

不同粉碎处理对香菇菌伞多酚细胞抗氧化及抗增殖活性的影响

陈金龙¹, 李谣¹, 卢可可¹, 夏春燕¹, 张小利¹, 明建^{1,2,3}

(1. 西南大学食品科学学院, 重庆 400715) (2. 国家食品科学与工程实验教学中心, 西南大学, 重庆 400715)
(3. 重庆市特色食品工程技术研究中心, 重庆 400715)

摘要: 本研究采用三种粉碎方式处理香菇菌伞, 制得样品普通粉碎香菇伞粉 (Coarse milled cap, CMC)、气流超微粉碎香菇伞粉 (Jet milled cap, JMC) 和纳米超微粉碎香菇伞粉 (Nano-micronized cap, NMC), 测定不同粉碎处理的香菇伞粉多酚含量, 并研究多酚对 HepG2 细胞抗氧化及抗增殖活性的影响。结果发现, JMC 中游离酚含量最高 (4.457±0.076 mg/g), 结合酚含量最低 (0.274±0.018 mg/g); CMC 游离酚含量最低, 但结合酚含量却最高。游离酚的细胞抗氧化活性, 不使用 PBS 清洗时其 CAA 值为: CMC-F>JMC-F>NMC-F; 使用 PBS 清洗时其 CAA 值为: NMC-F>JMC-F>CMC-F。多酚的细胞抗增殖活性, 三种粉碎处理的样品游离酚和结合酚均具有较好的抗增殖活性, EC₅₀ 大小顺序均为 NMC>CMC>JMC。因此, 不同粉碎方式处理对香菇伞粉多酚含量、细胞抗氧化及抗增殖活性均有一定影响, 但经超微粉碎处理后能显著提高总酚和游离酚含量, 减少结合酚含量, 而且能提高其细胞抗氧化及抗增殖活性。

关键词: 粉碎方式; 香菇菌伞; 多酚; 细胞抗氧化; 抗增殖

文章编号: 1673-9078(2016)12-191-197

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.12.030

Effects of Grinding Methods on the Antioxidant and Antiproliferative Activities of Phenolics in Mushroom Caps (*Lentinus edodes*)

CHEN Jin-long¹, LI Yao¹, LU Ke-ke¹, XIA Chun-yan¹, ZHANG Xiao-li¹, MING Jian^{1,2,3}

(1.College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China) (2.National Food Science and Engineering Experimental Teaching Center, Southwest University, Chongqing 400715, China) (3.Chongqing Special Food Programme and Technology Research Center, Chongqing 400715, China)

Abstract: Three grinding methods were employed on mushroom caps (*Lentinus edodes*) to generate three kinds of powders, coarse milled cap (CMC), jet milled cap (JMC), and nano-micronized cap (NMC). The polyphenolic content in these three samples and the effect of their antioxidant and antiproliferative activities on HepG2 cells were determined. The results showed that JMC had the highest amount of free phenolics (4.457±0.076 mg/g) and the lowest amount of bound phenolics (0.274±0.018 mg/g), while CMC had the highest amount of bound phenolics and the lowest amount of free phenolics. The results of the cellular antioxidant activity (CAA) assay showed that the order of CAA values after the three treatments without washing with PBS was: free phenol in CMC (CMC-F) > free phenol in JMC (JMC-F) > free phenol in NMC (NMC-F). The order of CAA values after washing with PBS was: NMC-F > JMC-F > CMC-F. The results of the cell proliferation assay indicated that the free phenolics and bound phenolics after all three treatments had significant effects on inhibiting the proliferation of HepG2 cells. The order of EC₅₀ values was: NMC>CMC>JMC. Therefore, different grinding methods had distinct effects on the polyphenolic content, antioxidant activity, and antiproliferation activity of *Lentinus edodes* caps. Superfine grinding could significantly increase the production of total phenolics and free phenolics, decrease the content of bound phenol, and improve the antioxidant activity and antiproliferation activity of *Lentinus edodes*.

