

# 桑黄-昆布双向发酵菌质化学成分及抗肿瘤活性

刘佳<sup>1</sup>, 魏宝红<sup>1,2</sup>, 毕旺华<sup>1,2</sup>, 杨文哲<sup>2</sup>, 杨雪<sup>1,2\*</sup>, 李欣<sup>1</sup>, 王长云<sup>1</sup>, 马晓青<sup>1,2</sup>, 胡淑曼<sup>2</sup>

(1. 中国海洋大学 海洋药物教育部重点实验室 医药学院, 山东 青岛 266003; 2. 青岛海洋生物医药研究院, 山东 青岛 266071)

**摘要:** 该试验利用桑黄对昆布进行双向发酵处理, 探究双向发酵后所得菌质有效成分含量变化及对肿瘤细胞增殖抑制作用。分别采用硫酸-蒽酮比色法、福林酚比色法对昆布水提物和桑黄-昆布双向发酵菌质中总糖、总酚的含量进行测定; 采用 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, PMP)柱前衍生化-高效液相色谱法对昆布水提物、桑黄-昆布双向发酵菌质中单糖组成和含量进行分析; 采用磺酰罗丹明 B(sulforhodamine B, SRB)比色法测定昆布水提物、桑黄-昆布双向发酵菌质对人肺癌细胞 A549、人结肠癌细胞 HCT-116、人肝癌细胞 HepG2、人乳腺癌细胞 MCF-7、人宫颈癌细胞 HeLa、人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)增殖的影响。结果表明, 昆布经桑黄双向发酵后, 总糖和总酚含量显著升高; 单糖组成中古洛糖醛酸、甘露糖醛酸、甘露糖和岩藻糖含量也显著升高; 与昆布水提物相比, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  桑黄-昆布双向发酵菌质对 HUVECs 表现出较好的增殖抑制作用(抑制率为 49.35%), 对 A549、HCT-116、HeLa 细胞也表现出一定的增殖抑制作用, 而对 HepG2、MCF-7 细胞未表现出增殖抑制作用。因此, 桑黄-昆布双向发酵后, 发酵菌质中总糖、总酚、特征单糖含量明显增加, 对肿瘤细胞增殖抑制作用也进一步增强。

**关键词:** 真菌; 桑黄; 昆布; 双向发酵; 化学成分; 生物活性

## Chemical Components and Antitumor Activity of Inonotus-Eckloniae Thallus Bidirectional Fermentation Product

LIU Jia<sup>1</sup>, WEI Baohong<sup>1,2</sup>, BI Wanghua<sup>1,2</sup>, YANG Wenzhe<sup>2</sup>, YANG Xue<sup>1,2\*</sup>, LI Xin<sup>1</sup>, WANG Changyun<sup>1</sup>, MA Xiaoqing<sup>1,2</sup>, HU Shuman<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Marine Drugs, Ministry of Education, School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao 266003, Shandong, China; 2. Marine Biomedical Research Institute of Qingdao, Qingdao 266071, Shandong, China)

**Abstract:** A bidirectional fermentation system of Inonotus-Eckloniae Thallus was established, and the content changes of active ingredients and the inhibitory effects of the fermentation product on tumor cell proliferation were investigated. The content of total sugars and total phenols were determined by sulfuric acid-anthrone colorimetry and Folin-Ciocalteu colorimetry, respectively. The composition and content of monosaccharides were analyzed by pre-column derivatization with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP). The sulforhodamine B (SRB) assay was employed to measure the proliferation of human cancer cell lines, including human lung cancer A549 cells, human colon cancer HCT-116 cells, human liver cancer HepG2 cells, human breast cancer MCF-7 cells, human cervical cancer HeLa cells, and human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) treated with Eckloniae Thallus water extract and the bidirectional fermentation product. The results showed that after bidirectional fermentation, the content of total sugars, total phenols, and monosaccharides (guluronic acid, manuronic acid, mannose, and fucose) significantly increased. The bidirectional fermentation product at the concentration of 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  showed an inhibition rate of 49.35% on the growth of HUVECs and outperformed Eckloniae Thallus

基金项目: 山东省重点研发计划(重大科技创新工程)项目(2021CXGC010510); 中央引导地方科技发展专项资金项目(YDZX2021018)

作者简介: 刘佳(1997—), 女(汉), 硕士研究生, 研究方向: 中药发酵。

\* 通信作者: 杨雪(1983—), 女(汉), 高级工程师, 博士, 研究方向: 海洋中药研究与开发。

water extract. In addition, the fermentation product showed inhibitory effects on A549, HCT-116, and HeLa cells, but not on HepG2 or MCF-7 cells. Therefore, the bidirectional fermentation of *Inonotus-Eckloniae* Thallus increased the content of total sugars, total phenols, and characteristic monosaccharides and enhanced the inhibitory effects on tumor cell proliferation.

**Key words:** fungi; *Inonotus*; *Eckloniae* Thallus; bidirectional fermentation; chemical components; biological activity

引文格式:

刘佳,魏宝红,毕旺华,等. 桑黄-昆布双向发酵菌质化学成分及抗肿瘤活性[J].食品研究与开发,2023,44(19):61-67.

