

网络出版时间:2020-06-01 10:45 DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2020.12.014
网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.s.20200529.0830.014.html>

1 株野生蝉虫草的鉴定及其胞内和胞外多糖抗肝癌活性比较

刘城移^{1a,1b}, 郝心怡^{1a}, 林沛霖^{1a}, 黄海辰^{1a}, 刘 昆², 吴小平^{1a,1b}, 傅俊生^{1a,1b}

(1 福建农林大学 a 生命科学学院, b 菌物研究中心, 福建 福州 350002; 2 丽水市农业科学研究院, 浙江 丽水 323000)

【摘 要】 **【目的】** 对 1 株野外采集的蝉虫草进行分离和鉴定, 分析比较其发酵菌丝胞内和胞外多糖的抗肝癌细胞 HepG-2 活性及多糖的组成。 **【方法】** 通过形态学特征和 ITS 序列分析, 对供试菌株进行鉴定; 采用 MTT 法、细胞划痕试验, 比较供试菌株菌丝胞内和胞外多糖对人肝癌细胞 HepG-2 的抑制活性以及对人正常肝细胞 LO2 的毒性, 并通过高效液相色谱法和凝胶渗透色谱法, 比较分析 2 种多糖的成分及分子质量分布。 **【结果】** 根据菌株形态学特征和 ITS 序列分析, 供试菌株为蝉虫草 *Cordyceps cicadae*; 其胞内和胞外多糖均可极显著抑制 HepG-2 细胞活性 ($P<0.01$), 半数抑制浓度 (IC_{50}) 值分别为 3.23 和 0.45 mg/mL, 细胞迁移率分别为 38.72% 和 24.79%, 提示胞外多糖比胞内多糖具有更强的抗肝癌细胞 HepG-2 活性; 且 2 种多糖对人 LO2 细胞均无明显毒性; 进一步分析发现, 胞外多糖中半乳糖醛酸的含量是胞内多糖的 23.53 倍, 其分子质量的 94.1% 集中在 19.1~85.0 ku, 胞内多糖中核糖是其特征性单糖, 高分子质量多糖 (>250.0 ku) 分布占比明显高于胞外多糖。 **【结论】** 野生蝉虫草菌株发酵所产胞外多糖的抗肝癌细胞 HepG-2 活性较胞内多糖强, 二者在单糖组成和分子质量分布上存在明显差异。

【关键词】 蝉虫草; 分离与鉴定; 胞内胞外多糖; 抗肝癌活性

【中图分类号】 S567.3⁺9 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-9387(2020)12-0117-10

Identification of a wild *Cordyceps cicadae* strain and comparison of its intracellular and extracellular polysaccharides in anti-hepatoma activity

LIU Chengyi^{1a,1b}, HAO Xinyi^{1a}, LIN Peilin^{1a}, HUANG Haichen^{1a},
LIU Kun², WU Xiaoping^{1a,1b}, FU Junsheng^{1a,1b}

(1 a College of Life Sciences, b Mycological Research Center, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China; 2 Lishui Academy of Agricultural Science, Lishui, Zhejiang 323000, China)

Abstract: **【Objective】** A *Cordyceps cicadae* strain was isolated and identified in the wild and the anti-hepatoma activity and components of its intracellular and extracellular polysaccharides were analyzed. **【Method】** The wild *Cordyceps cicadae* was identified by morphological characteristics and ITS sequences. Inhibitory activity on human hepatocell carcinoma cell HepG-2 and toxicity on human normal cell LO2 of intracellular and extracellular polysaccharides from *Cordyceps cicadae* were compared by MTT assay and wound healing assay. The components of intracellular and extracellular polysaccharides were analyzed by HPLC and Gel Permeation Chromatography. **【Result】** The wild strain was identified as *Cordyceps cicadae*.

【收稿日期】 2019-11-14
【基金项目】 国家重点研发计划项目(2018YFD0400200); 福建农林大学现代种业工程研究院建设经费项目
【作者简介】 刘城移(1994—), 女, 河南洛阳人, 硕士, 主要从事食药菌分类鉴定与药效机理研究。E-mail: 674178869@qq.com
【通信作者】 傅俊生(1981—), 男, 福建福州人, 副教授, 博士, 主要从事食药菌真菌功效物质分析与药效机理研究。E-mail: fujunsheng81@163.com

Its intracellular and extracellular polysaccharides significantly inhibited the growth of HepG-2 cells ($P < 0.01$) with IC_{50} of 3.23 and 0.45 mg/mL and cell migration rates of 38.72% and 24.79%, respectively. It indicated that extracellular polysaccharides possessed stronger anti-HepG-2 activity than intracellular polysaccharides. Both intercellular and extracellular polysaccharides had no obviously effects in LO2 cells. Further analysis showed that the content of galacturonic acid in extracellular polysaccharides was 23.53 times that in intracellular polysaccharides, and the molecular weight of extracellular polysaccharides was mainly at 19.1—85.0 ku (94.1%). Ribose only existed in intracellular polysaccharides. Relative contribution of high molecular weight polysaccharides in intracellular polysaccharide (>250.0 ku) was higher than in extracellular polysaccharides. 【Conclusion】 The extracellular polysaccharides extracted from fermentation of wild *Cordyceps cicadae* strain showed stronger anti-HepG-2 activity than intracellular polysaccharides, and there were significant differences in composition and molecular weight distribution of intracellular and extracellular polysaccharides.

Key words: *Cordyceps cicadae*; isolation and identification; intracellular and extracellular polysaccharides; anti-hepatoma activity

蝉虫草 (*Cordyceps cicadae* (Miq.) Masee) 又名金蝉花、蝉花、蝉草、蝉茸、胡蝉、南虫草, 隶属于子囊菌门 (Ascomycotina)、粪壳菌纲 (Sordariomycetes)、肉座菌目 (Hypocreales)、虫草科 (Cordycipitaceae)、棒束孢属 (*Isaria*)^[1], 其和冬虫夏草被称为我国南北并存的两大珍贵虫草, 是我国药用真菌中的瑰宝, 在民间常被作为补肝明目安神的珍贵食品^[2-3]。但目前天然野生蝉虫草因需要特定的生态环境、生长时间和寄主昆虫等限制, 自然产量逐年减少, 再加上人们的过度采摘, 导致野生资源短缺^[4]。因此, 如何保护和开发利用野生蝉虫草资源成为人们关注的焦点。

