

富硒羊肚菌多糖的制备及其体外抗肿瘤活性探究

李贝贝, 王慧琴, 孙仪征

Preparation of Selenium-enriched *Morchella* Polysaccharide and Its Antitumor Activity *in Vitro*

LI Beibei, WANG Huiqin, and SUN Yizheng

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023080337>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

羊肚菌硒化多糖结构表征及抗运动疲劳作用

Structure Characterization and Anti-exercise Fatigue Effect of Selenium Polysaccharide from *Morchella esculenta*

食品工业科技. 2024, 45(6): 110-120 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023060236>

羊肚菌多糖含片的研制及其体外抗氧化活性研究

Study on the Preparation of Polysaccharide Lozenge from *Morchella esculenta* and Its Antioxidant Activity

食品工业科技. 2021, 42(19): 163-172 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020110210>

响应面优化羊肚菌多糖提取工艺及抗氧化性

Extraction Optimization of *Morchella esculenta* Polysaccharides by Response Surface Methodology and Its Antioxidant Activity

食品工业科技. 2019, 40(6): 179-185,192 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.06.030>

响应面优化硒化白及多糖的制备工艺及其体外抗氧化活性研究

Optimization of Selenized *Bletilla striata* Polysaccharides Preparation by Response Surface Methodology and Determination of the Antioxidant Activity *in Vitro*

食品工业科技. 2024, 45(7): 244-253 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023060295>

羊肚菌胞外多糖液态发酵培养基配方优化及其体外降血糖活性

Optimization of Liquid Fermentation Medium Formulation of *Morchella esculenta* Exopolysaccharide and Its Hypoglycemic Activity *in Vitro*

食品工业科技. 2022, 43(20): 196-203 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021120191>

羊肚菌多糖类物质的研究进展

Review on *Morchella esculenta* Polysaccharides

食品工业科技. 2019, 40(3): 327-332 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.03.052>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

李贝贝, 王慧琴, 孙仪征. 富硒羊肚菌多糖的制备及其体外抗肿瘤活性探究 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(15): 213-222. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023080337

LI Beibei, WANG Huiqin, SUN Yizheng. Preparation of Selenium-enriched *Morchella* Polysaccharide and Its Antitumor Activity *in Vitro* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(15): 213-222. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023080337

· 工艺技术 ·

富硒羊肚菌多糖的制备及其体外 抗肿瘤活性探究

李贝贝*, 王慧琴, 孙仪征

(郑州澍青医学高等专科学校, 河南郑州 450064)

摘要: 本研究旨在优化提取和纯化富硒羊肚菌多糖 (Se-MPS), 并评估其抗肿瘤活性及其机制。采用单因素和响应面优化法, 对富硒羊肚菌粗多糖的提取工艺进行优化。通过柱层析法对粗多糖进行纯化, 并对其化学组成进行分析。使用 HepG2 细胞进行 CCK-8 试验、集落形成试验、划痕试验和 Transwell 试验来评价 Se-MPS 的抗肿瘤活性。采用 RT-qPCR 法、Western blot 法和免疫荧光法评价 Se-MPS 的潜在抗肿瘤机制。单因素和响应面试验结果显示, 富硒羊肚菌粗多糖提取的最佳工艺参数为: 提取时间 2.5 h、液料比 45:1 (mL/g)、提取温度 82 °C, 得率为 7.95%。纯化后, Se-MPS 的总糖含量达到 95.86%, 硒含量高达 76.07±0.32 mg/g。此外, Se-MPS 显著降低了 HepG2 细胞的集落形成效率、细胞迁移率和侵袭细胞数目 ($P<0.05$)。同时, Se-MPS 抑制了 PI3K/Akt 通路传导, 下调了葡萄糖转运蛋白 2 (GLUT2) 的 mRNA 表达, 并降低了细胞的葡萄糖摄取量。研究结果表明, 通过对提取时间、液料比及提取温度的优化, 可改善富硒羊肚菌粗多糖得率。此外, 通过调控 PI3K/Akt 通路, 富硒羊肚菌多糖可发挥出较强的抗肿瘤活性。这项研究为富硒羊肚菌多糖的抗肿瘤活性提供了证据, 并为相关功能性食品的开发提供了参考。

关键词: 硒, 羊肚菌多糖, 化学组成, 响应面优化, 抗肿瘤活性

中图分类号: TS209, TS202.1 文献标识码: B 文章编号: 1002-0306(2024)15-0213-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023080337

本文网刊:



Preparation of Selenium-enriched *Morchella* Polysaccharide and Its Antitumor Activity *in Vitro*

LI Beibei*, WANG Huiqin, SUN Yizheng

(Zhengzhou Shuqing Medical College, Zhengzhou 450064, China)

Abstract: This study aimed to optimize the extraction and purification processes for selenium-enriched *Morchella esculenta* (L.) Pers. (also known as *Morchella*) polysaccharides (Se-MPS) and to evaluate their anti-tumor activities and mechanisms. The extraction process was optimized using single-factor and response surface methodology. The crude polysaccharides were purified through column chromatography and their chemical composition was analyzed. The anti-tumor activity of Se-MPS was evaluated using HepG2 cells through a series of assays, including CCK-8, colony formation, scratching, and Transwell assays. The potential anti-tumor mechanisms of Se-MPS were assessed using RT-qPCR, Western blot, and immunofluorescence methods. Experimental results from single-factor and response surface methodology revealed that the optimal extraction conditions for selenium-enriched *Morchella* crude polysaccharides were: An extraction time of 2.5 h, a liquid-to-material ratio of 45:1 (mL/g), and an extraction temperature of 82 °C, yielding a crude polysaccharides yield of 7.95%. After purification, the total sugar content of Se-MPS reached 95.86%, with a selenium concentration of 76.07±0.32 mg/g. Furthermore, Se-MPS significantly reduced colony formation efficiency, cell migration rate, and the number of invasive cells in HepG2 cells ($P<0.05$). Meanwhile, Se-MPS inhibited the PI3K/Akt signaling pathway, down-regulated

收稿日期: 2023-09-04

基金项目: 河南省重点研发专项 (221111112300); 郑州澍青医学高等专科学校骨干教师培养计划 (2024ssgg04); 郑州澍青医学高等专科学校 2024 年教师教学创新团队培养计划 (2024jxcxtd01)。

作者简介/通信作者*: 李贝贝 (1990-), 女, 硕士, 讲师, 研究方向: 病原生物学与免疫学、分子生物学, E-mail: 1293850453@qq.com。

mRNA expression of glucose transporter 2 (*GLUT2*), and reduced glucose uptake in cells. The results indicated that optimizing extraction time, liquid-to-material ratio, and extraction temperature could improve the yield of selenium-enriched *Morchella* crude polysaccharides. Additionally, Se-MPS exhibited strong anti-tumor activity by regulating the PI3K/Akt pathway. This study provides evidence of the anti-tumor activities of Se-MPS and offers insights for the development of related functional foods.

