

药用拟层孔菌石油醚提取物的 GC-MS 分析及各相提取物生物活性

王佩佩 许培源 王哲 孙勇 王力 蒋继宏*

江苏师范大学江苏省药用植物生物技术重点实验室 江苏 徐州 221116

摘要: 通过形态学和分子生物学分析, 实验菌株为药用拟层孔菌。采用不同有机溶剂提取药用拟层孔菌子实体, 分别获得石油醚、氯仿、乙酸乙酯和甲醇提取物。采用 GC-MS 方法, 分析药用拟层孔菌石油醚提取物中的化学成分, 同时对不同有机溶剂提取物的生物活性进行检测。结果表明: 药用拟层孔菌石油醚提取物中共鉴定出 46 个化合物。体外抑制肿瘤细胞活性实验表明, 在 100 $\mu\text{g/mL}$ 时, 不同有机溶剂提取物都表现出抑制肿瘤细胞活性。其中, 石油醚提取物在 50 $\mu\text{g/mL}$ 时, 其对 NCI-H460 和 SGC-7901 肿瘤细胞的抑制率分别为 99.03% 和 82.57%。甲醇提取物在 8 mg/mL 时, DPPH 自由基清除率达 93.35%。

关键词: 药用拟层孔菌, 抗肿瘤, 抗氧化

Analysis of petroleum ether extracts from *Fomitopsis officinalis* by GC-MS and bioactivity investigation on different extracts

WANG Pei-Pei XU Pei-Yuan WANG Zhe SUN Yong WANG Li JIANG Ji-Hong*

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

Abstract: The fruiting bodies of *Fomitopsis officinalis* were extracted, using different polarity solvents. Petroleum ether extract, chloroform extract, ethyl acetate extract and methanol extract were obtained. The constituents of petroleum ether extracts were investigated by GC-MS, and the biological activities of extracts in different phase were measured. Forty-six kinds of constituents were identified from the petroleum ether extract. The extracts obtained by using the four solvents showed anti-tumor activity at 100 $\mu\text{g/mL}$. The petroleum ether extract components at 50 $\mu\text{g/mL}$ displayed strong growth-inhibitory effects on NCI-H460 and SGC-7901 tumor cells with 99.03% and 82.57% of inhibition rate, respectively. The free radical scavenging rate of methanol extracts at 8 mg/mL was 93.35%.

Key words: *Fomitopsis officinalis*, anti-tumor, antioxidant

*Corresponding author. E-mail: jjh669@126.com

收稿日期: 2014-05-29, 接受日期: 2014-11-17

药用真菌在分类上多属于担子菌门和子囊菌门,其中多孔菌目真菌是担子菌门中的一大类群。在我国的菌类药物中,许多真菌属于这一类,如有名的传统中药灵芝和茯苓等(戴玉成和杨祝良 2008)。

药用拟层孔菌 *Fomitopsis officinalis* (Vill.) Bondartsev & Singer, 俗名为苦白蹄,别名阿里红(新疆),属多孔菌目 Polyporales,拟层孔菌科 Fomitopsidaceae,拟层孔菌属 *Fomitopsis* (戴玉成 2009, 2010, 2012)。子实体呈马蹄形至近圆锥形或沿树呈圆柱形,成熟后表皮龟裂变粗糙,白色至淡黄色,后期呈灰白色,有同心环带。菌肉软,菌管多层。该菌株一般寄生于海拔 3 500m 左右的衰老的落叶松树干基部、伐桩上或其他针叶树上,偶见生于栎等阔叶树树干上。广泛分布于北温带,在我国的黑龙江、吉林、内蒙古、甘肃、新疆、河北、山西、四川、云南等地都有分布(王颖等 2002; 戴玉成等 2012)。药用拟层孔菌作为一种药用真菌,具有止咳平喘、祛风除湿、清肺化痰、健胃利尿及解蛇毒等功效,同时还发现该菌具有抗肿瘤的效果(郭淑英等 2010)。但是从总体上讲,目前对药用拟层孔菌的药理活性的研究报道甚少。为了更好地探讨药用拟层孔菌的药理活性,本文对菌株进行分类鉴定,对其抑制肿瘤细胞和抗氧化等生物活性进行研究,从而为进一步开发利用药用拟层孔菌提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种来源:大型野生真菌药用拟层孔菌子实体由大连王力野生灵芝生物科技有限公司提供。

