

# 10 种多孔类真菌体外抗肿瘤活性的筛选\*

孙 勇 蒋继宏\*\* 陈玉芹 高甜惠 陈凤美

(徐州师范大学 江苏省药用植物生物技术重点实验室 徐州 221116)

**摘要:** 采用 MTT 法对 10 种多孔类真菌的发酵液和菌丝体提取物进行抗人肺癌细胞实验, 测定培养基种类和培养时间对菌株抗肿瘤活性的影响。结果表明: PDA 培养基培养的 *Onnia tomentosa* 和 *Ceizene unicolor* 的发酵液以及木屑马铃薯培养基培养的 *Formitopsis pinicola* 菌丝醇提取物具有显著的抗肿瘤活性, 其中 *Formitopsis pinicola* 菌丝醇提取物浓度为 500  $\mu\text{g/mL}$  时对肿瘤细胞的抑制率达到 88.87%; 且在不同的培养基中及不同的培养时间获得的菌丝醇提取物的抗肿瘤活性变化不大。

**关键词:** 多孔菌, 筛选, 抗肿瘤活性

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2007) 01-0112-04

## Screening of Anti-tumor Activity from Ten Polypores Fungi *in vitro*

SUN Yong JIANG Ji-Hong\*\* CHEN Yu-Qin GAO Tian-Hui CHEN Feng-Mei

(Key Laboratory of Biotechnology for Medicinal Plant of Jiangsu Province, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221116)

**Abstract:** The anti-tumor activity of fermentation and the ethanol extraction of ten Polyporous fungi against human lung cancer cell NCI-H460 were determined by MTT method, the effect of medium and time for cultivation on the anti-tumor activity were studied. The results showed that the fermentation liquid of *Onnia tomentosa* and *Ceizene unicolor* and the mycelium ethanol extract of *Formitopsis pinicola* had obvious anti-tumor activity, the tumor inhibiting ratio of mycelium ethanol extract of *Formitopsis pinicola* cultivated in Potato-woodchipping medium was 88.87% at the concentration for 500  $\mu\text{g/mL}$ , and the inhibiting ratio had little change when *Formitopsis pinicola* cultivated in different medium and for different days.

**Key words:** Polypores, Screening, Anti-tumor activity

多孔菌目真菌是担子菌中的一大类群, 我国的菌类药物中许多是属于这一类真菌, 如有名的传统中药灵芝、猪苓、茯苓等等<sup>[1]</sup>。目前我国已知的多孔菌有 11,300 余种, 已知的药用多孔菌有 60 余种, 而有关报道的具有抗肿瘤活性的多孔类真菌也较多, 如灰树花、灵芝、云芝、桦褐孔菌以及俗称“桑黄”的一大类多孔菌等<sup>[2-4]</sup>。中国被认为是世界上物种多样性最丰富的国家之一, 但在种级单元上, 国际上被认可的只有 21,253 种, 而国内报道不足 400 种, 显然多孔菌种的数量有许多未被挖掘, 我国现在的具有抗肿瘤药用价值的多孔菌远不止报道的这些。本研究采用 MTT 法对 10 种多孔类真菌抗肿瘤活性进行了筛选。

## 1 材料

### 1.1 菌种

亚绒毛韧革菌 (*Stereum subtomentosum*); 木蹄层孔菌 (*Fomes fomentarius*); 南方灵芝 (*Ganoderma australe*); 三色拟迷孔菌 (*Daedaleopsis tricolor*); 杜鹃红锈革菌 (*Hymenochaete mougeotii*); 松生拟层孔菌 (*Formitopsis pinicola*); 彩云革盖菌 (*Corolus versicolor*); 绒毛昂氏多孔菌 (*Onnia tomentosa*); 单色下皮黑菌 (*Ceizene unicolor*); 黄薄孔菌 (*Antrodia xante*)。均采自吉林长白山, 由徐州师范大学省药用植物生物技术重点实验室分离和鉴定。

\* 江苏省药用植物生物技术重点实验室开放课题 (No. ZX10512)