Key words: grinding method; mushroom cap; polyphenol; cellular antioxidant; antiproliferative

收稿日期: 2015-12-25

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31471576); 重庆市社会民生科技创新专项 (cstc2015shmszx80019)

作者简介: 陈金龙 (1992-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 农产品贮藏与加工工程

通讯作者: 明建 (1972-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 现代食品加工理论与技术

香菇 (*Lentinus edodes*) 是仅次于双孢蘑菇的世界第二大食用菌, 也是我国特产之一, 因其味道鲜美及营养丰富而深受人们青睐。研究发现, 香菇具有抗癌、抗氧化、改善肝功能和降低胆固醇等多种生理活性。但是目前对于香菇的研究主要集中在香菇多糖上^[1,2], 对于香菇多酚的研究少有报道。有研究表明, 香菇多酚具有较好的抗氧化活性, 其多酚物质主要由对羟基苯甲酸、香草酸、肉桂酸、 α -生育酚和 β -生育酚等单体酚组成。通过体外化学抗氧化测定发现, 香菇多酚对 DPPH 自由基、超氧阴离子 $O_2^{\cdot-}$ 、羟基自由基 OH^{\cdot} 等均有明显的清除能力, 其中对 DPPH 自由基的清除能力最强^[3,4]。但是体外化学抗氧化测定不能反映机体对抗氧化剂的摄入情况以及机体内复杂的环境对抗氧化剂作用效果的影响, 具有一定的局限性, 而细胞抗氧化方法可以反映抗氧化物质在细胞内的吸收、代谢和分布, 比化学抗氧化方法更具有生物相关性, 能更好地预测物质在体内的抗氧化活性, 所以细胞抗氧化方法能更真实的评价香菇多酚的抗氧化活性^[5]。

香菇作为我国栽培量和产量最大的食用菌, 存在货架期短、易发生腐败变质等问题, 所以对香菇进行精深加工、综合利用是食品加工行业的研究热点。目前市场上的香菇大部分都进行了干燥和制粉处理, 不仅降低了香菇水分含量, 延长货架期和填补淡季需求, 还方便运输和贮藏, 而且干制香菇加工成粉体可以作为功能性食品添加剂加入各种食品中, 从而提高香菇的应用价值。超微粉碎是指利用机械或流体动力对物料进行碾磨、冲击和剪切等, 将原料粉碎微米级甚至纳米级的加工技术, 有助于增加微粉的比表面积, 具有一般颗粒所没有的特殊理化性质。Zhang 等^[6]将茶薪菇经过超微粉碎处理, 发现其表面积增加, 具有良好的溶解性、分散性和持水性, 具有很好的加工适应性。张小利等^[7]研究发现超微粉碎能在一定程度上提高多酚的溶出率及化学抗氧化活性, 其中气流超微粉碎作用效果最好。

本实验将香菇伞干燥后分别进行普通粉碎、气流超微粉碎和纳米超微粉碎处理, 以人肝癌细胞 HepG2 为细胞模型, 研究不同粉碎处理后香菇伞多酚物质的细胞抗氧化及抗增殖活性, 为香菇的合理利用以及功能产品的开发提供一定的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

香菇: 品种“808”, 购于重庆北碚农贸市场。
丙酮、浓盐酸、正己烷、乙酸乙酯、甲醇、没食

子酸、福林酚试剂和碳酸钠均为分析纯, 成都科龙化工试剂厂; 二甲苯和磷酸盐缓冲液 (PBS) 均为分析纯, 美国 Fisher 公司; 2,2'-偶氮二异丁基脒二盐酸盐 (2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride, ABAP) 为分析纯, 美国 Wako 化学试剂公司; 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 和 2',7'-二氯荧光素二乙酸酯 (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA) 均为分析纯, 美国 Sigma 公司; 青霉素、链霉素和庆大霉素均为生化试剂, 美国 Sigma 公司; Hank 平衡盐溶液 (Hank balanced salt solution, HBSS)、WME 培养基、表皮生长因子、肝素、胰岛素以及其他细胞培养试剂均为生化试剂, 美国 Gibco 生物科技公司; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS), 美国 Atlanta 生物科技公司; HepG2 人体肝癌细胞, 美国模式培养物集存库 (ATCC)。

1.2 仪器与设备

JYL-C012 型高速粉碎机, 九阳股份有限公司; YSC-701 型超微粉碎机, 北京燕山正德机械有限公司; LNJ-120 型气流粉碎机, 绵阳流能粉体设备有限公司; CJM-SY-B 型高能纳米冲击磨, 秦皇岛市太极环纳米制品有限公司; BHC-IIA2 系列生物安全柜, 苏净安泰空气技术有限公司; 5180 R 型冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; DM IRB 型倒置显微镜, 德国 Leica 仪器有限公司; HERA cell 240 型 CO_2 培养箱, 美国 Thermo 公司; T75 细胞培养瓶、96 孔黑色底部透明微孔板和 96 孔白色底部透明微孔板, 美国 Corning 公司。

1.3 方法

1.3.1 材料预处理

新鲜香菇购买后立即运送至实验室, 挑选无病虫害、大小均匀的个体, 用水洗净后, 将香菇伞部切下。通风至表面干燥, 再低温烘干 ($45^{\circ}C \sim 60^{\circ}C$) 至水分含量少于 10%。

