

网络出版时间: 2016-8-10 11:04:48 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160810.1104.016.html>

◇ 药学研究 ◇

桦褐孔菌抗肿瘤活性部位的筛选及化学成分研究

吴 昆¹ 程文明^{1,2} 李春如³ 吴泽华¹ 张 勋¹ 陆维丽¹ 李 俊¹

摘要 目的 研究桦褐孔菌抗肿瘤活性部位及化学成分。方法 将桦褐孔菌乙醇提取物(FT)、石油醚萃取物(FA)、乙酸乙酯萃取物(FB)、正丁醇萃取物(FC)以及水层萃取物(FD)作用于人肝癌 HepG2、胃癌 SGC-7901 及肺癌 A549 细胞,检测各提取部位对肿瘤细胞的生长抑制活性,并进一步对活性部分进行化学成分研究。结果 活性数据分析表明 FT、FA 及 FB 均有抑制肿瘤活性,IC₅₀ 值分别为 56、28、47 mg/L。从活性部位 FA 及 FB 分离得到 10 个化合物,分别鉴定为羊毛甾醇(1)、3 β -羟基 8,24-羊毛甾二烯-21-醛(2)、桦褐孔菌醇(3)、白桦脂醇(4)、5 α ,8 α -表-二氧-6,22-麦角甾二烯-3-醇(5)、4,6,8(14),22-麦角甾四烯-3-酮(6)、豆甾-4-烯-3-酮(7)、Inonotsuoxides B(8)、Inonotsutriols A(9)、胡萝卜苷(10)。结论 FA 及 FB 是桦褐孔菌的抗肿瘤活性部位,从活性部位分离鉴定 10 个化合物,其中 6、7、10 首次在桦褐孔菌中发现。

关键词 桦褐孔菌; 抗肿瘤活性; 活性部位; 三萜; 甾醇; 化学成分

中图分类号 R 284.2; Q 939.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)10-1468-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.10.016

桦褐孔菌(*Inonotus obliquus*)是锈革孔菌科(*Hymenochaetaceae*)、褐卧孔菌属(*Fuscoporia*)药用真菌,主要分布在北美、芬兰、波兰、俄罗斯、中国(东北)、日本(北海道)等国家。16~17 世纪以来,东欧国家民间广泛应用该菌防治多种癌症(胃癌、肝癌、

肠癌等)、心脏病和糖尿病^[1]。研究^[2-3]表明,该菌含有多糖、桦褐孔菌素、桦褐孔菌醇、甾醇、吡咯类生物碱及酚类等成分,有抗炎、抗菌、抗病毒、抗癌、抗氧化、降血压、降血糖等药理作用。虽然桦褐孔菌在俄罗斯民间抗肿瘤应用历史悠久,但是其抗肿瘤药效物质基础尚不明确。该实验筛选了桦褐孔菌对人胃癌细胞 SGC-7901、人肝癌细胞 HepG2 及人肺癌细胞 A549 具有明显抑制活性的部位,并对活性部位进行了化学成分分离和鉴定,为进一步探讨该菌药效物质基础及建立质控标准提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 药材与瘤株 桦褐孔菌产自吉林省抚松县,2015 年 1 月购自吉林省抚松县御参坊特产店。由李春如教授鉴定,样品存放在安徽医科大学药学院天然药物化学实验室。人胃癌细胞 SGC-7901、人肝癌细胞 HepG-2 及人肺癌细胞 A549 由安徽医科大学药学院提供。

1.2 仪器与试剂 AVANCE AV400 超导傅立叶变换数字化核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司,内标为四甲基硅烷);6210 TOF LC-MS 液质联用仪(美国 Agilent 公司);BT253 型电子天平(德国 Sartorius 公司);IKA RV10 数显型旋转蒸发仪(德国 IKA 公司);LDZX-40KB 立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂);2306-Z CO₂ 培养箱(美国 Shellab 公司);NIB-100 倒置显微镜(浙江宁波光学股份有限公司);uQuant 全波长酶标仪(美国 Biotek 公司)。