1.1.2 仪器和试剂:Spect roMax M2 荧光检测仪(molecular devices),RE-52A 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),96 孔细胞培养板购于 Gibico 公司,RPMI-1640 培养基购自 Gibico 公司,胎牛血清为杭州四季青公司产品,DMSO 购自上海生工公

司,Alamar blue 购自 Sigma 公司,注射用顺氯氨铂(DDP)为齐鲁制药厂产品,抗坏血酸、石油醚、乙酸乙酯和甲醇等均为分析纯。rDNA-ITS 的 PCR 扩增所用试剂均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。所用的引物 ITS5/ITS4 由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 药用拟层孔菌的形态观察与分子鉴定:对于实体组织分离,在 PDA 培养基上进行平皿培养,观察其形态特征。待菌落直径长至 3cm 后,刮取平皿上的菌丝体来提取 DNA。DNA 的提取参照曹小迎等(2007)的 CTAB 法。PCR 扩增体系包含:10×PCR Buffer (100mmol/L),dNTP (200μmol/L),MgCl₂ (25mmol/L),Taq DNA 酶(15U),ITS5/ITS4 引物,双链 DNA 模板(约 25ng),反应总体积为 25μL,扩增反应在 AB 公司的 2400 型 PCR 扩增仪上进行。扩增反应程序:95℃预变性 3min;95℃变性 1min,55℃退火 1min,72℃延伸 90s,循环 35 次;72℃延伸 7min,终止温度为 4℃。PCR 产物采用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测后,交付上海华诺生物有限公司完成测序。ITS 序列范围根据所用引物以及美国生物信息中心(NCBI)网站提供的多孔菌科其他真菌的相关序列确定。测定的 DNA 序列用 ClustalX 软件进行对位排列。并用分子进化遗传分析软件(MEGA5)构建分子系统树。

1.2.2 药用拟层孔菌样品的提取:取药用拟层孔菌粉末 15g,加入 300mL 石油醚,索式提取器提取 4h,低温浓缩得浸膏 0.5g,得率 3.33%;上述过程所得残渣中加入 300mL 三氯甲烷提取 4h,低温浓缩得浸膏 3.6g,得率 24.67%;上述过程所得残渣中加入乙酸乙酯提取 4h,低温浓缩得浸膏 6.7g,得率 44.67%;上述过程所得残渣中加入甲醇提取 4h,低温浓缩得浸膏 0.7g,得率 4.67%;最后剩余 3.4g 的残渣。浸膏 4℃保存,备用。

1.2.3 GC-MS 分析:Thermo TRACE1300 气质联用仪,HP-5msi 毛细管色谱柱(0.25mm×30m,0.25μm),

进样口温度 260℃, 升温程序为初始温 50℃, 以 5℃/min 速度升温到 200℃, 载气为高纯氦气, 流量 1μL/min, 进样量 1μL, 分流比 30:1; EI 电离源 70eV, 离子源温度 230℃, 柱前压 7.4psi, 扫描范围为 35–550, 利用 NIST05 标准质谱库检索。

1.2.4 细胞培养与体外抑制肿瘤细胞活性实验: 采用 Alamar Blue 法 (Brigitte *et al.* 1993; Hamid *et al.* 2004) 检测体外抑制肿瘤细胞活性。NCI-H460 和 SGC-7901 细胞于含 10% FBS、100U/mL 青霉素、100μg/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养基中培养, 在 37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下继代培养。用 0.25% 胰酶将对数生长期的细胞从培养瓶上消化下来, 制成细胞悬液, 96 孔板中每孔加 100μL (约 1 万个细胞), 同时设阴性对照、阳性对照和空白对照。阴性对照组加 100μL 含细胞的培养基, 阳性对照组加 100μL DDP 溶液, 空白对照组加 100μL 不含细胞的培养基, 放入细胞培养箱中过夜, 细胞贴壁。不同有机溶剂的提取物用 DMSO 溶解后用培养基稀释, 加 100μL 到实验组中, 使得终浓度分别为 100μg/mL 和 50μg/mL (DMSO 的浓度小于 0.1%), 对照组补加 100μL 培养基。培养 48h 后, 弃去培养液, 用 PBS 洗涤两次。Alamar Blue 贮存液用培养基以 1:10 比例稀释后, 每孔加 200μL, Alamar Blue 为 10%, 4h 后将培养板放于 570nm 的激发波长和 590nm 的发射波长下, 将不含细胞的培养基的孔作空白值, 加细胞液不加样品的孔作对照值,

