

栽培杨黄不同提取物对 H₂₂ 荷瘤小鼠的抗肿瘤作用及机理

和生¹, 包海鹰¹, 魏颖¹, 刘颖¹, 刘杰²

1 吉林农业大学 药用菌物资源及开发利用重点研究室, 吉林 长春 130118

2 延边兴林生物科技有限公司, 吉林 延边 133000

和生, 包海鹰, 魏颖, 刘颖, 刘杰. 栽培杨黄不同提取物对 H₂₂ 荷瘤小鼠的抗肿瘤作用及机理. 生物工程学报, 2022, 38(3): 1025-1038.

HE S, BAO HY, WEI Y, LIU Y, LIU J. Antitumor effect and mechanism of different extracts of cultivated *Phellinus vaninii* on H₂₂ tumor bearing mice. Chin J Biotech, 2022, 38(3): 1025-1038.

摘要: 为探讨栽培杨黄子实体不同提取物对 H₂₂ 荷瘤小鼠的抑瘤作用及机制, 将 150 只 ICR 小鼠随机分为空白组、模型组、CTX 组、杨黄水提取物组、乙醇提取物组、石油醚提取物组及粗多糖组。采用 H₂₂ 肝癌细胞建立实体瘤模型, 给药第 10 天处死小鼠, 计算脾、胸腺脏器指数及抑瘤率, 检测血清中 TNF- α 、INF- γ 、VEGF 及苏木精-伊红和免疫组化染色法观察肿瘤组织病理变化, 同时 Western blotting 检测肿瘤相关蛋白表达。结果表明, 石油醚提取物的高剂量组抑瘤率 (73.21%) 最好, 且血清中的 TNF- α 、INF- γ 、VEGF 的含量升高; 能显著促进肿瘤组织坏死、消融等现象。水提物组免疫组化则出现负调控, 表现出抑瘤率不显著。Western blotting 结果表明, 与模型组相比各给药组的凋亡基因 *Caspase-3*、*Caspase-9* 和通路基因 *NF- κ B*、*JAK* 均高表达, 且随剂量的递增表达量逐渐降低。综上所述, 杨黄子实体石油醚提取物抑瘤效果显著, 其作用机理可能是通过线粒体途径实现, 药物经体内代谢后, 引起细胞中 Bax、Bcl-2、TNF 等激活 *Caspase-3* 和 *Caspase-9* 凋亡蛋白, 引起细胞核染色质或 DNA 凝聚或降解, 破坏肿瘤细胞的正常增殖, 从而诱导其凋亡, 抑制肿瘤的生长。

关键词: 瓦尼木层孔菌; 细胞凋亡; *Caspase-3*; *Caspase-9*; 免疫组化染色; Western blotting

Received: March 5, 2021; Accepted: June 8, 2021; Published online: June 21, 2021

Supported by: The Crosswise Project of Yanbian Xinglin Biotechnology Limited Company (0207-202022978)

Corresponding author: BAO Haiying. Tel: +86-431-84533295; E-mail: baohaiying2008@126.com

基金项目: 吉林延边州兴林生物科技有限公司横向课题 (0207-202022978)

Antitumor effect and mechanism of different extracts of cultivated *Phellinus vaninii* on H₂₂ tumor bearing mice

HE Sheng¹, BAO Haiying¹, WEI Ying¹, LIU Ying¹, LIU Jie²

1 Engineering Research Center of Chinese Ministry of Education for Edible and Medicinal Fungi, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin, China

2 Yanbian Xinglin Biotechnology Limited Company, Yanbian 133000, Jilin, China

Abstract: In order to explore the antitumor effect and mechanism of different extracts of cultivated *Phellinus vaninii* fruit body on H₂₂ tumor bearing mice, 150 ICR mice were randomly divided into blank group, model group, CTX group, *P. vaninii* water extract group, ethanol extract group, petroleum ether extract group and crude polysaccharide group. H₂₂ liver cancer cells were used to establish a solid tumor model and the mice were sacrificed on the 10th day after administration. The spleen and thymus organ index and tumor inhibition rate were calculated, the serum levels of TNF- α , INF- γ , VEGF, and hematoxylin-eosin were detected, and the immunohistochemical staining method was used to observe the pathological changes of tumor tissues, while Western blotting was used to detect the expression of tumor-related proteins. The high-dose petroleum ether extract group showed the best tumor inhibition rate (73.21%), increased serum levels of TNF- α , INF- γ , and VEGF, as well as significantly promoted tumor necrosis and ablation. The immunohistochemistry of the water extract group showed negative regulation, indicating an insignificant tumor suppression. Western blotting showed the apoptosis genes *Caspase-3*, *Caspase-9* and pathway genes *NF- κ B* and *JAK* were all highly expressed in each administration group compared with the model group, and their expression levels gradually decreased with increasing doses. In summary, the petroleum ether extract of *P. vaninii* fruit body showed a significant anti-tumor effect which is presumably mediated through the mitochondrial pathway. The metabolism of drug in the body induces activation of *Caspase-3* and *Caspase-9* apoptotic proteins by Bax, Bcl-2, and TNF, which further caused nuclear chromatin or DNA to condense or degrade, and subsequently destroy the normal proliferation of tumor cells, thereby inducing their apoptosis and inhibiting tumor growth.

Keywords: *Phellinus vaninii*; cytotoxicity; *Caspase-3*; *Caspase-9*; immunohistochemistry; Western blotting

肿瘤是危害人体健康且不易治疗的恶性疾病之一,具有生长速度快、治疗难度大等特点,因此抑制肿瘤药物的研究也成为当代社会研究的热点^[1]。据文献报道,到2020年,世界预计有1 810万例新癌症病例,有近1 000万例癌症患者死亡(除了黑色素瘤皮肤癌外)。其中女性

乳腺癌已经超过肺癌成为最为常见的癌症病例,预计有230万例新增病例(11.7%),其次为肺癌(11.4%)、结直肠癌(10.0%)、前列腺癌(7.3%)、胃癌(5.6%),其中肺癌依旧是导致癌症死亡的主要原因,估计有180万人死亡(18%),其次结直肠癌(9.4%)、肝癌(8.3%)、

胃癌 (7.7%) 和女性乳腺癌 (6.9%), 预计到 2040 年, 全球癌症负担将达到 2 840 万例, 比 2020 年增加 47%^[2]。截至目前, 癌症致死率仍显著升高, 严重危害人体健康, 因此通过药物抑制或者杀死肿瘤细胞等方式降低肿瘤的危害, 也是现代医学界亟待解决的问题。

杨黄 (*Phellinus vaninii* Ljub), 学名为瓦尼木层孔菌, 隶属于担子菌门 (Basidiomycota), 蘑菇纲 (Agaricomycetes), 锈革孔菌目 (Hymenochaetales), 锈革孔菌科 (Hymenochaetaceae), 木层孔菌属 *Phellinus*^[3], 多寄生于山杨 (*Populus davidiana* Dode) 的多年生大型真菌。据我国延边朝鲜族民间记载, 杨黄在民间被当地人作为一种中药来使用, 且常与其他一些传统中药配合使用, 其最早以桑黄记载于《东医宝鉴》, 其味甘, 性平, 主肠风泻血, 及妇人腹痛崩中漏下赤白^[4]。延边朝鲜将其作为桑黄的代用品来使用。杨黄中含有多糖^[5-6]、黄酮^[7]、甾醇^[8]类等化学成分, 现代研究表明, 杨黄具有抗肿瘤、抗氧化、增强免疫等功效^[9-10], 但对其抗肿瘤机理尚不明确。本研究在野生杨黄子实体研究的基础上主要探究了栽培杨黄不同提取物对 H₂₂ 肝癌小鼠的抗肿瘤作用及其存在的机理。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

