

发酵灵芝主要活性物质变化及对 HepG₂ 细胞的抑制作用

武 铭, 李 梅, 周中凯*

(天津科技大学食品科学与工程学院 天津 300457)

摘要 为探究鼠李糖乳杆菌发酵灵芝子实体粉的主要活性物质变化及对肝癌细胞 HepG₂ 的抑制作用,采用固体发酵的方式,以鼠李糖乳杆菌为发酵菌种,灵芝子实体粉为发酵基质,制备发酵灵芝粉,研究其主要活性成分及抗氧化能力。对灵芝子实体粉进行植物代谢组学测定,通过扫描电镜观察其表面结构的变化。采用 CCK-8 法检测灵芝醇提物对肝癌细胞的抑制作用;细胞划痕的方法检测灵芝醇提物对肝癌细胞迁移的影响;Hoechst 33258 检测灵芝醇提物对细胞核的影响,验证凋亡效果;PCR 法分析 HepG₂ 细胞凋亡相关基因的表达。结果表明,鼠李糖乳杆菌发酵灵芝粉的三萜类物质含量为 4.075 mg/g、多糖含量为 2.347 g/100 g、黄酮含量为 4.604 mg/g 与发酵前相比均提高;鼠李糖乳杆菌发酵灵芝粉抗氧化能力较原灵芝粉和发酵对照灵芝粉显著提高;植物代谢组学的结果显示,3 种样品的物质成分和峰面积均有显著差异。细胞试验结果显示,发酵灵芝醇提物抑制 HepG₂ 细胞增长和阻滞细胞迁移能力明显增加,且 Hoechst 33258 结果凋亡现象更加显著。通过 PCR 试验验证发酵灵芝醇提物干预细胞使得促进细胞凋亡相关基因 *Bax*、*Cyclin-A*、*CDK-2*、*P21*、*P53* 显著上调,抑制细胞凋亡相关基因 *Bcl-2* 显著下调。结论:鼠李糖乳杆菌发酵灵芝可提高灵芝主要活性物质,如灵芝三萜类化合物、灵芝多糖、黄酮的含量,发酵灵芝醇提物对 HepG₂ 细胞的抑制作用更强。

关键词 灵芝; HepG₂ 细胞; 鼠李糖乳杆菌; 固体发酵; 醇提物

文章编号 1009-7848(2023)04-0012-10 **DOI**: 10.16429/j.1009-7848.2023.04.002

肝癌是全球常见的恶性肿瘤,其发病率与死亡率居高不下,据 2020 年全球癌症报告显示:肝癌的发病率位居世界肿瘤发病率第 7 位,死亡率位居世界肿瘤死亡率第三^[1],正严重威胁着人类健康。目前对肝癌的治疗方法主要有手术、放疗和化疗等,费用昂贵且放疗和化疗有明显的毒副作用,因此寻求新型、高效、低毒的抗肿瘤药物成为肿瘤治疗的研究热点。研究发现,中草药应用于癌症治疗具有很好的效果^[2]。

近年来微生物发酵中草药得到广泛的研究。微生物发酵中草药分为固体发酵和液体发酵两种,发酵菌种主要包括真菌和细菌,其中主要为乳酸菌、芽孢杆菌、双歧杆菌、酵母菌、米曲霉、黑曲霉等^[3]。发酵中草药具有促进中草药活性物质的释放,提高部分中草药有效成分含量及药效,降低毒性,减少毒副作用,产生新活性成分等优点^[4]。通过该方法可以有效提高中草药的利用率。

灵芝是一种药食两用真菌,在我国有着悠久的历史。其主要活性成分包括三萜类化合物、灵芝多糖、生物碱、蛋白质、核苷和微量元素等^[5]。研究表明,灵芝具有免疫调节、抗肿瘤、抗氧化、抑菌、保肝等功效^[6-12]。灵芝被广泛应用于保健食品、药品、化妆品等领域,深受广大消费者的喜爱。近年来对灵芝的研究主要集中于对其主要活性物质的提取和纯化以及药理作用等方面,而以微生物为发酵菌种,灵芝为发酵底物的相关研究很少。本课题通过分析鼠李糖乳杆菌发酵灵芝后其主要活性物质的变化及其醇提物对 HepG₂ 细胞的抑制作用,探讨发酵对灵芝活性物质以及抗癌的影响,为灵芝的进一步开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 主要材料与试剂 灵芝,浙江龙泉佳宝生物科技有限公司。鼠李糖乳杆菌,本实验室自行筛选保藏;HepG₂ 细胞,中国医学科学院协和基础研究所;MRS 肉汤培养基,青岛高科技工业园海博生物技术有限公司;齐墩果酸标准品、芦丁标准品、1×PBS 缓冲溶液、二甲基亚砜、Hoechst 33258,上

收稿日期: 2022-04-24

基金项目: 天津市“一带一路”科技创新工程
(18PTZWHZ00080)

第一作者: 武铭,女,硕士生

通信作者: 周中凯 E-mail: zkzhou@tust.edu.cn

海索莱宝生物科技有限公司;葡萄糖,福晨(天津)化学试剂有限公司;香草醛、维生素 E,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;冰醋酸、高氯酸、乙醇、甲醇,天津市江天化工技术股份有限公司;DMEM、Trypsin-EDTA 0.25%,中科迈晨(北京)科技有限公司;CCK-8 试剂盒,MedChemExpress 公司;TRIZOL, Ambion 公司;CDNA 试剂盒, Molecular biology 公司。

1.1.2 主要设备与仪器 CT62A 标准型高压灭菌器,欧莱德科学仪器(北京)有限公司;SW-CJ-1FD 型单人单面净化工作台,苏州净化设备有限公司;ZWY-2102C 恒温培养振荡器,上海智城分析仪器制造有限公司;SPX-250 智能培养箱,宁波赛福实验仪器有限公司;SB-120DT 超声波清洗器,宁波新芝生物科技股份有限公司;RE52AA 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;SHZ-DIII 循环水真空泵,巩义市予华仪器有限公司;Epoch 酶标仪, Biotek Instruments 公司;CKX41 显微镜, Olympus 公司;ETC811 基因扩增仪,苏州东胜兴业科学仪器有限公司;Steponeplus 实时荧光定量 PCR 仪,美国 Thermo 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 灵芝样品粉的制备 以鼠李糖乳杆菌为发酵菌种,称取适量灵芝子实体干粉,加入 1%葡萄糖,搅拌均匀后在 121 °C, 30 min 条件下高压灭菌。灭菌后按料液比 1:2 加入无菌水,再加入 5%的鼠李糖乳杆菌,总菌量 $\geq 1.5 \times 10^9$ CFU/mL,在发酵对照组中加入 5%的无菌水,搅拌均匀后,转移到发酵袋中,抽真空、封口,在 37 °C 培养箱中发酵 48 h。发酵结束后将鼠李糖乳杆菌发酵灵芝粉、原灵芝粉、发酵对照灵芝粉在 37 °C 条件下烘干,制得 3 种灵芝样品粉,备用。