以细胞培养孔的值减去空白值为样品实际值。按照下式计算细胞存活率: 细胞存活率=(对照—样品)/对照×100%。

1.2.5 抗氧化能力检测: 采用 DPPH 自由基清除法 (Orhan *et al.* 2007)。按照预定的浓度梯度, 将不同的各有机溶剂提取物用乙醇溶解稀释, 作为受测液。取 100μL 的 200μmol/L DPPH 乙醇溶液和 100μL 的受测液 (A) 加入 96 孔板中, 混匀, 室温下放置 30min 后, 在 517nm 处测吸光度, 同时测定 100μL DPPH 溶液+100μL 无水乙醇混合液 (B) 和 100μL 受测液+100μL 无水乙醇混合液 (C) 在 517nm 下的吸光度。选用 VC 作为阳性对照。按照下式计算 DPPH 自由基清除率: DPPH 清除率=[1-(A-C)/B]×100%。

2 结果与分析

2.1 形态观察与分子鉴定

观察子实体形态, 可见成熟后的子实体呈圆柱形, 表皮龟裂粗糙, 有白色、淡黄色、灰白色同心环带。对子实体进行组织分离, 取 2mm×2mm 的新鲜组织块在 25℃、无光、恒温条件下培养 3d 后, 组织块开始萌发生长, 长出白色菌丝菌落。经 PDA 培养基纯化培养至 10d (图 1) 后, 白色菌丝不断生长。生长初期形成的菌落, 雪白色菌丝较为浓密, 培养一段时间后, 菌落渐变为土黄色。

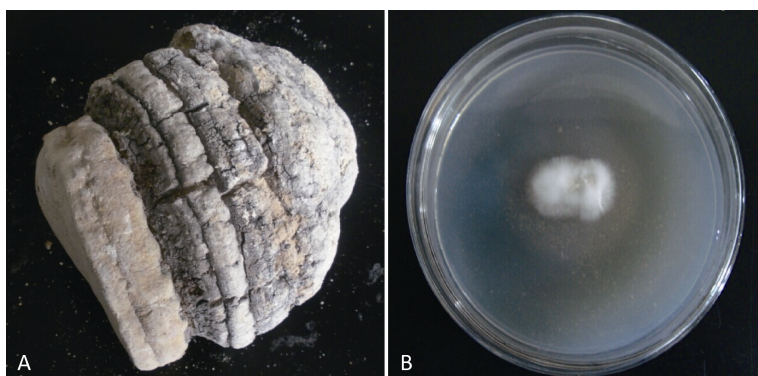


图 1 药用拟层孔菌子实体及其组织分离菌株 A: 药用拟层孔菌子实体; B: 培养 10d 的菌落。

Fig. 1 A fruiting body and the tissue isolate of *Fomitopsis officinalis*. A: A fruiting body of *F. officinalis*; B: Culture after 10 days.

2.2 ITS 序列测序及系统发育分析

以实验菌株菌丝体提取的基因组 DNA 为模板，对 ITS 片段进行 PCR 扩增后测序。利用 NCBI 上的 BLAST 程序进行序列比对，下载相似度最高的 9 个 ITS 序列，运用分子进化遗传分析软件 MEGA5 中的最大简约法构建系统发育树（图 2）。可见，系统发育树上实验菌株与 *F. officinalis* 聚为了一类群，相似度极高。与 *F. spraguei*、*F. meliae*、*F. rhodophaea* 差异相对较大。且经 BLAST 序列比对得知，与 *F. officinalis* 最大相似率在 99%，进一步证明，与 *F. officinalis* 具有较近的系统发育关系，鉴定为药用拟层孔菌。