多糖是蝉虫草主要的营养物质和活性成分之一^[5-6], 具有免疫调节^[7]、抗氧化^[8]、抗肿瘤^[9]、抑菌^[10]等生物活性, 但开发利用受限于蝉虫草资源短缺。目前, 液体发酵因具有来源稳定、操作方便、成本低、不受季节限制、发酵周期短、能大规模生产等优势^[11], 是获得大量蝉虫草多糖的有效手段。发酵产生的多糖包括胞内多糖和胞外多糖, 其中胞外多糖 (extracellular polysaccharides, EPS), 是相对于胞内多糖存在的, 是指菌体在生长代谢过程中分泌到培养基中的水溶性多糖, 易于与菌体分离, 属于次级代谢产物; 胞内多糖 (intracellular polysaccharides, IPS) 大部分以糖原形式存在, 如淀粉粒等作为胞内能源存储的形式; 二者在生物体内行使着多种生物学功能, 活性与结构均存在一定的差异。崔芳源^[12]研究发现, 猴头菇胞外多糖清除自由基的活性和还原能力均高于胞内多糖, 其中阿拉伯糖是胞外多糖的特征性单糖, 鼠李糖和木糖是胞内多糖的

特征性单糖; Cui 等^[13]研究显示, 猴头菇胞外多糖对四氯化碳诱导的小鼠肝损伤的病理改善作用强于胞内多糖, 其中阿拉伯糖是胞外多糖的特征性单糖; 王宏雨等^[14]报道, 姬松茸胞外多糖清除 DPPH 和 ABTS 自由基的活性弱于胞内多糖, 其中胞外多糖的平均分子质量显著高于胞内多糖。然而有关蝉虫草发酵产的胞内与胞外多糖的抗肿瘤生物活性的比较与组成差异, 目前还尚未见报道。

肝癌是众所周知的高发且危害极大的恶性肿瘤, 肝癌 HepG-2 细胞保留有许多肝细胞的特性与功能, 是抗肝癌体外研究的常用细胞模型^[15]。本研究以 1 株野外采集的蝉虫草为材料, 对其进行分离和鉴定, 并以 HepG-2 和 LO2 细胞为模型, 比较分析其胞内和胞外多糖的抗肝癌活性, 以期从单糖组成与分子质量分布上探讨 2 种多糖的组成成分, 进而为蝉虫草的充分开发和利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 野生蝉虫草菌株 MF38 (原始编号: WS401), 由浙江丽水市农业科学研究院刘昆采集于丽水市缙云县东方镇下东方村, 分离纯化培养的菌丝保存于福建农林大学生命科学学院菌物研究中心。

人肝癌细胞系 HepG-2 和人正常肝细胞系 LO2, 均购自赛百慷生物技术有限公司。

1.1.2 试剂与仪器 真菌 DNA 提取试剂盒、Bioteke 2×power Taq PCR Master Mix 试剂盒, 购自 OMEGA 公司; RPMI 1640 培养液、血清、胰酶、

双抗,购自 Gibco 公司;四甲基偶氮唑盐 (MTT),购于 Sigma 公司;葡萄糖、蛋白胨、磷酸二氢钾、硫酸镁、二甲基亚砷等试剂,均为分析纯。

主要仪器:PCR 扩增仪 (Mycycler 型)、离心机 (ST16R 型)、多功能酶标仪、MCO-15AC 型 CO₂ 培养箱、XDS-3 型倒置生物显微镜、凝胶色谱仪 (型号 ELEOS System Wyatt 制造)。

加富的马铃薯葡萄糖液体培养基 (PDB):马铃薯 (去皮)200 g,葡萄糖 20 g,蛋白胨 3 g,酵母粉 3 g,磷酸二氢钾 1 g,硫酸镁 0.5 g, V_{B1} 10 mg,沸水煮沸 30 min,纱布过滤,加水至 1 L;加富的马铃薯葡萄糖固体培养基 (PDA):1 L 加富的 PDB 培养基中加入 18~20 g 琼脂,121 °C 高压灭菌 30 min。

1.2 方 法

1.2.1 供试菌株的形态学鉴定 参照《中国真菌志》^[16]对供试菌株进行形态学鉴定。首先将供试菌株接入平板 PDA 培养基中活化,再接种于 PDA 平板上,置于 25 °C 培养箱中,每天观察菌丝性状;用插片法观察菌株菌丝形态:在距离菌块 2 cm 处,将灭菌盖玻片倾斜 45°插入培养基中,培养 10 d 后取出盖玻片,显微镜下观察菌丝形态特征;待产孢后,收集孢子,显微镜下观察形态,并拍照记录。

1.2.2 供试菌株的分子生物学鉴定 (1)基因组 DNA 的提取。将供试菌株接种于加富的 PDA 平板中央,25 °C 培养 10 d 后,收集菌丝备用。取适量菌丝,利用 OMEGA 真菌 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA。

(2)PCR 扩增和序列检测。采用 Bioteke 2 × power Taq PCR Master Mix 试剂盒扩增供试菌株 ITS 区序列,以真菌核糖体基因间隔区通用的 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')为引物。PCR 反应体系为:10 × Taq Buffer 2.5 μL, Taq DNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.25 μL, dNTP (10 mmol/L) 2 μL, 引物 ITS1 和 ITS4 (100 μmol/L) 各 1 μL, 模板 DNA 约 50 ng, ddH₂O 补足至 25 μL。反应条件为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s, 62 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环;72 °C 终延伸 10 min, 4 °C 保存。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物后,将产物送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。

(3)ITS 序列分析。利用 NCBI 中的 BLAST 功能,将测序得到的 DNA 序列在 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中进行同源比对分析,选

取下载同源性较高的 rDNA ITS 序列。采用邻接法构建系统进化树,引入中华被毛孢 (*Hirsutella sinensis*) 为外群,用自展法检验重复 1 000 次,检验系统发育进化树的可靠性,判断供试菌株种性的分类学地位。

1.2.3 胞内和胞外多糖的制备与检测 (1)胞内多糖制备与检测。参考 Li 等^[17]的方法,将供试菌株接入加富的 PDB 培养基中,在 25 °C、150 r/min 条件下发酵 10 d;发酵结束后,12 000 r/min 离心 3 min,收集菌丝并用蒸馏水清洗 3 遍,冷冻干燥、研磨,备用。采用苯酚-硫酸法检测胞内多糖含量:取菌丝体 300 g,加入体积分数 65% 乙醇去杂;过滤取滤渣,按料 (g) 液 (mL) 比 1 : 15 加入去离子水,65 °C 浸提 75 min,重复 2 次,合并滤液;浓缩滤液至原体积的 1/3,加入 4 倍体积的无水乙醇,4 °C 静置 24 h;12 000 r/min 离心 5 min 取沉淀,加入去离子水复溶,用 Seavage 法脱蛋白,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,将其装入透析袋中流水透析 48 h,冷冻干燥后,置 -20 °C 保存备用。

