星点设计-效应面法优化牛樟芝总三萜提取工艺及其抗肿瘤活性研究

吕 莎[1]，张梦雅[1]，罗晓云[1]，王春丽[1]，黄 松[1, 2, 3]，贺 莲[4*]

1. 广州中医药大学，广东 广州 510006
2. 东莞广州中医药大学中医药数理工程研究院，广东 东莞 523808
3. 广东省中药新药研发重点实验室，广东 广州 510006
4. 中山大学新华学院，广东 广州 510006

摘 要：目的 研究牛樟芝总三萜（ACTT）提取工艺及其抗肿瘤活性。**方法** 采用星点设计-效应面法（CCD-RSM）优化 ACTT 的提取工艺；通过 MTT 法检测其对人肝癌 HepG2 细胞体外增殖抑制作用；以最佳质量浓度的 ACTT 提取物（ACTTE）处理 HepG2 细胞，应用荧光显微镜进行形态学观察；应用 AnnexinV 凋亡检测试剂盒进行流式细胞分析，应用流式细胞仪检测细胞凋亡率。**结果** 优化的工艺为加 20 倍量的 90%乙醇，超声提取 2 次，每次 40 min，超声功率 400 W，ACTT 提取率达 11.87%，实际值与预测值的偏差为 1.56%；不同质量浓度（12.5～200 μg/mL）的 ACTTE 对 HepG2 细胞的增殖均有明显的抑制作用（P＜0.01）；直接形态显微观察及 Hoechst33342 荧光染色可观察到核浓缩及核碎裂等典型细胞凋亡特征及凋亡小体；流式细胞仪结果显示，给药组细胞凋亡率与空白组相比，有显著差异（P＜0.01）。**结论** CCD-RSM 优化牛樟芝的超声醇提工艺，实际值与预测值吻合度高，预测性良好，是可行的；ACTTE 体外对 HepG2 细胞有明显的增殖抑制及诱导凋亡的作用。

关键词：牛樟芝；总三萜；星点设计；效应面法；HepG2 细胞；MTT 法；Hoechst33342 荧光染色

中图分类号：R284.2 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2016)22 - 3990 - 07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.22.010

Optimization of extracting technology of total triterpenoids in *Antrodia camphorata* by central composite design-response surface methodology and study on antitumor activity of total triterpenoids

LV Sha[1], ZHANG Meng-ya[1], LUO Xiao-yun[1], WANG Chun-li[1], HUANG Song[1, 2, 3], HE Lian[4]

1. Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China
2. Dongguan Institution for Mathematics and Theoretics Engineering Research for Traditional Chinese Medicine, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Dongguan 523808, China
3. Guangdong Provincial Key Laboratory of New Chinese Medicine Research and Development, Guangzhou 510006, China
4. Xinhua College of SunYat-Sen University, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To study the extracting technology of *Antrodia camphorata* total triterpenoids (ACTT) and their anti-tumor activity. **Methods** To optimize the ACTT extraction process by central composite design of response surface methodology (CCD-RSM). To compare the inhibition of ACTT extract at different concentration and different time on *in vitro* proliferation of cultured HepG2 cell using MTT assay; To observe the HepG2 cell morphology by fluorescence microscopy and flow cytometry and to detect the cell apoptosis rate by AnnexinV apoptosis assay kit. **Results** The optimized process was plus 20 times amount of 90% ethanol, ultrasonic extraction twice, 40 min each time, ultrasonic power of 400 W. ACTT extracting rate was 11.87%, deviation between the actual and predicted values of ACTT extraction rate was 1.56%. MTT assay showed that in 12.5—200 μg/mL, ACTT extract at different concentration (12.5—200 μg/mL) on the proliferation of HepG2 cells showed significant inhibition (P < 0.01). Microscopic observation and direct form Hoechst 33342 staining were used to observe the nuclear enrichment and nuclear

收稿日期：2016-07-13

基金项目：科技部港澳台科技合作专项（2014DFH30010）

作者简介：吕 莎（1991—），女，硕士研究生，从事中药新药研究。Tel: 13640801424 E-mail: 1757567160@qq.com

***通信作者** 贺 莲（1976—），女，硕士，助理研究员。Tel: (020)39358183 E-mail: huangnn421@163.com

fragmentation and other typical features of apoptosis and apoptotic bodies; Flow cytometry showed that there was significant difference of apoptosis rate in the administration group ($P < 0.01$) compared with the control group. **Conclusion** Using CCD-RSM to optimize antrodia ultrasonic alcohol extraction process, the actual and predicted values are consistent with high and good predictability which is feasible. ACTT extract can significantly inhibit the proliferation and induce apoptosis on HepG2 cells *in vitro*.