1.3.2 粉碎处理

普通粉碎: 将烘干的香菇伞经高速粉碎机粉碎后, 过 100 目筛, 即得到 CMC 粉 (粒径 $<2.5 \mu m$)。

气流超微粉碎: 将 CMC 粉用 LNJ-120 气流粉碎机粉碎 2 h, 即得 JMC 粉 (粒径 $10 \mu m \sim 25 \mu m$), 干燥阴凉处密封保藏, 备用。

纳米超微粉碎: 将 CMC 粉用 CJM-SY-B 高能纳米冲击磨 (不锈钢粉碎腔体, 氧化锆球粉碎磨介, $5 \sim 35^{\circ}C$ 变频) 粉碎处理 6 h, 制得 NMC 粉 (粒径 $<1 \mu m$), 干燥阴凉处密封保藏, 备用。

1.3.3 香菇多酚提取^[8,9]

游离酚的提取:准确称取不同粉碎的香菇伞粉 2.0 g, 加入 80%冷冻丙酮 50 mL, 漩涡震荡 5 min 后均质 (12000 r/min) 3 min, 于 2500 r/min 下离心 10 min 取上清液。滤渣重复以上操作, 合并上清液, 抽滤后于 45 °C 旋转蒸干。用盐酸甲醇溶液 ($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{盐酸}}=90:10$) 定容至 25 mL, -80 °C 条件下贮存, 备用。

结合酚的提取:向游离酚提取后的残渣中加入 20 mL、2 mol/L 氢氧化钠溶液, 氮气环境下消化 90 min, 用盐酸调至中性, 加入 25 mL 正己烷除脂, 加入 30 mL 乙酸乙酯, 震荡 10 min 后离心 (4000 r/min, 10 min), 取上清液。乙酸乙酯重复提取 5 次, 合并上清液, 抽滤后于 45 °C 旋转蒸干。用盐酸甲醇溶液 ($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{盐酸}}=90:10$) 定容至 25 mL, -80 °C 条件下贮存, 备用。

1.3.4 多酚含量的测定

标准曲线的制作:分别配制 0、20、60、100、150、200、300、400、500 和 600 $\mu\text{g/mL}$ 的没食子酸标液。取 200 μL 标准溶液与 800 μL 去离子水于玻璃管中, 加入福林-酚试剂 200 μL , 振荡试管使样品充分混合, 避光保存 6 min, 再加入 2 mL、7% Na_2CO_3 溶液和 1.6 mL 去离子水, 混合均匀, 避光保持 90 min 后于 760 nm 处测定吸光值。以没食子酸溶液浓度为横坐标 (x), 以吸光值为纵坐标 (y), 绘制标准曲线, 得回归方程为: $y=0.0043x+0.0168$ ($R^2=0.9983$)。

多酚含量的测定:准确吸取 200 μL 样液与 800 μL 去离子水于玻璃管中, 后续操作同标准曲线的制备。结果以每克样品中所含没食子酸当量 (mg gallic acid equivalent /g dry-weight basis, mg GAE/g DW) 表示。每个样品做 3 组平行, 结果表示为平均值士标准偏差。

1.3.5 细胞培养

HepG2 细胞在生长培养基 CM (William's Medium E, WME), 5% FBS, 2 mmol/L 谷氨酸盐, 10 mmol/L Hepes, 5 $\mu\text{g/mL}$ 胰岛素, 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 氢化可的松, 50 units/mL 青霉素, 50 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素和 100 $\mu\text{g/mL}$ 庆大霉素) 条件下生长, 在 37 °C、5% CO_2 条件下培养^[10,11]。

1.3.6 细胞抗氧化活性测定^[11,12]

将对数生长期 HepG2 细胞接种到 96 孔板中, 每孔细胞数约为 6×10^4 个, 于 37 °C、5% CO_2 下培养 24 h 后, 移去残余培养基, PBS 清洗 1 次。加入新鲜培养基、香菇游离酚 (终浓度梯度为 0、1、2、4、6、8 和 10 mg/mL)、DCFH-DA 荧光探针溶液 (终浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$) 及标准品槲皮素 (终浓度梯度为 0、1、2、4、6、8 和 10 $\mu\text{mol/L}$)。再置于 37 °C、5% CO_2 条件下继续培养 1 h, 移去残余培养液, 然后加入 100 μL 孔 PBS, 清洗一次 (PBS 清洗实验) 或不经 PBS 清洗

(不经 PBS 清洗实验), 加入 100 μL 孔 ABAP 溶液 (终浓度为 600 $\mu\text{mol/L}$), 立即于发射波长 538 nm, 入射光波长 485 nm 下测定荧光值, 测定时间 1 h, 每 5 min 测定 1 次。对照组用 DCFH-DA 和 ABAP 处理, 不加香菇游离酚; 空白组用 DCFH-DA 处理, 不加入 ABAP 和香菇游离酚。