(2)胞外多糖制备与检测。参考陈显群等^[18]的方法稍作修改。将供试菌株接入加富的 PDB 培养基中,在 25 °C、150 r/min 条件下发酵 10 d,发酵结束后于 12 000 r/min 离心 3 min,取上清液,备用。采用苯酚-硫酸法检测胞外多糖含量:将上清液浓缩至原体积的 1/3,加入 4 倍体积的无水乙醇;4 °C 静置 24 h,12 000 r/min 离心 5 min,取沉淀加入适量去离子水复溶;用 Seavage 法脱蛋白,12 000 r/min 离心 10 min 取上清液,将其装入透析袋中流水透析 48 h,冷冻干燥后,置 -20 °C 保存备用。

1.2.4 多糖的抗肝癌活性 (1)多糖对 HepG-2 细胞增殖活性的影响。取对数生长期的 HepG-2 细胞,稀释为 1×10^5 mL⁻¹,接种于 96 孔板中,每孔 100 μL,在体积分数 5% CO₂、37 °C 条件下培养。待细胞完全贴壁后,加入含不同质量浓度 (0.05, 0.25, 0.5, 1.5 mg/mL) 多糖的 RPMI 1460 培养液,以加入 RPMI 1460 培养液为对照组,每组 5 个平行,作用 24 h 后,加入 MTT (5 mg/mL) 20 μL,继续培养 4 h,弃上清液,加入二甲基亚砷 (DMSO) 150 μL,充分混匀,在 490 nm 波长处测吸光度 (OD),以未接种细胞只加入 RPMI 1460 培养液为调零组。按照以下公式计算细胞存活率:

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{OD}_{\text{试验组}} - \text{OD}_{\text{调零组}}}{\text{OD}_{\text{对照组}} - \text{OD}_{\text{调零组}}} \times 100\%。$$

采用 lg (药物浓度)-抑制率回归分析法^[19]计算

多糖对 HepG-2 细胞的半数抑制浓度(IC_{50})。

(2)多糖对 HepG-2 细胞迁移活性的影响。采用划痕试验检测多糖对 HepG-2 细胞迁移活性的影响。本研究设对照组和 2 个试验组 3 个处理,参照刘艳等^[20]的方法,取对数生长期的 HepG-2 细胞,将其接种于 6 孔板,每孔接种密度 $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$,在体积分数 5% CO_2 、37 °C 条件下培养 24 h,第 2 天弃去培养液,用 10 μL 移液枪吸头划线,每孔 3 条划痕,每条线距离 0.5~1 cm,划好后用 PBS 清洗 3 遍。对照组中加入 RPMI 1460 培养液,2 个试验组中分别加入含胞内和胞外多糖(5 mg/mL)的 RPMI 1460 培养液,置于显微镜下拍照,记录为 0 h(原划痕宽度),置于培养箱中继续培养作用 24 h 后,PBS 清洗悬浮凋亡细胞,在显微镜下观察记录为 24 h(现划痕宽度)。按照以下公式计算细胞迁移率:

$$\text{细胞迁移率} = \frac{\text{原划痕宽度} - \text{现划痕宽度}}{\text{原划痕宽度}} \times$$

100%。

1.2.5 多糖对 LO2 细胞的毒副作用 本研究设对照组和 2 个试验组 3 个处理,取对数生长期的 LO2 细胞,稀释密度为 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$,接种于 96 孔板中,每孔 100 μL ,在体积分数 5% CO_2 、37 °C 条件下培养。待细胞完全贴壁后,在对照组中加入 RPMI 1460 培养液,2 个试验组中分别加入含胞内和胞外多糖(5 mg/mL)的 RPMI 1460 培养液,每组 5 个平行,作用 24 h 后,加入 MTT(5 mg/mL)20 μL 继续培养 4 h,弃上清液;加入 DMSO 150 μL ,充分混匀,在 490 nm 波长处测 OD 值。按照 1.2.4(1)的公式计算细胞存活率。

1.2.6 多糖组成的测定 (1)完全酸水解。取多糖样品适量,用 2 mol/L 三氟乙酸溶液(TFA)在 120 °C 条件下水解 120 min,用氮吹仪吹干。配制 10 mg/mL 单糖(葡萄糖、甘露糖、半乳糖、阿拉伯糖、葡萄糖醛酸、木糖、半乳糖醛酸、鼠李糖和岩藻糖)标准品,各取 5 μL 加入到可密封的玻璃管,再加入 2 mol/L TFA 溶液 0.5 mL 混匀,于 120 °C 下水解 120 min,用氮吹仪吹干。

(2)1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)衍生化。取完全酸水解的多糖样品,加入 0.5 mol/L 的 PMP 和 0.3 mol/L 的 NaOH 溶液各 0.5 mL,充分混匀,70 °C 水浴反应 30 min,冷却,加入 0.3 mol/L 的 HCl 溶液 0.5 mL 进行中和,再加入等体积的氯仿充分振荡,12 000 r/min 离心 2 min,除去 PMP、过剩反应试剂等杂质,重复 3 次。将水层用 0.22 μm

滤膜过滤后,进行高效液相色谱(HPLC)检测。

(3)HPLC 检测条件。SHISEIDO C_{18} 柱(4.6 mm $\times$ 250 mm,5 μm),流动相为 0.1 mol/L pH 6.8 的磷酸盐缓冲液-乙腈(V(磷酸盐):V(乙腈)=82:18),流速为 1.0 mL/min,柱温为 25 °C,进样量 10 μL ,检测波长为 245 nm。

1.2.7 多糖分子质量分布的测定 采用凝胶渗透色谱(gel Permeation chromatography,GPC)法检测多糖样品的分子质量分布。凝胶色谱仪基本配置为:Waters515 泵、激光检测器(LS)、示差检测器(DRI);色谱柱:ShodexOHpak 系列 SB-806 串 803;流动相:质量分数 0.02% NaN_3 的水溶液,流速:1 mL/min,柱温:40 °C,进样量:500 μL 。打开仪器电源,待仪器各部分自检完成,设定流速、柱温等参数,平衡系统;打开计算机,运行 ARTRAV 软件,设定流速、时间等参数;取基线,待基线平稳后开始进样测定。

1.2.8 数据统计与分析 试验数据用“平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)”表示,用 SPSS 20.0 统计软件进行分析处理。采用 t 检验法进行方差分析,以 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 分别表示显著和极显著差异。