1.2.2 灵芝中主要活性物质的测定

1.2.2.1 灵芝三萜含量的测定 采用超声提取的方法,称取适量样品粉于锥形瓶中,按料液比 1:25 加入 90%的乙醇,在功率 120 W 条件下超声 1 h。之后抽滤,合并滤液,制得待测样品溶液。采用刘宇等^[13]的方法并稍作修改,测定待测样品溶液中的三萜含量。以齐墩果酸为标准品,测定标准曲线。

1.2.2.2 灵芝多糖含量的测定 按照行业标准

《食用菌中粗多糖含量的测定》(NY/T 1676-2008)^[14]方法提取并测定灵芝样品粉中的多糖,以葡萄糖为标准品,测定标准曲线。

1.2.2.3 灵芝黄酮含量的测定 待测样品溶液制备方法同 1.2.2.1 节方法。采用王昌涛等^[15]的方法并稍作修改测定待测样品溶液中黄酮的含量。以芦丁为标准品,测定标准曲线。

1.2.3 灵芝醇提物抗氧化能力测定 待测样品溶液制备方法同 1.2.2.1 节方法。采用贾雨朦等^[16]、陈佳歆等^[17]的方法并稍作修改,测定待测样品溶液中 ABTS 阳离子自由基、DPPH 自由基的清除能力以及亚铁离子螯合能力。抗氧化能力以 Trolox 当量(mg/100 g)为单位表示。

1.2.4 样品扫描电镜 将鼠李糖乳杆菌发酵灵芝粉、原灵芝粉、发酵对照灵芝粉放入 37 °C 烘箱中烘干至恒重,粉碎成粉末后,分别过 100 目筛,得到电镜扫描样品。将 3 种样品喷金后置于扫描电镜下,调节放大至 500, 1 000, 2 000 倍,选择合适的视野进行拍照。

1.2.5 样品的代谢组学测定 对鼠李糖乳杆菌发酵灵芝粉、原灵芝粉、发酵对照灵芝粉进行 UH-PLC-QE-MS 非靶标代谢组学检测。对鼠李糖乳杆菌发酵灵芝粉、原灵芝粉进行植物广靶代谢组学的测定。

1.2.6 细胞培养及干预物的制备

1.2.6.1 细胞培养 配制含有 10%FBS 和 1%青霉素-链霉素-庆大霉素混合溶液(三抗)的 DMEM 作为 HepG₂ 细胞的培养基。HepG₂ 细胞经复苏后用配制好的细胞培养基于 37 °C, 5%CO₂ 的培养箱中培养 48 h, 在倒置显微镜下观察细胞形态及生长状况, 当细胞生长融合度达 80%~90%时,用 0.25%的 EDTA 进行消化传代或后续试验。

1.2.6.2 干预物的制备 将 3 种灵芝样品粉分别按料液比为 1:25 配制后加入 90%的乙醇,采用超声提取方法,在 120 W 室温下超声 1 h,抽滤,将滤液在 60 °C 下减压浓缩除乙醇后冷冻干燥,得到 3 种灵芝样品粉的醇提物浸膏。分别将 3 种醇提物浸膏用 DMSO 溶解,过 0.45 μm 的微孔滤膜,制备质量浓度为 160 mg/mL 干预物母液,用细胞培养基将其稀释成所需浓度,做细胞试验。

1.2.7 CCK-8 法检测 3 种样品醇提物对 HepG₂

细胞增殖的抑制作用 采用 CCK-8 法测定 HepG₂ 细胞的抑制率。将 3 种样品的干预物母液分别用 HepG₂ 细胞培养基稀释成 400, 500, 600, 700, 800 μg/mL 5 个浓度梯度的样品溶液, 用于细胞干预。将对数生长期的细胞用细胞培养基配成 5×10⁴ 个/mL 的细胞悬液, 按每孔 100 μL 接种于 96 孔板中, 在 37 °C, 5%CO₂ 培养箱中培养 12 h, 待细胞完全贴壁后, 弃上清液, 按每孔 100 μL 加入配好的不同浓度梯度的干预物, 设置 3 个平行孔, 放入培养箱中分别培养 12, 24, 48 h, 弃上清液, 向每孔加入 10 μL CCK-8 溶液和 100 μL 细胞培养基, 培养 2 h 后, 在波长 450 nm 处测定吸光值, 注意避光。用抑制率公式计算细胞抑制率。

$$\text{抑制率} = [(A_c - A_s) / (A_c - A_b)] \times 100\% \quad (1)$$

式中, A_c ——对照孔 (含有细胞的培养基、CCK-8、没有待测药物) 的吸光度; A_s ——试验孔 (含有细胞的培养基、CCK-8、待测药物) 的吸光度; A_b ——空白孔 (不含细胞和待测药物的培养基、CCK-8) 的吸光度。

1.2.8 HepG₂ 细胞迁移能力的测定 在 6 孔板背面每隔 0.5 cm 平行画出 1 条横穿过孔的线, 每孔至少穿过 5 条线。将对数生长期的 HepG₂ 细胞按照每孔 1×10⁶ 个细胞接种于 6 孔板中, 将 6 孔板置于 37 °C, 5%CO₂ 的培养箱中培养。当细胞生长融合度达 80%~90% 时, 弃培养基, 用无菌的 200 μL 移液枪枪头垂直在每孔中划出均匀分布的 3 条平行划痕, 之后加入 500 μL PBS 清洗细胞碎片。样品孔分别加入用培养基配制的低 (500 μg/mL)、中 (600 μg/mL)、高质量浓度 (700 μg/mL) 的 3 种样品溶液, 空白对照组加入培养基, 置于培养