Key words: *Antrodia camphorata*; total triterpenoids; central composite design; response surface methodology; HepG2 cell; MTT assay; Hoechst33342 fluorescence staining

牛樟芝 *Antrodia camphorate* 属非褶菌目多孔菌科（Polyporaceae）薄孔菌属 *Antrodia* Karst. 多年生蕈菌类，又名牛樟菇或樟芝，药用部位为牛樟芝子实体，仅生长于台湾特有的牛樟树上，具有解酒、保肝、抗肿瘤的作用[1-2]。

现代研究表明，牛樟芝含有多糖、三萜、超氧化物歧化酶（SOD）、腺苷、小分子蛋白质（含免疫蛋白）等多种生理活性物质[2-8]，其中三萜类成分是其主要的抗肿瘤活性成分。王宫等[9]采用正交设计法确定的回流提取工艺，使得牛樟芝总三萜（ACTT）提取率达到 10.02%。超声提取方法已在中草药提取和成分鉴定中取得不少成果，具有提取时间短、提取率高、提出成分完全、污染少、设备简单等优点[10-11]。牛樟芝子实体与菌丝体均具有良好的抗肿瘤作用，作为抗肿瘤新药的研发来源，具有很大的开发前景。前期通过比较超声提取法与回流提取法的 ACTT 提取率，确定超声提取法效果更好。星点设计（central composite design，CCD）[12]由于其精密度高、预测值接近真实值，是近年常用的设计方法。因此，本研究采用单因素与 CCD-效应面法（CCD-RSM）[13-14]，优选合理的 ACTT 超声提取工艺，同时以人肝癌细胞 HepG2 为研究对象，对 ACTT 提取物（ACTTE）体外的潜在抗肿瘤效应进行了一系列的研究，为牛樟芝抗癌药物的开发提供了一定的实验基础和理论依据。

1 仪器与材料

TU-1810 型紫外-可见分光光度计，北京普析通用仪器有限责任公司；CP225D 十万分之一电子天平，德国 Sartorius 公司；KQ5200DA 型数控超声清洗器，昆山市超声仪器公司；ScienTZ-10N 冷冻干燥机，宁波新芝生物科技股份有限公司。Heraeu CO_2 孵箱、Olympus 倒置显微镜、i'Mark680 酶标仪、Leica 荧光显微镜、流式细胞仪，美国 BD 公司。

熊果酸对照品，批号 100080-200306，质量分数≥98.5%，购于中国食品药品检定研究院；高氯酸、5%香草醛-冰乙酸、乙醇，分析纯。

人肝癌 HepG2 细胞购自吉欧物科技有限公司；MTT、DMSO、五氟尿嘧啶均购自美国 Sigma 公司；高糖 DMEM，Gibco 公司，批号 8112136；Annexin V-FITCPI 双染试剂盒、Hoechst33258 购自凯基生物；胎牛血清、磷酸盐缓冲液、青链霉素混合液购自 Cyagen Biosciences 公司。

牛樟芝药材为广东茂丰源农业科技有限公司提供的组织培养子实体，经广州中医药大学陈建南研究员鉴定为多孔菌科薄孔菌属多年生蕈菌类牛樟芝 *Antrodia camphorata* 子实体，冷冻干燥，粉碎，过 100 目筛，得牛樟芝粉末。

2 方法与结果

2.1 方法学考察

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称定熊果酸对照品 10.00 mg 于 100 mL 量瓶，以醋酸乙酯溶解、定容，得 0.10 mg/mL 熊果酸对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取牛樟芝粉末 1 g，加入 20 mL 90%乙醇超声提取 1 次，滤过，溶液定容于 250 mL 量瓶。取 1 mL 于 10 mL 量瓶，定容，备用。

2.1.3 线性关系考察 精密量取 0.10、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00、1.20 mL 熊果酸对照品溶液，水浴蒸干后加 0.2 mL 5%香草醛-冰醋酸溶液和 1 mL 高氯酸，于 65 ℃水浴 30 min，再冰水浴 10 min，加入 5.00 mL 冰醋酸，摇匀后放置至室温，随行做空白。用紫外-可见分光光度计于 548 nm 处测定其吸光度（A）值，以熊果酸质量浓度（X）对 A 值（Y）进行线性回归，得到回归方程为 Y＝56.405 X＋0.031 4，r＝0.999 3，表明熊果酸在 10～120 μg 线性关系良好。

2.1.4 精密度试验 精密移取对照品溶液和供试品溶液各 1 mL，分别置于 20 mL 具塞试管中挥干溶剂，按“2.1.3”项下方法显色后在紫外分光光度计上连续测定 6 次，结果对照品和样品显色产物 A 值的 RSD 分别为 0.10%和 0.24%，结果表明仪器精密度良好。

2.1.5 稳定性试验 精密移取对照品溶液和供试品溶液各 1 mL，分别置于 20 mL 具塞试管中挥干溶

剂，按“2.1.3”项下方法显色后，在 160 min 内每隔 20 min 测定 *A* 值。结果表明，对照品和供试品显色产物在室温下 120 min 内稳定，*A* 值的 RSD 分别为 0.82%和 1.90%。