Key words: selenium; *Morchella* polysaccharide; chemical composition; response surface optimization; anti-tumor activity

羊肚菌(*Morchella esculenta*(L.)Pers.)属于子囊菌亚门、盘菌纲、盘菌目、羊肚菌科和羊肚菌属,以其独特的口感和良好的保健功效而闻名^[1-3]。作为一种珍贵的食药两用蘑菇,其在全球范围内备受推崇。多项研究表明,羊肚菌的保健功效与其富含多种有益健康的成分有关,包括多糖、氨基酸、脂质、维生素、甾醇、有机酸等,这些成分已被广泛应用于植物药物和营养保健品的开发^[4]。在这些活性成分中,羊肚菌多糖因具有良好的抗肿瘤、抗菌、增强免疫等多种作用而受到许多研究者的关注^[2],研究显示羊肚菌多糖能有效激活免疫系统,这提示其可能具有潜在的抗肿瘤活性^[5]。羊肚菌的许多保健功效和生物活性都归功于其含有的多糖。因此,羊肚菌多糖具有重要的研究和经济价值。

据报道,多糖与某些微量元素结合可增强其生物活性,例如硒元素^[6]。硒(Se)是人体必需的微量矿物质元素之一,对维持免疫系统健康和保护细胞免受氧化应激具有关键作用^[7]。硒可增强免疫系统的功能,提高对病毒和细菌的抵抗力,从而降低感染风险^[7]。此外,硒还可抑制氧化应激、减少细胞损伤^[7]。研究显示,硒对某些癌症具有显著的抵抗效果,可抑制肿瘤细胞的生长和扩散,减少癌症的发病率^[8]。硒以多种形式存在,如硒酸、亚硒酸盐或元素硒,它可在生物体内与多糖、多肽或蛋白质结合转化为有机硒^[9]。硒与多糖的结合不仅可以优化二者作为营养补充剂的生理和保健功效,还可以降低硒和多糖在食品加工应用中的内在局限性,如低溶解度和低生物利用度^[10]。然而,富硒羊肚菌多糖的生物活性的研究报道较少,特别是其抗肿瘤活性的研究鲜有报道,进一步研究富硒羊肚菌多糖的抗肿瘤活性有助于揭示其生物活性和潜在的健康益处。

本文在单因素实验的基础上采用响应面法优化了富硒羊肚菌粗多糖的提取工艺。此外,研究了柱层析法制备的纯化羊肚菌硒多糖(Se-MPS)的化学组成,并采用CCK-8试验、集落形成试验、划痕试验和Transwell试验评估了Se-MPS的抗肿瘤效果。同时,采用RT-qPCR、Western blot和免疫荧光法初步探究了Se-MPS的潜在抗肿瘤机制。这些研究为富硒羊肚菌多糖的高效制备及其在功能性食品中的应用提供重要的科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

富硒羊肚菌子实体 湖北省恩施土家族苗族自

治州来凤县,纯水洗净,烘干、粉碎后过80目筛存储;DEAE Sepharose FF琼脂糖凝胶 Pharmacia公司;3500 Da透析袋 上海高信化玻仪器有限公司;苯酚、浓硫酸、间羟基联苯 上海国药集团化学试剂有限公司;HepG2肝癌细胞 中国科学院上海细胞库;考马斯亮蓝G-250 上海源叶生物科技有限公司;牛血清白蛋白、胎牛血清、DMEM培养基 HyClone公司;0.1%结晶紫溶液 Sigma公司;葡萄糖氧化酶试剂盒 Applygen Technologies公司;一抗与二抗 Abcam公司;葡萄糖转运蛋白2(glucose transporter 2, GLUT2)mRNA表达正向引物 AACTGCCACAATCTCATACTCA和反向引物 TGATTCTTCCAAGTGTGTCCCC 生工生物工程(上海)股份有限公司;TRIzol试剂、Servicebio®RT First Strand cDNA合成试剂盒、SYBR Green qPCR Master Mix、DAPI 武汉塞维尔有限公司。

UV-5100紫外可见分光光度计 上海元析仪器有限公司;FW-400A倾斜式高速万能粉碎机 北京中兴伟业仪器有限公司;DK-S26电热恒温水浴锅 上海精宏实验设备有限公司;RE-3000旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂;LABCONCO冷冻干燥机 赛默飞世尔科技有限公司;CO-150二氧化碳培养箱 New Brunswick SCIENTIFIC公司;CKX41倒置显微镜 日本 Olympus公司;MLS-3750灭菌锅 日本 Sanyo公司;定量图像分析仪 上海天能科技有限公司;AMR-100酶标仪 杭州奥盛仪器有限公司;StepOne实时荧光定量PCR仪 Applied Biosystems公司。

1.2 实验方法

1.2.1 富硒羊肚菌粗多糖提取 将羊肚菌子实体在40℃条件下烘干4h后粉碎过80目筛。将1.0g羊肚菌粉按30:1(mL/g)液料比与去离子水混合并置于60℃恒温水浴中提取2.5h,之后离心10min(4000r/min)收集上清液,重复提取两次。合并收集的上清液并用旋转蒸发器浓缩,然后加入3倍体积的95%乙醇,4℃静置过夜。离心10min后(4000×g),将沉淀冷冻干燥,得到粗多糖。

$$\text{粗多糖得率(\%)} = \frac{\text{冻干粗多糖重量(g)}}{\text{原料重量(g)}} \times 100$$

1.2.2 单因素实验

1.2.2.1 提取时间对粗多糖得率的影响 称取1.0g干燥的富硒羊肚菌子实体粉末,固定液料比30:1(mL/g)、提取温度60℃,选取提取时间1.5、2、2.5、

3、3.5 h,按照 1.2.1 提取流程进行实验,并称重以测定粗多糖的得率。

1.2.2.2 液料比对粗多糖得率的影响 称取 1.0 g 干燥的富硒羊肚菌子实体粉末,提取温度 60 ℃,提取时间 2.5 h,选取液料比 20:1、30:1、40:1、50:1、60:1(mL/g),按照 1.2.1 提取流程进行实验,并称重以测定粗多糖的得率。

1.2.2.3 提取温度对粗多糖得率的影响 称取 1.0 g 干燥的富硒羊肚菌子实体粉末,提取时间 2.5 h,液料比为 30:1(mL/g),选取提取温度 50、60、70、80、90 ℃,按照 1.2.1 提取流程进行实验,并称重以测定粗多糖的得率。

1.2.3 响应面优化试验 在单因素实验结果的基础上,结合 Box-Behnken 试验设计原理,对提取时间(A)、液料比(B)、提取温度(C)按照三因素三水平进行编码,试验设计中的水平及编码见表 1。最后以粗多糖得率为响应值,利用软件 Design Expert 8 对试验数据进行分析。

表 1 响应面试验因素与水平
Table 1 Experimental factors and levels of response surface test

水平	因素		
	A提取时间(h)	B液料比(mL/g)	C提取温度(℃)
-1	2.0	30:1	70
0	2.5	40:1	80
1	3.0	50:1	90

1.2.4 富硒羊肚菌粗多糖纯化 采用 Qian 等^[4]的方法纯化富硒羊肚菌多糖。将粗多糖(40 mg/mL)溶于 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液中并经 0.45 μm 滤膜过滤,然后经 DEAE Sepharose Fast Flow 离子交换柱(2.6 cm×50 cm)洗脱。洗脱液为 0.5 mol/L NaCl 溶液,流速为 1 mL/min,同时用苯酚-硫酸法监测洗脱过程。收集洗脱液,用截留 10 kDa 的透析袋透析 36 h,冷冻干燥得到纯化多糖 Se-MPS。

$$\text{纯化多糖得率(\%)} = \frac{\text{冻干纯化多糖重量(g)}}{\text{上样重量(g)}} \times 100$$

1.2.5 纯化 Se-MPS 的化学组成分析 参照国家标准 GB 5009.93-2010,采用原子荧光光谱法测定硒含量。

采用苯酚-硫酸法测定总糖含量^[11]:取 6 支 25 mL 刻度试管,配制 20、40、60、80、100 μg/mL 的葡萄糖溶液并各取 2 mL,按顺序向试管内加入 1.0 mL 90 g/L 苯酚溶液并混匀,之后在 5~20 s 内加入 5 mL 浓硫酸并在室温下反应 30 min。以空白为参比,在波长 485 nm 处测定混合反应液吸光度值。以葡萄糖含量为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线。将配制好的多糖溶液按照同样方法测定吸光度值,代入标准曲线计算总糖含量。