减去空白和初始荧光值后, 每个香菇游离酚质量浓度对应时间-荧光值曲线下的面积即为 CAA 值, 计算公式如下所示。

$$\text{CAA 值} = 100 - \left(\frac{I_{\text{SA}}}{I_{\text{CA}}} \right) \times 100$$

式中: I_{SA} 表示加入不同质量浓度香菇游离酚提取物后的时间-荧光值曲线下的积分面积; I_{CA} 表示空白对照组的时间-荧光值曲线下的积分面积。

香菇游离酚提取物的半数有效质量浓度 (EC_{50}) 根据 $\lg(f_a/f_0)$ 对 $\lg(\text{剂量})$ 的中效原理来计算, 式中: f_a 为样品作用效应 (CAA 值), f_0 为 1-CAA 值, EC_{50} 值以 3 次平行实验计算得出, 将 EC_{50} 值转化为 CAA 值。香菇游离酚的 CAA 值以每 100 g 香菇相当于微摩尔槲皮素的量表示 ($\mu\text{mol QE}/100 \text{ g}$)。

1.3.7 细胞毒性测定^[12,14]

取对数生长期 HepG2 细胞接种于 96 孔白板中, 使每孔细胞数约为 4×10^4 个, 于 37 °C、5% CO_2 下培养 4 h 后, 移去残余培养基, PBS 清洗 1 次。其中, 样品孔中加入 100 μL 含样品的培养基 (每个浓度做 3 个平行孔), 控制孔中加入 100 μL 培养基, 于 37 °C 下 5% CO_2 条件培养 24 h 后开始测板, 移去 96 孔板内残余培养基, PBS 清洗 1 次, 加 50 μL 孔亚甲基蓝溶液 (98% HBSS、0.67% 戊二醛和 0.6% 亚甲基蓝) 染色, 于 37 °C 培养 1 h, 然后移去染色液, 并用去离子水中清洗 96 孔板至清洗液无色, 吸去板中多余水分并风干 2~3 min, 加 100 μL 孔洗脱液 (49% PBS、50% 乙醇和 1% 醋酸), 然后漩涡振荡 20 min, 使孔内已染色的细胞形成均匀的细胞悬浮液, 最后在酶标仪 (570 nm) 测定悬浮液吸光度。计算公式如下:

$$\text{减少的吸光度}/\% = (1 - A_{\text{样品组}}/A_{\text{对照组}}) \times 100$$

1.3.8 细胞抗增殖能力测定^[12,14]

取对数生长期 HepG2 细胞接种于 96 孔板中, 每孔细胞数约为 2.5×10^4 个, 于 37 °C、5% CO_2 下培养 4 h 后, 移去残余培养基, PBS 清洗 1 次。其中, 样品孔中加入 100 μL 含样品的培养基 (每个浓度做 3 个平行孔), 控制孔中加入 100 μL 培养基, 于 37 °C、5% CO_2 下培养 72 h 后开始测板, 操作同细胞毒性测定。按公式计算细胞增殖抑制率。

$$\text{细胞增殖抑制率}/\% = (1 - A_{\text{样品组}}/A_{\text{对照组}}) \times 100$$

1.4 数据处理

数据采用 Origin 8.0 统计分析, 实验重复 3 次, 结果用“ $\bar{x}\pm s$ ”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 不同粉碎处理对香菇伞粉多酚含量的影响

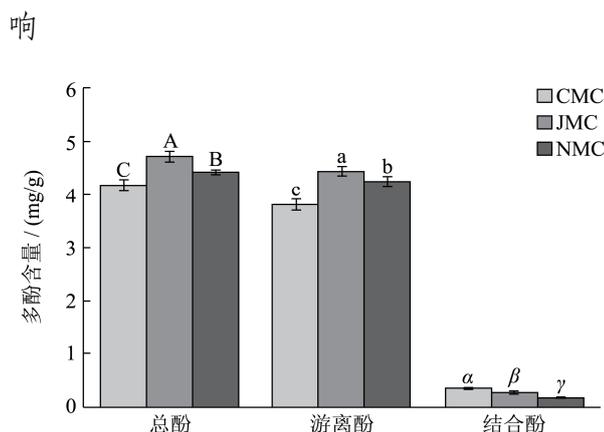


图1 不同粉碎处理对香菇伞粉多酚含量的影响

Fig.1 Polyphenolic content in mushroom (*Lentinus edodes*) caps after different grinding methods

