

• 药理与临床 •

人工虫草菌 HK-1 与天然虫草提取物的抗肿瘤活性比较

张巧霞^{1,2}, 梁保康², 吴建勇^{2*}, 胡宗定¹

(1. 天津大学化工学院, 天津 300072; 2. 香港理工大学 应用生物与化学科技学系, 香港)

摘要:目的 比较人工虫草菌 HK-1 与天然虫草提取物抗肿瘤活性及主要化学成分。方法 人工虫草菌 HK-1 与天然虫草分别用石油醚、醋酸乙酯、乙醇和水提取。用 MTT 法测定各提取物对小鼠黑色素瘤细胞 B16、人肝癌细胞 Hep G2、人乳腺癌细胞 MCF-7 和类骨髓白血病细胞 HL-60 的细胞毒作用。对活性提取物进一步用动物模型检测其体内抗肿瘤作用。高效液相色谱法测定提取物中的化学成分。结果 对于小鼠黑色素瘤细胞 B16, 所有虫草菌 HK-1 提取物的细胞毒作用均比天然虫草提取物的作用强, 其中以醋酸乙酯提取物的细胞毒作用最强。虫草菌 HK-1 醋酸乙酯提取物对 4 种肿瘤细胞的细胞毒作用均比天然虫草醋酸乙酯提取物的作用强; 体内实验也表明虫草菌 HK-1 醋酸乙酯提取物可以抑制肿瘤的生长。对提取物化学成分的分析表明麦角甾醇和腺苷可能是虫草菌 HK-1 中具有抗肿瘤活性的成分。结论 人工虫草菌 HK-1 比天然虫草具有更强的抗肿瘤活性, 是有开发潜力的抗肿瘤候选药物。

关键词:冬虫夏草; 人工虫草菌 HK-1; 抗肿瘤作用

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)09-1346-04

Comparison of antitumor effect of extracts in cultivated *Cordyceps sinensis* fungus HK-1 and natural *Cordyceps sinensis*

ZHANG Qiao-xia^{1,2}, LEUNG Po-hong², WU Jian-yong², HU Zong-ding¹

(1. College of Chemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2. Department of Applied Biology and Chemical Technology, Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong, China)

Abstract: **Objective** To compare the antitumor effects and chemical components of the extracts in cultivated *Cordyceps sinensis* (Cs) fungus HK-1 and natural Cs. **Methods** The cultivated Cs fungus HK-1 and natural Cs were extracted with petroleum ether (PE), ethyl acetate (EtOAc), ethanol (EtOH), and water. The cytotoxicity of all the extracts was observed with MTT assay on breast cancer cell line MCF-7, mouse melanoma cell line B16, human premyelocytic leukemia cell line HL-60, and human hepatocellular carcinoma cell line Hep G2. The antitumor activity *in vivo* of the extract was further studied with animal model. The chemical constituents in the extracts were analyzed by HPLC. **Results** All of the extracts from the cultivated Cs fungus HK-1 had much stronger cytotoxicity on B16 than those from natural Cs, and the EtOAc extract had the most potent activity. The activity of EtOAc extract from the cultivated Cs fungus HK-1 was more potent than that from natural Cs on all the four cancer cell lines. EtOAc extract from the cultivated Cs fungus HK-1 also can inhibit the growth of tumor *in vivo*. Chemical components of all extracts were analyzed and ergosterol and adenosine were found to be potential compounds. **Conclusion** The cultivated Cs fungus HK-1 has stronger antitumor activity than natural Cs and is a potential source of antitumor compounds.

Key words: *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.; cultivated Cs fungus HK-1; antitumor effect

冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. 是真菌冬虫夏草菌侵染蝙蝠蛾幼虫形成的一种菌体与虫体外壳共存的生物体, 具有极高的药用价值, 是我国特产名贵中药。研究报道冬虫夏草具有抗衰老, 抗

病源微生物, 抗恶性肿瘤, 扩张血管, 改善动脉硬化症, 调节内分泌、呼吸、免疫、神经系统及肾脏和肝脏等多种功效^[1]。其抗肿瘤活性已被许多体内外的实验研究所证实^[2-5]。由于冬虫夏草本身的生境特殊,

收稿日期: 2005-01-26

基金项目: 香港理工大学资助项目 (G-YD28 and ASD fund)