柱色谱硅胶(青岛海洋化工厂);薄层色谱 GF254 硅胶板(烟台江友硅胶开发有限公司);Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶(美国 GE 医疗生命科学公司);甲醇、氯仿、石油醚、正丁醇、乙酸乙酯(西陇化工股份有限公司,均为分析纯);RPMI-1640 培养基(美国 Thermo Fisher 生物制品公司);胎牛血清(杭州四季青生物材料研究所);DMSO、MTT(美国 Sigma 公司);PBS(武汉博士德生物科技有限公司);胰酶(上海碧云天生物技术有限公司);5-氟尿嘧啶(5-FU)(上海汉博生物科技有限公司)。

2016-06-22 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:090413105);天然药物活性组分与药效国家重点实验室资助项目(编号:SKLNMKF201416)

作者单位:¹安徽医科大学药学院,安徽天然药物活性研究省级重点实验室,安徽省天然药物活性成分工程技术研究中心,合肥 230032

²天然药物活性组分与药效国家重点实验室(中国药科大学),南京 210009

³浙江泛亚生命科学研究院,嘉兴 314200

作者简介:吴 昆 男 硕士研究生;

程文明 女 副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:chengwm919@hotmail.com;

李春如 男 教授,责任作者,E-mail:chunruli@hotmail.com

1.3 方法

1.3.1 抗肿瘤活性测试 取对数生长期的细胞,用 0.25% 胰酶消化后,用含 10% 灭活小牛血清的 RPMI-1640 完全培养液将细胞制成 2×10^4 个/ml 的细胞悬液,加入 96 孔培养板内,每孔加 180 μ l,然后置于细胞培养箱内培养 12 h,待细胞贴壁生长后,分别加入 20 μ l 不同浓度 5 种桦褐孔菌提取物溶液(乙醇提取物-FT、石油醚萃取物-FA、乙酸乙酯萃取物-FB、正丁醇萃取物-FC 和水层萃取物-FD),使各提取物最终浓度为 80、60、40、20、10 mg/ml,同时设置阴性对照组(加 20 μ l RPMI-1640 完全培养液),空白对照组(180 μ l RPMI-1640 完全培养液 + 20 μ l 生理盐水),阳性对照组(5-FU,剂量为 50、10、2、0.4 mg/ml),每组均设 5 个平行孔,细胞培养箱中培养 24、48 及 72 h 后,倒置显微镜下观察药物作用于肿瘤细胞后对其形态的影响,每孔加入 20 μ l 5 g/L MTT 溶液,放入培养箱继续培养 4 h,弃去孔中培养液,每孔加入 150 μ l DMSO,恒温振荡器(30 $^{\circ}$ C)上避光摇匀 10 min,酶标仪 492 nm 测定各孔光密度(optical density, OD)值,按下列公式计算细胞生长抑制率,并计算半数抑制浓度(IC₅₀)值^[3]。

细胞生长抑制率(%) = [(阴性对照组 OD 值 - 实验组 OD 值) / (阴性对照组 OD 值 - 空白组 OD 值)] $\times$ 100%。

1.3.2 提取与分离 取桦褐孔菌药材 10 kg,加 10 倍量的 95% 乙醇,60 $^{\circ}$ C 热提取 4 次,每次 10 h,过滤,合并药液减压浓缩(温度不超过 60 $^{\circ}$ C)药膏至无醇味,得浸膏 FT 550 g。加水适量使其混悬,依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,分别浓缩回收萃取液,得 FA 140 g、FB 220 g、FC 170 g 和 FD 120 g。对 FA(120 g)进行反复硅胶柱层析,以石油醚-乙酸乙酯 50:1、20:1、10:1、8:1、7:1、6:1 梯度洗脱,TLC 跟踪,相同流分合并,得到 6 个部分(FA1~FA6),FA2 经反复硅胶柱色谱(石油醚-乙酸乙酯 125:1、100:1)纯化得到化合物 1(320 mg)、化合物 7(30 mg)。FA3 经石油醚-乙酸乙酯 30:1、20:1、氯仿-乙酸乙酯 100:1、氯仿-乙酸乙酯-冰醋酸 100:1:0.2 得到化合物 2(1 970 mg)。FA4、FA5 静置析出大量白色物质,经减压抽滤,乙酸乙酯重结晶,分别得到化合物 3(570 mg)、化合物 4(87 mg)。FA6 静置析出大量白色固体,减压抽滤,经硅胶柱色谱(氯仿:甲醇 150:1)纯化得到化合物 5(530 mg);FA6 减压抽滤所得液体部分经反复硅胶柱色谱(石油醚-乙酸乙酯 10:1、氯仿-甲

