

张 蕾,郝婧玮,宛春雷,等. 桦褐孔菌多糖的提取工艺优化及对人肝癌细胞 HepG2 脂肪堆积的影响[J]. 江苏农业科学,2019,47(10):201-204. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.10.045

# 桦褐孔菌多糖的提取工艺优化 及对人肝癌细胞 HepG2 脂肪堆积的影响

张 蕾,郝婧玮,宛春雷,柴军红,赵 玥,王 鑫,王 雪

(牡丹江师范学院生命科学与技术学院,黑龙江牡丹江 157011)

**摘要:**通过  $L_9(3^4)$  正交试验,通过 MTT 法选取桦褐孔菌多糖对 HepG2 细胞的安全浓度,检测不同浓度的桦褐孔菌多糖对胞内 TG 蛋白的影响,及桦褐孔菌多糖减轻细胞内脂质堆积的作用。结果表明,桦褐孔菌多糖最佳条件为 1 g : 15 mL 的料液比,在温度 30 ℃ 下提取 30 min,超声功率为 480 W。桦褐孔菌多糖可明显减轻 HepG2 细胞内脂质堆积,显著降低细胞中 TG 的含量,其中 600 mg/L 桦褐孔菌多糖对 TG 的清除率达 24.57%,脂滴数量明显减少。说明桦褐孔菌多糖具有良好的体外降脂活性,对脂肪肝有较好的预防效果。

**关键词:**桦褐孔菌;多糖;HepG2 细胞;甘油三酯;脂肪堆积;清除率;脂滴数量

**中图分类号:** R284 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)10-0201-04

非酒精性脂肪肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 的主要特征是肝细胞内脂肪的变性以及脂质的贮积,但同时无过量饮酒史的临床病理综合征<sup>[1]</sup>。经常伴有中心性的肥胖、高血脂症,对胰岛素的抵抗能力以及对糖的耐量异常等方面代谢综合征,严重危害人类的健康<sup>[2-4]</sup>。近年来,对 NAFLD 的研究很多,但对其发病机制的研究尚不清楚。因此,寻找到有效治疗 NAFLD 的药物非常重要。

桦褐孔菌 (*Phaeoportunus obliquus* J. Schroet), 别称白桦茸,被赞誉为“西伯利亚灵芝”,为真菌门担子菌亚门层菌纲非褐菌目多孔菌科褐卧孔菌属,是一种非常珍稀而名贵的药用真菌,生长在温度相对较低的俄罗斯西伯利亚地区的原始森林中,不能人工栽培,非常稀少,颜色呈深栗色,常在树皮破损及伤节处形成肉瘤状菌核,菌块性状为近球形或不定形状块;研究发现,其化学成分包含多糖类化合物、芳香物质、多酚类化合物、三萜类化合物等物质<sup>[5-8]</sup>,具有重要的药用价值。从 16 世纪至今,桦褐孔菌一直被作为一种民间药物来治疗糖尿病、高血压、抗衰老等,具有显著的效果<sup>[9-10]</sup>。对于非酒精性

脂肪肝病的治疗,目前还尚未见相关的研究报道。本试验通过模拟临床上 NAFLD 的病理特点,通过优化提取桦褐孔菌多糖提取物,将其作用于 HepG2 细胞,从细胞水平上来评价桦褐孔菌多糖提取物对细胞脂质堆积的影响,以及对细胞内甘油三酯含量的影响,从而揭示其在防治非酒精性脂肪肝方面的药用价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

桦褐孔菌购于黑龙江省绥芬河市;MTT、TG 试剂盒、油酸、油红 O 和细胞裂解液购于上海源叶生物科技有限公司;DMEM 细胞培养基、血清、胰蛋白酶等细胞试剂购于 Hylone 公司;乙醇、异丙醇购于北京化工厂;HepG2 细胞笔者所在实验室传代保存,由哈尔滨工业大学赠送;粉碎机 (戴声设备有限公司)、超声波清洗机 (杭州法兰特超声波科技有限公司,总功率 800 W)、电子天平 (QUINTIX224-1CN Sartorius, R210)、旋转蒸发器 (瑞士 BUCHI)、电子显微成像系统 (CX31 Olympus)、酶标仪 (Synergy HTX BioTek)、静音混合器 (MT-360 其林贝尔)。

### 1.2 桦褐孔菌多糖的提取及测定

将桦褐孔菌粉末过筛,准确称取 5 g 溶于醇浓度为 30% 的乙醇中,在一定时间、温度、料液比和超声波功率下振荡处理一定时间,用 80% 乙醇沉淀多糖后,4 000 r/min,离心 7 min 后取上清液,减压浓缩至浸膏后水浴至干,得粗制多

antioxidant polysaccharides from the fruiting bodies of *Chroogomphus rutilus* (Schaeff. : Fr.) O. K. Miller by Box- Behnken statistical design[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 82(1): 209-214.

