

灵芝破壁孢子粉总三萜提取工艺优化及体外抗肿瘤作用的研究

李康, 娜锬, 王兴亚* (浙江中医药大学, 杭州 310053)

摘要: 目的 优选出破壁灵芝孢子粉中总三萜的最佳提取工艺, 并对其体外抗肿瘤活性进行评价。方法 正交试验法优化灵芝总三萜的提取工艺; MTT 法测定体外抗肿瘤活性; 流式细胞仪检测筛选出的细胞株的凋亡率。结果 最佳提取工艺条件为 95%乙醇, 液料比 60:1, 在 85 °C 条件下, 回流提取 2 h, 提取 2 次, 总三萜的含量可达 6.45%; 灵芝总三萜对人结肠癌 HCT116 细胞、人肺癌 A549 细胞、人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的 IC₅₀ 值分别为 1.29, 1.68, 3.81 mg·mL⁻¹; 不同浓度的灵芝总三萜(0.64, 1.6, 4.0, 10 mg·mL⁻¹)作用于结肠癌 HCT116 36 h 能显著诱导结肠癌 HCT116 细胞发生凋亡。结论 该提取工艺提取效率较高, 稳定、可行; 灵芝总三萜在体外具有抗人结肠癌、人乳腺癌及人肺癌作用, 并可显著诱导 HCT116 细胞产生凋亡作用。

关键词: 灵芝孢子粉; 总三萜; 抗肿瘤; 细胞凋亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2017)09-1219-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.09.001

引用本文: 李康, 娜锬, 王兴亚. 灵芝破壁孢子粉总三萜提取工艺优化及体外抗肿瘤作用的研究[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(9): 1219-1224.

Study on Optimize Extraction Process of Total Triterpenoids from Sporoderm-broken Spores of *Ganoderma Lucidum* and Its Anti-cancer Effect *in Vitro*

LI Kang, NA Kun, WANG Xingya* (Zhejiang Chinese Medicine University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize extraction process of sporoderm-broken spores of *Ganoderma lucidum* triterpenoids and evaluate anti-cancer effect of total triterpenoids from sporoderm-broken spores of *Ganoderma lucidum in vitro*. **METHODS** Orthogonal test was used to optimize the extraction process of triterpenoids and cell viability was detected by MTT assay. Besides, the apoptosis rate of cells was detected by flow cytometry. **RESULTS** The optimum extraction conditions were as follows: ethanol concentration: 95%, the ratio of liquid to material ratio: 60:1, temperature: 85 °C, time: 2 h, frequency: 2. According to this condition, the content of triterpenoids of *Ganoderma lucidum* was up to 6.45%. The IC₅₀ values of triterpenoids of *Ganoderma lucidum* on human colon cancer HCT116 cells, human lung cell line A549 cells and human breast cancer MDA-MB-231 cells were 1.29, 1.68, 3.81 mg·mL⁻¹, respectively. Compared with the control group, apoptosis of HCT116 cells treated with a various concentration of total triterpenoids of *Ganoderma lucidum* (0.64, 1.6, 4.0, 10 mg·mL⁻¹) at 36 h was significantly induced. **CONCLUSION** The extraction process is feasible, which can improve extraction efficiency. The MTT data indicates that triterpenoids of *Ganoderma lucidum* has anti-proliferation activity of human colorectal cancer, human breast cancer and human lung cancer cells *in vitro*, and the results show that triterpenoids of *Ganoderma lucidum* can significantly induce apoptosis of HCT116 cells.

KEY WORDS: sporoderm-broken spores of *Ganoderma lucidum*; total triterpenoids; anti-cancer activity; apoptosis

灵芝孢子粉为多孔菌科灵芝属赤芝或紫芝 (*Ganoderma lucidum* Karst) 的种子, 具有其全部的遗传物质^[1], 且较灵芝其他部位有效成分的含量要高^[2-3]。由于灵芝孢子具有双壁结构致使内部的营养物质无法完全溶出, 所以通常通过破壁来提高人体对灵芝孢子粉营养物质的吸收。三萜类化合物是灵芝孢子粉中一类重要的活性化合物。现代药理学研

究发现, 灵芝三萜具有抗肿瘤^[4]、提高免疫力及保肝等^[5]药理作用。因此, 研究破壁灵芝孢子粉中总三萜的提取工艺及抗肿瘤活性对进一步开发破壁灵芝孢子粉具有重要的意义。