2.3 药用拟层孔菌石油醚提取物化学成分分析

采用 GC-MS 分析方法，从药用拟层孔菌石油醚提取物中获得 52 个峰，通过检索数据库 NIST05、人工解析并参考有关文献资料，共鉴定了 46 个化合物（表 1），在所有鉴定出的化合物中，涵盖了脂肪族化合物中大部分种类，如脂肪烃及其衍生物、酯类化合物、萜类化合物等，还有少量的生物碱。其成分组成与已报道大型真菌成分相似。

2.4 药用拟层孔菌不同有机溶剂提取物对肿瘤细胞增殖的影响

体外抑制肿瘤细胞实验表明（表 2 和表 3），不同有机溶剂的提取物在不同浓度时对人非小细胞肺癌 NCI-H460 和 SGC-7901 细胞的生长均有不同程度的抑制作用。随着样品溶液浓度的增大，对肿瘤细胞增殖的抑制率也随之增强，基本呈正相关。当浓度达到 100μg/mL 时，实验所涉及的肿瘤细胞均被抑制增殖，尤以石油醚提取物的抑制作用最明显。在浓度为 50μg/mL 时，石油醚提取物对 NCI-H460 和 SGC-7901 肿瘤细胞的抑制率为 99.03%和 82.57%，与注射用顺氯氨铂（DDP）的抑制率相近，说明石油醚提取物中可能含有抑制肿瘤细胞活性较高的物质。

2.5 药用拟层孔菌不同有机溶剂提取物抗氧化能力的检测

通过检测不同有机溶剂提取物 DPPH 自由基清除能力可以看出，药用拟层孔菌的甲醇提取物具有一定的抗氧化能力。且随着样品浓度的增加，其 DPPH 自由基清除率也相应增加，表现出一定的量效关系。甲醇提取物在 8mg/mL 时，清除率达 93.35%，表明其具有抗氧化活性，但活性较弱（表 4）。

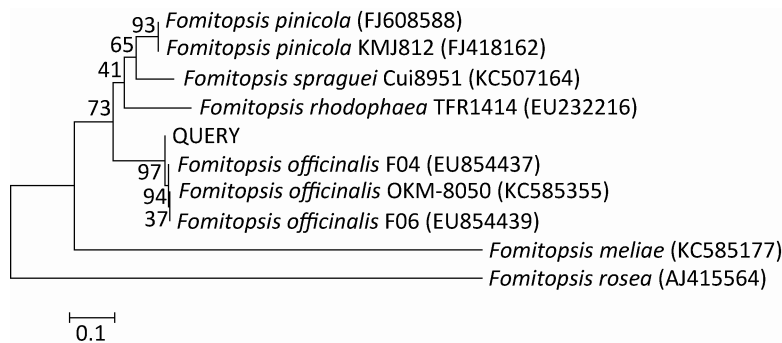


图 2 药用拟层孔菌 ITS 区碱基序列构建的 NJ 系统发育树 节间数字代表 bootstrap 支持值；标 QUERY 的样品序列为本文作者所测，其余样品序列来自 GenBank.

Fig. 2 Neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree based on ITS region sequences of *Fomitopsis officinalis*. Nucleotide: Kimura 2-parameter, complete deletion, bootstrap=1 000; The numbers in each node represents bootstrap support value. The samples marked with QUERY was examined by the authors, and others obtained from GenBank.

表 1 药用拟层孔菌石油醚提取物成分

Table 1 Components of petroleum ether extract from *Fomitopsis officinalis* fruiting bodies

