

内生真菌生物转化提高滇重楼皂苷含量及抗肿瘤作用研究

刘德柱, 陈艺杨, 张 蒙, 田 雨, 李早慧, 于 丹*, 都晓伟*

黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: 目的 研究内生真菌 *Fusarium-C39* 生物转化提高滇重楼药材皂苷类化学成分的含量, 并增强重楼对癌细胞增殖的抑制作用, 初步探讨主要甾体皂苷的生物转化机制。方法 将内生真菌 *Fusarium-C39* 分别与滇重楼药材固体发酵和与重楼总皂苷提取物液体发酵, 比较发酵前后重楼总皂苷和重楼皂苷 I、II、VII 的含量变化及对肝癌 HepG2 细胞、肺癌 A549 细胞和结肠癌 HT-29 细胞增殖抑制作用的差异; 采用 UPLC/Q-TOF-MS 技术研究发酵前后重楼皂苷类化学成分的变化, 并结合甾体皂苷生物合成途径推测内生真菌 *Fusarium-C39* 生物转化提高重楼皂苷含量的机制。结果 与滇重楼药材相比较, 发酵物中的重楼总皂苷、重楼皂苷 I、II 和 VII 的含量显著提高, 对 3 种癌细胞增殖的抑制作用显著增强; 人参皂苷 Th、pseudoprotogenin B 和 parisynnanside B 为 *Fusarium-C39* 菌株生物转化提高重楼皂苷 I、II 和 VII 含量的主要前体物质, 它们在 *Fusarium-C39* 菌株的作用下发生了 C₂₆ 糖基水解和环化反应, 分别生成了重楼皂苷 I、II 和 VII。结论 内生真菌 *Fusarium-C39* 可生物转化提高重楼皂苷含量, 并增强重楼的抗肿瘤作用, 转化机制可能与 *Fusarium-C39* 真菌促使重楼皂苷前体物质发生糖基水解和环化反应相关。

关键词: 内生真菌; 滇重楼; 微生物转化; 重楼皂苷 I; 重楼皂苷 II; 重楼皂苷 VII; 抗肿瘤活性

中图分类号: R286.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)14-4486-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.14.027

Study on biotransformation of endophytic fungus to enhance saponins content and antitumour activity of *Paridis Rhizoma*

LIU De-zhu, CHEN Yi-yang, ZHANG Meng, TIAN Yu, LI Zao-hui, YU Dan, DU Xiao-wei

Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To study the fermenting effect of endophytic fungus *Fusarium-C39* with Dian chong lou (*Paridis Rhizoma*) on enhancing the saponins content and antitumour activity, and preliminarily investigate the biotransformation mechanism of main steroid saponins. **Methods** The endophytic fungus *Fusarium-C39* was fermented with *Paridis Rhizoma* and total saponins extract, respectively. The contents of total saponins and polyphyllin I, II and VII from *Paridis Rhizoma* and its fermentation, and the inhibitory effects on the proliferation of HepG2, A549 and HT-29 of them were compared. UPLC/Q-TOF-MS was used to study the changes of saponins before and after fermentation, and the mechanism of biotransformation was deduced by referring with the biosynthesis pathway of steroidal saponins. **Results** Compared with *Paridis Rhizoma*, the contents of total saponins, polyphyllin I, II and VII in the fermentation were significantly increased, and the inhibitory effect on the proliferation of tumour cells was significantly enhanced. Th, pseudoprotogenin B and parisynnanside B were determined as main precursor substances. They were biotransformed into polyphyllin I, II and VII by the deglycosylation of C₂₆ and cyclization under the catalysis of *Fusarium-C39*. **Conclusion** Endophytic fungus *Fusarium-C39* could increase the saponins content and enhance the anti-tumor effect of *Paridis Rhizoma* by fermentation. The transformation mechanism was probably related to the deglycosylation and cyclization of the precursor substances catalyzed by *Fusarium-C39*.

Key words: endophytic fungus; *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz.; microbial transformation; polyphyllin I; polyphyllin II; polyphyllin VII; antitumor activity

收稿日期: 2021-11-13

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81872967)

