

蛹虫草培养基多糖的提取及抗肿瘤活性研究

孙叶^{1,2}, 包建忠¹, 刘红³, 马辉¹, 张甜¹, 陈秀兰^{*1}

(1. 江苏里下河地区农业科学研究所, 江苏 扬州 225007; 2. 扬州大学 动物科学技术学院, 江苏 扬州 225009; 3. 扬州循天岭生物科技有限公司, 江苏 扬州 225007)

摘要: 为综合利用蛹虫草小麦培养基, 研究培养基多糖的提取和开发。在热回流水提法和超声波水提法单因素试验的基础上, 采用热回流水提法正交试验筛选蛹虫草小麦培养基粗多糖最佳的提取工艺; 用 MTT 法检测了不同处理提纯多糖的抗肿瘤活性。结果表明热回流水提法提取培养基粗多糖效果优于超声波水提法; 提取温度 100 ℃、料液比 1 g:25 mL、提取 3 次、每次提取时间 90 min, 为最佳培养基粗多糖提取工艺; 影响粗多糖提取效率的 4 个因素的主次关系是: 提取温度>提取时间>提取次数>料液比; 粗多糖的得率随着醇沉浓度的提高而提高。MTT 试验发现质量浓度为 5 mg/mL、培养时间 72 h, 培养基脱脂脱蛋白多糖 A 对 HepG2 肝癌细胞抑制率可达到 83.02%, 培养基脱脂多糖 B 的抑制率可达到 75.39%, 培养基未脱脂脱蛋白粗多糖 C 抑制率为 30.61%, 提纯多糖表现出较高的抑制率; 100 ℃热回流水提蛹虫草子实体脱脂脱蛋白多糖 F, 质量浓度为 5 mg/mL、培养 72 h 后, 对 HepG2 细胞抑制率平均值达到 92.974%, 与对照顺铂(SB)无显著差异, 与多糖 A 差异显著。

关键词: 蛹虫草; 培养基; 多糖; 抗肿瘤

中图分类号: TS 201.2 文章编号: 1673-1689(2019)04-0118-09 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.04.018

Research on Extraction and Antineoplastic Activity of Polysaccharide in Culture Medium of *Cordyceps militaris*

SUN Ye^{1,2}, BAO Jianzhong¹, LIU Hong³, MA Hui¹, ZHANG Tian¹, CHEN Xiulan^{*1}

(1. Institute of Agricultural Sciences of Lixiahe Districts, Yangzhou 225007, China; 2. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 3. Company of Yangzhou Xuntianlin Biological Technology, Yangzhou 225007, China)

Abstract: The extraction and development of polysaccharide was researched to multipurpose use of cordyceps militaris culture medium with wheat. This article studied the optimum extraction process of coarse polysaccharide in cordyceps militaris culture medium through the orthogonal factor experiment on hot reflux water on the base of single factor experiment on hot reflux water and ultrasonic extraction, researched the antitumor activity of polysaccharide purified by cordyceps militaris culture medium by MTT method. The results showed that hydrothermal refluxing extraction is better than supersonic water extraction on the basis of the results of single factor experiment. The

收稿日期: 2016-10-23

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金项目(CX(12)5069); 中央财政农业技术推广项目(TG(16)109)。

* 通信作者: 陈秀兰(1956—), 女, 农学学士, 研究员, 主要研究方向为辐射诱变。E-mail: yzchxl@163.com

引用本文: 孙叶, 包建忠, 刘红, 等. 蛹虫草培养基多糖的提取及抗肿瘤活性研究[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(04): 118-126.

results of orthogonal test showed the optimal technological conditions for the extraction conditions of coarse polysaccharide of were as follow: extracting temperature was 100 °C , material-water ratio was 1:25 , extracting times was three and time was 90 min. The primary and secondary relationships of four Factors influencing the efficiency of extraction coarse polysaccharide are: extraction temperature > extraction time > extraction times > solid-liquid ratio. The coarse polysaccharide yield increased with the increasing of concentration of alcohol. The MTT test found the polysaccharide purified by different processing has inhibitory effect on the liver cancer cells, 5 mg/mL concentration of polysaccharide, effect time for 72 h, inhibition rate of polysaccharide gained by degreasing and deproteinization from culture medium of *Cordyceps militaris* for hepg2 cells can reach 83.02% , inhibition rate of polysaccharide gained by degreasing medium for hepg2 cells can reach 75.39% , inhibition rate of polysaccharide gained without degreasing and deproteinization for hepg2 cells can reach 30.61% , purified polysaccharide showed higher inhibition rate. The polysaccharide extracted by *cordyceps militaris* fruiting body with 100 °C hot reflux water , 5 mg/mL concentration of polysaccharide, training after 72 hours, the inhibition rate reached 92.974% on Hepg2 cell, there was no significant difference compared with SB, but was significant difference compared with polysaccharide gained by degreasing and deproteinization from culture medium of *Cordyceps militaris*.