\*\* 通讯作者 Tel: (0516) 83403515, E-mail: jhjiang@xzn. edu. cn

收稿日期: 2006-04-19, 修回日期: 2006-07-14

## 1.2 肿瘤细胞株

人肺癌细胞 NCI-H460, 由江苏省药用植物生物技术重点实验室提供。

## 1.3 培养基

PDA 固体培养基: 马铃薯 200g, 葡萄糖 20g, 琼脂 20g, 水定容至 1,000mL。

PDA 液体培养基: 马铃薯 200g, 葡萄糖 20g, 水定容至 1,000mL。

马铃薯木屑液体培养基: 马铃薯 200g, 木屑 100g, 葡萄糖 20g, 水定容至 1,000mL。

CYM 液体培养基 (完全培养基): 蛋白胨 5g, 酵母膏 2g, 硫酸镁 0.5g, 磷酸二氢钾 0.46g, 磷酸氢二钾 1.0g, 葡萄糖 20g, 水定容至 1,000mL。

RMPI 1640 完全培养基: RMPI 1640 基本培养基, 10% 小牛血清, 10,000U 青霉素, 10,000U 链霉素, 碳酸钠 2.0g, 双蒸水定容至 1,000mL, pH 7.0。

## 2 方法

### 2.1 菌种的活化

取 4℃ 保存的原菌种转接到斜面培养基上进行扩大培养, 每种菌种转接 3 支斜面培养基, 于电热恒温培养箱中 25℃ 下培养, 菌种长满后备用。

### 2.2 待测菌株的培养和培养获得物的处理

选用 PDA 培养基作为测定各菌株发酵液抗肿瘤活性的培养基, 木屑马铃薯培养基作为测定各菌株菌丝乙醇提取物抗肿瘤活性的培养基, 将活化的菌种再转接到 250mL 的锥形瓶中, 锥形瓶含 100mL 液体培养基, 置于培养箱中 25℃ 恒温条件下培养, 每种菌株培养 6 瓶, 由于菌株间差异很大, 每种菌株长满时取样, 真菌深层培养物用真空泵抽滤得到菌丝体和发酵液, 菌丝体置于 60℃ 电热恒温鼓风干燥箱内干燥, 然后称量, 捣碎, 最后放入小锥形瓶用 95% 的乙醇浸提 7d, 抽滤取上清液, 水浴蒸干后即乙醇提取物粗品, 称重, 加 1mL DMSO 溶解至 5 mg/mL, 0.22μm 微孔滤膜过滤后放在 4℃ 条件下保存; 发酵液直接用 0.22μm 微孔滤膜过滤后放在 4℃ 条件下保存。

### 2.3 抗肿瘤活性测定方法<sup>[5]</sup>

#### 2.3.1 细胞培养: 人肺癌细胞 NCI-H460 培养用

RMPI1640 完全培养基在 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

2.3.2 细胞接种: 将对数生长期的细胞用 0.25% 胰酶在培养瓶上消化, 1,000r/min 离心 5 min, 用细胞计数板计数, 制成  $2 \times 10^4$  个/mL 的细胞悬液。96 孔板中每孔加 100μL, 空白对照孔加 100μL 不含细胞的培养基, 放入细胞培养箱中过夜, 使细胞贴壁。

2.3.3 加样: 每孔补加培养基 80μL, 加 20μL 按 2.2 处理的发酵液或菌丝醇提物, 即发酵液的最终浓度为原发酵液的 0.1 倍, 菌丝醇提物的最终浓度为 500μg/mL, 继续培养 24h。

2.3.4 Alamar blue 方法: Alamar blue 贮存液用培养基以 1:1 比例稀释每孔加 50μL, 每孔终体积为 250μL, Alamar blue 为 10%, 5h 后用 M2 荧光检测仪检测。将培养板放于 530nm 的激发波长和 590nm 的发射波长下, 加入不含细胞的培养基的孔做空白值, 加细胞液不加样品的孔做对照值。细胞培养孔减去空白值为实际值。按照公式计算细胞抑制率: 细胞抑制率 = (对照 - 样品) / 对照 × 100%。

### 2.4 不同培养时间和不同培养基培养的菌株培养物的抗肿瘤活性测定方法

选用 PDA、CYM 和木屑马铃薯培养基将上方方法得到的具有较好抗肿瘤活性的菌株进行培养, 每菌株每种培养基培养 12 瓶待菌丝长满表面时取样, 以后每隔 3d 取样 1 次, 每次 3 瓶, 共取样 4 次, 取的样按 2.2 方法获得不同时间和不同培养基培养的菌株的乙醇提取物和发酵液, 采用体外细胞毒测定的 MTT 法测定抗肿瘤活性。

