

真姬菇多糖结构鉴定及其抗肿瘤活性

李欣霖¹, 朱链², 刘可², 尹相力³, 陈长青³, 黄宇³, 丁祥^{1*}

(1. 西华师范大学 环境科学与工程学院, 嘉陵江流域生态环境保护与污染防治南充市重点实验室, 四川南充 637009; 2. 西华师范大学 生命科学学院, 西南野生动植物资源保护教育部重点实验室, 四川南充 637009; 3. 西充星河生物科技有限公司, 四川南充 637260)

摘要: 为明确真姬菇多糖(*Hypsizygus marmoreus* polysaccharide, HM-P)的结构组成及体外抗肿瘤活性, 采用热水浸提法分离提取 HM-P, 利用凝胶渗透色谱、傅里叶变换红外光谱和高效液相色谱等技术鉴定 HM-P 的组成成分, 采用细胞活力检测试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)以及细胞划痕法检验 HM-P 的体外抗肿瘤活性。结果表明, HM-P 的重均分子量(weight average molecular weight, M_w)为 25 232 Da, 由半乳糖、葡萄糖、木糖以 72.406:17.661:9.933 的含量比例组成。HM-P 能够显著地抑制肺癌细胞(A549)、结肠癌细胞(CT26.WT)、成纤维细胞(L929)和胃癌细胞(MFC)增殖($P<0.05$)、迁移($P<0.05$), 以及极显著地抑制腹水癌细胞(S180)增殖($P<0.01$), 其中 HM-P 对胃癌细胞(MFC)的直接抑制作用最强, 当 HM-P 终浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 时, 抑制率达到 27.9%, 迁移率达到 19.0%。HM-P 通过介导巨噬细胞(RAW264.7)上清液杀死肺癌细胞(A549)、结肠癌细胞(CT26.WT)、成纤维细胞(L929)、胃癌细胞(MFC)及腹水癌细胞(S180), 发现均有极显著的杀伤效果($P<0.01$), 且对肺癌细胞(A549)的杀伤效果最好, 当 HM-P 终浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 时, 杀伤率高达 42.6%。

关键词: 真姬菇; ITS 序列鉴定; 多糖组成; 体外; 抗肿瘤活性

Structure Identification and Antitumor Activity of *Hypsizygus marmoreus* Polysaccharides

LI Xinlin¹, ZHU Lian², LIU Ke², YIN Xiangli³, CHEN Changqing³, HUANG Yu³, DING Xiang^{1*}

(1. Key Laboratory of Nanchong City of Ecological Environment Protection and Pollution Prevention in Jialing River Basin, College of Environmental Science and Engineering, China West Normal University, Nanchong 637009, Sichuan, China; 2. Key Laboratory of Southwest China Wildlife Resources Conservation (Ministry of Education), College of Life Science, China West Normal University, Nanchong 637009, Sichuan, China; 3. Xichong Xinghe Biotechnology Co., Ltd., Nanchong 637260, Sichuan, China)

Abstract: To determine the structure composition and *in vitro* anti-tumor activity of *Hypsizygus marmoreus* polysaccharide (HM-P), HM-P was isolated and extracted by hot water extraction method. The HM-P components were identified by gel permeation chromatography, Fourier transform infrared spectroscopy, and high performance liquid chromatography. The *in vitro* anti-tumor activity of HM-P was examined by cell counting kit-8 (CCK-8) and cell scratch method. The result showed that HM-P, with a weight average molecular weight (M_w) of 25 232 Da, was composed of galactose, glucose, and xylose in the content ratio of 72.406:17.661:9.933. HM-P could significantly inhibit the proliferation ($P<0.05$) and migration ($P<0.05$) of lung cancer cells (A549), colon cancer cells (CT26.WT), fibroblasts (L929), and mouse forestomach carcinoma (MFC). It could also highly significantly inhibit the proliferation of ascites cancer cells (S180) ($P<0.01$). The direct inhibition of HM-P on mouse forestomach carcinoma (MFC) was the strongest. When the final concentration of HM-P was 20 $\mu\text{g/mL}$, the inhibition rate reached 27.9% and the mobility rate 19.0%. HM-P mediated the supernatant of macrophages (RAW264.7) to kill lung cancer cells (A549), colon cancer cells (CT26.WT), fibroblasts (L929), mouse forestomach carcinoma (MFC) and ascites cancer cells (S180). It was found that the killing effect was extremely significant ($P<0.01$), especially on lung cancer cells (A549). The killing rate

基金项目: 四川省科技厅农业科技成果转化资金项目(2022NZZJ0003); 四川省转移支付科技成果转化示范项目(22ZYZFSF0009、23ZHSF0082); 四川省科技厅应用基础面上项目(2022NSFS0107); 达州市市校合作项目(2021-S05)

作者简介: 李欣霖(1999—), 女(汉), 硕士研究生, 研究方向: 资源微生物多样性保护与利用。

*通信作者: 丁祥(1980—), 男(汉), 教授, 博士, 研究方向: 资源微生物多样性保护与利用。

of lung cancer cells (A549) was 42.6% when the final concentration of HM-P was 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Key words: *Hypsizygus marmoreus*; ITS sequence identification; polysaccharide composition; *in vitro*; anti-tumor activity

引文格式:

李欣霖,朱链,刘可,等.真姬菇多糖结构鉴定及其抗肿瘤活性[J].食品研究与开发,2025,46(3):45-54.

LI Xinlin, ZHU Lian, LIU Ke, et al. Structure Identification and Antitumor Activity of *Hypsizygus marmoreus* Polysaccharides[J]. Food Research and Development, 2025, 46(3): 45-54.

多糖是指由 10 个以上的单糖组成的具有一定生物活性的天然高分子聚合物,结构复杂而庞大,其来源分为高等光合植物、真菌、藻类、细菌等^[1]。多糖作为真菌最重要的组成成分之一,毒性小,且普遍具有潜在免疫和抗癌功能,可作为辅助药物用于肿瘤化疗治疗,在临床治疗中发挥重要作用,如香菇多糖能够辅助化疗方案治疗晚期结肠癌,有效改善化疗所致的免疫功能损伤,减少不良反应且安全性较高^[2];黑木耳多糖与化疗药物环磷酰胺联合治疗时,其对肿瘤细胞的抑制作用明显增加^[3]。

不同真菌多糖的生物学活性不同,真菌多糖的免疫活性及抗肿瘤活性可以更加显著、广谱,因此寻找这种良好活性多糖已成为研究热点。例如郑恒光等^[4]研究发现杏鲍菇菇头多糖能够抑制人胃癌细胞(MGC-803)的生长,其抑制率呈浓度依赖性增长。Xue 等^[5]研究发现桑黄多糖以剂量依赖性的形式抑制肝癌细胞(HepG2)的增殖。Luo 等^[6]研究发现云芝多糖能够体外抑制小鼠乳腺癌细胞(4T1)迁移和侵袭,但不抑制小鼠乳腺癌细胞(4T1)增殖。Li 等^[7]研究发现紫丁香蘑能够抑制黑色素瘤细胞(A375)的增殖并诱导其凋亡。Zhang 等^[8]发现羊肚菌多糖可显著促进巨噬细胞(RAW264.7)的增殖、吞噬作用和 NO 的产生。陈茜等^[9]发现灰褐纹口蘑多糖具有较强的体外免疫活性,能够显著地促进淋巴细胞(T、B)及巨噬细胞(RAW264.7)增殖。王晶等^[10]发现一定浓度的鳞柄小奥德蘑多糖可增强巨噬细胞(RAW264.7)的免疫功能。