Keywords: *Cordyceps militaris* , culture medium , polysaccharide , antineoplastic

蛹虫草(*Cordyceps militaris* L Link), 俗称北冬虫夏草, 是虫草属的模式种。蛹虫草子实体采收后的培养基富含菌丝体和子实体残留以及其他代谢物质^[1], 可作为原料直接用于酿造食品^[2]、饲料^[3-4]、肥料等开发; 二次发酵可生产杀虫真菌制剂等产品; 蛹虫草培养基的综合利用能变废为宝, 为企业增加效益。目前蛹虫草培养基活性物质的提取分离^[5-8]是研究的热点, 蛹虫草大米培养基多糖提取方法有浸提法、热回流水提法、超声波提取、微波提取等, 在此基础上, 还发展了酶提等方法^[9-12]。目前小麦培养基的生产规模在不断扩大, 但小麦培养基多糖提取与开发的研究相对较少。

药用真菌多糖的抗肿瘤活性已被广泛认可^[13-14], 蛹虫草子实体或菌丝体提取物具有调节免疫系统, 抗肿瘤, 抗衰老, 抗感染, 降血糖、血脂, 治疗艾滋病等作用^[14-19], 蛹虫草培养基多糖是否也有这些功效还有待研究。肝癌是现代恶性程度和发病率较高的恶性肿瘤, 针对肝癌的药物、保健品开发十分重要。有研究证明蛹虫草水提物可通过线粒体途径抑制 HepG2 肝癌细胞和 MCF-7 人乳腺癌细胞的生长^[20], 高纯度虫草素有直接抗 HepG2 肝癌细胞的作用^[21-22], 蛹虫草的其他活性物质对 HepG2 肝癌细胞是否也有相同作用值得研究探讨。MTT 法被公认

为是抗肿瘤药物大规模粗筛的有效方法, 用 MTT 法研究蛹虫草多糖抗肿瘤效果已有一定进展^[23-25]。本实验首次以蛹虫草小麦培养基为原料, 通过热回流水提法正交试验确定多糖的最佳提取工艺, 并利用 MTT 法研究不同提纯处理的培养基多糖对肝癌细胞的抑制作用, 并与蛹虫草子实体多糖进行比较, 研究结果对蛹虫草小麦培养基多糖的开发利用有一定的参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料 蛹虫草培养基由扬州循天岭生物科技有限公司提供。试验用细胞株: HepG2 肝癌细胞(上海中科院)。

无水乙醇、氯仿、正丁醇等均为国药分析纯, 胎牛血清、DMEM 高糖细胞培养基及 0.05% 胰酶细胞消化液购自 Gibco 公司, 青霉素链霉素混合液及四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自 Sigma 公司, 顺铂冻干粉每支 10 mg 购自上海源叶生物技术有限公司, 二甲基亚砜(DMSO)购自 AMRESCO 公司。

1.1.2 设备 TGL-16M 低温高速离心机, 上海沪湘仪公司产品; RE-201D 旋转蒸发器, 郑州特尔仪器设备有限公司产品; CU600 型电热恒温水箱, 上海

越平科学仪器有限公司产品；电热恒温鼓风干燥箱,上海一恒科技有限公司产品;BS124S 电子天平,赛多利斯科学仪器北京有限公司产品;SOW-25DI 冷冻高速微粉机,山东三清不锈钢设备有限公司产品;Ps-250 万能破碎机,南京威利朗食品机械有限公司产品;RY-NSG-20LC 超声波提取浓缩机,海锐元机械设备有限公司产品;Thermo Multiskan Go 全波长酶标仪,赛默飞世尔科技公司产品;Telstar Lyoquest-55 冻干机,西班牙泰事达公司产品;LKTC-B1-T 水浴恒温振荡器,常州国华电器有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 小麦培养基的获得 小麦、蚕蛹粉和营养液(葡萄糖 15 g,蛋白胨 10 g,磷酸二氢钾 1 g,硫酸镁 1 g,VB1 1 mg,加水定容至 1 000 mL,pH 值自然),按质量比(25:2:50)加入玻璃瓶中,封口,高温高压 121 ℃灭菌 60 min,放凉备用。培养基无菌环境下接蛹虫草菌种 B6,培养子实体,子实体采收后,培养基烘干至含水质量分数小于 10%后,密封保存备用。

1.2.2 水热回流提取法提取蛹虫草粗多糖 取 2 g 一定目数蛹虫草培养基粉末,用蒸馏水热回流重复提取数次,合并滤液,用旋转蒸发器进行减压浓缩至 1 g:10 mL,冷却后加入 3 倍量乙醇使其沉淀,离心后倾出上清液,沉淀加少量水溶解,加入 2 倍量乙醇使其沉淀,将最后沉淀物用蒸馏水溶解,并定容于 50 mL 容量瓶中,用苯酚硫酸法^[26]测定蛹虫草多糖含量。单因素试验设计:①培养基物料大小的影响。固定提取温度为 80 ℃,提取时间 120 min,提取 2 次,料液比(1 g:20 mL),物料大小设定为 20、40、60、80、100、200 目,6 个水平。②料液比影响。固定培养基目数为 60 目,提取温度为 80 ℃,提取时间 120 min,提取 2 次,料液比(g/mL)设定为 1:10、1:15、1:20、1:25,4 个水平。③提取温度的影响。固定培养基目数为 60 目,提取时间 120 min,提取 2 次,料液比设定为 1 g:20 mL,提取温度设为 60、80、100 ℃,3 个水平。④提取时间的影响。固定培养基目数为 60 目,提取温度为 80 ℃,提取 2 次,料液比设定为 1 g:20 mL,提取时间设定为 60、120、180 min,3 个水平。⑤提取次数的影响。固定培养基目数为 60 目,浸提温度为 80 ℃,提取时间为 120 min,料液比设定为 1 g:20 mL,设定提取次数为 1、2、3 次,3 个水平。