[11] 栾庆书,金若忠,云丽丽,等. 血红铆钉菇对土传病原菌抑菌性研究[J]. 辽宁林业科技, 2005(6): 13-16, 55.

[12] 李艳红,姜 勇,王文杰,等. 有机碳和无机碳对 3 种真菌胞外酸性磷酸酶和蛋白酶活性的影响[J]. 植物研究, 2013, 33(4): 404-409.

收稿日期: 2018-11-03

基金项目: 黑龙江省教育厅科研备案项目 (编号: 1352MSYQN002);

黑龙江省大学生创新创业训练计划 (编号: 201810233045); 黑龙江省牡丹江市科学技术计划 (编号: Z2016s0024)。

作者简介: 张 蕾 (1984—), 女, 黑龙江东宁人, 博士, 讲师, 主要从事微生物与生物化学研究。E-mail: swxzlz@126.com。

[7] 胡 锐, 李宝莉. 传统药物中脂肪酸的药理活性和现代研究[J]. 中外医疗, 2008(27): 135-136.

[8] 祝鹤鸣, 吴艳玲, 李 雪, 等. 血红铆钉菇子实体对人肝星状细胞 LX-2 和人肝癌细胞 Hep G2 增殖的影响[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(15): 6651-6653.

[9] 张雪倩, 孙 红, 王立安, 等. 色钉菇粗多糖对小鼠 DA 能神经元 MPTP 损伤的保护作用[J]. 菌物学报, 2011, 30(1): 77-84.

[10] Sun Y X, Liu J C, Kennedy J F. Extraction optimization of

糖,标准曲线法测定其含量。

1.2.1 单因素试验指标对桦褐孔菌多糖提取量的影响 设计桦褐孔菌多糖提取物单因素试验的变量条件分别为:提取温度,20、30、40、50、80 ℃;提取时间,10、20、30、40、50 min;料液比 1 g : 8 mL、1 g : 10 mL、1 g : 15 mL、1 g : 20 mL、1 g : 25 mL;超声功率,160、320、400、480、640 W,从而来确定正交试验中各因素的水平。

1.2.2 提取工艺正交试验优化 在单因素试验基础上,利用正交试验表  $L_9(3^4)$  进行正交试验,各因素与水平见表 1。

表 1 桦褐孔菌多糖提取工艺 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平				
水平	超声时间 (min)	料液比 (g : mL)	超声温度 (℃)	超声功率 (W)
1	20	1 : 10	30	320
2	30	1 : 15	40	400
3	40	1 : 20	50	480

1.3 细胞培养及 MTT 法测 HepG2 细胞活性

复苏 HepG2 细胞,将实验室冻存的 HepG2 细胞从液氮罐中取出,迅速放于 37 ℃ 水浴锅中融化,用 PBS 清洗后,1 000 r/min 离心去上清后将其放于含 10% FBS 的 DMEM 培养基中,培养条件:温度为 37 ℃、体积分数为 5% 的  $CO_2$ 、饱和湿度,将培养好的 HepG2 细胞每隔 1 d 进行传代培养,并将处于对数生长期的细胞转于 10% FBS 的高糖型 DMEM 培养基进行下一步试验。

将处于对数生长期的 HepG2 细胞接种于 96 孔细胞培养板中,并利用细胞计数板记数使每孔细胞的接种量达到  $10^4$  个,置于 37 ℃、体积分数为 5% 的  $CO_2$  培养箱中孵育 24 h 后,设对照组和给药组(桦褐孔菌多糖提取物),给药组的终浓度分别为 6、60、600、6 000、60 000 mg/L,每组设置 3 个平行孔,培养 24 h;每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液 10  $\mu$ L,继续在 37 ℃、体积分数为 5% 的  $CO_2$  培养箱中培养 4 h;取出,缓慢吸去培养液,然后每孔加入 100  $\mu$ L 的 DMSO,振荡 5 ~ 10 min;酶标仪 490 nm 处测吸光度。根据酶标仪的吸光度值计算细胞存