醇 150:1、石油醚-乙酸乙酯 6:1)分离得到化合物 6(63 mg)。对 FB(200 g)进行反复硅胶柱色谱(氯仿-甲醇 100:1~1:1)梯度洗脱,TLC 跟踪,相同流分合并,得到 6 个部分(FB1~FB6)。FB3 经反复硅胶柱色谱(氯仿-甲醇 150:1、石油醚-乙酸乙酯 6:1)分离得到化合物 8(47 mg)。FB4 经硅胶柱色谱(氯仿-甲醇 25:1~1:1)梯度洗脱,得到 5 个部分(FB4-1~FB4-5),FB4-2 经硅胶柱色谱(氯仿-甲醇 60:1)得到 5 个部分(FB4-2-1~FB4-2-5)、FB4-2-3 经反复硅胶柱色谱(氯仿-甲醇 100:1、石油醚-乙酸乙酯-冰醋酸 6:1:0.001)纯化得到化合物 9(80 mg)。FB4-4 经硅胶柱色谱(氯仿-甲醇 1:1)纯化,再经反复 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱(氯仿-甲醇 40:1、20:1)分离得到化合物 10(17 mg)。

1.3.3 化合物结构鉴定 通过分析波谱数据(MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR)、检索天然产物碳谱数据库及查阅文献鉴定化合物结构。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。实验重复 3 次。组间比较采用单因 ANOVA 方差分析,两两比较采用 LSD 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 抗肿瘤活性测试 桦褐孔菌 5 种提取物对 3 株肿瘤细胞的 IC₅₀ 值见表 1。结果表明 FT、FA、FB 对 3 种肿瘤细胞生长有抑制作用,且呈浓度依赖关系;FC、FD 不具抗肿瘤活性。

表 1 5 种提取物及 5-FU 对 3 株肿瘤细胞抑制作用的 IC₅₀ 值($n = 3$ $\bar{x} \pm s$)

提取物	IC ₅₀ (mg/L)		
	HepG2	SGC-7901	A549
FT	56.23 $\pm$ 3.61	39.31 $\pm$ 0.62	39.73 $\pm$ 1.19
FA	28.79 $\pm$ 0.13	14.87 $\pm$ 0.91	22.45 $\pm$ 1.03
FB	47.88 $\pm$ 0.44	40.43 $\pm$ 2.12	30.88 $\pm$ 1.42
FC	$> 2.7 \times 10^7$	$> 4.58 \times 10^{20}$	$> 4.32 \times 10^{10}$
FD	$> 2.09 \times 10^7$	$> 7.47 \times 10^{11}$	$> 3.43 \times 10^3$
5-FU	6.35 $\pm$ 2.11	5.74 $\pm$ 1.42	4.78 $\pm$ 0.94

2.2 结构鉴定 从活性部位 FA 及 FB 分离得到 10 个化合物,分别鉴定为羊毛甾醇(1)、3 β -羟基 8,24-羊毛甾-21-醛(2)、桦褐孔菌醇(3)、白桦脂醇(4)、5 α ,8 α -表二氧-6,22-麦角甾-2-烯-3-醇(5)、4,6 β (14),22-麦角甾四烯-3-酮(6)、豆甾-4-烯-3-酮(7)、Inonotsuoxides B(8)、Inonotsutriols A(9)、胡萝

卜萜(10) 其中6、7、10 首次在桦褐孔菌中发现。

化合物1 白色针状结晶(丙酮), mp. 140 ~ 141 °C, ESI-MS m/z : 427. 393 4 $[M + H]^+$ 。 1H -NMR(600 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.68(3H, s, H-28) 0.81(3H, s, H-18) 0.86(3H, s, H-30) 0.91(3H, d, J = 6.1, H-21) 0.97(3H, s, H-49) 0.99(3H, s, H-29) 1.60(3H, brs, H-26) 1.68(3H, brs, H-27) 3.23(1H, dd, J = 11.6 and 2.5 Hz, H-3) 5.09(1H, t, J = 6.5 Hz, H-24)。 ^{13}C -NMR 数据及归属见表2。以上数据均与文献^[4]对照基本一致, 故确定化合物1 为羊毛甾醇。