每水平 3 次重复。

1.2.3 超声波水提法提取蛹虫草粗多糖 取 2 g 蛹虫草二茬培养基粉末,室温 20 ℃,用倍量体积蒸馏水于超声提取器中超声提取数次,合并滤液,用旋转蒸发器进行减压浓缩至 1:10(g/mL),冷却后加入 3 倍量乙醇使其沉淀,离心后倾出上清液,沉淀加少量水溶解,加入 2 倍量乙醇使其沉淀,将最后沉淀物用蒸馏水溶解,并定容于 50 mL 容量瓶中,用苯酚硫酸法测定蛹虫草多糖含量。单因素试验设计:①料液比影响。固定培养基目数为 60 目,超声波时间为 60 min,浸提 2 次,料液比(g/mL)设定为 1:10、1:15、1:20、1:25,4 个水平。②超声波时间的影响。固定培养基目数为 60 目,超声波提取 2 次,料液比设定为 1 g:20 mL,超声波时间为 30、60、90 min,3 个水平。③提取次数的影响。固定培养基目数为 60 目,超声波时间为 60 min,料液比设定为 1 g:20 mL,设定提取次数为 1、2、3 次,3 个水平。每水平 3 次重复。

1.2.4 不同乙醇体积分数对粗多糖得率的影响 利用热回流水提法单因素试验获得的最佳工艺提取粗多糖浓缩液,设定醇沉体积分数为 50%、60%、70%、80%、90%,5 个水平 3 次重复,沉淀过夜,4 000 r/min 常温离心,倾出上清液,冷冻干燥,获得粗多糖质量,计算粗多糖得率。

1.2.5 热回流水提法提取蛹虫草培养基粗多糖正交试验设计 在单因素试验的基础上,利用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计方案优化水热回流提取法提取蛹虫草二茬培养基多糖最佳工艺参数,因素水平设计见表 1。

表 1 正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels in orthogonal design

水平编号	A 提取温度/℃	B 提取次数	C 提取时间/min	D 料液比(g/mL)
1	80	2	90	1:15
2	90	3	120	1:20
3	100	4	150	1:25

1.2.6 蛹虫草培养基去脂去蛋白质多糖 A 和去脂粗多糖 B、水提醇沉粗多糖 C 的获得 称量 60 目的蛹虫草培养基 5 g,3 次重复,1 g:10 mL 乙醇去脂处理,离心去乙醇后 40 ℃烘干,料液比 1 g:25 mL,100 ℃热回流提取 3 次、提取时间 90 min、体积分数 80%乙醇、醇沉,离心倾出上清液,沉淀溶于少量蒸

馏水,加 2 倍体积乙醇,醇沉离心,重复 1 次,沉淀用无水乙醇、丙酮、乙醚各清洗 1 次,获得沉淀一半冷冻干燥获得去脂粗多糖 B;一半溶于少量蒸馏水,saveage(氯仿:正丁醇=4:1,体积比)去蛋白质 5 次,加 3 倍无水乙醇,离心,沉淀冷冻干燥,获得去脂去蛋白质多糖 A。

称量 60 目培养基 5 g,3 次重复,料液比 1 g:25 mL,100 ℃热回流提取 3 次、提取时间 90 min、体积分数 80%乙醇、醇沉,离心倾出上清液,沉淀溶于少量蒸馏水,加 2 倍体积乙醇,醇沉离心,重复 1 次,沉淀用无水乙醇、丙酮、乙醚各清洗 1 次,沉淀干燥获得水提醇沉粗多糖 C。

1.2.7 蛹虫草子实体不同处理获得提纯多糖 称量蛹虫草 B6 菌种培养的 100 目子实体粉 5 g,3 次重复,质量比 1:10 乙醇去脂去蛋白处理,离心去乙醇后 40 ℃烘干,料液比 1 g:25 mL,60、80、100 ℃热回流提取 3 次、提取时间 90 min、体积分数 80%乙醇、醇沉,离心倾出上清液,沉淀溶于少量蒸馏水,加 2 倍体积乙醇,醇沉离心,重复 1 次,沉淀用无水乙醇、丙酮、乙醚各清洗 1 次,saveage(氯仿:正丁醇=4:1,体积比)去蛋白质 5 次,加 3 倍无水乙醇,离心,沉淀用无水乙醇、丙酮、乙醚各清洗 1 次,沉淀冷冻干燥获得去脂去蛋白质多糖 D、E、F。

采用菌种 B6 培养的 100 目蛹虫草子实体粉 5 g,3 次重复,料液比 1 g:25 mL,80 ℃热回流提取 3 次、提取时间 90 min、体积分数 80%乙醇醇沉,离心倾出上清液,沉淀溶于少量蒸馏水,加 2 倍体积乙醇,醇沉离心,重复 1 次,沉淀用无水乙醇、丙酮、乙醚各清洗 1 次,沉淀干燥获得子实体水提醇沉粗多糖 G。