2.1.6 重复性试验 取同批牛樟芝粉末 6 份，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.1.3”项下方法测定 ACTT 量，并计算提取率，结果 ACTT 提取率 RSD 为 1.90%，表明本法重复性良好。

2.1.7 加样回收率试验 精密称定已测定牛樟芝样品（ACTT 质量分数 11.75%）1 g 共 9 份，分别按 80%、100%、120%比例加入熊果酸适量，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，即得加样回收溶液，取 1 mL 溶液蒸干，按“2.1.3”项下方法测定 ACTT 量。结果该方法平均加样回收率为 100.01%，RSD 为 1.78%。

2.2 单因素试验

2.2.1 乙醇体积分数对 ACTT 提取率的影响 精密称定 5.0 g 牛樟芝粉末 5 份，分别加入水及 50%、70%、80%、90%、95%、100%乙醇 100 mL，超声（功率 500 W）提取 1 次，每次 60 min，滤过，滤液合并定容于 250 mL 量瓶。取 1 mL 于 50 mL 量瓶，定容。取 1 mL 供试品溶液水浴蒸干，按“2.1.3”项下方法测定 *A* 值，计算 ACTT 提取率，结果分别为（1.34±0.06）%、（2.82±0.07）%、（5.81±0.07）%、（9.41±0.02）%、（11.47±0.08）%、（11.26±0.04）%、（11.17±0.03）%（n=5）。当乙醇体积分数为 90%时，ACTT 提取率最大，因此选择 90%乙醇作为星点设计时提取溶剂的中心点。

2.2.2 超声功率对 ACTT 提取率的影响 精密称定 5.0 g 牛樟芝粉末 4 份，加入 100 mL 90%乙醇，分别在 200、300、400、500 W 功率下超声 1 次，每次 30 min，滤液合并定容于 250 mL 量瓶，取 1 mL 于 50 mL 量瓶，定容。取 1 mL 供试品溶液水浴蒸干，按“2.1.3”项下方法测定 *A* 值，计算 ACTT 提取率，结果分别为（8.21±0.04）%、（9.05±0.03）%、（11.31±0.01）%、（10.18±0.03）%（n=5）。ACTT 提取率随超声功率的增大而增大，当功率达到 400 W 时达到最大，超过 400 W ACTT 提取率开始降低，可能功率过大导致三萜类成分结构破坏[15]，因此选择超声功率 400 W 作为星点设计时的中心点。

2.2.3 溶剂用量对 ACTT 提取率的影响 精密称定 5.0 g 牛樟芝粉末 4 份，分别加入 10、15、20、25、30 倍量 90%乙醇在超声功率 400 W 条件下提取 1 次，每次 30 min，合并滤液定容于 250 mL 量瓶，取 1 mL 于 50 mL 量瓶，定容。取 1 mL 供试品溶液水浴蒸干，按“2.1.3”项下方法测定 *A* 值，计算 ACTT 提取率，结果提取率分别为（8.84±0.01）%、（9.91±0.02）%、（11.36±0.09）%、（11.47±0.05）%、（11.53±0.05）%（n=5）。ACTT 提取率随溶剂用量增大而升高，当溶剂用量为 20 倍时达到最大，之后趋于平衡，考虑节约成本，选择乙醇用量为 20 倍作为星点设计时的中心点。

2.2.4 提取时间对 ACTT 提取率的影响 精密称定 5.0 g 牛樟芝粉末 4 份，加入 100 mL 90%乙醇在 400 W 功率下超声 1 次，设计提取时间分别为 20、30、40、50、60 min，合并滤液定容于 250 mL 量瓶，取 1 mL 于 50 mL 量瓶，定容。取 1 mL 供试品溶液水浴蒸干，按“2.1.3”项下方法测定 *A* 值，计算 ACTT 提取率，结果 ACTT 提取率分别为（9.91±0.12）%、（10.18±0.04）%、（11.36±0.13）%、（11.42±0.09）%、（11.58±0.14）%（n=5）。ACTT 提取率随提取时间增加而升高，当提取时间为 40 min 时达到最大，之后趋于平衡，故选择超声提取时间 40 min 作为星点设计时的中心点。

2.2.5 提取次数对 ACTT 提取率的影响 精密称定 5.0 g 牛樟芝粉末 4 份，加入 100 mL 90%乙醇分别超声（功率 400 W）提取 1、2、3、4 次，每次 40 min，合并滤液定容于 250 mL 量瓶，取 1 mL 于 50 mL 量瓶，定容，取 1 mL 供试品溶液水浴蒸干，按“2.2.1”项下方法测定 *A* 值，计算 ACTT 提取率，结果分别为（10.49±0.06）%、（11.64±0.06）%、（11.78±0.13）%、（11.94±0.03）%（n=5）。ACTT 提取率随提取次数增加而升高，当提取 2 次时已基本提取完全，故选择超声提取次数为 2 次。