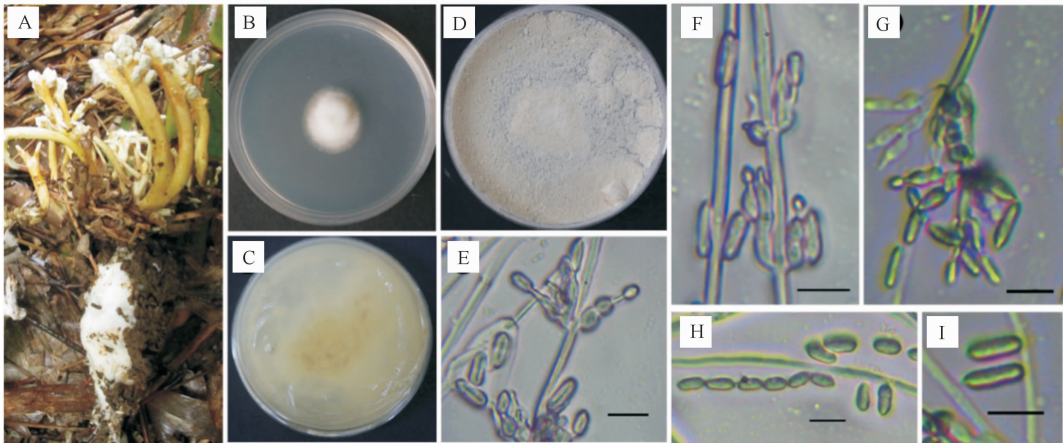
2 结果与分析

2.1 野生蝉虫草分离菌株的鉴定

2.1.1 形态学鉴定 野外采集的野生蝉虫草(图 1-A)经分离后得到菌株 MF38(原始编号 WS401),对其进行平板菌落形态特征观察,结果显示,菌落为圆形且表面蓬松,菌丝初期为白色,绒毛状向四周平伏生长,与培养基贴合紧密(图 1-B),后期转淡黄色(图 1-C,平板背面),并容易产生大量的分生孢子,产孢后又转呈土灰色(图 1-D)。菌丝显微结构特征观察显示,产孢结构的瓶梗基部拟椭圆形或球形膨大,单个分生孢子呈长椭圆形或略弯曲的腊肠状,大小为 (3~10) $\mu\text{m} \times$ (1.6~2.8) μm ,孢子多聚集呈长链状(图 1-E-I)。经检索,以上特征与《中国真菌志》^[16]中对蝉花 *Cordyceps cicadae* (Miq.) Massee 的特征描述相一致。

2.1.2 分子生物学鉴定 将菌株 MF38 的 ITS 序列(NCBI 登录号:MN128643)在 GenBank 上进行同源性比对,结果显示,菌株 MF38 的 ITS 序列与已报道的蝉虫草序列(NCBI 登录号:KY924492、KY924491、MF460361)具有高达 99% 的同源性;再以中华被毛孢(*Hirsutella sinensis*)为外群,引入其他虫草属真菌的 ITS 序列,采用邻接法构建系统发

育进化树。结果(图 2)表明,菌株 MF38 与蝉虫草聚为一支,与其他虫草属真菌遗传距离较远。结合形态学观察与分子生物学鉴定的结果,可知供试菌株 MF38 为蝉虫草 *Cordyceps cicadae*。



A. 野生蝉花子实体;B-D. 菌落形态;E-G. 产孢结构;H-I. 孢子形态。标尺=10 μm
A. Fruiting body of wild *Cordyceps cicadae*;B-D. Colony on PDA;E-G. Conidiogenous structures;H-I. Conidiophores. Bars=10 μm

图 1 野生蝉虫草分离菌株 MF38 的形态学观察

Fig. 1 Morphological observation of strain MF38 isolated from wild *Cordyceps cicadae*

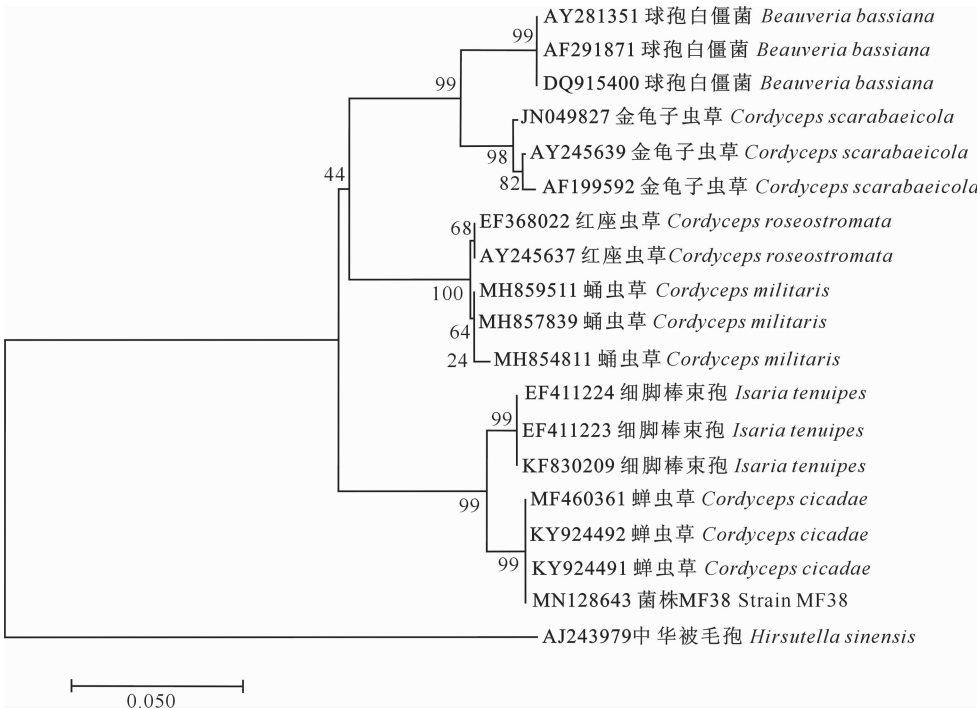


图 2 基于 ITS 序列构建的野生蝉虫草分离菌株 MF38 与其他虫草属真菌的系统发育进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain MF38 from *Cordyceps cicadae* and other *Cordyceps* fungus based on ITS sequence

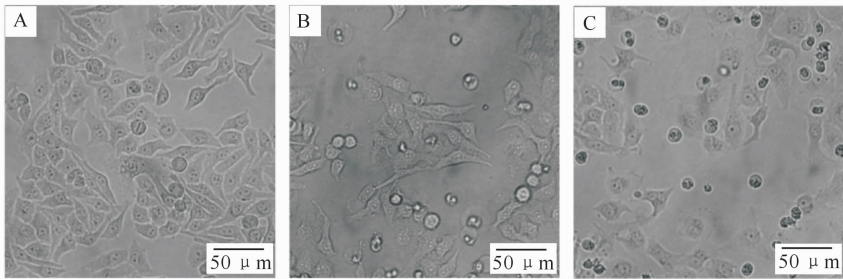
2.2 蝉虫草多糖的抗肝癌活性

2.2.1 对肝癌细胞增殖活性的影响 由图 3 可以看出,以肝癌 HepG-2 细胞为研究对象,从细胞形态变化上看,与对照组相比,添加了胞内多糖(5 mg/mL)和胞外多糖(5 mg/mL)的癌细胞不仅数目明显减少,而且形态皱缩或变圆,还存在许多悬浮的凋亡细胞,提示胞内和胞外多糖对肝癌细胞有一定的毒性。用 MTT 法检测多糖对肝癌细胞增殖的影