注: A-C 代表总酚含量差异显著($p<0.05$); a-c 代表游离酚含量差异显著($p<0.05$); $\alpha-\gamma$ 代表结合酚含量差异显著($p<0.05$)。

香菇菌伞经不同粉碎处理后总酚、游离酚及结合酚含量变化如图 1 所示。总体来看, 其总酚含量在 4 mg/g 左右, 其存在形式以游离酚为主, 占到总酚含量的 94% 以上。各处理组的总酚含量大小依次为 JMC>NMC>CMC ($p<0.05$), 表明不同粉碎处理能影响香菇伞粉中总酚的含量。游离酚含量顺序与总酚一致, 结合酚含量依次为 CMC>JMC>NMC ($p<0.05$)。JMC 和 NMC 中游离酚含量均高于 CMC, 而结合酚含量则均低于 CMC。其中, 相对于普通粉碎处理, 香菇菌伞经气流超微粉碎处理后能使其游离酚含量提升 16.7%, 结合酚含量减少 22.8%。说明超微粉碎能显著增加游离酚的含量, 减少结合酚含量, 这也与张小利^[7]等的研究结果一致, 超微粉碎能显著增加香菇多酚的溶出率, 有利于多酚存在形态的转变。另一方面, 随着粉碎粒度的减小, 结合酚含量降低, 其对应的游离酚含量应该越高。但本研究 NMC 中结合酚和游离酚含量均低于 JMC, 其可能原因是气流超微粉碎技术与纳米超微粉碎技术工作原理不同。纳米超微粉碎过程是一种机械的研磨过程, 会导致局部升温, 破坏部

分酚类物质。综上所述, 香菇伞粉中, 游离酚含量高于结合酚, 超微粉碎可以显著提高香菇伞粉中总酚及游离酚含量。

2.2 不同粉碎处理对香菇伞粉多酚抗氧化活性的影响

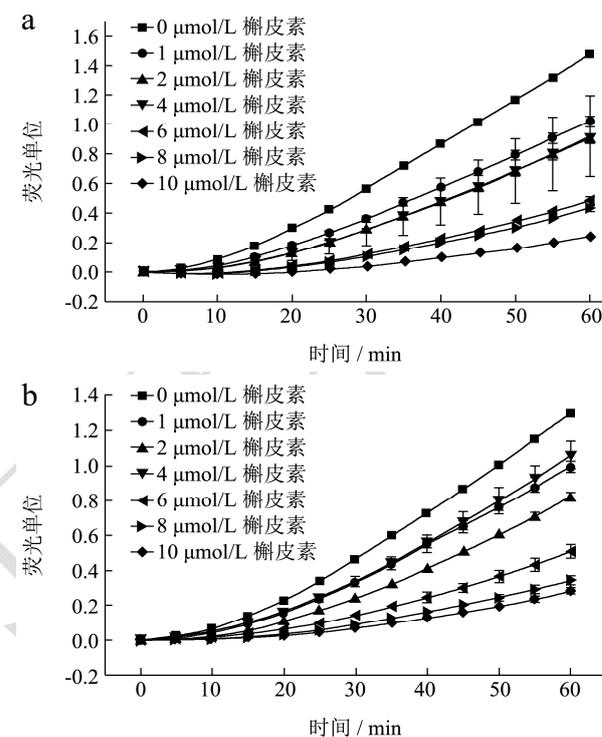


图2 槲皮素标准品对HepG2细胞ABAP产生的过氧化氢自由基氧化DCFH的动力学曲线

Fig.2 Kinetic curve of peroxyl radical-induced oxidation of DCFH to DCF in HepG2 cells by quercetin standards

注: a 为 PBS wash; b 为 PBS no wash。

细胞内荧光物 DCF 的生成及抗氧化剂减少其生成的动力学曲线如图 2 和图 3 所示, 其中图 2a 和 b 表示槲皮素的细胞抗氧化动力曲线图, 随着浓度梯度增加, 荧光值都随之明显减小, 说明槲皮素具有良好的细胞抗氧化活性; 图 3a、c 和 e 表示不使用 PBS 清洗时, 不同粉碎处理的香菇伞粉游离酚的细胞抗氧化动力曲线图, 主要反映抗氧化剂在细胞膜表面的抗氧化活性; 图 3b、d 和 f 则表示了使用 PBS 清洗试验, 反映抗氧化剂在细胞内的抗氧化活性。整体来看, 各样品中不使用 PBS 清洗处理抗氧化活性效果优于使用 PBS 处理。其中普通粉碎处理组在不使用 PBS 清洗时, 当 CMC-F 浓度为 4 mg/mL 时能显著抑制氧化产物的生成; 使用 PBS 清洗时, 荧光值的大小随浓度变化趋势很小, 可以认为 CAA 活性很小甚至没有活性。由于前期实验发现, 结合酚基本无抗氧化活性,