陈冠州等^[6]报道, 以三氯甲烷为提取溶剂, 在超声波(50 °C、45 kHz)条件下对破壁灵芝孢子粉进行提取, 经测定发现样品中灵芝三萜的含量为

基金项目: 国家自然科学基金项目(81473397)

作者简介: 李康, 男, 硕士生 Tel: 17826818453

E-mail: 1258398689@qq.com

*通信作者: 王兴亚, 女, 博士, 研究员

Tel:

18668093229 E-mail: xywang@zjmu.edu.cn

3.55%。除此之外,有研究人员发现,通过超临界流体萃取技术在萃取压力为 22 MPa、萃取温度 50 °C、萃取时间 2 h 条件下对破壁灵芝孢子粉中的三萜进行提取,获得的样品中三萜化合物的含量为 17.6%^[7]。这说明提取技术会对灵芝三萜含量产生较大的影响,然而由于超临界流体成本较高,技术条件较为复杂,大范围应用条件尚不成熟。因此对常规提取技术的影响因素进行正交优化,从而获得比较理想的工艺参数,是目前比较实用的解决此类问题的重要思路。以乙醇为提取溶剂,对破壁灵芝孢子粉总三萜提取工艺及其体外抗肿瘤作用进行同步研究鲜见报道。

本课题采用正交试验法对灵芝总三萜的提取工艺的影响因素进行优化,并通过 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)试验检测其对入结肠癌 HCT116 细胞、人肺癌 A549 细胞、人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的体外抗肿瘤活性,为进一步开发破壁灵芝孢子粉提供一定的理论依据。

1 仪器与试剂

UV5950 型紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司); DK-450B 恒温水浴锅(上海森信实验仪器有限公司); SB-5200DT 超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司); XS105 分析天平、ISO 9001 电子天平(梅特勒-托利多国际有限公司); SHB-III 循环水式多用真空泵、R1001-VN 旋转蒸发器、WB-2000 水浴锅(郑州长城科工贸有限公司); H051 型冷冻干燥机(丹麦 LABOGENE 公司); 酶标仪(美国 Bio-tech 公司); 细胞培养箱、超净台(美国 Thermo 公司); easyCyte 6 流式细胞仪(德国 Millipore 公司)。

无水乙醇[分析纯,永华化学科技(江苏)有限公司]; 冰醋酸(上海凌峰化学试剂有限公司,批号: 20131018,分析纯); 苯酚(上海凌峰化学试剂有限公司,批号: 20140126,色谱纯); 香草醛(上海强顺化学试剂有限公司; 批号: 20131015,分析纯); 二甲基亚砷(美国 Sigma 公司,批号: RBNF5902,分析纯); 水为超纯水。齐墩果酸对照品(中国食品药品鉴定研究院,批号: GV26-XLXP,纯度: 94.9%); 灵芝破壁孢子粉(泰安正信科技有限责任公司,批号: 20150901); 四甲基偶氮唑盐(美国 aMRECO 公司,批号: 20160301); PBS 缓冲液(江苏凯基生物技术股份有限公司,批号: 20160715); 小牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司,批号:

20161220); 0.25%胰酶(批号: 1699720)和 DMEM 培养基(批号: 1776585)均购自美国 Gibco 公司; MTT(美国 AMRESCO,批号: 298-93-1); Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒(美国 BD 公司,批号: 6033840)。

HCT116、A549、MDA-MB-231 细胞来源于 ATCC,由浙江中医药大学能量代谢实验室冷冻保存,用含 10% FBS 的 DMEM 培养液,将其置于 37 °C,5%饱和湿度的 CO₂ 培养箱中培养。

2 方法

2.1 正交试验法优选提取工艺

2.1.1 供试品制备 精密称取破壁灵芝孢子粉 2.5 g,置于具塞锥形瓶中,加入 95%乙醇 25 mL,称重,85 °C 水浴回流提取 1 次,每次 2 h,放冷,补足质量,过滤,即得供试品。

2.1.2 总三萜含量测定方法的建立 精密称取齐墩果酸对照品 6.10 mg,置 25 mL 棕色量瓶中,用无水乙醇定容,得 0.244 mg·mL⁻¹ 的齐墩果酸对照品溶液^[8]。