3 年生栽培杨黄子实体, 由兴林生物科技有限公司提供, 由吉林农业大学包海鹰鉴定。

通用显影粉、酸性定影粉 (天津天陆海感光材料厂); 环磷酰胺 (cytoxan, CTX, 山西普德药业); 胎牛血清 (美国 Hyclone 公司); RPMI-1640 细胞培养液 (美国 Gibco 公司); 双抗 (以色列贝特海默克生物产业有限公司); 胰蛋白酶 (以色列贝特海默克生物产业有限公司); 4%台盼蓝 (上海碧云天生物技术有限公司);

生理盐水 (黑龙江科伦制药有限公司); IL-2、TNF- α 、VEGF 酶联免疫试剂盒 (吉林华纳德科技有限公司); 一抗 (圣克鲁斯生物技术有限公司); 二抗 (北京百奥莱博科技有限公司); H&E 染色剂 (上海多烯生物科技有限公司); DAB 显色试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司); Caspase-3、Caspase-9、P-Akt (Abcam)、Akt、Nf-kb、JAK、Actin 蛋白 (北京中杉)。

1.2 主要仪器

旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂, 型号: RE-52AA), HH-4 数显恒温水浴锅 (常州市江南实验仪器厂, 型号: HH-4), 电子天平 BSA124S-CW (德国 Sartorius 公司), 显微镜 (日本奥林巴斯, 型号: BX51T-PHD-J11), 多功能真彩色细胞图像分析管理系统 (美国, Media Cybernetics 公司 Image-Pro Plus), 石蜡切片机 (德国莱卡, 型号: RM2015), 离心机 (德国, 型号: Eppendorf-5430), 二氧化碳恒温培养箱 (北京昊诺斯科技有限公司), 酶标仪 ELX800 (BioTek Instruments, Inc.), 组织包埋机 (德国 LEICA 公司, 型号: EG 1150C), -80 °C 低温冰箱 (青岛, 海尔), 医用 X 射线胶片 (柯达公司, 美国), 高速离心机 (Eppendorf 公司, 德国), 转移脱色摇床 (海门其林贝尔仪器制造公司 TS-8), 电泳仪、垂直电泳槽 DY CZ-20C、转移槽 DYCP-40C (北京六一仪器厂)。

1.3 实验动物

动物: 健康无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级美国癌症研究所 (Institute of Cancer Research, ICR) 雌性小鼠, 体重 20-22 g, 购自辽宁长生生物技术股份有限公司, 动物许可证号: SCXK (辽) 2015-0001 (吉林农业大学实验动物福利与伦理委员会, 2020-1203-009), 饲养环境参考国际动物委员会相关规定饲养: 温度 20-25 °C, 相对湿度 40%-70%。

1.4 实验方法

1.4.1 药物的制备

蒸馏水煎煮杨黄子实体 3 h, 纱布过滤, 重复提取 3 次, 合并滤液水浴蒸干, 获得杨黄子实体水提物; 水提醇沉法提取杨黄子实体多糖, 然后利用 Sevage 法 (氯仿: 正丁醇=5:1) 除蛋白, 获得杨黄粗多糖; 70%乙醇回流提取 6 h, 重复提取 3 次, 合并 3 次滤液, 滤纸过滤, 水浴蒸干, 获得乙醇提取物; 石油醚回流提取 3 次, 每次 6 h, 旋转蒸发仪回收石油醚, 挥发干获得石油醚提取物。

1.4.2 H₂₂ 肝癌小鼠的模型建立

复苏 H₂₂ 肝癌细胞, 传代培养, 传代 5-6 代细胞稳定后, 待细胞长满整个培养瓶时, 用胰蛋白酶消化贴壁细胞, 用生理盐水调节细胞浓度, 注入小鼠腹腔, 每只小鼠 0.4 mL, 制备腹水肝癌小鼠模型, 待 8-10 d 后, 小鼠腹部肿胀, 然后在超净工作台中无菌抽取腹水至 15 mL 的离心管, 生理盐水调节细胞浓度, 再次注入小鼠腹腔, 同法传代 3 代以后, 腹水细胞活性强且死细胞较少, 取传代 3 代的腹水瘤细胞, 生理盐水调节细胞浓度, 4%台盼蓝染色进行细胞计数, 最终调节的细胞浓度活细胞为 1×10^6 个/mL, 然后将调节后的腹水细胞每只按 0.2 mL 接种于 140 只小鼠左前肢腋窝, 建立 H₂₂ 荷瘤模型^[11]。

1.4.3 分组及给药

将 150 只 ICR 小鼠随机分为 15 组, 留取 10 只小鼠作为空白组 (B 表示), 其余的 140 只接种 H₂₂ 肝癌细胞建立肿瘤小鼠模型, 然后随机分为 14 组每组 10 只, 即模型组 (M 表示), 阳性组 (CTX 表示), 水提物高、中、低剂量组 (以 W-L、W-M、W-H 表示, 剂量分别为 250、500、1 000 mg/kg), 乙醇提取物组高、中、低 (以

E-L、E-M、E-H 表示, 剂量分别为 50、100、200 mg/kg), 石油醚提取物组高、中、低 (以 Pe-L、Pe-M、Pe-H 表示, 剂量分别为 50、100、200 mg/kg), 多糖组高、中、低 (以 P-L、P-M、P-H 表示, 剂量分别为 50、100、200 mg/kg)。模型组按 0.02 mL/g 的给药体积灌胃给予等体积的生理盐水, 阳性组按 0.01 mL/g 的给药体积腹腔注射等体积的环磷酰胺, 其他给药组按 0.02 mL/g 的给药体积给予各提取物。

1.4.4 抑瘤率和脏器指数

解剖连续灌胃给药 10 d 的 H₂₂ 荷瘤小鼠, 取肿瘤、胸腺和脾脏称重, 计算各给药组对小鼠肿瘤的抑制率, 以及胸腺和脾脏指数的变化情况。

$$\text{脏器指数 (mg/g)} = \frac{\text{小鼠脏器重量 (mg)}}{\text{小鼠体重 (g)}}$$

$$\text{抑瘤率 (\%)} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A: 模型组平均瘤重; B: 给药组平均瘤重。

1.4.5 苏木精-伊红染色观察肿瘤组织

肿瘤组织称重后 4%甲醛固定, 用不同体积分数的乙醇脱水后石蜡包埋, 然后使用石蜡切片机以 4-5 μm 的厚度切片, 再使用苏木精-伊红 (H&E) 染色后封片, 选取病变组织拍照记录。

1.4.6 免疫组化染色检测 Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达

取小鼠肿瘤组织, 4%甲醛固定, 乙醇梯度脱水, 浸蜡包埋、切片, 然后按照免疫组化试剂盒说明进行检测^[12]。通过显微镜采图, 以出现棕色区域划分显色强度等级, 棕色区域显阳性, 无颜色 (蓝色) 则为阴性。强阳性 (+++), 阳性细胞 >50%; 中度阳性 (++) , 阳性细胞在 30%-50%之间; 弱阳性 (+), 阳性细胞 5%-30%之间; 无阳性 (-), 阳性细胞 <5%^[11-12]。

1.4.7 小鼠血清中 IL-2、TNF- α 、VEGF 水平的测定

小鼠眼球取血，将血清置于冰盘放置 30 min，以 3 000 r/min 离心 15 min，吸取上清液至 2 mL 的 EP 管中，取小鼠血清使用酶联免疫试剂盒 (ELISA) 按说明书检测小鼠血清中白细胞介素 2 (IL-2)、干扰素 α (TNF- α)、血管内皮生长因子 (VEGF) 的表达水平。