采用间羟基苯基法测定糖醛酸含量^[4]:配制 10、

20、40、60、80、100 μg/mL 的半乳糖醛酸标准品溶液。取 1.0 mL 并与 5.0 mL 四硼酸钠-硫酸溶液(0.478 g 四硼酸钠溶于 100 mL 浓硫酸)混合后沸水浴 5 min,之后采用冰水浴降至室温。向体系中加入 100 μL 间羟基联苯混匀并静置 5 min,之后于 520 nm 处测定吸光度值。以糖醛酸浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线。将配制好的多糖溶液按照相同方法测定吸光度值,代入标准曲线计算糖醛酸含量。

采用考马斯亮蓝法测定蛋白质含量^[12]:配制 10、20、40、60、80、100 mg/L 蛋白质标准溶液,各取 20 μL 分别加入到 96 孔板中,向其中加入 200 μL 1×G250 溶液并于室温孵育 3~5 min,之后于 595 nm 波长下测定各孔的吸光值。以蛋白质标准溶液的浓度为横坐标,吸光值为纵坐标绘制标准曲线。将配制好的多糖溶液按照相同方法测定吸光度值,代入标准曲线计算蛋白质含量。

1.2.6 纯化 Se-MPS 的抗肿瘤活性

1.2.6.1 细胞培养 HepG2 细胞在 37 ℃,5% CO₂ 和 95% 湿度的环境中培养,并在含有 10% 胎牛血清和 100 U/mL 青霉素-链霉素双抗混合液的 DMEM 培养基中孵育处理。

1.2.6.2 细胞活力评价 收集处于对数生长期的 HepG2 细胞,调整细胞密度为 2×10⁴ 个/mL,以每孔 100 μL 细胞悬液接种于 96 孔培养板中。待细胞贴壁后,加入不同浓度的样品(0、25、50、100、200、400、800、1600 μg/mL)100 μL。孵育 24 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,置于 37 ℃ 恒温培养箱中反应 1 h 后取出,置于酶标仪中于 450 nm 处测定吸光度值。

1.2.6.3 细胞集落形成试验评价 HepG2 细胞增殖能力 将实验分为四组,依次为对照组(无任何样品添加)、低剂量 Se-MPS 组(200 μg/mL)、中剂量 Se-MPS 组(400 μg/mL)、高剂量 Se-MPS 组(800 μg/mL)。将各组细胞以 10⁴ 个/mL 密度接种于 6 孔板中,每孔细胞数为 200。每 3 d 更换一次 DMEM 培养基,连续培养 2 周后终止培养。向每孔加入 500 μL 14% 多聚甲醛,洗涤细胞三次并于室温固定 30 min。随后,采用 500 μL 0.1% 结晶紫溶液洗涤细胞并染色,然后在室温下孵育 15 min。染色后,用双蒸水洗涤细胞,计算形成的克隆细胞的数目。按下列公式计算细胞克隆形成效率:

$$\text{克隆形成效率} = \frac{\text{细胞克隆数平均值}}{\text{铺板细胞总数}}$$

1.2.6.4 细胞划痕试验评价 HepG2 细胞的迁移能力

收集对数生长期的细胞并接种于 6 孔板中,每孔保持约 5×10⁴ 个细胞。细胞完全覆盖后,沿中线刮去约 2 mm 的划痕。然后洗涤细胞 3 次,对照组加入不含胎牛血清的 DMEM 培养基,低、中、高剂量多糖

组分别加入含 200、400、800 $\mu\text{g/mL}$ Se-MPS 的无胎牛血清 DMEM 培养基。培养 36 h 后,通过 Image J 软件计算细胞迁移率。

$$\text{细胞迁移率}(\%) = \frac{0\text{ h划痕宽度} - 36\text{ h划痕宽度}}{0\text{ h划痕宽度}} \times 100$$

1.2.6.5 Transwell 试验评价 HepG2 细胞的侵袭能力 收集对数生长期的细胞并在 Transwell 室中测定细胞侵袭力。将对照组细胞接种于不含胎牛血清的 DMEM 培养基中(10^5 个/mL),而低、中、高剂量多糖组分别接种于含 200、400、800 $\mu\text{g/mL}$ Se-MPS 的无胎牛血清 DMEM 培养基中(10^5 个/mL),所有组细胞均接种于上室,下室覆盖 DMEM 完全培养基。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 24 h 后,除去残留在膜上表面的细胞,并用无水甲醇固定 30 min。细胞膜用 0.5% 结晶紫染色,并于显微镜下计数浸润细胞数,每孔随机选择 5 个视野进行拍照并进行细胞计数。在侵入测定过程中,上室用 Matrigel 预涂。

1.2.6.6 葡萄糖消耗量测定 依据朱将雄^[11]之前报道的方法对细胞进行处理,略有改动。将细胞(10^5 个/mL)接种于含 DMEM 培养基的 96 孔板中并培养 24 h。实验分为四组:对照组(无样品添加),低、中、高剂量 Se-MPS 组(分别为 200、400、800 $\mu\text{g/mL}$)。之后,低、中、高剂量组分别用相应浓度的 Se-MPS 处理 36 h,而模型组用生理盐水替代。孵育结束后,收集无细胞上清液并使用 GOD-POD 法测定葡萄糖含量。之后,根据初始和最终细胞培养上清液中的葡萄糖含量之差计算葡萄糖消耗量。

1.2.6.7 GLUT2 基因表达测定 收集对数生长期的细胞并依据 1.2.6.6 中的步骤对细胞进行分组及样品处理,之后使用 TRIzol 试剂提取细胞的总 RNA。采用 Servicebio[®]RT First Strand cDNA 合成试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA,逆转录程序设置为 25 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; 42 $^{\circ}\text{C}$, 30 min; 85 $^{\circ}\text{C}$, 5 s。随后使用 2 \times SYBR Green qPCR Master Mix 检测 GLUT2 基因的表达水平,实时定量 PCR 的扩增条件设置为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min,然后以 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 实施 30 个循环,并在 72 $^{\circ}\text{C}$ 下延伸 30 s。以 GAPDH 基因为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 GLUT2 基因的相对 mRNA 表达水平。

1.2.6.8 Western blot 法评价 PI3K p85、p-Akt 及 Akt 蛋白表达 收集对数生长期的细胞并依据 1.2.6.6 中的步骤对细胞进行分组及样品处理。之后,收集细胞并用 RIPA 裂解缓冲液裂解。收集的蛋白通过 SDS-PAGE 电泳初步分离并转移到 PVD 膜上,并用 5% 的脱脂牛奶封闭 1 h。弃去剩余液体后,将膜与稀释的一抗(1:500~1:1000)在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜,使用的一抗包括 anti-PI3K p85、anti-pAkt 及 anti-Akt。清洗 3 次后,将其与相应的二抗(HRP 标记山羊抗大鼠 IgG)在室温下孵育 30 min,并使用 ECL 显色溶