活率,选择存活率达到 70% 以上时的桦褐孔菌多糖浓度为安全浓度。

细胞存活率 =  $D_{\text{给药}}/D_{\text{对照}} \times 100\%$ 。(1)

式中: $D_{\text{给药}}$  为加药组 490 nm 处吸光度; $D_{\text{对照}}$  为对照组 490 nm 处吸光度。

1.4 细胞内 TG

检测蛋白吸附法<sup>[11]</sup>,桦褐孔菌多糖的给药浓度分别是 600、60、6 mg/L,细胞内的 TG 含量检测方法同陈静等对细胞内 TG 浓度的测量<sup>[12]</sup>。

TG 清除率 =  $(D_{\text{模型}} - D_{\text{给药}})/D_{\text{模型}} \times 100\%$ 。(2)

1.5 油红 O 染色

油红 O 工作液配制:首先配制 0.5% 油红 O 储备液,将油红 O 粉末溶于异丙醇中,储备液用蒸馏水稀释后过滤 2 次,至液体澄清为止<sup>[13]</sup>。

将 HepG2 细胞接种于 24 孔板,37 ℃、体积分数为 5% 的  $CO_2$  培养箱中孵育 24 h 后取出,分为对照组、模型组、低中高浓度(600、60、6 mg/L)桦褐孔菌多糖给药组,各组所加培养基。孵育 24 h 后用油红 O 工作液染色 30 min,蒸馏水吹洗 2 次,在倒置显微镜下观察染色效果。

1.6 统计分析

通过 SPSS 13.0 软件对数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 提取时间、超声功率、提取温度、料液比分别对桦褐孔菌多糖提取率的影响

通过对比分析分别改变提取时间、超声功率、提取温度、料液比条件下桦褐孔菌多糖类物质的提取率,结果分别显示,提取时间为 30 min、超声功率为 320 W、提取温度为 40 ℃、料液比达到 1 g : 15 mL 时,桦褐孔菌中的多糖提取量最大(图 1)。因此,选择提取时间 20 ~ 40 min、超声功率 240 ~ 400 W、提取温度 30 ~ 50 ℃、料液比 1 g : (10 ~ 20) mL 为进一步优化。

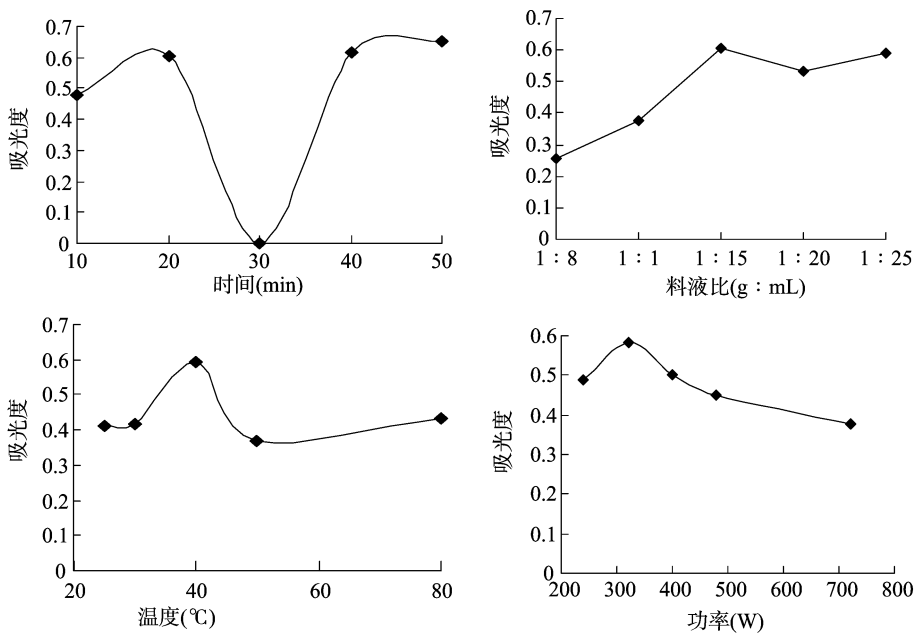


图1 单因素对桦褐孔菌多糖提取率的影响

2.2 桦褐孔菌多糖类物质提取的正交优化试验

通过正交试验确定桦褐孔菌多糖的最佳提取工艺。正交试验结果表明,影响桦褐孔菌多糖类物质提取率的因素主次顺序为 D>A>B>C,即超声功率和超声时间对桦褐孔菌多糖提取效果影响相对较大,其次为提取温度、料液比的影响。综合以上条件,桦褐孔菌多糖的最佳提取条件为 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>D<sub>3</sub>,即按 1 g:20 mL 的料液比在温度 30 ℃下提取 30 min,超声功率为 480 W,乙醇浓度为 30% 进行多糖含量测定(表 2)。