化合物2 白色针状结晶(丙酮), mp. 145 ~ 146 °C, ESI-MS m/z : 441. 372 7 $[M + H]^+$ 。 1H -NMR(600 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.67(3H, s, H-48) 0.79(3H, s, H-28) 0.88(3H, s, H-30) 0.94(3H, s, H-29) 0.98(3H, s, H-49) 1.57(3H, s, H-27) 1.67(3H, s, H-26) 3.19 ~ 3.23(1H, m, J = 4.5 Hz, H-3) 5.1(1H, t, J = 6.9 Hz, H-24) 9.4(1H, d, J = 5.1 Hz, H-21)。 ^{13}C -NMR 数据及归属见表2。以上数据与文献^[4]对照基本一致, 故确定化合物2 为3 β -羟基8, 24-羊毛甾二烯-21-醛。

化合物3 白色针状结晶(甲醇), mp. 182.1 ~ 182.7 °C, ESI-MS m/z : 443. 388 4 $[M + H]^+$ 。 1H -NMR(600 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.71(3H, s, H-28) 0.80(3H, s, H-48) 0.86(3H, s, H-30) 0.93(3H, d, J = 6.5 Hz, H-21) 0.97(3H, s, H-48) 0.99(3H, s, H-29) 1.64(3H, brs, H-26) 1.74(3H, brs, H-27) 3.23(1H, dd, J = 11.6 and 4.3, H-3) 3.65(1H, m, J = 6.3 Hz and 3.2 Hz, H-22) 5.18(1H, t, J = 6.3, H-24)。 ^{13}C -NMR 数据及归属见表2。以上数据与文献^[4]对照基本一致, 故确定化合物3 为桦褐孔菌醇。

化合物4 白色针状结晶(氯仿-甲醇), mp. 236 ~ 238 °C, ESI-MS m/z : 443. 388 3 $[M + H]^+$ 。 1H -NMR(600 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.75(3H, s, CH_3) 0.81(3H, s, CH_3) 0.96(3H, s, CH_3) 0.97(3H, s, CH_3) 1.01(3H, s, CH_3) 1.68(3H, s, CH_3) 3.18(1H, dd, J = 11.4 and 4.4 Hz, H-3) 3.33(1H, d, J = 10.8 Hz, H-28a) 3.8(1H, d, J = 10.8 Hz, H-28b) 4.58(1H, brs, H-29a) 4.68(1H, brs, H-29b)。 ^{13}C -NMR 数据及归属见表2。以上数据与文献^[5]对照基本一致, 故确定化合物4 为白桦脂醇。

化合物5 白色粉末, mp. 177 ~ 178 °C, ESI-MS m/z : 429. 336 3 $[M + H]^+$ 。 1H -NMR(600 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.82(3H, d, J = 12.6 Hz, H-26) 0.82

(3H, s, H-48) 0.83(3H, d, J = 17.1 Hz, H-27) 0.88(3H, s, H-49) 0.91(3H, d, J = 6.6 Hz, H-21) 1.00(3H, d, J = 6.6 Hz, H-28) 3.97(1H, m, H-3) 5.14(1H, dd, J = 15.3 and 8.2 Hz, H-23) 5.22(1H, dd, J = 15.2 and 7.6 Hz, H-22) 6.24(1H, d, J = 8.7 Hz, H-7) 6.51(1H, d, J = 8.7 Hz, H-6)。 ^{13}C -NMR 数据及归属见表2。以上数据与文献^[6]对照基本一致, 故确定化合物5 为5 α , 8 α -表二氧-6, 22-麦角甾二烯-3-醇。

化合物6 浅黄色固体, mp. 114 ~ 115 °C, ESI-MS m/z : 393. 315 2 $[M + H]^+$ 。 1H -NMR(600 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.82(3H, d, J = 6.8 Hz, H-26) 0.85(3H, d, J = 6.8 Hz, H-27) 0.93(3H, d, J = 6.8 Hz, H-28) 0.96(3H, s, H-48) 0.99(3H, s, H-49) 1.05(3H, d, J = 6.7 Hz, H-21) 5.16 ~ 5.22(1H, dd, J = 15.4 and 7.2 Hz, H-22) 5.22 ~ 5.28(1H, dd, J = 15.2 and 7.3 Hz, H-23) 5.73(1H, s, H-4) 6.03(1H, d, J = 9.2 Hz, H-6) 6.6(1H, d, J = 9.2 Hz, H-7)。 ^{13}C -NMR 数据及归属见表2。以上数据^[7]与文献对照基本一致, 故确定化合物6 为4, 6, 8(14), 22-麦角甾四烯-3-酮。

