

文章编号:1673-1689(2006)06-0054-04

巴西蘑菇发酵菌丝体醇提物的抑瘤活性

高虹,谷文英*,丁霄霖

(江南大学食品学院,江苏无锡 214036)

摘要:巴西蘑菇深层发酵的菌丝体,用热水提取出水溶性成分(主要是活性多糖)后,残渣用体积分数 85% 的乙醇提取,对乙醇提取物进行了抑瘤活性的研究。体外细胞培养实验表明,菌丝体醇提物对人肝癌细胞 Bel-7402 有一定抑制作用,半抑制浓度(IC_{50})为 $1507\mu\text{g/mL}$ 。体内则显示出了较强的抑瘤效果,腹腔注射(i. p.)每天 10、50、100 mg/kg,对 S180 荷瘤鼠的瘤重抑制率分别为 44.72%、66.50%和 70.49%;灌胃(p. o.)每天 800 mg/kg,对 S180 腹水瘤鼠的生命延长率达到 52.94%。结果表明:巴西蘑菇深层发酵菌丝体的醇提物具有较强的抑瘤作用,其具体的功效成分值得进一步研究。

关键词:巴西蘑菇;菌丝体;醇提物;抑瘤活性

中图分类号:R 979.1

文献标识码:A

Studies on Antitumor Activity of Ethanol Extracts from Liquid-Cultured Mycelium of *Agaricus brasiliensis* sp.

GAO Hong, GU Wen-ying*, Ding Xiao-lin

(School of Food Science and Engineering, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The Basidiomycete fungus, *Agaricus brasiliensis* sp. (*Agaricus blazei* Murill), has traditionally been used as a health food for the prevention of cancer. In this study, The antitumor activity of ethanol extracts from cultivated mycelium was investigated. In vitro analysis revealed that it was directly cytotoxic to human hepatoma cells Bel-7402 at dose more than $1000\mu\text{g/mL}$ and IC_{50} was about $1507\mu\text{g/mL}$. In vivo, intraperitoneal administration (i. p.) of 10~100 mg/kg/day to mice bearing Sarcoma 180 significantly inhibit tumor growth and the inhibition rate of tumor weight reached at 44.72%~70.49%. Oral administration (p. o.) of 800mg/kg/day to mice carrying Sarcoma 180 ascites considerably prolonged their survival time (increase in life span- ILS; 52.94%). These results suggested that the alcohol-soluble fraction from mycelium of *Agaricus brasiliensis* sp. exhibit strong antitumor activity.

Key words: *Agaricus brasiliensis* sp.; mycelium; ethanol extracts; antitumor effect

巴西蘑菇(*Agaricus brasiliensis* sp. 或 *Agaricus blazei* Murill)又名姬松茸,是一种在我国正在大力开发的药食兼用菌。巴西蘑菇具有较高的食

用价值和药用价值,据日本报道其抗癌作用明显优于其他 14 种有抗癌作用的大型真菌,位居抗癌真菌首位^[1]。目前全球有 30~50 万人用它作为预防

收稿日期:2005-09-21; 修回日期:2006-02-22.

作者简介:高虹(19871-),男,湖北武汉人,粮食、油脂与植物蛋白工程博士研究生;*为通讯作者.

癌症或治疗癌症时化疗的辅助药物,更多的人把它作为一种增强免疫,预防各种疾病的功能食品^[2]。用固体培养料栽培巴西蘑菇子实体,产量低,且不稳定。而其发酵菌丝体中的营养成分和药效与子实体的相近,因此用液体发酵生产的菌丝体替代子实体应用于食品和医药领域,已成为一个新的发展方向^[3-5]。