作者简介: 刘德柱 (1986—), 男, 研究实习员, 研究方向为中医药基础研究。E-mail: 253720985@qq.com

*通信作者: 于 丹 (1980—), 女, 副教授, 研究方向为天然药物质量评价。E-mail: yd10011@163.com

都晓伟 (1962—), 女, 教授, 研究方向为天然药物质量评价。E-mail: xiaoweidu@hotmail.com

百合科植物滇重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz. 是常用中药材重楼的基原植物^[1], 其主要活性成分为甙体皂苷类化合物^[2]。重楼皂苷按化学结构可分为 2 大类: 一类以薯蓣皂苷元为母核, 如重楼皂苷 I、重楼皂苷 II 等; 另一类以偏诺皂苷元为母核, 如重楼皂苷 VI、重楼皂苷 VII 等^[3]。现代药理学研究证明, 重楼皂苷具有较强的抗肿瘤、止血、镇痛、镇静和免疫调节等作用^[4], 例如重楼总皂苷能抑制肺癌细胞^[5]、鼻咽癌细胞^[6]、胃癌细胞的增殖^[7]; 重楼皂苷 I 对肺癌细胞^[8]和结肠癌细胞^[9]具有抑制作用; 重楼皂苷 VI、VII 对肝癌细胞有抑制作用^[10]。除了作为药材单独使用外, 重楼还是云南白药、宫血宁胶囊等上百种中成药的主要原料^[11], 市场需求量大, 药材价格已由 20 世纪七八十年代的 20~30 元/kg 暴涨至现今 1500 元/kg 左右。大量的采挖使得野生重楼资源日益减少, 而人工驯化栽培重楼又存在着生长缓慢, 繁殖率低等困难。因此, 如何利用现代技术和手段提升其有效成分含量, 增强其药理活性, 对保护重楼野生资源, 提高有限资源的利用率, 研制和开发以重楼药效成分为原料的药物具有重要的意义。

微生物转化技术是获得低成本、高活性药物的重要途径。课题组前期从穿龙薯蓣 *Dioscorea nipponica* Makino 中分离筛选出一株可生物转化提高薯蓣皂苷含量的内生真菌 *Fusarium-C39*, 本研究将其与滇重楼药材共同发酵培养, 通过对发酵前后重楼主要皂苷成分的分析以及抑制癌细胞增殖作用的考察, 明确内生真菌 *Fusarium-C39* 生物转化提高滇重楼皂苷含量及抗肿瘤的作用, 并初步探讨主要甙体皂苷成分的生物转化机制。

1 仪器与材料

1.1 仪器

2965-2996 型 HPLC 仪、ACQUITY UPLC (Waters, 美国); Triple-TOF TM 5600+ 质谱仪、数据采集软件 Analyst TF 1.6 software、数据处理软件系统 PeakView 2.0/masterview 1.0 software、MarkerView 1.2.1 (AB SCEIX 公司, 美国); Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) (Waters 公司, 美国); Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) (北京迪马科技有限公司); CO₂ 培养箱 (香港力康公司); Multiskan FC 型酶标仪 (Thermo 公司, 美国); AB204-N 型电子

分析天平 (梅特勒-托利多上海有限公司); BXM-30R 型全自动高压灭菌锅、BJ-CD 型洁净工作台、SPX-150C 型恒温恒湿箱、DSD-150 型振荡培养箱 (上海博迅实业有限公司医疗设备厂)。

1.2 材料

滇重楼药材购自云南麻栗坡药材公司 (批号 1801031SK1), 经黑龙江中医药大学中药鉴定学教研室都晓伟教授鉴定为滇重楼 *P. polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz. 的干燥根茎; *Fusarium-C39* 菌株由本实验室分离, 于 4 °C 冰箱保存, 通过形态与分子鉴定确定该菌株为 *Fusarium tricinctum*; 对照品重楼皂苷 I (批号 111590-201604)、重楼皂苷 II (批号 111591-201604)、重楼皂苷 VI (批号 111592-201604)、重楼皂苷 VII (批号 111593-201604)、伪原薯蓣皂苷 (批号 111855-201402)、薯蓣皂苷元 (批号 1539-200001) 和偏诺皂苷元 (批号 16091802) 均购自中国药品生物制品检定所; 肝癌 HepG2 细胞、肺癌 A549 细胞和结肠癌 HT-29 细胞购于中山大学实验动物中心; 胎牛血清购于浙江天杭生物科技股份有限公司; RPMI 1640 细胞培养基购于美国 Gibco 公司; MTT 和二甲基亚砷购于 Sigma 公司; 乙腈 (色谱纯) 购于德国 Merck 公司; 甲酸 (色谱纯) 购自美国 Fisher 公司; 蒸馏水购自广州屈臣氏食品饮料有限公司; 其余试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 *Fusarium-C39* 菌株与滇重楼的发酵培养

2.1.1 固体发酵 精确称取滇重楼药材粗粉 2 g, 置 100 mL 锥形瓶中, 用 4 mL 蒸馏水润湿 12 h, 聚丙烯膜封口, 121 °C 湿热灭菌 30 min, 待冷却后于无菌条件下接种 *Fusarium-C39* 菌种子液 2.3 mL, 置于恒温恒湿箱 28 °C 静止培养 20 d。

2.1.2 液体发酵 称取 2 g 滇重楼药材粗粉, 加 70% 乙醇 50 mL 回流 2 次, 每次提取 2 h, 合并醇溶液, 减压回收至干得药材提取物。用 PD 液体培养基 150 mL 转移药材提取物至 250 mL 锥形瓶中, 聚丙烯膜封口, 121 °C 湿热灭菌 30 min。待冷却后于无菌操作台接种 *Fusarium-C39* 菌种子液 1.2 mL, 置于恒温振荡培养箱中, 120 r/min, 28 °C 培养 7 d。平行培养 *Fusarium-C39* 菌株做空白对照。

