

冬虫夏草菌丝体水提醇沉物体外抗肿瘤活性研究

陈家念^{1,3}, 张璇^{1,3}, 蔡豪斌^{1,2*}, 傅晓波^{1,3}, 沈星灿^{1,3*}

1. 广西师范大学 药用资源化学与药物分子工程教育部重点实验室, 广西 桂林 541004

2. 桂林英美特生物技术研究所, 广西 桂林 541001

3. 广西师范大学 化学与药学学院, 广西 桂林 541004

摘要: **目的** 研究冬虫夏草菌丝体水提醇沉物的体外抗肿瘤活性及其机制。**方法** 采用热水浸提-醇沉法得到水提物, 高效液相色谱仪测定水提醇沉物中腺苷的量; 采用MTT法测定其抗肿瘤活性, 利用流式细胞仪结合碘化丙啶染色法检测其对细胞周期的抑制。**结果** 实验表明水提醇沉物能抑制人肝癌 HepG2 细胞株及大细胞肺癌 NCI-H460 细胞株的增殖, 并呈浓度相关性; 半数抑制浓度 (IC₅₀) 值分别为 (1.49±0.19) 和 (1.67±0.27) mg/mL。细胞周期分析表明, 水提醇沉物分别阻滞 HepG2 及 NCI-H460 细胞周期于 G₂/M 期、S 期, 并可诱导上述两种细胞发生凋亡。**结论** 冬虫夏草水提醇沉物通过阻滞 HepG2 及 NCI-H460 细胞周期循环, 诱导其凋亡, 从而表现出良好的增殖抑制活性。为深入研究冬虫夏草菌丝体水提醇沉物抗肿瘤的机制提供了实验证据。

关键词: 冬虫夏草菌丝体; 水提物; 抗肿瘤; 机制

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2014)02-0108-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.02.003

Anti-tumor activity of water extracts from *Cordyceps sinensis* mycelia *in vitro*

CHEN Jia-nian^{1,3}, ZHANG Xuan^{1,3}, CAI Hao-bin^{1,2}, FU Xiao-bo^{1,3}, SHEN Xing-can^{1,3}

1. The Key Laboratory for the Chemistry and Molecular Engineering of Medicinal Resources (Ministry of Education of China), Guangxi Normal University, Guilin 541004, China

2. Institute of Guilin Immunotech, Guilin 541001, China

3. School of Chemistry and Pharmacy, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China

Abstract: Objective To study the anti-tumor activity of water extract from artificially propagated *Cordyceps sinensis* mycelia *in vitro* and its mechanisms. **Methods** Water extract from *C. sinensis* mycelia was obtained using hot-water-extraction combined with alcohol precipitation method and the content of adenosine was determined using HPLC; MTT assay was performed to assess the cell growth inhibition, and the distribution of cell cycle was determined by flow cytometric analysis of propidium iodide staining. **Results** It was found that the water extract of *C. sinensis* mycelia could inhibit human hepatoma HepG2 cells and large cell lung cancer NCI-H460 cells growth in a concentration-dependent manner; the IC₅₀ values were (1.49±0.19) and (1.67±0.27) mg/mL, respectively. Cell cycle analysis showed that water extract arrested HepG2 cell cycle at G₂/M phase, and arrested NCI-H460 cell cycle at S phase; Furthermore, the water extract could induce the above two cell lines apoptosis. **Conclusion** The water extract from *C. sinensis* mycelia could inhibit HepG2 and NCI-H460 cells growth through cell cycle arrest and apoptosis induction. This study provides the important experimental evidence which would contribute to the further study on the anti-tumor mechanisms of the water extract from *C. sinensis* mycelia.

Key words: *Cordyceps sinensis* mycelia; water extract; anti-tumor; mechanism

收稿日期: 2013-11-05

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21161003, 21364002); 广西自然科学基金项目 (2013GXNSFGA019001, 2012GXNSFDA053007, 2011GXNSFA018044, 2013GXNSFBA019200); 广西“新世纪十百千人才工程”、广西医药人才小高地项目 (1105, 1313)、广西壮族自治区教育厅一般项目 (2013YB025); 药用资源化学与药物分子工程教育部重点实验室主任基金、开放基金资助项目 (CMEMR2012-A01, CMEMR2012-A12, CMEMR2008-B01, 桂科能 07109001-19); 广西师范大学校级重点项目 (2011ZD006)

作者简介: 陈家念 (1979—), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师。研究方向为中药新制剂、新剂型、新技术。

