

灰树花醇提物化学成分及其生物活性研究

何君强¹, 熊雯宇¹, 黄莹¹, 刘斌^{*1,2}

(1. 福建农林大学 食品科学学院, 福建 福州 350002; 2. 国家菌草工程技术研究中心, 福建 福州 350002)

摘要: 为探明灰树花发挥活性作用的化学成分及其抗氧化活性和对肿瘤细胞的抑制作用, 该文分析了灰树花醇提物不同极性溶剂萃取物的主要化学成分及其对 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 自由基、2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸 (ABTS) 自由基和羟自由基的清除能力, 以及对肝癌细胞 (HepG2) 和肺癌细胞 (A549) 的抑制作用。结果显示, 乙酸乙酯萃取物和正丁醇萃取物的抗氧化活性最佳, 总酚和黄酮的质量分数与抗氧化活性显著正相关 ($P < 0.05$); 石油醚萃取物和乙酸乙酯萃取物对肿瘤细胞抑制效果最好, 三萜和甾醇质量分数与肿瘤细胞抑制作用极显著正相关 ($P < 0.01$)。利用超高效液相色谱质谱联用技术 (UPLC-MS) 从灰树花醇提物中共鉴定出 15 个化合物, 其中芹菜素和表儿茶素可能是灰树花发挥抗氧化作用的主要化学成分, 麦角甾醇和过氧化麦角甾醇可能是发挥肿瘤细胞抑制作用的甾体类化合物。该研究结果可为灰树花作为功能食品进一步开发提供理论依据。

关键词: 灰树花; 不同极性溶剂; 化学成分; 抗氧化活性; 肿瘤细胞抑制作用

中图分类号: Q 71 文章编号: 1673-1689(2024)05-0054-10 DOI: 10.12441/spyswjs.20220526002

Chemical Constituents and Bioactivity of Alcohol Extracts from *Grifola frondosa*

HE Junqiang¹, XIONG Wenyu¹, HUANG Ying¹, LIU Bin^{*1,2}

(1. College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. National Engineering Research Center of JUNCAO Technology, Fuzhou 350002, China)

Abstract: To elucidate the bioactive chemical components of *Grifola frondosa* and their antioxidant and tumor cell inhibition effects, the present study analyzed the main chemical components of ethanol extracts of *Grifola frondosa* extracted with various polar solvents, as well as their scavenging abilities to 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), and hydroxyl radicals. The inhibitory effects on human hepatocellular carcinoma cells (HepG2), human lung adenocarcinoma cells (A549) were also investigated. The results showed that ethyl acetate extract and n-butanol extract had the highest antioxidant activity, and the mass fractions of total phenols and flavonoids were significantly positively correlated with antioxidant activity ($P < 0.05$). The petroleum ether extract and ethyl acetate

收稿日期: 2022-05-26 修回日期: 2022-06-22

基金项目: 福建省科技计划重大专项项目 (2021NZ029009); 福建省科学技术厅区域发展项目 (2020N3002); 福建省科学技术厅对外合作项目 (2021I0008); 中国博士后科学基金项目 (2020M671918)。

* 通信作者: 刘斌 (1969—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事分子营养学研究。E-mail: liubin618@hotmail.com

extract showed the best inhibitory effect on tumor cells, and the mass fractions of triterpenoids and sterols showed a highly significant positive correlation with tumor cell inhibition ($P<0.01$). Ultrahigh performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS) identified a total of 15 compounds from the ethanol extracts of *Grifola frondosa*, among which apigenin and epicatechin might be the main chemical components responsible for the antioxidant activity of *Grifola frondosa*, while the steroid compounds exhibiting inhibitory effects on tumor cells might be ergosterol and ergosterol endoperoxide. The results could provide a theoretical basis for the further development of *Grifola frondosa* as the functional food.

Keywords: *Grifola frondosa*, different polar solvents, chemical components, antioxidant activity, tumor cell inhibition effect

灰树花(*Grifola frondosa*)是多孔菌科树花属真菌,柄枝呈珊瑚状,孔面呈淡黄色,主要分布于福建、云南等地^[1],目前对灰树花的研究主要集中在大分子活性物质的分离纯化以及生物活性方面。灰树花具有丰富的药用价值,从灰树花子实体中纯化得到的D组分已被正式用作临床抗肿瘤药物和免疫调节剂,其他多糖组分具有降血糖、降血脂等活性作用,蛋白质和多肽具有抗病毒、降血压等功效^[2-3]。

目前关于灰树花其他活性物质的相关研究较少,主要有灰树花醇提物对二肽基肽酶(DPP-IV酶)、肿瘤细胞的抑制作用研究,以及灰树花多酚组分的抗氧化活性比较^[4-5]。但此类研究未涉及灰树花活性成分化学组分的研究。

作者采用体积分数70%的乙醇溶液为提取剂,按照极性从低到高依次萃取得到灰树花不同极性溶剂萃取物,研究各萃取物的功能成分质量分数、抗氧化活性和肿瘤细胞抑制作用,同时利用相关性研究和超高效液相色谱-质谱联用技术分析各萃取物发挥活性作用的潜在化学成分,以期灰树花作为功能性食品进行开发和利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

灰树花子实体:浙江省龙泉市建松土特产经营部;A549(肺癌细胞)、HepG2(肝癌细胞)、HEK293(人胚肾细胞):武汉普诺赛生命科技有限公司;无水乙醇、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、硫酸、苯酚、香草醛、高氯酸、冰醋酸:国药集团化学试剂有限公司;DPPH、ABTS、没食子酸、芦丁、葡萄糖:上海阿拉丁试剂公司;磷酸盐缓冲液、福林-酚试剂、齐墩果

酸、色谱级甲醇、色谱级乙腈、甲酸铵:上海麦克林生化科技有限公司;CCK-8试剂盒:北京兰博利德生物技术有限公司;DMEM培养基、血清、青霉素、链霉素、胰酶:Biosharp公司。

1.2 仪器与设备

DHG-9240A电热恒温干燥箱:上海一恒科技有限公司;HH-3A数显三用水浴锅:金坛精达仪器制造厂;SC-3612低速离心机:科大创新股份有限公司;倒置显微镜:日本尼康仪器有限公司;二氧化碳培养箱:上海一恒科学仪器有限公司;TYPEFDU-1000冷冻干燥机:东京理化器械株式会社;MK3型酶标仪、液相色谱仪、质谱仪:美国Thermo公司。