液进行显色。使用定量图像分析仪测定蛋白质条带的密度,并将 β -肌动蛋白(β -actin)作为内参蛋白^[10]。

1.2.6.9 免疫荧光法评价 PI3K p85 和 pAkt 蛋白表达 收集对数生长期的细胞并依据 1.2.6.6 中的步骤对细胞进行分组及样品处理。采用 0.1 mol/L PBS 溶解的含 4% 多聚甲醛的混合液预混合细胞 1 h。冲洗后,采用 1% Triton X-100 在室温下渗透细胞(20 min)。清洗细胞 3 次,之后采用 10% 血清封闭细胞 1 h,并与相应的一抗混合孵育过夜(4 $^{\circ}\text{C}$)。之后,洗涤细胞并用相应的荧光标记二抗孵育。滴加 DAPI 避光孵育 5 min 后清洗 4 次。封片后,在荧光显微镜下观察结果。

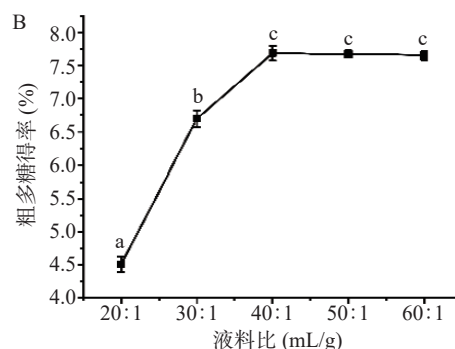
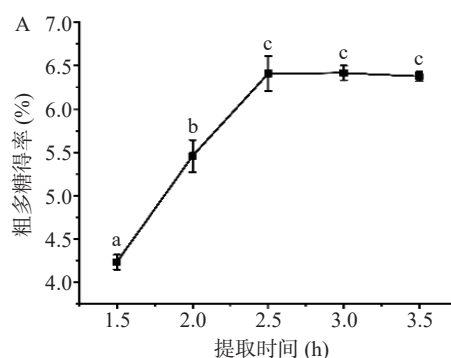
1.3 数据处理

所有实验均重复 3 次,利用软件 Design Expert 8 对响应面试验数据进行分析。所有统计分析均由 GraphPad Prism 9.0 完成, $P < 0.05$ 被视为具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

如图 1A 所示,随着提取时间从 1.5 h 延长到 2.5 h,粗多糖的得率显著升高($P < 0.05$),并在 2.5 h 时达到最大值 6.41%,继续延长提取时间并未使得粗多糖得率有所提升。过长的提取时间易使得非多糖类水溶性成分溶出从而导致与多糖竞争而降低得率,因此选定 2.5 h 为最佳提取时间进行后续响应面优化试验。在液料比为 20:1~40:1(mL/g)之间(图 1B),随着液料比的增加,粗多糖的得率显著提高($P < 0.05$),这可能是因为较低液料比时,溶液量较少限制了多糖的溶出。然而,当液料比超过 40:1(mL/g)时,粗多糖得率变化不再显著($P > 0.05$)。考虑到增加



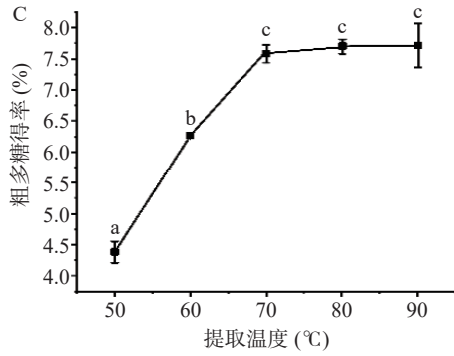


图1 提取时间(A)、液料比(B)和提取温度(C)对富硒羊肚菌粗多糖得率的影响

Fig.1 Effects of extraction time (A), liquid-to-material ratio (B), and extraction temperature (C) on the yield of selenium-enriched *Morchella* crude polysaccharides

注: 不同字母表示组间具有显著差异($P < 0.05$)。

液料比会在过滤和浓缩等后续步骤中增加多糖的损失, 选择液料比为 40:1(mL/g)为最佳结果进行后续的响应面优化试验。在提取温度为 50~80 °C 的范围内(图 1C), 随着温度的升高, 粗多糖的得率明显增加。当提取温度超过 80 °C 后, 粗多糖得率的变化趋于平缓且无显著性差异($P > 0.05$), 此时多糖的溶出已达到饱和。长时间的过高温度的提取可能会破坏多糖的结构, 因此选择 80 °C 为最佳提取温度进行后续的响应面优化试验。

2.2 响应面优化试验

在热水浸提富硒羊肚菌多糖的过程中, 以粗多糖得率(Y)作为响应值, 提取时间(A)、液料比(B)、提取温度(C)为影响因素设计试验, 结果见表 2。将表 2 数据进行二次回归分析, 拟合回归方程为 $Y = 2.48 + 2.98A + 0.57B + 0.05C + 0.35AB + 3.15AC + 0.27BC - 3.28A^2 - 0.90B^2 - 9.5C^2$ 。

表 2 响应面试验设计
Table 2 Design of response surface test

试验号	A提取时间	B液料比	C提取温度	得率(%)
1	-1	-1	0	5.69
2	1	-1	0	6.8
3	-1	1	0	5.44
4	1	1	0	7.74
5	-1	0	-1	5.65
6	1	0	-1	4.61
7	-1	0	1	4.37
8	1	0	1	6.88
9	0	-1	-1	5.77
10	0	1	-1	5.98
11	0	-1	1	5.1
12	0	1	1	6.34
13	0	0	0	7.98
14	0	0	0	7.65
15	0	0	0	7.92
16	0	0	0	7.44
17	0	0	0	7.82

借助 Design-Expert 8.0 软件, 对响应面试验结果进行了详细分析。通过对表 2 中的数据进行回归

拟合和方差分析, 具体结果整理于表 3 中。如表 3 所示, 模型的差异极显著($P < 0.01$)而失拟项不显著($P > 0.05$), 这表明模型的拟合效果良好且试验设计可靠。多元相关系数 R^2 为 0.9593, 显示模型与实际实验数据之间的拟合度良好。同时, 模型校正系数 R^2_{Adj} 为 0.9069, 表明模型能够准确地分析和预测富硒羊肚菌粗多糖得率。此外, 从表 3 的 F 值可知影响粗多糖得率的主要因素为提取时间>液料比>提取温度。响应面和等高线图(见图 2)展示了两个变量之间的交互作用。图 2B 和 2E 揭示了提取时间和提取温度之间的最为显著的相互作用, 其次是提取时间和液料比的关系(图 2A 和 2D), 而液料比与提取温度之间的交互作用则相对较弱(图 2C 和 2F)。

表 3 响应面回归模型方差分析
Table 3 Variance analysis for response surface regression models

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	22.28	9	2.48	18.32	0.0005	**
A	2.98	1	2.98	22.03	0.0022	**
B	0.57	1	0.57	4.24	0.0786	ns
C	0.06	1	0.06	0.43	0.5340	ns
AB	0.35	1	0.35	2.62	0.1496	ns
AC	3.15	1	3.15	23.31	0.0019	**
BC	0.27	1	0.27	1.96	0.2040	ns
A ²	3.28	1	3.28	24.25	0.0017	**
B ²	0.90	1	0.90	6.66	0.0365	*
C ²	9.50	1	9.50	70.31	0.0001	**
残差	0.95	7	0.14			
失拟项	0.75	3	0.25	5.23	0.0719	ns
误差	0.19	4	0.05			
总离差	23.22	16				