Tel/Fax: (0773)2120958 E-mail: cjn88@sina.com

***通信作者** 蔡豪斌, 研究员, 硕士生导师。Tel: (0773)2228059 E-mail: caihaobin@hotmail.com

沈星灿, 教授, 博士生导师。Tel: (0773)5846273 E-mail: xcshen@mailbox.gxnu.edu.cn

冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* 是我国的名贵中药材, 又名冬虫草或夏草冬虫, 是冬虫夏草菌 *Cordyceps sinensis* (Berk) Sacc 寄生于虫草蝙蝠蛾 *Hepialus armoricanus* 幼虫体后发育成的真菌子座充满菌丝的僵死幼虫的复合体^[1]。冬虫夏草主要分布在我国青海、西藏、四川、云南等高寒草甸区。现代科学的研究证实冬虫夏草对人体具有多方面药理作用, 如抗肿瘤^[2-4]、抗炎^[5]、降血糖^[6]、免疫调节^[7]及抗氧化^[8]等功效。对于冬虫夏草的抗肿瘤研究已经广泛开展, 但目前对于其抗肿瘤的机制尚未明确。本实验选择桂北冬虫夏草菌丝体, 研究其水提物对人肝癌、肺癌等肿瘤细胞的抑制作用, 并通过流式细胞仪检测其对细胞周期的影响, 为深入研究冬虫夏草菌丝体水提醇沉物抗肿瘤的机制提供必要的实验证据。

1 仪器与材料

岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪 (日本岛津公司), CO281R 型细胞培养箱 (美国 New Brunswick Scientific 公司), BCN-1360 超净工作台 (哈尔滨东联电子技术开发有限公司), Olympus CKX41 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司), TL04B 型台式离心机 (北京大恒建海科贸公司), TECAN GENios Pro 型多功能酶标仪 (瑞士 TECAN 公司), FACS AriaII 流式细胞仪 (美国 BD 公司), RE-52A 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂), 恒温水浴锅 (上海跃进医疗器械厂), BS210S、BL610 电子分析天平 (德国 Sartorius 公司)。

胎牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司), DMEM 培养基 (杭州吉诺生物医药技术有限公司), 胰蛋白酶及青链霉素购自生兴生物技术 (南京) 有限公司, 3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT)、DMSO 及碘化丙锭 (PI) 购自美国 Sigma 公司。甲醇 (色谱级), 腺苷对照品购自上海源叶生物科技有限公司。无水乙醇、氯仿、正丁醇、茛三酮等其他试剂均为国产 AR 级试剂。人肝癌 HepG2 细胞株及大细胞肺癌 NCI-H460 细胞株分别来源于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库和中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

2 方法

2.1 水提物的制备

称取桂北人工培植冬虫夏草菌丝体 500 g, 粉碎, 加蒸馏水, 于 85 °C 恒温水浴 24 h, 4 000 r/min

离心 10 min, 取上清液, 即得菌丝水提液。取菌丝水提液, 浓缩, 加入无水乙醇 (菌丝水提液-乙醇=1:4), 放入冰箱 4 °C 过夜, 4 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 收集沉淀物, 干燥。

2.2 水提醇沉物的纯化

采用 Sevag 法^[9], 除去水提物中的蛋白质: 上述沉淀重新溶于蒸馏水中, 以 3:1 的量加入氯仿-正丁醇溶液 (预先配制成体积比为 4:1 混合液), 剧烈振荡至充分混合, 静置后离心去除沉淀, 重复此操作, 并用茛三酮法检测上清液中是否有蛋白质: 取试管 1 支, 加入上清液 4 滴, 0.5% 茛三酮-乙醇溶液 2 滴, 混匀后于小火上煮沸 1~2 min。放置冷却。观察溶液颜色变化, 颜色由粉红变紫红, 最终变为蓝色者为阳性。直至上清液不显示蛋白质反应为止, 以此除去蛋白质, 低温冻干即得冬虫夏草菌丝体水提物, 称质量, 计算水提醇沉物的含量, 实验重复 3 次。所得水提物保存于 -20 °C, 备用。

2.3 腺苷的测定

称质量后的水提醇沉物粉碎, 采用 2010 版《中国药典》载明方法^[10], 即 HPLC 法, 检测其中腺苷的质量分数 (以 mg/g 计)。色谱条件: 岛津 LC-20AT 检测系统, SPD-20A 紫外可见检测器; 迪马 C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为磷酸盐缓冲液 (磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲液, pH6.5): 甲醇 (85:15); 体积流量 0.7 mL/min; 检测波长为 260 nm。实验重复测定 3 次。