最大吸收波长的确定: 精密移取齐墩果酸对照品溶液 0.5 mL,置于干燥具塞试管中,水浴挥尽溶剂,放冷至室温,加入 0.2 mL 新鲜配制的质量分数 5%香草醛-冰醋酸溶液和 0.8 mL 高氯酸,试管密塞置于 60 °C 水浴显色反应 15 min,冰水冷却至室温,再加冰醋酸 5 mL,摇匀,随行制备空白阴性对照溶液,UV 测定,将齐墩果酸对照品溶液在 400~800 nm 进行扫描,确定最大吸收波长^[8]。

2.1.3 标准曲线的绘制 精确量取齐墩果酸对照品溶液 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 mL 置于干燥具塞试管中,按“2.1.2”项下的方法,在最大吸收波长处测定吸光度^[8]。以吸光度对浓度作标准曲线,求得回归方程。

2.1.4 方法学考察 仪器精密度考察:精密移取低、中、高 3 个浓度的齐墩果酸对照品溶液,按“2.1.2”项下方法,测定吸光度值,平行 6 次试验,计算其 RSD 值。

稳定性考察:精密移取供试品溶液 0.4 mL,按“2.1.2”项下的方法,在 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0 h 进行检测,计算 RSD 值,考察其 5 h 内的稳定性。

重复性考察:精密称取同一批破壁灵芝孢子粉样品,按“2.1.1”项下制备供试品溶液 6 份,精密移取供试品溶液 0.4 mL,按“2.1.2”项下的方

法, 进样分析, 由回归方程求得供试液中灵芝总三萜的含量, 计算 RSD 值。

加样回收率考察: 精密移取已知总三萜含量的供试品溶液, 分别按照样品溶液中含总三萜量的 80%, 100%, 120% 加入齐墩果酸对照品溶液, 置于 9 支干燥的带刻度试管中, 混合均匀, 按“2.1.2”项下的方法, 进样分析, 计算其平均回收率。

根据“2.1.3”项下绘制的标准曲线回归方程计算供试品中的总三萜的浓度 C 。破壁灵芝孢子粉中总三萜含量的计算公式: 总三萜含量(%) = $(C \times N \times V) / A \times 100\%$, C 为总三萜的浓度($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), N 为稀释倍数, V 为供试品溶液体积(mL), A 为破壁灵芝孢子粉质量(mg)。

2.1.5 单因素考察 乙醇浓度的考察: 精密称取破壁灵芝孢子粉 5 份(每份 5 g), 分别加 20 倍量 55%, 65%, 75%, 85%, 95% 乙醇, 按工艺路线提取总三萜, 精密移取适量, 测定总三萜的含量。平行 3 次试验, 考察乙醇浓度对灵芝总三萜提取率的影响。

液料比考察: 精密称取破壁灵芝孢子粉 5 份(每份 5 g), 分别加入 30, 40, 50, 60, 70 倍量的 85% 乙醇, 按工艺路线提取总三萜。按“2.1.4”项下方法测定总三萜的含量, 平行 3 次试验, 考察液料比对灵芝总三萜提取率的影响。

提取温度考察: 精密称取破壁灵芝孢子粉 5 份(每份 5 g), 分别于 55, 65, 75, 85, 95 °C 条件下, 按工艺路线提取总三萜。精密移取适量, 按“2.1.4”项下方法测定总三萜的含量, 平行 3 次试验, 考察提取温度对总三萜提取率的影响。

提取时间考察: 精密称取破壁灵芝孢子粉 4 份(每份 5 g), 按工艺路线提取其总三萜, 分别提取 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 h。精密移取适量, 按“2.1.4”项下方法测定总三萜的含量, 平行 3 次试验, 考察提取时间对总三萜提取率的影响。

提取次数考察: 精密称取破壁灵芝孢子粉 3 份(每份 5 g), 按工艺路线提取其总三萜, 提取次数分别为 1, 2, 3 次。精密移取适量, 按“2.1.4”项下方法测定总三萜的含量, 平行 3 次试验, 考察提取次数对灵芝总三萜提取率的影响。

2.1.6 因素水平的选择及正交试验 为了综合考察多因素对灵芝中总三萜含量提取的影响, 本实验采用 4 因素 3 水平对提取过程进行研究。为明确最佳提取工艺条件, 以总三萜的含量为指标, 确定乙醇浓度(A)、液料比(B)、提取时间(C)、提取次数(D)