1.4.8 Western blotting 检测肿瘤组织 Caspase-3、Caspase-9、JAK、Akt、Nf- κ B 蛋白的表达

剪取肿瘤组织 20–30 mg，用 PBS 洗涤，加入细胞裂解液 (每 20 mg 组织加 200–400 mL 的细胞裂解液) 提取肿瘤组织总蛋白，用考马斯亮蓝法测定各组肿瘤组织中的蛋白含量浓度，用化学发光试剂曝光显影，扫描片，蛋白相对表达量以灰度值比值表示，记录采图拍照。

1.5 数据处理

使用 SPSS 21.0 统计软件分析数据。按方差分析进行 ANOVA 分析，检查方差齐性，计算 P 值， $P < 0.05$ 在统计学中有显著差异； $P < 0.01$ 在统计学中有极显著差异； $P > 0.05$ 在统计学中无显著差异。

2 结果与分析

2.1 杨黄子实体不同提取物对肿瘤小鼠的影响

接种 H₂₂ 肝癌肿瘤细胞后小鼠觅食和饮水均未出现异常，小鼠皮毛未出现异常，接瘤 3 d 后，M 组小鼠肿瘤开始迅速生长，局部出现肿大现象，且体重快速增长，小鼠行为活动渐为倦怠，皮毛失去光泽，说明造模成功；CTX 组个别小鼠面部出现肿胀现象，阳性药对小鼠起到抑瘤作用的同时对小鼠产生毒副作用，其中 CTX 组小鼠肿瘤与 M 组相比，其生长速度较为

缓慢；P 组和 E 组小鼠行为活动较水提组活跃，且体重增长较 M 组和 W 组缓慢；Pe 组小鼠肿瘤生长最为缓慢，体重增长也最为缓慢，且小鼠行为活动较为活跃。其中，能明显看到石油醚组 (Pe) 小鼠肿瘤最小，水提物组 (W) 小鼠肿瘤较大，其水提物抑瘤效果较差，其他组肿瘤大小如图 1 所示。

2.2 杨黄提取物的肿瘤抑制率和脏器指数

杨黄不同提取物对 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤均有一定的抑制作用。其中抑瘤效果较好的为 Pe-H 组 (73.21%)、Pe-M 组 (69.61%)、Pe-L 组 (61.90%)。从给药前后小鼠体重重变化来看，与 CTX 组相比，除 M 组、W-L 组、W-M 组和 E-H 组外，其他各组小鼠体重均有降低趋势；与 M 组相比，P-M 组、P-H 组和 Pe-H 组具有显著的降低趋势，其他组均无显著差异 ($P > 0.05$)。给药后，缓解了肿瘤小鼠体重的增长，说明给药组对小鼠肿瘤有一定的治疗效果；从瘤重变化来看，各给药组与模型组相比，各给药组小鼠肿瘤质量极显著降低 ($P < 0.01$)，与 CTX 组相比，除 E-M 组外，其他各组与阳性组均具有显著性。

胸腺指数结果表明，M 组小鼠胸腺指数显著小于 B 组 ($P < 0.05$)，Pe-L 组小鼠胸腺指数显著大于空白组；与 M 组相比，其中 Pe-L 组和 Pe-M 组小鼠胸腺指数极显著升高；与 CTX 组相比，Pe-M 组和 Pe-H 组胸腺指数极显著升高。脾脏指数各组与 B 组相比，除 W-H 组、P-H 组、E-L 组、E-H 组、Pe-M 组和 Pe-L 组显著降低，与模型组相比，B 组、W-M 组、W-H 组，P-H 组，E-L 组、E-H 组、Pe 组小鼠的脾脏指数显著降低；与 CTX 组相比，只有 B 和 Pe-H 组小鼠脾脏指数显著降低，与其他各组无显著差异 ($P > 0.05$)。详细结果见表 1。

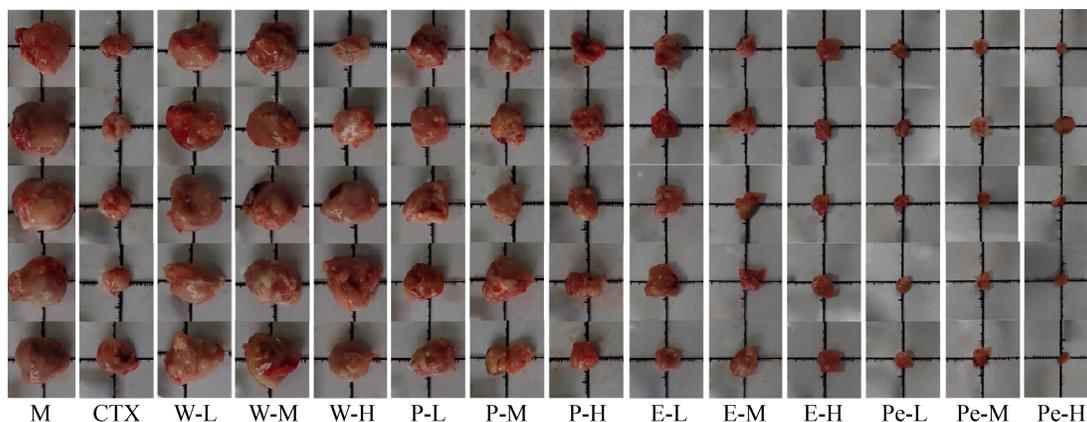


图 1 小鼠肿瘤组织宏观图

Figure 1 Macroscopic picture of tumor tissues in mice.

表 1 杨黄提取物对 H₂₂ 实体瘤荷瘤小鼠的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 1 Effect of the extract of *Phellinus vaninii* on H₂₂ solid tumor bearing mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Groups		Weight gain (g)	Tumor quality (g)	Tumor inhibition rate (%)	Thymus index (mg/g)	Spleen index (mg/g)
Blank group		7.26±0.67 ^{△△}	—	—	4.67±1.05 [#]	5.37±0.58 ^{##△}
Model group		6.06±1.12 [△]	1.68±0.14 ^{△△}	—	2.94±1.83 [*]	10.72±1.90 ^{**}
CTX group		4.46±1.42 ^{***}	0.82±0.10 ^{##}	51.19	3.29±0.29 [#]	8.41±1.78 [*]
Water extraction group	L	5.70±1.45	1.98±0.11 ^{###△}	0	3.77±0.85	9.49±1.97 ^{**}
	M	5.79±0.84	1.89±0.10 ^{###△}	0	4.07±1.69	8.04±1.67 [#]
	H	5.67±1.20 [*]	1.78±0.09 ^{###△}	0	5.21±1.40 ^{#△}	7.05±1.82 ^{##}
Polysaccharide group	L	4.54±1.18 ^{**}	1.27±0.08 ^{###△}	24.40	4.21±1.98	9.03±1.53 ^{**}
	M	4.30±0.43 ^{***}	1.21±0.09 ^{###△}	27.98	3.59±1.37	9.74±1.46 ^{**}
	H	4.37±0.33 ^{***}	1.06±0.05 ^{###△}	36.90	4.07±0.87	6.69±1.03 ^{##}
Ethanol extraction group	L	4.71±0.68 ^{**}	0.99±0.09 ^{###△}	41.07	5.16±0.66 ^{#△}	7.39±1.90 [#]
	M	5.41±1.32 ^{**}	0.82±0.06 ^{##}	51.19	4.75±1.29 [#]	8.38±1.56 [*]
	H	5.95±0.74	0.75±0.09 ^{###△}	55.36	4.49±1.89	7.61±1.68 [#]
Petroleum ether extraction group	L	4.72±1.39 ^{**}	0.64±0.04 ^{###△}	61.90	5.63±1.62 ^{###△}	5.68±0.69 ^{###△}
	M	5.52±0.42 [*]	0.51±0.06 ^{###△}	69.61	7.42±1.24 ^{***###△}	6.36±1.25 ^{**##}
	H	3.95±1.83 ^{***}	0.45±0.02 ^{###△}	73.21	3.77±0.94	6.43±1.23 ^{##}

Note: compared with the blank group, ^{*}: $P < 0.01$, ^{**}: $P < 0.05$; compared with the model group, [#]: $P < 0.05$, ^{##}: $P < 0.01$; compared with the positive group, [△]: $P < 0.05$, ^{△△}: $P < 0.01$.