LIU Jia, WEI Baohong, BI Wanghua, et al. Chemical Components and Antitumor Activity of *Inonotus-Eckloniae* Thallus Bidirectional Fermentation Product[J]. Food Research and Development, 2023, 44(19):61-67.

肿瘤是目前严重威胁人类健康和生命安全的疾病之一。2019年我国癌症中心数据统计报告显示,全国每年恶性肿瘤发病约392.9万人,死亡约233.8万人,而且恶性肿瘤发病率还在持续上升<sup>[1]</sup>,寻找治疗肿瘤的药物迫在眉睫。目前,临床上治疗肿瘤的办法主要有手术治疗、化疗、放疗、免疫治疗、分子靶向治疗等。手术治疗主要适用于良性肿瘤和未发生远处转移的恶性肿瘤;化疗和放疗这两种治疗方法都伴随着药物毒性,会产生严重的不良反应;虽然靶向治疗和免疫治疗在各种临床环境中远远优于传统疗法,但它们仍然受到先天和后天耐药机制的困扰,限制了许多患者的治疗效果<sup>[2]</sup>。近些年来,从天然产物中发现越来越多的抗肿瘤成分,合理选用可辅助治疗肿瘤的特殊症状和并发症,不仅与西医放化疗配合有效,而且可单独应用治疗肿瘤<sup>[3-4]</sup>。

昆布是海带科植物海带(*Laminaria japonica* Aresch.)或翅藻科植物昆布(*Ecklonia kurome* Okam.)的干燥叶状体,是大宗海洋中药品种,具有软坚散结、利水消肿、消痰功效<sup>[5]</sup>。勿日汗等<sup>[6]</sup>对昆布的应用方剂进行整理发现,含有昆布的方剂约有180首,其中用于治疗瘰疬病的方剂占总方数的40%,治瘰疬方中昆布的使用频率为63.5%,因此,临床上常用昆布的软坚散结之功效对肿瘤进行干预治疗<sup>[7]</sup>。目前昆布抗肿瘤研究主要集中在昆布多糖、岩藻黄质等有效成分,昆布多糖即褐藻胶是昆布发挥抗肿瘤作用的主要成分,褐藻胶由 $\beta$ -D-甘露糖醛酸( $\beta$ -D-mannuronic acid, M)和 $\alpha$ -L-古洛糖醛酸( $\alpha$ -L-guluronic acid, G)通过1 $\rightarrow$ 4糖苷键杂聚在一起组成<sup>[8]</sup>。研究表明, M段、G段是海洋藻类抗肿瘤的有效部位,目前发现褐藻胶寡糖抗肿瘤作用涉及多种机制,包括肿瘤细胞的增殖和转移、免疫调节等<sup>[9]</sup>。褐藻胶寡糖具有天然无毒、对机体的副作用小等特点,已经成为目前研究的热点。昆布利用传统水提得到的昆布水提物中古洛糖醛酸和甘露糖醛酸

得率偏低,其抗肿瘤活性 $IC_{50}$ 大多在300  $\mu$ g/mL以上,甚至达到1 mg/mL<sup>[10-11]</sup>。为提高昆布的资源利用率,本课题组借鉴槐耳-黄芪菌质、雷灵菌质的开发经验,采用中药双向发酵技术,对昆布进行双向发酵研究。中药双向发酵是指以药用真菌为发酵菌种,以中药材作为药性基质,该基质在为真菌提供营养物质的同时,又与真菌在生长过程中产生的各种代谢产物相互作用、相互影响,使整个发酵具有“双向性”<sup>[12]</sup>。

桑黄是锈革孔菌科真菌粗毛纤孔菌[*Inonotus hispidus* (Bull.)P.Karst.]的干燥子实体,是一种名贵的药食两用真菌,具有散结化饮、活血止血、健脾止泻的功效<sup>[13]</sup>。在生物抗癌领域,桑黄是国际公认的最具抗癌功效的真菌之一<sup>[14]</sup>。

本研究利用昆布和桑黄配伍组合的抗肿瘤功效<sup>[15-16]</sup>,利用双向发酵技术优化制备桑黄-昆布双向发酵菌质,阐明菌质中有效成分含量的变化,并采用磺酰罗丹明B(sulforhodamine B, SRB)比色法测定桑黄-昆布双向发酵菌质对人肺癌细胞A549、人结肠癌细胞HCT-116、人肝癌细胞HepG2、人乳腺癌细胞MCF-7、人宫颈癌细胞HeLa、人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)增殖的影响,初步评价桑黄-昆布双向发酵菌质的抗肿瘤活性,以期提高昆布的抗肿瘤功效及利用率,为拓展其在药食同源功能食品的开发应用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

桑黄:临清清源正本生物医药科技有限公司;昆布:亳州市佰世信中药饮片有限公司;L-阿拉伯糖、半乳糖、D-木糖、D-甘露糖、鼠李糖、岩藻糖、D-无水葡萄糖、D-半乳糖醛酸(纯度均>98%);中国食品药品检定研究院;D-葡萄糖醛酸、D-氨基半乳糖盐酸盐、D-氨基葡萄糖盐酸盐(纯度均 $\geq$ 99%);西格玛奥德里奇