为考察因素, 选用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验。

2.1.7 正交试验的验证试验 重复验证最佳组合, 求得灵芝总三萜的平均得率。

2.2 灵芝破壁孢子粉总三萜对肿瘤细胞增殖作用的影响

将处于对数生长期的 HCT116、A549、MDA-MB-231 细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化, 离心, 采用细胞计数板计数后, 调整细胞悬液浓度, 配制为每孔 $5 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的细胞悬液接种于 96 孔板, 为防止边缘效应, 96 孔板外缘一圈加入 200 μL PBS, 其余每孔加入 200 μL 细胞悬液, 放置于 CO_2 浓度为 5%, 温度为 37 °C 的培养箱中培养 24~48 h。吸弃培养液, 加入不同浓度的灵芝破壁孢子粉总三萜, 分别为 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 每孔 200 μL , 平行设 6 个复孔, 同时设置空白对照组不添加细胞悬液, 只加入 200 μL 新鲜培养基, 平行测定 3 次。在同样条件的培养箱内继续培养 24 h, 于倒置显微镜下观察细胞状态。每孔加入 20 μL MTT 溶液 ($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 继续孵育 4 h。终止培养, 小心吸去培养孔中的液体。每孔加入 150 μL 二甲亚砜(DMSO), 置于低速摇床上振荡 10 min, 以溶解残留的 MTT-甲臜结晶, 于多功能酶标仪上 490 nm 处测定各孔的光密度(OD)值, 以正常对照组测得的 OD 值为对照, 按照公式: 存活率(%) = 给药组 OD 值 / 正常组 OD 值 $\times 100\%$, 计算灵芝总三萜对于 HCT116、A549、MDA-MB-231 细胞增殖的抑制效果。灵芝总三萜组分的作用时间设定为 72 h。通过 CompuSyn 软件, 求得灵芝孢子粉总三萜与 HCT116、A549、MDA-MB-231 细胞作用 72 h 时的半数抑制浓度值(IC_{50})。

2.3 流式细胞仪测定灵芝总三萜对 HCT116 细胞凋亡的影响

取对数生长期 HCT116 细胞接种于 6 孔板中, 贴壁后加入不同浓度的灵芝总三萜(1.6, 4.0, 10.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 对照组(加不含药物的培养基)作用 48 h。加入适量的胰蛋白酶消化细胞, 用 PBS 重悬细胞并进行计数。取一定数目的细胞用 $1 \times \text{Binding Buffer}$ 重悬, 并调整其细胞浓度为 $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ 。取 100 μL 的含 $1 \times \text{Binding Buffer}$ 细胞液 (1×10^5 cells) 至 2 mL 的 EP 管中, 然后每管加入 5 μL 的 Annexin V-FITC 和 5 μL 碘化丙啶(PI)溶液, 轻轻混匀。室温(25 °C)避光孵育 15 min。然后每管加入 400 μL $1 \times \text{Binding Buffer}$, 1 h 之内在流式细胞仪

上进行检测。

2.4 数据分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 17.0 统计软件进行处理, 采用 t 检验和 ANOVA 法进行显著性检验, 以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

3 结果

3.1 正交试验法优选提取工艺

3.1.1 标准曲线 根据试验方法测得的最大吸收波长为 546 nm, 得到的回归方程: $Y = 37.475X - 0.038878$ ($r = 0.9995$), 其中 X 为齐墩果酸的浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), Y 为吸光度。结果表明, 齐墩果酸在 0.0064~0.0224 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 线性关系良好。

3.1.2 方法学考察 按照“2.1.4”项下方法进行方法学考察, 结果 3 个浓度的齐墩果酸对照品溶液仪器精密度的 RSD ($n=6$) 分别为 0.07%, 0.03%, 0.06%, 表明仪器精密度良好; 供试品溶液稳定性 RSD ($n=9$) 为 0.58%, 表明供试液在 5 h 内比较稳定。供试液中灵芝总三萜的含量为 0.22%, 其 RSD ($n=6$) 为 2.36%, 说明该实验方法重复性良好。

