $50\mu\text{g/mL}$ 时, D、E 2 种方法提取的三萜组分对 SW620 的抑制率超过了 50%,而 A、B、C、F 四种方法提取的三萜组分对 SW620 的抑制作用不明显,抑制率没有超过 50%;在 $200\mu\text{g/mL}$ 时,除了 F 外,其他方法提取的三萜组分对 SW620 的抑制作用都很强,并且 D 的抑制率接近阳性对照 5-FU,同 L1210 实验一样,在此浓度下,显微镜观察所有样品均有析出现象,可能会对测试结果

果有影响。

3 结 论

(1)通过不同溶剂提取樟芝菌丝体试验及 HPLC 图谱可以看出,不同的溶剂提取物的峰的高度有所不同,峰数也不太相同,各峰的分离度都很好。甲醇静置过夜(1)、甲醇超声法(3)和 95%的乙醇超声波(4)等提取物的 HPLC 图谱中峰的高度基本相同,峰数也基本相同,各峰的分离度也好。又考虑到甲醇较乙醇毒性更强的特点,本试验就采用乙醇超声波提取法。

(2)通过不同浓度乙醇提取菌丝体实验可知,即使是同一种溶剂,不同浓度和不同的提取时间所得的三萜产量是不同的,95%乙醇超声波(C)提取的三萜产量最高,在 1g 菌丝体中可以提取出 25.24 mg 的三萜,这为以后进一步分离纯化三萜类化合物提供理论依据。

(3)在对 HPLC 图谱研究的样品中,具有相同相对保留值 α 的峰,即为色谱图谱共有峰。从表 1 中的图谱可以看出,相对保留值 α :1.0 时为 A~F 6 种不同方法提取的三萜的共有的 100%峰,可知这六种不同的方法可以提取相同的成分。含量较高的峰都集中在 α 值为 0.68~1.59。这也为今后进一步分离纯化樟芝乙醇提取物提供理论依据。

(4)从体外抗肿瘤试验结果可以看出,在 $10\mu\text{g/mL}$ 时, A、B、C、D、E、F 6 种方法提取的三萜组分对 L1210 和 SW620 都有抑制作用,但抑制作用不明显;在 $50\mu\text{g/mL}$ 时, D、E 2 种方法提取的三萜组分对 L1210 和 SW620 的抑制率超过了 50%。

参 考 文 献

- 宋爱荣. 台湾樟芝对碳素营养源利用的研究[J]. 中国食用菌, 2002, 21(5): 41~43
- 浦跃武, 熊冬生. 樟芝的研究及其应用[J]. 中国医院药学杂志, 2005, 25(2): 171~173
- Cheng I H, Wu D P, Chiang H C. Triterpenoid from *antrodia camphorata*[J]. *Phytochemistry*, 1996, 41(1): 263~267
- You Cheng Hseu, Weng Cheng Chang, Yi Ting Hseu, et al. Protection of oxidative damage by aqueous extract from *Antrodia camphorata* mycelia in normal human erythrocytes[J]. *Life Science*, 2002, 71(4): 469~482
- Chen CH, Yang SW, Shen YC. New steroid acids from *Antrodia cinnamomea*. a fungal parasite of *Cinnamomum*

- micranthum* [J]. *J NatProd*, 1995, 58(11): 1 655~1 661
- 6 孟繁岳, 车会莲, 杜 杰, 等. 樟芝抑瘤作用及对荷瘤小鼠免疫功能的影响[J]. *中国公共卫生*, 2005, 21(10): 1 224~1 225
- 7 宋爱荣, 田雪梅. 不同装瓶量对樟芝液体深层培养的影响[J]. *新疆大学学报(自然科学版)*, 2004(增刊), 21(Z1): 131~133
- 8 Zhang JS, Tang QJ, Martin Zimmerman-Kordmann, et al. Activation of B lymphocytes by GLIS, a bioactive proteoglycan from *Ganoderma lucidum* [J]. *Life Science*, 2002, 71, 623~638

Extraction Conditions for *Mycelia of Antrodia camphorata* from Submerged Fermentation Liquid and Its Antitumor Activity

Liu Hua^{1,2}, Jia Wei¹, Zhang JinSong

1(Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, 201106 Shanghai, China)

2(College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, 210095 Nanjing, China)

ABSTRACT We extracted mycelia of *Antrodia camphorata* by different methods, and analyzed using HPLC. The results showed that the best extracted solvent was ethanol. We also extracted mycelia of *Antrodia camphorata* by using ethanol at different concentration and at different extracting time. Results showed that the highest production of extracted triterpenes was about 25.24mg per one gram mycelium by 95% ethanol. Ultrasonic Antitumor activity test in vitro showed that the extraction from submerged mycelium of *Antrodia camphorata* produced a prominent anti-tumor activity on L1210 (murine lymphoid leukemia) and SW620 (adenocarcinoma), at 50 μ g/mL, 80% ethanol extracted for 18 hours.

Key words *Antrodia camphorata*, mycelia, ethanol, antitumor activity

政策法规标准

欧盟通过 10% 的生物燃料掺混政策

欧盟决定把 2008 年 12 月中旬通过的燃料质量指导方案中的 B5 标准提高到 B7 标准。欧盟标准化委员会将于 2009 年 6 月发布调整后的标准, 为成员国调整标准铺平道路。燃料质量指导方案将在未来 10 年内逐渐采用气候变化削减目标, 而未来 2 年内新的掺混标准将在成员国中实施。

欧盟将实施 10% 的生物燃料掺混目标, 取代了 2010 年掺混目标 5.75%。欧洲国会 2008 年 12 月 17 日通过的再生能源指导政策定义了 20—20—20 计划, 即要求到 2020 年温室气体比 1990 年减少 20%, 到 2020 年欧盟再生燃料用量提高 20%, 到 2020 年能源消费减少 20%。

行业动态

适用于葡萄酒的容器内壁无毒防腐涂料获中国卫生部许可

由中国海洋化工研究院承担的科技部科研院所专项资金“大型容器内壁无溶剂无毒长效防腐涂料的研究”项目所形成的产品, 通过了山东省疾病预防控制中心和中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所卫生安全性检验, 并经国家卫生部审核, 产品符合《生活饮用水卫生监督管理办法》的有关规定, 取得了卫生部颁布的中华人民共和国卫生部国产涉及饮用水卫生安全产品卫生许可批件。

该产品适用于化学品贮罐、贮水罐(池)的碳钢、不锈钢、铝和混凝土等结构的防腐保护。特别适用于食品饮料加工罐、槽的内壁防腐保护, 如啤酒发酵罐、麦芽槽和黄酒、葡萄酒、中、低度白酒、饮用水、果汁、酱油、食用醋、植物油以及原油、汽油、柴油等石油产品贮罐(池)内壁的防腐保护。近年来, 该产品经饮食酿造、输配(饮用)水设备、发电厂海水淡化装置、建筑(无毒防水)等行业 60 多个厂家近 20 万 m² 的实际应用, 其防腐性能优异。