真姬菇是生长在北纬 30°~60°的一种大型木质腐生真菌,外形美观且味道具有海蟹味,又称其为蟹味菇、海鲜菇、斑玉蕈,属于担子菌门、伞菌纲、白蘑科、玉蕈属。多糖是真姬菇子实体中重要的生物活性成分之一,已有部分研究初步鉴定真姬菇多糖的结构及其生物活性。野外采集真姬菇的数量少、难度大,而提取菌多糖需要足量的菌种,人工栽培菌种具有产量大、来源稳定的优势,是作为试验材料的普遍选择,如 Song 等^[11]以天津市人工栽培的真姬菇菌株作为试验材料,鉴定其多糖是由甘露糖、葡萄糖、半乳糖以含量比例 1.145:5.282:1.157 组成,通过凝胶过滤法测定多糖平

均分子量为 1.92×10^6 Da。聂莹等^[12]以北京市人工栽培的真姬菇菌株作为试验材料,鉴定其多糖的结构特性以及探究其抗氧化活性,发现真姬菇多糖的单糖组分包括半乳糖、葡萄糖、甘露糖和半乳糖醛酸,并具有较好的还原能力、 Fe^{2+} 螯合能力、清除超氧离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)和羟自由基($\cdot\text{OH}$)能力。Oliveira 等^[13]以巴西地区人工栽培的真姬菇菌株作为试验材料,提取出分子量为 1.71×10^4 Da 的真姬菇多糖,由岩藻糖、甘露糖及半乳糖按含量比 1.00:1.08:3.17 组成,其中多糖主链为 α -(1 \rightarrow 6)-D-Galp,支链为 β -D-Manp 和 α -L-Fucp。目前,四川省人工栽培的真姬菇多糖的结构及体外抗肿瘤活性鲜见报道。本研究以真姬菇为研究对象,对其子实体进行内部转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)序列鉴定,经热水浸提法分离纯化后得到真姬菇多糖(HM-P),利用凝胶渗透色谱、傅里叶变换红外光谱和高效液相色谱等技术对 HM-P 的结构进行初步解析。以肺癌细胞(A549)、结肠癌细胞(CT26.WT)、成纤维细胞(L929)、胃癌细胞(MFC)及腹水癌细胞(S180)为对象,采用 CCK-8 法及细胞划痕法,对 HM-P 的体外抗肿瘤活性进行研究,以为真姬菇多糖资源的开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

真姬菇子实体:西充县星河生物科技有限公司;聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)引物:成都生工生物工程股份有限公司;植物基因组脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)提取试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒:天根生物科技(北京)有限公司;DEAE-52 纤维素:南京生兴生物技术有限公司;溴化钾(分析纯)、三氟乙酸(色谱纯):上海阿拉丁生化科技股份有限公司;乙腈(色谱纯):美国 Thermo 公司;巨噬细胞(RAW264.7)、肺癌细胞(A549)、结肠癌细胞(CT26.WT)、成纤维细胞(L929)、胃癌细胞(MFC)及腹水癌细胞(S180):中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所;脂多糖(lipopolysaccharide, LPS):美国 Sigma 公司;甘露聚糖肽(mannatide, MAN):四川奥邦药业有限

公司;CCK-8 试剂盒:北京索莱宝科技有限公司。

1.2 仪器与设备

PCR 仪(Thermal Cycler2720)、化学凝胶成像系统(ChemiDoc XRS+);美国 Bio-Rad 公司;电泳仪(DYY-6C);北京六一有限公司;高效液相色谱仪(HPLC1260):美国 Agilent 公司;二氧化碳细胞培养箱(BPN-80CH UV)、傅里叶变换红外光谱仪(Nicolet 5700):美国 Thermo 公司;酶标仪(318MC):上海三科仪器有限公司;倒置显微镜(DMI3000):徕卡显微系统(上海)有限公司。

1.3 方法

1.3.1 真菌的 ITS 鉴定

依据 DNA 提取试剂盒说明书进行总 DNA 提取并检测其浓度。

rDNA ITS 扩增引物:ITS4(5'-TCCTCCGCTTATT-GATATGC3'-)、ITS5(5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG3'-)。扩增体系(30 μ L):1 μ L 的 ITS4,1 μ L 的 ITS5,1 μ L DNA 模板,12 μ L 双蒸水,15 μ L Q5 酶。扩增程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,58 $^{\circ}$ C 复性 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 40 个循环,4 $^{\circ}$ C 保温。扩增产物使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

切取 500~750 bp 之间有明亮亮度的 ITS 扩增条带,依据凝胶回收试剂盒说明书回收纯化,回收产物送至成都生工生物工程股份有限公司进行上下游引物双向测序。将测序结果上传至 GenBank 并申请登录号,利用 MEGA7.0 软件采用邻接(neighbor-joining, N-J)法构建系统发育进化树。

1.3.2 HM-P 的提取与纯化

采用热水浸提法提取 HM-P。以蒸馏水、NaCl 溶液(0.05、0.10 mol/L)为流动相,使用 DEAE-52 纤维素柱进一步层析纯化真姬菇多糖,每段收集 50 管洗脱液,每管 5 mL。取每管 70 μ L 洗脱液于 96 孔板中,采用硫酸-苯酚法^[14]测定 490 nm 处的吸光值并在 Origin 软件上绘制洗脱曲线图。透析、冷冻干燥得多糖组分,并将蒸馏水段多糖命名为 HM-P。

1.3.3 HM-P 的分子量测定

称取 10 mg 的 HM-P 溶解于纯水中,过滤后采用凝胶渗透色谱法检测 HM-P 的重均分子量(weight average molecular weight, M_w)、峰位分子量(peak molecular weight, M_p)、数均分子量(number average molecular weight, M_n),并计算分散性指数(polymer dispersity index, PDI)。

1.3.4 HM-P 的傅里叶变换红外光谱测定

称取 2 mg 的 HM-P 与 200 mg 溴化钾混合,经过研磨、压片并使用傅里叶变换红外光谱仪在 4 000~400 cm^{-1} 波数范围内扫描。

1.3.5 HM-P 的高效液相色谱测定

称取 10 mg 的 HM-P 与 5 mL 2 mol/L 三氟乙酸溶液

混匀密封,100 $^{\circ}$ C 水浴水解 6 h,12 000 r/min 离心 5 min 并弃去沉淀,烘干样品后加入纯水洗涤,重复 3 次以除去残留的三氟乙酸。将 HM-P 水解液和单糖标准品分别加入 75% 乙腈溶剂,配制质量浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的待测样品。

高效液相色谱条件:示差折光检测器温度为 35 $^{\circ}$ C;Zorbax Carbohydrate 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm \times 5 μm);25 $^{\circ}$ C 柱温;75% 乙腈为流动相;上样量为 10 μL ;流速为 1.4 mL/min。

1.3.6 HM-P 的体外抗肿瘤活性检测

1.3.6.1 肿瘤细胞的抑制率测定

根据 CCK-8 试剂盒说明书检测 HM-P 对肿瘤细胞的抑制率。体外抑制试验分为空白对照组(CK)、HM-P 药物组(5、10、15、20、25、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、阳性对照组(MAN),每组设置 6 个重复。

1)铺板:取处于对数生长期的肺癌细胞(A549)、结肠癌细胞(CT26.WT)、成纤维细胞(L929)、胃癌细胞(MFC)及腹水癌细胞(S180),将细胞浓度分别调至 1×10^5 个/mL,接种于 96 孔培养板,每孔 100 μL ,置于细胞培养箱(37 $^{\circ}$ C、5% CO_2)中培养 24 h,待细胞完全贴壁且状态良好后进行肿瘤细胞抑制效用检测。