(上海)贸易有限公司;D-甘露糖醛酸、L-古罗糖醛酸(纯度均为98%);青岛博智汇力生物科技有限公司;人肺癌细胞A549、人结肠癌细胞HCT-116、人肝癌细胞HepG2、人乳腺癌细胞MCF-7、人宫颈癌细胞HeLa、HUVECs:中科院上海细胞库;RPMI 1640培养液、DMEM高糖培养液、Mc-COY'S 5A培养液:浙江森瑞生物科技有限公司;SRB(S1402):上海生物工程有限公司;乙腈、甲醇(均为色谱纯):Merk公司;三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TFA)、1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, PMP)、三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)(均为分析纯):国药集团化学试剂有限公司。

## 1.2 仪器与设备

MQD-B1T全温振荡培养箱:上海旻泉仪器有限公司;ZHJH-C1115B垂直流超净工作台:上海智城分析仪器制造有限公司;LDZH-150KBS立式压力蒸汽灭菌器:上海申安医疗器械厂;Aglient 1260 II型高效液相色谱仪:美国安捷伦科技有限公司;ME204E万分之一天平:梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;GL冷冻高速离心机:湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;HWS-26水浴锅:上海一恒科学仪器有限公司;101-2AB型电热鼓风干燥箱:天津市泰斯特仪器有限公司;SCIENTZ-18N型冷冻干燥机:宁波新芝生物科技股份有限公司;N-1100型旋转蒸发仪:上海爱朗仪器有限公司;SpectraMax-i3多功能酶标仪:上海艾研生物科技有限公司。

## 1.3 试验方法

### 1.3.1 桑黄-昆布双向发酵体系的建立

#### 1.3.1.1 培养基的配制

前期优化的桑黄最佳培养工艺为3%蔗糖、2%酵母浸粉、0.3%硫酸镁、0.6%磷酸二氢钾、0.1%硫酸铜,在此基础上添加一定量的昆布,进行桑黄-昆布双向发酵。

马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基:马铃薯200 g,去皮洗净后切小块,沸水煮30 min后4层纱布滤过,滤液加20 g葡萄糖及15 g琼脂,定容至1 L。

液体种子培养基:蔗糖2%、酵母浸粉1%、硫酸镁0.3%、磷酸二氢钾0.6%。

基础培养基:蔗糖3%、酵母浸粉2%、硫酸镁0.3%、磷酸二氢钾0.6%、硫酸铜0.1%。

#### 1.3.1.2 菌种活化

将保存的桑黄菌株接种于PDA培养基上,每个平板接入1块体积约0.1 cm<sup>3</sup>的桑黄菌种,置于26℃培养箱中恒温培养14 d,备用。

#### 1.3.1.3 液体培养

于250 mL锥形瓶装入液体种子培养基100 mL,接入活化后的桑黄菌种4块,每块约0.1 cm<sup>3</sup>,于28℃、160 r/min的摇床条件下培养7 d,得桑黄液体菌种子。

#### 1.3.1.4 桑黄-昆布双向发酵菌质的制备

取粉碎后的昆布粉末4 g置于250 mL锥形瓶中,加入100 mL基础培养基,搅拌均匀,放入121℃高压蒸汽灭菌锅中灭菌20 min,得双向发酵培养基;待其冷却至室温,接种10 mL桑黄种子液,在28℃、160 r/min的摇床条件下培养9 d,10 000 r/min离心10 min,沉淀用蒸馏水洗涤2次,合并上清液,即得桑黄-昆布双向发酵菌质,浓缩后冷冻干燥,备用。

#### 1.3.1.5 昆布水提物的制备

取4 g粉碎后的昆布,加100 mL蒸馏水,100℃回流提取1 h,提取2次,合并两次提取液,10 000 r/min离心10 min,取上清液,即得昆布水提物,浓缩后冷冻干燥,备用。

## 1.3.2 化学成分含量测定

### 1.3.2.1 总糖含量测定

采用硫酸-蒽酮比色法测定总糖含量<sup>[7]</sup>。分别取昆布水提物和桑黄-昆布双向发酵菌质精密称定,加蒸馏水制成质量浓度为0.1 mg/mL的溶液,10 000 r/min离心10 min,取上清液,待测。精密吸取样品溶液2 mL,迅速精密加入0.1%硫酸-蒽酮溶液6 mL,立即摇匀,沸水浴15 min,立即至冰浴中冷却15 min,取出,于625 nm波长处测定吸光度,根据葡萄糖标准溶液曲线计算其总糖含量。

### 1.3.2.2 单糖组成分析

标准品溶液的制备:取L-阿拉伯糖、半乳糖、D-木糖、D-甘露糖、鼠李糖、岩藻糖、D-无水葡萄糖、D-半乳糖醛酸、D-葡萄糖醛酸、D-氨基半乳糖盐酸盐、D-氨基葡萄糖盐酸盐、D-甘露糖醛酸、L-古罗糖醛酸标准品精密称定,加水制成质量浓度为0.5 mg/mL的混合标准品溶液,待测。取100 μL上述混合标准品溶液,分别加入0.3 mol/L NaOH溶液和0.5 mol/L PMP甲醇溶液各100 μL,混匀,至70℃恒温水浴90 min,冷却,加入100 μL 0.3 mol/L盐酸溶液中和。继而加入500 μL氯仿,涡旋30 s,离心去除有机相,重复3次。取水相,即得对照品溶液<sup>[8]</sup>。

