

# 桦褐孔菌总三萜提取物的纯化及其体外抗肿瘤活性研究<sup>Δ</sup>

邵骏菁<sup>1,2\*</sup>, 杨颖<sup>1</sup>, 马大龙<sup>3</sup>, 吕志强<sup>3</sup>, 田景振<sup>1</sup>, 张晓平<sup>1,4#</sup> (1. 山东中医药大学药学院, 济南 250355; 2. 济宁医学院, 山东济宁 272067; 3. 青岛大学附属医院药品调剂科, 山东青岛 266000; 4. 山东中医药大学青岛中药科学院, 山东青岛 266112)

中图分类号 R943.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)18-2198-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.18.05



**摘要** **目的** 优化桦褐孔菌总三萜提取物的纯化工艺, 考察其纯化物的抗肿瘤活性。**方法** 以桦褐孔菌醇为对照品, 建立桦褐孔菌总三萜的含量测定方法。采用单因素实验筛选大孔吸附树脂种类、上样体积、上样液质量浓度、上样流速、洗脱剂体积分数、洗脱剂用量、洗脱流速, 确定并验证该粗提物的纯化工艺。通过细胞增殖实验、迁移实验、流式细胞术和AO/EB试剂盒检测桦褐孔菌总三萜纯化物对人宫颈癌细胞HeLa增殖、迁移及凋亡的影响。**结果** 桦褐孔菌总三萜粗提物的最佳纯化工艺为: AB-8型大孔吸附树脂, 上样液质量浓度为2.0 mg/mL, 上样体积为140 mL, 上样流速为1.0 mL/min; 洗脱时先用50%的乙醇40 mL除杂, 再用95%的乙醇160 mL洗脱, 洗脱流速为3.0 mL/min。纯化后桦褐孔菌总三萜的质量分数从34.36%升至73.39%。桦褐孔菌总三萜纯化物可抑制HeLa细胞增殖, 半数抑制浓度为184.20 μg/mL; 与对照组相比, 该纯化物可显著抑制HeLa细胞的迁移, 促进其凋亡( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。**结论** 成功优化了桦褐孔菌总三萜提取物的纯化工艺, 该纯化物可抑制HeLa细胞增殖和迁移, 诱导其凋亡。**关键词** 桦褐孔菌总三萜; 纯化; 细胞增殖; 细胞迁移; 细胞凋亡

## Study on the purification technology of total triterpenoid extracts from *Inonotus obliquus* and their anti-tumor activity *in vitro*

SHAO Junjing<sup>1,2</sup>, YANG Ying<sup>1</sup>, MA Dalong<sup>3</sup>, LYU Zhiqiang<sup>3</sup>, TIAN Jingzhen<sup>1</sup>, ZHANG Xiaoping<sup>1,4</sup> (1. School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2. Jining Medical University, Shandong Jining 272067, China; 3. Dept. of Drug Dispensing, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Shandong Qingdao 266000, China; 4. Qingdao Academy of Chinese Medicine, Shandong University of Chinese Medicine, Shandong Qingdao 266112, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To optimize the purification technology of total triterpenoid extracts from *Inonotus obliquus*, and to investigate the anti-tumor activity of its purified products. **METHODS** Using inotodiol as control, the method was established for the content determination of total triterpenoid in *I. obliquus*. The type of macroporous adsorption resin, sample volume, sample concentration, sample flow rate, eluent volume, eluent dosage and elution flow rate were selected by single factor experiments. The purification technology of the crude extract was determined and verified. The effects of total triterpenoid purified from *I. obliquus* on the proliferation, migration and apoptosis of human cervical cancer HeLa cells were detected by cell proliferation test, migration test, flow cytometry and AO/EB kit. **RESULTS** The best purification technology of total triterpenoid crude extracts from *I. obliquus* was as follows: AB-8 macroporous adsorption resin was used; mass concentration of the sample solution was 2.0 mg/mL; sample volume was 140 mL, and the flow rate was 1.0 mL/min; the impurity was removed with 50% ethanol 40 mL, then eluted with 95% ethanol 160 mL, at the elution flow rate of 3.0 mL/min. After purification, mass concentration of total triterpenoid from *I. obliquus* increased from 34.36% to 73.39%. The total triterpenoid of *I. obliquus* could inhibit the proliferation of HeLa cells, and the 50% inhibitory concentration was 184.20 μg/mL. Compared with control group, the purified products could significantly inhibit the migration and promote the apoptosis of HeLa cells ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **CONCLUSIONS** The purification

technology of total triterpenoids extracts from *I. obliquus* is successfully optimized. The purified product could inhibit the proliferation and migration of HeLa cells and induce their apoptosis.