供试品溶液平均加样回收率为 102.31%, 其 RSD ($n=9$) 为 2.83%, 表明该方法回收率符合要求。

3.1.3 单因素考察 乙醇浓度的考察: 随着提取溶剂乙醇浓度的升高, 灵芝中总三萜的提取率也随之升高; 当乙醇浓度为 85% 时, 再增加乙醇浓度, 总三萜提取率稍有下降, 因此选择 85% 乙醇浓度 ($n=5$)。

液料比考察: 随着提取溶剂用量的增大, 总三萜提取率逐渐增加; 当溶剂倍量为 60 倍时, 再增加乙醇倍量, 总三萜的提取率无明显增加, 因此选择液料比为 60:1 ($n=5$)。

提取温度考察: 随着提取温度的逐渐升高, 总三萜提取率逐渐增加; 当提取温度达到 85 °C 时, 再升高提取温度, 总三萜提取率无明显增加, 因此选择 85 °C 作为提取温度 ($n=5$)。

提取时间考察: 随着提取时间的延长, 总三萜提取率呈一定的上升趋势, 但当提取时间达到 3 h 后, 再增加提取时间, 总三萜的提取率无明显增加, 因此选择 3 h ($n=4$)。

提取次数考察: 随着提取次数的增多, 总三萜提取率呈一定的上升趋势, 但提取 2 次与提取 3 次, 总三萜提取率无明显增加, 从经济和时间成本考虑, 选择提取 2 次为最佳的提取次数 ($n=3$)。

3.1.4 正交试验 由单因素实验结果可知, 乙醇浓

度、提取温度、提取时间、液料比这 4 个因素对总三萜的含量影响较大, 故以 A 乙醇浓度(%), B 提取温度(°C)、C 提取时间(h)、D 液料比($\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$) 为主要因素, 设计 $L_9(3^4)$ 正交试验, 试验因素水平表见表 1, 其结果见表 2。

表 1 因素与水平表

Tab. 1 Factors and levels of recipe

水平	因素			
	乙醇浓度 (A)/%	提取温度 (B)/°C	提取时间 (C)/h	液料比 (D)/ $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$
1	75	75	2.0	50:1
2	85	85	3.0	60:1
3	95	95	4.0	70:1

由表 2 可知, 乙醇浓度、提取温度、提取时间、液料比对总三萜含量产生影响的先后顺序为 A>D>B>C, 即乙醇浓度>液料比>提取温度>提取时间; 灵芝总三萜的最佳回流提取工艺为: A3B2C1D2, 即乙醇浓度 95%、提取温度 85 °C、提取时间 2 h、液料比 60:1、提取 2 次。

3.1.5 验证试验 重复验证正交试验所得的最佳组合, 按“2.1.2”项下的方法, 进样分析, 计算总三萜的平均提取率, 得总三萜平均含量为 6.45%, 该结果表明: 说明该灵芝三萜提取工艺简便合理、稳定可行 ($n=3$)。

表 2 灵芝总三萜提取正交试验结果

Tab. 2 Extraction results of orthogonal test of triterpenoids from *Ganoderma lucidum*

序号	A	B	C	D	含量/%
1	1	1	1	1	1.72
2	1	2	2	2	3.80
3	1	3	3	3	3.11
4	2	1	2	3	3.86
5	2	2	3	1	3.21
6	2	3	1	2	5.24
7	3	1	3	2	4.80
8	3	2	1	1	6.44
9	3	3	2	3	4.27
K_1	2.877	3.460	4.467	3.067	
K_2	4.103	4.483	3.977	4.613	
K_3	5.170	4.207	3.707	4.470	
R	2.293	1.023	0.760	1.546	

3.2 灵芝总三萜对 3 种肿瘤细胞增殖能力的影响 不同浓度灵芝总三萜(0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 作用 HCT116、A549、MDA-MB-231 细胞 72 h, 经 MTT 实验测定发现, 灵芝总三萜可

显著性抑制这 3 种肿瘤细胞的增殖生长, 并呈现出一定的剂量依赖性, 结果见图 1。经 CompuSyn 软件求得灵芝总三萜作用 HCT116、A549、MDA-MB-231 细胞 72 h 的 IC_{50} 分别为 1.29, 1.68, $3.81 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。这表明, 灵芝三萜体外具有抗人结肠癌、人乳腺癌及人肺癌细胞增殖的作用, 且对 HCT116 抑制效果最好。

