

基于 HepG2 细胞模型的褐赭色羊肚菌多酚抗氧化及抗增殖活性研究

卢可可¹, 谭玉荣¹, 郑少杰¹, 刘冬², 吴素蕊³, 明建¹

(1. 西南大学食品科学学院, 重庆 400715) (2. 深圳职业技术学院应用化学与生物技术学院, 广东深圳 518055)

(3. 中华全国供销合作总社昆明食用菌研究所, 云南昆明 650223)

摘要: 本实验研究了褐赭色羊肚菌游离酚和结合酚体内抗氧化能力以及对 HepG2 细胞的毒性和抗增殖作用。采用 HPLC 对褐赭色羊肚菌多酚组分进行鉴定, 测定多酚抗氧化能力指数 (ORAC); 以人肝癌细胞 HepG2 为模型, 测定多酚细胞抗氧化活性 (CAA) 及抗增殖活性 (EC₅₀ 值)。结果显示: 褐赭色羊肚菌游离酚和结合酚含量分别为 (4.27±0.07)、(0.14±0.01) mg GAE/g DW; 其 ORAC 值分别为 (4624.52±400)、(429.41±60) μmol TE/100 g DW; CAA 值分别为 (15.33±0.60)、(0.37±0.01) μmol QE/100 g DW (PBS 清洗) 和 (51.84±0.83)、(1.27±0.04) μmol QE/100 g DW (不经 PBS 清洗)。游离酚和结合酚浓度为 125 μg/mL 和 70 μg/mL 时, 对 HepG2 细胞增殖抑制率分别为 77.28%、66.31%, 且试验浓度范围内, 羊肚菌多酚对 HepG2 基本无细胞毒性。褐赭色羊肚菌多酚具有一定的细胞抗氧化及抗增殖活性, 可将褐赭色羊肚菌作为开发此类功能营养食品的原料, 为羊肚菌的进一步综合利用提供理论依据。

关键词: 褐赭色羊肚菌; 多酚; 抗氧化能力指数 (ORAC); 细胞抗氧化活性 (CAA); 抗增殖

文章编号: 1673-9078(2015)12-6-13

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.12.002

Antioxidant and Antiproliferative Activities of Polyphenols in *Morchella umbrina* Boud on the HepG2 Cell Model

LU Ke-ke¹, TAN Yu-rong¹, ZHENG Shao-jie¹, LIU Dong², WU Su-rui³, MING Jian¹

(1.College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China) (2.School of Applied Chemistry and Biological Technology, Shenzhen Polytechnic, Shenzhen 518055, China) (3.Kunming Research Fungi Institute of All China Federation of Supply and Marketing Cooperatives, Kunming 650223, China)

Abstract: The *in vivo* antioxidant capacity of free and bound phenols in *Morchella umbrina* Boud. and their toxic and antiproliferative effects on HepG2 cells were investigated in this study. The polyphenolic components in *Morchella umbrina* Boud were identified by high performance liquid chromatography (HPLC), in addition to measuring the oxygen radical absorption capacity (ORAC). The human liver cancer cell line HepG2 was used as a model to measure cellular antioxidant activity (CAA) and antiproliferative activity (EC₅₀ value). The results showed that the free phenol and bound phenol content of *Morchella umbrina* Boud was (4.27 ± 0.07) mg GAE/g DW and (0.14 ± 0.01) mg GAE/g DW, respectively. The ORAC values of free phenol and bound phenols were (4624.52 ± 400) and (429.41 ± 60) μmol TE/100 g DW, respectively. The corresponding CAA values with PBS washing were 15.33 ± 0.60 and 0.37 ± 0.01 μmol QE/100 g DW, respectively. The corresponding CAA values without PBS washing were 51.84 ± 0.83 and 1.27 ± 0.04 μmol QE/100 g DW, respectively. HepG2 cell proliferation was inhibited at a ratio of 77.28% and 66.31% at 125 μg/mL for free phenol and 70 μg/mL for bound phenol, respectively. In addition, within the concentration range of the experiment, the polyphenols from *M. umbrina* Boud generally showed no cytotoxicity to HepG2 cells. These results indicate that the polyphenols in *M. umbrina* Boud have certain antioxidant and antiproliferative effects. Thus, *M. umbrina* Boud could be used as a raw material to develop related types of functional foods. This study provides a theoretical basis for further utilization of *M. umbrina* Boud.

Key words: *Morchella umbrina* Boud.; polyphenols; oxygen radical absorbance capacity (ORAC); cellular antioxidant activity (CAA); anti-proliferation

收稿日期: 2015-03-13

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31471576); 十二五国家科技支撑计划 (2013BAD16B01)