## 3 结果与分析

### 3.1 具有抗肿瘤活性菌株的筛选

通过 MTT 法检测了 10 种供试菌株的发酵液和菌丝体乙醇提取物对体外肿瘤细胞增殖及存活的影响, 结果见表 1、表 2, 由表 1 可看出: PDA 培养基培养 22d 的 *Onnia tomentosa* 和 *Ceizene unicolor* 的发酵液具有强的抗肿瘤活性; 抑制率分别为 87.93% 和 55.25%。由表 2 看出: 马铃薯木屑培养基培养的 *Formitopsis pinicola* 菌株的乙醇提取物活

性较好, 体外肿瘤抑制率可达 88.87%。

表 1 PDA 培养基培养的十种供试菌株的发酵液  
体外抑制肿瘤活性测定结果

菌株	培养天数 (d)	0.1 倍发酵液抗 肿瘤抑制率 (%)	标准偏差
<i>Stereum subtomentosum</i>	22	44.41	0.104733
<i>Fomes fomentarius</i>	22	-	0.015308
<i>Onnia tomentosa</i>	22	87.93	0.007234
<i>Ceizene unicolor</i>	22	55.25	0.003055
<i>Antrodia xante</i>	22	15.58	0.028792
<i>Ganoderma australe</i>	22	16.86	0.067575
<i>Daedaleopsis tricolor</i>	22	-	0.023159
<i>Hymenochaete mougeotii</i>	22	-	0.035165
<i>Formitopsis pinicola</i>	22	-	0.090512
<i>Corolus versicolor</i>	18	41.36	0.034699

“-”表示没有抗肿瘤作用, 下同

表 2 马铃薯木屑培养基培养的十种供试菌株的  
菌丝乙醇提取物体外抑制肿瘤活性测定结果

菌株	培养天数 (d)	乙醇提取物 (浓度: 500 μg/mL) 抗肿瘤抑制率 (%)	标准偏差
<i>Stereum subtomentosum</i>	25	-	0.029956
<i>Fomes fomentarius</i>	25	14.32	0.035572
<i>Onnia tomentosa</i>	17	-	0.100271
<i>Ceizene unicolor</i>	17	-	0.060136
<i>Antrodia xante</i>	25	15.10	0.042099
<i>Ganoderma australe</i>	24	-	0.031817
<i>Daedaleopsis tricolor</i>	24	-	0.038157
<i>Hymenochaete mougeotii</i>	24	-	0.180485
<i>Formitopsis pinicola</i>	24	88.87	0.111899
<i>Corolus versicolor</i>	24	-	0.110109

3.2 不同培养时间和不同培养基对 *Onnia tomentosa* 和 *Ceizene unicolor* 的发酵液抗肿瘤活性的影响

选用 PDA、CYM 和木屑马铃薯培养基测定不同培养时间的 *Onnia tomentosa* 和 *Ceizene unicolor* 的发酵液的抗肿瘤活性, 结果见表 3、图 1 和图 2。

由表 3、图 1 和图 2 可以看出, *Onnia tomentosa* 在各种培养基中培养产生的发酵液体外抑制肿瘤活性差异很大, 仅 PDA 培养基培养的发酵液有一定的活性, 培养 22d 的活性较好, 而 *Ceizene unicolor* 发酵液的抗肿瘤活性较为稳定, 在 PDA 培养基、CYM 培养基中均有活性, 在 CYM 培养基中得到的发酵液的抗肿瘤活性最好; 其抗肿瘤活性与

培养天数无线性关系。

表 3 不同培养时间和不同培养基条件 *Onnia tomentosa* 和 *Ceizene unicolor* 的发酵液体外抑制肿瘤活性

供试菌株	培养基	培养天数 (d)	0.1 倍发酵液 抑制率 (%)	标准偏差
<i>Onnia tomentosa</i>	PDA 培养基	13	5.5	0.043313
		18	22.11	0.10055
		22	87.93	0.007234
	CYM 培养基	26	-	0.064583
		20	-	0.078894
		24	-	0.025498
		28	-	0.013
		32	-	0.215786
	木屑马铃薯 培养基	8	-	0.03479
		12	-	0.036679
<i>Ceizene unicolor</i>	PDA 培养基	16	-	0.100271
		20	18.71	0.035341
		13	22.11	0.043558
	CYM 培养基	18	34.46	0.02498
		22	55.25	0.003055
		26	-	0.025981
		23	87.02	0.006028
		26	54.42	0.01124
	木屑马铃薯 培养基	31	55.8	0.029569
		36	64.92	0.016563