2)加药:空白对照组加入 100 μL 的细胞培养液,药物组分别加入 100 μL 终浓度为 5、10、15、20、25、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 HM-P 溶液,阳性对照组加入 100 μL 浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 MAN 溶液,继续培养 24 h。

3)检测:每孔分别加入 5 μL CCK-8 试剂,放入细胞培养箱中培养 3 h,在酶标仪 450 nm 波长下检测其 OD 值。按以下式子计算细胞抑制率(p ,%)。

$$p = \frac{A_2 - A_1}{A_1 - A_0} \times 100$$

式中: A_0 为细胞培养基的平均 OD 值; A_1 为空白对照组的平均 OD 值; A_2 为 HM-P 药物组或阳性对照组的 OD 值。

1.3.6.2 肿瘤细胞的迁移率测定

采用细胞划痕法检测 HM-P 对肿瘤细胞迁移的抑制作用。细胞迁移试验分为空白对照组(CK)、HM-P 药物组(10、15、20、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、阳性对照组(MAN)。

1)铺板:在 6 孔板底面画 5 条平行线,肺癌细胞(A549)、结肠癌细胞(CT26.WT)、成纤维细胞(L929)及胃癌细胞(MFC)的铺板操作同 1.3.6.1,接种量改为每孔 1 mL。使用 10 μL 枪头制造与标记线垂直的划痕,并用 1 mL 磷酸缓冲盐溶液洗 3 次,充分洗去悬浮细胞,在显微镜下观察并对细胞形态进行拍照记录,记为 0 h。

2)加药:加药操作同 1.3.6.1,加药量改为 1 mL,药物组改为终浓度 10、15、20、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 HM-P 溶液,并放入细胞培养箱中培养,每隔 6 h 用倒置显微镜观察划痕并拍照记录。

3)检测:结果使用 Image J 软件进行数据分析,根据倒置显微镜记录的图像,统计划痕面积的平均值。按以下公式计算迁移率($m, \%$)。

$$m = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100$$

式中: A_1 为0 h的划痕面积; A_2 为培养后的划痕面积。

1.3.6.3 肿瘤细胞的杀伤率测定

参照 CCK-8 试剂盒说明书检测 HM-P 对肿瘤细胞的杀伤率。体外杀伤试验分为空白对照组(CK)、HM-P 药物组(5、10、15、20、25、30、35、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、阳性对照组(LPS),每组设置6个重复。

1)铺板:巨噬细胞(RAW264.7)、肺癌细胞(A549)、结肠癌细胞(CT26.WT)、成纤维细胞(L929)、胃癌细胞(MFC)及腹水癌细胞(S180)的铺板操作同1.3.6.1。

2)加药:取巨噬细胞(RAW264.7)板,加药操作同1.3.6.1,药物组终浓度改为5、10、15、20、25、30、35、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的HM-P溶液,阳性对照组改为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的

LPS 溶液。将巨噬细胞(RAW264.7)板的上清液按照对应组依次加入肿瘤细胞板,继续培养24 h。

3)检测:检测操作同1.3.6.1。按以下式子计算杀伤率($k, \%$)。

$$k = \frac{A_2 - A_1}{A_1 - A_0} \times 100$$

式中: A_0 为细胞培养基的平均OD值; A_1 为空白对照组的平均OD值; A_2 为药物组或阳性对照组的OD值。

1.4 数据处理

采用 SPSS 19.0 软件对数据进行单因素方差分析,数据用平均值 \pm 标准差表示,所有组间数据的比较均采用 t 检验。采用 GraphPad Prism 8.0 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 进化树的建立

真菌菌株的 rDNA-ITS 序列的 N-J 系统发育树见图 1。

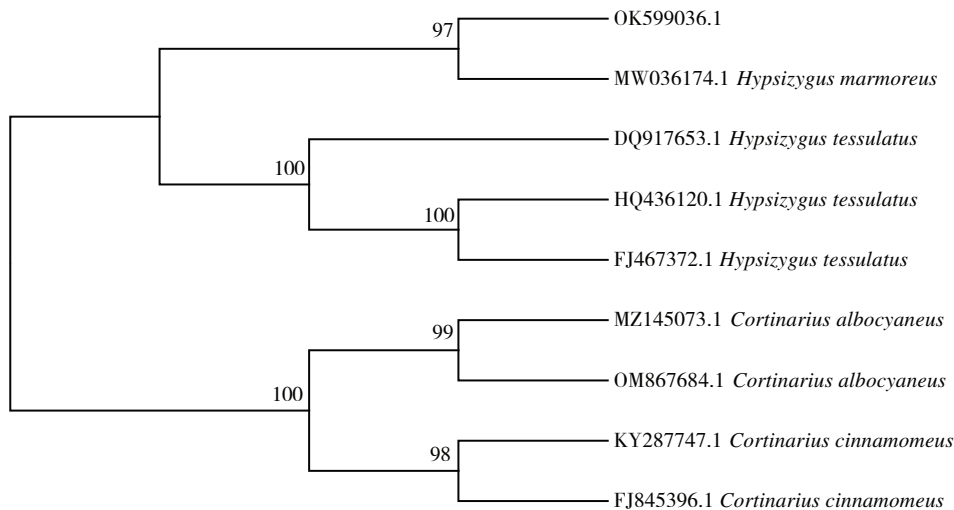


图1 真菌菌株的 rDNA-ITS 序列的 N-J 系统发育树

Fig.1 N-J phylogenetic tree of rDNA-ITS sequences from fungal strains

利用 ITS4、ITS5 引物对本样品菌株 DNA 进行扩增、测序,测序结果上传至 GenBank 申请 rDNA-ITS 的序列登录号,获得真菌样品登录号为 OK599036.1。由图 1 可知,N-J 系统发育树结果显示目标序列与俄罗斯的真姬菇菌株(MW036174.1)同源性达到了 98.07%,置信度达到 97%(图 1),表明本试验菌株为真姬菇(*Hypsizygus marmoreus*)。

2.2 HM-P 的洗脱曲线

HM-P 的洗脱曲线见图 2。

采用蒸馏水(0~50 管)、0.05 mol/L NaCl 溶液(51~100 管)作为流动相时分别出现了一个较高的单一对称峰、一个较低的峰,0.1 mol/L NaCl 溶液(101~150 管)作

