

真菌多糖激发子对桦褐孔菌多酚积累影响的研究

赵艳霞, 缪康杰, 魏志文, 张梅梅, 郑维发*

(徐州师范大学 江苏省药用植物生物技术重点实验室, 江苏 徐州 221116)

摘要:目的 研究真菌多糖激发子对深层培养的桦褐孔菌抗氧化和抗肿瘤酚类化合物积累的影响。方法 在桦褐孔菌的培养基中分别加入 15、45、100 $\mu\text{g/mL}$ 的真菌多糖激发子, 测定胞内外多酚的量和主要组成成分, 抗氧化活性和抗肿瘤活性, 并测定不同培养条件下菌丝体内苯丙氨酸解氨酶和一氧化氮合酶的活性。多酚的量以 Folir Ciocalteu 法测定。利用 HPLC 法测定多酚的组成成分。抗氧化活性以清除超氧阴离子的能力表示。利用 MTT 法测定多酚对 Hela 细胞的抑制率。苯丙氨酸解氨酶和一氧化氮合酶活性均以分光光度计法测定。结果 添加 45 $\mu\text{g/mL}$ 的真菌多糖激发子可使桦褐孔菌胞内、胞外酚类化合物分别达到最高水平 71.8 和 182.1 mg/L , 明显地高于正常对照组胞内(42.6 mg/g)和胞外(83.6 mg/L)。真菌多糖激发子显著提高了苯丙氨酸解氨酶和一氧化氮合酶的活性。不同培养条件下产生的胞内、胞外酚类化合物主要组成成分不同, 但均具有抗氧化和抗肿瘤等活性, 尤其是添加 45 $\mu\text{g/mL}$ 真菌多糖激发子的培养体系。结论 真菌多糖激发子可上调深层发酵培养的桦褐孔菌酚类化合物的积累以及抗氧化和抑制肿瘤细胞的活性。

关键词: 桦褐孔菌; 深层发酵; 酚类化合物; 抗氧化; 抗肿瘤

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)12-2079-04

桦褐孔菌 *Inonotus obliquus* (Fr.) Pilat 是担子菌亚门层菌纲非褐菌目多孔菌科褐卧孔菌属的一种药用真菌, 主要寄生于白桦的树干, 作为一种有效的抗肿瘤天然药物在俄罗斯已有 400 多年的应用历史。实验证明, 桦褐孔菌对糖尿病、心血管疾病、肝病、艾滋病以及消化道疾病等都有十分确切的疗效, 且没有明显不良反应^[1-2]。前期研究表明, 桦褐孔菌在摇瓶培养条件下以积累初生代谢产物为主, 次生代谢产物如酚类化合物无论是种类还是积累量均明显低于野生桦褐孔菌, 同时液体培养条件下桦褐孔菌菌丝体在抗氧化和免疫调节活性等方面均不及野生桦褐孔菌^[3-5]。因此, 如何提高次生代谢产物的积累是桦褐孔菌深层发酵产物能否替代野生资源的关键。

在植物次级代谢产物合成的研究过程中, 真菌多糖被广泛用做诱导物质。研究表明, 毛头鬼伞多糖可以提高烟草过氧化物酶、多酚氧化酶和苯丙氨酸解氨酶的活性, 诱导烟草酚类物质和木脂素的合成^[7]。以疫霉和曲霉多糖作为激发子, 可以提升蛹虫草中虫草菌素的积累^[8]。酵母菌多糖可以提高丹参毛状根中二萜和丹参酮的积累^[9]。为了进一步阐明桦褐孔菌多酚类化合物的积累规律, 本研究以链孢霉多糖为真菌激发子, 研究其对桦褐孔菌多酚积

累及其抗氧化和抗肿瘤活性的影响。

1 材料与方法

1.1 药品与仪器: 葡萄糖(glucose)、蛋白胨(peptone)、酵母膏(yeast extract)、磷酸二氢钾(KH_2PO_4)、蒽酮(anthrone)(中国医药集团上海化学试剂公司); 邻苯三酚(pyrogallol)、没食子酸(gallic acid)、芸香柚皮苷(narirutin)、山柰酚(kaempferol)、槲皮素(quercetin)(美国 Sigma 公司); 噻唑蓝(MTT)(北京拜尔迪生物技术有限公司)。