箱中培养。分别于 0, 12, 24, 48 h 在倒置显微镜下观察并拍照。

1.2.9 细胞凋亡检测 将对数生长期的 HepG₂ 细胞按照每孔 0.5×10⁶ 个细胞接种于 6 孔板中, 将 6 孔板置于 37 °C, 5%CO₂ 的培养箱中培养 12 h, 当细胞生长融合度达 80%~90% 时, 弃培养基, 样品孔分别加入用培养基配制的低 (500 μg/mL)、中 (600 μg/mL)、高质量浓度 (700 μg/mL) 的 3 种样品溶液, 空白对照组加入培养基, 置于培养箱中培养 24 h, 弃上清液, 用 PBS 洗 3 次。每孔加入 800 μL 固定液 (甲醇与冰乙酸以体积比为 3:1 配制), 在 4 °C 条件下放置 60 min, 弃固定液, 用 PBS 洗 3 次。每孔加入 500 μL Hoechst 33258 染色液, 覆盖住样品, 在室温放置 5 min 后弃染色液, 用 PBS 洗 3 次, 置于荧光显微镜下观察细胞并拍照。

1.2.10 RT-PCR 测定 将对数生长期的 HepG₂ 细胞配成 0.3×10⁶ 个/mL 的细胞悬液, 按照每培养皿 5 mL 接种于 6 cm 培养皿中, 放入 37 °C, 5%CO₂ 的培养箱中培养 12 h, 弃培养基, 分别加入用细胞培养基配制的低 (500 μg/mL)、中 (600 μg/mL)、高质量浓度 (700 μg/mL) 的 3 种样品溶液, 培养 24 h 后收集细胞, 采用 TRIZOL 法提取细胞 RNA, 用微量分光光度计测定 RNA 浓度, 使用 CDNA 试剂盒将 RNA 反转录成 CDNA, 用 RT-PCR 法测定细胞凋亡相关基因的表达量, 以 β -action 为内参, 引物序列见表 1。

1.2.11 数据统计分析 每个试验重复 3 次, 结果用“平均值±标准差”表示。使用 SPSS Statistics 26.0 分析数据, 用 Origin 2018 64bit 软件作图。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 PCR primer sequences

引物名称	种属	引物序列 (5'-3')	碱基数
β -actin-F	Human	ATCGTCCACCGCAAATGCTTCTA	23
β -actin-R	Human	AGCCATGCCAATCTCATCTTGTT	23
Bax-F	Human	TTTCTGACGGCAACTTCAACTG	22
Bax-R	Human	GCCACAAAGATAATCACGGTC	21
Bcl-2-F	Human	GGAGCGTCAACAGGGAGATG	20
Bcl-2-R	Human	GATGCCGGTTCAGTACTCAG	21
CyclinA-F	Human	GATGCTGACCCATACCTCAAGT	22
CyclinA-R	Human	GCTTTGTCCCGTACTGTGT	21
CDK2-F	Human	CCTGGATGAAGATGGACGGA	20
CDK2-R	Human	TGGAAGAAAAGGGTGAGCCA	19

(续表 1)

引物名称	种属	引物序列(5'-3')	碱基数
P21-F	Human	TTTGATTAGCAGCGGAACAAGGAGT	25
p21-R	Human	CTAGGTGGAGAAACGGGAACCAG	23
p53-F	Human	CTTTGAGGTGCGTGTGTTGTG	20
p53-R	Human	GTTTCTTCTTTGGCTGGGGA	20

2 结果与分析

2.1 灵芝的主要活性物质变化

测定灵芝样品中的三萜含量、多糖含量、黄酮含量首先要测定标准曲线,以齐墩果酸为标准品,测得标准曲线为 $Y=2.4081X+0.1075$, 决定系数 $R^2=0.9991$ 。以葡萄糖为标准品,测得标准曲线为 $Y=5.4332X+0.086$, 决定系数 $R^2=0.999$ 。以芦丁为标准品,测得标准曲线为 $Y=1.9694X+0.088$, 决定系数 $R^2=0.9991$ 。

由表 2 可知,采用固体发酵的方式,以鼠李糖乳杆菌为发酵菌种,灵芝子实体粉为发酵基质进行发酵后,灵芝中的三萜含量、黄酮含量及多糖含量均提高。其中,对三萜含量和黄酮含量排序,鼠李糖乳杆菌发酵灵芝>原灵芝>发酵对照灵芝;对多糖含量排序,鼠李糖乳杆菌发酵对照>发酵对照灵芝>原灵芝。与原灵芝粉对比,发酵后灵芝中的

三萜含量增加 29.78%, 多糖含量增加 19.98%, 均具有显著性差异 ($P<0.05$); 黄酮含量增加 12.05%, 变化不显著 ($P>0.05$)。这可能是因为发酵过程中, 益生菌产生的酶破坏细胞壁, 使得有效成分进一步释放, 进而提高有效成分的含量。

2.2 灵芝的抗氧化能力

由表 2 可知, 鼠李糖乳杆菌发酵灵芝醇提物的 ABTS 阳离子自由基、DPPH 自由基清除能力以及亚铁离子螯合能力较原灵芝醇提物均显著性提高 ($P<0.05$)。其中, ABTS 阳离子自由基、DPPH 自由基清除能力均为鼠李糖乳杆菌发酵灵芝>原灵芝>发酵对照灵芝, 而亚铁离子螯合能力为鼠李糖乳杆菌发酵灵芝>发酵对照灵芝>原灵芝。结果表明, 鼠李糖乳杆菌发酵灵芝可以提高其抗氧化能力, 这可能与发酵后三萜、黄酮等主要活性物质的含量增加有关。

表 2 样品中主要物质的含量与抗氧化能力

Table 2 Content changes and antioxidant capacity of main substances in the samples