供试溶液的制备:取昆布水提物和桑黄-昆布双向发酵菌质精密称定,加水制成质量浓度为5.0 mg/mL的待测样品溶液,备用。精密吸取样品溶液200 μL,加入2 mol/L的TFA溶液200 μL,封管后,置100℃恒温烘箱5 h;精密吸取水解液200 μL,加入200 μL甲醇,氮气吹干,重复2次。加入100 μL水溶解,后续反应步

骤同标准品溶液制备,即得供试品溶液。

色谱条件:色谱柱采用日本半井公司 COSMOSIL Packed 5 C18-PAQ(4.6 mm×150 mm,5 μm)的色谱柱;流动相为 0.1 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH 缓冲溶液(A)和乙腈(B),18%B 等度洗脱;流速为 1.0 mL/min;检测波长为 254 nm,柱温为 30 ℃,进样量为 10 μL。

各单糖组分相对含量分析:采用外标一点法进行计算,求得各单糖组分含量<sup>[9]</sup>。

### 1.3.2.3 总酚含量测定

采用福林酚比色法测定总酚含量<sup>[20]</sup>。分别取昆布水提物和桑黄-昆布双向发酵菌质精密称定,加蒸馏水制成质量浓度为 5 mg/mL 的溶液,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,待测。精密量取样品溶液 0.5 mL,加 1.4 mol/L 的福林酚试剂 0.5 mL,在 1~8 min 内加入 30 g/L 的 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液 4 mL,45 ℃ 水浴中避光显色 112 min,在 765 nm 处测溶液的吸光度,根据没食子酸标准溶液曲线计算其总酚含量。

### 1.3.3 体外抑制肿瘤细胞增殖活性试验

#### 1.3.3.1 细胞培养

分别将人肺癌细胞 A549、人肝癌细胞 HepG2、人宫颈癌细胞 HeLa 用 DMEM 高糖培养液培养,人乳腺癌细胞 MCF-7 和 HUVECs 用 RPMI 1640 培养液培养,人结肠癌细胞 HCT-116 用 McCOY'S 5A 培养液培养,于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养,胰酶消化,传代,保持细胞在良好的对数生长期。

#### 1.3.3.2 检测方法

处于对数生长期的人肺癌细胞 A549、人结肠癌细胞 HCT-116、人肝癌细胞 HepG2、人乳腺癌细胞 MCF-7、人宫颈癌细胞 HeLa、HUVECs 分别以 5 000 个/孔(180 μL/孔)接种于 96 孔板,培养 24 h 后,加入待测样品 20 μL,待测样品分为溶剂对照组,阳性药组(阿霉素),昆布水提物组和桑黄-昆布双向发酵菌质组,

阳性药的终浓度为 1 μmol/L,所有待测样品终浓度 100 μg/mL,每个浓度设 3 个复孔,溶剂对照组加入等体积的无菌水。药物作用 72 h 后,每孔加入 50% 冰冷的三氯乙酸固定细胞,SRB 染色后,加入 150 μL/孔的 Tris 溶液,于 540 nm 测定其吸光度。

肿瘤细胞增殖抑制率(I,%)按下列公式计算。

$$I = [(A_1 - A_2) / A_1] \times 100$$

式中:A<sub>1</sub> 为对照品在 540 nm 处的吸光度;A<sub>2</sub> 为给药孔样品在 540 nm 处的吸光度。

### 1.4 数据统计及分析

所有结果以用平均值±标准差表示,并采用 Excel 和 SPSS 软件进行分析。采用 T-test 统计分析,以 P<0.05 表示差异显著,P<0.01 表示差异极显著。

## 2 结果与分析

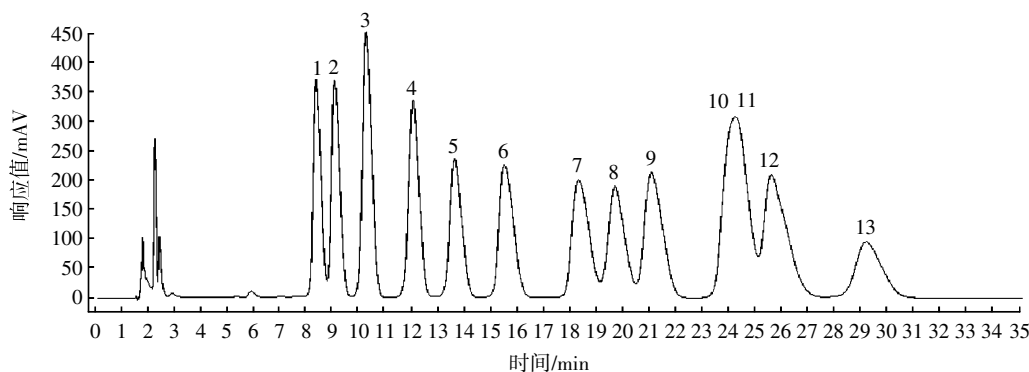
### 2.1 总糖含量检测结果

以葡萄糖为标准品,以吸光度对质量进行线性回归,得回归方程为  $y = 0.0106x + 0.0417$  ( $R^2 = 0.9999$ ),曲线拟合性较好。测得昆布水提物和桑黄-昆布双向发酵菌质中总糖含量分别为(30.00±1.51)、(645.00±18.55) mg/g,表明在相同的昆布生药量条件下,与昆布水提物相比,桑黄-昆布双向发酵菌质总糖含量显著升高( $P < 0.01$ )。推测原因可能为桑黄在发酵过程中不断代谢产生的纤维素酶类、淀粉酶类物质分解昆布的细胞壁,促进昆布细胞中褐藻胶、褐藻淀粉、褐藻糖胶等物质的溶出,此外,昆布也促进了桑黄的生长、分裂和发育,从而提高了菌质中总糖的含量<sup>[21]</sup>。