对巴西蘑菇抗癌功效成分的研究,主要集中在水溶性的活性多糖^[6-9]。此外,Kawagishi等人^[10]从巴西蘑菇子实体的丙酮提取物中分离出了4种甾类成分,其中3种对Hela肿瘤细胞有直接杀伤作用;Kaneno等人^[11]对巴西蘑菇子实体正己烷提取物的抗癌活性进行了研究,发现其主要成分是糖类和脂肪酸,能抑制小鼠体内Ehrlich肿瘤生长,增强NK细胞和脾淋巴细胞活性;而对其醇溶性成分,尤其是发酵菌丝体醇提物的活性研究,在国内外目前还是一个空白。

用水提取菌丝体多糖的过程中会产生大量的水提残渣,如果这些残渣不加以合理利用,将会极大增加工业化生产的成本。作者以这些残渣为原料,用体积分数85%乙醇进行再提取得到醇提物,通过体外细胞培养和动物体内活性实验,证实巴西蘑菇菌丝体的醇溶性成分也具有较强的抗癌活性,从而为进一步研究其具体的功效成分奠定基础,并为巴西蘑菇发酵产物的综合利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌丝体 由作者所在实验室筛选、保存的菌种,经深层发酵获得的发酵醪,再经60目筛分离菌丝体与发酵滤液(另作处理),菌丝体用水充分洗涤后60℃烘干,经粉碎机处理后过60目筛得菌丝体干粉。

1.1.2 醇提物 菌丝体干粉先用热水提取(90℃,1:20(g:mL)3h),反复提取3次后,残渣烘干,再用体积分数85%的乙醇回流提取(80℃,1:10(g:mL)6h),重复3次,醇提液浓缩、抽滤、真空干燥,得膏状醇提物。

1.1.3 实验动物 昆明种纯系健康小鼠,6周龄,体重18~22g,购自江苏山禾药业;S180腹水瘤小鼠购自上海斯莱克实验动物中心。

1.1.4 细胞 人肝癌细胞Bel-7402由作者所在学校医学系提供。

1.1.5 试剂 MTT[3-(4,5-dimethyliazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium]; Sigma公司产品;RPMI-

1640培养液;Gibco产品;小牛血清;杭州四季清产品;淋巴细胞分离液(FICSO);上海华美生物工程公司生产;二甲亚砜(DMSO);生化级;阿拉伯胶(医药级)。

1.1.6 主要仪器与设备 BIOTECH-5B型5L发酵罐;上海保兴生物设备工程有限公司生产;CO₂培养箱;Harris公司产品;Thermolabsystems Multiskan MK3酶联免疫检测仪;上海雷勃分析仪器有限公司生产。

1.2 方法

1.2.1 体外细胞培养 将人肝癌细胞Bel-7402保存在含体积分数5%CO₂,37℃的培养箱内,在含有10mg/dL小牛血清的RPMI-1640培养液中贴壁生长。用含0.125mg/dL胰蛋白酶和0.01mg/dL EDTA的消化液消化传代处于指数生长的癌细胞,以3×10⁴个/mL密度接种于96孔培养板上,每孔150μL,培养24h后,倾去培养液,然后加入不同质量浓度的巴西蘑菇菌丝体醇提物(先用二甲亚砜溶解,再用培养基稀释到终质量浓度分别为100、200、500、1000、2000μg/mL,并使DMSO浓度≤0.5μg/mL),每个质量浓度5孔重复,每孔加150μL样品,阴性对照组加含0.5μg/mL浓度DMSO的培养液,阳性对照组加0.5μg/mL质量浓度的Doxorubicin(注射用盐酸多柔比星)。培养48h后,每孔加入MTT(5g/L)20μL,继续培养4h,弃去上清液,每孔加入二甲亚砜150μL,平板振荡仪振荡10min,酶联免疫仪570nm波长下检测各孔吸光度A₅₇₀。