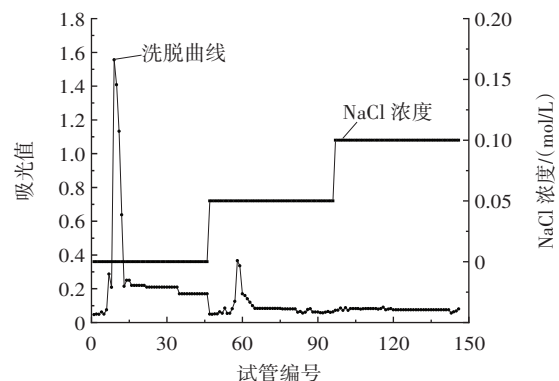


图2 HM-P 的洗脱曲线

Fig.2 Elution curve of HM-P

为流动相时无洗脱峰。由图2可知,蒸馏水段的洗脱液中多糖含量最高,收集所有蒸馏水段的洗脱液,经过浓缩、透析、真空冷冻干燥后得到固体样品命名为HM-P。

2.3 HM-P的分子质量

HM-P的凝胶渗透色谱结果见图3。

由图3可知, HM-P在13~14 min呈现单一洗脱峰

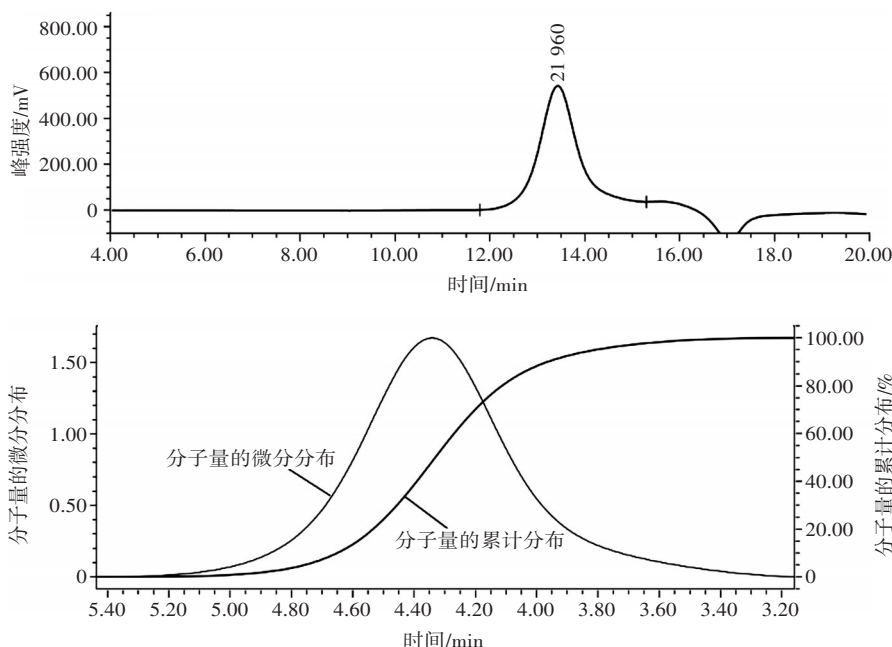


图3 HM-P的凝胶渗透色谱

Fig.3 Gel permeation chromatography of HM-P

且对称性较好,其 M_w 为 25 232 Da, M_p 为 21 960 Da, M_n 为 16 352 Da, PDI 为 1.54, 分子量分布宽度大于 1。分子量过高的多糖不仅溶解度较低,并且很难进入体内直接发挥活性^[15]。过低的分子量则无法形成活性聚合结构从而导致活性差^[16]。一般认为分子量的范畴在 10 000~50 000 Da 能够保持最大生物活性^[17], HM-P 的分子量为 25 232 Da, 满足这一范畴。

2.4 HM-P的傅里叶变换红外光谱

HM-P的傅里叶变换红外光谱结果见图4。

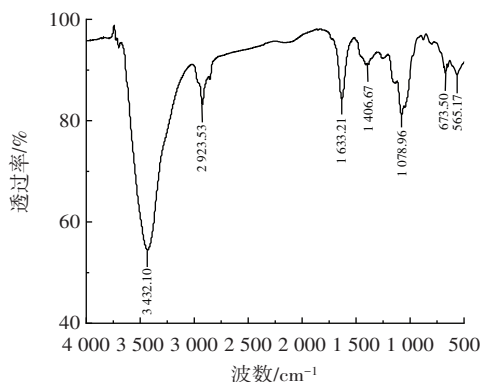


图4 HM-P的红外光谱图

Fig.4 Infrared spectrum of HM-P

由图4可知, 3 432.10 cm^{-1} 处出现了一个强且宽的吸收峰, 为 HM-P 的 $-OH$ 伸缩振动峰^[18]; 在

2 923.53 cm^{-1} 处是糖环上次甲基 $C-H$ 的伸缩振动峰^[19]; 在 1 633.21 cm^{-1} 处归属为 HM-P 的 $C=O$ 非对称伸缩振动峰^[20]; 在 1 406.67 cm^{-1} 处为 $C-H$ 面内弯曲振动峰; 1 078.96 cm^{-1} 处的吸收峰指定为 HM-P 的吡喃糖环上 $C-O-C$ 的伸缩振动峰^[21]; 673.50 cm^{-1} 处归属为 $=C-H$ 面外弯曲振动峰; 在 1 740 cm^{-1} 处无明显吸收峰, 表明 HM-P 无糖醛酸。以上信号峰显示 HM-P 是一种含有吡喃糖结构的多糖。

2.5 HM-P的高效液相色谱

HM-P的高效液相色谱结果见表1和图5。

由表1和图5可知, 单糖标准品木糖、葡萄糖、半

表1 HM-P的单糖组成分析

Table 1 Monosaccharide composition analysis of HM-P

单糖种类	标准品保留时间/min	水解单糖保留时间/min	峰面积占比/%
木糖	5.431	5.300	9.933
葡萄糖	6.228	6.267	17.661
半乳糖	7.664	7.147	72.406
果糖	6.517	-	-
岩藻糖	5.738	-	-
鼠李糖	4.881	-	-
甘露糖	6.734	-	-

注:- 表示未检测出的单糖种类。

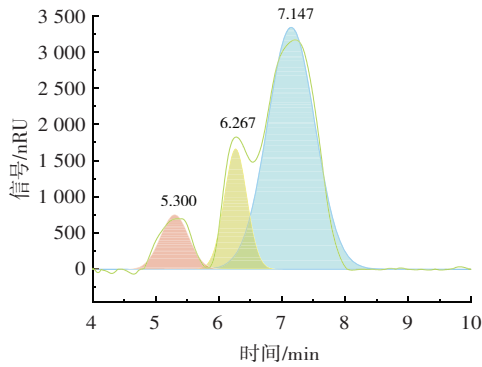


图5 HM-P的高效液相色谱图

Fig.5 High performance liquid chromatography results of HM-P

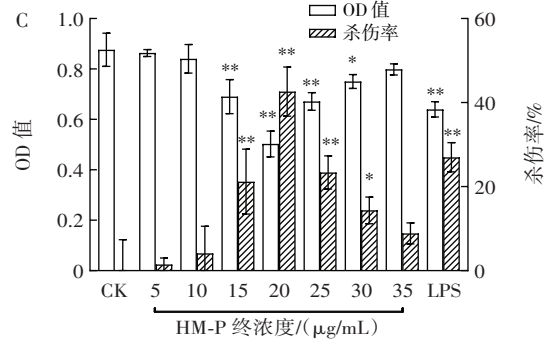
乳糖、果糖、岩藻糖、鼠李糖、甘露糖的出峰时间分别为5.431、6.228、7.664、6.517、5.738、4.881、6.734 min, HM-P水解后单糖的出峰时间分别为5.300、6.267、7.147 min, 与7种单糖标准品的出峰时间对比, 5.300、6.267、7.147 min处分别对应为木糖、葡萄糖、半乳糖。各水解单糖的峰面积显示HM-P中木糖、葡萄糖及半乳糖含量比例为9.933:17.661:72.406。

2.6 HM-P的体外抗肿瘤活性

2.6.1 HM-P对肺癌细胞(A549)的抑制作用

HM-P对肺癌细胞(A549)的抑制作用见图6。

部分多糖具有直接的抑制肿瘤作用, 如直接破坏肿瘤细胞结构, 诱导细胞凋亡^[22]。由图6A、6B可知, 与空白对照组(CK)相比, HM-P能够极显著地直接抑制贴壁型肺癌细胞增殖、迁移($P<0.01$), HM-P终浓度