2.3 星点设计实验

2.3.1 因素、水平及指标的确定 根据星点设计[16]的原理和单因素试验结果，选取乙醇体积分数（X_1）、溶剂用量（X_2）和提取时间（X_3）3 个对 ACTT 提取率（Y）影响较大的因素。因提取次数为非连续变量，不能进行回归处理，结合预试验结果和工业生产的实际，暂固定为 2 次，超声功率固定为 400 W，进行 3 因素 5 水平的响应面试验，用代码−α、−1、0、1、α（$\alpha=\sqrt{3}$）表示，代码值所代表的物理量见表 1，星点实验设其余因素的水平见因素水平见表 1，具体实验方案与结果见表 1。

2.3.2 模型拟合 将实验所得数据运用 Design-

表 1 星点试验设计与结果 (n = 5)

Table 1 CCD design and result (n = 5)

试验号	X_1/%	X_2/倍	X_3/min	Y/%
1	84.23 (−1)	14.23 (−1)	28.45 (−1)	11.33
2	95.77 (1)	14.23 (−1)	28.45 (−1)	11.44
3	84.23 (−1)	25.77 (1)	28.45 (−1)	11.69
4	95.77 (1)	25.77 (1)	28.45 (−1)	11.40
5	84.23 (−1)	14.23 (−1)	51.55 (1)	11.46
6	95.77 (1)	14.23 (−1)	51.55 (1)	11.04
7	84.23 (−1)	25.77 (1)	51.55 (1)	11.51
8	95.77 (1)	25.77 (1)	51.55 (1)	10.92
9	80 (−α)	20 (0)	40 (0)	11.39
10	100 (α)	20 (0)	40 (0)	11.34
11	90 (0)	10 (−α)	40 (0)	10.99
12	90 (0)	30 (α)	40 (0)	11.56
13	90 (0)	20 (0)	20 (−α)	11.28
14	90 (0)	20 (0)	60 (α)	11.15
15	90 (0)	20 (0)	40 (0)	11.94
16	90 (0)	20 (0)	40 (0)	11.90
17	90 (0)	20 (0)	40 (0)	11.82
18	90 (0)	20 (0)	40 (0)	11.87
19	90 (0)	20 (0)	40 (0)	11.69
20	90 (0)	20 (0)	40 (0)	12.01

Expert V8.0.6 版软件以 Y 对各单因素 X_1、X_2、X_3 进行多元线性回归和 2 项式拟合。

多元线性回归方程为 Y＝12.888 24－0.015 803 X_1＋0.015 317 X_2－22.419 106 X_3，r＝0.402 1，P＝0.006 4＜0.01，表示模型通过检验，但 r＝0.402 1，表明拟合度不佳，预测性也较差，因此不能选择线性模型进行拟合。

二项式拟合方程为 Y＝11.87－0.091 X_1＋0.088 X_2－0.083 X_3－0.071 X_1X_2－0.10 X_1X_3－0.049 X_2X_3－0.16 X_1^2－0.19 X_2^2－0.21 X_3^2，r＝0.941 7，进行方差分析，结果见表 2。

二项式模型拟合的方差分析显示，F 值为 8.7，且 F 的概率 P＝0.001 1，小于显著性水平 0.05，可以判断模型是显著的。对各个变量分别进行显著性检验，结果发现 X_1、X_1^2、X_2^2、X_3^2 这几个变量是显著的（P＜0.05、0.01）。失拟模型拟合不成立的 P 为 0.147 3，远大于 0.05，说明由于误差导致模型拟合程度不佳的可能性较小，模型拟合较好。

2.3.3 效应面法优化提取工艺 根据 2 项式方程分别对 X_1、X_2、X_3 求偏导数，并令其等于 0，得出的理论工艺条件为乙醇体积分数 90%、液料比 20 倍、提取时间 40 min，这 3 个理论值和实际操作非常接近并且在合理的范围之内。同时再结合响应面及等高线图将理论结果规划到一个更精确的范围内，固定 3 个自变量之一为中值，以拟合的目标函数为数学模型，绘制因变量 Y 的响应面和等高线图，见图 1。在理论最佳条件的基础上再依据响应面和等高线图，将各响应面和等高线的区域进行组合重叠，得到最佳区域，再结合实际操作的试验数据，选取 ACTT 的提取最佳工艺范围：X_1 为 85%～91%，X_2 为 18～24 倍，X_3 为 31～45 min。根据实际情况，确定 ACTT 的最佳超声提取工艺为 20 倍的 90%乙醇超声提取 2 次，每次 40 min，超声功率 400 W。