2.2 滇重楼发酵前后总皂苷和重楼皂苷 I、II、VII 的含量测定

2.2.1 固体发酵前后总皂苷和重楼皂苷 I、II、VII

的含量测定 取 2 g 重楼药材的固体发酵物, 加 70% 乙醇 140 mL 超声提取 2 次, 每次 40 min, 抽滤, 合并滤液, 回收至干后再加水溶解。水溶液分别用石油醚和水饱和正丁醇萃取, 取正丁醇部位, 回收至干。以未发酵的滇重楼药材做随行对照。残渣加甲醇定容至 10 mL, 采用紫外-可见分光光度法测定重楼总皂苷含量^[12]; 采用 HPLC 法测定重楼皂苷 I、II 和 VII 的含量, 色谱条件为: Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 乙腈 (A)-水 (B) 为流动相梯度洗脱: 0~25 min, 40%~60% A; 25~35 min, 60%~40% A, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 203 nm, 柱温 30 °C, 进样量 20 μL。

2.2.2 液体发酵前后总皂苷和重楼皂苷 I、II、VII 的含量测定 取 150 mL 液体发酵物, 将菌丝和菌液抽滤分离, 菌丝加入 50 mL 水饱和正丁醇超声 3 次, 每次 30 min; 菌液减压回收至 20 mL, 加入等体积水饱和正丁醇萃取 3 次, 合并菌丝和菌液萃取液, 减压回收至干。以未发酵的滇重楼药材提取物做随行对照。样品处理方法和含量测定方法同“2.2.1”项下。

2.3 重楼固体发酵前后对癌细胞增殖的抑制作用实验

按照“2.2.1”项下制备实验样品, 取正丁醇部位冻干。以 DMSO 溶解冻干粉, 配制成 10 mg/mL 的母液 4 °C 保存, 使用时用无血清培养基稀释母液到所需浓度, 除菌滤过, 备用。采用 MTT 法^[13]测定各实验样品对肝癌 HepG2 细胞、肺癌 A549 细胞和结肠癌 HT-29 细胞增殖的抑制作用。

2.4 重楼皂苷 I、II 和 VII 的液相-质谱分析

2.4.1 对照品溶液的制备 分别精密称取适量重楼皂苷 I、II、VI、VII, 伪原薯蓣皂苷, 薯蓣皂苷元以及偏诺皂苷元对照品, 配制成各对照品浓度均为 0.1 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.4.2 供试品溶液的制备 精确量取 150 mL 发酵液浓缩至 20 mL, 加乙醇至 80%, 沉淀 12 h, 抽滤, 旋干, 80% 乙醇定容, 获得供试品溶液。

2.4.3 色谱条件 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (5 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 柱温 40 °C; 流动相为 0.1% 甲酸水 (A)-0.1% 甲酸乙腈 (B); 梯度洗脱: 0~2 min, 95%~60% A; 2~22 min, 60%~0 A; 22~22.1 min, 0~95% A; 22.1~25 min, 95% A; 体积流量 0.3 mL/min; 进样量 2 μL。

2.4.4 质谱条件 电喷雾离子源 (ESI); 正负离子交替扫描; 离子源温度 550 °C; 碰撞电压 500 V; 裂解电压 80 V; 碰撞能量 40 eV; 碰撞能量扩展 15 eV; 氮气为雾化气体; 辅助气 Gas1 和 Gas2 均为 55 psi (1 psi=6.895 kPa); 气帘气 Cur Gas 为 35 psi。一级质谱母离子扫描范围为 80~1500, 相关信息扫描 (IDA) 设置响应值超过 100 cps 的最高峰进行二级质谱扫描, 子离子扫描范围为 m/z 50~1500, 开启动态背景扣除 (DBS)。

2.4.5 数据分析 (1) 通过质谱处理工作站 (Markerview) 对数据进行筛查, 获取发酵前后样品数据的分型信息, 选择发酵前后有显著性差异 ($P<0.05$) 且离子强度差异倍数 (Fold Change) > 1.5 倍的离子作为发酵前后的差异化合物。(2) 依据精确质量数及同位素丰度比确定差异化合物的分子式, 通过与对照品和数据库的二级谱图比对以及裂解规律分析, 并结合现有文献报道^[14-20], 最终确定结构式。(3) 结合甾体皂苷的生物合成途径从差异化合物中挖掘生物转化生成重楼皂苷 I、II 和 VII 的前体物质, 解析发酵后重楼皂苷 I、II 和 VII 含量提升的机制。