化合物7 白色针状结晶(丙酮), mp. 95 ~ 97 °C, ESI-MS m/z : 413. 177 8 $[M + H]^+$ 。 1H -NMR(600 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.71(3H, s, H-48) 0.81(3H, d, J = 6.4 Hz, H-27) 0.83(3H, d, J = 7.6 Hz, H-26) 0.85(3H, t, J = 7.2 Hz, H-29) 0.92(3H, d, J = 6.5 Hz, H-21) 1.18(3H, s, H-49) 5.73(3H, s, H-4)。 ^{13}C -NMR 数据及归属见表2。以上数据与文献^[8]对照基本一致, 故确定化合物7 为豆甾-4-烯-3-酮。

化合物8 无色晶体, mp. 240 ~ 242 °C, ESI-MS m/z : 459. 388 3 $[M + H]^+$ 。 1H -NMR(600 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.72(3H, s, H-48) 0.81(3H, s, H-29) 0.87(3H, s, H-30) 0.93(3H, d, H-21) 0.99(3H, s, H-49) 1.00(3H, s, H-28) 1.19(3H, s, H-26) 1.21(3H, s, H-27) 3.23(1H, dd, J = 12.0 and 4.5 Hz, H-3) 3.96(m, 1H, J = 6.8 and 4.9 Hz, H-24) 4.04(m, 1H, J = 9.0 and 6.8 and 3.8 Hz, H-22)。 ^{13}C -NMR 数据及归属见表2。以上数据与文献^[9]对照基本一致, 故确定化合物8 为 Inonotsuoxides B。

化合物9 无色晶体, mp. 203 ~ 205 °C, ESI-MS m/z : 459. 388 1 $[M + H]^+$ 。 1H -NMR(600 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.72(3H, s, Me-48) 0.81(3H, s, Me-29) 0.91(3H, s, Me-30) 0.97(3H, s, Me-49) 1.0(3H, s, Me-28) 1.05(1H, dd, J = 11.7 2.1) 1.20(3H, s,

表 2 化合物 1~10 的碳谱数据(150 MHz a. CDCl₃ b. CDCl₃/CH₃OD)

C	化合物 1	化合物 2	化合物 3	化合物 4	化合物 5	化合物 6	化合物 7	化合物 8	化合物 9	化合物 10
1	36.34	35.65	35.68	38.66	34.68	34.14	35.69	35.59	35.66	42.98
2	27.96	27.88	27.93	27.35	30.09	34.14	33.88	27.85	27.88	35.12
3	79.16	79.05	79.06	78.95	66.44	199.58	199.63	78.99	79.01	79.66
4	39.03	38.98	39.00	38.85	36.91	123.00	123.74	38.89	38.90	52.08
5	50.57	50.45	50.46	55.23	82.18	164.43	171.68	50.41	50.45	143.53
6	21.13	19.28	19.26	18.28	135.43	124.42	32.95	18.25	18.26	125.35
7	28.34	29.28	29.17	34.18	130.74	134.06	32.06	26.52	26.51	39.36
8	134.54	134.78	134.64	40.87	79.51	124.46	35.63	134.19	134.33	37.16
9	134.48	133.98	134.26	50.34	51.05	44.30	53.82	134.63	134.66	59.28
10	37.18	37.18	37.12	37.11	36.95	36.76	38.60	37.04	37.10	41.90
11	18.38	20.84	21.11	20.79	23.40	18.96	21.03	21.00	20.90	27.49
12	26.65	26.52	26.61	25.14	39.32	35.58	39.63	30.90	28.99	45.54
13	44.58	44.36	44.98	37.25	44.55	43.99	42.39	45.02	44.55	49.08
14	49.92	49.59	49.49	42.68	51.67	156.22	55.88	49.32	49.45	65.05
15	31.09	30.70	31.04	27.00	20.63	25.38	24.19	30.96	30.83	31.45
16	31.01	29.70	31.06	29.12	28.68	27.76	28.19	27.28	26.51	32.88
17	50.57	45.41	47.34	47.76	56.16	55.67	56.01	47.92	49.03	59.98
18	15.87	16.94	15.80	48.70	12.88	18.99	11.97	15.78	15.42	15.01
19	18.80	18.28	18.35	47.76	18.20	16.66	17.38	19.12	19.13	26.27
20	36.26	55.65	41.76	150.48	39.77	39.33	36.11	38.22	47.82	40.48
21	19.33	206.57	12.74	29.71	20.89	21.24	18.70	12.51	79.11	22.93
22	35.74	26.93	73.45	33.95	135.21	135.02	33.98	76.71	24.54	39.93
23	24.43	25.88	27.34	27.97	132.28	132.52	26.07	34.11	27.41	32.37
24	125.38	123.66	121.46	15.37	42.77	33.09	45.83	78.31	57.67	53.42
25	131.07	132.55	135.33	16.11	33.06	42.88	29.15	81.46	73.56	24.27
26	25.04	25.82	26.14	15.95	19.66	20.02	19.82	25.52	24.16	22.15
27	17.86	17.85	18.12	14.74	19.97	19.68	19.03	22.48	30.67	22.47
28	25.89	15.54	15.55	60.48	17.58	17.67	23.07	27.96	27.98	29.28
29	28.12	28.08	28.08	109.70	—	—	11.95	15.40	17.05	21.93
30	15.60	24.29	24.42	19.06	—	—	—	24.30	24.41	32.88