作者简介: 卢可可 (1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品化学与营养学

通讯作者: 明建 (1972-), 男, 博士, 教授, 研究方向为食品化学与营养学

褐赭色羊肚菌 (*Morchella umbrina* Boud.), 隶属于子囊菌门 (*Ascomycota*) 子囊菌纲 (*Ascomycetes*) 盘菌目 (*Pezizales*) 羊肚菌科 (*Morchellaceae*) 羊肚菌属 (*Morchella*), 是我国常见羊肚菌品种之一, 主要分布于四川、云南、甘肃等地。具有较高的营养价值和保健功能, 不仅富含蛋白质、维生素、微量元素等, 还含有多糖、多酚等功能活性成分^[1]。研究表明羊肚菌具有抗氧化^[2]、抗肿瘤^[3]、保护肝脏^[4]和提高免疫活性^[5]等生物活性。目前, 关于多酚抗氧化活性测定方法是化学分析法, 如 DPPH 自由基清除法、铁还原力 (FRAP) 法、羟自由基清除力 (PSC) 法、总氧自由基清除力 (TOAC) 法、亚油酸氧化法、ABTS 自由基清除法以及氧化自由基吸收能力法 (ORAC) 等。由于这些方法是在非生理性的环境条件下 (温度、pH 等) 进行的, 基本未考虑抗氧化剂在体内的生物利用率和在细胞中的吸收代谢情况, 以上方法不能准确体现其抗氧化能力。Liu^[6]等建立的细胞抗氧化活性 (cellular antioxidant activity, CAA) 测定方法, 本身无荧光的指示剂 2',7'-二氯荧光素双乙酸盐 (DCFH-DA) 进入细胞内, 细胞酯酶分解 DCFH-DA 形成极性更强的还原型二氯荧光素 (DCFH), 再用 2,2'-偶氮二异丁基脒二盐酸盐 (ABAP) 处理细胞, ABAP 分散在细胞中并自发分解形成过氧化自由基 ROO*, ROO* 攻击细胞膜产生更多自由基或活性氧 (reactive oxygen species, ROS)。自细胞内的 DCFH 极易被 ROS 氧化成荧光物氧化型二氯荧光素 (DCH), 荧光物 DCH 可通过分光光度法测定。抗氧化剂可在细胞膜外部结合 ROS 而阻止其进入细胞, 或者在细胞膜内部与 ROS 和 ROO* 结合而阻断 DCFH 氧化成 DCF, 从而减少 DCF 的形成。CAA 方法测定抗氧化剂阻止人体 HepG2 癌细胞中 ABAP 产生的氧自由基导致 DCF 形成的能力, 与对照组相比, 细胞荧光物质的减少量就能反映该化合物的抗氧化能力。CAA 法比化学法更具有生理性, 又比动物试验周期短、操作简单, 是一种相对较为科学合理的抗氧化评价方法。目前虽然有研究发现宽圆羊肚菌、小羊肚菌、尖顶羊肚菌等七种羊肚菌中有较高的多酚含量并证明其具有一定的化学抗氧化能力^[7]。但对褐赭色羊肚菌多酚的细胞抗氧化活性和抗增殖作用的研究罕见报道。本试验以我国云南产地的褐赭色羊肚菌为原料, 以人肝癌细胞 HepG2 为模型, 分析羊肚菌多酚细胞抗氧化能力 (CAA 值) 和抗增殖作用 (EC₅₀ 值), 从细胞层面上对羊肚菌多酚抗氧化能力和抗增殖能力进行科学合理评价与分析。为羊肚菌功能活性及营养保健价值研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

褐赭色羊肚菌 (*Morchella umbrina* Boud.), 购自中华全国供销合作总社昆明食用菌研究所。

人肝癌细胞 HepG2, 购自美国菌种保藏中心 (American Type Culture Collection)。

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH)、2,2-联氨基-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸) 二氨盐 (ABTS)、荧光素钠盐 (fluorescein disodium salt, FL)、6-羟基-2,5,7,8-四甲基色烷-2-羧酸 (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, Trolox)、2',7'-二氯荧光素双乙酸盐 (DCFH-DA)、胰岛素 (分析纯)、槲皮素 (色谱级) 购自美国 Sigma 公司; 2,2'-偶氮二异丁基脒盐酸盐 (2,2'-azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride, ABAP)、WME 培养基 (生化试剂) 购自美国 Wako Chemicals; 抗生素、胰酶、胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS)、平衡盐溶液 (Hanks Balanced Salt Solutions, HBSS)、DMEM 培养基、氢化可的松、抗菌-抗真菌剂、邻二氮菲 (生化试剂) 购自 invitrogen 公司; 甲醇 (色谱级) 购自天津四友精细化学品有限公司; 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

CS101 型电热鼓风干燥箱: 重启仪器设备厂; JYL-A110 粉碎机: 上海恒平科学仪器有限公司; HH-6 数显恒温水浴锅: 金坛市富华仪器有限公司; VDRTEX-5 漩涡振荡器: 林贝尔仪器制造有限公司; XHF-D 均质机: 宁波新芝生物科技股份有限公司; RE-52AA 旋转蒸发器 and SHZ-III 循环水真空泵: 上海亚荣生化仪器厂; 5810 型台式高速离心机: 德国 Eppendorf 公司; DF8517 冰箱 (-80 °C): 韩国 ilshin 公司; 722 分光光度计: 上海精科科学仪器厂; PB-10 pH 计: 德国赛多利斯公司; SpectraMax M2 多功能酶标仪: 美国 Molecular 公司; DC300 显微镜: 德国 Leica 公司; BCM-1000A 超净工作台: 苏净集团安泰公司; SS-325 高压蒸汽灭菌锅: 上海申安医疗器械; 240 型 CO₂ 细胞培养箱: Thermo Scientific 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 材料预处理

褐赭色羊肚菌采摘后 12 h 内冻藏于 -20 °C, 实验前取出自然解冻后, 于 50 °C 烘箱烘至恒重, 用中

药粉碎机粉碎, 过 80 目筛后密封备用。

1.3.2 羊肚菌多酚的提取

1.3.2.1 游离酚的提取^[8]

准确称取 2.00 g 样品于 100 mL 离心管中, 按料液比 1:25 (*m/V*) 加入 80% 的-4 °C 预冻丙酮溶液, 均质 2 min 后充分搅拌提取 10 min。于 2500×g 下离心 10 min, 取上清液。残渣重复提取一次, 合并上清液, 抽滤后于 45 °C 浓缩蒸干, 用甲醇定容至 25 mL。过 0.45 μm 有机滤膜后贮于-80 °C 下保存备用。

1.3.2.2 结合酚的提取^[8]

收集游离酚提取后的残渣, 按料液比 1:10 (*m/V*) 加入 2 mol/L NaOH 溶液, 室温震荡消化 1.5 h, 再用浓盐酸调至 pH 2 左右。加入正己烷 25 mL, 放置 10 min 后离心, 除去脂肪层。加入 20 mL 乙酸乙酯并充分搅拌提取 10 min, 2500×g 下离心后取上清液, 重复提取 5 次 (每次离心加大离心率 500×g), 合并上清液, 抽滤后于 45 °C 旋转蒸干, 用甲醇定容至 10 mL。过 0.45 μm 有机滤膜后贮于-80 °C 备用。