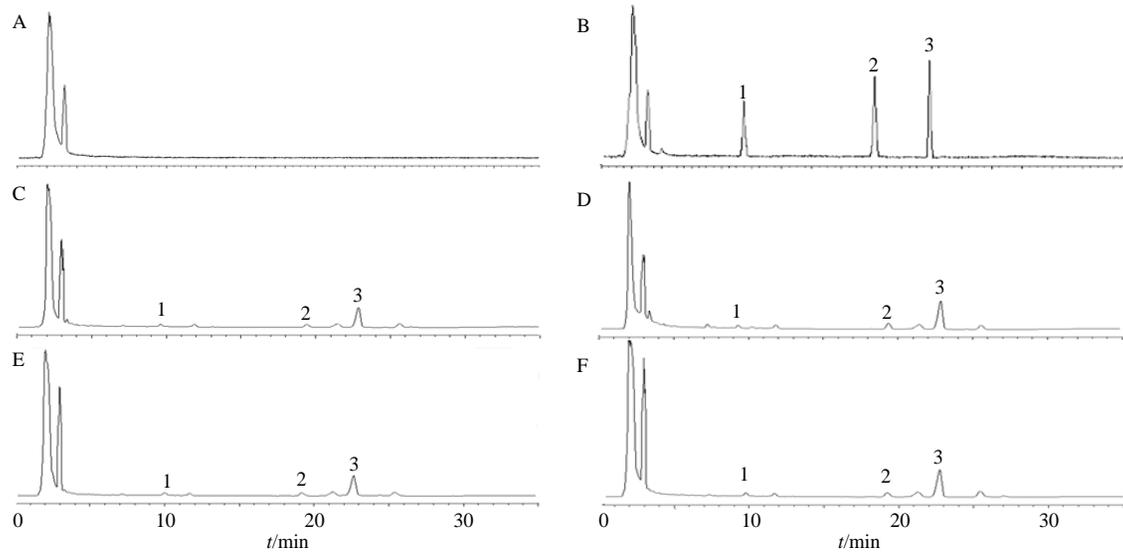
2.5 统计学处理

采用 SPSS 18.0 统计软件对数据分析和处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 T 检验, 以 P 值小于 0.05 为有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 *Fusarium-C39* 菌发酵提高滇重楼皂苷类成分的含量

重楼皂苷对照品、*Fusarium-C39* 空白菌液、滇重楼原药材、滇重楼原药材乙醇提取物、滇重楼固体发酵物、滇重楼液体发酵物的 HPLC 图见图 1, 滇重楼固体发酵物和液体发酵物中重楼皂苷的增长率见图 2。与滇重楼原药材比较, 固体发酵物和液体发酵物中总皂苷、重楼皂苷 I、重楼皂苷 II 以及重楼皂苷 VII 的含量均有显著提高。如图 2 所示, 采用固体发酵方法, *Fusarium-C39* 菌使重楼总皂苷、重楼皂苷 I、重楼皂苷 II 和重楼皂苷 VII 的含量分别提高了 60.01%、86.36%、75.60% 和 52.07%; 液体发酵物中重楼总皂苷、重楼皂苷 I、重楼皂苷 II 和重楼皂苷 VII 的含量分别提高了 28.89%、61.89%、48.81% 和 27.63%。可见, *Fusarium-C39* 菌通过发酵能够生物转化提高滇重楼中重楼皂苷成分的含量。



A-*Fusarium*-C39 发酵液 B-重楼皂苷对照品 C-重楼药材 D-重楼固体发酵物 E-重楼皂苷提取物 F-重楼液体发酵物 1-重楼皂苷 VII 2-重楼皂苷 II 3-重楼皂苷 I
A-*Fusarium*-C39 fermentation broth B-steroid saponins reference substance C-*Paridis Rhizoma* D-solid fermentation E-steroid saponins extract F-liquid fermentation 1-polyphyllin VII 2-polyphyllin II 3-polyphyllin I

图1 重楼及其发酵物中皂苷测定的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatogram of steroid saponins in *Paridis Rhizoma* and its fermenting samples

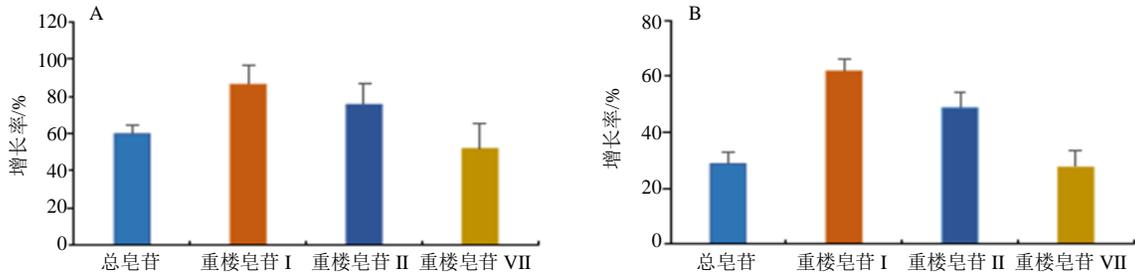


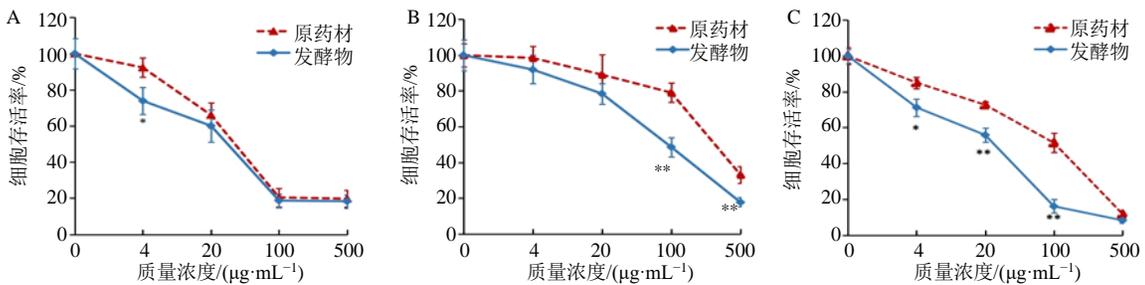
图2 *Fusarium*-C39 菌与滇重楼固体发酵 (A) 和液体发酵 (B) 对重楼皂苷的增长率