1.3 实验方法

1.3.1 灰树花醇提物不同极性溶剂萃取物的制备 灰树花子实体烘干,用粉碎机粉碎至粗粉,在50℃下加入15倍体积的体积分数70%的乙醇溶液,超声提取2次,每次1h,过滤,合并提取液,减压浓缩得灰树花70%乙醇提取物(GF70)。将灰树花醇提物加适量水充分混匀后,采用液液萃取法,用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇依次萃取,萃取至有机层无色,分别合并萃取液,减压浓缩,冷冻干燥,得到石油醚萃取物(PE)、乙酸乙酯萃取物(EAE)、正丁醇萃取物(NBE)和水溶物(WSE)。

1.3.2 总酚质量分数测定 取没食子酸标准溶液(质量浓度分别为10、20、30、40、50 μg/mL)1.0 mL,加入福林酚试剂5.0 mL,摇匀放置5 min,再加入质量分数7.5%碳酸钠溶液4.0 mL,避光放置60 min,在765 nm测定吸光度^[6]。绘制标准曲线,得到回归方程 $y=7.247x+0.0309$ ($R^2=0.9945$)。取质量浓度为10 μg/mL的灰树花各萃取物1.0 mL,按上述方法操

作, 根据标准曲线计算出各萃取物的总酚质量分数, 再换算即可。

1.3.3 多糖质量分数测定 取质量浓度分别为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL 的葡萄糖溶液 500 μ L, 加入质量分数为 5% 的苯酚溶液 500 μ L 摇匀, 再加入浓硫酸 2.5 mL, 沸水浴 15 min, 冷却后在 490 nm 测定吸光度^[7]。绘制标准曲线, 得到回归方程 $y=4.617\ 3x+0.133\ 4$ ($R^2=0.992\ 9$)。分别取质量浓度为 1 mg/mL 的灰树花各萃取物 500 μ L, 按上述方法操作, 根据标准曲线计算出各萃取物的多糖质量分数, 再换算即可。

1.3.4 黄酮质量分数测定 用体积分数 30% 乙醇溶液配制芦丁标准液, 取质量浓度分别为 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06 mg/mL 的芦丁标准液 50 μ L, 加入质量分数 5% 的 NaNO_2 溶液 15 μ L, 摇匀放置 6 min, 加入质量分数 5% 的 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 30 μ L, 放置 6 min, 再加入质量分数 4% 的 NaOH 溶液 105 μ L, 放置 15 min, 在 510 nm 测吸光度^[8]。绘制标准曲线, 得到回归方程 $y=1.338\ 4x-0.004\ 6$ ($R^2=0.999\ 6$)。取质量浓度为 50 mg/mL 的灰树花各萃取物 50 μ L, 按上述方法操作, 根据标准曲线计算出各萃取物的黄酮质量分数, 再换算即可。

1.3.5 三萜质量分数测定 用无水乙醇配制齐墩果酸标准液(质量浓度 0.2 mg/mL), 分别取 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 置于试管中, 100 $^{\circ}\text{C}$ 挥干试剂后, 加入 0.1 mL 质量分数 5% 的冰醋酸溶液和 0.8 mL 质量分数 70% 的高氯酸溶液, 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 20 min 后立即冰水浴 5 min, 再加入冰醋酸溶液 5 mL, 摇匀放置 10 min, 在 550 nm 测吸光度^[9]。绘制标准曲线, 得到回归方程 $y=0.003\ 5x-0.019\ 8$ ($R^2=0.999\ 4$)。取 0.1 g 灰树花各萃取物溶于 10 mL 无水乙醇中, 按上述方法操作, 根据标准曲线计算出各萃取物的三萜质量分数, 再换算即可。

1.3.6 甾醇质量分数测定 用无水乙醇配制 1.0 mg/mL 麦角甾醇标准液, 分别取 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 置于试管中, 100 $^{\circ}\text{C}$ 挥干试剂后, 加入 0.2 mL 质量分数 5% 的香草醛-冰醋酸溶液和 0.8 mL 质量分数 70% 的高氯酸溶液, 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 15 min 后立即冷却, 再加入质量分数 99% 冰醋酸溶液 5 mL, 摇匀后在 546 nm 测吸光度^[10]。绘制标准曲线, 得回归方程 $y=2.500\ 4x+0.059\ 9$ ($R^2=0.998\ 4$)。取 10 mg 灰树花各萃取物溶于 10 mL 无水乙醇中, 按上述方

法操作, 根据标准曲线计算出各萃取物的甾醇质量分数, 再换算即可。

1.3.7 DPPH 自由基清除率测定 取 100 μ L 质量浓度分别为 0.125、0.25、0.5、1.0、2.0 mg/mL 的灰树花各萃取物, 加入 100 μ L 浓度 0.4 mmol/L 的 DPPH-乙醇溶液, 摇匀避光放置 30 min, 在 517 nm 测定吸光度, 记为 A_1 。用无水乙醇代替灰树花萃取物作空白对照, 吸光度记为 A_0 。以无水乙醇代替 DPPH-乙醇溶液为样品对照, 吸光度记为 A_2 ^[11]。计算 DPPH 自由基清除率并利用 GraphPad Prism 7.0 软件计算 IC_{50} (半数抑制质量浓度), 见式(1):

$$R = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0} \right) \times 100\% \quad (1)$$

式中: R 为 DPPH 自由基清除率; A_0 为无水乙醇加入 DPPH-乙醇溶液的吸光度; A_1 为样品加入 DPPH-乙醇溶液的吸光度; A_2 为样品加入无水乙醇的吸光度。