1.3.3 多酚含量测定

没食子酸标准曲线制作: 分别配制 0、20、100、150、200、300、400、500、600 μg/mL 的没食子酸标准液。取 200 μL 标准液加入试管中, 再依次加入 800 μL 去离子水、200 μL 福林-酚试剂, 振荡试管使样品充分混合, 避光保存 6 min, 再加入 2 mL 7% Na₂CO₃ 溶液和 1.6 mL 去离子水, 在避光条件下放置 90 min 后于 760 nm 测定吸光值。以多酚浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程为: $y=0.0043x+0.0168$ ($R^2=0.9983$)。

羊肚菌多酚含量测定: 采用福林-酚法, 取 200 μL 提取液 (可作适当稀释) 并用去离子水补至 1 mL, 后续操作同标准曲线的制备。结果以每克羊肚菌样品中所含的没食子酸当量 (mg gallic acid equivalent / g dry-weight basis, mg GAE/g DW) 表示。每个样品做 3 组平行, 结果表示为平均值±标准偏差。

1.3.4 HPLC 测定羊肚菌多酚组成成分

参照 Liang 等人方法做适当修改^[9]: 将多酚提取物和多酚标准品 (没食子酸、原儿茶酸、对羟基苯甲酸、儿茶素、绿原酸) 经 0.45 μm 有机滤膜过滤后用 LC-20A HPLC (日本岛津公司) 检测, 流动相 A 为 0.2% 甲酸; 流动相 B 为 100% 乙腈; 梯度洗脱程序为 0~5 min, 10% B; 5~25 min, 10%~40% B; 25~35 min, 40%~90% B; 35~40 min, 90% B; 40~45 min, 90%~10% B; 45~50 min, 10% B。色谱柱为 Thermo BDS C₁₈ 反相柱 (250 × 4.6 mm i.d.), 粒径 5 μm; 流速: 0.7 mL/min; 进样量: 8 μL; 柱温: 40 °C; 检测波长 280 nm。

1.3.5 羊肚菌多酚化学抗氧化活性测定

1.3.5.1 DPPH 清除率测定

参考 Cheung^[10]的方法测定。按式 (1) 计算样品的 DPPH 清除率 (%):

$$DPPH^+ \text{清除率}(\%) = (1 - \frac{A_i}{A_j}) \times 100 \quad (1)$$

式中, A_i 为不同浓度提取液的吸光值, A_j 为甲醇空白试剂的吸光值。

1.3.5.2 还原力测定

参考 Ardestani^[11]的方法测定。

1.3.5.3 ABTS⁺清除率测定

参考 Soong^[12]的方法测定。按式 (2) 计算样品的 ABTS⁺清除率 (%):

$$ABTS^+ \text{清除率} = (1 - \frac{A_i}{A_j}) \times 100 \quad (2)$$

式中, A_i 为不同浓度提取液的吸光值, A_j 为甲醇空白试剂的吸光值。

本试验引入半数抑制率 EC₅₀ 值作为 DPPH、还原力和 ABTS⁺清除能力大小的评价标准, EC₅₀ 值越小, 说明抗氧化剂的抗氧化效果越好。

1.3.5.4 抗氧化能力指数 (ORAC) 值测定

参考 Wolfe^[8]的方法测定。根据测定值计算 ORAC 值, 按式 (3) 计算荧光衰减曲线下的面积 (AUC)、式 (1-4) 计算 ORAC 值:

$$AUC = (0.5 \times f_1/f_1 + f_2/f_1 + f_3/f_1 + \dots + f_n/f_1 + \dots + f_{30}/f_1 + 0.5 \times f_{30}/f_1) \times CT \quad (3)$$

$$ORAC \text{ 值} = [(AUC_{\text{sample}} - AUC_{\text{ABAP}}) / (AUC_{\text{Trolox}} - AUC_{\text{ABAP}})] \times (\text{摩尔浓度}_{\text{Trolox}} / \text{摩尔浓度}_{\text{sample}}) \times 100 \quad (4)$$

式中, f_i 为第一次荧光读数; f_i 为第 i 次荧光读数; CT 为间隔测定时间。最终的 ORAC 值表示为 μmol TE/100 g DW。

1.3.6 羊肚菌多酚细胞抗氧化活性 (CAA) 测定

参考 Wolfe^[6,8]的方法测定。取 12~35 代之间的 HepG2 细胞接种至 96 孔板中, 每孔 100 μL 生长培养基 (每孔细胞数约为 6×10^4 个), 于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 h, 移去培养基, 用 100 μL PBS 清洗每个接种孔。然后每孔加入 100 μL 不同浓度含有 DCFH-DA 工作液的槲皮素标准品或多酚提取物, 于相同条件下继续培养 1 h 后, 用 100 μL PBS 清洗每个孔, 对于不经 PBS 清洗试验, 此时则不加 PBS 清洗。除去 PBS (经 PBS 清洗) 或者被测液 (不经 PBS 清洗), 加入 100 μL ABAP 工作液, 空白则加入 100 μL 氧化剂处理培养基, 立即将 96 孔板置于酶标仪 (37 °C) 读板。于 538 nm 发射波长下 (激发波长=485

nm) 测定 60 min, 每 5 min 测定一次。对照组与处理组的荧光读数减去空白读数后, 用荧光随时间的曲线积分面积来计算标准品或多酚提取物每个浓度的 CAA 值。计算公式如下:

$$CAA_{unit} = 100 - \left(\frac{[SA]}{[CA]} \right) \times 10 \quad (5)$$

其中: [SA] 是样品荧光曲线积分面积, [CA] 是对照荧光曲线积分面积。

标准品和多酚提取物的半数有效浓度 (EC_{50}) 根据 $\log(fa/fu)$ 对 $\log(\text{浓度})$ 的线性关系算出, fa 是处理后被影响的部分 (CAA unit), 而 fu 是不受影响的部分 ($1 - CAA$ unit)。以槲皮素作为标准品, 由槲皮素和样品的 EC_{50} 值换算出 CAA 值, 用 μmol 槲皮素当量/100 g DW 表示。