物质名称	三萜含量/ mg·g ⁻¹	多糖含量/ g·(100 g) ⁻¹	黄酮含量/ mg·g ⁻¹	ABTS 清除率/ TE mg·(100 g) ⁻¹	DPPH 清除率/ TE mg·(100 g) ⁻¹	FRAP 清除率/ TE mg·(100 g) ⁻¹
原灵芝	3.140 ± 0.289 ^a	1.951 ± 0.129 ^b	4.109 ± 0.088 ^b	182.452 ± 3.516 ^c	150.839 ± 5.166 ^a	196.754 ± 3.986 ^a
鼠李糖乳杆菌 发酵灵芝	4.075 ± 0.183 ^b	2.347 ± 0.084 ^c	4.604 ± 0.213 ^b	199.199 ± 3.457 ^a	166.708 ± 7.180 ^b	241.115 ± 6.528 ^c
发酵对照	2.725 ± 0.216 ^a	2.753 ± 0.111 ^a	3.233 ± 0.176 ^a	161.631 ± 2.574 ^b	147.313 ± 5.870 ^a	212.411 ± 3.986 ^b

注:表中不同小写字母表示具有显著性差异, $P<0.05$ 。

2.3 灵芝的扫描电镜结果

由图 1 可知, 灵芝子实体粉末扫描电镜下呈纤维状, 以分散的菌丝片段形态存在。已知灵芝子实体是由骨架菌丝、缠绕菌丝等菌肉、菌丝构成, 经鼠李糖乳杆菌发酵后灵芝的菌丝结构解体、破碎, 灵芝表面结构被破坏。

2.4 灵芝的植物代谢组学分析结果

对鼠李糖乳杆菌发酵灵芝粉、原灵芝粉、发酵对照灵芝粉进行 UHPLC-QE-MS 非靶标代谢组学检测, 结果(图 2)发现 3 种样品的 UHPLC-QE-

MS 检测正离子模式 TIC 图的峰面积变化明显。经植物广靶代谢组学分析, 鼠李糖乳杆菌发酵灵芝粉与原灵芝粉相比, 其主要活性物质三萜、黄酮、有机酸及衍生物、有机氮化合物等物质的峰面积均增加, 维生素、酚类物质等物质的峰面积均减少。这一结果与前面测定活性物质含量的结果一致, 见表 3。

2.5 细胞增殖

CCK-8 法检测结果(图 3)显示: 3 种灵芝样品醇提物对 HepG₂ 细胞均有抑制作用。随着时间的

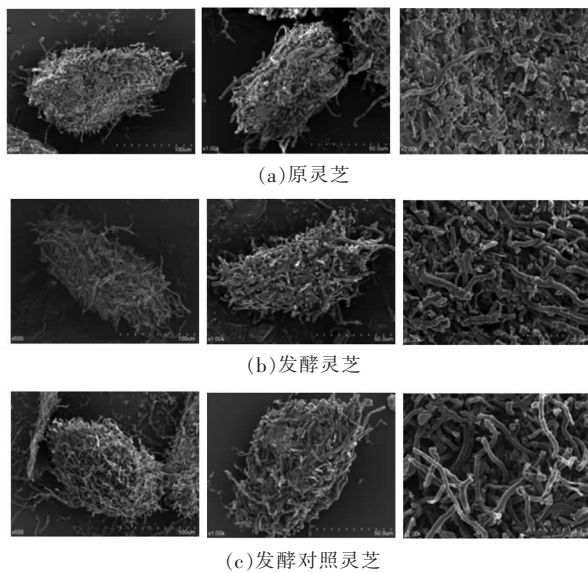


图1 样品的电镜扫描图
Fig.1 Sem of the sample

延长,3种醇提物的抑制率均增大,且同一浓度、同一时间条件下,与原灵芝醇提物以及发酵对照灵芝醇提物相比,发酵后的灵芝醇提物对 HepG₂ 细胞的抑制率最大。当干预质量浓度为 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$,干预时间为 24 h 时,发酵灵芝醇提物对细胞的抑制率为 49.47%,原灵芝醇提物对细胞的抑制率为 41.78%,发酵对照醇提物对细胞的抑制率为 37.35%。发酵前醇提物抑制率有显著差异 $P<0.05$ 。最终确定 3 种灵芝样品醇提物低、中、高 3 个质量浓度为 500,600,700 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.6 细胞迁移结果

采用细胞划痕法检测 3 种样品醇提物对 HepG₂ 细胞迁移能力的影响,结果显示,与空白对照组相比,3 种样品醇提物对细胞迁移的影响均呈药物浓度和时间依赖性。在不同时间点发酵