因此, 本文只选择游离酚进行抗氧化活性研究。

CAA 值越大不是细胞抗氧化活性越强。不同粉碎处理后的香菇伞酚多酚 CAA 值见表 1。由表可知, 在不使用 PBS 清洗时, 三种粉碎处理的香菇伞粉游离酚对 HepG2 细胞抗氧化活性(CAA)值均大于 $15.60 \times 10^{-2} \mu\text{mol QE/g}$, 其中普通粉碎处理组的 CAA 值达到 $34.83 \times 10^{-2} \mu\text{mol QE/g}$, 说明各处理组的伞粉游离酚均具有较好的细胞抗氧化活性。随着粉碎粒径的减小, 细胞抗氧化活性也降低, 说明超微粉碎处理可能会破坏部分游离酚的活性结构, 使活性降低。使用 PBS 清洗时, 香菇伞粉游离酚 CAA 值从 $0.01 \times 10^{-2} \mu\text{mol QE/g}$ 到 $2.87 \times 10^{-2} \mu\text{mol QE/g}$, 以普通粉碎处理组最低, 基本没有抗氧化活性, 随着粉碎粒径的减小, 细胞抗氧化活性增强, 说明超微粉碎能够使游离酚更易于进入细胞, 有利于发挥抗氧化活性。

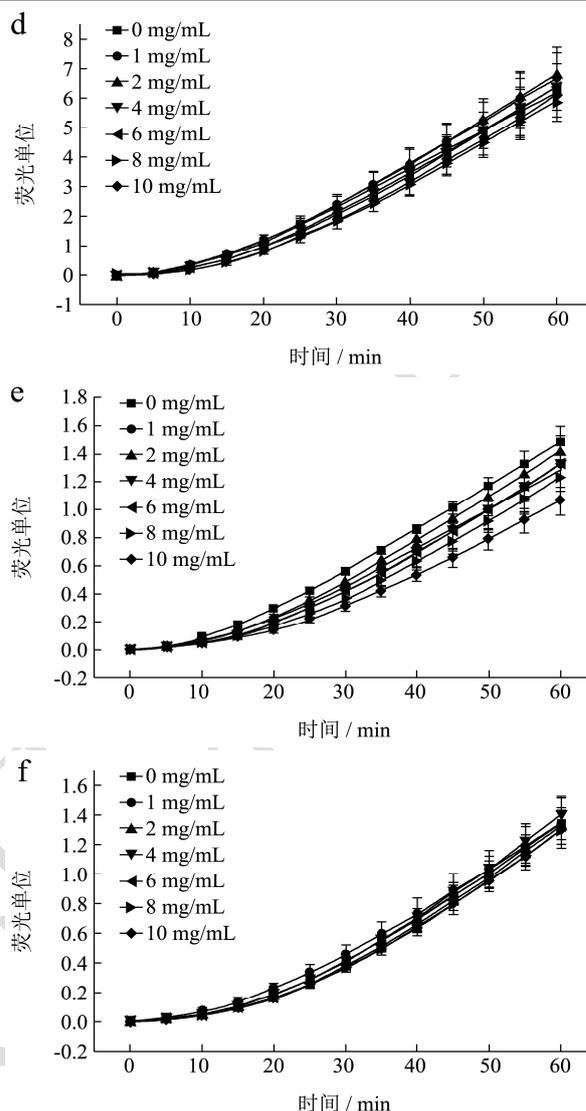
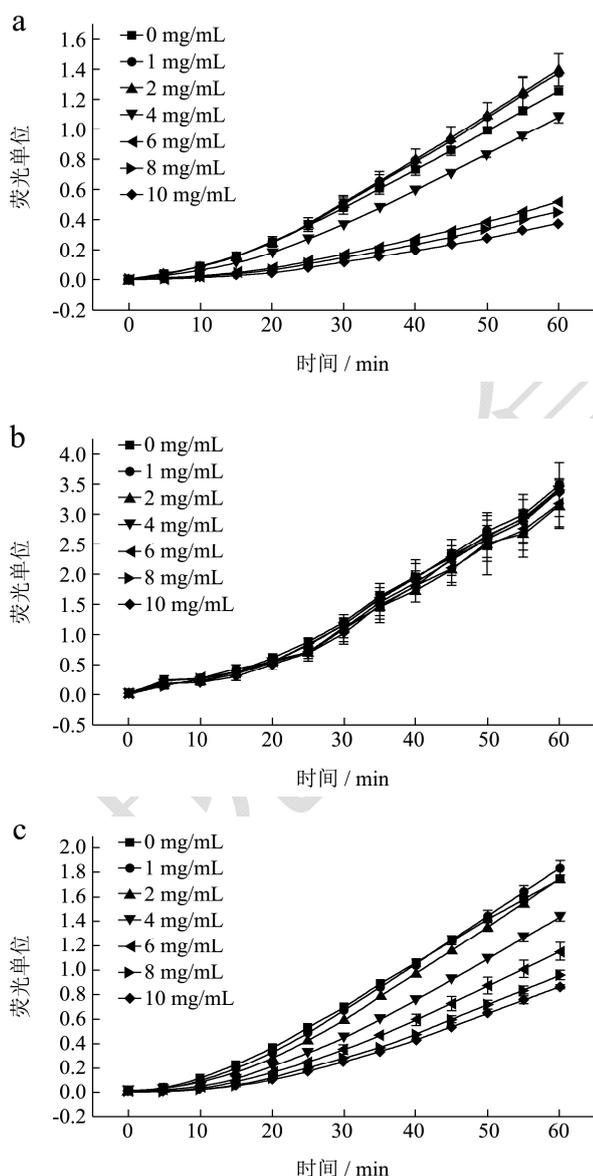