通过对正交试验结果进行方差分析,来分析各因素对多糖提取率的影响。结果表明,提取时间、功率、温度和料液比对提取率影响显著(表 2)。

表 2 桦褐孔菌多糖提取工艺的正交试验结果(n=3)

序号	时间 (min)	料液比 (g:mL)	温度 (℃)	功率 (W)	提取率
1	20	1:10	30	320	0.567
2	20	1:15	40	400	0.583
3	20	1:20	50	480	0.563
4	30	1:10	40	480	0.650
5	30	1:15	50	320	0.610
6	30	1:20	30	400	0.688
7	40	1:10	50	400	0.623
8	40	1:15	30	480	0.660
9	40	1:20	40	320	0.391
k <sub>1</sub>	0.571	0.613	0.638	0.52	
k <sub>2</sub>	0.649	0.618	0.541	0.631	
k <sub>3</sub>	0.558	0.547	0.599	0.624	
R	0.091	0.071	0.039	0.108	
主次顺序			D>A>B>C		
优水平			A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>1</sub> D <sub>2</sub>		

2.3 桦褐孔菌多糖的细胞毒理学评价

高浓度的药物对细胞具有一定的毒性,为了避免此情况的发生,本试验通过 MTT 法检测桦褐孔菌多糖对细胞存活率的影响,选取对细胞毒害作用较小的多糖作为给药剂。如表 3 所示,桦褐孔菌多糖浓度为 6 mg/L 时,细胞的存活率为 93.02%;浓度为 60 mg/L 时,细胞的存活率为 80.04%;浓度为 600 mg/L 时,细胞的存活率为 68.75%;浓度为 6 000 mg/L 时,细胞的存活率为 38.06%;浓度为 60 000 mg/L 时,细胞的存活率为 25.32%。随着桦褐孔菌多糖浓度的增加,HepG2 细胞的死亡率也在升高,说明桦褐孔菌多糖对细胞有一定的毒害作用。当浓度在 600 mg/L 以下时,对细胞毒害作用相对小。因此,将桦褐孔菌多糖的给药浓度可设定在 6~600 mg/L 之间的安全浓度范围内(表 3)。

表 3 桦褐孔菌多糖对 HepG2 细胞存活率影响

组别	浓度 (mg/L)	D <sub>490 nm</sub>	存活率 (%)
对照组	—	1.232±0.013	100.00
处理组	6	1.146±0.315	93.02
	60	0.986±0.123	80.04
	600	0.847±0.374	68.75
	6 000	0.469±0.213	38.06
	60 000	0.213±0.298	25.32

2.4 桦褐孔菌多糖对 HepG2 细胞 TG 含量的影响

为了减少高浓度的桦褐孔菌多糖对细胞的毒害作用,试

验选取了 600 mg/L 以下的桦褐孔菌多糖浓度,测定不同浓度对 HepG2 细胞脂肪堆积模型 TG 含量的影响。表 4 所示,模型组与对照组相比,TG 含量显著增加(P<0.05),表明 HepG2 细胞脂肪堆积模型成功建立<sup>[12]</sup>。60 mg/L 桦褐孔菌多糖组与模型组相比,TG 含量具有显著性差异(P<0.05);600 mg/L 桦褐孔菌多糖组与模型组相比,TG 含量具有显著性差异(P<0.01),并随桦褐孔菌多糖浓度的升高,TG 的清除率也逐渐升高,具有明显的剂量依赖性,其中高浓度组 600 mg/L 桦褐孔菌多糖对细胞内 TG 的清除效果最好,其清除率达到 24.57%。

表 4 桦褐孔菌多糖对 TG 含量的影响(±s,n=6)

组别	浓度 (mg/L)	1 000 万细胞 TG 含量 (mg)	TG 清除率 (%)
对照组	—	0.462±0.563	—
模型组	—	1.746±0.631Δ	—
处理组	6	1.706±0.327	2.31
	60	1.566±0.348*	10.31
	600	1.317±0.456**	24.57