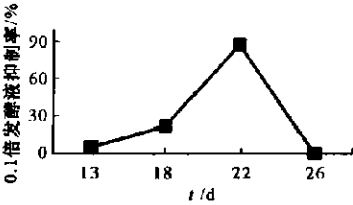


图 1 *Onnia tomentosa* 在 PDA 培养基中不同培养时间的发酵液抗肿瘤抑制率

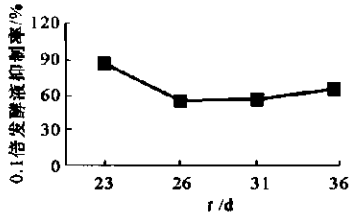


图 2 *Ceizene unicolor* 在 CYM 培养基中不同培养时间的发酵液抗肿瘤抑制率

### 3.3 不同培养基和不同培养时间培养的 *Formitopsis pinicola* 菌丝体乙醇提取物体外抑制肿瘤活性测定

由表4可知, *Formitopsis pinicola* 在不同的培养基中培养得到的菌丝体醇提取物均有较好的体外肿瘤抑制活性, 且活性相差不大, 培养时间对菌丝体醇提取物抗肿瘤活性的影响也不大, 测定浓度为500 $\mu\text{g/mL}$ 时, *Formitopsis pinicola* 乙醇提取物肿瘤抑制率最高可达86.37%。

表4 不同培养基和不同培养时间培养的 *Formitopsis pinicola* 菌丝体乙醇提取物体外抑制肿瘤活性

培养基	培养天数 (d)	乙醇提取物 (浓度: 500 $\mu\text{g/mL}$ ) 抗肿瘤抑制率 (%)	标准偏差
PDA 培养基	18	79.78	0.042158
	22	70.43	0.101165
	26	71.58	0.013748
	30	78.21	0.009165
	34	78.21	0.009165
CYM 培养基	19	81.47	0.041356
	23	82.87	0.064825
	27	86.37	0.105078
	31	85.91	0.038018
	35	85.91	0.038018
木屑马铃薯培养基	16	72.54	0.009452
	20	80.12	0.032036
	24	81.46	0.113254
	28	73.56	0.087965
	32	73.56	0.087965

## 4 讨论

自然界存在的真菌种类繁多, 从这些真菌的发酵产物中是否能寻找到作用机制新颖抗肿瘤成分, 是开发抗肿瘤新药的基础工作。我们利用

MTT法对供试的10种菌株的发酵液和菌丝体提取物进行初筛, 从中找到了3个对实验所用的肺癌细胞系敏感的菌株, 包括 *Onnia tomentosa* 和 *Ceizene unicolor*。本实验所使用的肺癌细胞系, 结合细胞形态学显微观察及MTT法, 可以直接确定待筛样品是否具有对肿瘤细胞的直接杀伤的抗肿瘤活性。这种筛选方法具有微量、快速、特异性强等优点, 为抗肿瘤活性物质的筛选及活性追踪分离研究提供很好的检测手段。

通过实验, 我们获得3株具有抗肿瘤活性的真菌: *Onnia tomentosa*、*Ceizene unicolor* 和 *Formitopsis pinicola*; 其中 *Onnia tomentosa*、*Ceizene unicolor* 的活性物质主要存在于发酵液中, 在不同的培养基中, 甚至不同的培养天数都可能变化, 而 *Formitopsis pinicola* 的活性物质存在于菌丝的醇提取物中, 在不同的培养基和不同的培养时间内活性变化不大, 从稳定性方面考虑, *Formitopsis pinicola* 更具有研究和开发前景。

## 参考文献

- [1] 张 华, 姜成林, 徐丽华, 等. 微生物学通报, 2004, 31(2): 152~153.
- [2] 黄年来. 中国食用菌, 2002, 21(4): 7~9.
- [3] 孙培龙, 徐双阳, 杨 开, 等. 微生物学通报, 2006, 33(2): 119~123.
- [4] 秦 葵, 张书峰. 白求恩医学院学报, 2004, 2(4): 237~239.
- [5] Hamid R, Roishteyn Y, Rubadi I, et al. Toxicology in vitro, 2004, 88: 703~710.

## • 论文写作要点 •

### 专论与综述的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学各分支学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 最好包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在实际和理论中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势。即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: 在专论与综述中引用的文献应该主要是近3年国内外正式发表的研究论文, 引用文献篇数不限。