注: *差异显著($0.01 < P < 0.05$); **差异极显著($P < 0.01$); ns代表无显著性差异。

根据回归模型的确定, 得出了富硒羊肚菌粗多糖的最优提取工艺参数为提取时间 2.74 h、液料比 45.48:1(mL/g)、提取温度 82.75 °C, 此时预测得率为 8.00%。结合实际操作, 将提取时间调整至 2.5 h, 液料比为 45:1(mL/g), 提取温度为 82 °C, 此时预测得率为 7.98%。通过验证实验($n=3$), 实际得率为 $7.95\% \pm 0.18\%$, 从而验证了模型的可靠性。

2.3 纯化 Se-MPS 的化学组成分析

由表 4 可知, 富硒羊肚菌子实体的硒含量为 0.48 mg/kg, 其硒含量符合国家行业标准中的判定值 0.10~5.00 mg/kg(GH/T 1135-2017 富硒农产品)。纯化后的 Se-MPS 得率为 $9.98\% \pm 0.22\%$, 与吴孔阳等^[13]报道的利用类似的方法纯化羊肚菌多糖所得到的得率接近。此外, Se-MPS 中的硒含量 76.07 ± 0.32 mg/kg, 显著高于富硒羊肚菌子实体和粗多糖中的硒含量(分别为 0.48 ± 0.02 和 12.34 ± 0.09 mg/kg, $P < 0.05$), 这表明经过纯化后的 Se-MPS 中的硒含量显著富集, 与多糖相结合可能是富硒羊肚菌中硒的主要存在形式^[6]。Se-MPS 中的总糖含量为 $95.86\% \pm 0.22\%$, 与纯化前的总糖含量相比($68.49\% \pm 0.18\%$), 纯化后的

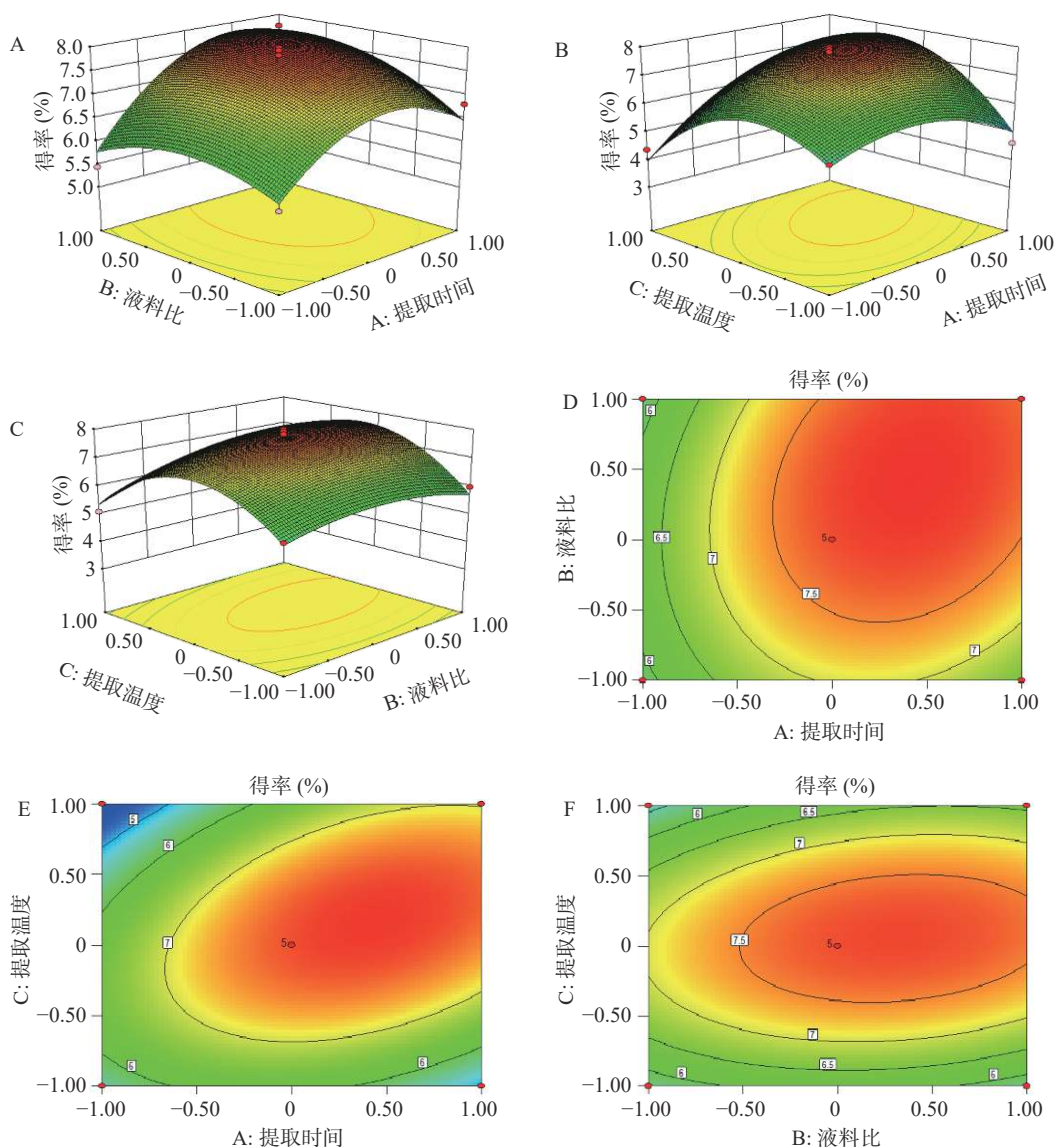


图2 提取时间、液料比和提取温度对富硒羊肚菌粗多糖得率影响的响应面图和等高线图

Fig.2 Response surface and contour plots of the effect of extraction time, liquid-to-material ratio and extraction temperature on the yield of selenium-enriched *Morchella* crude polysaccharides

表4 富硒羊肚菌子实体、粗多糖、纯化多糖的化学组成

Table 4 Chemical composition of selenium-enriched *Morchella* fruiting bodies, crude polysaccharides and purified polysaccharides

样品	硒(mg/kg)	总糖(%)	蛋白质(%)	糖醛酸(%)	得率(%)
富硒羊肚菌子实体	0.48±0.02 ^c	9.83±0.47 ^c	24.34±0.35 ^a	0.02±0.00 ^c	-
粗多糖	12.34±0.09 ^b	68.49±0.18 ^b	11.36±0.27 ^b	0.17±0.01 ^b	7.95±0.18 ^b
纯化Se-MPS	76.07±0.32 ^a	95.86±0.22 ^a	0.32±0.02 ^c	0.37±0.01 ^a	9.98±0.22 ^a

注: 同列不同字母表示具有显著差异(0.01<P<0.05)。

总糖含量显著提高($P<0.05$)。同时,在粗多糖和纯化后的多糖中均检测到少量糖醛酸的存在,这表明制备的 Se-MPS 可能是一种酸性多糖^[14]。然而,经过纯化后的 Se-MPS 中仍含有少量的蛋白质,推测这些成分可能为与硒多糖结合的结合组分^[15]。

2.4 富硒羊肚菌多糖纯化组分的抗肿瘤活性

2.4.1 富硒羊肚菌多糖抑制肝癌细胞增殖、迁移和侵袭 细胞活力实验(图 3A)表明纯化 Se-MPS 浓度在 25~800 $\mu\text{g/mL}$ 范围内对细胞增殖均具有抑制作用,且在 800 $\mu\text{g/mL}$ 时抑制效果最佳。如图 3B 所