1.3.8 ABTS 自由基清除率测定 先将 ABTS 用磷酸盐缓冲液(PBS)稀释, 734 nm 的吸光度为 0.70 ± 0.02 , 此为 ABTS 工作液。分别取 50 μ L 质量浓度为 0.125、0.25、0.5、1.0、2.0 mg/mL 的灰树花萃取物, 各加入 150 μ L ABTS 工作液, 摇匀后放置 30 min, 在 734 nm 测定吸光度, 记为 A_1 。以 PBS 代替灰树花萃取物为空白对照, 吸光度记为 A_0 。以 PBS 代替 ABTS 工作液为样品对照, 吸光度记为 A_2 ^[12]。计算 ABTS 自由基清除率, 并利用 GraphPad Prism 7.0 软件计算 IC_{50} (半数抑制质量浓度), 见式(2):

$$R = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0} \right) \times 100\% \quad (2)$$

式中: R 为 ABTS 自由基清除率; A_0 为 PBS 加入 ABTS 的吸光度; A_1 为样品加入 ABTS 的吸光度; A_2 为样品加入 PBS 的吸光度。

1.3.9 羟自由基清除率测定 分别取 1 mL 质量浓度为 0.125、0.25、0.5、1.0、2.0 mg/mL 的灰树花各萃取物, 加入 0.5 mL 质量分数为 0.14% 的 FeSO_4 溶液和 0.35 mL 的 H_2O_2 , 摇匀放置 10 min, 再加入 0.15 mL 的 20 mmol/L 水杨酸溶液, 放置 10 min, 在 562 nm 测定吸光度, 记为 A_1 。以去离子水代替灰树花各萃取物为空白对照, 吸光度记为 A_0 。以去离子水代替水杨酸溶液为样品对照, 吸光度记为 A_2 ^[13]。计算羟自由基清除率, 并利用 GraphPad Prism 7.0 软件计算 IC_{50} (半数抑制质量浓度), 见式(3):

$$R=\left(1-\frac{A_1-A_2}{A_0}\right)\times 100\% \quad (3)$$

式中: R 为羟自由基清除率; A_0 为去离子水加水杨酸的吸光度; A_1 为样品加水杨酸的吸光度; A_2 为样品加去离子水的吸光度。

1.3.10 肿瘤细胞抑制作用评价与正常细胞毒性测定 取处于对数生长期的肿瘤细胞 (A549 细胞和 HepG2 细胞) 和正常细胞 (HEK293 细胞) 用胰酶消化后, 用 DMEM 培养基制成含有 50 000 个/mL 细胞的细胞悬液, 每孔 100 μ L 加入 96 孔细胞培养板中, 培养箱中培养 24 h (37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO_2), 弃去上清液, 加入含有不同质量浓度灰树花各萃取物的培养液, 各质量浓度设 5 个重复, 并设置阴性对照组、不加细胞的空白组。培养 48 h, 每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂, 培养 2 h 后在 450 nm 测定光密度。计算肿瘤细胞的抑制率, 并利用 GraphPad Prism 7.0 软件计算 IC_{50} (半数抑制质量浓度), 正常细胞的存活率, 见式 (4)~(5):

$$S=\frac{D_1-D_0}{D_2-D_0}\times 100\% \quad (4)$$

式中: S 为正常细胞存活率; D_0 为不加细胞和不加灰树花各萃取物的光密度; D_1 为加细胞和灰树花各萃取物的光密度; D_2 为加细胞和不加灰树花各萃取物的光密度。

$$I=\left(1-\frac{D_1-D_0}{D_2-D_0}\right)\times 100\% \quad (5)$$

式中: I 为肿瘤细胞抑制率; D_0 为不加细胞和不加灰树花各萃取物的光密度; D_1 为加细胞和灰树花各萃取物的光密度; D_2 为加细胞和不加灰树花各萃取物的光密度。

1.3.11 灰树花 70% 乙醇提取物化学成分分析 色谱条件为: 使用 ACQUITY UPLC[®] HSS T3 色谱柱 (2.1 mm $\times$ 150 mm, 1.8 μ m)、流量 0.25 mL/min、柱温

40 $^{\circ}$ C、进样量 2 μ L。流动相 (负离子模式): 5 mmol/L 甲酸铵溶液 (A), 乙腈 (B)。洗脱程序 (负离子模式, 体积分数): 0~1 min, 98% A, 2% B; 1~9 min, 98%~50% A, 2%~50% B; 9~12 min, 50%~2% A, 50%~98% B; 12~13.5 min, 2% A, 98% B; 13.5~14 min, 2%~98% A, 98%~2% B。流动相 (正离子模式): 体积分数 0.1% 甲酸溶液 (C), 体积分数 0.1% 甲酸-乙腈溶液 (D), 正离子模式洗脱程序与负离子模式洗脱程序一样, 用流动相 C 代替流动相 A, 用流动相 D 代替流动相 B。质谱条件: 使用电喷雾离子源 (ESI), 正负离子电离模式, 正离子喷雾电压为 3.50 kV, 负离子喷雾电压为 2.50 kV, 鞘气 (氮气) 3 MPa, 辅助气 (氮气) 1 MPa。毛细管温度 325 $^{\circ}$ C, 分辨率 70 000 进行全扫描, 采用 HCD 进行二级裂解, 碰撞能量为 30 eV。

1.4 数据处理

采用 SPSS 26.0 和 GraphPad Prism 7.0 软件进行数据处理、绘图和分析, 每组数据重复 3 次, 结果以平均值 $\pm$ 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 灰树花不同极性溶剂萃取物成分分析

由表 1 可知: 石油醚萃取物中三萜质量分数最高, 为 18.299%, 与其他萃取物中三萜质量分数有显著差异 ($P<0.05$); 水溶物中三萜质量分数最低, 为 0.188%。乙酸乙酯萃取物中甾醇质量分数最高, 为 15.819%, 与其他萃取物中甾醇质量分数有显著差异 ($P<0.05$); 水溶物中甾醇质量分数最低, 为 0.043%。正丁醇萃取物的总酚和黄酮质量分数最高, 分别为 0.137% 和 0.077%, 与其他萃取物中总酚和黄酮的质量分数有显著差异 ($P<0.05$)。水溶物中多糖质量分数最高, 为 49.256%, 与其他萃取物中多糖质量分数有显著差异 ($P<0.05$); 石油醚萃取物中多糖质量分数最低, 为 4.235%。结果表明: 溶剂极性

表 1 灰树花不同极性溶剂萃取物的多糖、总酚、三萜、甾醇、黄酮质量分数 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 1 Mass fractions of polysaccharides, total phenolic, triterpenes, sterols, and flavonoids in various polar solvent extracts from *Grifola frondosa* ($\bar{x}\pm s, n=3$)