2.4 细胞毒活性测定

采用 MTT 法^[11]测定冬虫夏草菌丝体水提醇沉物的细胞毒活性。精密称取水提醇沉物样品 10 mg, 溶于一定量双蒸水, 用 0.1 mol/L NaOH 调节 pH7.4, 配制成 200 mg/mL 的溶液。过 0.2 μm 滤器后, 精确吸取样品液 100 μL, 加入 900 μL 无血清培养基, 稀释成 20 mg/mL, 备用。HepG2 细胞 (或 NCI-H460 细胞) 悬浮于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 常规培养后选取对数生长期细胞, 以 1×10⁴/mL 接种于 96 孔板, 每孔接种细胞悬液 180 μL, 待贴壁后分别加入不同质量浓度的水提醇沉物 (0、0.4、0.8、1.6、3.2、6.4 mg/mL), 每组 4 个复孔, 每孔加 20 μL 样品溶液。在 37 °C、100% 相对湿度、含 5% CO₂ 的培养箱培养 24 h。并设阴性对照, 阴性对照组加入不含药物的新鲜培养液, 然后用 MTT 法测定。每孔加入 20 μL、5 mg/mL MTT 溶液, 继续培养 4 h 后, 吸去上清液。每孔加入 100 μL DMSO, 置

微量振荡器振荡 5 min 使结晶完全溶解,酶标仪 490 nm 处单波长比色,测定吸光度 (A) 值,使用 SigmaPlot 10.0 软件拟合非线性曲线,并计算水提醇沉物的半数抑制浓度 (IC_{50})。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{阴性对照}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{阴性对照}}$$

2.5 水提醇沉物对肿瘤细胞周期的影响

取对数生长期细胞 (HepG2 细胞或 NCI-H460 细胞), 调整细胞悬液密度至 $5 \times 10^5/\text{mL}$, 接种于六孔板, 37°C 、5% CO_2 培养箱内培养 8 h, 对照组加入不含药物的新鲜培养液, 给药组加入含冬虫夏草菌丝体水提物的新鲜培养液 (水提醇沉物终质量浓度 10 mg/mL), 继续培养 24 h, 离心收集各组细胞并用预冷的磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 2 次后, 用 -20°C 的 75% 乙醇固定, 于 4°C 放置。测定前用 4°C PBS 洗细胞 2 次, 加入 0.5 mL RNA 酶 (终质量浓度为 $50 \mu\text{g/mL}$) 孵化 30 min, 然后加入 PI 染液 1 mL, PI 终质量浓度 $50 \mu\text{g/mL}$, 室温避光染色 30 min, 300 目尼龙膜过滤, 流式细胞仪检测, 每组重复 3 次。计算 G_0/G_1 、S 及 G_2/M 期细胞比例。

2.6 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 11.0 软件包分析, 对实验数据进行 One-way ANOVA 分析。

3 结果

3.1 冬虫夏草菌丝体水提物的制备

本研究采用热水浸提-醇沉法得到冬虫夏草菌丝体水提液, 水提液呈褐色, 干燥后为深褐色, 表面有光泽, 易研磨碎, 绝大部分可在水中溶解, 即为冬虫夏草菌丝体水提物粗品; 然后用 Sevag 法, 除去蛋白质及水不溶物, 得到具有良好水溶性的水提物, 此部分水提物干燥后, 占总质量的 ($5.61 \pm$

0.38) %。

3.2 腺苷的测定

腺苷是冬虫夏草中的主要活性成分, 在《中国药典》2010 年版中, 腺苷被作为冬虫夏草的质量控制指标^[10], 规定 HPLC 法测定其含量不低于 0.01%。本实验室按照《中国药典》2010 年版上载明的方法, 测定冬虫夏草菌丝体中腺苷质量分数为 (0.48 ± 0.06) mg/g , 符合要求。

3.3 体外细胞增殖抑制活性分析

结果表明冬虫夏草菌丝体水提物对人肝癌 HepG2 细胞株及大细胞肺癌 NCI-H460 细胞株增殖均显示出较强的抑制作用。随着质量浓度的升高 ($0 \sim 6.4 \text{ mg/mL}$), 抑制率也随着升高, 呈现出典型的浓度相关性 (图 1)。对 HepG2 及 NCI-H460 的 IC_{50} 值分别为 (1.49 ± 0.19) 和 (1.67 ± 0.27) mg/mL , 水提物对前者的抑制作用稍强。