响,结果(图 4)显示,随着多糖质量浓度的增加,胞内和胞外多糖均可以极显著地抑制肝癌细胞的增殖($P<0.01$),降低细胞存活率,当多糖质量浓度在 5 mg/mL 时,其抑制活性均较高。

由图 4 还可知,同一质量浓度下,胞外多糖组肝癌细胞的存活率较胞内多糖组更低($P<0.01$),胞外和胞内多糖的 IC_{50} 值分别为 0.45 和 3.23 mg/mL,提示胞外多糖抑制 HepG-2 细胞增殖的活

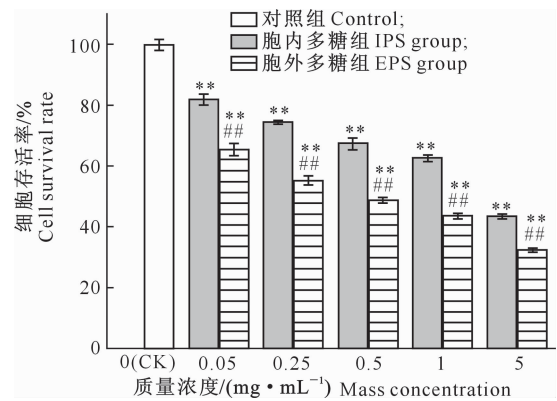
性较胞内多糖效果更强,表明在供试质量浓度下蝉虫草多糖能明显抑制肝癌 HepG-2 细胞的增殖,且胞外多糖对 HepG-2 细胞的毒性高于胞内多糖,具有进一步开发的潜力。



A. 对照组;B. 胞内多糖组;C. 胞外多糖组
A. Control group;B. IPS group;C. EPS group

图 3 野生蝉虫草分离菌株 MF38 多糖对肝癌细胞形态的影响

Fig. 3 Effect of polysaccharides of strain MF38 isolated from wild *Cordyceps cicadae* on HepG-2 cell morphology



※※和##分别表示与对照组和胞内多糖组差异极显著($P<0.01$)。下同

※※ and ## indicated highly significant difference ($P<0.01$) compared with the control group and IPS group. The same below

图 4 野生蝉虫草分离菌株 MF38 多糖对肝癌细胞活力的影响

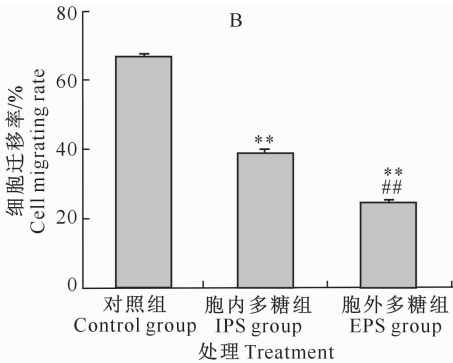
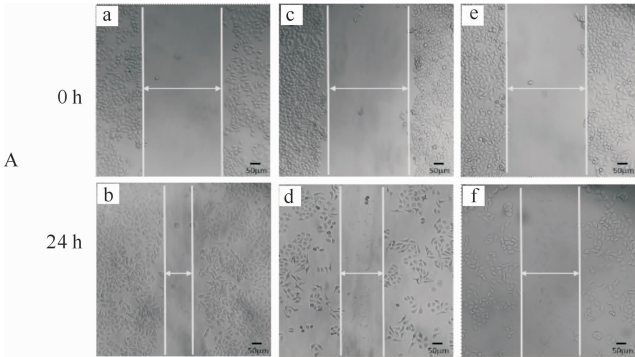
Fig. 4 Effect of polysaccharides of strain MF38 isolated from wild *Cordyceps cicadae* on HepG-2 cell viability

2.2.2 对肝癌细胞迁移活性的影响 由图 5-A 可知,与 0 h 相比,3 个处理组细胞培养 24 h 后划痕均

发生了明显愈合,表明细胞在培养过程中发生了迁移。与对照组相比,多糖组的细胞数目均变少,细胞形态有一定程度的变化,划痕愈合程度低,可观察到划痕愈合程度由高到低依次为对照组>胞内多糖组>胞外多糖组。进一步计算(图 5-B)可知,对照组、胞内多糖组和胞外多糖组细胞的迁移率分别为 66.81%、38.72%和 24.79%,胞内多糖组的细胞的迁移率是胞外多糖的 1.56 倍,二者之间有极显著差异($P<0.01$)。这表明在供试质量浓度下多糖样品可明显抑制 HepG-2 细胞的迁移,且胞外多糖的抑制作用较胞内多糖更强。

2.3 蝉虫草多糖的毒副作用

图 6 表明,多糖(质量浓度为 5 mg/mL)对 LO2 细胞形态无明显影响,细胞数量与对照组接近。检测发现,胞内和胞外多糖组的细胞存活率分别为 93.05%和 96.31%(图 7),与对照组之间均无显著差异($P>0.05$)。这表明在供试质量浓度下胞内和胞外多糖对人正常肝细胞 LO2 无明显毒性。



A. 细胞划痕愈合观察(a-b. 对照组;c-d. 胞内多糖组;e-f. 胞外多糖组);B. 细胞迁移率统计

A. Cell wound healing assay(a-b. Control group;c-d. IPS group;e-f. EPS group);B. Cell migrating rate

图 5 野生蝉虫草分离菌株 MF38 多糖对肝癌细胞迁移活性的影响

Fig. 5 Effect of polysaccharides of strain MF38 isolated from wild *Cordyceps cicadae* on HepG-2 cell migrating activity

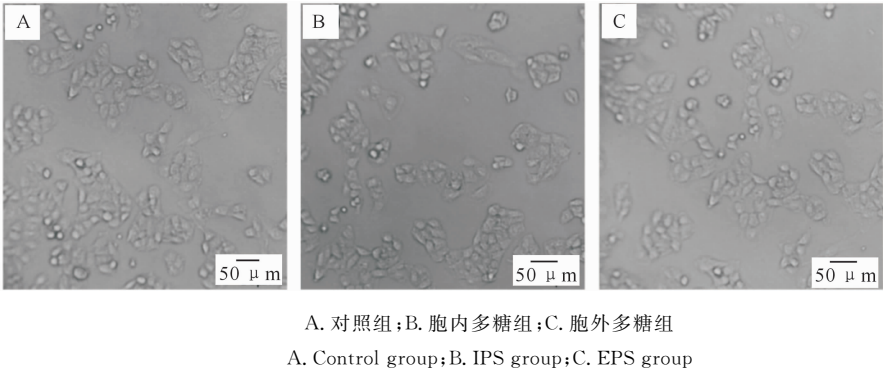


图 6 野生蝉虫草分离菌株 MF38 多糖对人肝细胞形态的影响

Fig. 6 Effect of polysaccharides of strain MF38 isolated from wild *Cordyceps cicadae* on LO2 cell morphology