图3 不同粉碎处理的香菇伞粉游离酚的细胞抗氧化动力学曲线图

Fig.3 Cellular antioxidant activity (CAA) kinetic curve of free polyphenols in different powders of mushroom (*Lentinus edodes*) cap

注: a为CMC-F No PBS wash; b为CMC-F PBS wash; c为JMC-F No PBS wash; d为JMC-F PBS wash; e为NMC-F No PBS wash; f为NMC-F PBS wash。

表1 不同粉碎处理的香菇伞粉游离酚的 CAA 值

Table 1 CAA values of free polyphenols in different powders of mushroom (*Lentinus edodes*) cap

CAA 值 ($\times 10^{-2} \mu\text{mol}$ 槲皮素当量/g 香菇伞粉)	样品		
	CMC-F	JMC-F	NMC-F
No PBS wash	34.83	17.31	15.60
PBS wash	0.01	2.14	2.87

注: CMC-F, 普通粉碎伞粉游离酚; JMC-F, 气流粉碎伞粉游离酚; NMC-F, 纳米粉碎伞粉游离酚。

2.3 不同粉碎处理对香菇伞粉多酚抗增殖活性的影响

不同粉碎处理的香菇伞粉多酚对 HepG2 细胞的毒性和抗增殖活性如图 4 和图 5 所示。由图可知, 不同粉碎处理的香菇多酚的抗增殖曲线明显低于空白对照组的抑制曲线, 说明香菇伞游离酚和结合酚均具有抑制 HepG2 细胞增殖能力。

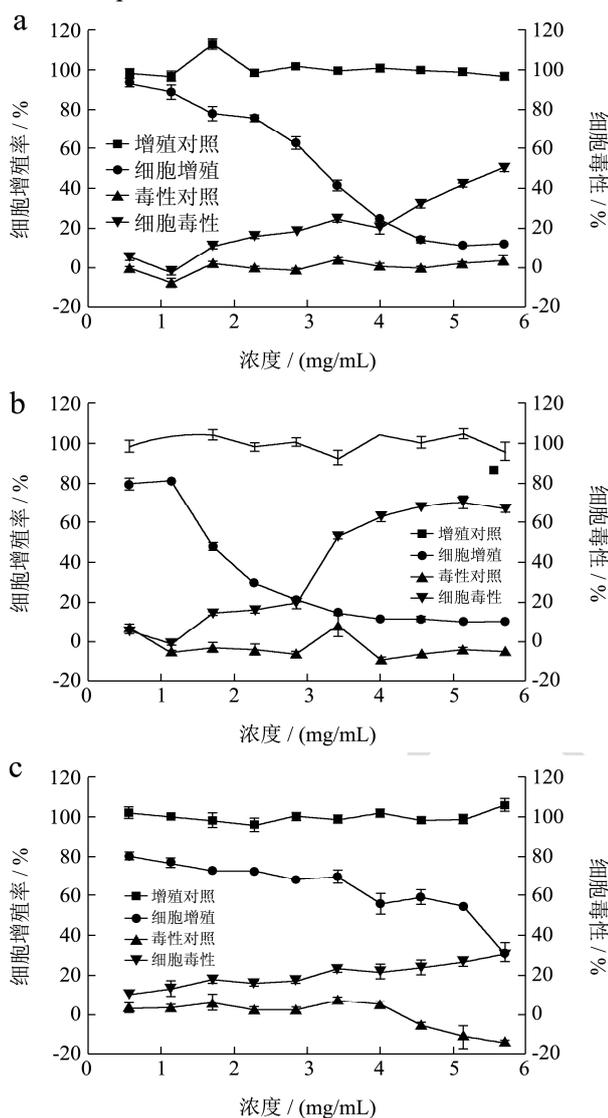


图 4 不同粉碎处理的香菇伞粉游离酚的细胞毒性和增殖抑制作用

Fig.4 Anti-proliferative and cytotoxic activity of free phenolics in mushroom (*Lentinus edodes*) caps after different grinding methods