**KEYWORDS** total triterpenoid of *Inonotus obliquus*; purification; cell proliferation; cell migration; cell apoptosis

Δ 基金项目 山东省重点研发计划(重大科技创新工程)(No. 2020CXGC010505, No. 2021CXGC010511)

\* 第一作者 硕士。研究方向: 中药新药研发。E-mail: shaojunjing1@163.com

# 通信作者 讲师, 博士。研究方向: 中药新药研发与炮制原理。E-mail: xia\_opingzhang@126.com

宫颈癌主要由人乳头瘤病毒引起,是一种会严重危害女性健康的生殖系统恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。据统计,宫颈癌的发病率和病死率均居全球第4位,且近年来呈年轻化的趋势<sup>[2]</sup>。中医药在我国肿瘤患者的防治中发挥着重要作用,调查发现,大多数肿瘤患者的诊疗过程都有中医药的参与<sup>[3-4]</sup>。中药治疗具有多途径、多靶点、副作用小等特点,目前已经成为临床治疗肿瘤不可或缺的手段之一<sup>[5-6]</sup>。

桦褐孔菌 *Inonotus obliquus* 为多孔菌科、褐卧孔菌属的药食两用真菌,味微苦、性偏凉,以扶正为主,兼以祛邪,具有益气养血、滋阴生津、疏肝解郁等作用<sup>[7-9]</sup>。动物实验和长期临床实践表明,桦褐孔菌具有良好的抗肿瘤、降血糖和降血脂等药理活性,且尚未发现其明显的不良反应<sup>[10]</sup>。笔者前期已对桦褐孔菌的抗肿瘤谱和抗肿瘤活性部位进行了筛选,发现三萜类成分为其发挥抗肿瘤作用的主要有效部位之一,且对人宫颈癌细胞 HeLa 具有良好的抑制效果,但作用机制尚不清晰<sup>[10]</sup>。此外还发现,桦褐孔菌提取物中总三萜含量较低。基于此,本研究拟先对桦褐孔菌总三萜进行纯化,再对纯化后的总三萜进行抗肿瘤活性探讨,为进一步阐明桦褐孔菌抗肿瘤作用的物质基础及具体机制提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括 UV-6000 型紫外-可见分光光度计(上海元析仪器有限公司),FA2014 型十万分之一电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司),HF90 型 CO<sub>2</sub> 恒温培养箱(上海力申科学仪器有限公司),U-LH100HG 型荧光显微镜(日本 Olmipus 公司),Primaide 型倒置显微镜(日本 Hitachi 公司),Epoch2T 型酶标仪(美国 BioTek 公司)。

### 1.2 主要药品与试剂

桦褐孔菌药材购自神农金康(湖南)原生态茶业有限责任公司,经山东中医药大学药学院张晓平讲师鉴定为真品。桦褐孔菌醇对照品(批号 B50360,纯度 ≥95%)和顺铂对照品(批号 B24462,纯度 ≥98%)均购自上海源叶生物科技有限公司;AB-8 型大孔吸附树脂和 X-5 型大孔吸附树脂(批号分别为 A875381、X875377)均购自上海麦克林生化科技有限公司;D101 型大孔吸附树脂(批号 20200624)购自国药集团化学试剂有限公司;MTT 试剂(批号 EZ6789C126)购自德国 BioFroxx 公司;Annexin V-FITC 流式凋亡检测试剂盒(批号 BMS500FI-100)购

自美国 Invitrogen 公司;AO/EB 试剂盒(批号 BB-4132-100T)购自上海贝博生物科技有限公司;磷酸盐缓冲液(PBS)和二甲基亚砜(批号分别为 21036449、EZ6789C150)均购自兰杰柯科技有限公司。

### 1.3 细胞株

人宫颈癌细胞株 HeLa 购自上海启达生物科技有限公司。

## 2 方法与结果

### 2.1 桦褐孔菌总三萜粗提物的制备

经过前期正交实验,优化出桦褐孔菌总三萜的最佳提取工艺如下:取桦褐孔菌粉末适量,置圆底烧瓶中,加 12 倍量(mL/g,下同)95%乙醇加热回流 2 次,每次 80 min,合并滤液,回收乙醇至无醇味,冷冻干燥得到桦褐孔菌总三萜粗提物,提取率约为 2.136%。