按如下公式计算抑制率:

$$\text{抑制率}(\%) = (1 - A_{\text{实验组}} / A_{\text{对照组}}) \times 100$$

1.2.2 体内实体瘤抑瘤实验 抽取腹腔接种S180细胞7~10d的小鼠腹水,用无菌生理盐水稀释成1×10⁷个/mL浓度的瘤细胞悬液,接种0.2mL悬液于健康小鼠右腹沟皮下,随机分组,每组8只,雌雄各半,次日开始注射待测药品,醇提物以5g/dL阿拉伯胶溶液助溶并稀释到所需浓度,每日按低、中、高剂量(每日10、50、100mg/kg)分别腹腔注射给药一次,连续10d,阴性对照组每日给予等量5g/dL阿拉伯胶无菌溶液,阳性对照组给予用无菌生理盐水稀释的环磷酰胺(CTX)。于第21天颈椎脱臼处死动物,剥离瘤块,称重,按下式计算肿瘤抑制率:

$$\text{瘤重抑制率}(\%) = (1 - C/T) \times 100$$

其中C为阴性对照组平均瘤重(mg),T为各试验组平均瘤重(mg)

同时取脾脏和肝脏,称重,比较对免疫器官的影响。

脾脏指数=脾重/体重(mg/g)

1.2.3 体内腹水瘤生命延长率实验 选择接种 S180 后 5 d 的小鼠,消毒腹部皮肤,用无菌空针抽取腹水,生理盐水稀释,台盼蓝染色后用血球计数板在显微镜下计数,计算存活率,稀释细胞悬液使活细胞数达到 1×10^7 个/mL,每只小鼠腹腔注射 0.2 mL 细胞悬液。次日开始灌胃(p. o.),治疗组每天灌胃 800 mg/kg(醇提物以 5 g/dL 质量浓度阿拉伯胶溶液助溶稀释到所需浓度),连续 14 d,对照组灌以等量 5 g/dL 阿拉伯胶无菌溶液。观察小鼠的死亡情况,计算每组小鼠的平均生存时间和生命延长率。

小鼠生命延长率(%)=(给药组小鼠平均存活天数/空白对照组平均存活天数)-1

1.2.4 数据分析 实验数据以 $\bar{x} \pm S$ 表示,实验结果采用 SAS v8.0 软件进行方差分析和多重比较。

2 结果与讨论

2.1 体外对人肝癌细胞 Bel-7402 生长的抑制作用

在实验室的前期工作中,已经证明菌丝体热水提取的水溶性粗多糖在体外对人肝癌细胞 Bel-7402 具有显著的细胞毒作用^[5]。在检测菌丝体醇提物的体外活性时,也用人肝癌细胞 Bel-7402 作为对象。但因醇提物不易溶于水,因此先用二甲亚砜溶解,再用培养液稀释到所需浓度。DOX(注射用盐酸多柔比星)是一种可用于治疗肝癌的化疗药物(曾用名阿霉素),本实验用做阳性对照来比较观察菌丝体醇提物体外对肝癌 Bel-7402 细胞的直接作用效果。结果见表 1。

结果表明,其抑制肿瘤细胞增殖的活性与质量浓度呈一定的依赖关系,但是只有在质量浓度大于 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 时,才显现较强的活性,经计算其半抑制浓度(IC_{50})为 1 507 $\mu\text{g/mL}$ 。这与水溶性粗多糖(IC_{50} 为 99.8 $\mu\text{g/mL}$ ^[12])相比差别很大。表明菌丝体醇提物在体外的细胞毒作用只有在较高浓度的情况下才能表现出来,对癌细胞的直接杀伤作用可能并不是它抑瘤作用的主要机制。

2.2 体内实体瘤抑瘤实验

由于在体外的抑瘤活性实验中,菌丝体醇提物并没有显现很强的抗癌活性。我们又进行了动物活体(*in vivo*)实验。目前临床上常用的抗肿瘤药大多经动物移植性肿瘤筛选而发现的。按照我国