表 2 2 项式拟合方差分析表

Table 2 Variance analysis of binomial fitting

误差来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值
模型	9	1.760	0.200	8.70	0.001 1
X_1	1	0.120	0.120	5.18	0.046 1
X_2	1	0.110	0.110	4.86	0.052 0
X_3	1	0.095	0.095	4.24	0.066 5
X_1X_2	1	0.041	0.041	1.81	0.208 7
X_1X_3	1	0.086	0.086	3.83	0.078 8
X_2X_3	1	0.019	0.019	0.85	0.379 5
X_1^2	1	0.390	0.390	17.21	0.002 0
X_2^2	1	0.550	0.550	24.43	0.000 6
X_3^2	1	0.670	0.670	29.94	0.000 3
残差	10	0.220	0.022		
失拟项	5	0.160	0.033	2.73	0.147 3
纯误差	5	0.060	0.012		
总差	19	1.990			

2.3.4 验证与放大试验 依据响应面法优化的工艺条件，再次提取牛樟芝药材 3 份，每份 20 g，按最优提取工艺条件提取，进行验证试验，结果 3 份样品测得的 ACTT 提取率分别为（11.83±0.42）%、（11.77±0.11）%、（11.46±0.29）%（n＝3），平均值为（11.68±0.29）%，RSD 为 2.50%；按最优工艺参数简化后代入 2 次多项式模型方程计算，预测 ACTT 提取率为 11.87%。计算其相对偏差［RD，RD＝(实测值－预测值)/预测值］，得 RD 为 1.56%。结果表明本实验所得拟合方程可较好地描述指标与因素之间的关系，所建立的数学模型具有良好的预

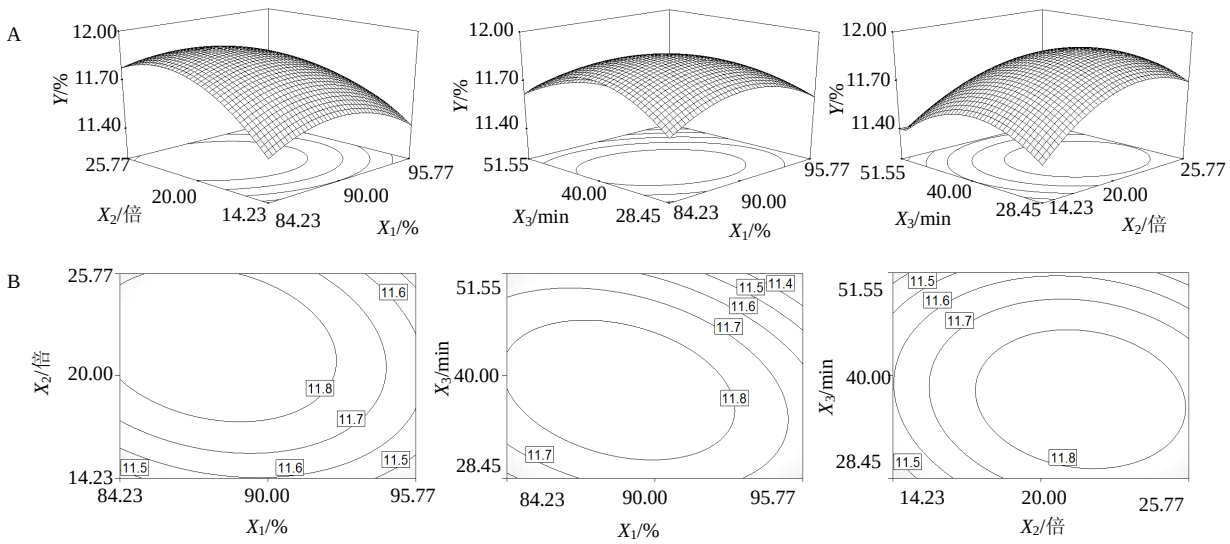

图 1　*Y* 的响应面图 (A) 和等高线图 (B)

Fig. 1　Response surface (A) and contour (B) plot of *Y*

测性，所选工艺条件重现性好。

2.4　ACTT 体外抗肿瘤活性研究

2.4.1　MTT 法检测细胞增殖抑制率　HepG2 细胞以 5×10^4/孔接种于 96 孔板，置于 37 ℃、5% CO_2 的培养箱中，次日细胞贴壁后弃去培养液，分别加入质量浓度为 12.5、25、50、100、200 μg/mL 的 ACTTE 的培养液 100 μL，每个质量浓度设 5 孔，同时设无药阴性对照组（无血清）5 孔，以及阳性对照组（5-FU，50 μg/mL），设 5 孔；然后置 37 ℃、5% CO_2 培养箱分别培养 12、24、48 h；取出后加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μL，37 ℃避光继续培养 4 h；吸出旧液，每孔加 DMSO 150 μL，震荡 5 min，混匀使甲瓒结晶充分溶解；置于酶标仪 490 nm 波长下检测各孔 *A* 值，取 5 个复孔的均值为最终结果；计算细胞增殖抑制率（IR）。