722 光栅分光光度计(上海精密科学仪器有限公司); FLUKO 均浆器(上海弗鲁克流体机械制造有限公司); JY92-II 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物技术科技有限公司); Septra Max M2(美国 Molecular Devices); Waters HPLC 液相色谱仪(Waters 公司)。

1.2 供试菌株及培养基: 桦褐孔菌 *Inonotus obliquus* (Fr.) Pilat (KLBMP04005)、链孢霉 *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler 均由江苏省药用植物生物技术重点实验室提供。桦褐孔菌菌种保存于麦粒培养基中。桦褐孔菌液体培养基: 葡萄糖(2%), 蛋白胨(0.35%), 酵母膏提取物(2%), KH_2PO_4 (0.01%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.05%), pH 5.5。链孢霉的培养基: 马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)

收稿日期: 2010-03-24

基金项目: 江苏省自然科学基金资助项目(BK2009034); 徐州师范大学国家自然科学基金预研究项目(08XLY14)

作者简介: 赵艳霞(1980—), 女, 河北衡水人, 助教, 从事药用真菌代谢产物调控研究。

Tel: 13913478674 E-mail: zhaoyx0318@126.com

* 通讯作者 郑维发 Tel: (0516) 83403179 E-mail: yyzw@xznu.edu.cn

培养基, 不含琼脂的液体培养基为 PD 培养基。

1.3 真菌多糖激发子的制备: 将链孢接种在 PDA 培养基上并于 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下培养 7 d, 然后转入 PD 液体培养基中 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 震荡培养 3 d (摇床转速为 140 r/min)。培养结束后取链孢霉培养物, 4 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液。将上清液浓缩至初始体积的 1/5, 加入 3 倍体积的 95% 乙醇, 静置醇沉 24 h, 4 000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀即为粗多糖。利用硫酸-蒽酮法测定多糖。高压蒸气灭菌, 置于 4°C 冰箱内保存备用。

1.4 桦褐孔菌的培养: 接种桦褐孔菌菌种于液体培养基中, 置于 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、140 r/min 条件下培养 7 d 至对数生长期。在无菌条件下, 用匀浆器于 400 W 匀浆菌丝体 30 s, 取匀浆液 10 mL, 接种于含 190 mL 培养液的 500 mL 培养瓶中, 继续培养。培养至第 2 天时加入真菌多糖激发子。培养液中真菌多糖激发子的终浓度分别为 0、15、45、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 每组重复 3 次。每 2 天取样 40 mL。

1.5 分析方法

1.5.1 菌丝体积累量的测定: 取 1 mL 桦褐孔菌培养物, 抽滤, 干燥, 称量。

1.5.2 胞内多酚的制备: 研磨冷冻干燥后的菌丝体, 加 80% 丙酮浸泡过夜, 冰浴超声破碎细胞 (功率 300~400 W), 4°C 静置过夜, 4 000 r/min 离心 30 min, 收集上清液, 重复 3 次。

1.5.3 胞外多酚的制备: 向发酵液中添加 3 倍体积的无水乙醇, 醇沉过夜, 除去多糖, 再利用醋酸乙酯萃取^[10]。

1.5.4 多酚的测定: 以 Folin-Ciocalteu 法测定多酚的量^[11]。

1.5.5 苯丙氨酸解氨酶活性的测定: 苯丙氨酸解氨酶活性参照文献^[12]方法测定。

1.5.6 一氧化氮合酶活性的测定: 一氧化氮合酶活性以商业试剂盒法测定 (南京建成生物科技有限公司)。

1.5.7 多酚清除超氧阴离子能力的测定^[13]: 取 1.5 mL pH 8.2 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, 1.4 mL 蒸馏水, 混匀后于 25°C 水浴 20 min, 取出后立即加入 0.1 mL 25°C 预热的 3 mmol/L 邻苯三酚, 以 Tris-HCl 缓冲液为空白对照, 于 420 nm 处测得 V (空白), 测定 V (样品) 时, 在加入邻苯三酚前分别加入一定量的多酚, 蒸馏水减少相应的体积, 以同样浓度样品液作对照。计算单位质量 (mg) 多酚对超氧阴离子的清除率。

$$\text{清除率} = (A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{空白}} \times 100\% / \text{多酚的量}$$