A.HM-P体外刺激后肺癌细胞 $A_{450\text{nm}}$ 与抑制率; B.HM-P体外刺激后肺癌细胞($A_{450\text{nm}}$)迁移率; C.HM-P介导巨噬细胞(RAW264.7)上清液处理后肺癌细胞 $A_{450\text{nm}}$ 与杀伤率。与空白对照组(CK)比, *表示组间差异显著($P<0.05$), **表示组间差异极显著($P<0.01$)。

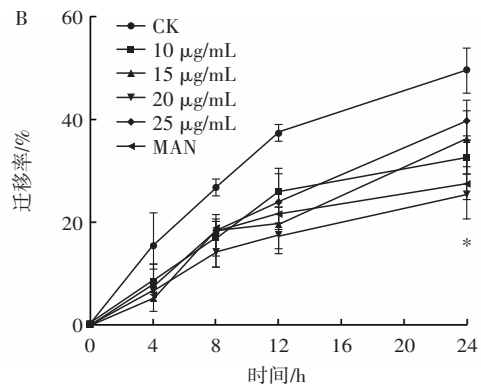
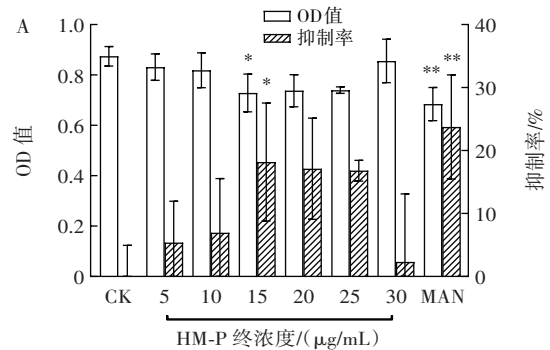
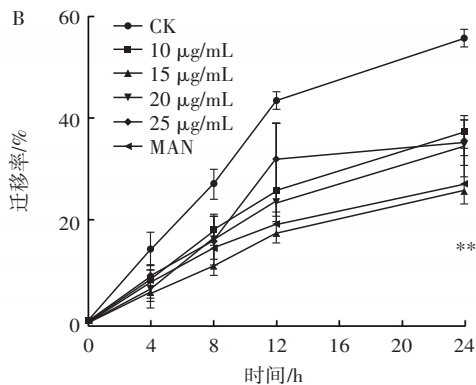
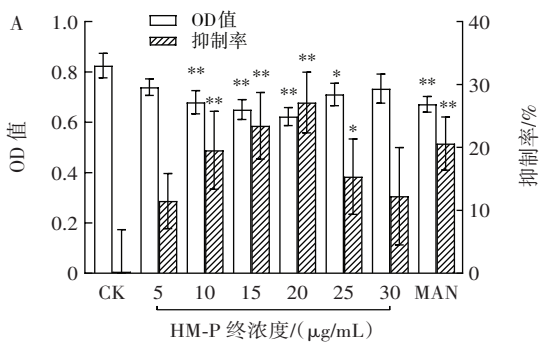
图6 HM-P对肺癌细胞(A549)活性的抑制作用

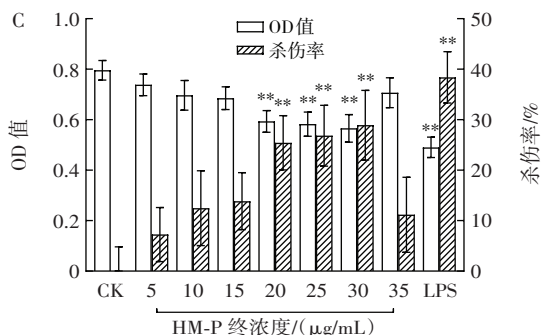
Fig.6 Anti-tumor activity inhibition of HM-P on lung cancer cells (A549)

为20 $\mu\text{g/mL}$ 时, 其抑制率达到27.1%; HM-P终浓度为15 $\mu\text{g/mL}$ 时, 其迁移率为25.8%。间接杀伤肿瘤细胞包括通过使用不同浓度的药物激活巨噬细胞释放细胞因子, 间接实现其抗肿瘤功能^[23]。由图6C可知, HM-P能够极显著地通过巨噬细胞(RAW264.7)间接杀伤肺癌细胞($P<0.01$), 杀伤效果呈现先增加后减少的趋势, HM-P终浓度为20 $\mu\text{g/mL}$ 时, 杀伤率高达42.6%, 与直接抑制率相比, 杀伤率提高了57.2%。

2.6.2 HM-P对结肠癌细胞(CT26.WT)的抑制作用

HM-P对结肠癌细胞(CT26.WT)的抑制作用见图7。





A.HM-P 体外刺激后结肠癌细胞 A_{450nm} 与抑制率;B.HM-P 体外刺激后结肠癌细胞(A_{450nm}) 迁移率;C.HM-P 介导巨噬细胞(RAW264.7) 上清液处理后结肠癌细胞 A_{450nm} 与杀伤率。与空白对照组(CK)比, *表示组间差异显著($P<0.05$), **表示组间差异极显著($P<0.01$)。

图7 HM-P 对结肠癌细胞(CT26.WT)活性的抑制作用

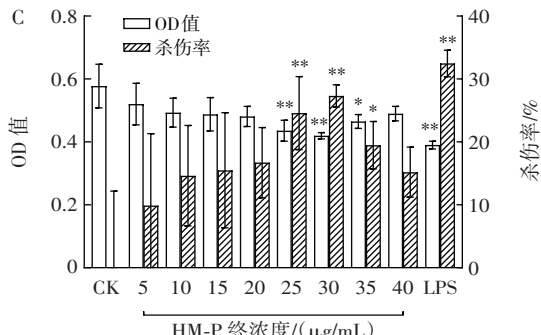
Fig.7 Anti-tumor activity inhibition of HM-P on colon cancer cells (CT26.WT)

由图 7A、7B 可知,在直接抑制肿瘤方面,HM-P 能够显著抑制贴壁型结肠癌细胞(CT26.WT)增殖($P<0.05$)及迁移($P<0.05$),当 HM-P 终浓度为 15 $\mu\text{g/mL}$ 时,其抑制率高达 18.2%;当 HM-P 终浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 时,其迁移率为 25.0%。由图 7C 可知,在间接杀伤方面,当 HM-P 终浓度为 30 $\mu\text{g/mL}$ 时,对结肠癌细胞(CT26.WT)的杀伤率高达 28.9%($P<0.01$),与直接抑制率相比,杀伤率高了 58.8%。

2.6.3 HM-P 对成纤维细胞(L929)的抑制作用

HM-P 对成纤维细胞(L929)的抑制作用见图 8。

由图 8A、8B 可知,与空白对照组(CK)相比,HM-P



A.HM-P 体外刺激后成纤维细胞 A_{450nm} 与抑制率;B.HM-P 体外刺激后成纤维细胞(A_{450nm}) 迁移率;C.HM-P 介导巨噬细胞(RAW264.7) 上清液处理后成纤维细胞 A_{450nm} 与杀伤率。与空白对照组(CK)比, *表示组间差异显著($P<0.05$), **表示组间差异极显著($P<0.01$)。

