

# 马勃多糖提取及体外抗肿瘤研究

赵友生<sup>a,b</sup>, 王进平<sup>a,b</sup>, 宋爱荣<sup>a</sup>, 王宁宁<sup>a,b</sup>, 韩志建<sup>a,b</sup>, 孙晓波<sup>b\*</sup> (青岛农业大学, a.山东省应用真菌重点实验室; b.化学与药学院, 山东 青岛 266109)

**摘要:** 目的 研究马勃子实体多糖的最佳提取条件及其体外抗肿瘤作用。方法 通过单因素及正交试验确定热水浸提法提取马勃多糖(CGP)的最佳提取工艺条件。利用 MTT 法研究马勃多糖对宫颈癌细胞(Siha)和乳腺癌细胞(MDA)体外增殖的抑制作用。结果 通过正交试验确定 CGP 的最佳提取条件为提取时间: 1.5 h、提取次数: 2 次、提取温度: 100 °C、料液比: 1:15; 体外肿瘤细胞增殖抑制实验结果显示: 马勃醇沉多糖在 250  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时对 Siha 细胞具有最高抑制率达到 52.6%; 醇溶多糖在 250  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时对 MDA 的抑制率达到 80.4%。结论 在最佳提取条件下马勃多糖热水浸提的得率为:

---

基金项目: 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金(BS2011NY008)

作者简介: 赵友生, 男, 硕士生 Tel: 13583247227 E-mail: zyszhu@126.com \*通信作者: 孙晓波, 女, 博士, 副教授 Tel: (0532)86080327 E-mail: jpwang@qau.edu.cn

1.792%；马勃多糖对 Siha 及 MDA 肿瘤细胞具较好的抑制作用。

关键词：马勃；多糖；提取；抗肿瘤

中图分类号：R284.2；R285.5

文献标志码：B

文章编号：1007-7693(2012)07-0574-05

## Polysaccharide Extraction from *Calvatia Gigantea* and its *in Vitro* Anti-tumor Activity

ZHAO Yousheng<sup>a,b</sup>, WANG Jinping<sup>a,b</sup>, SONG Airong<sup>a</sup>, WANG Ningning<sup>a,b</sup>, HAN Zhijian<sup>a,b</sup>, SUN Xiaobo<sup>b\*</sup> (Qingdao Agricultural University, a.Shandong Provincial Key Laboratory of Applied Mycology; b.College of Chemistry and Pharmaceutical Sciences, Qingdao 266109, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To study the optimal conditions for polysaccharide(CGP) extraction from fruiting bodies of *Calvatia gigantea*. **METHODS** First, the single factor and orthogonal tests were used to find the optimum conditions for polysaccharide extraction by hot water. Then, the proliferation inhibition effects on Cervical cancer cells (Siha) and breast cancer cells(MDA) *in vitro* were tested by MTT method. **RESULTS** Based on the single factor and orthogonal tests, the optimum extraction conditions were: extraction time 1.5 h, 2 times, temperature 100 °C and solid-liquid ratio 1 : 15. The *in vitro* experiments showed that the ratio of proliferation inhibition on Siha cells reached 52.6% when the concentration of alcohol precipitation parts was 250 μg·mL<sup>-1</sup>. Moreover, alcohol-soluble components had inhibition ratio of 80.4% for MDA cells. **CONCLUSION** Under above conditions, the productivity of polysaccharide extracted from fruiting bodies of *Calvatia gigantea* is 1.792%. And CGP has good inhibition effect on proliferations of Siha and MDA cells.

**KEY WORDS:** *Calvatia gigantea*; polysaccharide; extraction; anti-tumor

马勃(*Calvatia gigantea*)为常用真菌类中药,是多种真菌类药物的通称。在生物的多样性中,马勃是一类独特的大型真菌生物,是我国民间常见的用于止血、消肿的药用真菌之一<sup>[1]</sup>。马勃多糖是从马勃中提取的水溶性生物活性物质<sup>[2]</sup>,其细胞毒性小并且容易通过化学手段控制质量<sup>[3]</sup>。近年来马勃多糖在抗菌和抗癌方面的特殊作用,使其备受医药界的关注<sup>[4]</sup>。

目前对于马勃多糖抗肿瘤方面的应用研究还不是很多。王雪芹等<sup>[4]</sup>提取得到的脱皮马勃的次生代谢产物对红白血病细胞 K562 及肺癌细胞 A549 具有很好的抑制作用;孟延发等<sup>[5]</sup>研究发现,从马勃中提取的多糖 PS[III]在 100 μg·mL<sup>-1</sup> 对移植 S-180 肉瘤细胞具有明显的抑制作用,但是对于腹水癌细胞却没有作用;崔磊等<sup>[6]</sup>从马勃中分离得到 6 种小分子化合物以及马勃多糖,体外实验证实这 6 种小分子化合物对 Bel-7402 肺癌细胞及 C6 神经胶质瘤细胞都具有很好的抑制作用,但是马勃多糖对于上述两种细胞都不具有生长抑制作用。