序号 No.	保留时间 t_R (min)	化合物名称 Component name	分子式 Molecular formula
1	4.60	对二甲苯 1,4-dimethyl-benzene	C_8H_{10}
2	6.53	2,2,3-三甲基-5-乙基庚烷 5-ethyl-2,2,3-trimethylheptane	$C_{12}H_{26}$
3	7.66	十一烷 Undecane	$C_{11}H_{24}$
4	7.71	1-甲基-2-吡咯烷酮 2-pyrrolidone,1-methyl-	C_5H_9NO
5	8.63	7-甲基-Z-十四碳烯-1-醇乙酸酯 7-methyl-Z-tetradecen-1-ol acetate	$C_{17}H_{32}O_2$
6	9.40	(3 α ,5 α)-2-亚甲基--胆甾烷-3-醇 Cholestan-3-ol,2-methylene-,(3 α ,5 α)-	$C_{28}H_{48}O$
7	9.68	3-羟基-十二烷酸 Dodecanoic acid, 3-hydroxy-	$C_{12}H_{24}O_3$
8	9.70	油酸 Oleic acid	$C_{18}H_{34}O_2$
9	10.01	十二烷 Dodecane	$C_{12}H_{26}$
10	10.19	3,7,11-三甲基-1-十二醇 1-dodecanol,3,7,11-trimethyl-	$C_{15}H_{32}O$
11	10.28	2-[(Z)-9-十八碳烯基氧基]乙醇 2-[(Z)-9-octadecenyl-oxy]ethanol	$C_{20}H_{40}O_2$
12	10.90	2,6,10-三甲基-十四烷 Tetradecane,2,6,10-trimethyl-	$C_{17}H_{36}$
13	11.00	叔十六硫醇 Tert-hexadecanethiol	$C_{16}H_{34}S$
14	11.22	壬酸 Nonanoic acid	$C_9H_{18}O_2$
15	11.26	1,3,5(10)-雌甾三烯-17 α -醇 Estra-1,3,5(10)-triene-17 α -ol	$C_{18}H_{24}O$
16	11.35	4-异丙基-1,3-环己二酮 4-isopropyl-1,3-cyclohexanedione	$C_9H_{14}O_2$
17	11.49	2-甲基-1-十六烷醇 1-hexadecanol,2-methyl-	$C_{17}H_{36}O$
18	12.89	(E)-3,7-二甲基-2,6-辛二烯-3-甲基丁酸酯 3-methyl-,3,7-dimethyl-2,6-octadienyl ester,(E)-butanoic acid	$C_{15}H_{26}O_2$
19	15.30	9-十六碳烯酸 9-hexadecenoic acid	$C_{16}H_{30}O_2$
20	16.78	1-三十七烷醇 1-heptatriacotanol	$C_{37}H_{76}O$
21	17.34	17-三十五碳烯 17-pentatriacontene	$C_{35}H_{70}$
22	17.68	6-表-白菖醇 6-epi-shyobunol	$C_{15}H_{26}O$
23	17.74	二十七烷 Heptacosane	$C_{27}H_{56}$
24	18.64	E,E,Z-1,3,12-十九碳三烯-5,14-二醇 E,E,Z-1,3,12-nonadecatriene-5,14-diol	$C_{19}H_{34}O_2$
25	18.77	顺-13-二十碳烯酸 Cis-13-eicosenoic acid	$C_{20}H_{38}O_2$
26	19.59	3b,20-二羟基-12-乌苏烯-28-羧酸,3-乙酸甲酯 Urs-12-en-28-oic acid,3b,20-dihydroxy-,methyl ester,3-acetate (8CI)	$C_{33}H_{52}O_5$
27	20.21	1-三十七烷醇 1-heptatriacotanol	$C_{37}H_{76}O$
28	20.38	邻苯二甲酸,1-丁基-2-(8-甲基壬酯) 1,2-benzenedicarboxylicacid, 1-butyl-2-(8-methylnonyl) ester	$C_{22}H_{34}O_4$
29	21.90	异胆酸乙酯 Ethyl iso-allocholate	$C_{26}H_{44}O_5$
30	24.10	顺式-十八碳烯酸 Cis-vaccenic acid	$C_{18}H_{34}O_2$
31	24.36	反-13-十八碳烯酸 Trans-13-octadecenoic acid	$C_{18}H_{34}O_2$