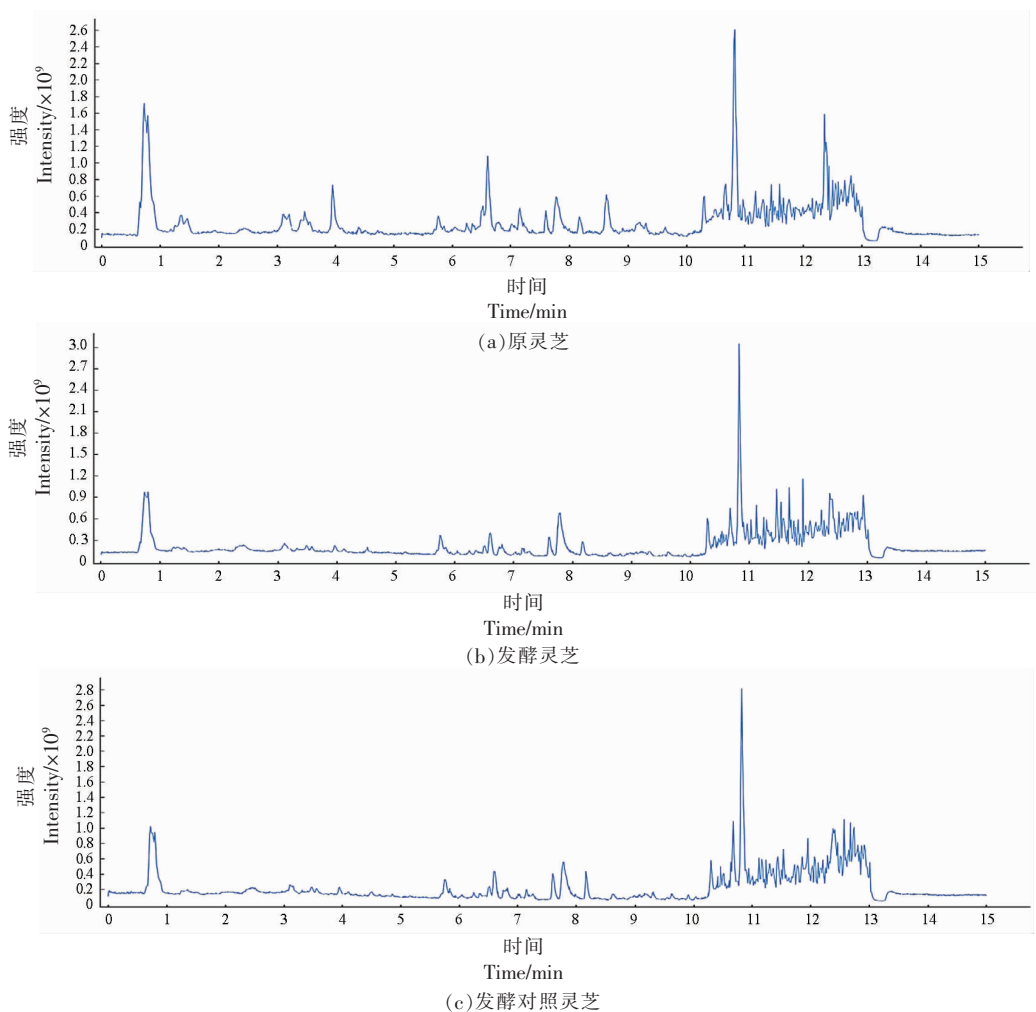


图2 样品 UHPLC-QE-MS 检测正离子模式下的 TIC 图
Fig.2 TIC pattern of positive ion detected by UHPLC-QE-MS

表 3 样品植物广靶代谢主要物质峰面积

Table 3 The peak area of the main substances in the broad target metabolism of the sample plants

CLASS_CH	发酵灵芝峰面积	原灵芝峰面积	峰面积差值
三萜	7 265 789.007	6 967 806.687	297 982.3201
糖类;有机氧化合物	22 630 232.29	14 538 355.07	8 091 877.227
黄酮;异黄酮	5 674 289.264	2 447 094.132	3 227 195.132
有机酸及衍生物	25 771 798.94	20 871 777.34	4 900 021.603
有机氮化合物	5 882 768.046	5 583 147.883	299 620.1632
木脂素	369 403.279	280 177.9075	89 225.37147
维生素类	4 843 600.143	8 191 226.732	-3 347 626.59
酚类;植物激素	33 847 716.98	85 154 726.83	-51 307 009.85
氨基酸及其衍生物	28 861 392.02	86 964 644.49	-58 103 252.47
生物碱;植物激素	95 247 310.75	146 735 887.7	-51 488 576.93

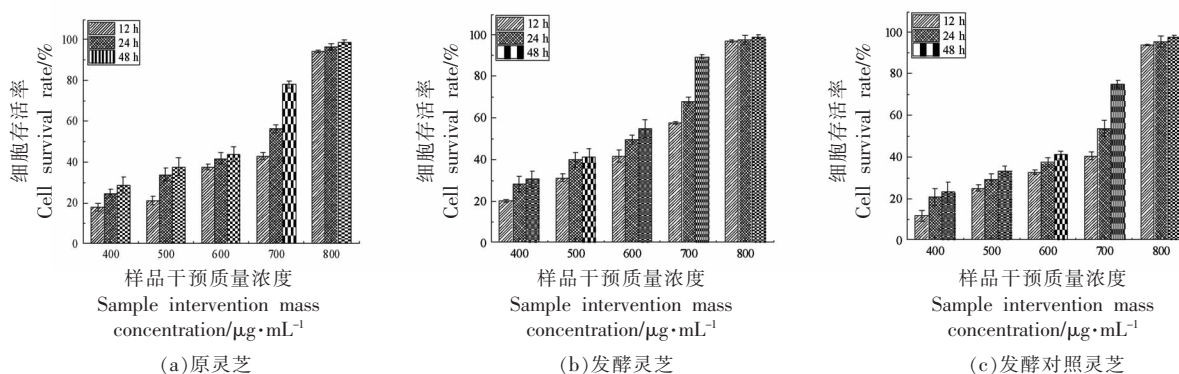
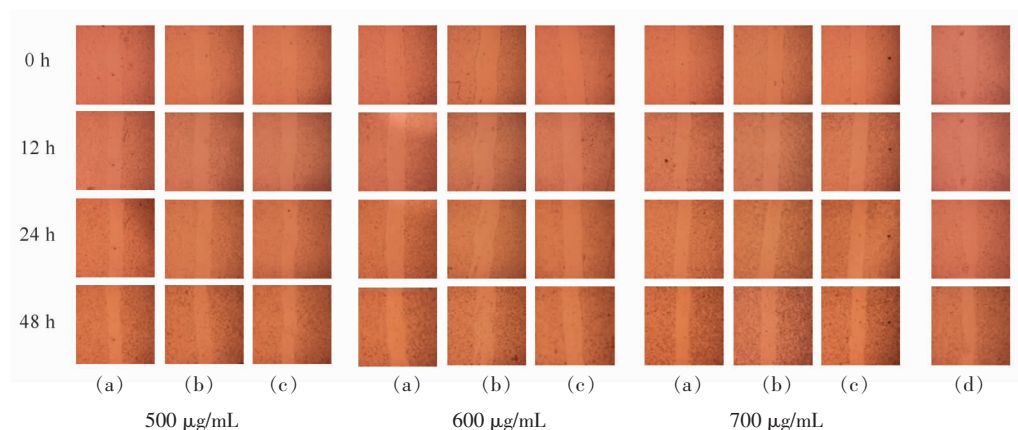


图 3 灵芝样品醇提取物对 HepG₂ 细胞增殖的抑制作用

Fig.3 Inhibitory effect of alcohol extract of *Ganoderma lucidum* on proliferation of HepG₂ cells