a: 化合物 1~9; b: 化合物 10

Me-27) δ 1.23 (3H, s, Me-26) δ 3.24 (1H, dd, $J = 11.7$ and 4.6) δ 3.72 (1H, t, $J = 8.7$ and 7.3)。¹³C-NMR 数据及归属见表 2。以上数据与文献^[10]对照基本一致,故确定化合物 9 为 Inonotsutriol A。

化合物 10 白色粉末固体(氯仿-甲醇), mp. 290~292 °C, ESI-MS m/z : 577.446 3 $[M + H]^+$ 。¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃/CH₃OD) δ : 104.33 (C-1'), 79.02 (C-2'), 80.67 (C-3'), 76.77 (C-4'), 82.37 (C-5'), 73.40 (C-6'), 其他碳谱数据及归属见表 2。与胡萝卜苷对照品共薄层, R_f 值及显色行为一致,熔点不下降,故可鉴定为胡萝卜苷。

3 讨论

从天然产物特别是大型真菌中筛选抗肿瘤活性物质一直是抗肿瘤新药研发的一个重要方向。桦褐孔菌作为食药两用菌,在俄罗斯民间用于抗肿瘤的历史悠久,该菌含有多种活性成分,包括多糖、羊毛

脂烷型三萜、甾醇、吲哚类生物碱及酚类等,其中三萜、生物碱通过阻滞肿瘤细胞周期、诱导细胞凋亡或分化达到抗肿瘤作用;酚类有抗氧化作用,可以抑制肿瘤细胞的生成;而多糖通过激活免疫系统抑制肿瘤细胞生长^[11]。但有关桦褐孔菌抗肿瘤活性部位及活性成分的研究较少,且与活性相关的质控成分尚需进一步完善。

本实验对桦褐孔菌各提取物进行活性筛选,发现 FA 的抗肿瘤活性最强,FB 次之,FT 较低。这与文献^[12]报道石油醚萃取物具有明显的体内外抗肿瘤活性一致。进一步从活性部位分 FA 及 FB 分离鉴定 10 个三萜类和甾类化合物,初步活性筛选表明化合物 1、3、5、8 能抑制胃癌细胞、肺癌及肝癌细胞生长;化合物 2、4、6、7 对受试瘤株抑制活性较弱。据有关文献^[13-15]报道,化合物 3(桦褐孔菌醇)可通过调控周期蛋白 E 抑制宫颈癌、卵巢癌及乳腺癌。化合物 2(3 β -羟基 8,24-羊毛甾二烯-21-醛)可抑制