由此可知,马勃多糖对于某些肿瘤细胞具有抑制作用,并具有选择性。为了深入研究马勃多糖的抗肿瘤作用,本实验首先通过单因素及正交试验确定了马勃多糖的最佳提取工艺,并且提取得到了马勃的醇沉及醇溶多糖;然后通过 MTT 法研究马勃粗多糖对于宫颈癌细胞(Siha)及乳腺癌细胞(MDA)的增殖抑制作用。

## 1 实验部分

### 1.1 材料与试剂

马勃子实体(*Calvatia gigantea*)(亳州中药材市场);宫颈癌细胞(Siha)、乳腺癌细胞(MDA)细胞株均购自山东省肿瘤医院;葡萄糖标准品(莱阳市康德化工有限公司 批号:20090324,葡萄糖含量 >99.5%);DMSO(天津市富宇精细化工有限公司);95%乙醇(莱阳市康德化工有限公司)、双氧水(天津市广成化学试剂有限公司)、萘酮(天津市科密欧化学试剂开发中心)、硫酸(莱阳市康德化工有限公司),均为分析纯。

302 型电热鼓风干燥箱(龙口市先科仪器公司);WFZ UV-2000 紫外分光光度计(美国尤尼克公司);KQ-500DE 型超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司);LXJ-II B 大型离心机(上海安亭科学仪器厂);SW-CJ-2FD 医用型净化工作台(苏净集团安泰公司制造);JE2000-S 倒置显微镜(Nikon)。

### 1.2 方法

**1.2.1 葡萄糖标准曲线的绘制<sup>[7]</sup>** 精密称取 105 °C 下干燥至恒重的标准葡萄糖 100 mg,用蒸馏水溶解,并转移至 100 mL 量瓶中,加蒸馏水至刻度,摇匀。准确吸取 0.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 mL 配制好的标准葡萄糖溶液于 10.0 mL 量瓶中,定容,配制成一系列浓度的标准样品。取各浓度的标准葡萄糖溶液各 1.0 mL 加入大试管中,然后再分别在试管中加入 4.0 mL 蒸馏水,冰浴中震荡加

入 0.2% 的萘酚硫酸 10.0 mL, 沸水浴中加热 6 min 后, 取出室温冷却, 测定其 610 nm 处吸光度值。绘制葡萄糖标准曲线, 得到葡萄糖标准曲线的回归方程为:  $A=0.0129C+0.0018$ ,  $r=0.9996$ , 表明葡萄糖在 0.1~1.0 mg·mL<sup>-1</sup> 之间线性关系良好。

**1.2.2 提取液中多糖含量的测定** 准确吸取 1.0 mL 多糖提取液, 加入 10.0 mL 具塞试管中, 加蒸馏水至 10.0 mL。从具塞试管中准确吸取 0.5 mL 样品加入大试管中, 再加入 2.0 mL 蒸馏水及 5.0 mL 0.2% 的萘酚硫酸溶液按上述方法测定其吸光度, 并从回归曲线中求出样品液所对应的葡萄糖溶液的浓度  $C(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$ : 多糖得率  $= (C \times V) / m$ , 其中,  $V$ : 提取液合并后体积(mL);  $m$ : 马勃子实体质量(g)。

**1.2.3 单因素实验** 分别考察提取温度为 40, 60, 80, 100 °C, 提取次数为 2, 3, 4, 5 次, 提取时间 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 h, 料液比为 1:10, 1:15, 1:20, 1:30 时对马勃多糖提取率的影响。

**1.2.4 正交试验** 根据单因素实验, 确定影响马勃多糖提取率的 4 个主要因素为: 提取时间(A)、提取次数(B)、提取温度(C)和料液比(D)。选用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交表进行试验, 因素水平安排见表 1。

表 1 正交试验因素及水平

Tab 1 Orthogonal factors and the levels

水平	提取时间 A/h	提取次数 B/次	提取温度 C/°C	料液比 D/倍
1	0.5	2	60	10
2	1.0	3	80	15
3	1.5	4	100	20

将烘干后的马勃子实体用药材粉碎机粉碎, 各取 50 g, 共 9 份, 分别放入烧杯中, 按表 2 中给出的条件进行提取, 每次提取完成后进行离心, 合并上清液后, 减压浓缩至适当体积, 离心得沉淀, 加入 4 倍体积的 95% 的乙醇进行沉淀, 4 °C 下沉淀 24 h, 离心得醇沉产物(CGPO), 50 °C 下干燥; 将离心所得上清液减压浓缩至小体积后, 50 °C 下烘干, 得醇溶性产物(CGPI)。