示,纯化 Se-MPS 的低、中、高剂量组的集落形成效率显著低于对照组($P<0.05$),且其作用效果也呈剂量依赖性。这一结果表明富硒羊肚菌纯化多糖可有效诱导 HepG2 细胞发生凋亡。同样地,在图 3C 和图 3D 中也可观察到,不同剂量下的纯化多糖剂量依赖性地抑制了 HepG2 细胞的迁移和侵袭。研究证实,富硒平菇多糖可降低人肺癌细胞系 A549、人卵巢癌细胞系 SKOV3、人肝癌细胞系 HepG2 和人乳腺癌细胞系 MCF-7 的细胞活力,诱导细胞凋亡并抑制 A549 细胞的转移^[16]。此外,硒与多糖的复合能够

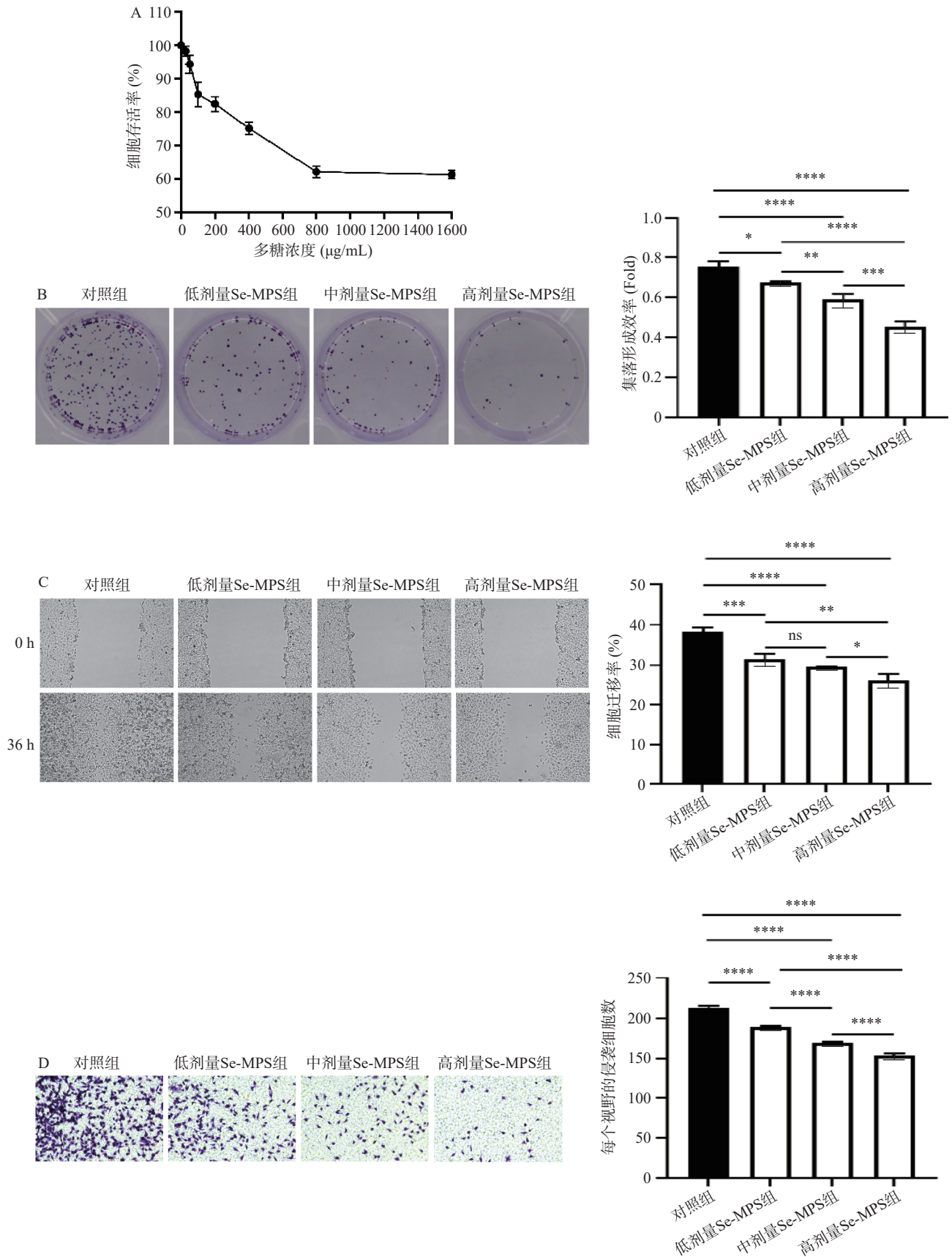


图 3 不同浓度 Se-MPS 处理后 HepG2 细胞的细胞存活率(A)、集落形成(B)、细胞迁移(C)和细胞侵袭(D)情况

Fig.3 Cell survival rate (A), colony formation (B), cell migration (C), and cell invasion (D) of HepG2 cells after treatment with different concentrations of Se-MPS

注: *表示具有显著差异(0.01<P<0.05), **, ***, ****均表示具有极显著差异但程度不同(0.001<P<0.01, 0.0001<P<0.001, P<0.0001), ns 表示无显著性差异; 图 4-图 6 同。

显著增强多糖的抗肿瘤效应^[6]。以富硒灵芝菌丝体所得的含硒多糖(SeGLP-2B-1)为例,其抑制六种人类癌细胞系增殖的效果较一般多糖 GLP-2B-1 高出 10 倍^[7]。本文的结果表明 Se-MPS 可呈剂量依赖性地抑制 HepG2 细胞的增殖、迁移和侵袭,表明硒元素与羊肚菌多糖的结合可发挥潜在的抗肿瘤功效,也进一步验证了富硒可食用菌活性多糖在抗肿瘤活性方面的显著效应。

2.4.2 富硒羊肚菌多糖抑制肝癌细胞的糖消耗及 GLUT2 基因表达 葡萄糖代谢在癌症的发生和发展中发挥着关键作用,而细胞膜上的葡萄糖转运体(GLUT)介导的葡萄糖运输是癌细胞获取葡萄糖的主要机制之一^[18]。如图 4A 所示,Se-MPS 以剂量依赖的方式抑制了 HepG2 细胞对葡萄糖的摄取。进一步的研究显示 Se-MPS 显著抑制了 HepG2 细胞中 GLUT2 基因的表达($P<0.05$) (图 4B)。GLUT2 是肝细胞膜上的跨膜载体蛋白,同时也是肝细胞中最丰富的葡萄糖转运蛋白,负责将血液中的葡萄糖跨越

质膜转运到肝细胞内^[19]。其表达是葡萄糖敏感基因的生理控制所必需,在肝脏中的失活会导致肝脏中的葡萄糖代谢紊乱,肝细胞摄取葡萄糖受损。之前的研究明确了早期的葡萄糖代谢抑制与后续的癌细胞增殖抑制之间存在紧密的联系,这表明阻断癌细胞的葡萄糖代谢可能是一种潜在的抗癌策略^[18]。据报道,下调 GLUT2 的蛋白表达可减少胰腺肿瘤细胞的葡萄糖摄取,从而减少肿瘤细胞的增殖和运动^[20]。这些研究表明,抑制 GLUT2 表达可减少肿瘤细胞的葡萄糖摄取,从而降低肿瘤细胞的恶性增殖和侵袭。结合当前的研究结果,推测 Se-MPS 抑制 HepG2 细胞的恶性增殖、迁移和侵袭可能与抑制 GLUT2 基因的表达有关。