### 2.2 单糖组成分析结果

混合标准品、昆布水提物和桑黄-昆布双向发酵菌质的高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)图见图 1~图 3。

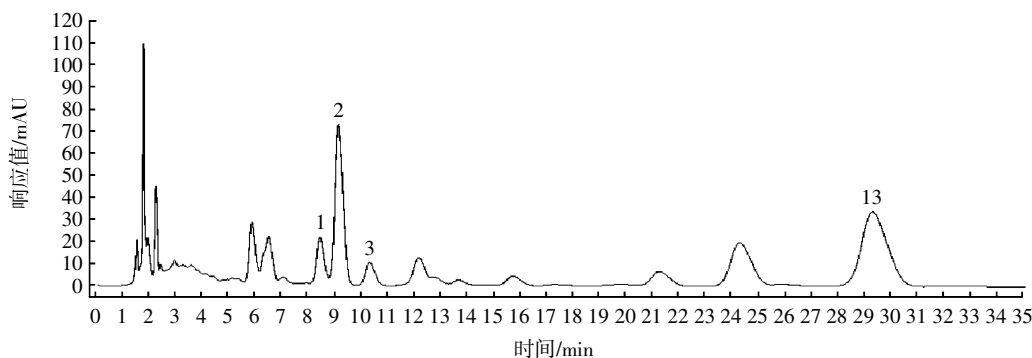
由图 1~图 3 可知,昆布水提物和桑黄-昆布双向



1.古洛糖醛酸;2.甘露糖醛酸;3.甘露糖;4.D-氨基葡萄糖;5.鼠李糖;6.葡萄糖酸;7.半乳糖酸;8.氨基半乳糖;9.葡萄糖;10.半乳糖;11.木糖;12.阿拉伯糖;13.岩藻糖。

图 1 混合标准品单糖的 HPLC 色谱图

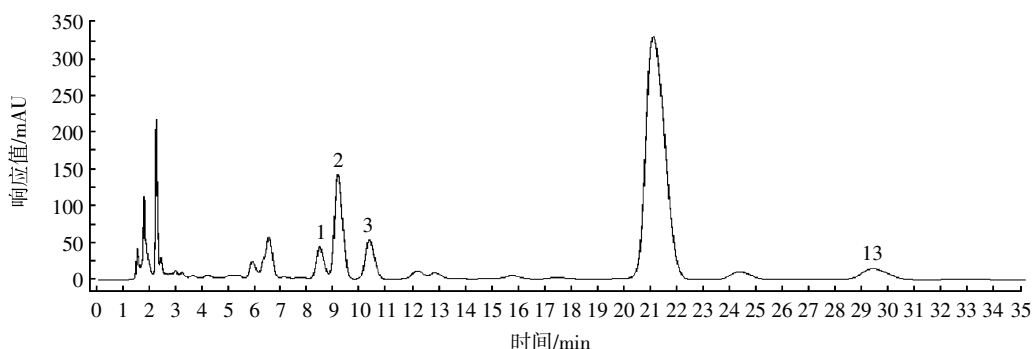
Fig.1 HPLC chromatogram of mixed standards of monosaccharides



1.古洛糖醛酸;2.甘露糖醛酸;3.甘露糖;13.岩藻糖。

图2 昆布水提物的 HPLC 色谱图

Fig.2 HPLC chromatogram of Eckloniae Thallus water extract



1.古洛糖醛酸;2.甘露糖醛酸;3.甘露糖;13.岩藻糖。

图3 桑黄-昆布发酵菌质的 HPLC 色谱图

Fig.3 HPLC chromatogram of Inonotus-Eckloniae Thallus bidirectional fermentation product

发酵菌质均含有甘露糖、古洛糖醛酸、甘露糖醛酸和岩藻糖。

根据外标一点法计算得到昆布水提物和桑黄-昆布双向发酵菌质中单糖的含量,见表1。

表1 昆布水提物和桑黄-昆布双向发酵菌质单糖含量测定结果  
Table 1 Content of monosaccharides in Eckloniae Thallus water extract and Inonotus-Eckloniae Thallus bidirectional fermentation product

样品名称	mg/g			
	古洛糖醛酸	甘露糖醛酸	甘露糖	岩藻糖
昆布水提物	2.64±0.02	8.96±0.17	1.13±0.05	17.76±0.17
桑黄-昆布双向发酵菌质	15.46±0.25**	50.66±0.14**	16.37±0.26**	22.64±0.11**