IR＝(1－给药组 *A* 值)/阴性对照组 *A* 值

由表 3 可知，12.5～50 μg/mL ACTTE 在 12～48 h 时对 HepG2 细胞的 IR 在逐渐升高，超过 50 μg/mL，药物对 HepG2 细胞的 IR 开始下降，且当质量浓度 50 μg/mL、作用时间为 48 h 时，IR 可达 86.93%，IR 稍高于阳性药 5-Fu（85.95%）。ACTTE 在 12、24、48 h 的半数抑制率（IC_{50}）分别为 130.63、22.28、4.56 μg/mL。

2.4.2　荧光显微镜观察细胞凋亡　HepG2 细胞以 1×10^5 个/孔的密度接种到 6 孔板，加入 200 μL 质量浓度为 50 μg/mL 的 ACTTE 孵育 48 h，培养后吸出，用 PBS 洗 3 次，用 4%多聚甲醛室温下固定细胞 30 min，PBS 洗 3 次，每孔加入 300 μL Hoechst 33258 染色液，室温避光染色 5 min，PBS 洗 3 次，荧光显微镜拍照记录。同时设阴性对照和阳性对照。

表 3　ACTTE 对 HepG2 细胞体外增殖的影响 ($\bar{x}\pm s$, n = 5)

Table 3　Effect of ACTT extract on proliferation of HepG2 cells ($\bar{x}\pm s$, n = 5)

组别	给药质量浓度/(μg·mL^{-1})	*A* 值			IR/%		
		12 h	24 h	48 h	12 h	24 h	48 h
阴性对照	—	0.917±0.030	0.860±0.000	0.782±0.040	—	—	—
ACTTE	12.5	0.740±0.010**	0.556±0.020**	0.341±0.070**	19.32±1.09*	35.29±2.01*	56.34±8.56
	25	0.552±0.010**	0.376±0.020**	0.171±0.010**	39.83±1.19*	56.29±2.01*	78.18±1.54*
	50	0.369±0.020*	0.266±0.010**	0.102±0.000*	56.79±1.89*	69.03±1.06*	86.93±0.39**
	100	0.412±0.010**	0.322±0.020	0.115±0.000	55.11±1.21*	62.50±2.39*	85.25±0.56**
	200	0.455±0.010**	0.310±0.010	0.148±0.010	50.42±0.84**	64.00±1.72*	81.03±1.64*
阳性对照	50	0.228±0.000**	0.182±0.010**	0.110±0.000**	75.10±0.17**	78.89±0.60**	85.95±0.43**

与阴性对照组比较：$^{*}P$＜0.05　$^{**}P$＜0.01，下同

$^{*}P$ < 0.05　$^{**}P$ < 0.01 *vs* negative control group, same as below

由图 2 可知，HepG2 细胞经 50 μg/mL 的 ACTTE 处理 48 h 后，用 Hoechst 33258 染色在荧光显微镜下可观察到细胞出现凋亡的典型形态改变：核固缩或碎裂，染色质呈新月形小体，细胞核或细胞质内可见浓染致密的颗粒块状荧光，荧光较强；而正常细胞核呈弥漫均匀荧光，荧光较弱；并且凋亡细胞的数目高于阴性对照组。

2.4.3 ACTTE 对 HepG2 细胞凋亡的影响 采用流式细胞仪检测细胞凋亡率。HepG2 细胞以 1×10^5 个/孔的密度接种到 6 孔板，加入 200 μL 质量浓度为 50 μg/mL 的 ACTTE 孵育 48 h，培养后，用不含 EDTA 的胰酶消化，收集细胞后用 PBS 洗涤细胞 2 次，然后用 Bind Buffer 重悬细胞，加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀后，加入 5 μL 碘化丙啶染色液，混匀，室温，避光，反应 5～15 min。进行流式细胞仪检测，Cell Quest 分析凋亡细胞率。同时设阴性对照和阳性对照组。50 μg/mL 的 ACTTE 作用 HepG2 细胞 48 h 时正常细胞、凋亡细胞（包括早期凋亡和晚期凋亡）和坏死细胞所占比例见图 3 和表 4。流式细胞测定结果显示，HepG2 细胞给药组在 48 h 与阴性对照组相比凋亡率明显增加（$P<0.01$），且以中晚期凋亡为主。

3 讨论

牛樟芝含有三萜、多糖、腺苷等多种具有生物活性的天然产物。其中三萜类化合物被证实具有抗肿瘤活性[8]。因此，本实验采用更加严密的 CCD-RSM[17]优化了牛樟芝总三萜提取工艺，保证药材的充分利用。同时以人肝癌 HepG2 细胞为研究对象，