2.3 肿瘤组织 HE 染色

HE 染色后在高倍镜 (400×) 下观察结果可见: 各组小鼠肿瘤组织均出现大面积的空泡或空隙, 其中 CTX 组和 Pe 组最为明显, M 组细胞生长旺盛, 细胞排列紧密, 部分组织细胞内有胞质变性、大面积空泡现象 (图 2); CTX

组肿瘤组织细胞排列疏松, 并且组织细胞呈现不规则型, 有大面积的空隙或空泡以及坏死或消融现象; Pe 组的 3 个剂量组肿瘤组织细胞均出现大面积的空隙, 呈现片状坏死或消融现象, 其中中剂量和高剂量组尤为明显, 说明杨黄石油醚提取物对肿瘤细胞有明显的杀伤作用, 能

明显抑制肿瘤细胞的增殖。

2.4 肿瘤组织 Bax 和 Bcl-2 免疫组化染色结果

杨黄各提取物对凋亡基因 Bax 蛋白均有一定的激活作用, Bax 促凋亡基因蛋白的表达随剂量的增加逐渐增强, Bcl-2 抗凋亡蛋白基因随剂量增大, 表达量逐渐降低 (表 2)。其中 Bax 和 Bcl-2 的比值 W-H 组和 P-H 组最高, 说明在抗肿瘤机理中 Bax 蛋白发挥了主要作用, 促使肿瘤细胞发生凋亡, 但对于 W 组来说, 虽然 Bax 蛋白高表达, 但是抑瘤效果却不佳, 可能杨黄水提物引起 Bax 蛋白发生负调控, 以至于拮抗 Bcl-2 蛋白的表达。

Bax 蛋白染色结果: 各提取物的低剂量组肿瘤组织 Bax 蛋白表达均较弱, 被染区域较少, 说明 Bax 蛋白表达较低。模型组 Bax 蛋白的表达明显低于低剂量的 E 组和 Pe 组; 其中 W-M 组和 P-M 组 Bax 蛋白表达较为明显, 说明中剂量的 W-M 组和 P-M 组药物能明显引起肿瘤细胞凋亡, 促进 Bax 蛋白的表达; 因此, 高剂量的给药组 Bax 蛋白表达是最为明显的, 从切片

中能明显看到片状的棕黄色区域。如图 3 所示。

Bcl-2 免疫染色结果: 低剂量组的各提取物肿瘤组织出现片状坏死或空泡现象, 且各提取组 Bcl-2 蛋白表现出高表达, 其中 E-L 组和 P-L 组表现出强阳性, 且明显低于 M 组 Bcl-2 蛋白的表达; 中剂量组的各提取物肿瘤组织细胞间隙和空泡现象与低剂量组相比明显减少, 而且细胞排列较低剂量组整齐, Bcl-2 蛋白表达量较低剂量组弱; 高剂量组的各提取物肿瘤组织细胞间也出现细胞空隙或空泡, 但较低剂量组少, 且各高剂量提取物 Bcl-2 蛋白表达显著高于阳性组, 且被染区域也明显变少, 各提取组详细肿瘤组织如图 4 所示。

2.5 小鼠血清中 TNF- α 、IFN- γ 、VEGF 水平的测定

各组小鼠血清 TNF- α 与 B 组相比, 除 CTX 和 E-L 组外, 其他各组小鼠血清中 TNF- α 均有上升趋势; 与 M 组比, 其中 W-M 组、E-M 组和 Pe-H 组小鼠血清中 TNF- α 均有上升趋势, 与 CTX 组相比, 其中 W-M 组、E-H 组和 Pe-H 组 TNF- α 极显著升高 ($P < 0.01$); 各给药组小鼠

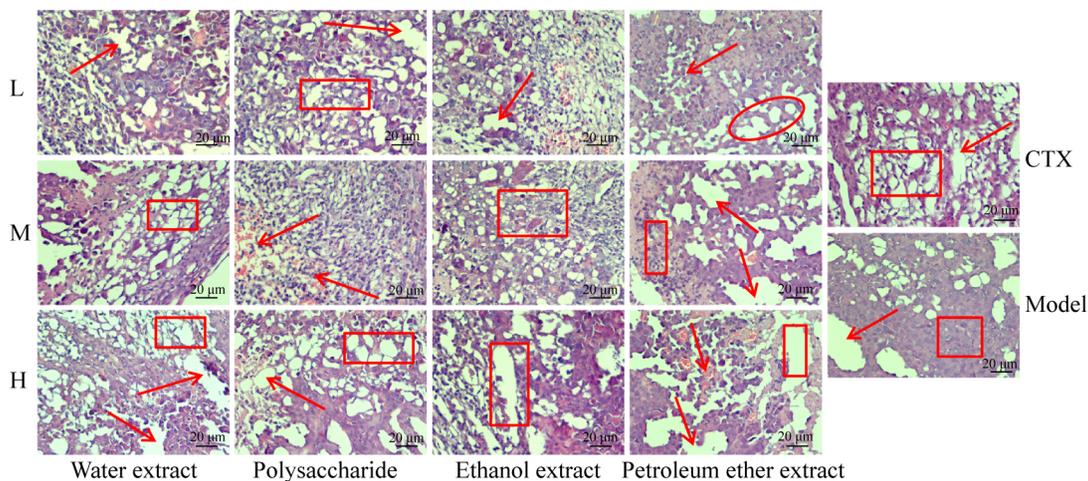


图 2 HE 染色法观察各组小鼠 H₂₂ 实体瘤细胞形态 (400 \times)

Figure 2 HE staining showing the morphology of H₂₂ solid tumor cell in each group of mice (400 \times). The arrows, boxes, and circles in the figure indicate the phenomenon of sheet-like vacuoles and necrosis in tissue cells). The same as below.

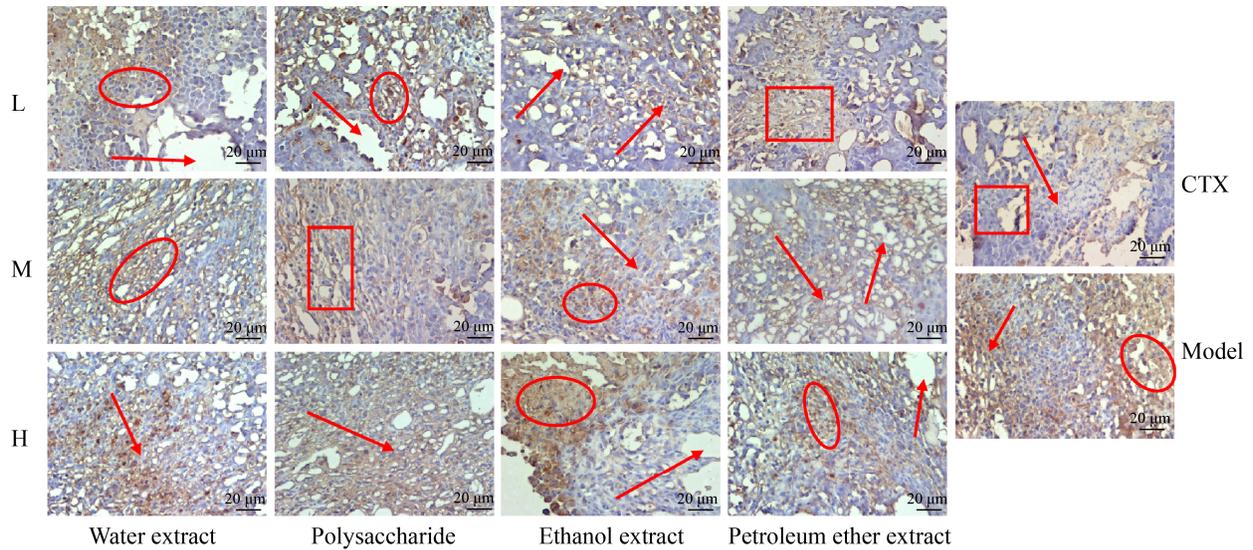


图3 小鼠实体瘤细胞形态 Bax 免疫组化染色结果 (400×)

Figure 3 Results of Bax immunohistochemical staining showing the morphology of solid tumor cells in mice (400×).