1.2.8 MTT 比色法测定提取多糖抗肿瘤活性 配置加体积分数 10%牛血清的 DMEM 培养基,培养肝癌 Hepg2 细胞至对数生长期,用体积分数 0.05%胰酶消化,加含体积分数 10%牛血清的 DMEM 培养液吹打成细胞悬液,调整细胞浓度至 1.0×10^4 每孔后,接种于 96 孔板中,每孔接种 200 μ L 细胞悬液,37 ℃,体积分数 5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h 后,弃培养液,给药组分别加入 200 μ L 质量浓度分别为 0.25、0.5、1、2.5、5 mg/mL 的药物 A、B、C、D、E、F、G,对照组则加入等体积的完全培养基,阳性对照加质量浓度为 20 μ g/mL 顺铂,每组设 6 个复孔,置于 37 ℃、5% CO₂ 条件下培养 24、48、72 h。每孔加入 10 μ L 浓度为 5 mg/mL MTT 试剂培养 4 h。小心弃去上清

液,每孔加入 100 μ L DMSO,振荡 10 min,再用酶标仪测定 OD₄₉₂,由测得的吸光度计算抑制率。

$$I = (\text{OD}_0 - \text{OD}_1) / \text{OD}_0 \times 100\% \quad (1)$$

式(1)中, I 为抑制率; OD_0 为对照组 OD 值; OD_1 为给药组 OD 值。

1.2.9 数据处理 试验数据用统计学方法进行处理,单因素、二因素方差分析、正交试验结果的极差分析、方差分析、图表制图采用 SPSS 19.0、Excel 软件制作分析。

2 结果与分析

2.1 粗多糖提取单因素试验

2.1.1 物料颗粒大小、提取温度对热回流水提法提取粗多糖含量的影响 由表 2 可知,采用热回流水提法提取蛹虫草培养基粗多糖,物料大小从 20~60 目,粗多糖质量分数增加明显,差异显著;60~100 目后粗多糖含量趋于平稳,无显著差异,200 目粗多糖质量分数明显降低。

粗多糖质量分数随着提取温度提高而增加,提取温度 80 ℃时粗多糖质量分数较提取温度 60 ℃时有明显提高且差异显著,但较提取温度 100 ℃时粗多糖质量分数无显著差异。

表 2 物料大小、提取温度对粗多糖质量分数影响

Table 2 Effect of diameter of materials and extraction temperature on the content of coarse polysaccharide

目数	多糖质量分数/%	差异显著性	提取温度/℃	多糖质量分数/%	差异显著性
20	6.209	a	60	17.572	a
40	18.137	b	80	21.172	b
60	19.298	c	100	21.340	b
80	19.245	c	—	—	—
100	19.297	c	—	—	—
200	17.964	b	—	—	—

注:不同小写字母表示显著性差异($P < 0.05$)

2.1.2 时间对热回流水提法和超声波水提法提取粗多糖含量的影响 由表 3 可知,物料大小 60 目、提取温度为 80 ℃、提取 2 次、料液比 1 g:20 mL、热回流提取法的提取时间为 120 min 时粗多糖得率最高,较提取时间为 60 min 和 180 min,有显著差异。

物料大小 60 目、提取 2 次时、料液比 1 g:20 mL,室温超声波水提法提取时间 30 min 粗多糖质量分

数较高,与提取时间 60 min 处理有显著差异,与提取时间 90 min 处理无显著差异。在料液比、物料大小、提取时间同为 60 min 时,热回流水提法提取粗多糖质量分数明显高于超声波水提法。

表 3 提取时间对粗多糖质量分数影响

Table 3 Effect of extraction time on the content of coarse polysaccharide

提取时间/min	热回流提取多糖质量分数/%	提取时间/min	超声波提取多糖质量分数/%
60	18.199 ^a	30	10.367 ^b
120	20.952 ^b	60	7.444 ^a
180	16.928 ^a	90	11.043 ^{7b}

注:不同小写字母表示显著性差异($P<0.05$)

2.1.3 料液比对热回流水提和超声波水提粗多糖质量分数的影响 由表 4 可知,热回流水提法,提取时间为 120 min、物料大小 60 目、提取温度为 80 ℃、提取 2 次,料液比为 1 g:20 mL 时粗多糖质量分数最高,较料液比 1 g:10 mL 和 1 g:15 mL 有显著差异;与料液比为 1 g:25 mL 时粗多糖质量分数无显著差异。

超声波水提法,提取时间 30 min、物料大小 60 目、室温提取 2 次,料液比为 1 g:25 mL 时粗多糖质量分数最高,较其他处理差异显著。

表 4 料液比对粗多糖质量分数影响

Table 4 Effect of ratio of material to solvent raw (w/v) on the content of coarse polysaccharide

料液比	热回流提取多糖质量分数/%	超声波提取多糖质量分数/%
V(1:10)	19.053 ^a	6.681 ^a
V(1:15)	19.141 ^a	6.633 ^a
V(1:20)	20.756 ^b	9.210 ^b
V(1:25)	19.679 ^{ab}	12.073 ^c

注:不同小写字母表示显著性差异($P<0.05$)

2.1.4 热回流水提和超声波水提提取次数对粗多糖质量分数的影响 由表 5 可知,在料液比 1 g:20 mL、物料大小 60 目,提取温度为 80 ℃、提取时间 120 min,热回流提取 3 次时粗多糖质量分数较高,较提取 2 次处理无显著差异,与提取 1 次处理有显著差异。

在料液比 1 g:20 mL、物料大小 60 目、提取时间 30 min 时,室温超声波提取 3 次时粗多糖质量分数最高,较提取 1 次和提取 2 次粗多糖质量分数有显