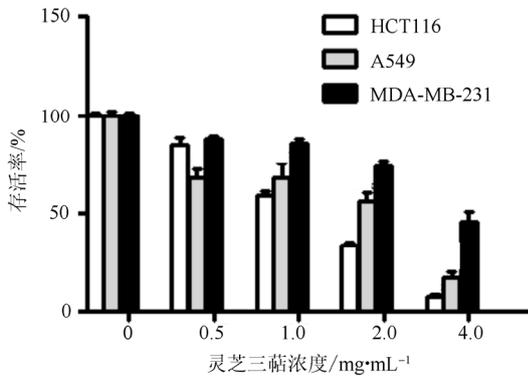


图 1 灵芝总三萜对不同肿瘤细胞增殖的影响($n=3$)
Fig. 1 Effect of triterpenoids from sporoderm-broken spores of *Ganoderma lucidum* on proliferation of various cell lines($n=3$)

3.3 灵芝总三萜对 HCT116 细胞凋亡的影响

不同浓度灵芝总三萜 ($0.64, 1.6, 4.0, 10.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 作用 HCT116 细胞 48 h, 经 Annexin-V-FITC/PI 染色处理, 经流式细胞仪测定其凋亡率分别为 19.58%, 20.32%, 26.84%, 37.68%, 这表明灵芝总三萜可显著诱导 HCT116 细胞凋亡从而发挥其抗肿瘤作用。

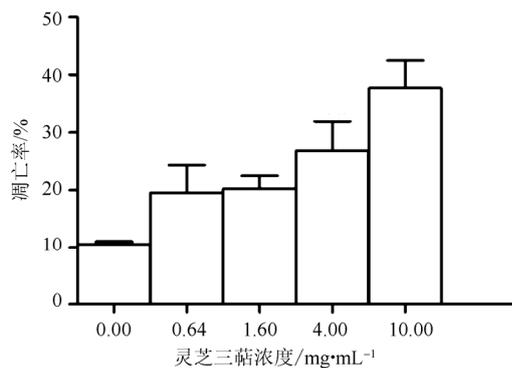


图 2 灵芝三萜对结肠癌 HCT116 细胞凋亡的影响($n=5$)
Fig. 2 Effect of triterpenoids from sporoderm-broken spores of *Ganoderma lucidum* on apoptosis of HCT116 cells($n=5$)

4 讨论

近年来, 改进产品质量、研究采用新工艺及试制新产品一直是研究的重点和热点, 而正交设计是

解决此类问题常用的方法之一, 它可以很好地平衡影响工艺的多因素, 并通过试验可以找出因素的主次关系和最优搭配条件^[9]。采用正交试验法安排试验, 不但省时、省力、省钱, 而且又能得到满意且工艺参数比较稳定的实验结果。本实验采用正交优化的工艺条件, 对破壁灵芝孢子粉中的总三萜进行提取, 可使总三萜的含量达到 6.45%。

本实验通过单因素以及正交设计实验, 筛选出最优提取工艺为 60 倍量 95%乙醇、85 °C、提取 2 次、每次 2 h。在前期单因素实验对提取次数考察过程中, 提取 2 次与提取 3 次所得总三萜含量无明显增加, 故确定提取 2 次作为最终提取次数。而提取时间、提取温度、乙醇浓度、乙醇倍量对总三萜含量影响较大, 故对以上 4 因素进行正交设计。从表 2 可知, 在正交设计过程中, 因素 B(提取温度)的最优水平为水平 2, 原因: 当温度从 75 °C 上升至 85 °C 时, 提取状态从温浸转变为微沸, 总三萜含量明显上升; 而温度从 85 °C 上升至 95 °C 时, 提取溶剂仍处于沸腾状态, 溶剂温度不变, 故对提取效率无明显改善。因素 C(提取时间)的最优水平为水平 1, 即随着时间的增加, 提取率反而降低, 说明破壁灵芝孢子粉有效部位总三萜含量随着受热时间的增加而降低, 可为以后其干燥工艺提供参考。因素 D(液料比)的最优水平为水平 2, 当料液比为 70 : 1 时, 总三萜提取率下降, 分析原因, 可能是由于溶剂倍量增加, 加热达到沸腾的时间增加, 即受热时间增加, 故总三萜的含量降低, 且该结果与因素 C(提取时间)所得结果相吻合。