样品	质量分数/%				
	多糖	三萜	甾醇	总酚	黄酮
石油醚萃取物	4.235 $\pm$ 0.535 ^d	18.299 $\pm$ 0.505 ^a	12.291 $\pm$ 0.434 ^b	0.005 $\pm$ 0.001 ^d	—
乙酸乙酯萃取物	12.592 $\pm$ 1.563 ^c	17.036 $\pm$ 1.231 ^b	15.819 $\pm$ 1.127 ^a	0.090 $\pm$ 0.006 ^b	—
正丁醇萃取物	37.400 $\pm$ 0.672 ^b	0.591 $\pm$ 0.023 ^c	0.391 $\pm$ 0.059 ^c	0.137 $\pm$ 0.012 ^a	0.077 $\pm$ 0.001 ^a
水溶物	49.256 $\pm$ 2.121 ^a	0.188 $\pm$ 0.023 ^d	0.043 $\pm$ 0.011 ^d	0.025 $\pm$ 0.004 ^c	0.012 $\pm$ 0.003 ^b

注: 同列数据角标字母不同表示差异显著 ($P<0.05$); “—”表示未检出。

与萃取物中多糖质量分数成正相关。由表 1 可知,正丁醇萃取物和水溶物中的三萜、甾醇质量分数,以及灰树花不同极性溶剂萃取物中总酚、黄酮质量分数均小于 1%。马迪等未在灰树花各萃取物中定性检出黄酮类成分,且未在正丁醇萃取物和水溶物中检出三萜和甾醇类成分,可能是由于甾醇、总酚等成分质量分数较少而导致定性检验未检出^[4]。宋吉玲等测出食药真菌桑黄中多糖质量分数是总酚和黄酮的 10 000 倍以上,表明与植物相比,真菌的总酚和黄酮质量分数相对较少^[14]。

2.2 灰树花不同极性溶剂萃取物抗氧化活性

2.2.1 灰树花不同极性溶剂萃取物对 DPPH 自由基的清除作用 DPPH 自由基具有重复性好等优点,被广泛应用于评价活性物质的抗氧化能力^[15]。由图 1 可知,灰树花不同极性溶剂萃取物对 DPPH 自由基清除率与质量浓度的量效关系良好,正丁醇萃取物对 DPPH 自由基清除速率增长最快。各萃取物对 DPPH 自由基均有良好的清除能力,清除率皆在 50% 以上。由表 2 可知,灰树花不同极性溶剂萃取物清除 DPPH 自由基的能力由大到小依次为:正丁醇萃取物>乙酸乙酯萃取物>水溶物>石油醚萃取物。

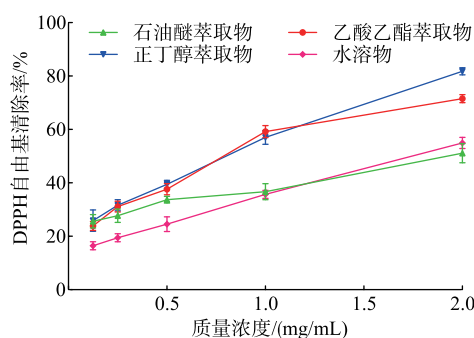


图 1 灰树花不同极性溶剂萃取物对 DPPH 自由基的清除能力

Fig. 1 DPPH radical scavenging capacity of various polar solvent extracts from *Grifola frondosa*

表 2 灰树花不同极性溶剂萃取物抗氧化活性 IC_{50}

Table 2 Antioxidant activity IC_{50} of various polar solvent extracts from *Grifola frondosa*

单位:mg/mL

样品	DPPH 自由基	ABTS 自由基	羟自由基
石油醚萃取物	1.997±0.021	3.074±0.037	1.126±0.054
乙酸乙酯萃取	0.721±0.022	0.735±0.029	0.345±0.005
正丁醇萃取物	0.634±0.007	1.034±0.018	0.297±0.032
水溶物	1.853±0.014	3.160±0.009	1.067±0.016

2.2.2 灰树花不同溶剂萃取物对 ABTS 自由基的清除作用 ABTS 自由基是评价天然产物抗氧化能力的重要指标,适应性广^[16]。由图 2 可知,灰树花不同极性溶剂萃取物对 ABTS 自由基的清除能力都随着样品质量浓度的升高而增强。正丁醇萃取物和乙酸乙酯萃取物对 ABTS 自由基的清除能力较强,而石油醚萃取物和水溶物在质量浓度 2.0 mg/mL 时,其清除率还未达到 50%。由表 2 可知,灰树花不同极性溶剂萃取物清除 ABTS 自由基的能力由大到小依次为:乙酸乙酯萃取物>正丁醇萃取物>石油醚萃取物>水溶物。

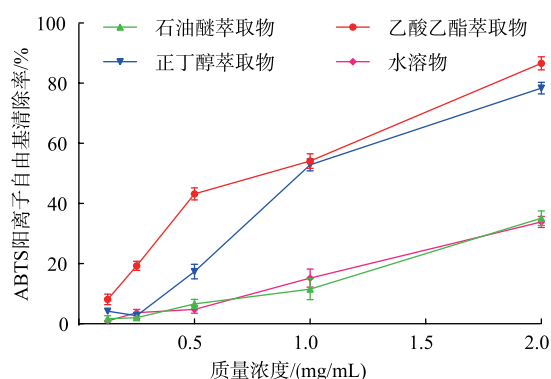


图 2 灰树花不同极性溶剂提取对 ABTS 自由基的清除能力

Fig. 2 ABTS radical scavenging capacity of various polar solvent extracts from *Grifola frondosa*

2.2.3 灰树花不同极性溶剂萃取物对羟自由基的清除作用 羟自由基是活性氧的一种,在人体新陈代谢过程中危害性较大^[17]。由图 3 可知,灰树花不同极性溶剂萃取物对羟自由基清除率与质量浓度正相关。4 个萃取物对羟自由基都有较强的清除能力,在质量浓度为 2.0 mg/mL 时,各萃取物对羟自由基的清除率皆为 60% 以上,其中乙酸乙酯萃取物和正丁醇萃取物的清除率可达 95.50% 和 92.25%。由表 2 可知,灰树花不同极性溶剂萃取物清除羟自由基的能力由大到小依次为:正丁醇萃取物>乙酸乙酯萃取物>水溶物>石油醚萃取物。