续表 1

32	31.59	硫代二丙酸二月桂酸 Dilauryl 3,3'-thiodipropionate	C ₃₀ H ₅₈ O ₄ S
33	32.00	色氨酸-谷氨酸 Trp-glu	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅
34	35.87	鲨烯 Squalene	C ₃₀ H ₅₀
35	37.56	3b,20-二羟基-12-乌苏烯-28-羧酸, 3-乙酸甲酯 Urs-12-en-28-oic acid,3b,20-dihydroxy-,methyl ester,3-acetate	C ₃₃ H ₅₂ O ₅
36	38.12	(3b,16a,21b,22a)-齐墩果烷-12-烯-3,16,21,28-五醇,21-[(2E)-甲基-2-丁烯酸甲酯] Olean-12-ene-3,16,21,22,28-pentol,21-[(2E)-2-methyl-2-butenate], (3b,16a,21b,22a)- (9CI)	C ₃₅ H ₅₆ O ₆
37	38.74	3-羟基-17-氧代-15,7,9(11)-三烯 5,7,9(11)-androstatriene,3-hydroxy-17-oxo-	C ₁₉ H ₂₄ O ₂
38	39.42	(16α)-甲基-6-亚甲基-4-孕烯-3,20-二酮 Pregn-4-ene-3, 20-dione,16-methyl-6-methylene-,(16α)-	C ₂₃ H ₃₂ O ₂
39	39.55	豆固醇 Stigmasterol	C ₂₉ H ₄₈ O
40	39.95	14-4A-14 15,17,19,21-hexatriacontatetrayne	C ₃₆ H ₅₈
41	40.00	全反-2,6,10,15,19,23-六甲基-2,6,10,14,18,22-二十四碳六烯 2,6,10,14,18,22-tetracosahexaene,2,6,10,15,19,23-hexamethyl-,didehydro deriv., (6E,10E,14E,18E)-	C ₃₀ H ₅₀
42	40.22	胆烷酸 Ursodeoxycholic acid	C ₂₄ H ₄₀ O ₄
43	43.75	麦角固醇 Ergosterol	C ₂₈ H ₄₄ O
44	44.87	4,22-二烯胆甾-3-酮 4,22-cholestadien-3-one	C ₂₇ H ₄₂ O
45	45.83	(3b,5a,6a,16a)- 5,6-环氧-3,17-二羟基-16-甲基-孕烷-20-酮 Pregnan-20-one,5,6-epoxy-3,17-dihydroxy-16-methyl-, (3b,5a,6a,16a)-	C ₂₂ H ₃₄ O ₄
46	48.82	麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮 Ergosta-4,6,8(14)-tetraen-3-one	C ₂₈ H ₄₀ O
47	49.15	4,14-二甲基-9,19-环胆甾烯-3,7-二醇-3-乙酸酯 9,19-cyclocholestene-3,7-diol,4,14-dimethyl-,3-acetate	C ₃₁ H ₅₂ O ₃

表 2 不同有机溶剂提取物抑制 NCI-H460 肿瘤细胞活性

Table 2 Antitumor activities for different solvent extracts of *Fomitopsis officinalis* fruiting bodies on NCI-H460 tumor cells

组分 Constituents	不同浓度的抑制率 The inhibition rate of different concentrations (%)				
	100	50	25	12.5	6.25
石油醚 Petroleum ether extract	99.37±1.21	99.03±1.17	14.62±1.98	8.56±1.23	5.98±1.53
三氯甲烷 Trichloromethane extract	99.04±1.34	46.68±0.92	9.05±3.46	3.27±1.06	7.19±1.94
乙酸乙酯 Acetylacelate extract	99.36±1.41	52.30±3.52	18.74±1.18	15.99±0.98	5.95±0.78
甲醇 Methanol extract	99.67±1.37	11.67±3.56	8.16±3.50	6.12±3.94	3.40±2.99
注射用顺氯氨铂 DDP	99.74±0.07	94.57±1.30	83.11±1.00	43.78±0.39	33.28±0.69

表 3 不同有机溶剂提取物抑制 SGC-7901 肿瘤细胞活性

Table 3 Antitumor activities for different solvent extracts of *Fomitopsis officinalis* fruiting bodies on SGC-7901 tumor cells