灵芝醇提取物作用于细胞时的愈合率均低于原灵芝醇提取物,且具有显著性差异 $P < 0.05$,说明益生菌发

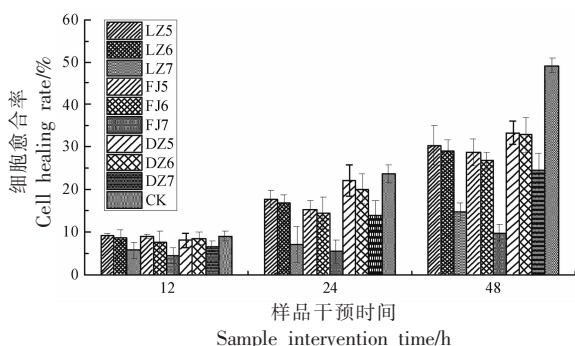
酵灵芝的醇提取物能够更好地抑制 HepG₂ 细胞的迁移,结果见图 4、图 5。



注:(a)原灵芝;(b)发酵灵芝;(c)发酵对照灵芝;(d)空白。

图 4 各组 HepG₂ 细胞划痕试验结果

Fig.4 Scratch test results of HepG₂ cells in each group



注:LZ:原灵芝;FJ:发酵灵芝;DZ:发酵对照灵芝;CK:空白;5,6,7分别为干预质量浓度500,600,700 $\mu\text{g/mL}$ 。

图5 各组 HepG₂ 细胞划痕愈合率

Fig.5 Scratch healing rate of HepG₂ cells in each group

2.7 细胞凋亡检测结果

通过 Hoechst 33258 检测经 3 种样品醇提取物干预后 HepG₂ 细胞的细胞核形态变化。结果显示,对照组细胞大小均匀,细胞核呈淡蓝色弱荧光,边缘光滑完整。3 种灵芝醇提取物干预后的细胞,细胞大小不均匀,细胞核均出现固缩、碎裂和荧光强度增强等凋亡现象,且均随着干预浓度的增加,细胞数量减少。观察发现,发酵灵芝醇提取物干预细胞后凋亡现象更加明显,在高、中、低干预浓度下的细胞核荧光强度均强于其它两种干预物,结果见图 6。

2.8 细胞凋亡基因表达量的 RT-PCR 分析结果

据报道,灵芝酸 A 可通过促进前列腺癌细胞 Bax、Caspase-3 和 AIFM1 蛋白的表达,进而促进前列腺癌细胞 LNCaP 凋亡^[18]。灵芝多糖可通过促进 Bax 基因表达,抑制 Bcl-2 基因表达,增强肿瘤细胞凋亡敏感性,进而有效抑制胃癌细胞在体外的增殖,促进胃癌细胞的凋亡^[19]。本文采用 RT-PCR 法测定 3 种灵芝醇提取物干预细胞后细胞凋亡相关基因的表达量,结果显示,干预细胞后 Bax、Cyclin-A、CDK-2、P21、P53 这 5 个基因的相对表达量均随干预浓度的增加而升高,而 Bcl-2 基因的相对表达量随干预浓度的增加而降低,且浓度越高,效果越明显。与原灵芝醇提取物相比,发酵灵芝醇提取物干预细胞后 Bax、Cyclin-A、CDK-2、P21、P53 基因的相对表达量明显升高 ($P < 0.05$), Bcl-2 基因的相对表达量明显降低。说明 3 种灵芝醇提取物均可促进 HepG₂ 细胞的凋亡,且发酵灵芝醇提