1.5.8 抑制活性的测定: 利用 MTT 法测定多酚抑制 HeLa 生长的活性。计算单位质量 (mg) 多酚对超氧阴离子的抑制率。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{空白}} \times 100\% / \text{多酚的量}$$

1.5.9 活性成分的 HPLC 法测定: 利用 HPLC^[14] 对多酚的主要组成成分进行分析, 以没食子酸、芸香柚皮苷、山柰酚、槲皮素、表儿茶素没食子酸酯等为对照品。

1.6 统计学分析: 采用 SPSS 13.0 统计软件对实验数据进行分析, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 时表示组间存在显著性差异。

2 结果与分析

2.1 对菌丝体积累量的影响: 真菌多糖激发子对桦褐孔菌菌丝体积累量的影响不显著。正常培养条件下, 培养至第 12 天时, 桦褐孔菌生物量有最高积累量为 6.12 g/L。真菌多糖激发子添加组的菌丝体积累量略低于正常培养组, 但是各组之间不存在显著性差异 (图 1)。

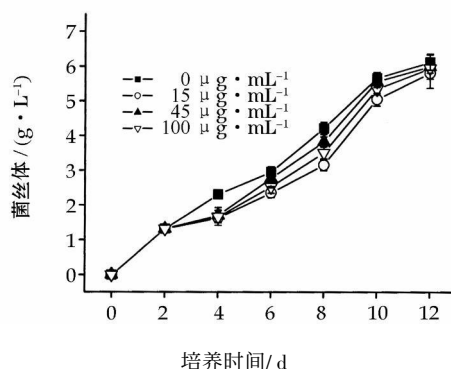


图 1 真菌多糖激发子对桦褐孔菌菌丝体积累的影响 ($n=3$)

Fig 1 Effects of fungal polysaccharide elicitor on accumulation of mycelial biomass ($n=3$)

2.2 对多酚的影响: 真菌多糖激发子显著提升了桦褐孔菌胞内多酚的积累。添加 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 真菌多糖激发子可使桦褐孔菌胞内多酚的积累量达到最高水平 71.87 mg/g, 显著地高于对照组 42.67 mg/g; 但是添加 15、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 真菌多糖激发子组胞内多酚的积累量分别为 53.32、49.96 mg/g, 与对照组的差异不明显 (图 2-A)。

真菌多糖激发子的加入明显提高了桦褐孔菌胞外多酚的生成。由图 2-B 可知, 在培养的前 8 d, 在 4 种不同培养条件下, 胞外多酚的积累量差异不显著。培养至第 10 天时, 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组胞外多酚的产量达最高值, 为 182.16 mg/L, 明显高于其他 3 组。正常组胞外多酚的最高量为 83.65 mg/L。15、100

$\mu\text{g}/\text{mL}$ 组胞外多酚的最高积累量分别为 114.68、118.14 mg/L 。真菌多糖激发子的加入激发了桦褐孔菌胞外多酚的积累。

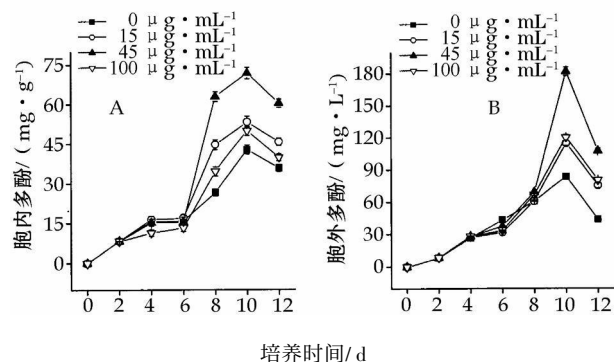


图 2 真菌多糖激发子对桦褐孔菌胞内(A)和胞外(B)多酚的影响($n=3$)