1.3.7 羊肚菌多酚细胞毒性和抗增殖活性测定

1.3.7.1 细胞毒性测定

参考 Yang^[13] 的方法测定。取 12~35 代之间 HepG2 细胞接种至 96 孔板中, 每孔 100 μL 生长培养基 (每孔细胞数约为 4×10^4 个), 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 24 h, 移去培养基, 用 100 μL PBS 清洗每孔; 然后分别加入 100 μL 含不同浓度多酚提取物的培养基, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h, 移去培养基, 用 100 μL PBS 清洗每孔; 每孔加入 50 μL 亚甲基蓝溶液 (由 0.6% 亚甲基蓝、0.67% 戊二醛、98% HBSS 配制) 染色, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 1 h, 移去染液, 将板浸入去离子水中清洗三次直至水变清澈, 将孔中的水甩干; 向每孔中加 100 μL 洗脱液 (由 1% 醋酸、49% PBS、50% 乙醇配制), 旋转震荡 20 min, 使形成悬液。将 96 孔板置于酶标仪中于 570 nm 波长下测定吸光值。毒性计算方法: 与空白孔相比, 处理孔减小的吸光度与空白孔吸光度的比值即可代表此标准品或多酚提取物的细胞毒性大小, 当比值大于 10% 时, 判定有细胞毒性。

1.3.7.2 细胞抗增殖活性测定

参考 Yang^[13] 的方法测定。取 12~35 代之间 HepG2 细胞接种至 96 孔板中, 每孔 100 μL 生长培养基 (每孔细胞数约为 2.5×10^4 个), 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 24 h, 移去培养基, 用 100 μL PBS 清洗每孔; 然后加入 100 μL 含不同浓度多酚提取物的培养基, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 72 h 后测定。后续操作步骤同细胞毒性测定。细胞增殖率计算方法: 处理孔吸光值/空白孔吸光值的比值即为多酚提取物处理下的细胞增殖率。

1.4 数据处理

数据采用 Sigma Plot 12.5 统计分析, 实验重复 3 次, 结果用“平均值 \pm 标准差”表示, 并用 SPSS 软件进行统计处理, 采用 ANOVA 进行 Turkey 多重比较分析

($p < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 褐赭色羊肚菌多酚的含量及组成

褐赭色羊肚菌中, 总酚含量为 4.41 mg GAE/g DW, 其中游离酚含量为 (4.27 ± 0.07) mg GAE/g DW, 约占总酚的 96.83%, 结合酚含量为 (0.14 ± 0.01) mg GAE/g DW, 约占总酚的 3.13% (见表 1)。说明褐赭色羊肚菌中多酚以游离态为主。与平菇 (4.47 ± 0.22) mg GAE/g DW、香菇 (3.45 ± 0.13) mg GAE/g DW、硫磺菌 (3.39 ± 0.16) mg GAE/g DW、鸡肉丝菇 (9.39 ± 0.28) mg GAE/g DW 等食用菌^[14] 相比, 褐赭色羊肚菌总酚含量处于中等水平。

由 DAD 检测器 200~600 nm 波长扫描可得各色谱峰的光谱图, 由于多酚类物质在 280 nm 左右均有较大吸收, 因此实验选择检测波长为 280 nm。褐赭色羊肚菌多酚液相色谱图如图 1 所示, 根据峰面积和出峰时间与标准品对照, 得到褐赭色羊肚菌多酚的组成成分及各组分含量 (见表 1)。

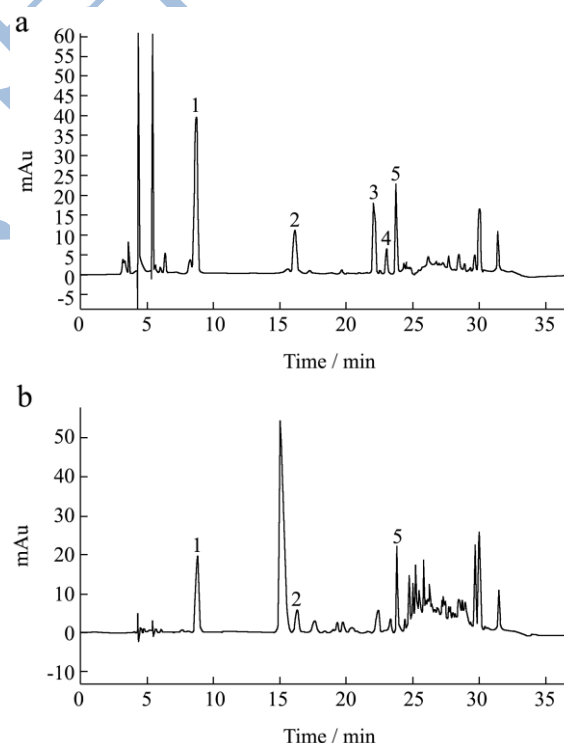


图 1 褐赭色羊肚菌多酚 HPLC 色谱图

Fig.1 Chromatograms of polyphenols in *Morchella umbrina* Boud

注: a: 游离酚; b: 结合酚。

由表可知, 游离酚主要由没食子酸、原儿茶酸、对羟基苯甲酸、儿茶素、绿原酸组成, 结合酚主要由没食子酸、原儿茶酸、绿原酸组成, 表明褐赭色羊肚

菌多酚组分主要为酚酸类,小部分为黄酮,与 Palacios 等^[1]研究食用菌多酚组成有类似结果。游离酚组分中,没食子酸含量最高,儿茶素含量最低;结合酚组分中,绿原酸含量最高,原儿茶酸含量最低。