2.3 灰树花不同极性溶剂萃取物对肿瘤细胞和正常细胞的活力影响

2.3.1 灰树花不同极性溶剂萃取物对 A549 细胞的抑制作用 由图 4 可知,灰树花不同极性溶剂萃取物对 A549 细胞的抑制作用随着质量浓度的增加而增强,当样品质量浓度小于 0.8 mg/mL 时,各萃取物对 A549 细胞抑制作用的增长速度缓慢;当样品质

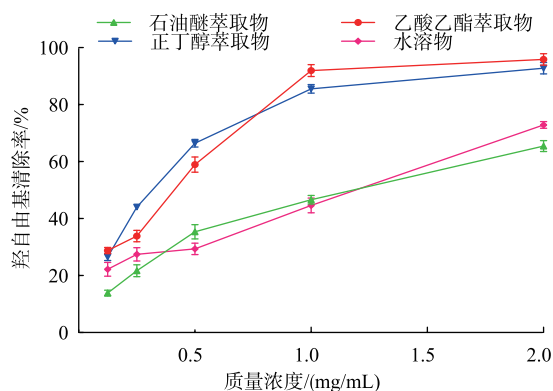


图3 灰树花不同极性溶剂萃取物对羟自由基的清除能力
Fig. 3 Hydroxyl radical scavenging capacity of various polar solvent extracts from *Grifola frondosa*

量浓度大于 0.8 mg/mL 时,增长速度较快;其中石油醚萃取物的增长速度最快,并且具有良好的线性正相关。当质量浓度为 3.2 mg/mL 时,石油醚萃取物 and 乙酸乙酯萃取物对 A549 细胞具有较强的抑制作用,细胞抑制率达 99%;正丁醇萃取物和水溶物的细胞抑制率均未超过 50%。通过计算 IC_{50} 可知灰树花不同极性溶剂萃取物对肺癌 A549 细胞抑制能力由大到小依次为:乙酸乙酯萃取物 (1.202 mg/mL),石油醚萃取物 (1.718 mg/mL),正丁醇萃取物 (4.998 mg/mL),水溶物 (18.587 mg/mL)。

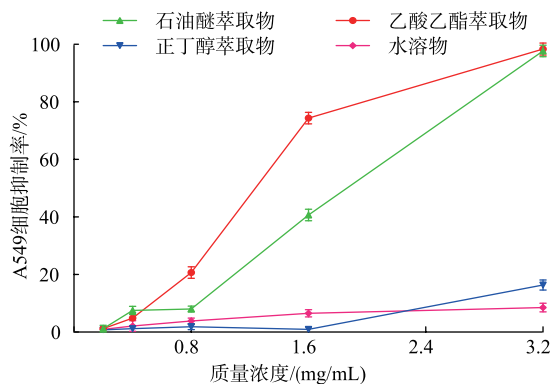


图4 灰树花不同极性溶剂萃取物对 A549 细胞的抑制作用
Fig. 4 Inhibitory activity of various polar solvent extracts from *Grifola frondosa* on A549 cell

2.3.2 灰树花不同极性溶剂萃取物对 HepG2 细胞的抑制作用 由图 5 可知,灰树花不同极性溶剂萃取物对 HepG2 细胞的抑制作用与质量浓度成正比,当样品质量浓度小于 1.6 mg/mL 时,各萃取物对 HepG2 细胞抑制作用的增长速度较快;反之则增长速度缓慢且趋于平稳。石油醚萃取物和乙酸乙酯萃取物具有明显抑制作用,当质量浓度为 3.2 mg/mL

时,对 HepG2 细胞的抑制率达 95%以上。正丁醇萃取物具有轻微抑制作用,而水溶物基本无抑制效果。通过计算 IC_{50} 可知灰树花不同极性溶剂萃取物对肝癌 HepG2 细胞的抑制能力由大到小依次为:乙酸乙酯萃取物 (0.583 mg/mL),石油醚萃取物 (0.759 mg/mL),正丁醇萃取物 (8.309 mg/mL),水溶物 (49.036 mg/mL)。

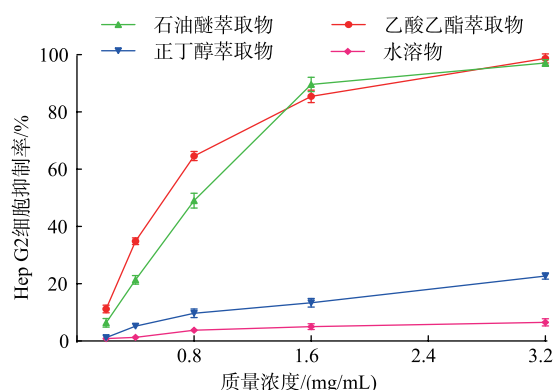


图5 灰树花不同极性溶剂萃取物对 HepG2 细胞的抑制作用
Fig. 5 Inhibitory activity of various polar solvent extracts from *Grifola frondosa* on HepG2 cells

2.3.3 灰树花不同极性溶剂萃取物对 HEK293 细胞的毒性测定 由图 6 可知,正常细胞 HEK293 在正丁醇萃取物和水溶物的作用下细胞活力并无明显下降,随正丁醇萃取物和水溶物样品质量浓度增加,HEK293 细胞存活率有上升趋势,表明在 0.2~3.2 mg/mL 时,正丁醇萃取物和水溶物对 HEK293 细胞并无抑制作用。当石油醚萃取物和乙酸乙酯萃取物样品质量浓度小于 0.8 mg/mL,HEK293 细胞存活率在 95%以上,对 HEK293 细胞无明显的毒性;当样品质量浓度由 0.8 mg/mL 增至 3.2 mg/mL,HEK293 细胞存活率逐渐减少至 85%,表明样品质量浓度大于 0.8 mg/mL 时,石油醚萃取物和乙酸乙酯萃取物对 HEK293 细胞有轻微毒性。