Fig 2 Effects of fungal polysaccharide elicitor on polyphenol of intracellular (A) and exocellular (B) ($n=3$)

2.3 对苯丙氨酸解氨酶和一氧化氮合酶活性的影响: 真菌多糖激发子的加入显著提高了桦褐孔菌菌丝体内苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonium-lyase, PAL)的活性。由图 3A 可知, 添加 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 真菌多糖激发子可使桦褐孔菌菌丝体内 PAL 的活性达到最高水平 88.9 U/mg, 极显著地高于正常培养的 43.8 U/mg; 当培养液中真菌多糖激发子的质量浓度为 15、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 菌丝体 PAL 的最高酶活性分别为 46.6、59.8 U/mg。

真菌多糖激发子明显提高了桦褐孔菌一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)的活性。在培养的第 8 天, 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组菌丝体内 NOS 活性达最高值 340.0 U/mg, 而正常组则为 278.8 U/mg。当培养液中真菌多糖激发子的质量浓度为 15、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 菌丝体 NOS 的最高酶活性分别为 296.5、308.1 U/mg (图 3B)。

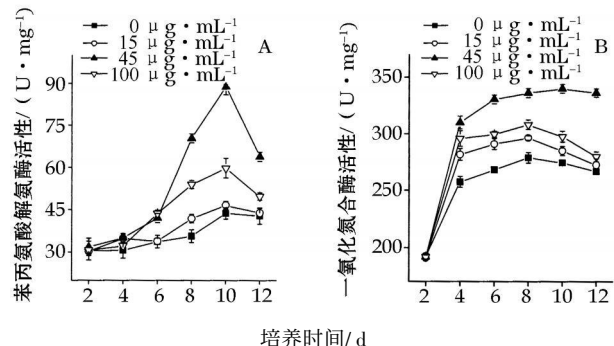


图 3 真菌多糖激发子对桦褐孔菌菌丝体内 PAL(A)和 NOS 活性(B)的影响($n=3$)

Fig 3 Effects of fungal polysaccharide elicitor on PAL (A) and NOS activity (B) ($n=3$)

2.4 清除超氧阴离子的能力: 桦褐孔菌胞内多酚和胞外多酚均具有清除超氧阴离子的活性。但是不同培养条件和不同培养时间胞内多酚和胞外多酚清除超氧阴离子的能力不同。由图 4 可知, 正常培养条件下, 胞内多酚和胞外多酚在培养的第 10 天清除超氧阴离子的能力最强, 分别为 157.5%、140.2%。真菌多糖激发子的添加增强了胞内多酚清除自由基的能力, 当培养液中真菌多糖激发子质量浓度为 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 胞内多酚和胞外多酚清除超氧阴离子的能力最强, 分别为 214.9%、188.1%, 与正常组胞内多酚和胞外多酚清除超氧阴离子的能力存在显著性差异(图 4)。

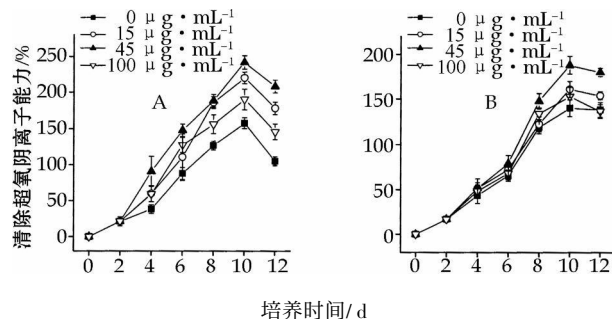


图 4 真菌多糖激发子对桦褐孔菌胞内多酚(A)和胞外多酚(B)清除超氧阴离子基能力的影响($n=3$)

Fig 4 Effects of fungal polysaccharide elicitor on scavenging ability for superoxide anion by polyphenol of intracellular (A) and exocellular (B) ($n=3$)