2.2 褐赭色羊肚菌多酚化学抗氧化活性

褐赭色羊肚菌多酚的抗氧化能力如表 2 所示。游离酚和结合酚的 DPPH 清除力 EC_{50} 值分别为 $(0.55 \pm 0.03) \mu\text{g/mL}$ 、 $(0.04 \pm 0.01) \mu\text{g/mL}$, 远低于对照品抗坏血酸 $(20.45 \pm 1.05) \mu\text{g/mL}$, 表明褐赭色羊肚菌多

酚具有较强的 DPPH 清除能力,强于常用抗氧化剂抗坏血酸,结合酚 DPPH 清除力强于游离酚;ABTS⁺清除力和还原力呈现出类似的结果,结合酚抗氧化能力强于游离酚;但 ORAC 值显示游离酚的抗氧化能力指数 $(4624.52 \pm 400) \mu\text{mol TE}/100 \text{ g DW}$ 高于结合酚 $(429.41 \pm 60) \mu\text{mol TE}/100 \text{ g DW}$ 。游离酚和结合酚抗氧化效果不同,这可能与多酚的组成成分不同有关;同种多酚在不同的抗氧化体系中活性不尽相同,这可能与各化学抗氧化方法机理不同有关,也可能是由于多酚对不同测定方法的灵敏度不同造成的。

表 1 褐赭色羊肚菌多酚的含量及组成

Table 1 Content and composition of polyphenols in *Morchella umbrina* Boud

羊肚菌多酚	含量 (mg GAE/g DW)	组分含量/ $\mu\text{g/g}$				
		没食子酸	原儿茶酸	对羟基苯甲酸	儿茶素	绿原酸
游离酚	4.27 ± 0.07^a	978.33 ± 9.23	657.99 ± 12.14	659.35 ± 4.29	470.13 ± 9.65	773.91 ± 6.54
结合酚	0.14 ± 0.01^b	9.47 ± 0.24	5.49 ± 0.16	nd	nd	10.59 ± 0.28

注: a~b 表示同列中含量差异显著 ($p < 0.05$); nd 表示未检出。

表 2 褐赭色羊肚菌多酚化学抗氧化活性

Table 2 Chemical antioxidant activity of polyphenols in *Morchella umbrina* Boud

羊肚菌多酚	DPPH 清除力 EC_{50}	还原力 EC_{50}	ABTS ⁺ 清除力 EC_{50}	ORAC 值
	/ $\mu\text{g/mL}$	/ $\mu\text{g/mL}$	/ $\mu\text{g/mL}$	/ $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g DW}$
游离酚	0.55 ± 0.03	116.49 ± 0.02	3.91 ± 0.17	4624.52 ± 400
结合酚	0.04 ± 0.01	106.76 ± 0.01	3.17 ± 0.09	429.41 ± 60
对照 (抗坏血酸)	20.45 ± 1.05	12.42 ± 0.03	0.823 ± 0.03	-

2.3 褐赭色羊肚菌多酚细胞抗氧化 (CAA) 活性

细胞抗氧化能力测定采用了两种处理方法,分别为使用 PBS 清洗(PBS wash)和不使用 PBS 清洗(PBS no wash)。图 2 和图 3 显示了 HepG2 细胞中 ABAP 产生的过氧化氢自由基氧化 DCFH 的动力学曲线,分别为 PBS wash 和 PBS no wash。在两种方法中,羊肚菌多酚提取液和槲皮素标准品都抑制了 DCF 的生成,从而导致荧光值的减小,且浓度及作用时间与荧光值呈一定的相关性,即相同条件下,浓度越大,荧光值越低,随着作用时间增加,荧光值增大,说明羊肚菌多酚提取液和槲皮素标准品均具有一定的抗氧化活性,且有一定的量效关系。对比图 2 和 3 发现,槲皮素标准品抑制 DCF 生成的能力显著强于羊肚菌多酚提取液;两种方法中槲皮素标准品抑制 DCF 生成的能力没有显著变化,而对于羊肚菌多酚,则是 PBS no wash 中抑制 DCF 生成的能力显著强于 PBS wash。可能是由于羊肚菌多酚提取液中有一部分大分子物质,无法完全进入细胞,导致残留在细胞外的物质较多,当采

用 PBS wash 方法时,这部分物质被洗脱掉,因此抑制 DCF 生成的能力比 PBS no wash 方法要低。

游离酚和结合酚细胞抗氧化能力的 EC_{50} 值见表 3。在使用 PBS 清洗处理中,游离酚和结合酚的 EC_{50} 值分别为 $(85.13 \pm 1.92) \text{ mg/mL}$ 和 $(2550.59 \pm 100.29) \text{ mg/mL}$, 而不经 PBS 清洗处理中,游离酚和结合酚的 EC_{50} 值分别为 $(18.42 \pm 0.50) \text{ mg/mL}$ 和 $(758.39 \pm 37.59) \text{ mg/mL}$, 显著低于经 PBS 清洗处理 ($P < 0.05$), 且两种处理中结合型 EC_{50} 值均显著高于游离型。结合酚细胞抗氧化能力弱于游离酚,可能是由于酚类物质的抗氧化活性与其组成有关,而在液相色谱检测中发现结合酚物质组成比游离酚少且含量低,从而影响其抗氧化活性;另一方面,结合酚中多酚多与糖、蛋白质等大分子物质结合,分子更大,进入细胞内部的分子较少,一致经 PBS wash 方法中结合酚抗氧化活性更低。

褐赭色羊肚菌游离酚和结合酚抗氧化能力 (CAA 值) 如表 4 所示。在 PBS 清洗处理中,游离酚和结合酚的 CAA 值分别为 $(15.33 \pm 0.60) \mu\text{mol QE}/100 \text{ g DW}$ 、 $(0.37 \pm 0.01) \mu\text{mol QE}/100 \text{ g DW}$; 在不经 PBS 清洗处理中,游离酚和结合酚的 CAA 值分别为 $(51.84 \pm 0.83) \mu\text{mol QE}/100 \text{ g DW}$ 、 $(1.27 \pm 0.04) \mu\text{mol QE}/100 \text{ g DW}$,