作者简介: 张巧霞 (1978—), 女, 山东省梁山县人, 博士研究生, 研究方向为分子药理学。

Tel: (0755) 26737176 Fax: (0755) 26972852 E-mail: qiaoxiazhang@163.com

* 通讯作者 吴建勇 Tel: (852) 27666687 Fax: (852) 23649932 E-mail: bcjywu@polyu.edu.hk

万方数据

其自然资源较少,近年来的过度采集已使其生境受到严重破坏,资源明显受到威胁,现已被国家列为濒危保护物种^[6]。人工培育冬虫夏草已成为当今合理保护和利用冬虫夏草这一稀有珍贵药用资源的重要措施。虫草菌液体深层发酵获得虫草菌丝体和发酵产物是人工培育冬虫夏草的主要方法之一^[7]。本实验对人工发酵的虫草菌丝体和天然虫草的抗肿瘤作用及其化学成分进行对比研究。探讨人工发酵的虫草菌丝体的抗肿瘤活性及其可能的活性成分。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器:天然冬虫夏草购于深圳市万泽药店,虫草菌为本实验室分离的虫草菌 HK-1,由 CABI Bioscience (Egham, Surrey, 英国) 鉴定。RPMI 1640 粉剂和胎牛血清 (Gibco 公司);MTT (Sigma 公司);其他试剂为分析纯。Fluostar galaxy 酶标仪 (BMG 公司);Hewlett Packard series 1050 高效液相色谱仪,日本日立 L-7100 型泵,DAD 检测器,HP Chem Station 色谱软件。

1.2 虫草菌丝体的培养及提取物的制备:将保存的虫草菌 HK-1 接种于 PDA 固体培养基,25℃ 培养 3 d,然后再接种于装有 200 mL 液体培养基 (葡萄糖 40 g/L、蛋白胨 10 g/L、酵母粉 3 g/L、MgSO₄ 0.5 g/L、KH₂PO₄ 1 g/L) 的 1 000 mL 三角瓶中,放恒温摇床 (200 r/min, 25℃) 上培养 7 d。滤过,收集菌丝体,50℃ 温箱中干燥至恒重。将培养的菌丝体和天然虫草分别粉碎后,依次用石油醚、醋酸乙酯、乙醇常温下提取 24 h,滤渣用 100℃ 水提取 3 h,所有滤液减压浓缩至恒重,得到虫草菌 HK-1 和天然虫草的提取物。

1.3 细胞培养:人乳腺癌细胞 MCF-7、小鼠黑色素瘤细胞 B16、人肝癌细胞 Hep G2 和类前骨髓白血病细胞 HL-60 均购自于 ATCC (Rockville, MD),在含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中,于 37℃、含 5% CO₂ 水饱和的培养箱中传代培养。

1.4 MTT 比色法:取对数生长期的细胞,以 2×10^4 /mL 接种于 96 孔培养板中,每孔 100 μ L。对照组为全培养基,实验组分别含石油醚、醋酸乙酯、乙醇和水提取物,终质量浓度分别为 200、100、50、25 μ g/mL。置 37℃、含 5% CO₂ 水饱和的培养箱中继续培养 48 h 后,每孔加入质量浓度为 1 mg/mL MTT 溶液 50 μ L,继续培养 4 h。以 600 $\times$ g 离心 5 min,吸去培养液,每孔加入 100 μ L DMSO,在 570 nm 处测定吸光度 (A) 值。计算细胞生长抑制率。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$$

万方数据

1.5 在体肿瘤生长试验:C57BL/6 小鼠 (雄性,2 周龄) 购于第一军医大学动物中心。每只小鼠大腿内侧 sc 体外培养的小鼠黑色素瘤 B16 细胞 2×10^6 个。接种肿瘤后第 2 天开始治疗。将荷瘤小鼠随机分成 3 组:模型组 (生理盐水);阳性对照组 (环磷酰胺, 50 mg/kg);给药组 (虫草菌 HK-1 醋酸乙酯提取物, 50 mg/kg), 每组 8 只。所有小鼠经 ip 给药 27 d。实验结束,剖取所有小鼠的肿瘤,称质量,计算抑瘤率。

$$\text{抑瘤率} = (\text{对照组肿瘤平均质量} - \text{给药组肿瘤平均质量}) / \text{对照组肿瘤平均质量} \times 100\%$$

1.6 提取物中麦角甾醇和腺苷的测定:麦角甾醇和腺苷采用高效液相色谱法测定。色谱法:Alltech Econosphere C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相:甲醇-5 mmol/L 磷酸二氢钾;体积流量:1.0 mL/min;进样量:20 μ L;柱温:25℃;检测波长:麦角甾醇为 282 nm 和 210 nm;腺苷为 260 nm。