3.4 对细胞周期的影响

冬虫夏草菌丝体水提物对两种细胞株 (HepG2 及 NCI-H460) 的细胞周期均产生显著影响, 两种细胞经冬虫夏草菌丝体水提物 (10 mg/mL) 处理 24 h 后, G_1/G_0 期比例降低, 与对照组间差异有显著性 ($P < 0.05$); 同时 S 期和 G_2/M 期细胞比例增加。然而, 水提物对两种细胞株的周期影响有所不同: 对 HepG2 细胞表现为 G_2/M 期阻滞, 此与文献报道一致^[12], 而对 NCI-H460 细胞, 则表现为 S 期阻滞; 其中 HepG2 经冬虫夏草菌丝体水提物作用前后 G_2/M 期细胞比例分别为 (5.35 ± 0.92) % 和 (16.35 ± 1.77) %, 两者间差异不显著; 而 NCI-H460 细胞经冬虫夏草菌丝体水提物作用前后 S 期细胞比例分别为 (25.27 ± 2.06) % 和 (41.51 ± 2.84) %, 两者间差

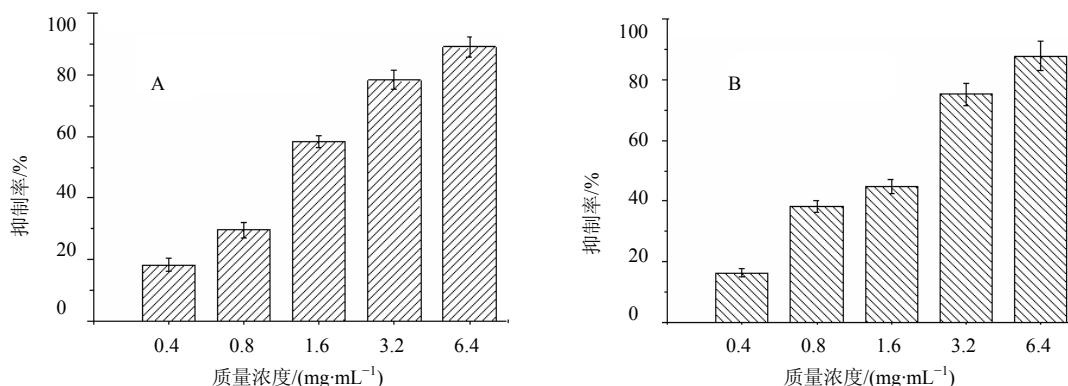
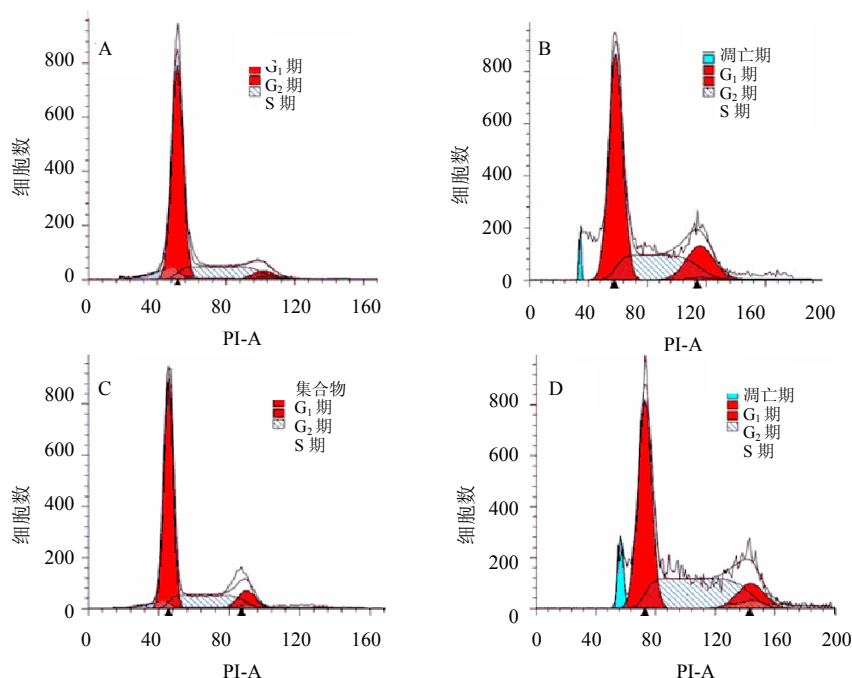