2.5 抑制 HeLa 细胞生长的能力: 桦褐孔菌胞内多酚和胞外多酚均具有抑制 HeLa 细胞生长繁殖的活性。在培养的第 10 天, 当培养液中真菌多糖质量浓度为 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 胞内多酚和胞外多酚对 HeLa 细胞的抑制率最高, 分别为 66.958%、51.85%, 与正常组胞内多酚和胞外多酚对 HeLa 细胞的抑制能力存在显著性差异(图 5)。

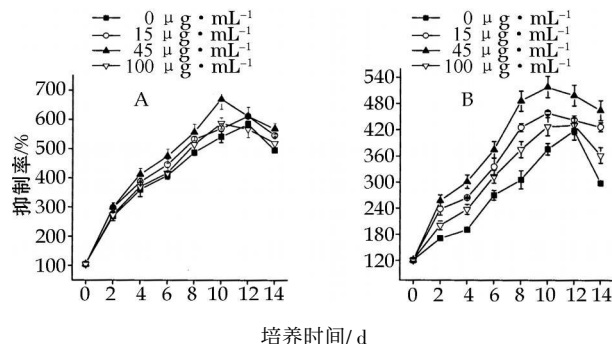


图 5 真菌多糖激发子对桦褐孔菌胞内多酚(A)和胞外多酚(B) HeLa 细胞生长能力的影响($n=3$)

Fig 5 Effects of fungal polysaccharide elicitor on inhibiting ability of growth for HeLa cell by polyphenol of intracellular (A) and exocellular (B) ($n=3$)

2.6 多酚的主要活性成分: 桦褐孔菌在不同培养条件下所产生的多酚的活性成分并不相同。由于真菌多糖激发子的加入, 胞内多酚中没食子酸的量降低, 芸香柚皮苷、山柰酚和槲皮素的量升高, 对照组胞内多酚中并不存在表儿茶素没食子酸酯, 但是激发子

添加组胞内多酚中表儿茶素没食子酸酯的量明显升高, 结果见表 1。由表 2 结果可知, 真菌多糖的添加降低了胞外多酚中没食子酸和表儿茶素没食子酸酯的量。芸香柚皮苷、山柰酚和槲皮素的量明显上升。

表 1 培养至第 10 天时桦褐孔菌菌丝体胞内多酚的主要已知成分量

Table 1 Compositional content of identified intracellular polyphenol present in mycelia of <i>I. obliquus</i> grown on day 10					
真菌多糖激发子/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	没食子酸/%	芸香柚皮苷/%	山柰酚/%	槲皮素/%	表儿茶素没食子酸酯/%
0	13.8 $\pm$ 1.1	16.8 $\pm$ 2.6	2.5 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.4	—
15	11.8 $\pm$ 0.5	17.8 $\pm$ 1.2	6.1 $\pm$ 0.8	6.5 $\pm$ 0.1	14.1 $\pm$ 1.4
45	4.8 $\pm$ 0.5	22.7 $\pm$ 1.1	10.9 $\pm$ 1.0	9.8 $\pm$ 1.0	20.9 $\pm$ 1.7
100	7.6 $\pm$ 0.7	18.7 $\pm$ 0.8	7.9 $\pm$ 0.9	8.5 $\pm$ 1.0	14.9 $\pm$ 2.9

表 2 培养至第 10 天时桦褐孔菌胞外多酚的主要已知成分量

Table 2 Compositional content of identified extracellular polyphenol present in mycelia of <i>I. obliquus</i> grown on day 10					
真菌多糖激发子/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	没食子酸/%	芸香柚皮苷/%	山柰酚/%	槲皮素/%	表儿茶素没食子酸酯/%
0	5.9 $\pm$ 0.8	3.3 $\pm$ 0.5	3.2 $\pm$ 0.3	2.6 $\pm$ 0.2	10.1 $\pm$ 1.1
15	4.8 $\pm$ 0.6	5.4 $\pm$ 0.4	5.7 $\pm$ 0.3	2.2 $\pm$ 0.1	16.1 $\pm$ 1.1
45	0.87 $\pm$ 0.0	6.15 $\pm$ 0.4	8.9 $\pm$ 0.2	11.0 $\pm$ 0.8	1.8 $\pm$ 0.0
100	1.3 $\pm$ 0.0	5.9 $\pm$ 0.1	7.7 $\pm$ 0.2	8.9 $\pm$ 0.7	1.5 $\pm$ 0.1