1.7 统计学处理:数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,行 *t* 检验。

2 结果

2.1 各提取物对 B16 细胞生长的抑制作用:虫草菌 HK-1 和天然虫草石油醚、醋酸乙酯、乙醇和水提取物对小鼠黑色素瘤肿瘤细胞 B16 的细胞毒作用见图 1。结果表明培养的虫草菌 HK-1 抗肿瘤活性远远大于天然虫草。虫草菌 HK-1 的 4 种提取物在质量浓度为 100 μ g/mL,作用时间为 48 h 条件下对 B16 的生长抑制率均在 50% 以上,见图 2。而相同条件下天然虫草各提取物的抑制率明显低于虫草菌 HK-1 各提取物的抑制率,其中天然虫草乙醇和水提取物的抑制作用最弱,乙醇提取物抑制率为 21.6%,而水提取物对 B16 无抑制作用。虫草菌 HK-1 4 种提取物中,醋酸乙酯提取物活性最强,在质量浓度为 100 μ g/mL,作用时间为 48 h 条件下,对 B16 细胞活性的抑制率为 92.7%,而在相同条件下,天然虫草醋酸乙酯提取物的抑制率仅为 56.5%。

2.2 醋酸乙酯提取物对不同细胞株生长的抑制作用:对活性最强的醋酸乙酯提取物对其他肿瘤细胞的细胞毒作用进行进一步检测,结果发现对 MCF-7、Hep G2 和 HL-60 均有类似结果,即虫草菌 HK-1 醋酸乙酯提取物的细胞毒作用比天然虫草醋酸乙酯提取物的作用更强。见图 3。

2.3 虫草菌 HK-1 醋酸乙酯提取物的体内抗癌作用:全部 C57BL/6 小鼠在接种后 7~10 d 出现实体瘤,接种成功率 100%。经过 27 d ip 给药治疗,虫草菌 HK-1 醋酸乙酯提取物组较模型组肿瘤生长速度明显减慢,抑瘤率为 47.98%,说明虫草菌 HK-1 醋

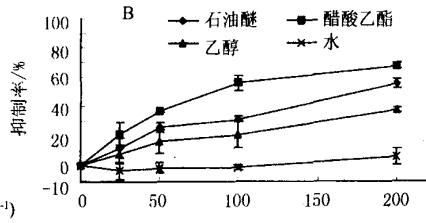
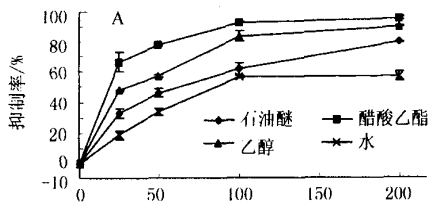


图 1 不同质量浓度的虫草菌 HK-1 (A) 和天然虫草 (B) 提取物作用 48 h 对体外培养的 B16 细胞的生长抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 Growth inhibition of Cs fungus HK-1 (A) and natural Cs (B) extracts on B16 cells at different concentration treated for 48 h *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

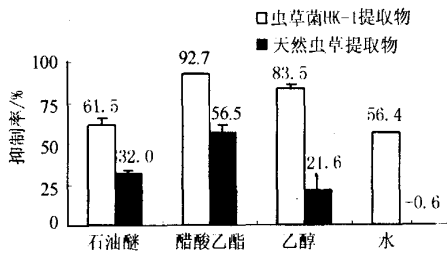


图 2 虫草菌 HK-1 和天然虫草提取物 (100 µg/mL) 作用 48 h 对 B16 细胞生长的抑制作用比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Comparison of growth inhibition of Cs fungus HK-1 and natural Cs (100 µg/mL) extracts on B16 cells treated for 48 h ($\bar{x} \pm s, n=3$)

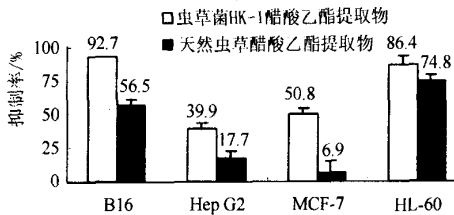


图 3 虫草菌 HK-1 和天然虫草醋酸乙酯提取物对体外培养的肿瘤细胞的细胞毒作用 (100 µg/mL, 48 h) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Cytotoxicity of EtOAc extract from Cs fungus HK-1 and natural Cs (100 µg/mL) on cancer cell lines *in vitro* treated for 48 h ($\bar{x} \pm s, n=3$)