图 1 冬虫夏草菌丝体水提物对 HepG2 (A) 和 NCI-H460 (B) 细胞毒性

Fig. 1 Cytotoxic activity of water extract from *C. sinensis* mycelia against HepG2 (A) and NCI-H460 cells (B)

异显著。此外,通过对 DNA 倍体分析,发现仅实验组(冬虫夏草菌丝体水提物)在 G_0/G_1 期之前出现明显的亚二倍体,此为凋亡小峰,提示有凋亡现象,而两个

对照组均未检测到凋亡细胞(图2和表1),这说明冬虫夏草菌丝体水提物不仅能阻滞肿瘤细胞 HepG2 及 NCI-H460 的周期循环,还可诱导其发生凋亡。



A、C-对照组; B-冬虫夏草菌丝体水提物(10 mg/mL)处理后的 HepG2 细胞; D-冬虫夏草菌丝体水提物(10 mg/mL)处理后的 NCI-H460 细胞
A and C-control group; B-HepG2 cells treated with water extract of *C. sinensis* mycelia (10 mg/mL); D-NCI-H460 cells treated with water extract of *C. sinensis* mycelia (10 mg/mL)

图2 冬虫夏草菌丝体水提醇沉物对 HepG2 (A 和 B) 和 NCI-H460 (C 和 D) 细胞周期的影响
Fig. 2 Effects of water extract of *C. sinensis* mycelia on cell cycles in HepG2 (A and B) and NCI-H460 cells (C and D)

表1 冬虫夏草菌丝体水提醇沉物对 HepG2 和 NCI-H460 细胞周期的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effects of water extract of *C. sinensis* mycelia on on cell cycles in HepG2 and NCI-H460 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	HepG2/%				NCI-H460/%			
	凋亡	G_0/G_1	S	G_2/M	凋亡	G_0/G_1	S	G_2/M
对照	0	69.91 ± 3.21	24.74 ± 2.88	5.35 ± 0.92	0	64.75 ± 5.36	25.27 ± 2.06	9.98 ± 0.47
冬虫夏草菌丝体水提物	1.87 ± 0.21	$54.82 \pm 4.33^*$	28.83 ± 2.49	16.35 ± 1.77	5.80 ± 3.19	$47.30 \pm 3.97^*$	$41.51 \pm 2.84^*$	11.19 ± 0.69

与对照组比较: $^*P < 0.05$

$^*P < 0.05$ vs control group

4 讨论

已报道冬虫夏草的化学成分有核苷类(如尿苷、尿嘧啶、虫草素、腺苷等)、氨基酸、糖醇、甾醇类及微量元素等^[13]。腺苷是冬虫夏草中的主要活性成分,并被作为冬虫夏草的质量控制指标;本实验通过测定腺苷的量,以衡量冬虫夏草菌丝体水提物的质量。Li 等^[14]发现冬虫夏草菌丝体中核苷的量比天然的冬虫夏草高,天然的冬虫夏草含量一般低于 0.4 mg/g,本实验冬虫夏草水提物中腺苷含量(平均值)接近 0.5 mg/g,符合 2010 年版《中国药典》冬虫夏

草项下要求。冬虫夏草产于高原,数量有限,高密度培养冬虫夏草菌丝体不失为获得名贵紧缺药材的一个途径;从主要效应成分腺苷含量的角度分析,冬虫夏草菌丝体替代冬虫夏草具有一定的可行性。

细胞周期调控异常是肿瘤发生发展过程中最重要的事件之一,可使细胞生长失控和不分化,并最终导致肿瘤的发生,而通过对细胞周期的有序调控可以达到抑制肿瘤细胞增殖的目的^[15]。冬虫夏草的抗癌机制还不十分清楚,就目前的研究报道而言,其抗肿瘤作用至少有如下 3 种机制:(1)直接的细