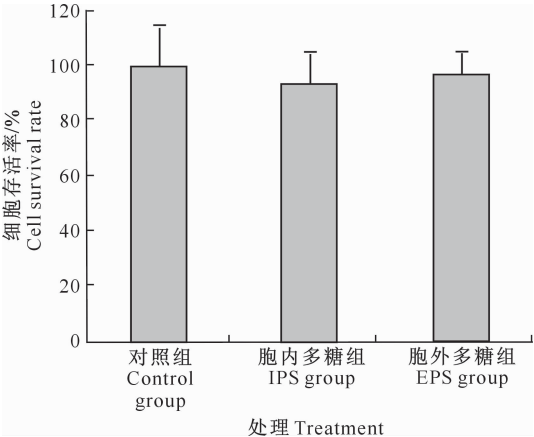


图 7 野生蝉虫草分离菌株 MF38 多糖对人肝细胞活力的影响

Fig. 7 Effect of polysaccharides of strain MF38 isolated from wild *Cordyceps cicadae* on LO2 cell viability

2. 4 蝉虫草胞内与胞外多糖的组成及分子质量分布

2. 4. 1 单糖组成 多糖作为自然界广泛分布的天

然产物,其独特的生物活性通常与多糖的单糖组成、分子质量等因素密切相关^[21-22]。蝉虫草多糖样品的单糖组成分析结果见表 1。表 1 显示,蝉虫草胞内多糖主要由 10 种单糖组成,含量由高到低依次为葡萄糖、半乳糖、甘露糖、葡萄糖醛酸、岩藻糖、鼠李糖、木糖、阿拉伯糖、核糖和半乳糖醛酸;胞外多糖则主要由 9 种单糖组成,含量由高到低依次为半乳糖、甘露糖、葡萄糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、岩藻糖、木糖、阿拉伯糖和鼠李糖。进一步对比发现,从单糖种类上分析,核糖是胞内多糖的特征性单糖;从单糖含量上分析,胞内多糖中仅有葡萄糖和鼠李糖的含量高于胞外多糖,分别是其的 5. 45 和 1. 75 倍,而其他 7 种单糖含量均低于胞外多糖,胞外多糖的半乳糖醛酸、甘露糖、半乳糖、阿拉伯糖、葡萄糖醛酸、木糖、岩藻糖分别是胞内多糖的 23. 53,1. 70,1. 65,1. 49,1. 48,1. 44 和 1. 03 倍。这表明,2 种多糖单糖组成种类以及含量均存在较为明显的差异。

表 1 蝉虫草多糖的单糖组成及含量

Table 1 Monosaccharide composition and contents of intracellular and extracellular polysaccharides of

Cordyceps cicadae				mg/kg			
序号 No.	单糖 Monose	胞内多糖含量 Intracellular polysaccharides	胞外多糖含量 Extracellular polysaccharides	序号 No.	单糖 Monose	胞内多糖含量 Intracellular polysaccharides	胞外多糖含量 Extracellular polysaccharides
1	甘露糖 Man	336. 56	573. 71	6	葡萄糖 Glc	778. 81	142. 82
2	核糖 Rib	3. 26	—	7	半乳糖 Gal	400. 58	660. 13
3	鼠李糖 Rha	7. 57	4. 32	8	木糖 Xyl	6. 35	9. 15
4	葡萄糖醛酸 GlcUA	75. 15	111. 24	9	阿拉伯糖 Ara	3. 53	5. 26
5	半乳糖醛酸 GalA	0. 83	19. 53	10	岩藻糖 Fuc	11. 13	11. 45

注:—表示未检测到。
Note: — means not detected.

2. 4. 2 分子质量的分布 采用 GPC 法对 2 种多糖的分子质量分布进行了检测,结果见表 2。表 2 显示,蝉虫草胞内和胞外多糖的重均分子质量(M_w)分别为 $3. 978 \times 10^4$ 和 $3. 551 \times 10^4$ u,分散指数(M_w/M_n)分别为 1. 466 和 1. 300,表明 2 种多糖的重均分

子质量较为接近,分散指数偏小,分子质量分布相对较窄、较集中。
进一步分析多糖分子质量分布的占比,结果见表 3。由表 3 可见,蝉虫草胞内多糖的分子质量主要分布在 19. 1~85. 0 ku(占 76. 9%),其次是在

250.1~2 200.0 ku(占 17.3%) ;而胞外多糖的分子质量则主要分布在 19.1~85.0 ku,占比明显高于胞内多糖。这表明 2 种多糖的分子质量大小分布具有

明显差异,表现在胞内多糖的分子质量分布较为分散,且在高分子质量范围内有分布,而胞外多糖的分子质量分布更集中在低分子质量范围。

表 2 蝉虫草胞内和胞外多糖的分子质量

Table 2 Molecular weight of intracellular and extracellular polysaccharides of *Cordyceps cicadae*

样品 Samples	M_n/u	M_p/u	M_w/u	M_z/u	M_w/M_n
胞内多糖 Intracellular polysaccharides	2.715×10^4	1.995×10^4	3.978×10^4	3.836×10^5	1.466
胞外多糖 Extracellular polysaccharides	2.732×10^4	1.947×10^4	3.551×10^4	7.758×10^4	1.300

注: M_n . 数均分子质量; M_p . 峰均分子质量; M_w . 重均分子质量; M_z . Z 均分子质量; M_w/M_n . 分散性指数。

Note: M_n . Number-average molecular weight; M_p . Peak-average molecular weight; M_w . Weight-average molecular mass; M_z . Z-average molecular mass; M_w/M_n . Dispersion index.

表 3 蝉虫草胞内和胞外多糖分子质量的分布

Table 3 Molecular weight distribution of intracellular and extracellular polysaccharides of *Cordyceps cicadae* %

样品 Samples	11.8~19.0 ku	19.1~85.0 ku	85.1~250.0 ku	250.1~2 200.0 ku
胞内多糖 Intracellular polysaccharides	N. a	76.9	5.8	17.3
胞外多糖 Extracellular polysaccharides	1	94.1	4.9	N. a

注:N. a 表示无分布。

Note:N. a means no distribution.