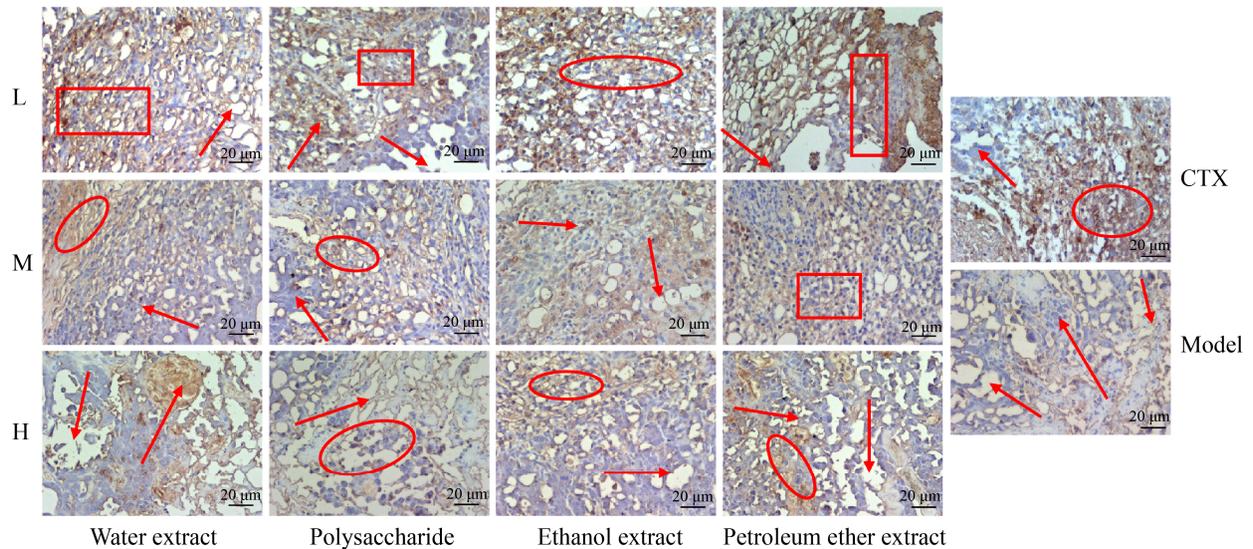


图4 小鼠实体瘤细胞形态 Bcl-2 免疫组化染色结果 (400×)

Figure 4 Results of Bcl-2 immunohistochemical staining showing the morphology of solid tumor cells in mice (400×).

血清中 IFN- γ 与 M 组比, B 组显著升高, W-M 组、P-L 组、P-M 组、E-H 组及其 Pe-H 组显著升高; 与 CTX 相比, M 组、W-L 组、W-M 组、P 组、E-H 组和 Pe-H 组均极显著升高; 各给药组 VEGF 与 B 组比, CTX 组、W 组、P-M 组、

E-L 组和 E-H 组均极显著升高 ($P < 0.01$), 与 M 组比, B 组、CTX 组、W-M 组、W-H 组和 E-L 组具有上升趋势, 与 CTX 组相比, B 组、M 组、P-L 组、E-H 组和 Pe 组小鼠 VEGF 均有下降趋势 (表 3)。

表 2 杨黄各提取物对 H₂₂ 荷瘤小鼠实体瘤细胞 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 2 Effects of various extracts of *Phellinus vaninii* on the expression of Bax and Bcl-2 proteins in solid tumor cells of H₂₂ tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Groups	Dose (mg/kg)	Bax		Bcl-2		Bax/Bcl-2
		Color intensity of positive cells	Positive rate	Color intensity of positive cells	Positive rate	
Model group	-	+	11	+++	45	0.24
CTX group	20	+++	42	+	13	3.23
Water extraction group	L 250	+	14	+++	29	0.03
	M 500	++	28	++	24	1.17
	H 1 000	+++	37	+	15	2.47
Polysaccharide group	L 50	+	16	+++	37	0.43
	M 100	++	27	++	26	1.04
	H 200	+++	33	+	16	2.06
Ethanol extraction group	L 50	+	19	+++	39	0.49
	M 100	++	24	++	28	0.86
	H 200	+++	30	+	20	1.50
Petroleum ether extraction group	L 50	+	18	+++	33	0.55
	M 100	++	25	++	25	1.00
	H 200	+++	35	+	19	1.84

Note: the results showed that the positive cells showed the color intensity grading (negative), + (weak positive), ++ (positive), and +++ (strong positive).

表 3 杨黄各提取物对小鼠血清中 TNF- α 、IFN- γ 和 VEGF 的影响结果 ($\bar{x} \pm s, n=5$)Table 3 Effect of various extracts of *Phellinus vaninii* on the TNF- α , IFN- γ and VEGF in mouse serum ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Groups	TNF- α (ng/L)	IFN- γ (ng/L)	VEGF (ng/L)
Blank group	50.71 \pm 4.11	942.65 \pm 4.83 [#]	143.24 \pm 6.70 ^{$\Delta\Delta$}
Model group	63.90 \pm 7.20 [*]	1 139.24 \pm 5.79 ^{*$\Delta\Delta$}	166.67 \pm 16.91 ^{Δ}
CTX group	58.92 \pm 4.51	1 023.24 \pm 4.70	193.89 \pm 5.86 ^{**#}
Water extraction group	L 73.27 \pm 3.89 ^{**Δ}	1 137.17 \pm 3.55 ^{*$\Delta\Delta$}	187.42 \pm 7.04 ^{**}
	M 77.64 \pm 7.00 ^{**#$\Delta\Delta$}	1 219.12 \pm 2.31 ^{**#$\Delta\Delta$}	197.75 \pm 5.57 ^{**#}
	H 75.69 \pm 8.96 ^{*Δ}	1 082.65 \pm 5.46	217.75 \pm 7.76 ^{**#}
Polysaccharide group	L 72.40 \pm 9.96 ^{**Δ}	1 370.45 \pm 8.38 ^{**#$\Delta\Delta$}	144.07 \pm 5.01 ^{$\Delta\Delta$}
	M 66.48 \pm 5.05 ^{**}	1 087.82 \pm 5.15 ^{**#$\Delta\Delta$}	186.45 \pm 9.97 ^{**}
	H 71.02 \pm 9.57 ^{**}	1 241.80 \pm 6.94 ^{**$\Delta\Delta$}	167.64 \pm 3.16 ^{Δ}
Ethanol extraction group	L 72.83 \pm 8.41 ^{**Δ}	1 245.59 \pm 9.65	199.23 \pm 8.19 ^{**#}
	M 73.83 \pm 9.83 ^{**Δ}	1 138.95 \pm 6.61 ^{**}	165.20 \pm 6.36
	H 81.40 \pm 8.85 ^{**#$\Delta\Delta$}	1 362.06 \pm 4.60 ^{**#$\Delta\Delta$}	186.61 \pm 8.67 ^{**Δ}
Petroleum ether extraction group	L 63.02 \pm 6.81 [*]	1 159.71 \pm 6.15 ^{**}	151.51 \pm 9.54 ^{$\Delta\Delta$}
	M 76.12 \pm 4.92 ^{**Δ}	1 065.59 \pm 6.24	157.76 \pm 6.67 ^{$\Delta\Delta$}
	H 79.26 \pm 9.66 ^{**#$\Delta\Delta$}	1 473.24 \pm 4.75 ^{**#$\Delta\Delta$}	161.85 \pm 7.76 ^{Δ}

Note: compared with the blank group, *: $P < 0.01$, **: $P < 0.05$; compared with the model group, #: $P < 0.05$, ##: $P < 0.01$; compared with the positive group, Δ : $P < 0.05$, $\Delta\Delta$: $P < 0.01$.