图8 HM-P 对成纤维细胞(L929)活性的抑制作用

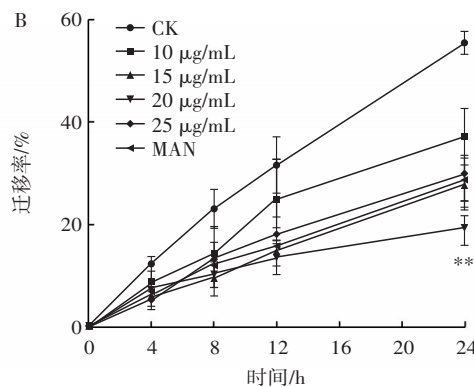
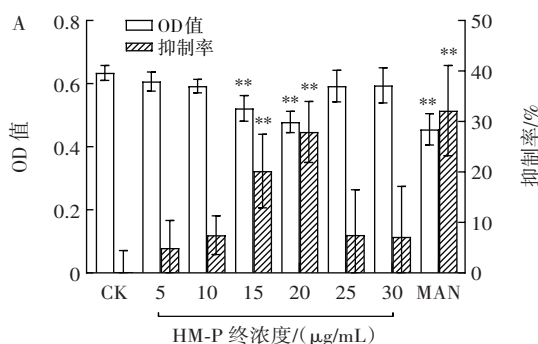
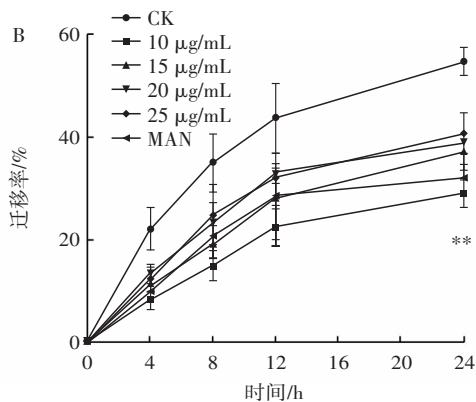
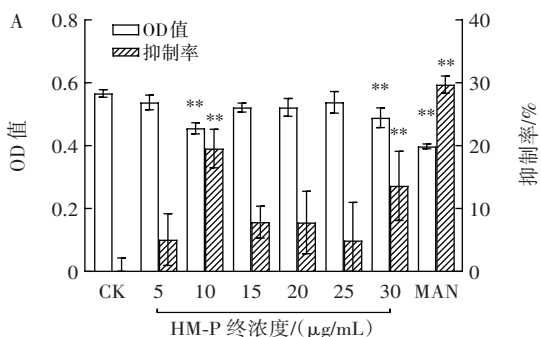
Fig.8 Anti-tumor activity inhibition of HM-P on fibroblast (L929)

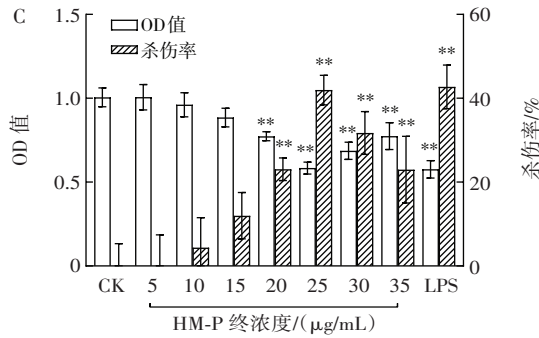
能够直接抑制贴壁型成纤维细胞(L929)增殖($P<0.01$)、迁移($P<0.01$),当 HM-P 终浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 时,其抑制率达到 19.6%,迁移率为 29.1%。由图 8C 可知,药物终浓度为 30 $\mu\text{g/mL}$ 时,HM-P 通过介导巨噬细胞(RAW264.7)上清液间接杀伤成纤维细胞(L929)的杀伤率达到最佳,为 27.3%($P<0.01$),杀伤率比直接抑制率高出 39.3%,其杀伤效果优于直接抑制作用。

2.6.4 HM-P 对胃癌细胞(MFC)的抑制作用

HM-P 对胃癌细胞(MFC)的抑制作用见图 9。

由图 9A、9B 可知,与空白对照组(CK)相比,HM-P 终浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 时,能够极显著地抑制贴壁型胃癌





A.HM-P 体外刺激后胃癌细胞 $A_{450\text{nm}}$ 与抑制率;B.HM-P 体外刺激后胃癌细胞($A_{450\text{nm}}$) 迁移率;C.HM-P 介导巨噬细胞(RAW264.7)上清液处理后胃癌细胞 $A_{450\text{nm}}$ 与杀伤率。与空白对照组(CK)比,*表示组间差异显著($P<0.05$),**表示组间差异极显著($P<0.01$)。

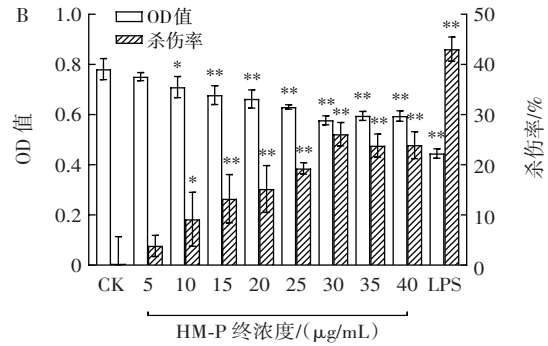
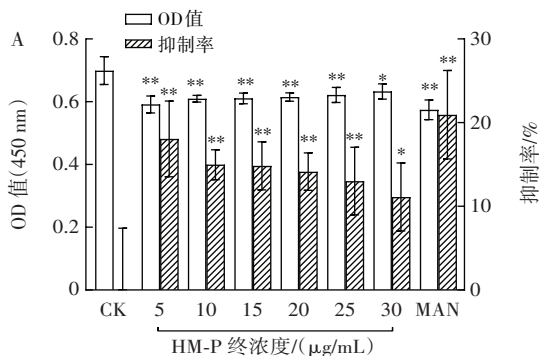
图9 HM-P 对胃癌细胞(MFC)活性的抑制作用
Fig.9 Anti-tumor activity inhibition of HM-P on mouse forestomach carcinoma (MFC)

细胞(MFC)的增殖($P<0.01$)和迁移($P<0.01$),其抑制率达到 27.9%,迁移率达到 19.0%。由图 9C 可知, HM-P 终浓度为 25 $\mu\text{g/mL}$ 时,能够极显著地杀伤胃癌细胞(MFC)($P<0.01$),杀伤率达到 42.0%。HM-P 在抑制胃癌细胞(MFC)增殖、迁移以及间接杀伤胃癌细胞(MFC)方面,其抑制作用随着药物浓度的增加,均呈现出先增加后减少的趋势,杀伤率比直接抑制率高出 50.5%,且其杀伤效果优于直接抑制作用。

2.6.5 HM-P 对腹水癌细胞(S180)的抑制作用

HM-P 对腹水癌细胞(S180)的抑制作用见图 10。

由图 10A、10B 可知,腹水癌细胞(S180)属于悬浮型肿瘤细胞。与空白对照组(CK)相比, HM-P 能够直接抑制腹水癌细胞(S180)增殖($P<0.01$),抑制率呈现剂量依赖性减少, HM-P 终浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 时,其抑制率达到 18.1%; HM-P 介导巨噬细胞(RAW264.7)上清液间接杀伤腹水癌细胞(S180),其杀伤率在 5~30 $\mu\text{g/mL}$ 药物浓度范围内呈现剂量依赖性增加,当 HM-P 终浓度为 30 $\mu\text{g/mL}$ 时,杀伤率高达 26.1% ($P<0.01$),杀伤率比直接抑制率高出 44.2%,其杀伤效果优于直接抑制作用。



A.HM-P 体外刺激后腹水癌细胞 $A_{450\text{nm}}$ 与抑制率;B.HM-P 介导巨噬细胞(RAW264.7)上清液处理后腹水癌细胞 $A_{450\text{nm}}$ 与杀伤率。与空白对照组(CK)比,*表示组间差异显著($P<0.05$),**表示组间差异极显著($P<0.01$)。