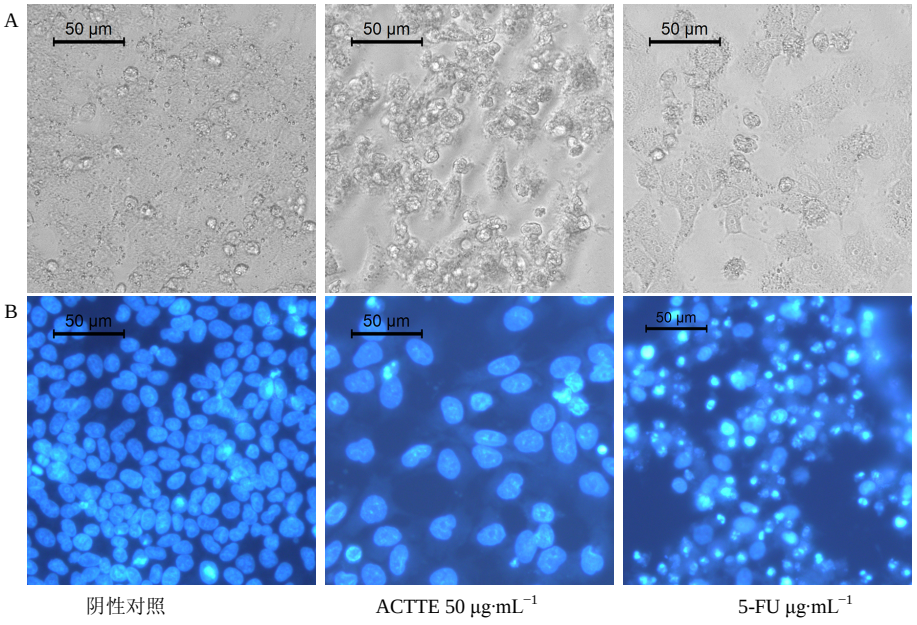

图 2 药物处理后的 HepG2 细胞的形态学变化 (200×, A) 和 Hoechst 33258 染色检查药物作用 HepG2 细胞 48 h 后细胞形态学变化 (200×, B)

Fig. 2 Morphology changes of HepG2 cells treated with ACTT extract (200 ×, A) and treated with ACTT extract for 48 h by Hoechst 33258 staining (200 ×, B)

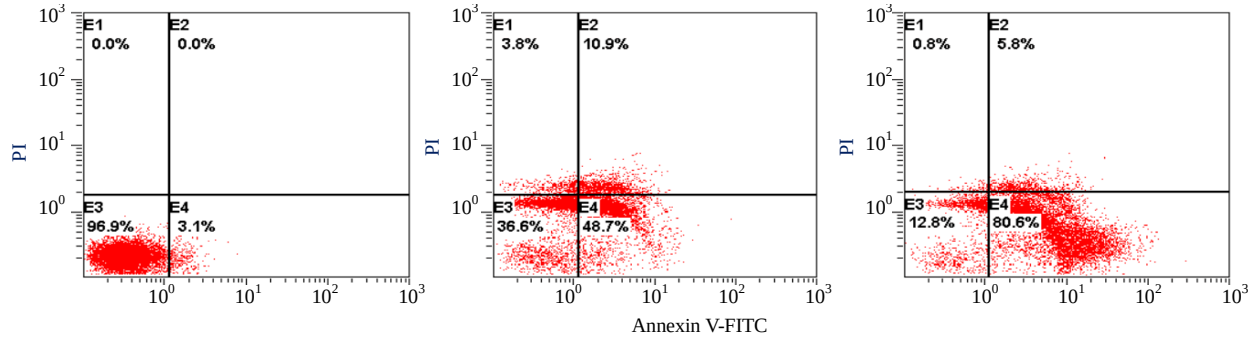

图 3 流式细胞术检测 ACTTE (50 μg/mL) 诱导 HepG2 细胞凋亡率

Fig. 3 Apoptosis of HepG2 cells after ACTT extract (50 μg/mL) induction detected by flow cytometry

表 4 ACTTE 对 HepG2 细胞凋亡的影响 ($\bar{x}\pm s$, n = 5)

Table 4 Effect of ACTT extract on apoptosis of HepG2 cells ($\bar{x}\pm s$, n = 5)

组别	给药质量浓度/(μg·mL^{-1})	凋亡率/%
阴性对照	—	3.09±0.04
给药组	50	86.92±0.39**
阳性对照	50	85.95±0.43**