2.6 Western blotting 蛋白免疫印迹表达结果

各蛋白表达水平的 Western blotting 检测结果见图 5。Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白表达结果：各小组小鼠肿瘤组织中与 B 组相比均有一定的上升趋势，其中 CTX、E-L 组、W-L 组、P-L 组表达相对明显，但从抑瘤效果来看，E-L 组和 W-L 组抑瘤效果均较差，可能 E-L 组和 W-L 组抑瘤效果与 Caspase-3 和 Caspase-9 两个蛋白表达没有直接的相关作用，也有可能 W-L 组和 E-L 组药物致使 Caspase-3 和 Caspase-9 两个蛋白基因高表达，但肿瘤细胞的增殖远远超过了小鼠体内各凋亡因子的调节；P-Akt 蛋白表达与 B 组相比，均有所下降，其中 E-H 组和 P-H 组 P-Akt 蛋白的表达量高于其他组，其中 M 组表现出高表达，CTX 组表达量最低，W-L 组和 W-M 组表达量显著高于 CTX 组；Akt 蛋白表达量各组无显著差异 ($P>0.05$)；NF- κ B 蛋白表达量也相对增加，其中各提取物的低剂量组表达量相对明显，CTX 组、E-L 组和 P-L 组表达尤为明显，各提取物的高剂量组 NF- κ B 表达显著低于低剂量组提取物，且呈现剂量变化趋势，随剂量的增大表达量逐渐降低；JAK 蛋白的表达量与空白组相比也有显著的上升趋势，其中各提取物的高剂量组相对表达量最为明显。从整体来看，Caspase-3、Caspase-9、P-Akt、NF- κ B 和 JAK 蛋白的表达量呈现剂量表达递增趋势。其中 W 组表现出特殊的表达变化趋势，各蛋白高表达，但其抑瘤效果最差，可能水提物抑瘤效果不佳，对各相关凋亡基因和通路基因起到负调控的作用，使其肿瘤细胞快速增殖，从而表现出较弱的抑瘤效果。

从不同的给药角度分析，各给药组中，肿瘤小鼠 Caspase-3、Caspase-9、NF- κ B 和 JAK 蛋白均表现出高表达，且随剂量的增大各蛋白表达量逐渐降低，其中 P-Akt 蛋白表现出低表

达，表现出负调控，且各剂量与模型组相比，表达量均较低，阳性组表现尤为明显，各给药组中，多糖高剂量组表现最为明显，是各给药组中表达量最高的组别。

各给药组中较模型组均有上调趋势，呈一定的剂量趋势，说明各给药组通过促进 Caspase-3 和 Caspase-9 基因的表达，从而抑制肿瘤细胞的凋亡。NF- κ B 信号通路基因的表达中，各给药组与模型组 NF- κ B 基因蛋白相比，均具有上调趋势，其中低剂量的药物组 NF- κ B 基因蛋白表达相对明显，且存在剂量表达趋势，其中醇低组和多糖低组表达最为明显；在检测 JAK 基因蛋白中，各给药组与模型组相比，JAK 基因蛋白均具有上调趋势。因此可以推测，各给药组一方面通过促进凋亡基因 Caspase-3 和 Caspase-9 的表达，上调 NF- κ B 基因、JAK 基因、血管内皮生长因子 (VEGF) 和干扰素 α (TNF- α) 因子的表达；另一方面，通过下调 P-Akt 基因，抑制 Bcl-2 凋亡蛋白表达，使其 Bax 和 Bcl-2 两个蛋白处于一定的动态平衡，维持细胞的凋亡，从而抑制肿瘤组织的生长，起到抑制肿瘤的作用。

对杨黄提取物抗瘤的初步预测，各药物通过小鼠腹腔灌胃后，通过体内代谢，经线粒体途径，引起 Bax、Bcl-2、TNF 等发挥作用，引起 Cyto C (细胞色素 C) 激活 Caspase 蛋白家族中的 Caspase-3 和 Caspase-9 发生凋亡作用，使其细胞核中的染色质或 DNA 发生凝聚或降解，导致肿瘤细胞基因无法复制转录，从而抑制肿瘤细胞的增殖。另外，药物通过体内代谢后，通过死亡受体的途径，使其肿瘤坏死因子 (TNFR) 发生作用，猜测引起 Caspase-8 基因表达，使其 Caspase-8 蛋白向线粒体转位，促使线粒体中的相关因子发生级联反应，起到抑制肿瘤细胞的增殖，从而减缓肿瘤组织的快速增长，其作用过程如图 6 所示。