著差异。

表 5 提取次数对粗多糖质量分数影响

Table 5 Effect of extraction number on the content of coarse polysaccharide

提取次数	热回流提取多糖质量分数/%	超声波提取多糖质量分数/%
1	17.173 ^a	5.258 ^a
2	19.889 ^b	8.558 ^b
3	20.731 ^b	15.244 ^c

注:不同小写字母表示显著性差异($P<0.05$)

2.1.5 乙醇浓度对热回流水提培养基粗多糖得率的影响 由表 6 可知,热回流法提取蛹虫草培养基多糖,醇沉浓度越高,粗多糖得率越高,醇沉体积分数 60%~70% 时,粗多糖得率无显著差异,醇沉体积分数 90% 时,粗多糖得率最高,达 25.146%,与其他处理有显著差异。

表 6 醇沉浓度对粗多糖得率的影响

Table 6 Effect of extraction number on the content of coarse polysaccharide

乙醇体积分数/%	粗多糖得率/%
50	17.629 ^{3a}
60	18.535 ^{0^{ab}}
70	19.451 ^{7^b}
80	20.823 ^{0^c}
90	25.146 ^{0^d}

注:不同小写字母表示显著性差异($P<0.05$)

2.2 正交试验优化提取工艺

由方差分析可知,影响提取多糖含量的因素中提取温度、提取次数、提取时间、料液比对提取蛹虫草二茬培养基粗多糖的提取率具有显著的影响,4 个因素的主次关系是:提取温度>提取时间>提取次数>料液比。通过邓肯多重比较和边际均值的直观图和经济成本的考虑,确定提取蛹虫草培养基粗多糖的最佳工艺为 $A_3B_2C_1D_3$,即提取温度为 100 ℃、提取 3 次、提取 90 min、料液比 1 g:25 mL。该工艺为正交试验 8 号处理,多糖质量分数平均值为 34.724 g/hg,为正交试验所有处理中最高,提取工艺优良得到了验证(表 7、8,图 1)。2015 年王雪等^[10]利用超声波—酶法所得蛹虫草大米基质多糖的得率为 30.27%,数据偏高是因为小麦培养基多糖组成复杂,既有菌丝体多糖、子实体多糖、小麦淀粉,也有虫草生长过程中转化的产生的多糖。已有除淀粉的

表 7 正交表 $L_9(3^4)$ 及实验结果

Table 7 Orthogonal table and experimental results

水平	A 提取温度/℃	B 提取次数	C 提取时间/min	D 料液比(质量体积比)	粗多糖质量分数/%		
1	1	1	1	1	20.902	20.277	21.691
2	1	2	2	2	21.193	21.601	19.731
4	1	3	3	3	23.738	22.185	22.326
4	2	1	2	3	18.528	18.219	17.913
5	2	2	3	1	22.985	21.901	22.934
6	2	3	1	2	18.804	18.310	18.572
7	3	1	3	2	31.553	30.511	30.189
8	3	2	1	3	32.981	35.384	35.807
9	3	3	2	1	23.634	23.558	22.898

表 8 正交试验结果方差分析

Table 8 Analysis of variance of orthogonal experiment

源	III 型平方和	自由度	均方	<i>F</i>	Sig.
校正模型	736.606 ^a	8	92.076	143.334	0
截距	1 5092.878	1	15 092.878	23 495.081	0
<i>A</i>	494.488	2	247.244	384.885	0
<i>B</i>	92.392	2	46.196	71.913	0
<i>C</i>	110.245	2	55.123	85.809	0
<i>D</i>	39.481	2	19.740	30.730	0
误差	11.563	18	.642		
总计	15 841.047	27			
校正的总计	748.169	26			

a. $R^2=0.991$ (调整 $R^2=0.987$)

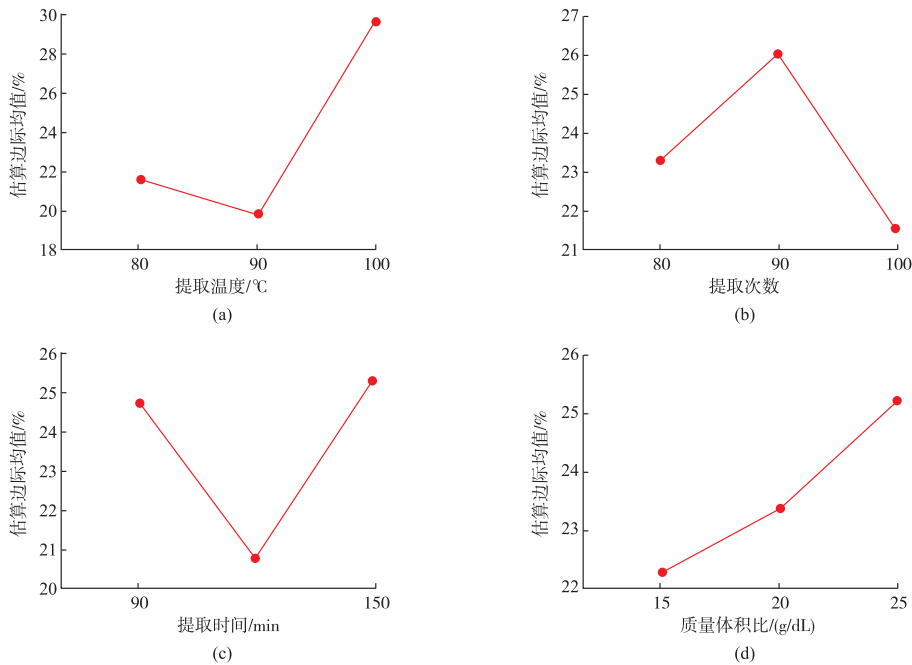


图 1 不同处理的粗多糖质量分数的估算边际均值

Fig. 1 Mean estimate the marginal average about content of coarse Polysaccharide of different treatments