3 讨论

本研究表明, 真菌多糖激发子可影响桦褐孔菌多酚类化合物的积累。当培养液中真菌多糖激发子的质量浓度为 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 桦褐孔菌胞内多酚和胞外多酚的积累量最高, 分别为 71.87、182.16 mg/L 。当培养液中真菌多糖激发子的质量浓度为 15 或 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 多酚的积累量与对照组相比较并未显著提高。前期的研究表明, 苯丙氨酸解氨酶和一氧化氮合酶活性的大小与酚类化合物的积累有着密切的关系。真菌多糖激发子可以提升桦褐孔菌菌丝体内苯丙氨酸解氨酶和一氧化氮合酶的活性, 促进多酚类化合物的积累。并且在不同培养条件和不同培养时间, 桦褐孔菌胞内多酚和胞外多酚均具有不同的清除超氧阴离子和抑制 HeLa 细胞生长繁殖的能力, 这主要是由于多酚的组成成分不同引起的。

参考文献:

[1] Youn M J, Kim J K, Park S Y, *et al.* Potential anticancer properties of the water extract of *Inonotus obliquus* by induction of apoptosis in melanoma B16 F10 cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 121: 221-228

[2] 梁清乐, 王秋颖, 樊锦燕, 等. 桦褐孔菌的研究概况 [J]. *中草药*, 2005, 36(4): 623-625

[3] Zheng W F, Zhao Y X, Zhang M M, *et al.* Phenolic compounds from *Inonotus obliquus* and their immune stimulating effects [J]. *Mycosystema*, 2008, 27: 39-47

[4] 陈才法, 项小燕, 顾琪, 等. 桦褐孔菌胞外多糖合成的深层发酵条件研究 [J]. *中草药*, 2007, 38(3): 358-361

[5] 杨士钊, 郑维发. 影响桦褐孔菌培养菌丝体水解解质积累的因素 [J]. *中草药*, 2007, 38(12): 1874-1878

[6] 项小燕, 顾琪, 郑维发, 等. 野生桦褐孔菌及其深层发酵产物的弱极性成分研究 [J]. *中草药*, 2006, 37(5): 670-672

[7] 吴艳兵, 谢荔岩, 谢联辉, 等. 毛头鬼伞多糖对烟草酶活性和同工酶谱的影响 [J]. *微生物学杂志*, 2007, 27: 29-33

[8] 李祝, 梁宗琦, 肖洋. 真菌多糖激发子对提高虫草素含量的影响 [J]. *中国食用菌*, 2006, 25: 34-37

[9] Basha S A, Sarma B K, Singh D P, *et al.* Differential methods of inoculation of plant growth promoting rhizobacteria induce synthesis of phenylalanine ammonia-lyase and phenolic compounds differentially in chickpea [J]. *Folia Microbiol*, 2006, 51: 463-468

[10] Zhao Y X, Miao K J, Zhang M M, *et al.* Effects of nitric oxide on production of antioxidant phenolic compounds in *Phaeo-*porus obliquus** [J]. *Mycosystema*, 2009, 28: 750-754

[11] Singleton V, Rossi J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdc phosphotungstic acid reagents [J]. *Am J Enol Vitic*, 1965, 16: 144-158

[12] Khan W, Prithiviraj B, Smith D L. Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves [J]. *J Plant Physiol*, 2003, 160: 859-863

[13] 王书华, 安芳, 张丹参. 蛇床子素抗氧自由基清除作用的研究 [J]. *中成药*, 2004, 26(12): 1062-1063

[14] Zheng W F, Zhang M M, Zhao Y X, *et al.* Accumulation of antioxidant phenolic constituents in submerged cultures of *Inonotus obliquus* [J]. *Bioresour Technol*, 2009, 100: 1327-1335