目前的条件和情况,从天然产物中寻找新抗肿瘤药物可选用 S180 实体型、艾氏实体型、Lewis 肺癌、败血病 L1210 和 P358、黑色素瘤、肝癌腹水或实体型等动物模型进行筛选^[13],结合本实验条件,首先选择 S180 实体瘤模型对巴西蘑菇菌丝体醇提物的体内抗肿瘤活性进行筛选。由于醇提物不溶于水,可用 5 g/dL 阿拉伯胶混匀后进行注射(必要时超声助溶)。

表 1 巴西蘑菇菌丝体醇提物对 Bel-7402 的抑制作用

Tab. 1 Inhibitive effects of *Agaricus brasiliensis* sp. ethanol extracts on Bel-7402 in vitro

组别	质量浓度/ ($\mu\text{g/mL}$)	A_{570} ($\bar{x} \pm S$)	抑制率 IR/%
空白对照组	—	0.536 $\pm$ 0.031 ^a	—
注射用盐酸多柔比星	0.5	0.161 $\pm$ 0.007 ^d	69.96
醇提物	100	0.571 $\pm$ 0.021 ^a	-6.53
	200	0.455 $\pm$ 0.018 ^{ab}	15.11
	500	0.431 $\pm$ 0.015 ^b	19.59
	1 000	0.319 $\pm$ 0.007 ^c	40.49
	2 000	0.213 $\pm$ 0.026 ^d	60.26

注:同一列标有相邻不同字母者表示差异显著($P < 0.05$),标有不相邻不同字母者表示差异极显著($P < 0.01$)。

巴西蘑菇菌丝体醇提物对 S180 小鼠的瘤重抑制率及荷瘤鼠免疫器官的影响见表 2。

由表 2 可见,中高剂量组的肿瘤抑制率高达 60%以上,都高于化疗药物环磷酰胺(抑瘤率为 51.79%),剂量也相差不大。同时,化疗药物环磷酰胺(CTX)的抗肿瘤效果虽然较高,但对小鼠的肝脏和脾脏等免疫器官抑制作用较大,也就是说环磷酰胺在发挥抗肿瘤作用的过程中同时对机体的免疫力有较大的破坏,导致体重异常下降,免疫器官受损。而本实验中的菌丝体醇提物在发挥抗肿瘤作用过程中,小鼠机体的脾脏指数和肝重均未有降低(与对照组比),体重也较正常,中剂量组的免疫力甚至有了一定提高。

2.3 体内腹水瘤生命延长率实验

筛选肿瘤药物的给药途径应与推荐临床用药的途径相同,一般初筛时均用腹腔注射(*i. p.*),静脉给药者可用腹腔注射代替,口服可用灌胃的方法^[14]。为检验菌丝体醇提物口服的效果,作者进行了腹水瘤小鼠灌胃(p. o.)实验,以生命延长率作为衡量指标。结果显示:对照组小鼠平均存活天数为(11.9 $\pm$ 3.2) d,治疗组(p. o., 800 mg/kg/d)小鼠平均存活天数为(18.2 $\pm$ 2.4) d,生命延长率为

52.94%。表明口服也有抗癌效果,从而为开发成 保健食品或口服抗癌药物提供了依据。

表 2 巴西蘑菇菌丝体醇提物对小鼠 S180 移植瘤的抗肿瘤效果及对荷瘤鼠免疫器官的影响

Tab. 2 Antitumor activity of *Agaricus brasiliensis* sp. ethanol extracts against S₁₈₀ in mice and effects on immuno organs in mice bearing S180

组别	给药途径	每日剂量/(mg/kg)	平均增重/g	平均肝重/g	脾指数/(mg/g)	平均瘤重/mg	抑瘤率/%
空白对照组	腹腔注射	0	11.21 ^a	1.77±0.32 ^a	8.58±0.64 ^a	1203±76 ^a	/
低剂量组	腹腔注射	10	10.68 ^a	1.99±0.59 ^{ab}	9.84±0.96 ^{ab}	665±24 ^c	44.72
中剂量组	腹腔注射	50	10.52 ^a	2.26±0.67 ^b	11.50±1.33 ^b	403±39 ^d	66.5
高剂量组	腹腔注射	100	9.42 ^{ab}	1.94±0.15 ^{ab}	8.65±1.01 ^a	355±40 ^d	70.49
环磷酰胺	腹腔注射	40	6.81 ^c	1.41±0.19 ^b	6.76±0.74 ^b	580±56 ^c	51.79