刘锋^[10]研究发现灵芝总三萜对 SW620、SMMC7221、HepG2、CNE1、CNE2 肿瘤细胞的增殖均具有一定的抑制作用, 这说明灵芝总三萜具有广谱抗肿瘤的作用。在体外抗肿瘤实验中, 本课题组也发现灵芝破壁孢子粉总三萜对 HCT116、A549、MDA-MB-231 细胞增殖的抑制作用。通过 3 种肿瘤细胞 IC_{50} 值的比较发现, 在同等剂量条件下, 灵芝三萜对 HCT116 增殖作用的抑制效果最强。这表明灵芝三萜对肿瘤细胞的抑制作用具有一定的选择性。

细胞凋亡是肿瘤研究的一个重要方向, 近年来研究表明许多抗肿瘤药物均可诱导肿瘤细胞发生凋亡^[11-13]。通过 MTT 实验, 本研究筛选出对灵芝总三萜比较敏感的结肠癌 HCT116 细胞株, 对其进行凋亡相关的研究。通过流式细胞仪检测, 发现灵

灵芝总三萜可以有效诱导结肠癌 HCT116 细胞产生凋亡, 并呈现出一定的量效关系。综上所述, 灵芝总三萜可通过增殖抑制及诱导凋亡发挥抗结肠癌作用。

REFERENCES

- [1] WU C M, WANG L J, LIN J M, et al. Optimize the wall breaking method of *Ganoderma Lucidum* spore and research immunomodulatory and antitumor mechanism [J]. *Pharm Today*(今日药学), 2017, 27(5): 307-311.
- [2] CHEN J H, WU F Q, LI W L, et al. Comparison of contents of triterpenoids, polysaccharides and heavy metals in *Ganoderma lucidum* sporule powder and *Ganoderma lucidum* [J]. *China Pharm*(中国药房), 2008, 19(33): 2585-2587.
- [3] WU G S, GUO J J, BAO J L, et al. Anti-cancer properties of triterpenoids isolated from *Ganoderma lucidum* – a review [J]. *Exp Opin Invest Drugs*, 2013, 22(8): 981-992.
- [4] DU G H, WANG H X, YAN Z, et al. Anti-tumor target prediction and activity verification of *Ganoderma lucidum* triterpenoids C [J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2017, 42(3): 517-522.
- [5] BAO Z, LI L. Therapeutical effect of ganoderma triterpene on non-alcoholic fatty liver in mice [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2014, 31(2): 148-151.
- [6] CHEN G Z, LIANG H M, XIE Y Z. Quantification of triterpenoids acids in broken *Ganoderma lucidum* spore extract by ultraviolet spectrometry [J]. *J Microbiol*(微生物杂志), 2011, 31(1): 91-94.
- [7] CHEN Y, LIU Z L, CHEN Z D, et al. Optimal technology for extraction of total triterpenoid compounds from *Ganoderma lucidum* spores by supercritical CO₂ extraction [J]. *Pharm Care Res*(药学服务与研究), 2010, 10(1): 34-36.
- [8] ZHOU M M. The pharmaceutical research of *Ganoderma lucidum* guttate pills [D]. Hangzhou: Zhejiang Chinese Medical University, 2015.
- [9] LIU R J, ZHANG Y W, WEN C W, et al. Study on the design and analysis methods of orthogonal experiment [J]. *Exp Technol Manage*(实验技术与管理), 2010, 27(9): 52-55.
- [10] LIU F. Anti-tumor effect of triterpene GLZ from *Ganoderma lucidum* *in vivo* and *in vitro* [D]. Fuzhou: Fujian Medical University, 2012.
- [11] SU W X, ZHU G H, XIAO H Q, et al. Effects of Kanglaite on proliferation and apoptosis of gastric cancer cells [J]. *J Clin Exp Med*(临床和实验医学杂志), 2008, 7(4): 89-90.
- [12] LV C X, SUN J H, WU C L. Apoptosis mechanism of Taxol combined with reveratrol on human laryngeal carcinoma HepG2 cells [J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2016, 41(3): 476-483.
- [13] LIU J J, HUANG L, LIU H. Effect of puerarin on proliferation inhibition and apoptosis of human osteosarcoma cell lines MG63 [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2016, 33(3): 300-304.

收稿日期: 2017-03-25
(本文责编: 曹粤锋)