### 2.2 桦褐孔菌总三萜的含量测定

2.2.1 对照品溶液的配制 精密称取桦褐孔菌醇对照品,加无水乙醇配制成质量浓度为 0.16 mg/mL 的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的配制 精密称取桦褐孔菌药材粉末 5 g,按照“2.1”项下方法提取,冷冻干燥至 50 mL,即得。

2.2.3 检测方法 精密量取“2.2.2”项下供试品溶液 50 μL,置 10 mL 具塞试管中,100 °C 下水浴蒸干,加入 0.2 mL 新配制的香草醛-冰醋酸溶液(质量浓度 0.05 g/mL)和 0.8 mL 高氯酸,摇匀,70 °C 下水浴保温反应 15 min,冷却至室温,加乙酸乙酯定容至 5 mL,并利用紫外-可见分光光度计检测其在 550 nm 波长处的吸光度。

2.2.4 方法学考察 按 2020 年版《中国药典》(四部)“分析方法验证指导原则”进行方法学考察。结果显示,桦褐孔菌醇的回归方程为  $Y=0.0589X-0.0632$  ( $R^2=0.9997$ )(式中  $Y$  为吸光度, $X$  为待测物质量浓度),线性范围为 3.20~17.60 μg/mL;精密密度、重复性、稳定性试验的 RSD 分别为 0.71%、1.27%、0.89% ( $n=6$ );平均回收率为 97.82%,RSD 为 2.35% ( $n=6$ )。考察结果均符合《中国药典》规定。

2.2.5 桦褐孔菌总三萜粗提物的含量测定 精密称取“2.1”项下桦褐孔菌总三萜粗提物粉末 2 mg,用无水乙醇溶解并定容至 10 mL,按“2.2.3”项下方法处理后测定吸光度,代入回归方程计算质量浓度,再计算得桦褐孔菌总三萜粗提物中总三萜的含量为 34.36%。

## 2.3 桦褐孔菌总三萜的纯化

2.3.1 大孔吸附树脂的预处理 将大孔吸附树脂用95%乙醇浸泡24 h,然后装柱,用95%乙醇以5 mL/min的流速洗脱至洗脱液澄清,再用蒸馏水洗脱至无醇味即可。

2.3.2 大孔吸附树脂种类的筛选 取预处理后的AB-8型、X-5型、D101型大孔吸附树脂分为7组,分别为单用组、两两等比例混合的联用组以及三者等比例混合的混用组,分别加至具塞锥形瓶中,各加入桦褐孔菌总三萜粗提物溶液20 mL(溶剂为水,质量浓度为2.0 mg/mL,总三萜含量约为0.687 mg/mL,下同),振荡24 h(25 °C、110 r/min,下同),过滤,取续滤液按“2.2.3”项下方法处理后测定吸光度,代入回归方程计算质量浓度。另将过滤后的大孔吸附树脂加至具塞锥形瓶中,加乙醇20 mL,振荡24 h,按上述方法计算其中总三萜的质量浓度。按下列公式计算吸附量、吸附率和解析率(表1): $\text{吸附量} = V(c_0 - c_e)/m$ , $\text{吸附率} = (c_0 - c_e)/c_0 \times 100\%$ , $\text{解析量} = V_1c_1/m$ , $\text{解析率} = V_1c_1/[V(c_0 - c_e)] \times 100\%$ ,式中 $c_0$ 、 $c_e$ 、 $c_1$ 分别为桦褐孔菌总三萜的加入质量浓度、平衡质量浓度、解析后质量浓度, $V$ 和 $V_1$ 分别为吸附液(桦褐孔菌总三萜粗提物溶液)及解析液(乙醇)体积, $m$ 为大孔吸附树脂质量。结果显示,AB-8型大孔吸附树脂的吸附量和吸附率最高,解析率仅略低于X-5型大孔吸附树脂。综合考虑,最终选用AB-8型大孔吸附树脂纯化桦褐孔菌总三萜。

表1 不同类型大孔吸附树脂对桦褐孔菌总三萜吸附、解析的影响

树脂型号	吸附量/(mg/g)	吸附率/%	解析量/(mg/g)	解析率/%
AB-8	2.141	93.47	1.917	89.54
X-5	1.785	77.94	1.611	90.22
D101	1.967	85.88	1.541	78.36
AB-8+X-5	1.864	81.39	1.633	87.58
D101+X-5	1.804	78.77	1.577	87.41
AB-8+D101	2.035	88.84	1.568	77.07
AB-8+X-5+D101	1.884	82.25	1.634	86.74