图10 HM-P 对腹水癌细胞(S180)活性的抑制作用
Fig.10 Anti-tumor activity inhibition of HM-P on ascites cancer cells (S180)

3 讨论与结论

真姬菇作为一种珍稀食用菌品种,其多糖具有生物活性及无明显毒副作用的特点,是开发抗癌药物的潜在候选药物。有研究发现多糖在体外试验中能够直接抑制肿瘤细胞增殖,如李艺萌^[24]发现青头菌多糖在低剂量和高剂量时,对肺癌细胞(A549)的增殖均表现出较好的抑制效果,在药物浓度达到 1 200 $\mu\text{g/mL}$ 时,抑制率达到 52.96%。唐贤等^[25]发现黑牛肝菌多糖在浓度为 15 $\mu\text{g/mL}$ 时,对结肠癌细胞(CT26.WT)、胃癌细胞(MFC)及腹水癌细胞(S180)的抑制率分别为 32.68%、30.68% 及 38.90%。本试验结果显示, HM-P 能够直接抑制肺癌细胞(A549)、结肠癌细胞(CT26.WT)、成纤维细胞(L929)、胃癌细胞(MFC)及腹水癌细胞(S180)的增殖($P<0.05$),抑制率为 18.1%~27.9%。直接抑制肿瘤作用除了表现在抑制肿瘤细胞增殖方面,还表现在抑制肿瘤细胞迁移侵袭方面。目前,细胞划痕法是评估肿瘤细胞迁移能力的主要方法,如包晓玮等^[26]通过细胞划痕法检测出沙棘多糖呈剂量依赖性地抑制肝癌细胞(HepG2)迁移,且当药物浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$ 时,肝癌细胞(HepG2)的迁移率仅为 5.59%。万茜淋等^[27]采用细胞划痕法检测出香菇多糖能够显著抑制神经胶质瘤细胞(SHG-44)迁移,并呈剂量依赖关系,迁移率为 $(-10.55\pm 7.78)\%$ 。本文采用细胞划痕法检测出 HM-P 能够显著抑制肺癌细胞(A549)、结肠癌细胞(CT26.WT)、成纤维细胞(L929)及胃癌细胞(MFC)迁移($P<0.05$),迁移率为 19.0%~29.1%。

有研究表明多糖不仅能够直接抑制肿瘤细胞增殖、迁移,还能够活化巨噬细胞,诱导巨噬细胞分泌免疫因子,在杀伤肿瘤细胞过程中起到间接作用,如刘蓝月^[28]发现金针菇多糖通过介导巨噬细胞(RAW264.7)上

清液处理肺癌细胞(A549),在药物浓度为100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的条件下,肺癌细胞(A549)活力最低,多糖的抑制效果最佳。赵姝雯等^[29]发现与3种金针菇多糖直接作用于成纤维细胞(L929)相比,3种金针菇多糖介导的巨噬细胞(RAW264.7)上清液对成纤维细胞(L929)的杀伤作用更显著,其抑瘤率分别增强了27.35%、20.79%、77.07%。本研究发现HM-P介导巨噬细胞(RAW264.7)上清液对肺癌细胞(A549)、结肠癌细胞(CT26.WT)、成纤维细胞(L929)、胃癌细胞(MFC)及腹水癌细胞(S180)具有极显著的杀伤效果($P<0.01$),与HM-P对肿瘤细胞的直接抑制作用相比,HM-P的杀伤效果远超出39.3%~58.8%,起到更好杀伤肿瘤细胞的作用。

综上所述,本研究通过ITS鉴定西充星河生物科技有限公司人工培育的菌株为真姬菇。HM-P的分子量为25 232 Da,由木糖、葡萄糖及半乳糖按含量比例9.933:17.661:72.406组成。体外抗肿瘤活性研究显示,HM-P对5种肿瘤细胞均有直接抑制作用,但是效果一般,对其展开HM-P间接杀伤肿瘤细胞研究,发现杀伤作用的抑瘤效果显著提高,且HM-P对贴壁型肿瘤细胞的抑制、杀伤效果均高于悬浮型肿瘤细胞。本试验中,HM-P对胃癌细胞(MFC)的直接抑制效果最佳,当HM-P终浓度为20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,其抑制率高达27.9%($P<0.01$),迁移率低至19.0%($P<0.01$);HM-P对肺癌细胞(A549)的间接杀伤效果最好,当HM-P终浓度为20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,其杀伤率高达42.6%($P<0.01$)。本研究表明HM-P有望作为一种高效、低毒的抗肿瘤制剂,为真姬菇多糖的开发与应用提供了一定的科学依据。

参考文献:

- [1] 桑雨梅,高郁超,武济萍,等.食用真菌多糖提取、纯化及结构特征研究进展[J].食品研究与开发,2023,44(13):210-218.
SANG Yumei, GAO Yuchao, WU Jiping, et al. Extraction, purification and structural characteristics of polysaccharides from edible fungi[J]. Food Research and Development, 2023, 44(13): 210-218.
- [2] 牟微娜,邵琰,李肖亮.香菇多糖联合SOX方案治疗晚期结肠癌临床研究[J].新中医,2023,55(9):170-173.
MOU Weina, SHAO Yan, LI Xiaoliang. Clinical study on lentinan combined with SOX scheme for advanced colorectal carcinoma[J]. Journal of New Chinese Medicine, 2023, 55(9): 170-173.
- [3] 甘霓,吴小勇,郑传进,等.黑木耳多糖对B16黑色素瘤细胞抗肿瘤作用研究[J].广东药科大学学报,2017,33(6):758-762.
GAN Ni, WU Xiaoyong, ZHENG Chuanjin, et al. Study on the anti-tumor activity of *Auricularia auricula* polysaccharides on B16 melanoma cells[J]. Journal of Guangdong Pharmaceutical University, 2017, 33(6): 758-762.
- [4] 郑恒光,沈恒胜,杨道富,等.杏鲍菇菇头多糖的结构鉴定及生物活性评价[J].食品科学,2019,40(22):7-13.
ZHENG Hengguang, SHEN Hengsheng, YANG Daofu, et al. Structural characterization and antitumor activity of crude polysaccharide extracted from the stalk residue of *Pleurotus eryngii*[J]. Food Science, 2019, 40(22): 7-13.
- [5] XUE Q, SUN J, ZHAO M W, et al. Immunostimulatory and anti-tumor activity of a water-soluble polysaccharide from *Phellinus baumii* mycelia[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 27(5): 1017-1023.
- [6] LUO K W, YUE G G L, KO C H, et al. *In vivo* and *in vitro* anti-tumor and anti-metastasis effects of *Coriolus versicolor* aqueous extract on mouse mammary 4T1 carcinoma[J]. Phytomedicine, 2014, 21(8/9): 1078-1087.
- [7] LI Y M, GUO X X, ZHONG R F, et al. Structure characterization and biological activities evaluation of two hetero-polysaccharides from *Lepista nuda*: Cell antioxidant, anticancer and immune-modulatory activities[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 244: 125204.
- [8] ZHANG Z, SHI M H, ZHENG H Y, et al. Structural characterization and biological activities of a new polysaccharide isolated from *Morchella sextelata*[J]. Glycoconjugate Journal, 2022, 39(3): 369-380.
- [9] 陈茜,侯怡铃,杨彤,等.灰褐纹口蘑多糖对免疫细胞的调节作用[J].食用菌学报,2021,28(4):64-74.
CHEN Xi, HOU Yiling, YANG Tong, et al. Regulative effects of *Tricholoma sinoportentosum* polysaccharide extract on immune cells[J]. Acta Edulis Fungi, 2021, 28(4): 64-74.
- [10] 王晶,史琪,随晶晶,等.鳞柄小奥德蘑多糖对巨噬细胞免疫功能的调节作用[J].天然产物研究与开发,2020,32(5):845-850,892.
WANG Jing, SHI Qi, SUI Jingjing, et al. Immunomodulatory effect of polysaccharide from *Oudemansiella furfuracea* on murine macrophages[J]. Natural Product Research and Development, 2020, 32(5): 845-850, 892.
- [11] SONG Q Y, TENG A G, ZHU Z Y. Chemical structure and inhibition on α -glucosidase of a novel polysaccharide from *Hypsizygus marmoreus*[J]. Journal of Molecular Structure, 2020, 1211: 128110.
- [12] 聂莹,李淑英,丁洋,等.真姬菇子实体多糖结构特性及抗氧化活性研究[J].中国食品学报,2016,16(11):55-61.
NIE Ying, LI Shuying, DING Yang, et al. Structural characteristic of polysaccharides from *Hypsizygus marmoreus* fruit's body and its antioxidant activities[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2016, 16(11): 55-61.
- [13] OLIVEIRA R S, BISCAIA S M P, BELLAN D L, et al. Structure elucidation of a bioactive fucanogalactan from the edible mushroom *Hypsizygus marmoreus*[J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 225: 115203.
- [14] MA Y N, WANG Z, ARIFEEN M Z U, et al. Structure and bioactivity of polysaccharide from a subseafloor strain of *Schizophyllum commune* 20R-7-F01[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 222: 610-619.
- [15] KANG Q Z, CHEN S S, LI S F, et al. Comparison on characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* by ultrasound and conventional extraction[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 124: 1137-1144.
- [16] 李苹,卢柏林,邓时贵,等.不同分子量醋柴胡多糖对Raw264.7巨噬细胞抗炎免疫活性的影响[J].中国现代应用药学,2020,37(10):1153-1156.
LI Ping, LU Bolin, DENG Shigui, et al. Study on anti-inflammatory and immunomodulatory activity of vinegar *Bupleuri Radix* polysaccharides with different molecular weight on Raw264.7 macrophage[J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2020, 37(10): 1153-1156.
- [17] 张鑫,刘洋,程亚茹,等.枸杞多糖分子量分布测定与抗炎活性