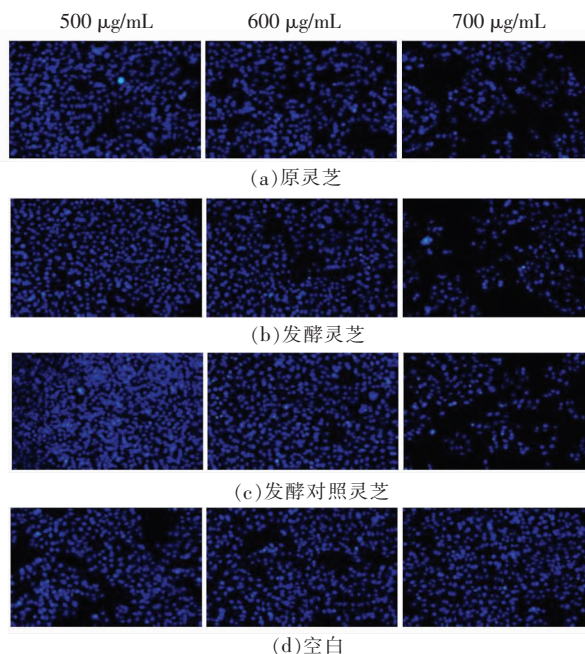


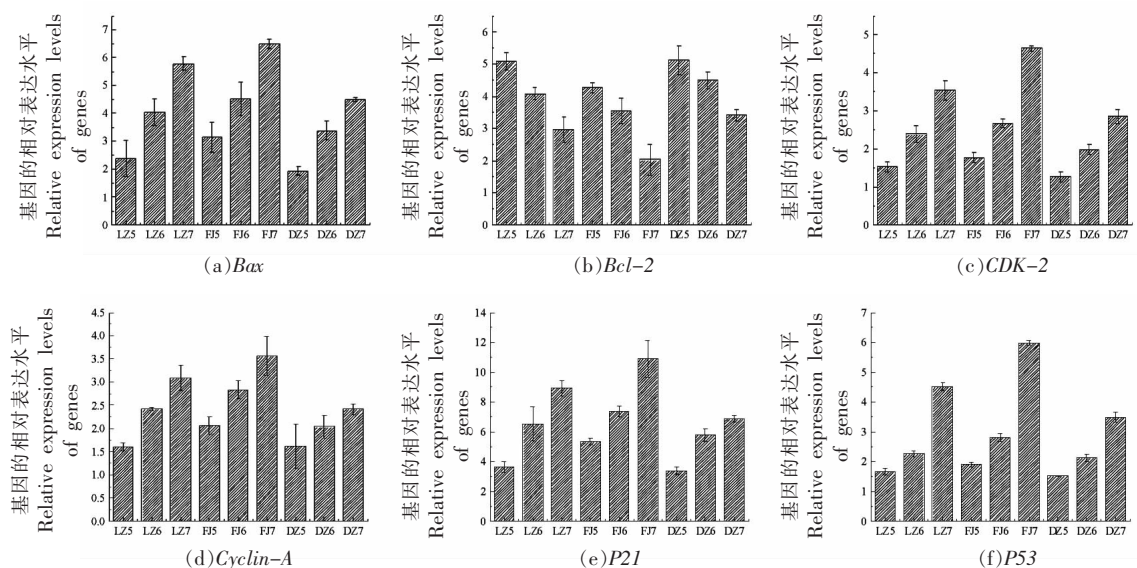
图6 各组 HepG₂ 细胞 Hoechst 33258 染色结果

Fig.6 Hoechst 33258 staining results of HepG₂ cells in each group

物促进 HepG₂ 细胞的凋亡作用更强,结果见图 7。

3 结论

本文以鼠李糖乳杆菌发酵灵芝粉,以原灵芝粉和发酵对照灵芝粉作为对照,通过测定灵芝中三萜类化合物、多糖、黄酮 3 种主要活性物质的含量发现,发酵后的灵芝粉中这 3 种主要活性物质含量均增加。发酵后灵芝醇提取物的 ABTS 阳离子自由基、DPPH 自由基清除能力以及亚铁离子螯合能力均增强,且有显著性变化,这可能与三萜类化合物、黄酮含量的增加有关。为进一步验证鼠李糖乳杆菌发酵对灵芝中活性物质的影响,进行植物代谢组学测定,结果显示,鼠李糖乳杆菌发酵灵芝与其它两种样品相比,UHPLC-QE-MS 检测正离子模式 TIC 图的峰面积有显著性差异,且三萜类物质、黄酮类物质的峰面积与原灵芝相比显著增加。以上结果表明鼠李糖乳杆菌发酵可以增加灵芝中主要活性物质的含量,推测是鼠李糖乳杆菌在发酵过程中生长代谢产生的酶使灵芝细胞壁被破坏,细胞壁的纤维素、半纤维素和木质素被微生物分解,存在于细胞胞浆中的活性物质被释放,并



注:LZ:原灵芝;FJ:发酵灵芝;DZ:发酵对照灵芝;5,6,7 分别为干预质量浓度 500,600,700 $\mu\text{g/mL}$ 。

图 7 各组 HepG₂ 细胞 PCR 结果

Fig.7 PCR results of HepG₂ cells in each group

且发酵灵芝的菌丝结构解体、破碎,表面结构更加粗糙。

细胞试验结果显示,3 种样品灵芝醇提取物都具有良好的抑制 HepG₂ 细胞增殖作用和阻滞 HepG₂ 细胞迁移的能力。Hoechst 33258 染色结果显示细胞均出现凋亡现象,且鼠李糖乳杆菌发酵灵芝醇提取物作用效果更强。经 PCR 试验验证了鼠李糖乳杆菌发酵后的灵芝醇提取物干预细胞,使促进细胞凋亡相关基因 *Bax*、*Cyclin-A*、*CDK-2*、*P21*、*P53* 显著上调,抑制细胞凋亡相关基因 *Bcl-2* 显著下调。有研究发现,灵芝三萜可通过 Wnt/ β -catenin 信号通路调节下游靶标表达,从而调节细胞周期,引起细胞凋亡^[20],因此,结合本文试验结果,推测鼠李糖乳杆菌发酵灵芝提高了具有抑癌作用的灵芝三萜类化合物、黄酮含量进而通过增强对 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响来抑制 HepG₂ 细胞增殖,促进细胞凋亡。

综上,鼠李糖乳杆菌发酵灵芝可以提高灵芝主要活性物质三萜类化合物、多糖、黄酮质的含量,并且发酵灵芝其醇提取物对 HepG₂ 细胞的抑制作用更强。

参 考 文 献

- [1] 李亚东,张红霞,张亚霞.肝癌的表观遗传学研究进展[J].生命的化学,2021,41(8):1763-1769.
LI Y D, ZHANG H X, ZHANG Y X. Advances in epigenetics of hepatocellular carcinoma[J]. Chemistry of Life, 2021, 41(8): 1763-1769.
- [2] 刘强,李健和.中草药作为细胞凋亡诱导剂用于癌症治疗的研究进展[J].中南药学,2017,15(6):803-806.
LIU Q, LI J H. Chinese herbal medicines as apoptosis inducers for cancer treatment[J]. Central South Pharmacy, 2017, 15(6): 803-806.
- [3] 李秋月,林连兵,杨雪娇,等.微生物发酵中草药的研究现状[J].微生物学通报,2021,48(6):2232-2244.
LI Q Y, LIN L B, YANG X J, et al. Research status of microbial fermentation of Chinese herbal medicine[J]. Microbiology China, 2021, 48(6): 2232-2244.
- [4] 李艳,周剑,何东贤,等.微生物转化在现代中药研发中的应用[J].中国抗生素杂志,2020,45(5):418-422.
LI Y, ZHOU J, HE D X, et al. Application of mi-