白血病细胞生长,而化合物4(白桦脂醇)抑制肺癌细胞和宫颈癌细胞活性较弱^[14]。

桦褐孔菌抗肿瘤活性成分尚需进一步分离鉴定,并针对更多瘤株进行体内外活性筛选,为明确桦褐孔菌抗肿瘤药效物质基础,建立质控指标及探索作用机制提供科学依据。

参考文献

- [1] 黄年来. 俄罗斯神秘的民间药用真菌—桦褐孔菌[J]. 中国食用菌, 2002, 21(4): 7-8.
- [2] 王文娟, 雒向宁, 晁旭. 桦褐孔菌提取物对人肝癌 HePG2 细胞增殖及凋亡的影响[J]. 陕西医学杂志, 2013, 42(7): 1539-42.
- [3] 张旭, 赵芬琴, 韩光, 等. 桦褐孔菌的化学成分及抗炎活性[J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22(3): 433-6.
- [4] Kahlos K, Hiltunen R, V Schantz M. 3 β -Hydroxy-lanosta-8, 24-dien-21-al, a New Triterpene from *Inotus obliquus* [J]. Planta Med, 1984, 50(2): 197-8.
- [5] 任冬梅, 姜红祥, 季梅. 岩青兰化学成分的研究(II) [J]. 中国药学杂志, 2005, 40(22): 1695-6.
- [6] Rösecke J, König W A. Constituents of the fungi *Daedalea quercina* and *Daedaleopsis confragosa* var. *tricolor* [J]. Phytochem, 2000, 54(8): 757-62.
- [7] 蔡庆秀, 赵金浩, 王佳莹, 等. 辣木内生真菌 LM033 的分离鉴定及其代谢产物抗植物病原菌活性[J]. 中国新药杂志, 2013, 22(18): 2168-73.
- [8] 何萍, 李帅, 王素娟, 等. 半夏化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(9): 671-4.
- [9] Nakata T, Yamada T, Taji S, et al. Structure determination of inonotsuoxides A and B and *in vivo* anti-tumor promoting activity of inotodiol from the sclerotia of *Inonotus obliquus* [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2007, 15(1): 257-64.
- [10] Taji S, Yamada T, Tanaka R. Three new lanostane triterpenoids, inonotsutriols A, B, and C, from *Inonotus obliquus* [J]. Helv Chim Acta, 2008, 91(8): 1513-24.
- [11] Song F Q, Liu Y, Kong X S, et al. Progress on understanding the anticancer mechanisms of medicinal mushroom: *inonotus obliquus* [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(3): 1571-8.
- [12] 季峰, 郑维发, 魏贤勇, 等. 桦褐孔菌石油醚提取物的抗肿瘤作用研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(6): 1377-8.
- [13] Liu C, Zhao C, Pan H H, et al. Chemical constituents from *Inonotus obliquus* and their biological activities [J]. J Nat Prod, 2014, 77(1): 35-41.
- [14] 白杨, 叶龙, 李晓京, 等. 桦褐孔菌醇对人卵巢癌 skov3 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 实用妇产科杂志, 2013, 29(6): 441-4.
- [15] Kim Y J, Park J, Min B S, et al. Chemical constituents from the sclerotia of *Inonotus obliquus* [J]. J Korean Soc Appl Biol Chem, 2011, 54(2): 287-94.

Screening of antitumor fractions and chemical constituents from *Inonotus obliquus*

Wu Kun¹, Cheng Wenming^{1,2}, Li Chunru³, et al

(¹Anhui Provincial Key Laboratory on Bioactivity of Natural Product, School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032; ²State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; ³Zhejiang BIOASIA Institute of Life Science, Jiaxing 314200)

Abstract Objective To screen the antitumor fractions of *Inonotus obliquus* and to study chemical constituents from the active fractions. **Methods** Ethanol extract (FT), petroleum ether extract (FA), ethyl acetate extract (FB), *n*-butanol extract (FC) and aqueous extract (FD) from *Inonotus obliquus* were screened by inhibiting the growth of tumor cells (HepG2, SGC-7901, A549). The constituents from active fractions were further isolated and structurally elucidated by spectral analysis. **Results** FT, FA and FB exhibited antitumor activity, with IC₅₀ value of no more than 56, 28 and 47 mg/L, respectively. Ten known compounds were elucidated as lanosterol (1), 3 β -hydroxy-lanosta-8, 24-dien-21-al (2), Inotodiol (3), betulin (4), 5 α , 8 α -Epidioxy ergosta-6, 22-dien-3 β -ol (5), ergosta-4, 6, 8(14), 22-Tetraene-3-one (6), stigmast-4-en-3-one (7), Inonotsuoxides B (8), Inonotsutriols A (9), daucosterol (10). **Conclusion** Two fractions, FA and FB, are antitumor fractions, from which 10 compounds were separated and elucidated. Compound 6, 7 and 10 are reported for the first time from *Inonotus obliquus*.

Key words *Inonotus obliquus*; antitumor activity; active fraction; triterpenoids; steroids; chemical constituents