- 关联研究[J]. 北京中医药大学学报, 2020, 43(11): 959-964.
- ZHANG Xin, LIU Yang, CHENG Yaru, et al. Molecular weight distribution of *Lycium barbarum* polysaccharides and its relation with anti-inflammatory activity[J]. Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2020, 43(11): 959-964.
- [18] 马殿旭, 刘刚, 欧全宏, 等. 常见野生蘑菇的红外光谱及其二维相关红外光谱的鉴别[J]. 光谱学与光谱分析, 2018, 38(7): 2113-2122.
- MA Dianxu, LIU Gang, OU Quanhong, et al. Discrimination of common wild mushrooms by FTIR and two-dimensional correlation infrared spectroscopy[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2018, 38(7): 2113-2122.
- [19] 楚文琪, 吴迪, 陈万超, 等. 桑树木屑栽培的瓦尼桑黄子实体分级醇沉粗多糖组成特征与活性相关性[J]. 菌物学报, 2023, 42(4): 984-996.
- CHU Wenqi, WU Di, CHEN Wanchao, et al. Correlation between composition characteristics and activities of graded ethanol precipitation derived crude polysaccharides of *Sanghuangporus vaninii* basidiomata cultivated on artificial substrate prepared from mulberry sawdust[J]. Mycosystema, 2023, 42(4): 984-996.
- [20] 王帅, 赵冬雪, 韩成凤, 等. 6种活性多糖的结构、性质及其抗氧化活性的比较研究[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(16): 7-15.
- WANG Shuai, ZHAO Dongxue, HAN Chengfeng, et al. A comparative study on the structure, properties and antioxidant activity of six active polysaccharides[J]. Food Research and Development, 2021, 42(16): 7-15.
- [21] 伍燕, 申利群, 朱华. 假芝菌丝体多糖 ARP 的纯化、结构及抗氧化活性[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(9): 214-219.
- WU Yan, SHEN Liqun, ZHU Hua. Purification, structural characteristics, and *in vitro* antioxidant activities of polysaccharides ARP from a wild *Amauroderma rugosum* mycelium[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(9): 214-219.
- [22] 赵爽, 高宜, 荣成博, 等. 不同蜜环菌属真菌胞外多糖生物功能的研究[J]. 河南农业大学学报, 2019, 53(2): 213-217.
- ZHAO Shuang, GAO Yi, RONG Chengbo, et al. Study on bioactivities of extracellular polysaccharides of different genus of *Armillaria*[J]. Journal of Henan Agricultural University, 2019, 53(2): 213-217.
- [23] LI W J, TANG X F, SHUAI X X, et al. Mannose receptor mediates the immune response to *Ganoderma atrum* polysaccharides in macrophages[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(2): 348-357.
- [24] 李艺萌. 青头菌多糖的结构表征及生物活性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2020.
- LI Yimeng. Study on structural characterization and bioactivities of polysaccharides from *Russula virescens*[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2020.
- [25] 唐贤, 丁祥, 朱森, 等. 黑牛肝菌多糖结构及体外抗肿瘤活性研究[J]. 食品与药品, 2019, 21(4): 253-256.
- TANG Xian, DING Xiang, ZHU Miao, et al. Study on structure and anti-tumor activity of polysaccharide from *Boletus aereus*[J]. Food and Drug, 2019, 21(4): 253-256.
- [26] 包晓玮, 魏晨业, 刘晓禄, 等. 沙棘多糖对肝癌细胞 Hep-G2 生长、凋亡、迁移和侵袭的影响[J]. 中国食品学报, 2022, 22(9): 47-54.
- BAO Xiaowei, WEI Chenye, LIU Xiaolu, et al. Effects of *Hippophae rhamnoides* polysaccharides on the growth, apoptosis, migration and invasion of Hep-G2 cells[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(9): 47-54.
- [27] 万茜淋, 任雨贺, 吕瑞娜, 等. 香菇多糖对神经胶质瘤 SHG-44 细胞增殖、周期、凋亡及迁移的影响[J]. 中成药, 2019, 41(11): 2614-2619.
- WAN Xilin, REN Yuhe, LÜ Ruina, et al. Effects of lentinan on proliferation, cell cycle, apoptosis and migration of glioma SHG-44 cells[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2019, 41(11): 2614-2619.
- [28] 刘蓝月. 金针菇多糖介导巨噬细胞免疫反应对 A549 细胞凋亡的影响[D]. 吉林: 吉林农业大学, 2022.
- LIU Lanyue. Effect of *Flammulina velutipes* polysaccharide-mediated macrophage immune response on apoptosis of A549 cells[D]. Jilin: Jilin Agricultural University, 2022.
- [29] 赵妹雯, 夏宇, 陈贵堂, 等. 金针菇多糖-Zn²⁺螯合物对 L929 肿瘤细胞的增殖抑制作用及其抗氧化活性[J]. 食品科学, 2016, 37(5): 202-207.
- ZHAO Shuwen, XIA Yu, CHEN Guitang, et al. Effect of *Flammulina velutipes* polysaccharide-Zn²⁺ chelate on suppression of L929 tumor cell proliferation and its antioxidant activity[J]. Food Science, 2016, 37(5): 202-207.

加工编辑: 刘艳美
收稿日期: 2023-10-13