注:以昆布生药量计,同列比较,\*\*表示差异极显著( $P<0.01$ )。

由表1可知,在相同的昆布生药量条件下,昆布经桑黄发酵后,古洛糖醛酸、甘露糖醛酸、甘露糖和岩藻糖含量显著增加( $P<0.01$ ),分别达到(15.46±0.25)、(50.66±0.14)、(16.37±0.26)、(22.64±0.11) mg/g,推测原因可能为桑黄在昆布提供能量的情况下进行分裂、生长、繁殖和代谢,它可以针对昆布不同的成分构成的细胞壁结构,分泌各种胞外酶,如纤维素酶、半纤维素酶、淀粉酶、果胶酶、蛋白酶等使昆布中的有效成分

如褐藻胶、褐藻淀粉、褐藻糖胶溶出,从而提高了菌质中古洛糖醛酸、甘露糖醛酸、甘露糖和岩藻糖的含量<sup>[2]</sup>。

### 2.3 总酚含量检测结果

以没食子酸为标准品,以吸光度( $A$ )对质量进行线性回归,得回归方程为 $y=33.21x-0.0949$ ( $R^2=0.9992$ ),曲线拟合性较好。计算昆布水提物和桑黄-昆布双向发酵菌质中总酚的含量分别为(2.24±0.19)、(9.94±0.57) mg/g。结果显示在相同的昆布生药量条件下,与昆布水提物比较,桑黄-昆布双向发酵菌质总酚的含量显著升高( $P<0.01$ )。推测原因可能与总糖含量升高的原因一致。

### 2.4 体外抑制肿瘤细胞增殖活性实验结果

昆布水提物、桑黄-昆布双向发酵菌质对 A549、HCT-116、HeLa、HUVECs、HepG2、MCF-7 细胞增殖抑制率结果如表2所示。

如表2所示,昆布水提物、桑黄-昆布双向发酵菌质和阿霉素对 HUVECs、A549、HCT-116、HeLa 细胞增殖均表现出不同程度的抑制作用;对于 HepG2 细胞增殖,只有昆布水提物和阿霉素表现出了抑制作用;而对于 MCF-7 细胞增殖除阿霉素外,昆布水提物和双向发酵菌质均未表现抑制作用,说明桑黄-昆布双向发酵

表2 昆布水提物和桑黄-昆布双向发酵菌质对细胞的增殖抑制率( $n=3$ )Table 2 Inhibition rates of cell proliferation by Eckloniae Thallus water extract and Inonotus-Eckloniae Thallus bidirectional fermentation product ( $n=3$ )

增殖抑制率	HUVECs	HCT-116 细胞	A549 细胞	HeLa 细胞	HepG2 细胞	MCF-7 细胞	%
昆布水提物	40.47±1.29	11.41±0.76	12.50±0.34	5.59±3.74	15.6250±1.05	-16.78±0.02	
桑黄-昆布双向发酵菌质	49.35±2.00	21.88±5.61	21.33±3.81	7.67±2.65	-4.66±0.42	-5.54±4.84	
阿霉素	93.59±0.61	94.01±3.71	92.21±1.23	88.31±2.86	92.02±0.54	71.165±0.01	

菌质具有一定的抗肿瘤作用。相同的昆布生药量条件下,桑黄-昆布双向发酵菌质较昆布水提物的抗肿瘤活性明显提高,推测可能与桑黄-昆布双向发酵菌质中古洛糖醛酸、甘露糖醛酸、岩藻糖等功能单糖含量升高有关。古洛糖醛酸、甘露糖醛酸是昆布中的特征性单糖,分子量低,水溶性强,稳定性高,本身无细胞毒性,对正常细胞无损伤;古洛糖醛酸、甘露糖醛酸与一般的抗肿瘤剂不同,是通过提高生物体对肿瘤细胞的防御能力和增强宿主免疫系统的功能来实现抗肿瘤作用而非直接作用于肿瘤细胞<sup>[23-25]</sup>;甘露糖则是通过干扰葡萄糖代谢阻断肿瘤的能量来源,从而抑制肿瘤细胞的生长<sup>[26-28]</sup>,另外还可调控免疫检查点分子PD-L1,达到抗癌作用<sup>[29]</sup>;岩藻糖可以参与细胞的识别与黏附、糖链的合成、肿瘤的发生与转移等<sup>[30]</sup>。桑黄-昆布双向发酵菌质在100  $\mu\text{g/mL}$ 的浓度条件下,对HUVECs的增殖抑制作用最强,达到了49.35%,HUVECs来源于人脐静脉,是一种具有干细胞潜能的内皮细胞,可以通过抑制HUVECs增殖,减少或阻止新血管的生成,从而抑制肿瘤生长和转移<sup>[31]</sup>。