2.4.3 富硒羊肚菌多糖抑制肝癌细胞中 PI3K/Akt 通路表达 为了深入探究 Se-MPS 对 GLUT2 基因表达的调控机制,采用了 Western blot 法和免疫荧光法来检测 PI3K p85 和 pAkt 的表达情况,相关结果见图 5 和图 6。与对照组相比,观察到 Se-MPS 可显著

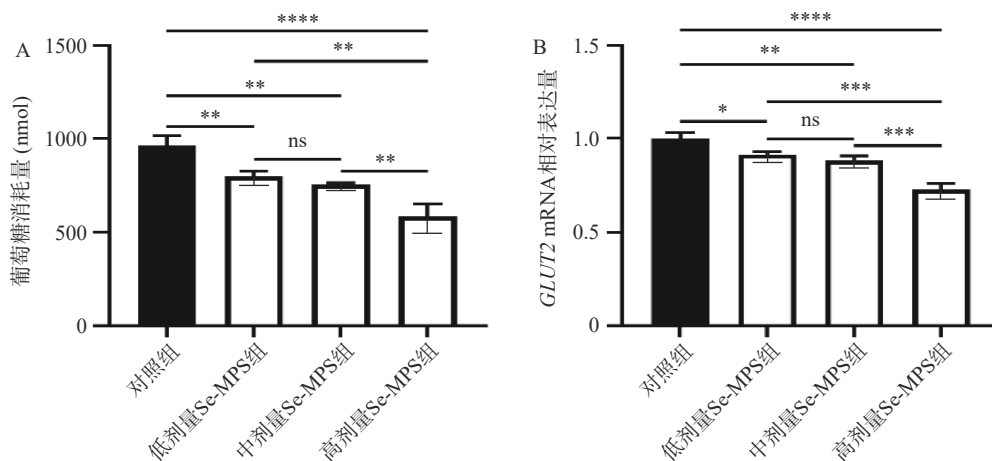


图 4 不同浓度 Se-MPS 处理对细胞葡萄糖消耗量(A)和细胞内 GLUT2 mRNA 表达水平(B)的影响

Fig.4 Effect of different concentrations of Se-MPS treatment on cellular glucose consumption (A) and intracellular GLUT2 mRNA expression levels (B)

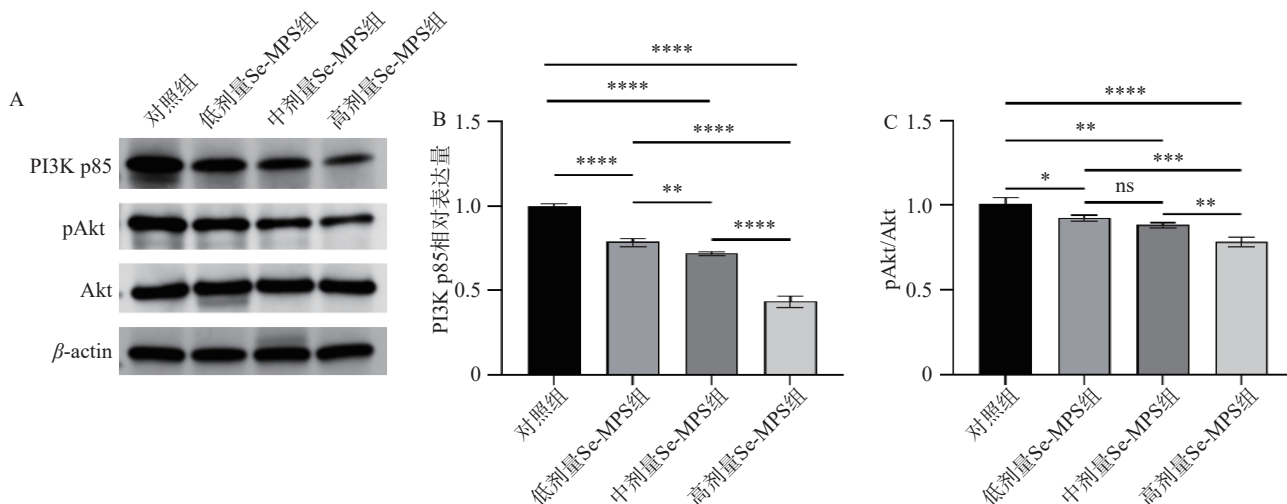


图 5 Western blot 实验评价 Se-MPS 对 HepG2 细胞中 PI3K p85、pAkt 和 Akt 蛋白表达的影响

Fig.5 Western blot assay to evaluate the effect of Se-MPS on the expression of PI3K p85, pAkt and Akt proteins in HepG2 cells

注: PI3K p85: 磷脂酰肌醇激酶; pAkt: 磷酸化蛋白激酶 B; Akt: 蛋白激酶 B; 图 6 同。

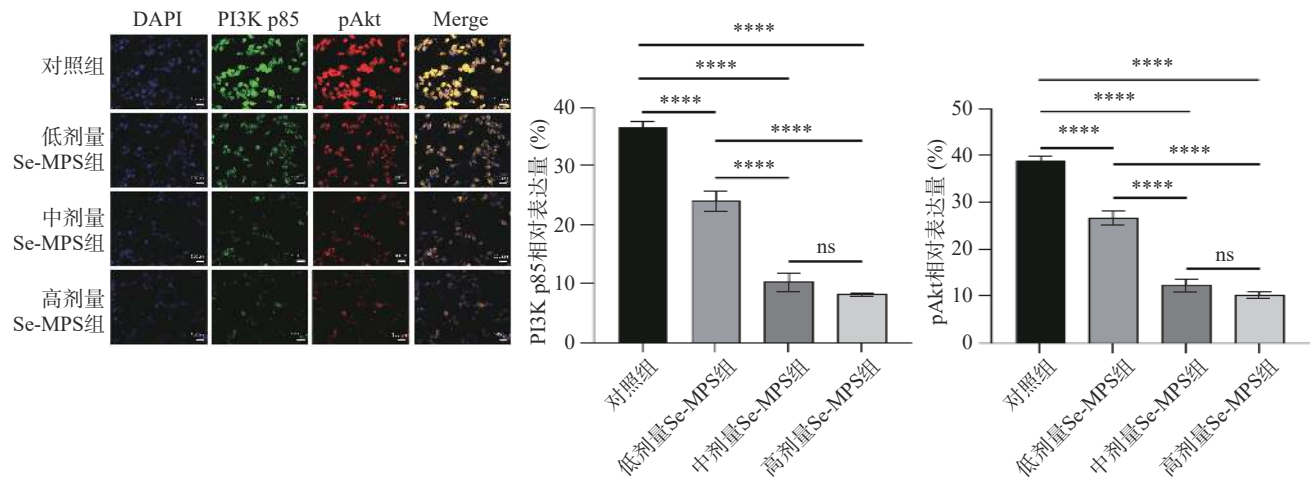


图 6 免疫荧光实验评价 Se-MPS 对 HepG2 细胞中 PI3K p85 和 pAkt 蛋白表达的影响

Fig.6 Immunofluorescence assay to evaluate the effect of Se-MPS on the expression of PI3K p85 and pAkt proteins in HepG2 cells