注:Δ 表示与对照组比较差异显著(P<0.05);\*、\*\* 表示与模型组相比差异显著(P<0.05)、差异极显著(P<0.01)。

2.5 桦褐孔菌多糖减轻细胞内脂质堆积的作用

桦褐孔菌多糖对油红 O 染色的细胞形态学影响见图 2,与对照组相比,模型组细胞内出现大量的红色脂滴,同时伴随相互融合现象,说明试验成功建立了细胞脂肪堆积模型<sup>[12]</sup>,并随着桦褐孔菌多糖浓度的提高,HepG2 细胞内红色脂滴数目逐渐减少,且脂滴变小。在 3 个浓度桦褐孔菌多糖给药组中,低浓度给药组的作用效果不明显;与模型组相比,中浓度给药组对细胞内脂质堆积稍有改善,明显减轻了细胞内脂质相互融合的现象;高浓度给药组可明显减轻细胞内脂质堆积现象,且脂滴数目显著减少,这与陈静等研究人参多糖 Rb1 对 HepG2 细胞脂肪堆积影响结果<sup>[12]</sup>相似。本试验结果说明桦褐孔菌多糖对体外降脂有一定的作用效果。

3 讨论与结论

非酒精性脂肪肝病(NAFLD)的发病率呈现逐年上升的趋势,已经成为一种严重危害人类健康的世界性疾病。NAFLD 是导致肝功能异常的主要原因,肝脏脂肪积聚是其典型特征,但并不能用单一的机制来解释其发病的机制。TG 是 NAFLD 患者肝脏内蓄积的主要脂质,是由体内 TG 合成与转化失衡的结果<sup>[13]</sup>。

HepG2 细胞已经被成功用于脂肪肝细胞模型的建立,且长链脂肪酸能够使 HepG2 细胞内形成明显的脂滴,进而引起细胞内脂肪的堆积。因为游离脂肪酸中含量最高的是油酸,所以选择油酸来诱导建立肝细胞脂肪堆积模型,是符合 NAFLD 形成的病理生理过程的<sup>[14]</sup>。因此,本试验采用以上诱导方法,在单因素的基础上通过正交试验得到桦褐孔菌多糖的最佳提取条件,将提取的桦褐孔菌多糖提取物作用于 HepG2 细胞,并选择 NAFLD 的常规检测指标来评价桦褐孔菌多糖对细胞内脂肪堆积的作用效果。试验结果表明,600 mg/L 桦褐孔菌多糖组的效果最显著,TG 含量与模型组比较差异极显著(P<0.01),对细胞内 TG 的清除率可达