2.3.3 静态吸附曲线的绘制 精密称取预处理后的AB-8型大孔吸附树脂5 g(湿质量,下同),置具塞锥形瓶中,加桦褐孔菌总三萜粗提物溶液20 mL,振荡24 h进行吸附,每小时测定溶液中桦褐孔菌总三萜的含量,并计算吸附量和吸附率,绘制静态吸附曲线(图1)。图1显示,在吸附5 h后吸附量趋于平衡,最终吸附率为93.48%,表明AB-8型大孔吸附树脂对桦褐孔菌总三萜具有较好的吸附性能,在吸附5 h时基本达到吸附饱和。

2.3.4 动态吸附曲线的绘制 精密称取预处理后的AB-8型大孔吸附树脂25 g,平行7份,湿法装柱(2.0 cm×30 cm,径高比为2:11),用2.0 mg/mL的桦褐孔菌

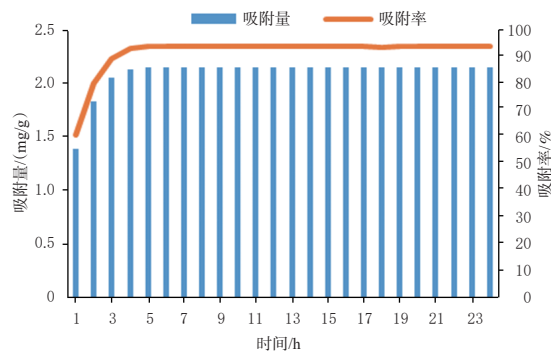


图1 AB-8型大孔吸附树脂对桦褐孔菌总三萜的静态吸附曲线

总三萜粗提物溶液上样,上样速率为1.0 mL/min,每流出20 mL流出液测定1次桦褐孔菌总三萜的质量浓度,绘制动态吸附曲线(图2)。图2显示,第7份流出液中桦褐孔菌总三萜质量浓度为0.063 75 mg/mL,接近初始上样液质量浓度的1/10,即认为吸附饱和<sup>[11]</sup>,故选择上样体积为140 mL。

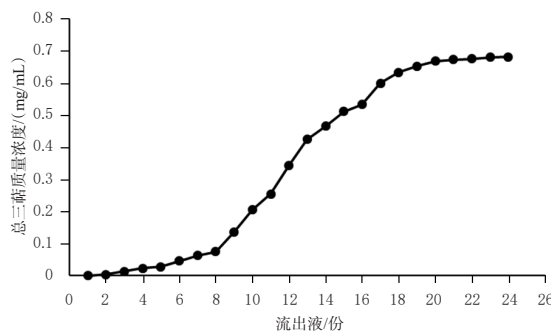


图2 桦褐孔菌总三萜在AB-8型大孔吸附树脂中的动态吸附曲线

2.3.5 上样液质量浓度对动态吸附的影响 同“2.3.4”项下方法装柱,上样速率为1.0 mL/min,上样体积为140 mL,考察不同质量浓度(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 mg/mL)的桦褐孔菌总三萜粗提物上样溶液对吸附率的影响。结果显示,上述上样液的吸附率分别为98.61%、96.55%、95.63%、94.74%、89.38%、74.69%、65.82%,可见当桦褐孔菌粗提物溶液的质量浓度为0.5~2.0 mg/mL时,吸附率均大于90%,考虑到生产周期和成本,最终选择上样液质量浓度为2.0 mg/mL。

2.3.6 上样流速对动态吸附的影响 同“2.3.4”项下方法装柱,用2.0 mg/mL的桦褐孔菌总三萜粗提物溶液上样,上样体积为140 mL,考察不同上样速率(1.0、2.0、3.0、4.0 mL/min)对吸附率的影响。结果显示,上述上样速率下的吸附率分别为93.59%、90.52%、88.21%、84.68%,可见当上样速率为1.0 mL/min时,吸附率最高,最终选择上样流速为1.0 mL/min。