3 讨 论

蝉虫草作为冬虫夏草的潜在替代品,与冬虫夏草化学成分相似,不仅含有虫草酸、甘露醇、多球壳菌素、核苷类成分、麦角固醇及其过氧化物等多种化学成分,还含有丰富的多糖^[23]。大量研究发现,真菌多糖作为天然产物,大多具有较强的抗肿瘤活性,对许多肿瘤细胞均有良好的抑制作用。如李璐等^[24]报道,银耳多糖对肝癌 HepG-2 细胞增殖有直接的抑制作用,对增殖细胞的杀伤率最高达 89.29%;赵霏^[25]研究发现,灰树花多糖能有效抑制肝癌 SMMC-7721 细胞的增殖。本研究发现,蝉虫草胞内和胞外多糖均能明显抑制 HepG-2 细胞的增殖和迁移活性,其中胞外多糖的抑制作用强于胞内多糖,但二者对人正常肝细胞 LO2 无明显毒性。这表明野生蝉虫草的 2 种多糖在活性上存在相似性,在抗肝瘤活性上具有差异性,这为野生蝉虫草资源的进一步开发提供了依据。

多糖结构复杂,其单糖组成和相对分子质量既是研究多糖分子特性的基础,也是研究多糖活性与结构相关性的重要内容^[26]。Zhang 等^[27]报道,半乳糖和鼠李半乳糖醛酸聚糖的含量与果胶多糖抗肿瘤活性呈正相关;张培等^[28]发现,党参多糖中半乳糖醛酸、阿拉伯糖、鼠李糖、果糖、半乳糖的含量与其对 HepG-2 细胞的毒性作用呈正相关,木糖、甘露糖和

葡萄糖含量与其对 HepG-2 细胞的毒性作用呈负相关;柯汉女^[29]报道,铁皮石斛中低分子质量多糖片段对 HepG-2 细胞增殖的抑制作用较强,高分子质量多糖片段的抑制作用较弱;邢利鹏^[30]报道,当归多糖分子质量较小的组分 ASP1 及 ASP3 比分子质量较大的组分 ASP2 对 HepG-2 细胞具有更高的抑制率。本研究发现,蝉虫草胞内和胞外多糖在抗肝癌 HepG-2 活性方面存在差异,进一步检测发现 2 种多糖在单糖组成与分子质量分布上均具有一定差异,其中胞内多糖主要由 10 种单糖组成,其分子质量在高于 250.0 ku 的范围内有分布,占 17.3%;胞外多糖主要由 9 种单糖组成,分子质量集中分布在 19.1~85.0 ku,占 94.1%;比较发现,胞内多糖中葡萄糖含量是胞外多糖的 5.45 倍,胞外多糖中醛酸类单糖、半乳糖、阿拉伯糖等单糖的含量高于胞内多糖,其中胞外多糖半乳糖醛酸的含量是胞内多糖的 23.53 倍,且胞外多糖的分子质量分布较胞内多糖更集中在低分子质量范围。这表明蝉虫草胞外多糖中糖醛酸、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖等单糖含量以及分子质量分布的差异,可能与 2 种多糖抗肝癌 HepG-2 细胞活性的差异有关。

肝癌是位列世界第六大最常见的癌症^[31],发病率和死亡率极高,尽快探索出高效、低毒、安全性高的治疗肝癌的药物是增加患者生存率的关键。本研究以野生蝉虫草为材料,发现蝉虫草多糖对人正常

肝细胞 LO2 无明显毒性,对肝癌 HepG-2 细胞具有明显毒性,其中胞外多糖的抗肿瘤活性高于胞内多糖,这可能与多糖的单糖组成和分子质量分布的差异性有关,这为蝉虫草及其活性成分多糖的进一步研究开发提供了科学依据。

[参考文献]