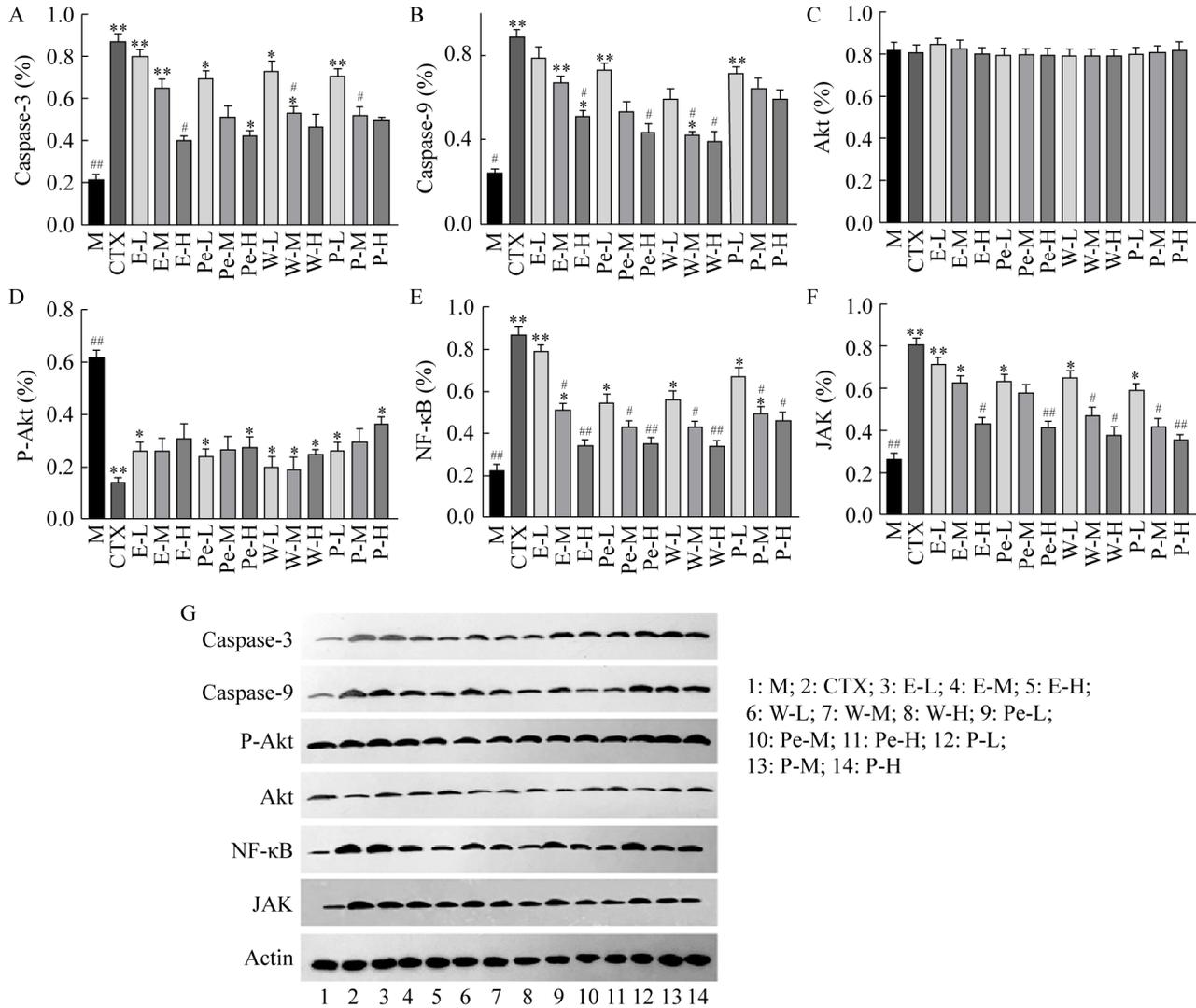


图 5 各蛋白表达水平的免疫印迹检测结果

Figure 5 Western blotting result showing the protein expression levels. Each group is compared with the model group, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$; compared with the positive group, #: $P < 0.05$, ##: $P < 0.01$.

3 讨论

杨黄为多年生木腐菌，多寄生于杨树^[13] (*Populus* spp.)，据延边地区民间调查，该菌被当地老百姓作为民族药使用，在延边朝鲜族医方中，常与一些吉林延边朝鲜族民族药配伍作为汤剂服用，主治肠风泻血，妇人心腹疼痛等症。本实验研究表明，杨黄具有明显的抑

瘤效果，其中抑瘤效果最好的为石油醚提取物组。本研究团队前期已对其三年生的杨黄子实体中多糖 ($0.83\% \pm 0.14\%$)、黄酮 ($0.49\% \pm 0.12\%$)、三萜及甾醇 ($0.67\% \pm 0.13\%$) 进行了测定^[14]，乙醇提取物中黄酮类含量相对比较高，其石油醚提取物中甾醇相对含量较高，其中起到抑瘤效果的主要活性成分可能跟含有的黄酮含量和甾醇含量相关。经口给药低、中、高剂量的石油

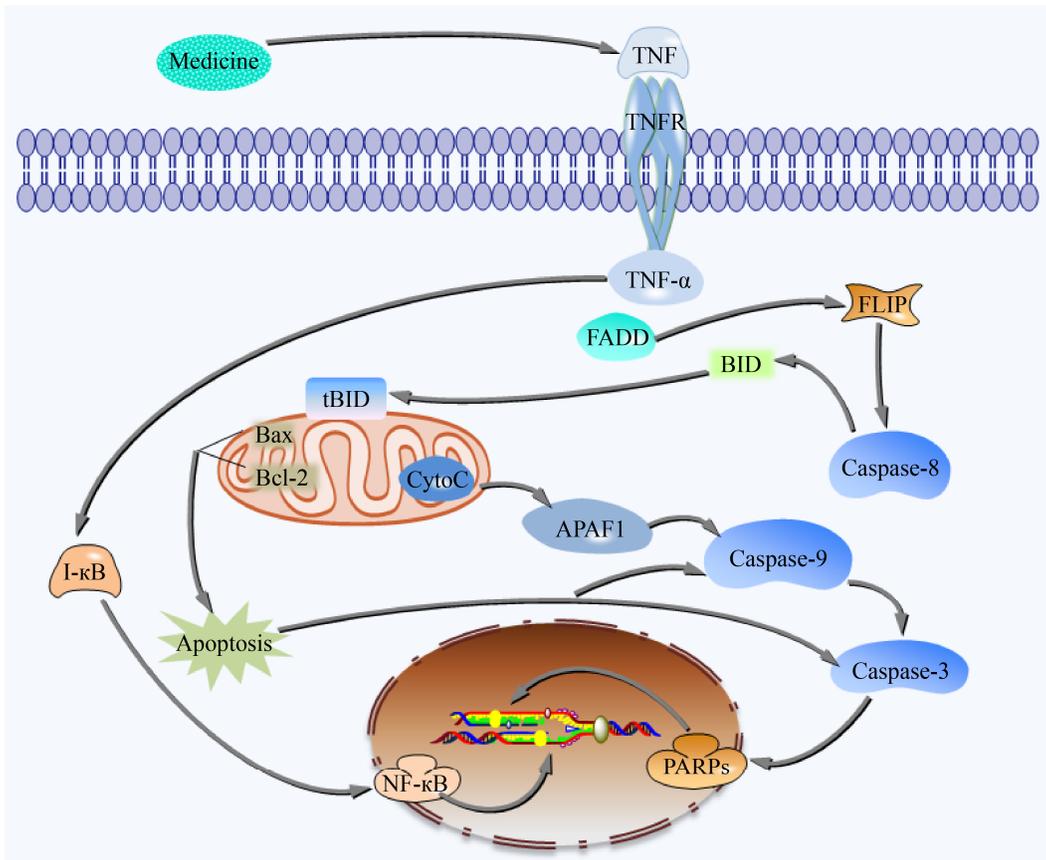


图 6 杨黄抗肿瘤机理初步探究图

Figure 6 Preliminary anti-tumor mechanism of *Phellinus vaninii*.

醚提取物后，石油醚低、中剂量组脾脏和胸腺指数与模型组相比均有显著差异 ($P < 0.01$)，脾脏有明显的萎缩现象，其胸腺出现明显的增大现象。

Bax 和 Bcl-2 是促进凋亡基因和抑制凋亡基因的 Bcl-2 家族重要成员，Bax 激活或 Bcl-2 失活可协同促进线粒体膜电位发生位移，引起线粒体释放小分子物质到细胞质中，从而活化 Caspase-3、Caspase-9 等核酸内切酶，引起细胞凋亡^[15]。Akt 信号通路的激活主要是 PI3K 转位到质膜，致使磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸磷酸化成磷脂酰肌醇 3,4,5-三磷酸，磷酸化的 Akt 通过抑制与凋亡相关的 B 淋巴细胞-2 (Bcl-2) 家族成员 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 和 Bcl-2 相关死

亡因子促进因子 (Bad) 或磷酸化双微体 2 (MDM2)，拮抗 p53 介导的凋亡，增加细胞的存活率^[16-17]。NF- κ B 的经典激活途径主要是多种刺激信号 TNF- α 、细胞因子、LPS 和紫外线等，激活 NF- κ B 信号通路，它的激活主要依赖 I κ B 蛋白，I κ B 激酶 (IKK) 由催化 IKK α 和 IKK β 亚基的异二聚体或 IKK γ 组成，当外界传来刺激信号时，I κ B 激酶磷酸化位于 I κ B 调节结构域中的 2 个丝氨酸残基，当这些残基发生磷酸化时，会导致蛋白酶体使细胞结构降解^[18-19]。JAK/STAT 的激活受体或配体很多，包括有 IFN 家族、IL 家族的许多生长因子或激素^[20-21]。