2.3.7 洗脱剂体积分数对洗脱效果的影响 同“2.3.4”项下方法装柱、上样,吸附饱和后用200 mL的7种不同体积分数(20%、30%、40%、50%、60%、75%、95%)的乙醇进行洗脱,测定洗脱液中桦褐孔菌总三萜的质量浓度,按解析率公式计算洗脱率。结果显示,上述体积分数乙醇洗脱液的洗脱率分别为15.27%、19.05%、33.40%、40.14%、57.77%、61.26%、98.16%,可见洗脱率和乙醇体积分数呈正相关。以体积分数<50%的乙醇洗脱后经浓缩冻干得到的固体呈深褐色,可见杂质较多;体积分数为60%和70%的乙醇洗脱率较低;以体积分数为95%的乙醇洗脱后经浓缩冻干得到的固体呈淡黄色,且洗脱率最高。因此本实验最终确定先用50%的乙醇进行洗脱,弃去非目标部分,然后用95%的乙醇进行洗脱,收集目标部分。

2.3.8 洗脱剂用量对洗脱效果的影响 同“2.3.4”项下方法装柱、上样,吸附饱和后先用50%的乙醇40 mL除杂,再用95%的乙醇以1.0 mL/min流速进行洗脱,每流出20 mL洗脱液测定1次洗脱率,考察20~240 mL的95%乙醇对洗脱率的影响。结果显示,第1~12份洗脱液的洗脱率分别为39.94%、15.35%、13.88%、6.42%、6.19%、4.05%、3.33%、2.97%、1.24%、1.09%、0.73%、0.62%,可见第9~12份洗脱液的洗脱率很低,且差异不大,表明此时大孔吸附树脂吸附的总三萜成分已被充分洗脱,故选择洗脱剂用量为160 mL。

2.3.9 洗脱流速对洗脱效果的影响 同“2.3.4”项下方法装柱、上样,吸附饱和后先用50%的乙醇40 mL除杂,再用95%的乙醇160 mL以不同流速进行洗脱,考察1.0、2.0、3.0、4.0 mL/min的流速对洗脱率的影响。结果显示,上述流速下的洗脱率分别为84.67%、87.49%、92.29%、70.12%,可见当流速为3.0 mL/min时,洗脱率最高,故选择流速为3.0 mL/min。

2.3.10 纯化工艺验证 称取同一批桦褐孔菌总三萜粗提物3份,按照最佳纯化工艺条件进行纯化,即选用AB-8型大孔吸附树脂,上样液质量浓度为2.0 mg/mL,上样体积为140 mL,上样流速为1.0 mL/min;洗脱时先用50%的乙醇40 mL除杂,再用95%的乙醇160 mL洗脱,洗脱流速为3.0 mL/min,考察纯化前后桦褐孔菌总三萜粗提物的质量和总三萜质量分数(表2)。表2显示,与纯化前相比,总三萜质量分数明显升高,纯化后总三萜质量分数的RSD为1.05%( $n=3$ ),说明本纯化工艺合理、可行。

表2 桦褐孔菌总三萜粗提物纯化的验证试验结果

序号	纯化前		纯化后			
	质量/mg	总三萜质量分数/%	质量/mg	总三萜质量分数/%	平均值/%	RSD/%
1	280.00	34.36	90.69	72.58		
2	280.00	34.36	94.45	74.12	73.39	1.05
3	280.00	34.36	96.22	73.47		

## 2.4 桦褐孔菌总三萜纯化物的体外抗肿瘤活性研究

2.4.1 供试品溶液的制备 精密称取桦褐孔菌总三萜纯化物适量,置EP管中,加二甲基亚砜涡旋溶解,加RPMI1640细胞维持液稀释至二甲基亚砜的体积分数为0.1%,涡旋混匀,经0.22 μm微孔滤膜过滤,即得供试品溶液,质量浓度为1 mg/mL。

2.4.2 阳性对照药物溶液的制备 精密称取顺铂适量,置EP管中,按“2.4.1”项下方法制成阳性对照药物溶液,质量浓度为0.4 mg/mL。

2.4.3 细胞增殖实验 HeLa细胞经3次传代后,用乙二醇四乙酸-0.25%胰酶消化至游离状态,进行细胞计数,稀释细胞液至 $1 \times 10^6$ 个/mL。将细胞接种于96孔板中,每孔100 μL,培养至细胞铺满孔80%时即可使用。实验设置对照组、顺铂组和桦褐孔菌总三萜组。取上述供试品溶液和阳性对照药物溶液,均二倍比稀释制得8个梯度浓度,然后接种于细胞长至80%以上的96孔板中,培养48 h,每个浓度设6个复孔。采用MTT染色法测定490 nm波长处的光密度,计算得桦褐孔菌总三萜纯化物和顺铂对HeLa细胞的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)分别为184.20、20.10 μg/mL,可见桦褐孔菌总三萜纯化物对HeLa细胞具有一定的抑制作用。