两种处理下游离酚的 CAA 值均高于结合酚。经 PBS 清洗处理中的游离酚和结合酚的 CAA 值显著低于不经 PBS 清洗处理 ($p < 0.05$)。

样品浓度提高毒性增强。表明在样品浓度小于 125 $\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞增殖率下降主要是样品本身的抗增殖作用, 而浓度大于 125 $\mu\text{g/mL}$ 时, 则可能是样品细胞毒性和抗增殖的双重作用。

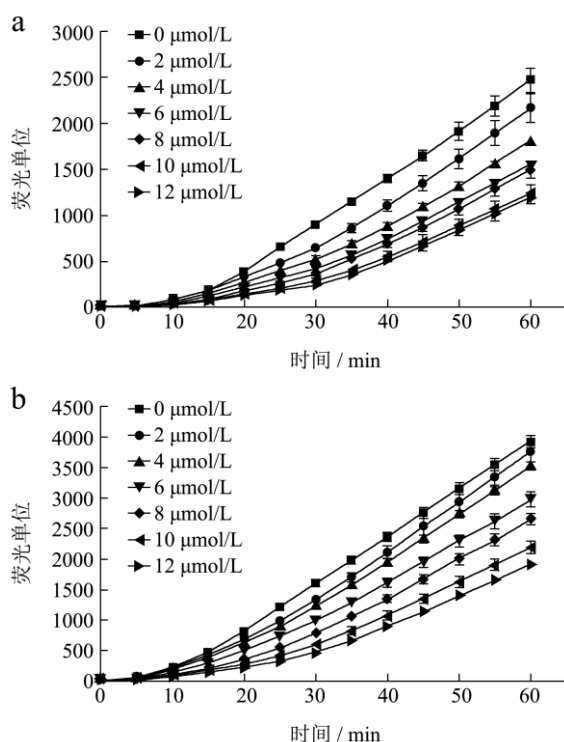


图2 槲皮素标准品对 HepG2 细胞 ABAP 产生的过氧化氢自由基氧化 DCFH 的动力学曲线

Fig.2 Kinetic curves of peroxyl radical (generated by ABAP in HepG2 cells that were treated with quercetin standard)-induced oxidation of DCFH

注: a 图为 PBS wash, b 图为 PBS no wash.

EC_{50} 值和 CAA 值呈负相关, 羊肚菌多酚 EC_{50} 值的变化规律与 CAA 值的变化规律正好相反, EC_{50} 值越小则 CAA 值越大, 说明细胞抗氧化活性越强, 所以游离酚细胞抗氧化活性高于结合酚; 是否使用 PBS 清洗对槲皮素标准品的细胞抗氧化结果无明显影响, 但对多酚的细胞抗氧化结果影响显著, 经 PBS 清洗处理的多酚细胞抗氧化活性低于不经 PBS 清洗处理的。

2.4 羊肚菌多酚的细胞抗增殖活性

褐赭色羊肚菌游离酚对人体肝癌细胞 HepG2 的抗增殖作用能力和细胞毒性作用能力如图 4 所示: 对照组的细胞增殖率为 100% 左右、没有显示细胞毒性, 表明细胞生长良好, 对照正常; 样品处理组随着多酚浓度从 0 提高到 150 $\mu\text{g/mL}$, 细胞增殖率从 100% 下降到 12.69%, 下降趋势明显, 而样品浓度大于 150 $\mu\text{g/mL}$ 后, 曲线趋向平衡; 当样品浓度小于 125 $\mu\text{g/mL}$ 时, 样品对细胞的毒性小于 10%, 可视为无毒性, 而当样品浓度大于 125 $\mu\text{g/mL}$ 时, 则显示出一定毒性, 且随