Fig. 2 Increase rate of steroid saponins by solid fermentation (A) and liquid fermentation (B) of *Fusarium*-C39 with *Paridis Rhizoma*

3.2 滇重楼固体发酵物抑制癌细胞增殖实验结果

MTT 实验结果见图 3, 在 0~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内, 滇重楼固体发酵前后的总皂苷提取物均

具有抑制肝癌 HepG2 细胞、肺癌 A549 细胞和结肠癌 HT-29 细胞增殖的作用。滇重楼原药材的总皂苷提取物对肝癌 HepG2 细胞、肺癌 A549 细胞



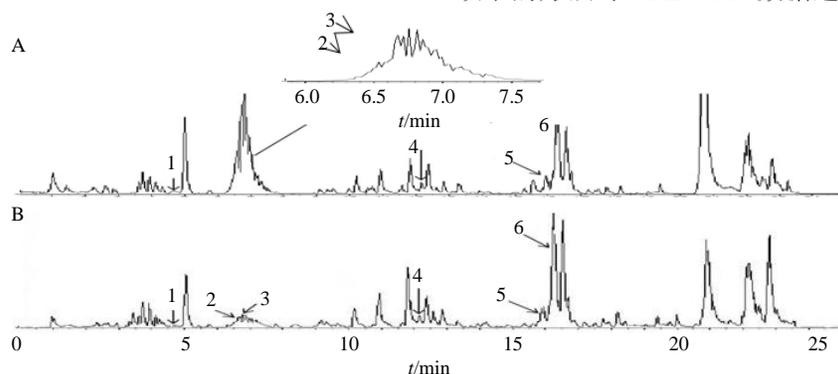
与原药材比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs *Paridis Rhizoma*

图3 *Fusarium*-C39 菌株与滇重楼发酵前后对肝癌 HepG2 细胞 (A)、肺癌 A549 细胞 (B) 和结肠癌 HT-29 细胞 (C) 增殖的影响
Fig. 3 Effects on proliferation of HepG2 (A), A549 (B) and HT-29 (C) cells before and after fermentation of *Fusarium*-C39 with *Paridis Rhizoma*

和结肠癌 HT-29 细胞的 IC₅₀ 值分别为 43.37、276.18、66.75 μg/mL，而固体发酵物的总皂苷提取物对 3 种癌细胞的 IC₅₀ 值分别下降为 24.07、87.43、17.42 μg/mL。可见与原药材相比较，滇重楼固体发酵后对癌细胞增殖的抑制作用显著增强。

3.3 发酵过程中重楼皂苷 I、II 和 VII 的生物转化分析

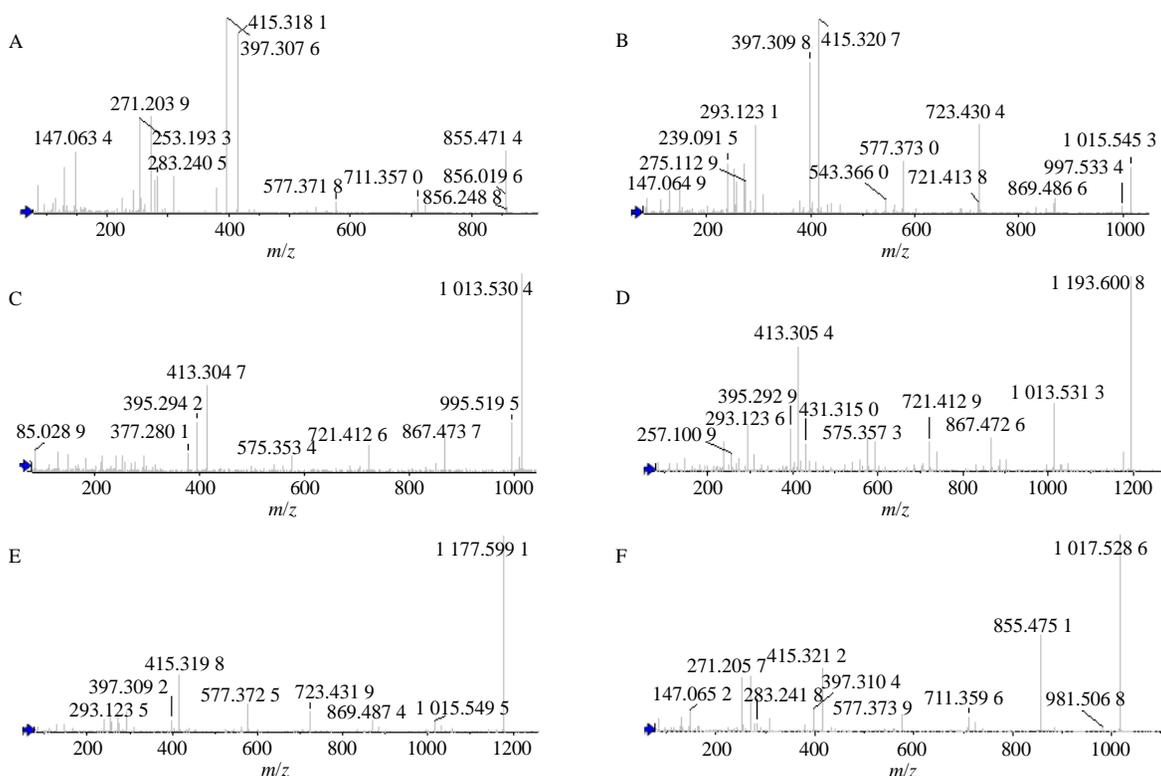
滇重楼发酵物的 UPLC-MS 总离子流图见图 4，相关化合物的 MS/MS 图见图 5，与重楼皂苷 I、II 和 VII 生物转化相关的化合物列于表 1。采用“2.4.5”项下的方法对 UPLC-MS 数据进行筛查，与原药材