相关研究^[9],本研究认为培养基淀粉具有一定的营养价值,除淀粉工艺需要从产品安全性、营养价值和开发成本综合考虑。

2.3 蛹虫草培养基提取多糖和子实体多糖对 Hepg2 肿瘤细胞的生长抑制作用

采用 MTT 法测定蛹虫草培养基、子实体多糖提取物对 Hepg2 肿瘤细胞的生长抑制作用,实验结果如图 2、3 所示。①药物质量浓度 5 mg/mL 时,所有药物对 Hepg2 肿瘤细胞的抑制率与培养时间呈正相关;培养 72 h 后,培养基脱脂蛋白多糖 A 的抑制率为 83.02%,培养基脱脂多糖 B 的抑制率为 75.388%,培养基粗多糖 C 的抑制率为 30.612%;100 °C 热回流水提蛹虫草子实体脱脂蛋白多糖 F72 h 培养后,对 Hepg2 细胞抑制率平均值达到

92.974%,超过了对照 SB 对 Hepg2 细胞抑制率,80 °C 热回流水提蛹虫草子实体多糖 G72 h 培养后,对 Hepg2 细胞抑制率平均值为 67.09%,子实体多糖对肝癌细胞的抑制率与水提温度呈正相关。②质量浓度为 2.5~5 mg/mL,作用时间为 72 h,多糖 A 对 HepG2 肝癌细胞的抑制率好于多糖 B,而质量浓度为 0.25~1 mg/mL 的抑制率则相反,但绝对值较低。③药物质量浓度 2.5 mg/mL 时,D、E、F、G,在 48、72 h 培养后,对 Hepg2 细胞抑制率均为正效应;药物 F、G,在 48、72 h 培养后,所有质量浓度对 Hepg2 细胞抑制率均为正效应。④药物质量浓度 1~0.25 mg/mL 时,24 h 培养后 D、E、F、G 对 Hepg2 细胞抑制率均为负效应。⑤除 D 外,所有药物培养 72 h 后,对 Hepg2 细胞抑制率与浓度呈正相关。