**1.2.5 马勃多糖的体外抗肿瘤实验** 取对数生长期的宫颈癌细胞(Siha)和乳腺癌细胞(MDA), 分别制成细胞悬液, 并用 PRIM1640 完全培养液调浓度至  $1 \times 10^5$  个·mL<sup>-1</sup>, 接种于 96 孔培养板。每孔 150 μL, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养 24 h 后, 分别加入 1 000, 500, 250 μg·mL<sup>-1</sup> 的马勃多

糖样品 50 μL, 阳性对照(5-氟尿嘧啶, 5-FU)的浓度为 100 μg·mL<sup>-1</sup> 和阴性对照(蒸馏水), 每个处理设 5 个重复, 继续培养 48 h。用 MTT 比色法测定 570 nm 处的吸光度值以检测细胞增殖, 按以下公式计算细胞生长抑制率:

细胞生长抑制率/% =  $(1 - \text{试验孔 } A_{570} / \text{阴性对照孔 } A_{570}) \times 100\%$

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素实验

通过单因素实验显示, 马勃多糖提取率随料液比的减小首先呈上升趋势, 当料液比为 1:15 时提取率达到最大值 1.273%, 随后随着料液比的减小提取率逐渐下降; 随着温度的升高, 多糖提取率随之增大, 当提取温度达到 100 °C 时, 提取率达到 1.287%; 提取次数的增加多糖提取率会随之升高, 当提取 3 次时提取率达到最高 1.128%, 但随着提取次数的继续增加, 多糖的提取率反而下降。原因可能是, 随着提取次数增加, 提取液的量也随之增大, 浓缩时间变长而造成多糖损失; 随着提取时间的增长, 提取率逐渐降低, 提取时间为 0.5 h 时提取率为 0.997% 达到最高。当提取时间过长, 长时间的高温会对多糖造成损失, 从而降低多糖的提取率。

### 2.2 马勃多糖最佳提取工艺

根据单因素实验结果, 建立了正交试验表, 测定了提取时间、提取次数、提取温度和料液比对多糖得率的影响, 结果见表 2。

表 2 马勃多糖提取条件正交试验结果

Tab 2 Extraction of polysaccharides orthogonal test results

序号	提取时间 A/h	提取次数 B/次	提取温度 C/°C	料液比 D/倍	多糖 得率/%
1	0.5	2	60	10	0.038 5
2	0.5	3	80	15	1.194 2
3	0.5	4	100	20	1.627 0
4	1	2	80	20	0.769 2
5	1	3	100	10	1.119 2
6	1	4	60	15	0.161 5
7	1.5	2	100	15	1.350 0
8	1.5	3	60	20	0.161 5
9	1.5	4	80	10	0.615 4
均值 1	0.953	0.719	0.120	0.591	
均值 2	0.683	0.825	0.860	0.902	
均值 3	0.709	0.801	1.365	0.853	
极差	0.270	0.106	1.245	0.311	

表 3 方差分析表

Tab 3 Analysis of variance

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性 P
提取时间	0.133	2	0.199	4.46	>0.05
提取次数	0.018	2	0.027	4.46	>0.05
提取温度	2.352	2	3.524	4.46	>0.05
料液比	0.167	2	0.250	4.46	>0.05
误差	2.670	8			

根据表 2 极差大小分析可知,影响马勃多糖提取率的因素从大到小分别为:提取温度>料液比>提取时间>提取次数,由表 3 可知,各因素及水平之间没有显著性差异。通过直观性分析可知,马勃多糖的最佳提取工艺为:A1B2C3D2,即:提取时间 0.5 h、提取次数 3 次、提取温度 100 ℃、料液比 1:15。根据所得的最佳提取条件进行验证实验,提取率为 1.792%提取率较高。

### 2.3 体外抗肿瘤实验

**2.3.1 马勃多糖对宫颈癌细胞 Siha 的抑制作用**  
CGP0, CGP1 对宫颈癌细胞(Siha)都有抑制作用,并且 CGP0 对它的抑制率随着浓度的降低而逐渐升高。在浓度为 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  及 250  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时对 Siha 的抑制率分别为:47.6%和 52.6%要高于阳性对照 5-FU 对细胞生长的抑制率 39.98%。CGP1 对 Siha 的抑制率在 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时最大,抑制率为 25.84%。结果见图 1。