1-Th 2-pseudoprototo-Pb 3-parisyunnanoside B 4-重楼皂苷 VII 5-重楼皂苷 II 6-重楼皂苷 I
1-Th 2-pseudoprototo-Pb 3-parisyunnanoside B 4-polyphyllin VII 5-polyphyllin II 6-polyphyllin I

图 4 重楼药材 (A) 和液体发酵物 (B) 供试品正离子 TIC 图

Fig. 4 TIC diagram of *Paridis Rhizoma* (A) and liquid fermentation (B) in positive ion mode



A-重楼皂苷 I B-重楼皂苷 II C-重楼皂苷 VII D-Th E-pseudoprototo-Pb F-parisyunnanoside B
A-polyphyllin I B-polyphyllin II C-polyphyllin VII D-Th E-pseudoprototo-Pb F-parisyunnanoside B

图 5 6 个生物转化相关化合物的 MS/MS 图

Fig. 5 MS/MS diagram of six compounds related to biotransformation

表 1 发酵过程中与重楼皂苷 I、II 和 VII 生物转化相关的化合物

Table 1 Compounds related to biotransformation of polyphyllin I, II and VII during fermentation

峰号	<i>t_R</i> /min	选择离子	测定值 (<i>m/z</i>)	误差 × 10 ⁻⁶	分子式	主要二级碎片离子 (MS/MS) 及来源	鉴定结果	变化趋势
1	4.63	[M+H-H ₂ O] ⁺	1 193.599 0	2.93	C ₅₇ H ₉₄ O ₂₇	1 193.596 9, 1013.533 8, 927.6557, 721.413 4, 593.3686, 431.313 1, 413.305 1	Th	下降
2	6.56	[M+H] ⁺	1 177.606 5	5.01	C ₅₇ H ₉₂ O ₂₅	1 177.599 1, 1015.549 5, 869.487 4, 723.431 9, 577.372 5, 415.319 8, 397.309 2	pseudoproto-Pb	下降
3	6.73	[M+H] ⁺	1 017.529 4	2.26	C ₅₀ H ₈₂ O ₂₂	1 017.524 4, 855.468 3, 723.430 3, 577.370 1, 415.325 8, 271.207 1, 253.197 4	parisyunnanoside B	下降
4	12.15	[M+H-H ₂ O] ⁺	1 013.536 6	4.34	C ₅₁ H ₈₂ O ₂₁	1 013.532 3, 867.472 9, 721.413 8, 575.358 4, 413.305 4, 395.294 7, 269.189 9, 251.179 1	重楼皂苷 VII	提升
5	15.88	[M+H] ⁺	1 015.551 4	3.64	C ₅₁ H ₈₂ O ₂₀	1 015.545 3, 869.486 6, 723.430 4, 577.372 9, 415.320 7, 397.309 7, 271.206 1, 253.195 4	重楼皂苷 II	提升
6	16.23	[M+H] ⁺	855.476 1	2.22	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₇	885.470 3, 723.426 2, 577.370 1, 433.256 3, 415.317 9, 397.307 4, 271.203 7, 253.193 0	重楼皂苷 I	提升

比较, 发酵后重楼皂苷 I、II 和 VII 的含量明显升高, 而化合物 Th、pseudoproto-Pb 和 parisyunnanoside B 的含量显著下降。后 3 种化合物均为甾体皂苷, 在 C₂₆ 位上连有糖基, 经过水解脱去糖基后, 开链不稳定而产生环合, 可形成螺甾结构的薯蓣皂苷。根据已有报道的甾体皂苷生物合成途径分析^[21], 推测发酵过程中, 滇重楼中的 Th、pseudoproto-Pb 和 parisyunnanoside B 等成分在 *Fusarium-C39* 真菌高表达水解酶的作用下, 其 C₂₆ 上连接的糖基首先发