### 3 结论

本研究以桑黄作为发酵菌株,昆布作为药性基质,采用双向液体发酵技术,在一定的优化条件下制备桑黄-昆布双向发酵菌质,其中两类活性成分总量分析结果表明,在相同的昆布生药量情况下,发酵处理后的菌质中总糖及总酚含量均显著增加,总糖含量由30.00 mg/g升高到645.00 mg/g;总酚含量由2.24 mg/g升高到9.94 mg/g。发酵处理后的菌质中古洛糖醛酸、甘露糖醛酸、甘露糖和岩藻糖含量显著增加,分别由2.64、8.96、1.13、17.76 mg/g升高到15.46、50.66、16.37、22.64 mg/g。除此之外还进行了桑黄-昆布双向发酵菌质对6种细胞株增殖的影响研究,结果表明桑黄-昆布双向发酵菌质在100  $\mu\text{g/mL}$ 的浓度条件下,对HUVECs的增殖显示出显著的抑制作用,抑制率为49.35%,同时对A549、HCT-116、HeLa细胞增殖也表现出不同程度的抑制作用,抑制率分别为21.88%、21.33%、7.67%,说明桑黄-昆布双向发酵菌质具有一定的抗肿瘤作用。本研究为将桑黄-昆布发酵菌质开

发功能食品提供了参考,后续还将进行桑黄-昆布双向发酵菌质对HUVECs增殖抑制是否呈剂量依赖性以及对HUVECs抑制效果的稳定性等进行深入研究。

### 参考文献:

- [1] 黄璜,孙培元,邹开勇,等.中国恶性肿瘤一级预防现状与展望[J].中华肿瘤杂志,2022,44(9):942-949.  
HUANG Huang, SUN Peiyuan, ZOU Kaiyong, et al. Current situation and prospect of primary prevention of cancer in China[J]. Chinese Journal of Oncology, 2022, 44(9): 942-949.
- [2] HARGADON K M. Genetic dysregulation of immunologic and oncogenic signaling pathways associated with tumor-intrinsic immune resistance: A molecular basis for combination targeted therapy-immunotherapy for cancer[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2023, 80(2): 1-22.
- [3] CHEN H K, ZHENG M, ZHANG W H, et al. Research status of mouse models for non-small-cell lung cancer (NSCLC) and antitumor therapy of traditional Chinese medicine (TCM) in mouse models[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM, 2022, 2022: 6404853.
- [4] ALFONZETTI T, YASMIN-KARIM S, NGWA W, et al. Phytoradiotherapy: An integrative approach to cancer treatment by combining radiotherapy with phytomedicines[J]. Frontiers in Oncology, 2021, 10: 624663.
- [5] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2014.  
Nanjing Medical University. Dictionary of traditional Chinese medicine[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 2014.
- [6] 勿日汗, 年莉. 昆布在方剂中的配伍应用研究[J]. 江西中医药, 2014, 45(8): 27-30.  
WU Rihan, NIAN Li. Study on compatibility and application of kelp in prescription[J]. Jiangxi Journal of Traditional Chinese Medicine, 2014, 45(8): 27-30.
- [7] 崔鹏, 高天舒. 常用软坚散结中药及复方碘含量的测定[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(7): 1396-1398.  
CUI Peng, GAO Tianshu. To mensurate the content of iodine in herbal medicine and compound prescription used in softening hard mass and disintegrating masses[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2007, 25(7): 1396-1398.
- [8] C I F F, JIANG H, ZHANG Z H, et al. Properties and potential applications of mannuronan C5-epimerase: A biotechnological tool for modifying alginate[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 168: 663-675.
- [9] XING M C, CAO Q, WANG Y, et al. Advances in research on the bioactivity of alginate oligosaccharides[J]. Marine Drugs, 2020, 18(3): 144.