2.4.4 细胞迁移实验 实验设置对照组、顺铂组和桦褐孔菌总三萜低、中、高剂量组,对照组细胞加入含2%胎牛血清和0.5%双抗的RPMI1640培养基,药物组细胞加入含100、150、200 μg/mL供试品溶液(或20 μg/mL阳性对照药物溶液)、2%胎牛血清和0.5%双抗的RPMI1640培养基,每个浓度设3个复孔,采用倒置显微镜分别记录培养0 h和48 h的划痕间距(图3),使用Image J V1.53c软件计算细胞迁移率,并使用GraphPad 8.0.2软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较用LSD检验。结果显示,对照组、顺铂组和桦褐孔菌总三萜低、中、高剂量组的细胞迁移率分别为(43.04 ± 1.60)%、(12.64 ± 0.40)%、(26.99 ± 0.73)%、(16.32 ± 0.34)%、(9.78 ± 0.41)%,RSD分别为3.71%、3.17%、2.72%、2.07%、4.22%( $n=3$ ),可见细胞迁移率随着桦褐孔菌总三萜纯化物质量浓度的升高而降低。与对照组相比,各药物组的细胞迁移率均显著降低( $P < 0.01$ )。

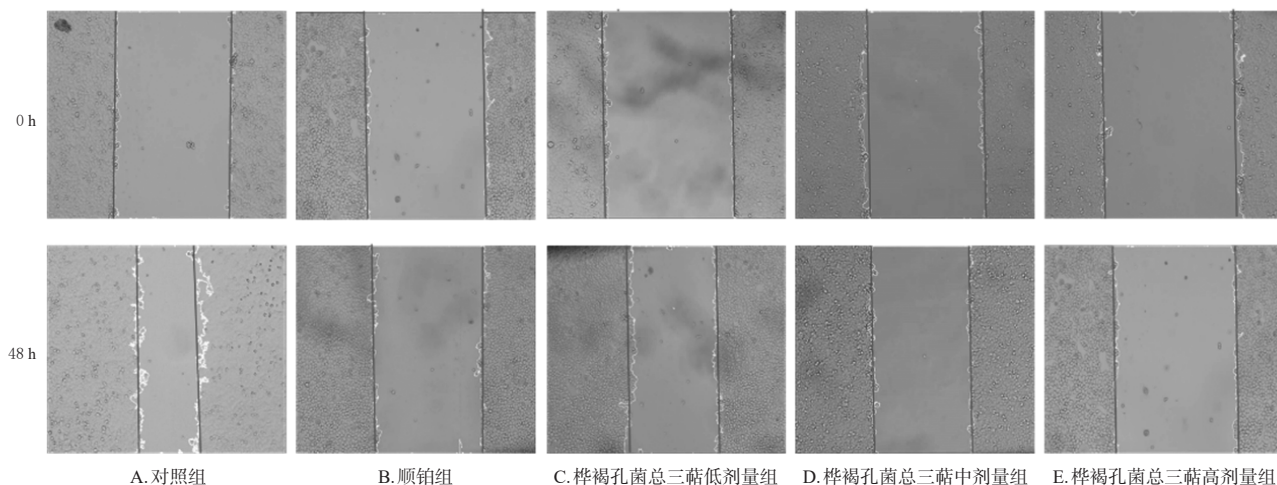


图3 桦褐孔菌总三萜纯化物对HeLa细胞划痕间距的影响( $\times 40$ )

2.4.5 细胞凋亡实验 (1)采用 Annexin V-FITC 流式凋亡检测试剂盒进行检测。按“2.4.4”项下分组、加药,培养 48 h,收集细胞,PBS清洗,重悬计数,参照 Annexin V-FITC 流式凋亡检测试剂盒说明书操作,采用流式细胞仪分析细胞早期、晚期凋亡率(表3、图4)。与对照组相比,各药物组细胞的晚期凋亡率均显著升高( $P < 0.01$ )。

(2)采用 AO/EB 试剂盒进行检测。按“2.4.4”项下分组、加药,培养 48 h,收集细胞,PBS清洗,调整细胞在  $1 \times 10^6$  个以内,参照 AO/EB 试剂盒说明书操作,采用荧光显微镜观察染色结果(图5,绿色为正常活细胞或早期凋亡细胞,橙红色为晚期凋亡细胞),使用 Image J V