- crobial transformation in the research of modern traditional Chinese medicine[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2020, 45(5): 418-422.
- [5] 刘高强. “瑞草”灵芝之现代研究[J]. 菌物学报, 2020, 39(1):1-6.
LIU G Q. The modern research on *Ganoderma lingzhi* (China "Ruicao")[J]. Mycosystema, 2020, 39(1): 1-6.
- [6] JI Z, TANG Q J, ZHANG J S, et al. Immunomodulation of RAW264.7 macrophages by GLIS, a proteopolysaccharide from *Ganoderma lucidum*[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2007, 112(3): 445-450.
- [7] REN L, ZHANG J, ZHANG T H. Immunomodulatory activities of polysaccharides from *Ganoderma* on immune effector cells [J]. Food Chemistry, 2021, 340: 127933.
- [8] AHMAD M F. *Ganoderma lucidum*: Persuasive biologically active constituents and their health endorsement[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018, 107: 507-519.
- [9] LIU J Q, LIAN C L, HU T Y, et al. Two new farnesyl phenolic compounds with anti-inflammatory activities from *Ganoderma duripora*[J]. Food Chemistry, 2018, 263: 155-162.
- [10] WANG X M, WANG B, ZHOU L Q, et al. *Ganoderma lucidum* put forth anti-tumor activity against PC-3 prostate cancer cells via inhibition of Jak-1/STAT-3 activity[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2020, 27(10): 2632-2637.
- [11] ADEYI A O, AWOSANYA S A, ADEYI O E, et al. *Ganoderma lucidum* ethanol extract abrogates metabolic syndrome in rats: *In vivo* evaluation of hypoglycemic, hypolipidemic, hypotensive and antioxidant properties[J]. Obesity Medicine, 2021, 22: 100320.
- [12] 徐锦, 汪雯翰, 杨妍, 等. 乙醇浓度对提取灵芝三萜含量的影响及提取物抗前列腺癌细胞 LNCaP 的活性[J]. 菌物学报, 2020, 39(1): 155-163
XU J, WANG W H, YANG Y, et al. Effects of ethanol concentration on the content of triterpenoids extracted from *Ganoderma lucidum* and the activity of the extracts against prostate cancer cells LNCaP [J]. Journal of Mycology, 2020, 39(1): 155-163.
- [13] 刘宇, 苏海国, 周勤梅, 等. 不同种的灵芝醇提物对肝癌细胞增殖的抑制作用[J]. 食用菌学报, 2018, 25(2): 121-125.
LIU Y, SU H G, ZHOU Q M, et al. Inhibitory effect of ethanol extracts of seven ganodermataceae species on the proliferation of human hepatoma cell line[J]. Acta Edible Fungi, 2018, 25(2): 121-125.
- [14] 中华人民共和国农业部. 食用菌中粗多糖含量的测定: NY/T 1676-2008[S]. 北京: 中国农业出版社, 2008: 1-3.
Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Determination of rough polysaccharides in edible bacteria: NY/T 1676-2008[S]. Beijing: China Agricultural Publishing House, 2008: 1-3.
- [15] 王昌涛, 孙啸涛, 周雪. 响应面分析法优化雪灵芝黄酮提取工艺[J]. 食品科学, 2013, 34(14): 91-95.
WANG C T, SUN X T, ZHOU X. Optimization of extraction process for flavonoids from *Arenaria kansuensis* Maxim. by response surface methodology[J]. Food Science, 2013, 34(14): 91-95.
- [16] 贾雨朦, 陈芹芹, 毕金峰, 等. 滁菊的功能成分及其体外抗氧化活性[J]. 食品科学, 2019, 40(23): 66-72.
JIA Y M, CHEN Q Q, BI J F, et al. Functional components and *in vitro* antioxidant activity of chrysanthemum flower[J]. Food Science, 2019, 40(23): 66-72.
- [17] 陈佳歆, 周沫, 毕金峰, 等. CO₂脱涩对柿果理化特性、酚类成分及抗氧化能力的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(13): 28-35.
CHEN J X, ZHOU M, BI J F, et al. Effects of CO₂ destringency on the physicochemical properties, phenolic components, and antioxidant capacity of persimmon fruits [J]. Food Science, 2019, 40(13): 28-35.
- [18] 徐宾, 贾薇, 王忠, 等. 灵芝酸 A 对前列腺癌 LNCaP 细胞的生长抑制作用及机制[J]. 菌物学报, 2019, 38(5): 717-727.
XU B, JIA W, WANG Z, et al. The effect and mechanism of ganoderic acid A (GA-A) inhibiting the growth of prostate cancer LNCaP cells[J]. Journal of Mycology, 2019, 38(5): 717-727.
- [19] 邢会军, 侯雷, 孙勇, 等. 灵芝多糖对小鼠胃肿瘤活性的体内外抑制作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(13): 116-120.
XING H J, HOU L, SUN Y, et al. Anti-gastric tumor effect of ganoderma polysaccharides *in vitro* and *in vivo*[J]. Chinese Journal of Experimental Formulas, 2017, 23(13): 116-120.

- [20] 蔡蕤. 灵芝三萜通过 Wnt/ β -catenin 信号通路对肝癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中成药, 2020, 42(5): 1320–1324.
- CAI R. The effect of *Ganoderma lucidum* triterpenes on the proliferation and apoptosis of liver cancer cells through the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. Chinese Patent Medicine, 2020, 42(5): 1320–1324.

The Changes of Main Active Substances of *Ganoderma lucidum* Fermented by *Lactobacillus rhamnosus* and the Inhibitory Effect of Alcohol Extracts on HepG₂ Cells

Wu Ming, Li Mei, Zhou Zhongkai*

(College of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457)

Abstract In order to explore the changes of main active substances in *Lactobacillus rhamnosus* fermentation of *Ganoderma lucidum* fruitum powder and its inhibitory effect on hepatoma cell HepG₂, a solid fermentation method was used to prepare the fermented *Ganoderma lucidum* fruitum powder with *Lactobacillus rhamnosus* as fermentation strain and *Ganoderma lucidum* fruitum powder as fermentation substrate, and its main active ingredients and antioxidant capacity were studied. Plant metabolomics of *Ganoderma lucidum* fruitum powder was determined and its surface structure was observed by scanning electron microscopy. The inhibitory effect of *Ganoderma lucidum* alcohol extract on hepatocellular carcinoma cells was detected by CCK-8 method. The effect of *Ganoderma lucidum* alcohol extract on hepatocellular carcinoma cell migration was detected by cell scratch method. Hoechst 33258 detected the effect of *Ganoderma lucidum* alcohol extract on cell nucleus and verified the apoptosis effect. The expression of apoptosis-related genes in HepG₂ cells was analyzed by PCR. The results showed that the contents of triterpenoids and polysaccharides were 4.075 mg/g, 2.347 g/100g and 4.604 mg/g respectively compared with those before fermentation. The antioxidant capacity of *Lactobacillus rhamnosus* fermented *Ganoderma lucidum* powder was significantly improved compared with the original *Ganoderma lucidum* powder and fermented control *Ganoderma lucidum* powder. The results of plant metabolomics showed that the material composition and peak area of the three samples were significantly different. Cell test results showed that the ability of fermented *Ganoderma lucidum* alcohol extract to inhibit HepG₂ cell growth and block cell migration was significantly increased, and the apoptosis was more significant in Hoechst 33258 results. PCR test confirmed that the intervention of fermented *Ganoderma lucidum* alcohol extract significantly up-regulated the apoptosis-related genes *Bax*, *Cyclin-A*, *CDK-2*, *P21* and *P53*, and significantly down-regulated the apoptosis-related genes *Bcl-2*. Conclusions: *Lactobacillus rhamnosus* fermentation of *Ganoderma lucidum* can increase the contents of main active substances, such as triterpenoids, polysaccharides and flavonoids of *Ganoderma lucidum*, and the ethanol extract of *Ganoderma lucidum* fermentation has stronger inhibitory effect on HepG₂ cells.

Keywords *Ganoderma lucidum*; HepG₂ cells; *Lactobacillus rhamnosus*; solid fermentation; alcohol extract