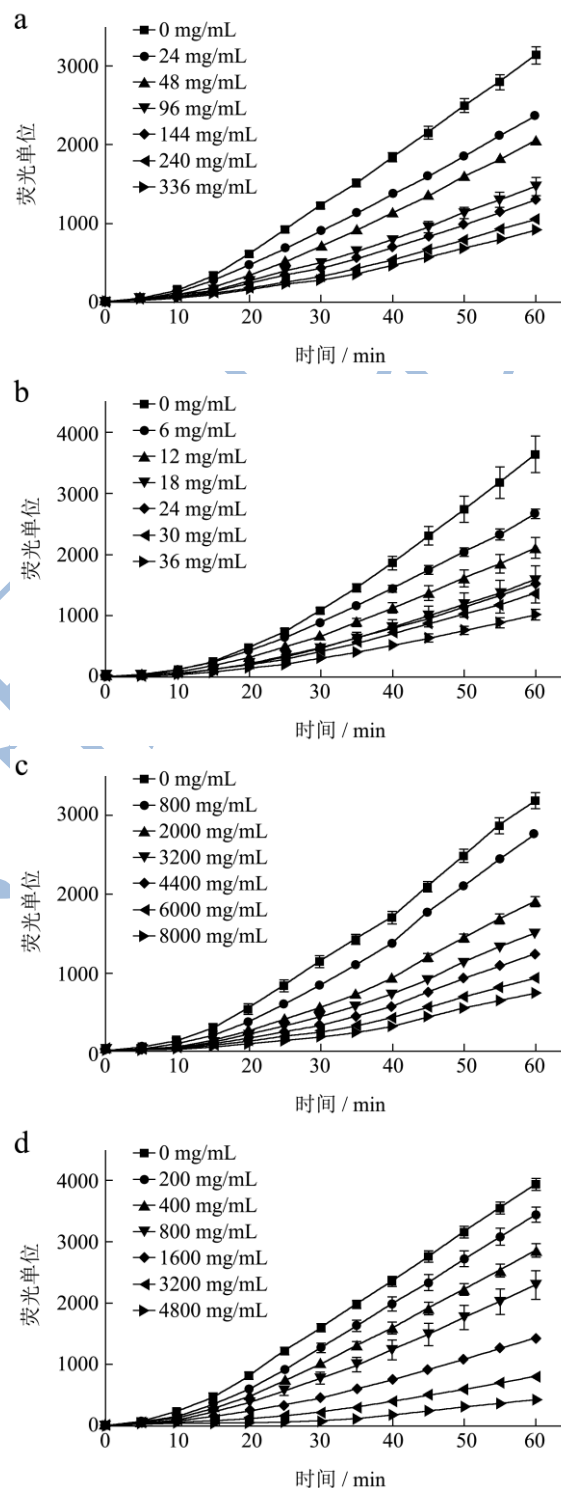


图3 褐赭色羊肚菌多酚对 HepG2 细胞 ABAP 产生的过氧化氢自由基氧化 DCFH 的动力学曲线

Fig.3 Kinetic curves of peroxyl radical (generated by ABAP in HepG2 cells that were treated with the polyphenols in *Morchella umbrina* Boud.)-induced oxidation of DCFH

注: a 图为游离酚 PBS wash; b 图为游离酚 PBS no wash; c 图为结合酚 PBS wash; d 图为结合酚 PBS no wash.

表 3 褐赭色羊肚菌多酚细胞抗氧化 EC₅₀ 值

Table 3 Variation in the EC₅₀ values of the polyphenols in *Morchella umbrina* Boud

	PBS 清洗的 EC ₅₀ 值/(mg/mL)			不经 PBS 清洗的 EC ₅₀ 值/(mg/mL)		
	平均值	标准差	变异系数/%	平均值	标准差	变异系数/%
游离酚	85.13 ^a	1.92	2.26	18.42 ^b	0.50	2.73
结合酚	2550.59 ^a	100.29	3.93	758.39 ^b	37.59	4.96

注: a~b 代表游离酚 EC₅₀ 值差异显著 ($p < 0.05$); α ~ β 代表结合酚 EC₅₀ 值差异显著 ($p < 0.05$).

表 4 褐赭色羊肚菌多酚细胞抗氧化能力

Table 4 CAA values of polyphenols in *Morchella umbrina* Boud

	CAA(μmol QE/100 g DW)	
	PBS 清洗	不经 PBS 清洗
游离酚	15.33 ± 0.60 ^b	51.84 ± 0.83 ^a
结合酚	0.37 ± 0.01 ^b	1.27 ± 0.04 ^a

注: a~b 代表游离酚 CAA 差异显著 ($p < 0.05$); α ~ β 代表结合酚 CAA 差异显著 ($p < 0.05$).

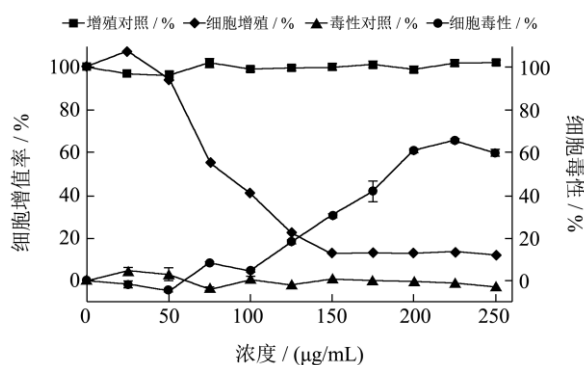


图 4 褐赭色羊肚菌游离酚对 HepG2 细胞的抗增殖活性和细胞毒性

Fig.4 Anti-proliferative activity and cytotoxicity of free polyphenols in *Morchella umbrina* Boud. on HepG2 cells

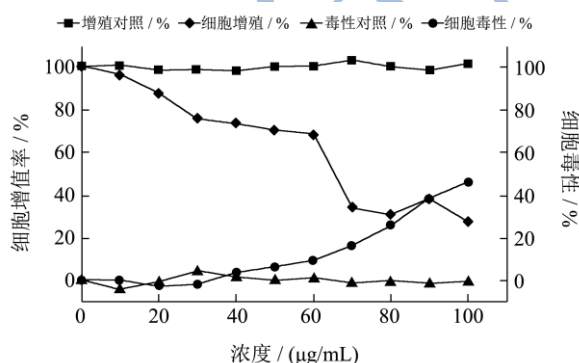


图 5 褐赭色羊肚菌结合酚对 HepG2 细胞的抗增殖活性和细胞毒性

Fig.5 Anti-proliferative activity and cytotoxicity of bound polyphenols in *Morchella umbrina* Boud. on HepG2 cells

赭色羊肚菌结合酚对人体肝癌细胞 HepG2 的抗增殖作用能力和细胞毒性作用能力如图 5 所示: 对照组的细胞增殖率为 100%左右, 没有显示细胞毒性,

表明细胞生长良好, 对照正常; 样品处理组随着多酚浓度从 0 提高到 70 μg/mL, 细胞增殖率从 100%下降到 33.69%, 下降趋势明显, 而样品浓度大于 70 μg/mL 后, 下降趋势趋向缓和; 当样品浓度小于 70 μg/mL 时, 样品对细胞的毒性小于 10%, 可视为无毒性, 而当样品浓度大于 70 μg/mL 时, 则显示出一定毒性, 且随样品浓度提高毒性增强。表明在样品浓度小于 70 μg/mL 时, 细胞增殖率下降主要是样品本身的抗增殖作用, 而浓度大于 70 μg/mL 时, 则可能是样品毒性和抗增殖的双重作用。

表 5 褐赭色羊肚菌多酚对 HepG2 细胞的抗增殖活性 (EC₂₅/EC₅₀) 和细胞毒性 (CC₅₀)

Table 5 Anti-proliferative activity (EC₂₅/EC₅₀) and cytotoxicity (CC₅₀) of polyphenols in *Morchella umbrina* Boud. on HepG2 cells

	细胞抗增殖活性		细胞毒性
	EC ₂₅ (mg/mL)	EC ₅₀ (mg/mL)	CC ₅₀ (mg/mL)
游离酚	51.26 ± 1.75 ^a	103.67 ± 6.86 ^a	>250
结合酚	42.27 ± 1.62 ^b	69.08 ± 3.96 ^b	>100

注: a~b 代表游离酚抗增殖活性差异显著 ($p < 0.05$); α ~ β 代表结合酚抗增殖活性差异显著 ($p < 0.05$).