表3 桦褐孔菌总三萜纯化物对HeLa细胞凋亡率的影响

组别	Annexin V-FITC		AO/EB( $n=3$ )	
	早期凋亡率/%	晚期凋亡率/%	细胞凋亡率/%	RSD/%
对照组	0.99	2.15	$7.58 \pm 0.21$	2.83
桦褐孔菌总三萜低剂量组	1.29	9.21 <sup>b</sup>	$10.07 \pm 0.34^a$	3.45
桦褐孔菌总三萜中剂量组	1.80	19.14 <sup>b</sup>	$21.29 \pm 0.79^a$	3.72
桦褐孔菌总三萜高剂量组	4.28	60.95 <sup>b</sup>	$66.81 \pm 2.24^a$	3.35
顺铂组	3.97	86.76 <sup>b</sup>	$56.10 \pm 1.44^a$	2.56

a:与对照组相比, $P < 0.05$ ;b:与对照品相比, $P < 0.01$

1.53c 软件进行荧光定量计数,计算细胞凋亡率(表3)。与对照组相比,各药物组的细胞凋亡率均显著升高( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。

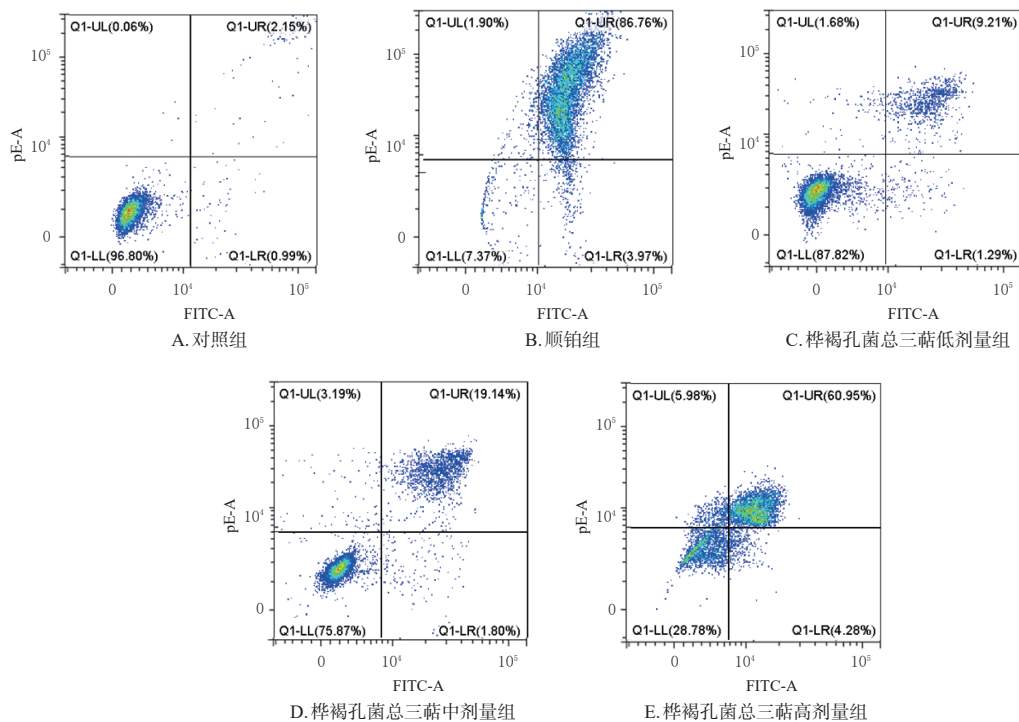


图4 桦褐孔菌总三萜纯化物对HeLa细胞凋亡影响的流式细胞图

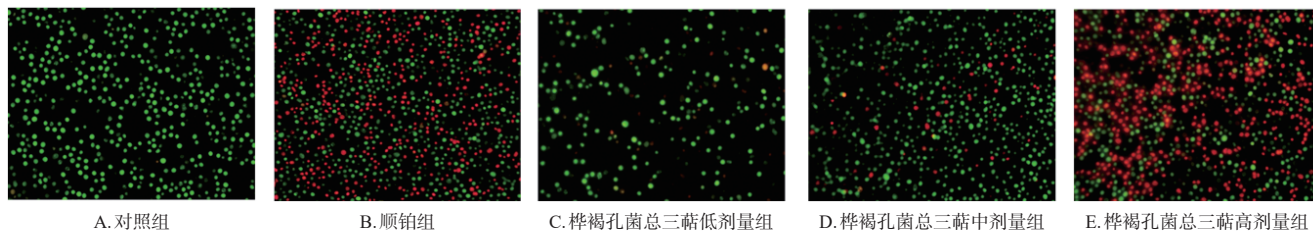


图5 桦褐孔菌总三萜对 HeLa 细胞凋亡影响的荧光染色图( $\times 30$ )