胞毒性, 吴德丰等^[16]认为冬虫夏草主要有效成分是3'-脱氧核苷, 其含有一个游离的醇羟基可掺入癌细胞中, 作用于癌细胞的DNA, 并抑制核苷或核苷酸的磷酸化, 使之不能生成二磷酸盐和三磷酸盐衍生物, 以抑制癌细胞的核酸合成。(2) 诱导肿瘤细胞发生凋亡^[17]: 主要是通过阻滞生长周期、影响肿瘤细胞凋亡信号传递途径而达到促进细胞凋亡的目的。(3) 激活或增强免疫功能: 冬虫夏草多糖类成分能促进免疫细胞的增殖、分泌, 增强免疫细胞的功能而发挥抗肿瘤作用^[18]。本研究结果显示, 冬虫夏草菌丝体水提物可通过阻滞 HepG2 及 NCI-H460 细胞周期循环, 诱导其发生凋亡, 从而发挥增殖抑制作用。有文献^[4]报道, 虫草多糖是冬虫夏草中重要的活性成分之一, 具有抑制肿瘤细胞增殖的药理作用。当然, 本研究中冬虫夏草菌丝体水提醇沉物成分复杂, 不仅含有核苷, 还含有单糖、多糖等成分, 至于是单糖活性组分, 还是多种组分的协同作用达到抗肿瘤效果尚未明确, 值得做更深入的研究。因而, 冬虫夏草菌丝体水提醇沉物对上述两种肿瘤细胞增殖抑制更深入的分子机制还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 王 征, 刘建利. 冬虫夏草化学成分研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(7): 1157-1160.
- [2] Wu J Y, Zhang Q X, Leung P H. Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Cordyceps sinensis* mycelia on various cancer cells in culture and B16 melanoma in C57BL/6 mice [J]. *Phytomedicine*, 2007, 14(1): 43-49.
- [3] Jeong J W, Jin C Y, Park C, *et al.* Inhibition of migration and invasion of LNCaP human prostate carcinoma cells by cordycepin through inactivation of Akt [J]. *Int J Oncol*, 2012, 40(5): 1697-1704.
- [4] 李绍平, 季 晖, 李 萍, 等. 冬虫夏草抗肿瘤作用研究进展 [J]. 中草药, 2001, 32(4): 373-375.
- [5] Yang M L, Kuo P C, Hwang T L, *et al.* Anti-inflammatory principles from *Cordyceps sinensis* [J]. *J Nat Prod*, 2011, 74(9): 1996-2000.
- [6] Lo H C, Hsu T H, Tu S T, *et al.* Anti-hyperglycemic activity of natural and fermented *Cordyceps sinensis* in rats with diabetes induced by nicotinamide and streptozotocin [J]. *Am J Chin Med*, 2006, 34(5): 819-832.
- [7] Shin K H, Lim S S, Lee S H, *et al.* Antioxidant and immunostimulating activities of the fruiting bodies of *Paecilomyces japonica*, a new type of *Cordyceps* sp [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2001, 928: 261-273.
- [8] Wang Y, Wang M, Ling Y, *et al.* Structural determination and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of cultured *Cordyceps sinensis* [J]. *Am J Chin Med*, 2009, 37(5): 977-989.
- [9] Cohen G H, Johnstone D B. Capsular polysaccharide of *zaotobacter agilis* [J]. *J Bacteriol*, 1964, 88: 1695-1699.
- [10] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [11] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *J Immunol Methods*, 1983, 65(1-2): 55-63.
- [12] Zhao Y Y, Shen X, Chao X, *et al.* Ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-one induces G₂/M cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1810(4): 384-390.
- [13] 栾 兰, 王钢力, 林瑞超. 冬虫夏草与虫草发酵菌丝体的 HPLC 指纹图谱比较研究 [J]. 中成药, 2010, 32(6): 893-897.
- [14] Li S P, Li P, Ji H, *et al.* The nucleosides contents and their variation in natural *Cordyceps sinensis* and cultured *Cordyceps mycelia* [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2001, 10(4): 175-179.
- [15] Frömberg A, Gutsch D, Schulze D, *et al.* Ascorbate exerts anti-proliferative effects through cell cycle inhibition and sensitizes tumor cells towards cytostatic drugs [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2011, 67(5): 1157-1166.
- [16] 吴德丰, 郑志雄, 张 翼, 等. 冬虫夏草、中国拟青霉对体外培养的人宫颈癌细胞的抑制作用 [J]. 癌症, 1986, 5(2): 337-340.
- [17] Thakur A, Hui R, Hongyan Z, *et al.* Pro-apoptotic effects of *Paecilomyces hepiali*, a *Cordyceps sinensis* extract on human lung adenocarcinoma A549 cells *in vitro* [J]. *J Cancer Res Ther*, 2011, 7(4): 421-426.
- [18] Jordan J L, Nowak A, Lee T D. Activation of innate immunity to reduce lung metastases in breast cancer [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2010, 59(5): 789-797.