褐赭色羊肚菌多酚细胞抗增殖 EC₂₅、EC₅₀ 值及细胞毒性 CC₅₀ 值如表 5 所示, 游离酚和结合酚对 HepG2 细胞增殖抑制率达到 25% 和 50% 时所对应的浓度未显示细胞毒性, 说明褐赭色羊肚菌多酚的 HepG2 细胞抗增殖作用不是由本身的细胞毒性作用引起, 而是由样品本身具有一定的抗增殖作用引起; 结合酚的 EC₂₅、EC₅₀ 值显著低于游离酚的 ($p < 0.05$), 表明结合酚对 HepG2 细胞抗增殖活性高于游离酚, 可能与结合酚提取物中某些未检测出的未知成分有关, 因此有待进一步研究褐赭色羊肚菌多酚组成与抗 HepG2 细胞增殖的关系。褐赭色羊肚菌多酚细胞毒性较小, 且在毒性范围内, 羊肚菌游离酚和结合酚都显示出较强的抗增殖活性。

3 结论

通过对褐赭色羊肚菌多酚 (游离酚和结合酚) 含

量及组分的测定,并分别采用化学抗氧化评价方法(ORAC)和以人肝癌细胞 HepG2 模型的细胞抗氧化活性(CAA)评价方法来研究羊肚菌多酚的抗氧化效果和细胞抗增殖作用。结果证明,褐赭色羊肚菌多酚含量较高,以游离态为主,游离酚和结合酚含量分别为 (4.27 ± 0.07) mg GAE/g 和 (0.14 ± 0.01) mg GAE/g DW,且二者组成成分差异明显,但均以酚酸类为主,有较强的抗氧化能力。细胞抗氧化活性(CAA)评价结果显示,经 PBS 清洗处理,游离酚和结合酚的 CAA 值分别为 (15.33 ± 0.60) $\mu\text{mol QE}/100$ g DW、 (0.37 ± 0.01) $\mu\text{mol QE}/100$ g DW;不经 PBS 清洗处理,游离酚和结合酚的 CAA 值分别为 (51.84 ± 0.83) $\mu\text{mol QE}/100$ g DW、 (1.27 ± 0.04) $\mu\text{mol QE}/100$ g DW,在 PBS 清洗和不清洗两种处理下游离酚的 CAA 值均高于结合酚,与 ORAC 测定结果类似,经 PBS 清洗处理中的游离酚和结合酚的 CAA 值显著低于不经 PBS 清洗处理中。同时,羊肚菌多酚对 HepG2 细胞具有明显的抑制增殖作用(抑制率高达 87.33%),在测试浓度范围内,羊肚菌多酚本身基本无细胞毒性,且结合酚抗增殖能力高于游离酚。游离酚和结合酚的 CAA 活性和抗 HepG2 细胞增殖能力不一致,可能与多酚的组分及各组分含量有关,且两种方法的原理不同,需进一步研究多酚抗氧化及抗增殖的构效关系。

参考文献

- [1] Palacios I, Lozano M, Moro C, et al. Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms [J]. Food Chemistry, 2011, 128(3): 674-678
- [2] Heleno S A, Stojković D, Barros L, et al. A comparative study of chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of *Morchella esculenta*(L.) Pers. from Portugal and Serbia [J]. Food Research International, 2013, 51(1): 236-243
- [3] Hu M L, Chen Y, Wang C, et al. Induction of apoptosis in HepG2 cells by polysaccharide MEP-II from the fermentation broth of *Morchella esculenta* [J]. Biotechnology Letters, 2013, 35(1): 1-10
- [4] Nitha B, Fijesh P V, Janardhanan K K. Hepatoprotective activity of cultured mycelium of Morel mushroom, *Morchella* [J]. Experimental and Toxicologic Pathology, 2013, 65(1-2): 105-112
- [5] Cui H L, Chen Y, Wang S S, et al. Isolation, partial characterisation and immunomodulatory activities of polysaccharide from *Morchella esculenta* [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2011, 91(12): 2180-2185
- [6] Wolfe K L, Liu R H. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(22): 8896-8907
- [7] Gursoy N, Sarikurkcu C, Cengiz M, et al. Antioxidant activities, metal contents, total phenolics and flavonoids of seven *Morchella* species [J]. Food and Chemical Toxicology, 2009, 47(9): 2381-2388
- [8] Wolfe K L, Kang X, He X, et al. Cellular antioxidant activity of common fruits [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(18): 8418-8426
- [9] Liang Q, Cui J, Li H, et al. Florets of sunflower (*Helianthus annuus* L.): potential new sources of dietary fiber and phenolic acids [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61 (14): 3435-3442
- [10] Cheung L, Cheung P C, Ooi V E. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts [J]. Food Chemistry, 2003, 81(2): 249-255
- [11] Ardestani A, Yazdanparast R. Antioxidant and free radical scavenging potential of Achillea santolina extracts [J]. Food Chemistry, 2007, 104(1): 21-29
- [12] Soong Y Y, Barlow P J. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds [J]. Food Chemistry, 2004, 88(3): 411-417
- [13] Yang J, Liu R H, Halim L. Antioxidant and antiproliferative activities of common edible nut seeds [J]. LWT-Food Science and Technology, 2009, 42(1): 1-8
- [14] Ashagrie Z, Woldegiorgis, Dawit Abate, et al. Antioxidant property of edible mushrooms collected from Ethiopia [J]. 2014, 157(15): 30-36