生水解, 然后脱去糖基的部位再环合, 分别转化成重楼皂苷 VII、重楼皂苷 II 和重楼皂苷 I, 从而使发酵物中的 3 种重楼皂苷含量显著提升。课题组对不同发酵时间 *Fusarium-C39* 菌株转录组学分析中也发现, *Fusarium-C39* 菌株在与滇重楼发酵过程中, 羟基化、羰基化、糖基化和水解等酶的相关基因表达均上调, 发挥了结构修饰作用, 从代谢酶角度佐证了对生物转化途径的推测。化合物生物转化途径见图 6。

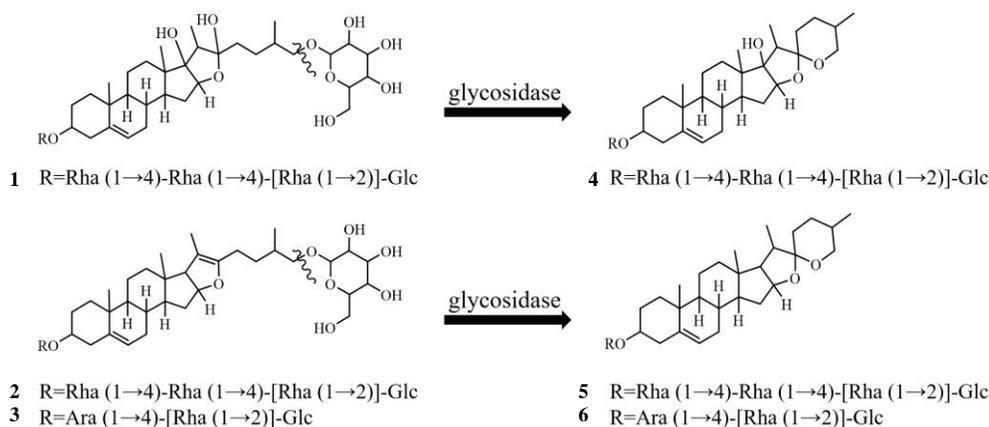


图 6 *Fusarium-C39* 菌株促进重楼皂苷 I、II 和 VII 生物转化的可能途径

Fig. 6 Proposed biotransformation pathway of polyphyllin I, II and VII catalyzed by *Fusarium-C39*

4 讨论

本研究采用微生物转化技术, 将 *Fusarium-C39* 菌与滇重楼药材共同发酵培养, 使重楼总皂苷、重楼皂苷 I、II 和 VII 的含量均大幅度提高。同时发酵后的总皂苷提取物对肝癌 HepG2 细胞、肺癌 A549 细胞和结肠癌 HT-29 细胞增殖的抑制作用也显著提升, 这与重楼皂苷 I、II 和 VII 具有抑制上述 3 种癌细胞增殖作用的文献报道相一致^[13, 22-24], 证明滇重楼发酵后抗癌活性的增强与重楼皂苷 I、II 和 VII 的含量升高有关。

Fusarium-C39 菌发酵促使滇重楼中甾体皂苷类成分含量提高的机制, 推测是由于滇重楼药材中存在着与这些甾体皂苷类成分生物合成相关的前体

物质, 当 *Fusarium-C39* 菌与滇重楼药材共培养时, 二者之间发生了交互作用。一方面, 滇重楼存在下的培养环境影响诱导 *Fusarium-C39* 菌产生了某些特殊的酶, 这些生物酶反过来又催化药材中的化学物质发生了结构改变, 促使原药材中的前体物质向甾体皂苷类成分的转化, 从而实现了发酵后甾体皂苷类成分大幅升高的结果, 同时显著提高了滇重楼的抗肿瘤作用。本实验对比了滇重楼发酵前后化学成分的变化, 对重楼皂苷 I、II 和 VII 的生物转化过程进行了分析与探讨, 发现在发生不同程度的升高或降低的多种化学成分中, 化合物 Th、pseudoproto-Pb 和 parisyunnanoside B 的变化最为显著, 参照 *Fusarium-C39* 菌株的转录组学研究结果,

结合代谢酶的分析,推测上述3种化合物为 *Fusarium*-C39 菌株生物转化提高重楼皂苷 I、II 和 VII 含量的前体物质,它们在 *Fusarium*-C39 菌株代谢酶的作用下发生了糖基水解和环化反应,分别生成了重楼皂苷 I、II 和 VII。