抑制 PI3K p85 和 pAkt 的表达($P<0.05$)。癌症的肿瘤发生过程通常涉及 PI3K/Akt 信号传导,该通路的激活可阻止细胞凋亡并促进肿瘤细胞的细胞周期进展^[21]。据报道,PI3K/Akt 信号通路对于肝癌细胞的增殖、侵袭以及抑制细胞凋亡均具有促进作用,抑制 PI3K/Akt 信号传导可抑制肝癌细胞的侵袭性行为^[22]。同时,PI3K/Akt 信号传导与肝癌细胞的葡萄糖吸收密切相关,进而影响了肝癌细胞的增殖^[22]。PI3K/Akt 通路的激活可上调 *GLUT2* 的表达,从而增强肝癌细胞的血管生成、转移和侵袭^[23]。研究显示二氢青蒿素可通过下调非小细胞肺癌细胞中 PI3K/Akt 通路表达来抑制 *GLUT2* 的表达,以此来抑制细胞活力和克隆形成能力并诱导细胞凋亡,同时降低细胞对葡萄糖的摄取,具有时间和剂量依赖效应^[24]。因此,Se-MPS 可能通过调控 PI3K/Akt 通路,抑制肿瘤细胞中的 *GLUT2* 表达以调节肿瘤细胞的葡萄糖摄取,从而调控肝癌细胞的恶性增殖和侵袭。

3 结论

本研究通过单因素和响应面试验,成功优化了富硒羊肚菌粗多糖的提取工艺,最佳工艺参数为:提取时间 2.5 h、液料比 45:1(mL/g)、提取温度 82 °C,其粗多糖得率可达 7.95%。纯化后的富硒羊肚菌多糖表现出显著的抗肿瘤活性,通过调控 PI3K/Akt 通路,下调 *GLUT2* 基因表达,进而降低了细胞的葡萄糖摄取量,可显著降低 HepG2 细胞的集落形成效率、细胞迁移率和侵袭细胞数目($P<0.05$)。综上所述,富硒羊肚菌多糖具有显著的抗肿瘤功效,有望成为一种天然的功能性食品,用于肿瘤的预防和干预。未来的研究应继续深入探讨富硒羊肚菌多糖的抗肿瘤机制,以为其在食疗中的应用提供更为科学的依据。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] SUN Y, HE H, WANG Q, et al. A review of development and utilization for edible fungal polysaccharides: Extraction, chemical characteristics, and bioactivities[J]. *Polymers*, 2022, 14(20): 4454.
- [2] TIETEL Z, MASAPHY S. True morels (*Morchella*)-nutritional and phytochemical composition, health benefits and flavor: A review[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2018, 58(11): 1888–1901.
- [3] 林晓民,李振岐,侯军,等.中国菌物[M].北京:中国农业出版社,2007. [LIN X M, LI Z Q, HOU J, et al. Chinese mycology [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2007.]
- [4] QIAN L J, DU M X, YANG X Y, et al. Microanalysis characterization and immunomodulatory effect for selenium-enriched polysaccharide from *Morchella esculenta* (L.) Pers[J]. *Molecules*, 2023, 28(7): 2885.
- [5] HUO W, QI P, CUI L, et al. Polysaccharide from wild morels alters the spatial structure of gut microbiota and the production of short-chain fatty acids in mice[J]. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 2020, 39(4): 219–226.
- [6] CHENG L, WANG Y, HE X, et al. Preparation, structural characterization and bioactivities of Se-containing polysaccharide: A review[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 120: 82–92.
- [7] ZHU J X, CHEN Z Y, CHEN L, et al. Comparison and structural characterization of polysaccharides from natural and artificial se-enriched green tea[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 130: 388–398.
- [8] ZHANG, S J, SONG Z T, SHI L J, et al. A dandelion polysaccharide and its selenium nanoparticles: Structure features and evaluation of anti-tumor activity in zebrafish models[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 270: 118365.
- [9] ZHU J X, DU M K, WU M R, et al. Preparation, physicochemical characterization and identification of two novel mixed ace-inhibiting peptides from two distinct tea alkali-soluble protein[J]. *European Food Research and Technology*, 2020, 246(7): 1483–1494.
- [10] ZHU J X, YU C, HAN Z, et al. Comparative analysis of existence form for selenium and structural characteristics in artificial selenium-enriched and synthetic selenized green tea polysaccharides[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 154: 1408–1418.
- [11] 朱将雄.不同中国黑茶降血糖活性比较及其降血糖机理探

- 究[D]. 上海: 上海师范大学, 2020. [ZHU J X. Comparison of hypoglycemic activities of different Chinese dark teas and exploration of hypoglycemic mechanisms[D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2020.]
- [12] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248–254.
- [13] 吴孔阳, 原瑞材, 杨同香, 等. 响应面法优化羊肚菌多糖提取工艺研究[J]. *洛阳师范学院学报*, 2021, 40(2): 19–23. [WU K Y, YUAN R C, YANG T X, et al. Optimization of extraction technology of *Morchella esculenta* polysaccharides by response surface methodology[J]. *Journal of Luoyang Normal University*, 2021, 40(2): 19–23.]
- [14] WANG Q, YANG X Y, ZHU C W, et al. Valorization of polysaccharides from *Benincasa hispida*: Physicochemical, moisturizing, and antioxidant skincare properties[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 912382.
- [15] ZHU J X, ZHOU H, ZHANG J Y, et al. Valorization of polysaccharides obtained from dark tea: Preparation, physicochemical, antioxidant, and hypoglycemic properties[J]. *Foods*, 2021, 10(10): 2276.
- [16] ZHANG Z M, ZHANG Y S, LIU H, et al. A water-soluble selenium-enriched polysaccharide produced by *Pleurotus ostreatus*: Purification, characterization, antioxidant and antitumor activities *in vitro*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 168: 356–370.
- [17] SHANG D J, ZHANG J N, WEN L, et al. Preparation, characterization, and antiproliferative activities of the Se-containing polysaccharide SeGLP-2B-1 from Se-enriched *Ganoderma lucidum*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(17): 7737–7742.
- [18] GHEZZI C, PEREZ S, RYAN K, et al. Early reduction of glucose consumption is a biomarker of kinase inhibitor efficacy which can be reversed with glut1 overexpression in lung cancer cells[J]. *Molecular Imaging and Biology*, 2023, 25(3): 541–553.
- [19] LIN S T, TU S H, YANG P S, et al. Apple polyphenol phloretin inhibits colorectal cancer cell growth via inhibition of the type 2 glucose transporter and activation of p53-mediated signaling[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(36): 6826–6837.
- [20] WANG F, QI X M, WERTZ R, et al. p38 γ MAPK is essential for aerobic glycolysis and pancreatic tumorigenesis[J]. *Cancer Research*, 2020, 80(16): 3251–3264.
- [21] WANG W L, SHEN C, ZHAO Y Z, et al. Identification and validation of potential novel biomarkers to predict distant metastasis in differentiated thyroid cancer[J]. *Annals of Translational Medicine*, 2021, 9(13): 1053.
- [22] PASKEH M D A, GHADYANI F, HASHEMI M, et al. Biological impact and therapeutic perspective of targeting PI3K/Akt signaling in hepatocellular carcinoma: Promises and challenges[J]. *Pharmacological Research*, 2023, 187: 106553.
- [23] UMAPATHY D, KARTHIKEYAN M C, PONNUCHAMY K, et al. The absence of cellular glucose triggers oncogene AEG-1 that instigates VEGFC in HCC: A possible genetic root cause of angiogenesis[J]. *Gene*, 2022, 826: 146446.
- [24] 闵发胜, 杨建洪, 黄建军, 等. DHA 通过抑制 PI3K 通路和 GLUT2 表达而诱导 NSCLC 细胞毒性[J]. *中国病理生理杂志*, 2015, 31(11): 1961–1969. [MIN F S, YANG J H, HUANG J J, et al. DHA induced cytotoxicity in NSCLC cells via inhibiting PI3K pathway activation and GLUT2 expression[J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2015, 31(11): 1961–1969.]