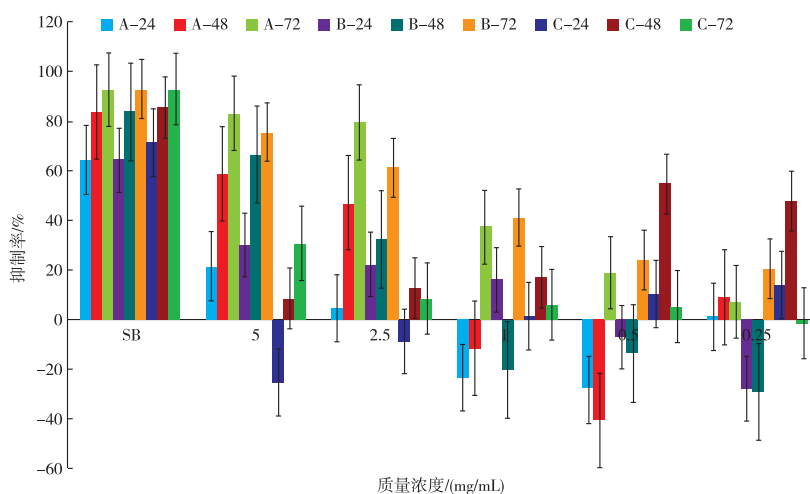


图 2 蛹虫草培养基提取物及对照 SB 对 Hepg2 肿瘤细胞的平均抑制率

Fig. 2 Production of mean estimate the marginal about different treatments

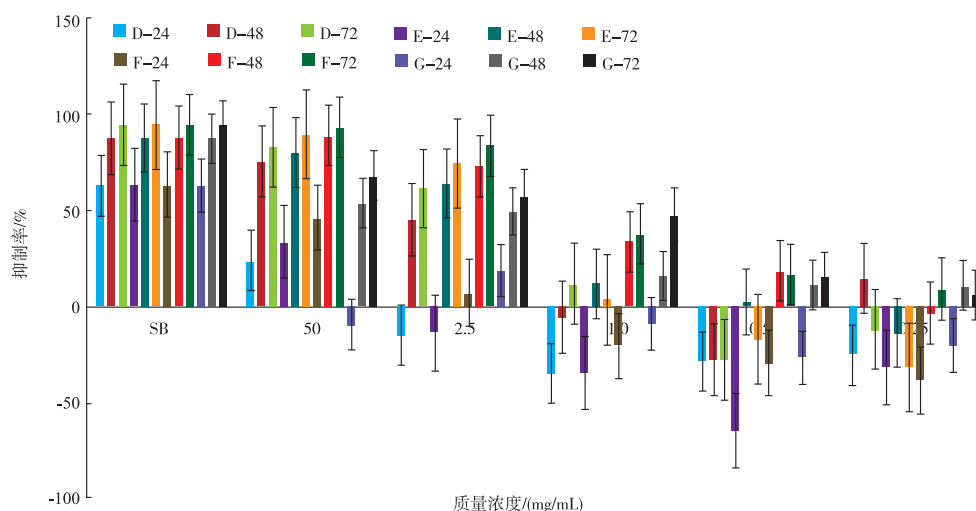


图 3 蛹虫草子实体提取物及对照 SB 对 Hepg2 肿瘤细胞平均抑制

Fig. 3 Production of mean estimate the marginal about different treatments

由表 9 可知,培养 72 h 后,多糖 A 和 F 质量浓度为 5、2.5 mg/mL 时,对 HepG2 细胞抑制率差异显著,质量浓度为 1~0.25 mg/mL 时,对 HepG2 细胞抑制率差异不显著;但多糖 A 和 F 各自不同质量浓度处理对 HepG2 细胞抑制率差异显著,且抑制率与多糖质量浓度呈正相关。

表 9 培养 72 h 后多糖 F 和多糖 A 对 HepG2 肿瘤细胞的平均抑制率

Table 9 Average inhibition rate of against HepG2 tumor cell of F and A polysaccharide A after 72 h training

质量浓度	多糖 A 抑制率/%	多糖 F 抑制率/%
SB(20 μ g/mL)	93.938 ^f	94.312 ^f
5 mg/mL	83.02 ^e	92.973 ^f
2.5 mg/mL	79.735 ^d	83.791 ^e
1 mg/mL	37.143 ^c	37.49 ^c
0.5 mg/mL	18.898 ^b	16.765 ^b
0.25 mg/mL	6.857 ^a	9.1635 ^a

注:不同小写字母表示所有处理显著性差异($P<0.05$)

蛹虫草子实体多糖抗肿瘤研究较多,效果也比较肯定。蛹虫草基质多糖研究证明蛹虫草基质多糖对酒精诱导的小鼠急性、亚急性肝损伤有明显的保护作用^[27],抗肿瘤作用的相关研究尚少见报道。JING 等^[28]从蛹虫草分离出一种新的低分子多糖(CMP-1),作用于 HepG2 肝癌细胞 48 h 后,IC₅₀ 值为 0.176 3 mg/mL。本试验多糖复合物 A、B、D、E、F、G 在浓度小于 1 mg/mL 时,作用于 HepG2 肝癌细胞 48 h 后,抑制率均未超过 50%,可以推测多糖成分的纯化,一定程度上有利于对肿瘤抑制率的提高。同时葛晓宇^[29]发现纯化获得质量浓度为 2 mg/mL 的

蛹虫草子实体酸性多糖(F2),培养 48 h 后,对 HepG2 肝癌细胞的抑制率达到 27.9%。本试验质量浓度为 2.5 mg/mL 培养基脱脂脱蛋白质多糖(A),作用于 HepG2 肝癌细胞 48 h,制率达 73.238%,培养 72 h 后抑制率达 79.735%,培养基提纯多糖表现出较高的抑制率。

3 结 语

多糖的提取、分离和纯化是相对复杂的工艺,多糖纯度越高,提取成本越高。自然提取多糖产品开发需要综合考虑开发产品的功效、成本和安全,本试验旨在为最大限度提高产品的性价比提供一定的参考。本研究对蛹虫草小麦培养基通过热回流提取法、超声波提取多糖单因素试验进行比较,得出热回流提取法提取多糖效果较优,这与以往研究结果^[5-7]一致。本试验以蛹虫草小麦培养基为原料,通过热回流提取法正交试验结合提取成本优化粗多糖提取工艺。结果表明提取温度 100 $^{\circ}$ C、料液比 1:25、提取 3 次、每次提取时间 90 min,为蛹虫草小麦培养基粗多糖最佳提取工艺。不同提纯处理后获得的培养基多糖通过 MTT 试验检测其对 HepG2 肝癌细胞抑制率,结果表明质量浓度为 5 mg/mL、培养时间 72 h 时,培养基提纯多糖表现出较高的抑制率,培养基脱脂脱蛋白质多糖 A 对 HepG2 肝癌细胞抑制率>脱脂多糖 B>未脱脂脱蛋白质粗多糖 C;多糖抑制率与浓度和作用时间呈正相关,在一定范围增加粗多糖的浓度和作用细胞时间,有利于对肿瘤细胞抑制率的提高。

参考文献:

- [1] HU Shan, LUO Huajian, HUANG Hao, et al. Research progress on the comprehensive use of residual *Cordyceps militaris* culture medium[J]. *Edible Fungi*, 2014, 36(2): 1-3. (in Chinese)
- [2] ZHANG Jie, ZHANG Ying, ZHAO Bo, et al. Effect of *Cordyceps militaris* culture medium addition on soy sauce koji-making and enzyme activities[J]. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 2015, 41(3): 276-280. (in Chinese)
- [3] GUO Peihong, SONG Xuehong, SUN Liping, et al. Optimal supplementation level of residual *Cordyceps militaris* culture medium for feeding Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. *Freshwater Fisheries*, 2011, 41(3): 43-49. (in Chinese)
- [4] SUN Yongxin, WEN Zhixin, LI Yajie, et al. Effects of *Cordyceps militaris* culture medium addition to fodder on growth performance and digestive enzyme activity of *stichopus japonicas* [J]. *China Feed*, 2012(13): 39-42. (in Chinese)
- [5] 王军. 蛹虫草固体栽培及下脚料深加工工艺研究[D]. 西安: 西北大学, 2009.
- [6] 许晓炜. 蛹虫草固体培养基中虫草多糖、虫草素提取分离工艺研究[D]. 天津: 天津大学, 2006.
- [7] REN Shuyu, ZHAO Chunyan, SONG Huiyi, et al. Optimum of polysaccharide distillation on scrap *Cordyceps militaris* medium [J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2008, 31(3): 342-343. (in Chinese)