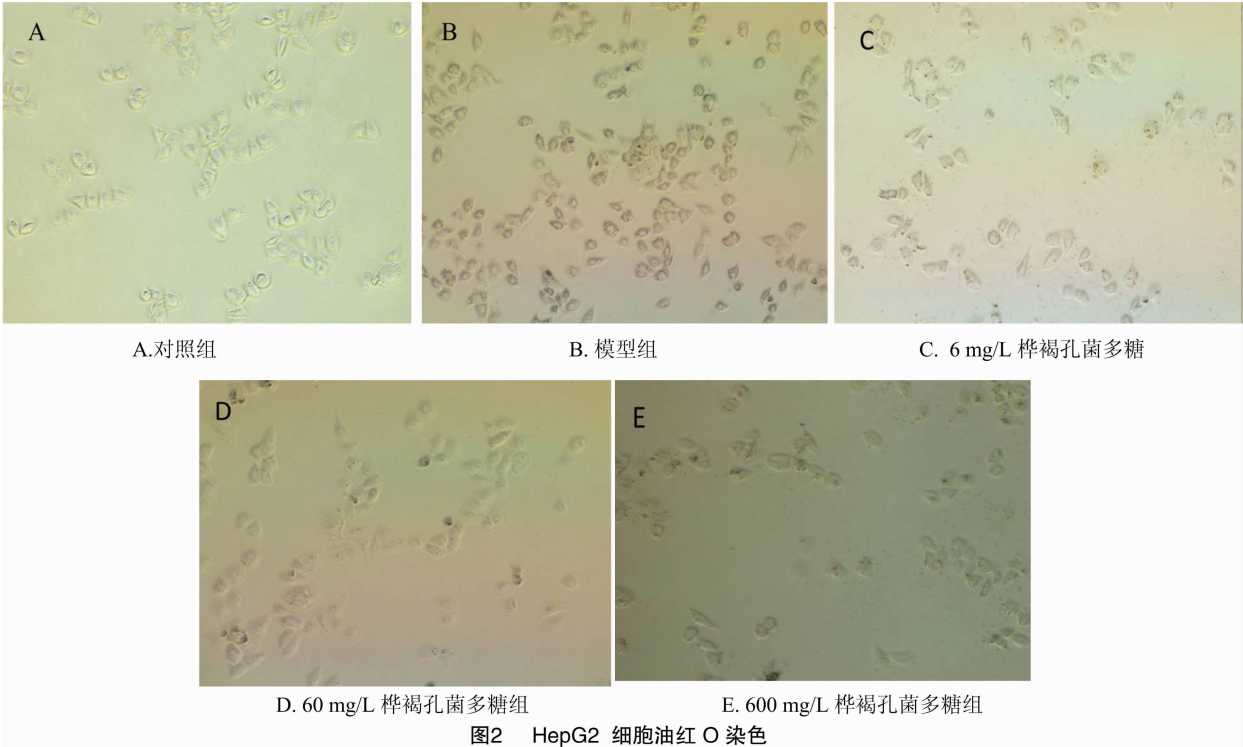


图2 HepG2 细胞油红 O 染色

24.57%,并且具有剂量依赖性。说明桦褐孔菌多糖提取物具有一定的清除细胞内脂肪堆积的作用,推测其在脂肪肝治疗方面也具有潜在的药用价值,但目前对于桦褐孔菌多糖降脂机制还不明确,具体的降脂机制还有待于进一步研究。

参考文献:

[1] 范建高,曾明德. 脂肪性肝病[M]. 北京:人民卫生出版社,2005: 200-203.

[2] Abdelmalek M F, Diehl A M. Nonalcoholic fatty liver disease as a complication of insulin resistance[J]. Medical Clinics of North America,2007,91(6):1125.

[3] Chow W C, Tai E S, Lian S C, et al. Significant non-alcoholic fatty liver disease is found in non-diabetic, pre-obese Chinese in Singapore[J]. Singapore Med,2007,48(8):752-757.

[4] Samuel V T, Liu Z X, Qu X Q, et al. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease[J]. Journal of Biological Chemistry,2004,279(31):32345-32353.

[5] Shin Y, Tamai Y, Minoru T. Chemical constituents of *Inonotus obliquus*, a new triterpene, 21,24-cyclopentalanosta-3 $\beta$ ,21,25-triol-8-ene from sclerotium[J]. The Japan Wood Research Society,2001,47(6):313-316.

[6] Cui Yong, Kim D S, Park K C. Antioxidant effect of *Inonotus obliquus* [J]. Journal of Ethnopharmacology,2005,96(1/2):79-85.

[7] Yong O K, Hae W P, Jong H K, et al. Anti-cancer effect and

structural characterization of endo-polysacchride from cultivated mycelia of *Inonotus obliquus* [J]. Life Science,2006,79(6):72-80.

[8] Song H S, Lee Y J, Kim S K, et al. Downregulatory effect of AGI-1120 ( $\alpha$ -glucosidase inhibitor) and Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) on cellular NF- $\kappa$ B activation and their antioxidant activity [J]. Korean Jphar-macogen,2004,35(4):92-97.

[9] 黄年来. 俄罗斯神秘的民间药用真菌——桦褐孔菌[J]. 中国食用菌,2002,21(4):7-8.

[10] 金光,杨恩月,金晴昊,等. 桦褐孔菌多糖的抗肿瘤作用实验研究[J]. 延边大学医学学报,2004,27(4):257-259.

[11] Cousin S P, Hugl S R, Wrede C E, et al. Free fatty acid-induced inhibition of glucose and insulin-like growth factor I-induced deoxyribonucleic acid synthesis in the pancreatic  $\beta$  cell line INS-1 [J]. Endocrinology,2001,142(1):229-240.

[12] 陈静,祁东利,张春风,等. 人参皂苷 Rb1 对油酸诱导 HepG2 细胞脂肪堆积的影响作用[J]. 中国野生植物资源,2013,32(2):20-23.

[13] 丁晓东,范建高. 非酒精性肝脂肪变性和脂肪性肝炎的发生机制[J]. 现代消化及介入诊疗,2009,14(4):237-242.

[14] 杨林辉,陈东风. 油酸诱导培养肝细胞脂肪变性模型的建立[J]. 重庆医学,2007,36(8):698-700.