- [10] 高文仓, 杨波, 庞德湘. 昆布多糖对人乳头状甲状腺癌细胞 TPC-1 生长信号转导的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2022, 49(4): 145-149. GAO Wencang, YANG Bo, PANG Dexiang. Regulation of laminarin on growth signal transduction of human papillary thyroid cancer cell line TPC-1[J]. Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine, 2022, 49(4): 145-149.
- [11] 李莹, 黄德春, 陈贵堂, 等. 昆布多糖不同提取工艺优化及其理化性质和抗肿瘤活性比较[J]. 食品科学, 2019, 40(6): 288-294. LI Ying, HUANG Dechun, CHEN Guitang, et al. Polysaccharides from *Laminaria japonica*: Optimization of different extraction processes and comparison of physicochemical properties and antitumor activity[J]. Food Science, 2019, 40(6): 288-294.
- [12] 庄毅, 潘扬, 谢小梅, 等. 药用真菌“双向发酵”的起源、发展及其优势与潜力[J]. 中国食用菌, 2007, 26(2): 3-6. ZHUANG Yi, PAN Yang, XIE Xiaomei, et al. The origin, development and its advantage and potential of 'the Bi-directional solid fermentation' for medicinal fungi[J]. Edible Fungi of China, 2007, 26(2): 3-6.
- [13] 山东省药品监督管理局, 山东省食品药品检验研究院. 山东省中药材标准: 2022 年版[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 2022. Shandong Medical Products Administration, Shandong Institute for Food and Drug Control. Standard for Chinese medicinal materials in Shandong province: 2022 edition[M]. Jinan: Shandong Science and Technology Press, 2022.
- [14] 曹红妹, 胡桂萍, 石旭平, 等. 药用真菌桑黄的研究进展[J]. 蚕业科学, 2019, 45(2): 285-292. CAO Hongmei, HU Guiping, SHI Xuping, et al. Research progress on medicinal fungus Sanghuang[J]. Science of Sericulture, 2019, 45(2): 285-292.
- [15] 刘漠浩, 曾建红. 桑黄化学成分及其抗肿瘤作用机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(8): 275-282. LIU Mohao, ZENG Jianhong. Chemical components of *Phellinus* and antitumor mechanism: A review[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2023, 29(8): 275-282.
- [16] 张浩, 王丽. 昆布多糖生物活性研究进展[J]. 食品安全导刊, 2019(9): 142, 144. ZHANG Hao, WANG Li. Research progress on biological activity of laminaria polysaccharide[J]. China Food Safety Magazine, 2019(9): 142, 144.
- [17] 徐宾朋. 桑黄的质量标准研究[J]. 黑龙江医药, 2018, 31(5): 957-960. XU Binpeng. Study on quality standard of *Phellinus* sp[J]. Heilongjiang Medicine Journal, 2018, 31(5): 957-960.
- [18] 胡淑曼, 付志飞, 魏宝红, 等. HPLC 法测定海藻药材质量标志物岩藻糖的含量[J]. 中国海洋药物, 2021, 40(1): 11-15. HU Shuman, FU Zhifei, WEI Baohong, et al. Determination of characteristic ingredient—fucose in marine TCM *Sargassum* by HPLC[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2021, 40(1): 11-15.
- [19] 丁水平, 丁水生. 高效液相色谱法测定天天风采中阿魏酸的含量[J]. 医药导报, 2002, 21(5): 303-304. DING Shuiping, DING Shuisheng. Determination of ferulic acid in Tiantianfengcai Granules by HPLC[J]. Herald of Medicine, 2002, 21(5): 303-304.
- [20] 牛雪. 福林酚法测定葡萄酒总酚的优化研究[D]. 银川: 宁夏大学, 2015. NIU Xue. The research on optimized total wine phenols determination by folin ciocalteu assay[D]. Yinchuan: Ningxia University, 2015.
- [21] 张文隽. 桑黄菌液体发酵生理特性研究及其动力学模型建立[D]. 西安: 西北大学, 2017. ZHANG Wenjun. Studies on liquid fermented physiological characteristics and dynamic model of *Phellinus linteus*[D]. Xi'an: Northwest University, 2017.
- [22] 宋予震, 史洪涛, 范明夏, 等. 微生物发酵中药研究进展[J]. 动物医学进展, 2021, 42(1): 105-109. SONG Yuzhen, SHI Hongtao, FAN Mingxia, et al. Progress on microbial fermented traditional Chinese medicine[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2021, 42(1): 105-109.
- [23] MOHSENZADEGAN M, MOGHBELI F, MIRSHAFIEY A, et al. Anti-tumor effect of M2000 ( $\beta$ -D-mannuronic acid) on the expression of inflammatory molecules in the prostate cancer cell[J]. Immunopharmacology and Immunotoxicology, 2021, 43(4): 419-430.
- [24] MARTÍNEZ-GÓMEZ F, GUERRERO J, MATSUHIRO B, et al. Characterization of poly-D-mannuronate and poly-L-gulonate block fractions from sodium alginate and preparation of hydrogels with poly(vinylalcohol)[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 111: 935-946.
- [25] ZHANG Q J, VAN RIJSSELE R, WALVOORT M T C, et al. Acceptor reactivity in the total synthesis of alginate fragments containing  $\alpha$ -L-guluronic acid and  $\beta$ -D-mannuronic acid[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2015, 54(26): 7670-7673.
- [26] SOYAMA T, SAKURAGI A, OISHI D, et al. Photodynamic therapy exploiting the anti-tumor activity of mannose-conjugated chlorin e6 reduced M2-like tumor-associated macrophages[J]. Translational Oncology, 2021, 14(2): 101005.
- [27] BISCHOFF S, HACKENBERG S, HAGEN R, et al. Antitumor effect of D-mannose on head and neck squamous cell carcinoma by inducing autophagy[J]. Laryngo-Rhino-Otologie, 2020, 99: s135.
- [28] 宋蒙蒙, 陈哲文, 李晔, 等. 甘露糖抗肿瘤作用的研究进展[J]. 肿瘤代谢与营养电子杂志, 2019, 6(3): 283-286. SONG Mengmeng, CHEN Zhewen, LI Ye, et al. Advances in anti-tumor effect of mannose[J]. Electronic Journal of Metabolism and Nutrition of Cancer, 2019, 6(3): 283-286.
- [29] ZHANG R N, YANG Y J, DONG W J, et al. D-mannose facilitates immunotherapy and radiotherapy of triple-negative breast cancer via degradation of PD-L1[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2022, 119(8): e2114851119.
- [30] 甘激文. L-岩藻糖的性质、应用及市场前景[J]. 大众科技, 2019, 21(12): 14-16. GAN Jiwen. Properties, applications and market prospects of L-fucose[J]. Popular Science & Technology, 2019, 21(12): 14-16.
- [31] 赵洪庆, 符超君, 孟盼, 等. 双丹明目胶囊抑制人脐静脉内皮细胞增殖有效成分筛选研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2019, 26(7): 48-51. ZHAO Hongqing, FU Chaojun, MENG Pan, et al. Study on screening of effective components in Shuangdan Mingmu capsules in inhibiting proliferation of human umbilical vein endothelial cells[J]. Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine, 2019, 26(7): 48-51.