- [1] 高 扬. 蝉棒束孢缺失有性子实体机理的研究 [D]. 合肥:安徽农业大学,2015.
Gao Y. Studies on the mechanism of the missing sexual fruiting body of *Isaria cicadae* [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2015.
- [2] 董彩虹,李文佳,李增智,等. 我国虫草产业发展现状、问题及展望 [J]. 菌物学报,2016,35(1):1-15.
Dong C H, Li W J, Li Z Z, et al. *Cordyceps* industry in China: current status, challenges and perspectives-Jinhu declaration for cordyceps industry development [J]. *Mycosystema*, 2016, 35(1):1-15.
- [3] 罗靖瑶,张晓雨,许睿洁,等. 不同食用方式下蝉花麦角甾醇、虫草素、腺苷和多糖的比较 [J]. 安徽农业大学学报,2018,45(3):389-394.
Luo J F, Zhang X Y, Xu R J, et al. Comparison of ergosterol, cordycepin, adenosine and polysaccharide with different preparation methods in *Isaria cicadae* Miquel [J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2018, 45(3):389-394.
- [4] 谢 飞,李 伟,陈美珍,等. 野生蝉花多糖抗肿瘤活性及其作用机制 [J]. 食品科学,2016,37(13):209-213.
Xie F, Li W, Chen M Z, et al. Antitumor activity and mechanism of action of wild *Cordyceps sobolifera* polysaccharide [J]. *Food Science*, 2016, 37(13):209-213.
- [5] Kim H S, Kim Y J, Lee H K, et al. Activation of macrophages by polysaccharide isolated from *Paecilomyces cicadae* through toll-like receptor [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2012, 50(9):3190-3197.
- [6] Yang S, Zhang H. Optimization of the fermentation process of *Cordyceps sobolifera* Se-CEPS and its anti-tumor activity *in vivo* [J]. *Journal of Biological Engineering*, 2016, 10(1):8-10.
- [7] 宋佳敏,王鸿飞,罗 洁,等. 金蝉花多糖对小鼠免疫功能的影响 [J]. 核农学报,2018,32(10):111-117.
Song J M, Wang H F, Luo J, et al. Effect of *Cordyceps cicadae* polysaccharides on immunologic function of mice [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2018, 32(10):111-117.
- [8] 邵 颖,赵节昌,陈尚龙,等. 蝉花孢子粉分级多糖的体外抗氧化活性 [J]. 食品科技,2018,43(4):200-204.
Shao Y, Zhao J C, Chen S L, et al. Antioxidant activity *in vitro* of rating polysaccharides from conidia powder of *Cordyceps cicade* [J]. *Food Science and Technology*, 2018, 43(4):200-204.
- [9] Olatunji O J, Feng Y, Olatunji O O, et al. Polysaccharides purified from *Cordyceps cicadae* protects PC12 cells against glutamate-induced oxidative damage [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 153:187-195.
- [10] 岑绮雯,宋宇婧,陈 涛,等. 蝉花多糖提取工艺优化及抗菌活性初步研究 [J]. 杭州师范大学学报(自然科学版),2018,17(3):269-274.
Cen Q W, Song Y J, Chen T, et al. Optimization of extraction technology for polysaccharide from *Cordyceps cicadae* and the preliminary investigation of its antibacterial activity [J]. *Journal of Hangzhou Normal University (Natural Science Edition)*, 2018, 17(3):269-274.
- [11] Chunyu Y J, Lu Z M, Luo Z S, et al. Promotion of metabolite synthesis in *Isaria cicadae*, a dominant species in the cicada flower microbiota, by cicada pupae [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(31):8476-8484.
- [12] 崔芳源. 猴头菇胞内胞外多糖的结构、抗氧化活性和保肝护肝能力分析 [D]. 山东泰安:山东农业大学,2016.
Cui F Y. Composition, antioxidant and hepatoprotective activities of extra-and intra-cellular polysaccharides of *Hericium erinaceus* [D]. Taian, Shandong: Shandong Agricultural University, 2016.
- [13] Cui F Y, Gao X, Zhang J J, et al. Protective effects of extracellular and intracellular polysaccharides on hepatotoxicity by *Hericium erinaceus* SG-02 [J]. *Current Microbiology*, 2016, 73(3):379-385.
- [14] 王宏雨,张 迪,肖冬来,等. 姬松茸胞内多糖和胞外多糖的抗氧化活性研究 [J]. 福建轻纺,2017(12):30-32.
Wang H Y, Zhang D, Xiao D L, et al. Study on antioxidant activity of intracellular polysaccharide and extracellular polysaccharide in *Agaricus blazei* [J]. *The Light Textile Industries of Fujian*, 2017(12):30-32.
- [15] 刘建兵,刘 昆,刘城移,等. 7 株野生虫草菌的鉴定及其菌丝体醇提取物对 HepG2 细胞的抑制活性 [J]. 菌物学报,2018,37(8):1044-1053.
Liu J B, Liu K, Liu C Y, et al. Identification of seven wild cordycipitoid fungal strains and inhibiting activities of their mycelium ethanol extract against HepG2 cells [J]. *Mycosystema*, 2018, 37(8):1044-1053.
- [16] 梁宗琦,韩燕峰,初华丽. 中国真菌志 [M]. 北京:科学出版社,2013:1-158.
Liang Z Q, Han Y F, Chu H L. *Flora fungorum sinicorum* [M]. Beijing: Science Press, 2013:1-158.
- [17] Li S C, Yang X M, Ma H L, et al. Purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides extracted from *Phellinus igniarius* mycelia [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 133:24-30.
- [18] 陈显群,羊 悦,杨胜利. 蝉花液体发酵产胞外多糖培养基优化研究 [J]. 食用菌,2015,37(1):10-13.
Chen X Q, Yang Y, Yang S L. Study on optimization of extracellular polysaccharide medium by liquid fermentation of *Cordyceps cicadae* [J]. *Edible Fungi*, 2015, 37(1):10-13.
- [19] 侯若琳,刘 鑫,陈良韬,等. 一株韦司梅拟盘多毛孢的鉴定及其发酵液抗乳腺癌活性 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2019,47(3):111-120.
Hou R L, Liu X, Chen L T, et al. Identification of a *Pestaloti-*

- opsis vismiae* strain and anti-breast cancer activity of its fermentation broth [J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2019, 47(3): 111-120.
- [20] 刘 艳, 邵阿末, 殷 莹, 等. Srsf9/srp30c 通过调控 gr β 对胶质瘤细胞增殖和迁移的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(10): 1825-1830.
- Liu Y, Shao A M, Yin Y, et al. Effects of Srsf9/srp30c on proliferation and migration abilities of glioma cells by regulating gr β [J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2017, 33(10): 1825-1830.
- [21] Zhang J X, Wen C T, Duan Y Q, et al. Advance in *Cordyceps militaris* (Linn) Link polysaccharides; isolation, structure and bioactivities; a review [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 132: 906-914.
- [22] Wu Y J, Wei Z X, Zhang F M, et al. Structure, bioactivities and applications of the polysaccharides from *Tremella fuciformis* mushroom; a review [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 121: 1005-1010.
- [23] 陈 玲, 宋捷民. 蝉花的研究进展 [J]. 中国中医药科技, 2009, 16(2): 159-160.
- Chen L, Song J M. Research advancement of *Cordyceps cicadae* [J]. Chinese Journal of Traditional Medical Science Technology, 2009, 16(2): 159-160.
- [24] 李 璐, 吕 俊, 毕富勇, 等. 银耳多糖对肝癌细胞株 HepG2 增殖的影响 [J]. 皖南医学院学报, 2008, 27(5): 320-323.
- Li L, Lü J, Bi F Y, et al. Effects of *Tremella fuciformis* polysaccharides on growth of human hepatoma cell line HepG2 [J]. Acta Academiae Medicinae Wannan, 2008, 27(5): 320-323.
- [25] 赵 韪. 灰树花多糖联合维生素 C 诱导肝癌细胞 SMMC-7721 凋亡与自噬的研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2016.
- Zhao F. Study of *Gri folia frondosa* polysaccharide and vitamin C induced apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2016.
- [26] Dai J, Wu Y, Chen S W, et al. Sugar compositional determination of polysaccharides from *Dunaliella salina* by modified RP-HPLC method of precolumn derivatization with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 82(3): 629-635.
- [27] Zhang W, Xu P, Zhang H. Pectin in cancer therapy; a review [J]. Trends in Food Science and Technology, 2015, 44(2): 258-271.
- [28] 张 培, 郑晓萍, 马玉玲, 等. 党参多糖单糖组成与其对 HepG2 细胞毒活性的相关分析 [J]. 中草药, 2016, 47(15): 2684-2692.
- Zhang P, Zheng X P, Ma Y L, et al. Monosaccharide compositions of *Codonopsis pilosula* polysaccharides and their correlation analysis on cytotoxic activities against HepG2 cells [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2016, 47(15): 2684-2692.
- [29] 柯汉女. 不同分子量铁皮石斛多糖分离及抗肿瘤、抗氧化活性研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.
- Ke H N. *In vitro* antitumor and antioxidation activities of different molecular weight polysaccharides extracted from *Dendrobium officinale* [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, 2016.
- [30] 邢利鹏. 三种均一分子量当归多糖的制备、结构鉴定及体外抗肿瘤活性研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2013.
- Xing L P. Study on structure identification and anti-tumor activity *in vitro* of three uniform molecular weight-*Angelica sinensis* polysaccharides [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2013.
- [31] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA: a Cancer Journal for Clinicians, 2018, 68(6): 394-424.