本研究工作证实, *Fusarium*-C39 菌株具有生物转化提高重楼皂苷 I、II 和 VII 含量的作用与能力,将 *Fusarium*-C39 菌株与滇重楼共同发酵为获取重楼皂苷 I、II 和 VII 的有效途径。甾体皂苷的生物合成过程极为复杂,迄今为止相关的生物合成途径尚未得到全面阐释,本实验的研究结果对进一步了解和揭示重楼皂苷的生物合成过程,以及重楼药材资源的深入开发和利用具有实际意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部: 2020. 78.
- [2] 杨远贵, 张霁, 张金渝, 等. 重楼属植物化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(18): 3301-3323.
- [3] Yang Y G, Zhang J, Zhao Y L, et al. Quantitative determination and evaluation of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* with different harvesting times using UPLC-UV-MS and FT-IR spectroscopy in combination with partial least squares discriminant analysis [J]. *Biomed Chromatogr*, 2017, 31(7): e3913.
- [4] 管鑫, 李若诗, 段宝忠, 等. 重楼属植物化学成分、药理作用研究进展及质量标志物预测分析 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4838-4852.
- [5] Man S L, Gao W Y, Zhang Y J, et al. *Paridis* saponins inhibiting carcinoma growth and metastasis *in vitro* and *in vivo* [J]. *Arch Pharmacol Res*, 2011, 34(1): 43-50.
- [6] 陈志红, 龚先玲, 刘义. 重楼总皂苷对人鼻咽癌细胞 CNE-2Z 周期及凋亡的影响 [J]. 中成药, 2011, 33(1): 25-29.
- [7] 保永亮, 龚晓燕, 方海雁, 等. 重楼总皂苷对人胃癌 MNK-45 和 MGC80-3 细胞增殖的影响 [J]. 安徽中医学院学报, 2012, 31(6): 51-55.
- [8] Li L M, Wu J J, Zheng F, et al. Inhibition of EZH2 via activation of SAPK/JNK and reduction of p65 and DNMT1 as a novel mechanism in inhibition of human lung cancer cells by polyphyllin I [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016, 35(1): 112.
- [9] 于思, 曹治兴, 杨雨婷, 等. 重楼皂苷 I 诱导 G₂M 期阻滞及干扰微管结构抗结肠癌 HCT116 细胞作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(6): 149-154.
- [10] Zhang C, Jia X J, Bao J L, et al. Polyphyllin VII induces apoptosis in HepG2 cells through ROS-mediated mitochondrial dysfunction and MAPK pathways [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2016, 16: 58.
- [11] 成莉, 甄艳, 陈敏, 等. 扩大重楼药用资源研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(16): 3121-3124.
- [12] 叶方, 程镇, 杨光义, 等. 紫外-可见分光光度法测定武当山区重楼属植物总皂苷的含量 [J]. 中国药师, 2015, 18(11): 1983-1985.
- [13] 颜璐璐, 张艳军, 高文远, 等. 滇重楼皂苷对 10 种肿瘤细胞株的细胞毒谱及构效关系研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(16): 2057-2060.
- [14] Zhao Y, Kang L P, Liu Y X, et al. Steroidal saponins from the rhizome of *Paris Polyphylla* and their cytotoxic activities [J]. *Planta Med*, 2009, 75(4): 356-363.
- [15] Negi J S, Bisht V K, Bhandari A K, et al. *Paris Polyphylla*: Chemical and biological perspectives [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2014, 14(6): 833-839.
- [16] Wu X, Wang L, Wang G C, et al. New steroidal saponins and sterol glycosides from *Paris Polyphylla* var. *yunnanensis* [J]. *Planta Med*, 2012, 78(15): 1667-1675.
- [17] Wu X, Wang L, Wang G C, et al. Triterpenoid saponins from rhizomes of *Paris Polyphylla* var. *yunnanensis* [J]. *Carbohydr Res*, 2013, 368: 1-7.
- [18] Wu X, Wang L, Wang H, et al. Steroidal saponins from *Paris Polyphylla* var. *yunnanensis* [J]. *Phytochemistry*, 2012, 81: 133-143.
- [19] Kang L P, Liu Y X, Eichhorn T, et al. Polyhydroxylated steroidal glycosides from *Paris Polyphylla* [J]. *J Nat Prod*, 2012, 75(6): 1201-1205.
- [20] Wu X, Chen N H, Zhang Y B, et al. A new steroid saponin from the rhizomes of *Paris Polyphylla* var. *yunnanensis* [J]. *Chem Nat Compd*, 2017, 53(1): 93-98.
- [21] Nakayasu M, Kawasaki T, Lee H J, et al. Identification of furostanol glycoside 26-O- β -glucosidase involved in steroidal saponin biosynthesis from *Dioscorea esculenta* [J]. *Plant Biotechnol*, 2015, 32(4): 299-308.
- [22] Zhang C, Jia X J, Bao J L, et al. Polyphyllin VII induces apoptosis in HepG2 cells through ROS-mediated mitochondrial dysfunction and MAPK pathways [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2016, 16: 58.
- [23] Feng F F, Cheng P, Wang C C, et al. Polyphyllin I and VII potentiate the chemosensitivity of A549/DDP cells to cisplatin by enhancing apoptosis, reversing EMT and suppressing the CIP2A/AKT/mTOR signaling axis [J]. *Oncol Lett*, 2019, 18(5): 5428-5436.
- [24] You L, Geng H, Yang X, et al. The comparison analysis of polyphyllin I and its analogues induced apoptosis of colon and lung cancer cells via mitochondrial dysfunction [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2021, 129(1): 15-25.

[责任编辑 时圣明]