- [8] CHEN Xiaoli, ZHENG Huazhang, TU Yupei, et al. Extraction and preliminary purification process for polysaccharides from solid rice culture medium of *Cordyceps militaris*[J]. **China Brewing**, 2014, 33(6):87-90. (in Chinese)
- [9] WANG Zhenjiong, WANG Renlei, WU Yulong, et al. Optimization of the extraction of *Cordyceps militaris* polysaccharides by microwave assisted with enzyme hydrolysis [J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2014, 35 (11):189-192. (in Chinese)
- [10] WANG Xue, CHI Yuelan, HUA Chun, et al. Effect of different extraction methods on the feature of polysaccharide in *Cordyceps militaris*[J]. **Food Science and Technology**, 2015, 36(9):49-52. (in Chinese)
- [11] YAN Wenjuan, LI Taihui, TANG Fangyong, et al. Extraction and contents determination of polysaccharide in *Cordyceps guangdongensis*[J]. **Journal of South China Agricultural University**, 2009, 30(4):53-56. (in Chinese)
- [12] LIANG Chen, SHANG Hongxia. Extraction and anti-oxidation performances of polysaccharide from culture medium of *Cordyceps militaris*[J]. **Food Research and Development**, 2010, 31(12):21-29. (in Chinese)
- [13] RUTHES A C, SMIDERLE F R, IACOMINI M. Mushroom heteropolysaccharides: A review on their sources, structure and biological effects[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2016, 136:358-375.
- [14] SILVA D D D, RAPIOR S, FONS F, et al. Medicinal mushrooms in supportive cancer therapies: an approach to anti-cancer effects and putative mechanisms of action[J]. **Fungal Diversity**, 2012, 55(1):1-35.
- [15] HAN Xiaojuan, SHEN Shanmei. Research progress of pharmacological activities and mechanisms of *Cordyceps polysaccharide* [J]. **Medical Recapitulate**, 2014, 20(16):3008-3010. (in Chinese)
- [16] YIN Daoqun, CHEN Li, ZHANG Song. Studies on antitumor active substances of *Cordyceps militaris* [J]. **Journal of Chinese Medicinal Materials**, 2010, 33(7):1189-1191. (in Chinese)
- [17] RAO Y K, FANG S H, WU W S, et al. Constituents isolated from *Cordyceps militaris* suppress enhanced inflammatory mediator's production and human cancer cell proliferation[J]. **Journal of Ethnopharmacology**, 2010, 131(2):363-367.
- [18] LIU J Y, FENG C P, LI X, et al. Immunomodulatory and antioxidative activity of *Cordyceps militaris* polysaccharides in mice[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2016, 86:594-598.
- [19] HU Xuesheng, ZHANG Meishang, TIAN Linlin et al. Research progress of *Cordyceps militaris* [J]. **Jilin Journal of Traditional Chinese Medicine**, 2016, 36(3):281-283. (in Chinese)
- [20] SONG J J, WANG Y W, TENG M Y, et al. *Cordyceps militaris* induces tumor cell death via the caspase-dependent mitochondrial pathway in HepG2 and MCF-7 cells[J]. **Molecular Medicine Report**, 2016, 13(6):5132-5140.
- [21] LEE J S, HONG E K. Immunostimulating activity of the polysaccharides isolated from *Cordyceps militaris* [J]. **Int Immunopharmacol**, 2011, 11(9):1226-1233.
- [22] SHAO L W, HUANG L H, YAN S, et al. Cordycepin induces apoptosis in human liver cancer HepG2 cells through extrinsic and intrinsic signaling pathways[J]. **Oncology Letters**, 2016, 12(2):995-1000.
- [23] LI Can, YAN Bing, SUN Fang, et al. Study of antitumor activity in vitro of extraction polysaccharide and polypeptides on *Cordyceps militaris*[J]. **Shandong traditional Chinese medicine journal**, 2013, 32(10):744-746. (in Chinese)
- [24] LU Chengyu, ZHANG Zukai, LIU Yan, et al. Study on the optimization of the extraction conditions and the anticancer activity of polysaccharide from the highly-yielding strain *Cordyceps militaris* N102 [J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2012, 33(14):250-254. (in Chinese)
- [25] 朱培欣. 虫草多糖的分离纯化及其生理活性的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.
- [26] 中华人民共和国农业部. NY/T 1676-2008 食用菌中粗多糖含量的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [27] 王雪. 蛹虫草基质多糖的提取及对酒精所致肝损伤的保护作用[D]. 南京: 南京师范大学, 2015.
- [28] JING Y S, CUI X L, CHEN Z Y, et al. Elucidation and biological activities of a new polysaccharide from cultured *Cordyceps militaris*[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2014(102):288-296.
- [29] 葛晓宇. 蛹虫草子实体多糖提取及功能活性研究[D]. 福建: 福建农林大学, 2013.