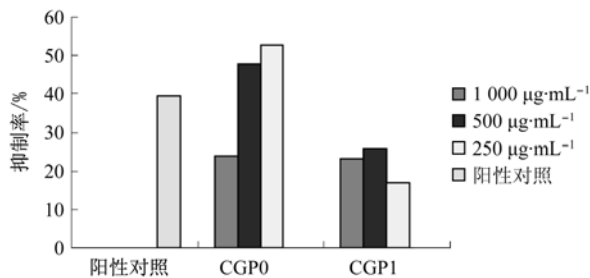


图 1 CGP0、CGP1 对宫颈癌细胞(Siha)的抑制率

Fig 1 CGP0, CGP1 on the inhibition rate of cervical cancer cells (Siha)

**2.3.2 马勃多糖对 MDA 肿瘤细胞的生长抑制作用**  
与对 Siha 细胞的抑制作用相比,CGP0 和 CGP1 对 MDA 肿瘤细胞均有较高的抑制率,CGP1 在高剂量和低剂量时的抑制率分别为:78.56%和 84.05%与阳性对照的抑制率 80.82%非常接近。CGP0 随对 MDA 细胞的抑制率呈剂量依赖性,随着多糖浓度的降低,对细胞的抑制率也降低,当浓度为 1 000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时抑制率最高为 65.95%。结

果见图 2。

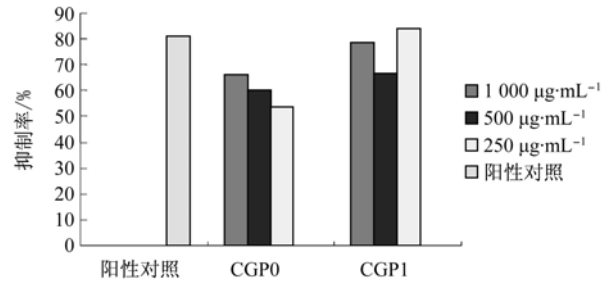


图 2 CGP0、CGP1 对乳腺癌细胞(MDA)的抑制率

Fig 2 CGP0, CGP1 on the inhibition rate of breast cancer cells (MDA)

### 3 结论

#### 3.1 最佳提取条件的确定

由于马勃中多糖含量很低,最佳提取条件下最大提取率仅为 1.792%。高温能最大程度地提取马勃子实体胞内多糖,但长时间高温提取可能会破坏马勃多糖的结构从而降低提取率。由此,本实验通过单因素试验确定了影响马勃子实体粗多糖提取的 4 个主要因素,正交试验进一步得到最佳提取条件为:提取时间:0.5 h、提取次数:3 次、提取温度:100 ℃、料液比:1:15。

#### 3.2 马勃多糖抗肿瘤作用研究

虽然马勃醇沉多糖及醇溶多糖对于所选的两株肿瘤细胞都具有良好的抑制作用,但是醇沉多糖对 Siha 的抑制作用要高于醇溶多糖,抑制率可高达 52.6%,而醇溶多糖仅为 25.84%;相反对于 MDA 细胞,醇溶多糖的抑制作用要明显高于醇沉多糖。醇溶多糖的最高抑制率为 84.05%,而醇沉多糖仅为 65.95%。所以,马勃多糖对于不同的肿瘤细胞株的抑制作用具有选择性。同时马勃多糖对本实验中的两株肿瘤细胞的高抑制率表明它们对于其他肿瘤细胞株也可能具有很好的抑制作用,由此,马勃多糖在抗肿瘤方面的应用还有待于进一步研究。

### REFERENCES

- [1] ZHAO H Z, XU Y, FU X Y, et al. The progress of food and medical on values of puff-balls [J]. Microbiology(微生物学通报), 2007, 34(2): 367-369.
- [2] WANG X Q. The study on secondary metabolites of *Lasiosphaera fenzlii* Reich and antitumor activity *in vitro* [D]. Ji'nan: Sandong University, 2007.
- [3] HUANG K, LI Z X, DENG Y K, et al. Isolation, purification and characterization of polysaccharides from *Calvatia gigantea* [J]. West China J Pharm Sci(华西药科学杂志), 2008, 23(5): 516-518.

- [4] WU C L, MENG Y F. Analysis of monosaccharides from *Calvatia gigangea* by gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Changzhi Medical College(长治医学院学报), 2009, 23(4): 254-259.
- [5] KAHLOS K. Occurrence of some compounds in *Lycoperdon pyriforme* [J]. Planta Med, 1989, 55(4): 621-625.
- [6] CUI L, SONG S L, SUN L R. Chemical and bioactive study on *Lasiospharea fenzlii* Reich [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2006, 29(7): 703-705.
- [7] DING L Q, LIU L, XU D S. Anthrone-sulfuric acid colorimetric methods for determination of total sugar content in the extract of *Rehmannia glutinosa* Libosch [J]. Shanghai Med Pharm J(上海医药), 2008, 29(8): 368-369.

收稿日期: 2011-09-29