酸乙酯提取物具有明显的抑制瘤作用。见表 1。

2.4 虫草菌 HK-1 与天然虫草提取物化学成分的比较:对虫草菌 HK-1 和天然虫草提取物的主要化学成分做了比较分析,结果表明麦角甾醇在虫草菌 HK-1 醋酸乙酯提取物中的量显著高于其他几种提取物(表 2),与虫草菌 HK-1 醋酸乙酯提取物抗肿瘤活性高于其他提取物的结果一致。虫草菌 HK-1 提取物中腺苷的量高于天然虫草提取物,但醋酸乙酯提取物低于乙醇提取物(表 2)。在所有菌丝体 HK-1 及天然虫草提取物中均未检测到虫草素。

万方数据

表 1 虫草菌 HK-1 醋酸乙酯提取物在体内的抑瘤作用 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Antitumor effect of Cs fungus HK-1 EtOAc extract *in vivo* ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	体重/g		瘤质量/g	抑瘤率/ %
		实验前	实验后		
模型	—	21.10±1.14	27.22±4.51	7.67±2.95	—
环磷酰胺	50	21.52±1.37	20.84±1.87	0.21±0.12**	97.26
虫草菌 HK-1	50	21.26±1.58	24.47±2.56	3.99±2.11*	47.98

与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group

表 2 虫草菌 HK-1 及天然虫草提取物中麦角甾醇和腺苷的质量分数 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Content of ergosterol and adenosine in extracts from Cs fungus HK-1 and natural Cs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

提取物	麦角甾醇/(µg·g ⁻¹)		腺苷/(µg·g ⁻¹)	
	虫草菌 HK-1	天然虫草	虫草菌 HK-1	天然虫草
石油醚	1 014.4±49.8	—	—	—
醋酸乙酯	4 331.9±464.8	12.6±4.9	428.5±55.2	—
乙醇	54.5±21.4	23.5±6.8	1 461.5±22.3	440.5±13.8
水	54.1±19.5	—	401.4±9.4	514.2±22.4

3 讨论

《中国药典》中规定腺苷作为冬虫夏草的质控标准,质量分数必须大于 0.01%,而本实验中的虫草菌 HK-1 含腺苷 0.04%,远远大于天然虫草的质控标准。腺苷可以抑制多种肿瘤细胞的生长,如黑色素瘤、淋巴瘤、结肠癌和前列腺癌等,且对正常细胞没有抑制作用^[8],这种选择性的生长抑制作用被认为是由其 A3 受体介导的^[9,10]。尽管在本实验中活性最强的醋酸乙酯提取物中腺苷质量分数低于乙醇提取物,但是并不能排除腺苷是虫草菌 HK-1 中抗肿瘤活性成分的可能。过去对虫草抗肿瘤作用的报道中指出虫草素是具有抗肿瘤作用的活性成分^[2],但也有报道指出在虫草中存在除多糖和虫草素外的抗肿瘤化合物^[11]。从虫草中分离的甾醇类化合物包括麦角甾醇是目前已被证实具有抗肿瘤活性的一类重要

的化合物。Bok 等从虫草菌中分离到的麦角甾醇过氧化物可以抑制体外培养的 K562、Jurkat、WM-1341、HL-60 和 RPMI-8226 肿瘤细胞的生长^[12], Yang 等从天然虫草中分离到的一种甾醇类化合物 H1-A 可以抑制人肾小球系膜细胞的生长,且诱导其凋亡^[13,14]。在本研究中,含麦角甾醇较多的提取物的抗肿瘤活性也较高,麦角甾醇分布与提取物抗肿瘤活性相一致,故推测麦角甾醇最有可能是虫草菌 HK-1 醋酸乙酯提取物中的抗肿瘤活性成分。

本实验通过对虫草菌 HK-1 和天然虫草提取物体外抗肿瘤作用的比较和活性部位体内抗肿瘤作用的研究证明虫草菌 HK-1 醋酸乙酯提取物具有抗肿瘤活性,且比天然虫草活性更强。另外,虫草菌 HK-1 可以进行深层发酵来获得大量菌丝体。因此,不论从药理活性还是从经济成本上看,人工培养的虫草菌都比天然虫草更具有开发利用的价值。

References:

- [1] Zhu J S, Halpern G M, Jones K. The scientific rediscovery of an ancient Chinese herbal medicine; *Cordyceps sinensis* (L) [J]. *J Altern Complement Med*, 1998, 4: 289-303.
- [2] Cho M A, Lee D S, Kim M J, et al. Antimutagenicity and cytotoxicity of cordycepin isolated from *Cordyceps militaris* [J]. *Food Sci Biotech*, 2003, 12(5): 472-475.
- [3] Kodama E N, McCaffrey R P, Yusa K, et al. Antileukemic activity and mechanism of action of cordycepin against terminal deoxynucleotidyl transferase-positive (TdT1) leukemic cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2000, 59: 273-281.
- [4] Nakamura K, Yamaguchi Y, Kagota S, et al. Inhibitory effect of *Cordyceps sinensis* on spontaneous liver metastasis of Lewis lung carcinoma and B16 melanoma cells in syngeneic mice [J]. *JPN Pharmacol*, 1999, 79: 335-341.
- [5] Yoshida J, Takamura S, Yamaguchi N, et al. Antitumor activity of an extract of *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. against murine tumor cell lines [J]. *JPN J Exp Med*, 1989, 59(4): 157-161.
- [6] Liu P G, Wang X H, Yu F Q, et al. Key taxa of larger members in higher fungi of biodiversity from China [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 2003, 25(3): 285-296.
- [7] Lu L X, Liu S M. Advances in research of *Cordyceps sinensis* [J]. *Bull Biol* (生物学通报), 2002, 37(6): 4-6.
- [8] Fishman P, Bar-Yehuda S, Madi L, et al. A3 adenosine receptor as a target for cancer therapy [J]. *Anti-cancer Drugs*, 2002, 13: 437-443.
- [9] Wen L T, Knowles A F. Extracellular ATP and adenosine induce cell apoptosis of human hepatoma Li-7A cells via the A3 adenosine receptor [J]. *Br J Pharmacol*, 2003, 140: 1009-1018.
- [10] Madi L, Ochaion A, Rath-Wolfson L, et al. The A3 adenosine receptor is highly expressed in tumor versus normal cells; potential target for tumor growth inhibition [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10: 4472-4479.
- [11] Kuo Y C, Lin C Y, Tsain W J, et al. Growth inhibitors against tumor cells in *Cordyceps sinensis* other than cordycepin and polysaccharides [J]. *Cancer Invest*, 1994, 12: 611-615.
- [12] Bok J W, Lerner L, Chilton J, et al. Antitumor sterols from the mycelia of *Cordyceps sinensis* [J]. *Phytochemistry*, 1995, 51(7): 891-898.
- [13] Yang L T, Chen A, Kuo Y C, et al. Efficacy of a pure compound H1-A extracted from *Cordyceps sinensis* on autoimmune disease of MRL lpr/lpr mice [J]. *J Lab Clin Med*, 1999, 134: 492-500.
- [14] Yang L Y, Huang W J, Hsieh H G, et al. H1-A extracted from *Cordyceps sinensis* suppresses the proliferation of human mesangial cells and promotes apoptosis, probably by inhibiting the tyrosine phosphorylation of Bcl-2 and Bcl-XL [J]. *J Lab Clin Med*, 2002, 141: 74-83.

原花青素对肿瘤坏死因子- α 诱导 HeLa 细胞凋亡和 caspase-8 活化的影响

侯 敢, 黄迪南

(广东医学院生物化学与分子生物学研究所, 广东 湛江 524023)

摘要:目的 研究原花青素对肿瘤坏死因子- α (TNF- α)诱导 HeLa 细胞凋亡和 caspase-8 活化的影响。方法 采用流式细胞术检测细胞凋亡, 荧光检测试剂盒测定 caspase-8 活性, Western blot 检测 caspase-8 酶原表达水平。结果 原花青素 (5、10、20 mg/L) 对重组人肿瘤坏死因子- α (rhTNF- α , 100 μ g/L) 诱导的 HeLa 细胞凋亡均有显著的抑制作用 ($P < 0.01$), 呈剂量依赖关系; 原花青素 (5、10、20 mg/L) 对 rhTNF- α (100 μ g/L) 诱导的 HeLa 细胞 caspase-8 活化均有显著抑制作用 ($P < 0.01$), 呈剂量依赖关系; 原花青素 (5、10、20 mg/L) 对 HeLa 细胞 caspase-8 酶原表达无明显影响。结论 原花青素抑制 TNF- α 诱导 HeLa 细胞凋亡可能与其抑制 caspase-8 活化有关。

关键词:原花青素; 肿瘤坏死因子- α (TNF- α); HeLa 细胞; 细胞凋亡; caspase-8

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)09-1349-04

收稿日期: 2005-01-15

基金项目: 广东省教育厅、广东省重点学科经费资助项目 (200308)

作者简介: 侯 敢 (1963—), 女, 湖南泸溪人, 副教授, 硕士, 从事抗肿瘤药物的分子生物学研究。

Tel: (0759) 2388581 E-mail: dinanh@gdmc.edu.cn

万方数据