2.4 灰树花不同溶剂萃取物各项指标的相关性分析结果

利用 SPSS 26.0 软件分析灰树花不同极性溶剂萃取物多糖、总酚、三萜、甾醇、黄酮质量分数与抗氧化、肿瘤细胞抑制作用的皮尔逊相关性结果见表 3,总酚和黄酮质量分数与抗氧化活性存在良好相关性。总酚质量分数与 DPPH 自由基清除率和羟自由基清除率极显著正相关 ($P<0.01$),与 ABTS 自由基清除率显著正相关 ($P<0.05$);黄酮质量分数与

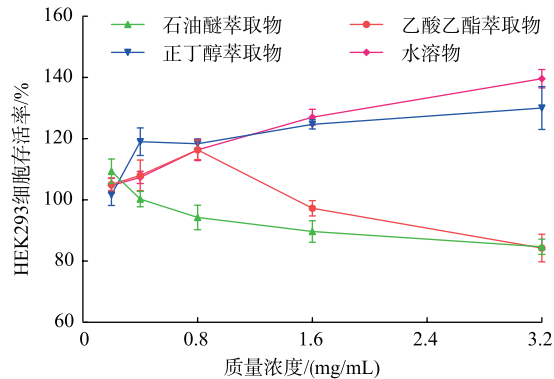


图 6 灰树花不同极性溶剂萃取物对 HEK293 细胞的毒性测定

Fig. 6 Toxicity test of various polar solvent extracts from *Grifola frondosa* on HEK293 cells

表 3 灰树花不同极性溶剂萃取物多糖、总酚、三萜、甾醇、黄酮质量分数与抗氧化、肿瘤细胞抑制作用的相关性

Table 3 Pearson's correlation coefficients between antioxidant and antitumor activities and the mass fractions of polysaccharides, total phenolic, triterpenes, sterols, and flavonoids in various polar solvent extracts from *Grifola frondosa*

指标	DPPH 自由基清除率	ABTS 自由基清除率	羟自由基清除率	A549 细胞抑制率	HepG2 细胞抑制率
多糖质量分数	0.044	-0.203	0.037	-0.897**	-0.921**
总酚质量分数	0.977**	0.791*	0.977**	-0.101	-0.168
三萜质量分数	-0.138	0.192	-0.135	0.930**	0.970**
甾醇质量分数	0.120	0.379	0.121	0.982**	0.999**
黄酮质量分数	0.624*	0.215	0.630*	-0.535	-0.648*

注:**表示极显著相关($P<0.01$);*表示显著相关($P<0.05$)。

2.5 灰树花 70%乙醇提取物化学成分分析

采用 1.3.11 的色谱和质谱条件对 GF70 进行化学成分分析,通过与 HMDB、MassBank、Lipid Maps、mzCloud 数据库,标准品以及相关文献报道的一级和二级质谱数据进行特征碎片离子和准分子离子的比对,共鉴定出 15 个化合物,包括 7 个黄酮类化合物(5,7-二羟基黄酮、鱼藤酮、木犀草素、黄豆苷元、芹菜素、大豆黄素、表儿茶素),3 个甾体化合物(麦角甾醇、过氧化麦角甾醇、2-甲氧雌酮),2 个萜类化合物(考司内酯、人参皂苷),2 个脂肪酸(十二烷酸、己二酸)和 1 个喹诺酮类化合物(萘啶酸)。

任丽蓉等从丽江山荆子中分离纯化得纯度 98%的表儿茶素,当其质量浓度为 0.075 mg/mL 时,对 DPPH 和 ABTS 自由基清除率可达 95%以上^[18]。余启明等分析广西茶叶中的功能性成分和抗氧化

DPPH 自由基清除率和羟自由基清除率显著正相关($P<0.05$);表明当萃取物质量浓度一定时,总酚和黄酮的质量分数越高,抗氧化指标的 IC_{50} 值越低,即总酚和黄酮是萃取物发挥抗氧化作用的主要活性成分。三萜、甾醇质量分数与 A549 细胞、HepG2 细胞抑制率极显著正相关($P<0.01$),表明三萜和甾醇是灰树花各萃取物抑制肿瘤细胞作用的主要贡献者。水溶物中多糖是主要成分,其他活性成分质量分数极低,抗氧化和肿瘤细胞抑制作用效果不显著,所以导致多糖质量分数与抗氧化和肿瘤细胞抑制作用存在弱相关甚至负相关。马迪等研究结果也表明灰树花萃取后的剩余部分即水溶物对 DPP-IV 酶和肿瘤细胞的抑制作用最差^[4]。

活性之间的相关性,表儿茶素的质量分数与抗氧化活性显著正相关^[19]。以上研究结果表明,表儿茶素具有较强的抗氧化活性。表儿茶素具有多个反应活性基团,其酚羟基与自由基结合是发挥抗氧化作用的主要原因^[18-20]。

杨薇通过灰色关联度分析法构建 19 个抗氧化成分与抗氧化活性之间的谱效关系,结果显示芹菜素对 DPPH 和 ABTS 自由基清除影响的关联度排名第二,表明在众多抗氧化活性成分中,芹菜素是发挥抗氧化作用的主要活性成分^[21]。芹菜素的抗氧化作用主要通过分子结构上的 3 个羟基与自由基结合,螯合金属离子,抑制自由基产生^[21-22]。

麦角甾醇是真菌中发现的一种重要甾醇,对多种肿瘤细胞(MDA-MB-231 细胞、HepG2 细胞、A549 细胞)的 IC_{50} 均小于 200 $\mu\text{mol/L}$,具有一定抑

表 4 灰树花 70%乙醇提取物的 UPLC-MS 分析
 Table 4 UPLC-MS analysis of 70% ethanol extracts from *Grifola frondosa*