探讨 ACTTE 对 HepG2 细胞增殖抑制作用可能的最佳质量浓度。

本研究通过 CCD-RSM 优化得到 ACTT 的最佳提取工艺为 20 倍的 90%乙醇超声提取 2 次，每次 40 min，超声功率 400 W。以优选的工艺提取 ACTT，提取物冷冻干燥，测得该提取物中 ACTT 量高达 55.56%。通过 MTT 法对药物质量浓度进行初步筛选后，发现同质量浓度的 ACTTE 均能显著抑制肝癌细胞 HepG2 的增殖，且 IR 在质量浓度为 50 μg/mL 时达到最大，MTT 证实了 ACTTE 对 HepG2 细胞具有显著的增殖抑制作用，在同一质量浓度作用下，实验组 IR 在一定范围内（12.5～50 μg/mL，12～48 h）逐渐降低，当质量浓度 50 μg/mL，作用时间为 48 h 时，给药组 IR 可达 86.93%，质量浓度或时间继续升高时，给药组 IR 开始下降，说明在一定范围内呈时间质量浓度依赖性，当给药时间为 48 h，给药质量浓度为 50 μg/mL 时，其 IC_{50} 为 4.56 μg/mL。本研究表明人肝癌 HepG2 细胞对 ACTTE 的敏感性高，ACTTE 在低质量浓度时就对 HepG2 有很好的抑制作用。

诱导凋亡是实现其对 HepG2 细胞抑制作用的重要途径，ACTTE 作用 12 h，HepG2 细胞未发现凋亡，仅见少许坏死细胞；作用 48 h，HepG2 细胞大量凋亡，同时可见肿瘤细胞大量坏死。细胞凋亡的早期改变之一是磷脂酰丝氨酸（PS）从细胞膜内转移至细胞外，异硫氰荧光素（FITC）标记的 Annexin V-PI 双染检测细胞凋亡。结果显示，HepG2 细胞凋亡通常是在一定质量浓度的 ACTTE 和一定作用时间内发生的，超出最高界线则表现为细胞坏死，提示如何更安全更有效地发挥其治疗作用，应进一步研究。

综上所述，ACTTE 能明显抑制 HepG2 细胞的增殖，呈剂量与时间依赖性，其抑制增殖的机制可能与 ACTTE 诱导细胞凋亡有关。但是 ACTTE 作为一种天然提取物，其成分复杂，对于是否还存在其他途径和通路，有待进一步研究。

参考文献

[1] Wu S H, Ryvarden L, Chang T T. *Antrodia camphorata* (niu-chang-chih), new combination of a medicinal fungus in Taiwan [J]. *Bot Bull Acad Sin*, 1997, 38(4): 273-275.

[2] 张远腾, 李晓波. 牛樟芝化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(6): 1034-1042.

[3] Zhang D Z. Taiwan's unique precious medicinal fungus Antrodia camphorata [J]. *Edible Medicinal Mushrooms*, 2011, 19(1): 33-34.

[4] Chen T Q, Fang Z Y. Taiwan food (drugs) with bacteria development status [J]. *Fujian Agric Sci Technol*, 2000, 18(1): 20-21.

[5] Chrn C, Yang S. New steroid acids from *Antrodia cinnamomea*, a fungal parasite of *Cinnamomum micranthum* [J]. *J Nat Prod*, 1995, 58(11): 1655-1661.

[6] Cheng I, Chiang H, Cheng M, *et al*. Three new trierpenoids from *Antrodia cinnamomea* [J]. *J Nat Prod*, 1995, 58(3): 365-371.

[7] Yang S, Shen Y, Chen C. Steroids and triterpenoids of *Antrodia cinnamomea* — A fungus parasitic on *Cinnamomum micranthum* [J]. *Phytochemietry*, 1996, 41(5): 1389-1392.

[8] Cherng I, Chiang H, Wu D. Triterpenoids from *Antrodia cinnamomea* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 41(5): 263-267.

[9] 王 宫, 王 瑾, 徐 蔚. 牛樟芝总三萜提取工艺研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2011, 25(6): 67-68.

[10] 徐春龙, 林书玉. 超声提取中草药成分研究进展 [J]. 药物分析杂志, 2007, 7(6): 933-937.

[11] 叶陈丽, 贺 帅, 曹伟灵, 等. 中药提取分离新技术的研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(3): 457-464.

[12] 吴 伟, 崔光华. 星点设计-效应面优化法及其在药学中的应用 [J]. 国外医学: 药学分册, 2000, 27(5): 292-298.

[13] 卢浩扬, 林媛媛, 车俊秀, 等. 星点设计-效应面法优化芷芎散温敏凝胶的处方及其鼻黏膜渗透特性研究 [J]. 中草药, 2014, 45(13): 1845-1849.

[14] 王 博, 李洪起, 连潇嫣, 等. 星点设计-效应面法优化阿德福韦-β-环糊精包合物制备工艺的研究 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(11): 1227-1230.

[15] 叶之红, 林乐珍, 熊红霞, 等. 超声波提取平卧菊三七总三萜的工艺研究 [J]. 食品工业, 2016, 37(2): 10-13.

[16] 严春临, 张 季, 刘 敏, 等. 星点设计-效应面法优化吴茱萸次碱固体脂质纳米粒处方 [J]. 中草药, 2015, 46(9): 1307-1313.

[17] 吕 维, 吴 恋, 罗红丽, 等. 星点设计-效应面法优化川芎提取工艺 [J]. 药物评价研究, 2014, 37(1): 53-57.