组分 Constituents	不同浓度的抑制率 The inhibition rate of different concentrations (%)				
	100	50	25	12.5	6.25
石油醚 Petroleum ether extract	99.36±4.32	82.57±7.24	52.85±4.69	22.54±4.82	8.98±2.53
三氯甲烷 Trichloromethane extract	70.25±6.75	7.23±8.89	16.99±3.53	17.95±7.16	14.13±3.46
乙酸乙酯 Acetylacelate extract	98.31±4.15	3.25±3.73	8.81±8.08	21.44±4.10	2.92±3.38
甲醇 Methanol extract	98.78±3.39	7.78±5.66	9.42±11.53	3.47±7.61	15.44±11.49
注射用顺氯氨铂 DDP	99.80±0.18	96.14±0.24	79.74±0.99	49.02±1.31	29.74±0.97

表 4 不同有机溶剂提取物抗氧化活性

Table 4 Antioxidant capacity for different solvent extracts of *Fomitopsis officinalis* fruiting bodies

组分 Constituents	不同浓度的清除率 The DPPH radical scavenging rate of different concentrations (%)				
	10	8	6	4	2
石油醚 Petroleum ether extract	36.95±1.75	35.21±0.83	34.41±2.82	21.44±2.95	19.13±1.52
三氯甲烷 Trichloromethane extract	53.05±0.11	48.85±1.17	36.34±2.00	27.74±4.30	23.87±0.60
乙酸乙酯 Acetylacelate extract	38.61±3.56	37.17±0.74	34.69±3.88	33.16±0.90	21.48±0.31
甲醇 Methanol extract	91.23±1.41	93.35±0.35	86.60±1.25	76.64±1.71	57.15±1.47
抗坏血酸 Vitamin C	99.89±0.01	99.51±0.03	97.73±0.02	97.54±0.03	89.97±0.01

3 讨论

对于大型真菌的鉴定, 基于分子水平上 rDNA 部分区段测序要比传统的基于子实体形态解剖特征的鉴定更加直接、可靠、方便。据文献报道, rDNA-ITS 测序技术已成功应用于桦褐孔菌 *Inonotus obliquus*、缝裂木层孔菌 *Phellinus rimosus*、松针层孔菌 *Porodaedalea chrysoloma*、鲍姆木层孔菌 *Inonotus baumii* (曹小迎等 2007)、乳牛肝菌 *Suillus bovinus* (佟丽华和连宾 2005) 等大型真菌纯培养菌种的鉴定。在本研究中, 我们基于 rDNA-ITS 对药用拟层孔菌进行了快速准确的鉴定, 这为今后药用拟层孔菌纯培养菌种的保护利用、长期保藏提供了必要的技术支撑。

本实验中, 首先利用不同有机试剂获取药用拟层孔菌提取物。采用 GC-MS 分析方法, 从药用拟

层孔菌石油醚提取物中分离化合物, 同时对不同有机溶剂提取物的生物活性进行检测。在药用拟层孔菌石油醚提取物中共鉴定了 46 个化合物。

体外抑制肿瘤细胞实验中, 不同有机溶剂提取物在浓度不同的情况下, 对人非小细胞肺癌 NCI-H460 和 SGC-7901 细胞的生长均有不同程度的抑制作用, 对肿瘤细胞的抑制率与溶液浓度基本呈正相关。根据美国 NIH 标准, 总提物在 100μg/mL 时其抑制肿瘤细胞生长的抑制率只要超过 30% 就可认为该物质具有抑制肿瘤细胞增殖的活性。实验中, 样品浓度在 100μg/mL 时不同有机溶剂提取物都表现出抗肿瘤活性, 其中, 石油醚提取物在 50μg/mL 时其对 NCI-H460 和 SGC-7901 肿瘤细胞的抑制率已经分别达到 99.03% 和 82.57%, 说明这其中可能含有抗肿瘤活性较高的活性物质。

在正常情况下, 人体内的自由基是处于不断产

生与清除的动态平衡中,确保有机体有正常的生命活动(方允中等 2004)。自由基产生过多或者清除过慢,它便会通过攻击生命大分子物质及各种细胞,造成机体在分子水平、细胞水平及组织器官水平的损伤,并诱发各种疾病,包括人体免疫功能的降低、衰老、癌症以及炎症等。人工合成的抗肿瘤和抗氧化物质对人体具有较大的副作用,人们正在致力于寻找各种天然功能成分,实验结果表明,药用拟层孔菌中可能含有抑制肿瘤细胞和抗氧化活性的天然有效成分,但其中主要活性物质及作用机制尚有待进一步的研究。