序号	保留时间/min	电离模式	相对分子质量	误差/10 ⁻⁶	MS/MS 离子碎片	分子式	鉴定结果	分类
1	1.38	[M] ⁺	199.98	0.01	158.96、128.95	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	十二烷酸	脂肪酸
2	1.57	[M-H] ⁻	145.05	1.00	126.99、101.06、83.10	C ₆ H ₁₀ O ₄	己二酸	脂肪酸
3	2.24	[M+H] ⁺	233.09	3.39	215.30、175.00	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₃	萘啶酸	喹诺酮
4	3.61	[M+H] ⁺	255.06	1.70	145.03、143.05、119.05、107.01、101.04	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	5,7-二羟基黄酮	黄酮
5	5.25	[M+H-H ₂ O] ⁺	377.13	0.91	367.27、241.08、212.08、191.07	C ₂₃ H ₂₂ O ₆	鱼藤酮	异黄酮
6	5.39	[M+H] ⁺	233.15	2.43	191.12、140.07、105.07	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	考司内酯	萜类
7	6.11	[M-H] ⁻	285.16	1.72	133.03	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	木犀草素	黄酮
8	6.71	[M-H] ⁻	253.05	0.38	198.87、180.91、136.87	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	黄豆苷元	异黄酮
9	7.06	[M-H] ⁻	269.05	0.24	151.01、117.04、107.02	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	芹菜素	黄酮
10	9.07	[M-H] ⁻	283.06	1.52	268.03	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	大豆黄素	异黄酮
11	11.71	[M-H] ⁻	799.47	1.81	637.43、475.37	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	人参皂苷	萜类
12	12.31	[M-H] ⁻	289.07	0.42	138.86、115.62、55.44	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	表儿茶素	黄酮
13	12.79	[M] ⁺	428.33	2.31	427.32、411.28、355.26、271.16、193.08	C ₂₈ H ₄₄ O ₃	过氧化麦角甾醇	甾体
14	13.19	[M+H] ⁺	397.33	0.34	379.33、311.23、83.08	C ₂₈ H ₄₄ O	麦角甾醇	甾体
15	13.50	[M-H] ⁻	299.16	3.61	273.19、137.06	C ₁₉ H ₂₄ O ₃	2-甲氧雌酮	甾体

制肿瘤细胞活性的作用。作为麦角甾醇衍生物,过氧化麦角甾醇对肿瘤细胞的抑制作用更加显著,对肿瘤 HepG2、HeLa、A549、MCF-7 细胞的 IC₅₀ 分别为 56.5、70.6、112.7、75.2 μmol/L^[23-24]。庞菲研究表明,过氧化麦角甾醇 5,8 位的过氧键是其发挥抗肿瘤作用的主要原因^[25]。

此次化学成分分析验证了 GF70 中含有多个甾醇和黄酮类化合物,其中抑制肿瘤细胞作用的甾体类化合物可能为麦角甾醇和过氧化麦角甾醇,芹菜素和表儿茶素可能是灰树花抗氧化作用的潜在化学成分。

3 结 语

分析灰树花不同极性溶剂萃取物中功能成分的质量分数,结果表明:与桑黄等真菌类似,灰树花中总酚、黄酮质量分数较低,主要存在于水溶物和正丁醇萃取物中;石油醚萃取物和乙酸乙酯萃取物

主要由三萜和甾醇组成,多糖质量分数与萃取溶剂极性正相关。研究灰树花不同极性溶剂萃取物的抗氧化和肿瘤细胞抑制作用,再利用相关性研究分析灰树花各萃取物中功能成分的质量分数与各活性作用之间的关系,结果表明石油醚萃取物和乙酸乙酯萃取物的肿瘤细胞抑制效果较好,且发挥作用的主要成分为三萜和甾醇类成分;乙酸乙酯萃取物和正丁醇萃取物的抗氧化效果最佳,虽然总酚和黄酮类成分质量分数较低,但是这两者质量分数与抗氧化能力显著正相关。灰树花醇提物的 UPLC-MS 分析验证了灰树花醇提物中含有多种甾体类化合物和黄酮类化合物,发挥肿瘤细胞抑制作用的甾体类化合物可能为麦角甾醇和过氧化麦角甾醇,芹菜素和表儿茶素可能是发挥抗氧化作用的潜在化学成分。该研究验证了灰树花小分子活性物质具有较强的抗氧化和肿瘤细胞抑制作用,检测了发挥活性作用的潜在化学成分,可为灰树花高值化开发提供科学依据。

参考文献:

- [1] XIAO C, WU Q P, XIE Y Z, et al. Hypoglycemic effects of *Grifola frondosa* (Maitake) polysaccharides F2 and F3 through improvement of insulin resistance in diabetic rats[J]. **Food & Function**, 2015, 6(11): 3567-3575.
- [2] 刘佳, 包海鹰, 图力古尔. 灰树花化学成分及药理活性研究进展[J]. 菌物研究, 2018, 16(3): 150-157.
LIU J, BAO H Y, BAU T. Chemical constituents and pharmacological activities of *Grifola frondosa*[J]. **Journal of Fungal Research**, 2018, 16(3): 150-157. (in Chinese)
- [3] CHEN X Y, JI H Y, ZHANG C F, et al. Structural characterization and antitumor activity of a novel polysaccharide from *Grifola frondosa*[J]. **Journal of Food Measurement and Characterization**, 2020, 14(1): 272-282.
- [4] 马迪, 韩乐, 冯娜, 等. 灰树花子实体醇提物生物活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(3): 381-385.
MA D, HAN L, FENG N, et al. Biological activity of ethanol extract of *Grifola frondosa* fruiting bodies[J]. **Natural Product Research and Development**, 2015, 27(3): 381-385. (in Chinese)
- [5] 黄梓芮, 潘雨阳, 李田田, 等. 灰树花不同极性多酚组分的抗氧化活性研究[J]. 农产品加工, 2017(14): 1-4.
HUANG Z R, PAN Y Y, LI T T, et al. Polyphenol antioxidant activities with different polarities from *Grifola frondosa*[J]. **Farm Products Processing**, 2017(14): 1-4. (in Chinese)
- [6] LIU M, LIN L Q, SONG B B, et al. Cranberry phytochemical extract inhibits SGC-7901 cell growth and human tumor xenografts in BALB/c nu/nu mice[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2009, 57(2): 762-768.
- [7] 宋美蓉, 侯冬岩, 回瑞华. 苯酚-硫酸法测定葡萄酒中多糖含量[J]. 鞍山师范学院学报, 2013, 15(2): 47-50.
SONG M R, HOU D Y, HUI R H. Determination of polysaccharide content in wine by phenol-sulphate colorimetry [J]. **Journal of Anshan Normal University**, 2013, 15(2): 47-50. (in Chinese)
- [8] 孟晓萌, 郑晓冬, 潘少香, 等. 微波超声协同萃取法提取不同芦笋废弃物中黄酮类物质的研究[J]. 食品科技, 2019, 44(5): 208-212.
MENG X M, ZHENG X D, PAN S X, et al. Extration on the flavonoid from different kinds of asparagus waste by ultrasonic-microwave synergistic extraction[J]. **Food Science and Technology**, 2019, 44(5): 208-212. (in Chinese)
- [9] 张倩倩, 黄青. 基于香草醛-高氯酸显色反应测定灵芝三萜的方法探讨与修正[J]. 菌物学报, 2018, 37(12): 1792-1801.
ZHANG Q Q, HUANG Q. Revised method for determining *Ganoderma lingzhi* terpenoids by UV-Vis spectrophotometry based on colorimetric vanillin perchloric acid reaction[J]. **Mycosystema**, 2018, 37(12): 1792-1801. (in Chinese)
- [10] 张学良, 赵德华, 张文懿, 等. 银柴胡中总甾醇含量测定的方法学研究[J]. 宁夏医学杂志, 2012, 34(2): 126-127.
ZHANG X L, ZHAO D H, ZHANG W Y, et al. Methodology study on qualification of total sterol in *Stellaria dichotoma* L. var. *lanceolata* Bge by ultraviolet spectrophotometry[J]. **Ningxia Medical Journal**, 2012, 34(2): 126-127. (in Chinese)
- [11] 范亦菲, 郭琳, 靳文会, 等. 枸杞酸奶体外抗氧化活性和保肝功能研究[J]. 食品与生物技术学报, 2022, 41(4): 25-30.
FAN Y F, GUO L, JIN W H, et al. Study on antioxidant activity *in vitro* and hepatoprotective function of *Lycium barbarum* yogurt [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2022, 41(4): 25-30. (in Chinese)
- [12] ZHENG L, ZHAO M M, XIAO C Q, et al. Practical problems when using ABTS assay to assess the radical-scavenging activity of peptides: importance of controlling reaction pH and time[J]. **Food Chemistry**, 2016, 192: 288-294.
- [13] 林海燕, 王珊珊, 孙珊, 等. 响应面法优化南极磷虾亚铁螯合肽制备工艺及其理化性质[J]. 食品工业科技, 2019, 40(21): 166-173.
LIN H Y, WANG S S, SUN S, et al. Optimization of preparation of iron-chelating peptides from *Antarctic krill* by response surface methodology and its physicochemical properties[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2019, 40(21): 166-173. (in Chinese)
- [14] 宋吉玲, 王伟科, 闫静, 等. 药用真菌桑黄抗氧化物质及其活性研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2022, 50(3): 144-154.
SONG J L, WANG W K, YAN J, et al. Antioxidant substances and activity of medicinal fungus *Sanghuangporus*[J]. **Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)**, 2022, 50(3): 144-154. (in Chinese)

- [15] 韦献雅,殷丽琴,钟成,等. DPPH 法评价抗氧化活性研究进展[J]. 食品科学,2014,35(9):317-322.
WEI X Y, YIN L Q, ZHONG C, et al. Advances in the DPPH radical scavenging assay for antioxidant activity evaluation[J]. **Food Science**, 2014, 35(9):317-322. (in Chinese)
- [16] 焦扬,宋海,张勇,等. 3 种野生浆果酒中活性物质及抗氧化活性比较[J]. 食品与发酵工业,2015,41(1):60-65.
JIAO Y, SONG H, ZHANG Y, et al. Comparison of antioxidant activity and active substance of three kinds wild berry wine[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2015, 41(1):60-65. (in Chinese)
- [17] 冯慧萍,李亦聪. 羟自由基与水杨酸反应机理的初探[J]. 光谱实验室,2009,26(4):931-938.
FENG H P, LI Y C. Investigation on reaction kinetics of salicylic acid and hydroxyl radical[J]. **Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory**, 2009, 26(4):931-938. (in Chinese)
- [18] 任丽蓉,杨艳,付晓萍,等. 丽江山荆子表儿茶素的分离纯化及其抗氧化活性[J]. 食品研究与开发,2022,43(6):32-39.
REN L R, YANG Y, FU X P, et al. Isolation and purification of epigallocatechin from *Malus rockii* Rehd. and evaluation of its antioxidant activity[J]. **Food Research and Development**, 2022, 43(6):32-39. (in Chinese)
- [19] 余启明,张金华,黄泽强,等. 12 种广西地区茶叶的水提物活性成分测定及其抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发,2021,42(17):19-24.
YU Q M, ZHANG J H, HUANG Z Q, et al. Active components and antioxidant activities of aqueous extracts of twelve types of tea in Guangxi region[J]. **Food Research and Development**, 2021, 42(17):19-24. (in Chinese)
- [20] 童观珍,付晓萍,杨艳,等. 表儿茶素的分布及药理活性研究进展[J]. 云南农业大学学报(自然科学),2018,33(2):343-349.
TONG G Z, FU X P, YANG Y, et al. Advances in research on the distribution and pharmacological activities of epicatechin[J]. **Journal of Yunnan Agricultural University(Natural Science)**, 2018, 33(2):343-349. (in Chinese)
- [21] 杨薇. 车前草抗氧化抗炎谱效关系研究[D]. 贵阳:贵州大学,2021.
- [22] SI D Y, WANG Y, ZHOU Y H, et al. Mechanism of CYP2C9 inhibition by flavones and flavonols[J]. **Drug Metabolism and Disposition**, 2009, 37(3):629-634.
- [23] CHEN S D, YONG T Q, XIAO C, et al. Pyrrole alkaloids and ergosterols from *Grifola frondosa* exert anti- α -glucosidase and anti-proliferative activities[J]. **Journal of Functional Foods**, 2018, 43:196-205.
- [24] 宋晓芳. 桂花中多酚类成分分析和过氧化麦角甾醇抗肿瘤活性研究[D]. 咸宁:湖北科技学院,2019.
- [25] 庞菲. 灰树花化学成分及抗肿瘤细胞增殖作用研究[D]. 上海:华东师范大学,2010.

(责任编辑:金文苑)