注:同一列标有相邻不同字母者表示差异显著($P<0.05$),标有不相邻不同字母者表示差异极显著($P<0.01$)。

3 结 论

动物体内活性实验证明:巴西蘑菇菌丝体醇提物具有较强的抑瘤活性。从其对免疫器官的影响来看,虽然有一定增强免疫的效果,但作用并没有多糖那么强,增强免疫可能并非其起抗肿瘤功效的主要途径。体外细胞培养显示:在质量浓度大于

1 000 $\mu\text{g/mL}$ 时,才有较强的抑瘤活性,也说明菌丝体醇提物的抗肿瘤作用主要不是对肿瘤细胞的直接杀伤。因此,其抑瘤活性的机理有待进一步研究。同时,巴西蘑菇菌丝体的醇提物是一个粗的混合物,有必要对其进行分级纯化,以弄清起抑瘤作用的具体的功效成分。

参考文献:

[1] 近藤贤. 巴西蘑菇与癌症[M]. 刘雪卿译. 台湾:正义出版社,1998.

[2] Takeshi Takaku, Yoshiyuki Kimura, hiromichi Okuda. Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* murill and its mechanism of action[J]. *J Nutr*, 2001, 131:1409—1413.

[3] 沈爱英. 姬松茸子实体与菌丝体营养成分比较[J]. *食用菌*, 2002, 4:7—9.

[4] Takashi Mizuno. Medicinal properties and clinical effects of culinary-medicinal mushroom *Agaricus blazei* murill (agaricomycetidae) (Review) [J]. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2002, 4:299—312.

[5] Wasser S P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 60:258—274.

[6] Mizuno T, Hagiwara T, Nakamura T, et al. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from “Himematsutake”, the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill[J]. *Agric Biol Chem*, 1990, 54(11):2889—2896.

[7] Ito H, Shimura K, Kawase M, et al. Antitumor effects of a new polysaccharides-protein complex (ATOM) prepared from *Agaricus blazei* (Iwade Strain 101) “Himematsutake” and its mechanisms in tumors-bearing mice [J]. *Anticancer Research*, 1997, 17:277—284.

[8] Mizuno M, Minato K, Ito H, et al. Anti-tumor polysaccharide from the mycelium of liquid-cultured *Agaricus blazei* Murill[J]. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 1999, 47(4):707—714.

[9] Leifa Fan, Andrea Thomz Soccol, Ashok Pandey, et al. Production of polysaccharide by culinary-medicinal mushroom *Agaricus brasiliensis* LPB03 (Agaricomycetidae) in submerged fermentation and its antitumor effect [J]. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2003, 5:17—23.

[10] Kawagishi H, Katsumi R, Mizuno T, et al. Cytotoxic steroids from the mushroom *Agaricus blazei*[J]. *Phytochemistry*, 1988, 27(9):2777—2779.

[11] R Kaneno, L M Fontanaria, S A Santosb, et al. Effects of extracts from brazilian sun-mushroom (*Agaricus blazei*) on the NK activity and lymphoproliferative responsiveness of ehrlich tumor-bearing mice[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2004, 42: 909—916.

[12] 姜荷. 姬松茸深层发酵菌丝体中抗肿瘤、免疫活性多糖的研究[D]. 无锡:江南大学, 2005. 6.

[13] 韩锐. 抗癌药物研究与实验技术[M]. 北京:北京医科大学协和医科大学联合出版社, 1997.

[14] 廖子君. 现代肿瘤治疗药理学[M]. 西安:世界图书出版社西安公司, 2002.

(责任编辑:杨 萌)