### 3 讨论

目前桦褐孔菌总三萜的纯化手段以大孔吸附树脂纯化为主<sup>[12]</sup>。考虑到总三萜类成分极性较小,因此本实验筛选了 AB-8 型、D101 型、X-5 型 3 种极性较小的大孔吸附树脂。通过对其吸附和解吸能力进行考察,最终选用 AB-8 型大孔吸附树脂进行桦褐孔菌总三萜纯化。经过单因素实验考察,筛选出最佳纯化工艺为:AB-8 型大孔吸附树脂,上样液质量浓度为 2.0 mg/mL,上样体积为 140 mL,上样流速为 1.0 mL/min;洗脱时先用 50% 的乙醇 40 mL 除杂,再用 95% 的乙醇 160 mL 洗脱,洗脱流速为 3.0 mL/min。

笔者前期实验研究发现,三萜类成分是桦褐孔菌抗肿瘤的有效活性部位之一,对肝癌细胞 HepG2、宫颈癌细胞 HeLa、黑色素瘤细胞 A375、胃癌细胞 AGS、乳腺癌细胞 T47D 均具有良好的抑制效果,其中对 HeLa 细胞的抑制效果最优。因此本实验采用 HeLa 细胞作为体外实验研究对象,观察桦褐孔菌总三萜纯化物的抗肿瘤活性。结果显示,桦褐孔菌总三萜纯化物可抑制 HeLa 细胞增殖和迁移,促进其凋亡,主要促进肿瘤细胞晚期凋亡。

综上所述,本研究建立了桦褐孔菌总三萜提取物的纯化工艺,其纯化物可抑制 HeLa 细胞增殖和迁移,促进其凋亡。但是其诱导凋亡的具体机制尚不清楚,下一步仍需深入研究。

### 参考文献

[1] ROSALIK K, TARNEY C, HAN J. Human papilloma virus vaccination[J]. Viruses, 2021, 13(6): 1091.  
 [2] 夏璇,李丹,程琳,等.宫颈癌患者生存质量的研究进展

[J].上海护理,2021,21(2):45-49.

[3] MA Y, ZHOU K H, FAN J, et al. Traditional Chinese medicine: potential approaches from modern dynamical complexity theories[J]. Front Med, 2016, 10(1): 28-32.  
 [4] XU Q H, BAUER R, HENDRY B M, et al. The quest for modernisation of traditional Chinese medicine[J]. BMC Complement Altern Med, 2013, 13: 132.  
 [5] 潘祥龙,郝二伟,杨雪,等.瑶药钻类药材化学成分抗肿瘤作用的研究进展[J].中国药房,2020,31(19):2426-2432.  
 [6] 罗亚娟,岳红梅,何含含.中药在抗肿瘤综合治疗中的作用[J].东南大学学报(医学版),2016,35(2):289-291.  
 [7] 戴玉成,李玉.中国六种重要药用真菌名称的说明[J].菌物学报,2011,30(4):515-518.  
 [8] 杨珺尧,孟利.桦褐孔菌及其药理作用研究进展[J].食用菌,2021,29(3):202-207.  
 [9] 张文彭,ZHANG Y.桦褐孔菌的中医性味功效探析[J].国际中医中药杂志,2019(6):655-659.  
 [10] WANG Y, GUO L, LIU C, et al. Isolation of potential  $\alpha$ -glucosidase inhibitor from *Inonotus obliquus* by combining ultrafiltration-liquid chromatography and consecutive high-speed countercurrent chromatography [J]. Anal Methods, 2021, 13(7): 918-924.  
 [11] 冯宇,刘雪梅,罗伟生,等.大孔树脂纯化荔枝核总黄酮工艺研究[J].中草药,2019,50(9):2087-2093.  
 [12] 柯春山,吴少福,彭鹏,等.大孔树脂纯化裸花紫珠总三萜工艺研究[J].江西农业大学学报,2021,43(5):1178-1187.

(收稿日期:2022-03-23 修回日期:2022-08-25)

(编辑:邹丽娟)