本研究结果中，肿瘤组织 HE 染色后，各提取物中高剂量组肿瘤组织均出现大面积的空

隙或空泡, 部分区域出现片状坏死现象。Bax 和 Bcl-2 两个基于在正常情况下, 是通过保持一定的平衡从而维持细胞凋亡, 当机体受一些因素作用就会破坏这种平衡, 从而调控细胞凋亡。在本实验中, Bax 促凋亡基因随剂量的递增, 表达量也随之逐渐增加, 然而相反的是 Bcl-2 抑凋亡基因随着剂量的增加, 其染色强度呈降低趋势, 说明高剂量的药物能明显影响机体内 Bax 和 Bcl-2 凋亡基因的平衡状态, 引起两个蛋白出现应激表达, 从而促进细胞凋亡。Akt 基因的调控受 Bax 和 Bcl-2 的调控, 两个基因引起细胞凋亡, 引起 Akt 基因上调或下调。本实验中各给药组与空白组相比, 各给药组能明显下调磷酸化的基因 Akt 的表达, 从而引起 Akt 通路基因的表达起到抑制肿瘤的作用。NF- κ B 是肿瘤调控中最经典的通路, 是通过多种因子刺激才能激活, TNF- α 是其中一个重要的刺激因子, 通过试剂盒检测小鼠血清中 TNF- α 因子, 除 CTX 组和 Pe-L 组外, 其他组与 B 组相比均有上调趋势, 而且 Western blotting 免疫印迹测定 NF- κ B 基因表达, 发现各给药组与 M 组相比, 均有上调趋势, 其中 CTX 组、E-L 组、Pe-L 组、P-L 组具有明显上调 NF- κ B 基因表达的趋势。JAK 通路的调控主要与白细胞介素等因子相关, 通过检测小鼠血清中 IFN- γ 因子, 与模型组相比, 水提物中剂量组、多糖低剂量组、多糖中剂量组、醇提物高剂量组、石油醚提取物高剂量组均具有上调 IFN- γ 的趋势, 与 Western blotting 测定的 JAK 基因表达是一致的, 其中各提取物的低、中剂量组较高剂量组明显。总的来说, 杨黄各提取物通过刺激一些相关因子 (如 TNF- α 、IFN- γ 、VEGF 等), 从而多途径引起相关凋亡蛋白 (Bax 和 Bcl-2) 的表达, 促进肿瘤细胞快速凋亡起到抑制肿瘤效果。

REFERENCES

- [1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [3] 吴兴亮, 卯晓岚, 图力古尔. 中国药用真菌. 北京: 科学出版社, 2013.
Wu XL, Mao XL. *Medicinal Fungi of China*. Beijing: Science Press, 2013 (in Chinese).
- [4] (朝)许浚. 东医宝鉴. 影印本. 北京: 人民卫生出版社, 1982.
Xu J. *Donguibogam*. Beijing: People's Medical Publishing House, 1982 (in Chinese).
- [5] 巴媛媛, 朴美子, 孟菡妍. 瓦尼木层孔菌菌株多糖提取工艺的研究. *食品研究与开发*, 2012, 33(1): 62-65.
Ba YY, Piao MZ, Meng HY. Study on extraction technology of polysaccharides from *Phellinus vaninii* Ljub. *Food Res Dev*, 2012, 33(1): 62-65 (in Chinese).
- [6] 杜易平, 张亚婕, 李艳, 等. 微波辅助亚临界水提取杨黄多糖. *实用药物与临床*, 2017, 20(12): 1407-1409.
Du YP, Zhang YJ, Li Y, et al. Extraction of polysaccharide from *Inonotus vaninii* with microwave-subcritical water method. *Pract Pharm Clin Remedies*, 2017, 20(12): 1407-1409 (in Chinese).
- [7] 张怡. 杨黄总黄酮分散片的制备及质量控制. *实用药物与临床*, 2013, 16(10): 939-941.
Zhang Y. Preparation and quality control of dispersible tablets of flavonoids from *Phellinus vaninii*. *Pract Pharm Clin Remedies*, 2013, 16(10): 939-941 (in Chinese).
- [8] 於学良, 卢艺, 杜盼, 等. 瓦尼木层孔菌子实体中小分子化学成分分离与鉴定. *食用菌学报*, 2014, 21(2): 90-94.
Yu XL, Lu Y, Du P, et al. Isolation and identification of low molecular weight chemical constituents from *Phellinus vaninii* fruit bodies. *Acta Edulis Fungi*, 2014, 21(2): 90-94 (in Chinese).
- [9] 程鑫颖, 包海鹰, 丁燕, 等. 瓦尼木层孔菌中 5 个化合物的抗肿瘤活性筛选. *菌物研究*, 2011, 9(3): 176-179.
Cheng XY, Bao HY, Ding Y, et al. Study on antitumor activity of *Phellinus vaninii* *in vitro*. *J Fungal Res*, 2011, 9(3): 176-179 (in Chinese).

- [10] 程鑫颖. 瓦宁木层孔菌子实体抗肿瘤及抗氧化活性成分的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2011.
Cheng XY. Study on antitumor and antioxidant activity constituent of fruiting body of *Phellinus vaninii* Ljub[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2011 (in Chinese).
- [11] 赵凯丽. 中药复方肝清宁对 H₂₂ 肝癌小鼠的抗肿瘤作用及机制研究[D]. 南宁: 广西医科大学, 2019.
Zhao KL. Anti-tumor effect of Chinese medicine compound Ganqingning Formula on H₂₂ tumor-bearing mice and ITS mechanism[D]. Nanning: Guangxi Medical University, 2019 (in Chinese).
- [12] Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, et al. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer*, 2000, 89(12): 2637-2645.
- [13] 戴玉成, 范少辉, 魏玉莲, 等. 中国东北杨树上的木腐菌. *林业科学研究*, 2003, 16(1): 13-18.
Dai YC, Fan SH, Wei YL, et al. Wood-decaying fungi on poplars in northeastern China. *For Res*, 2003, 16(1): 13-18 (in Chinese).
- [14] 和生, 刘颖, 魏颖, 等. 不同生长年限栽培与野生的瓦尼木层孔菌主要成分分析及急性毒理. *食用菌学报*, 2020, 27(4): 101-107.
He S, Liu Y, Wei Y, et al. Main components and acute toxicity of cultivated and wild *Phellinus vaninii*. *Acta Edulis Fungi*, 2020, 27(4): 101-107 (in Chinese).
- [15] 吴圣曦, 吴国欣, 何珊, 等. 白芥子挥发油对小鼠肝癌 H₂₂ 移植性肿瘤的抑制作用及其机制研究. *中草药*, 2013, 44(21): 3024-3029.
Wu SX, Wu GX, He S, et al. Antitumor effect of volatile oil from *Sinapis albae* Semen on H₂₂-bearing mice and its mechanism. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2013, 44(21): 3024-3029 (in Chinese).
- [16] Deptala A, Bedner E, Gorczyca W, et al. Activation of nuclear factor kappa B (NF-kappaB) assayed by laser scanning cytometry (LSC). *Cytometry*, 1998, 33(3): 376-382.
- [17] Nelson DE. Oscillations in NF-B signaling control the dynamics of gene expression. *Science*, 2004, 306(5696): 704-708.
- [18] Hiscott J, Kwon H, Génin P. Hostile takeovers: viral appropriation of the NF-kappaB pathway. *J Clin Invest*, 2001, 107(2): 143-151.
- [19] Adkins I, Schulz S, Borgmann S, et al. Differential roles of *Yersinia* outer protein P-mediated inhibition of nuclear factor-kappa B in the induction of cell death in dendritic cells and macrophages. *J Med Microbiol*, 2008, 57(Pt 2): 139-144.
- [20] Levine RL, Pardananani A, Tefferi A, et al. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(9): 673-683.
- [21] Carlisi D, D'Anneo A, Angileri L, et al. Parthenolide sensitizes hepatocellular carcinoma cells to TRAIL by inducing the expression of death receptors through inhibition of STAT3 activation. *J Cell Physiol*, 2011, 226(6): 1632-1641.

(本文责编 陈宏宇)