[REFERENCES]

- Brigitte P, Michel P, Christiane N, 1993. A new fluorimetric assay for cytotoxicity measurements *in vitro*. *International Journal of Oncology*, 3(3): 473-676
- Cao XY, Jiang JH, Sun Y, Chen FM, Liu Q, 2007. ITS sequence analysis on four fungi of Hymenochaetaceae. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 22(38): 261-264 (in Chinese)
- Dai YC, 2009. A checklist of polypores in China. *Mycosystema*, 28(3): 315-327 (in Chinese)
- Dai YC, 2010. Species diversity of wood-decaying fungi in Northeast China. *Mycosystema*, 29: 801-818 (in Chinese)
- Dai YC, 2012. Pathogenic wood-decaying fungi on woody plants in China. *Mycosystema*, 31: 493-509 (in Chinese)
- Dai YC, Bau T, Cui BK, Qin GF, 2012. Illustrations of medicinal fungi in China. Northeast Forestry University Press, Harbin. 1-653 (in Chinese)
- Dai YC, Yang ZL, 2008. A revised checklist of medicinal fungi in China. *Mycosystema*, 27(6): 801-824 (in Chinese)
- Fang YZ, Yang S, Wu GY, 2004. Free radical homeostasis. *Progress in Physiological Sciences*, 35(3): 199-204 (in Chinese)
- Guo SY, Feng B, Sun XS, Mu L, 2010. Extraction of polysaccharide of *Fomes officinalis* Ames and its anti-tumor activity. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 20(9):

2191-2192 (in Chinese)

- Hamid R, Rotshteyn Y, Rabadi L, Parikh R, Bullock P, 2004. Comparison of alamar blue and Mtt assays for high throughput screening. *Toxicology in vitro*, 4(88): 703-710
- Orhan I, Kartal M, Nac Q, Ejazc A, Yilmazd G, Kane Y, Konuklugilb B, Şenera B, Choudharyc M, 2007. Antioxidant and anticholinesterase evaluation of selected Turkish *Salvia* species. *Food Chemistry*, 7(103): 1247-1254
- Tong LH, Lian B, 2005. A simplified method for extracting DNA from the mycelium of edible fungi. *Food Science*, 26(8): 318-320 (in Chinese)
- Wang Y, Lu XX, Yu JL, Mikaram, 2002. Study on Beneficial effects of *Fomes officinalis* Ames (FOA) in Xinjiang. *Journal of Xinjiang Agricultural University*, 25(1): 40-41 (in Chinese)

[附中文参考文献]

- 曹小迎, 蒋继宏, 孙勇, 陈凤美, 刘群, 2007. 刺革菌科 4 种药用真菌的 ITS 区序列分析. *中草药*, 22(38): 261-264
- 戴玉成, 2009. 中国多孔菌名录. *菌物学报*, 28(3): 315-327
- 戴玉成, 2010. 中国东北地区木材腐朽菌的多样性. *菌物学报*, 29: 801-818
- 戴玉成, 2012. 中国木本植物病原木材腐朽菌研究. *菌物学报*, 31: 493-509
- 戴玉成, 图力古尔, 崔宝凯, 秦国夫, 2012. 中国药用真菌图志. 哈尔滨: 东北林业大学出版社. 1-653
- 戴玉成, 杨祝良, 2008. 中国药用真菌名录及部分名称的修订. *菌物学报*, 27(6): 801-824
- 方允中, 杨胜, 伍国, 2004. 自由基稳衡性动态. *生理科学进展*, 35(3): 199-204
- 郭淑英, 冯波, 孙雪松, 穆林, 2010. 阿里红多糖的提取工艺研究及抗肿瘤作用初探. *中国卫生检验杂志*, 20(9): 2191-2192
- 佟丽华, 连宾, 2005. 一株食用外生菌根菌乳牛肝菌的分子鉴定. *食品科学*, 26(8): 318-320
- 王颖, 吕巡贤, 余佳林, 米克热木, 2002. 新疆药用层孔菌补益作用的研究. *新疆农业大学学报*, 25(1): 40-41