注: a, CMC 游离酚 (CMC-F); b, JMC 游离酚 (JMC-F); c, NMC 游离酚 (NMC-F)。

图 4 表示三种粉碎处理的香菇伞粉游离酚对 HepG2 细胞毒性及抗增殖活性的影响, CMC 和 JMC

中游离酚浓度大于 1.71 mg/mL 时, 即显示出细胞毒性, 相应的细胞增殖抑制率分别为 22.64%和 52.29%, 在无细胞毒性范围内, JMC 较 CMC 显示出更好的抗增殖作用。NMC 中游离酚的细胞毒性较高, 其抗增殖作用可能是细胞毒性所引起。

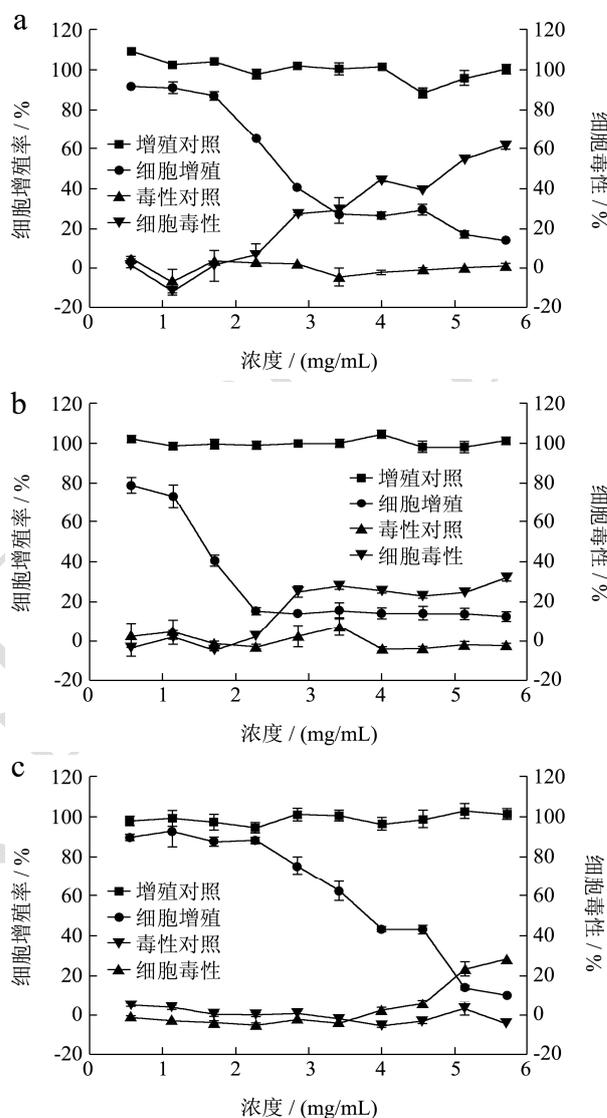


图 5 不同粉碎处理的香菇伞粉结合酚的细胞毒性和增殖抑制作用

Fig.5 Anti-proliferative and cytotoxic activity of bound phenolics in mushroom (*Lentinus edodes*) caps after different grinding methods

注: a, CMC 结合酚 (CMC-B); b, JMC 结合酚 (JMC-B); c, NMC 结合酚 (NMC-B)。

图 5 表示三种粉碎处理香菇伞粉结合酚对 HepG2 细胞毒性及抗增殖活性的影响, CMC、JMC 和 NMC 中结合酚浓度分别大于 1.71 mg/mL、2.85 mg/mL 和 4.75 mg/mL 显示出细胞毒性, 增殖抑制率分别为 45.02%、55.14%和 60.20%。在无细胞毒性范围内, 三种粉碎处理的香菇结合酚均有显著抗增殖作用。其

中 JMC 中结合酚在达到毒性浓度前,抗增殖活性趋于稳定,说明其抗增殖作用不是细胞毒性作用引起的。

表 2 不同粉碎处理的香菇伞粉多酚的细胞抗增殖能力 (EC₅₀) 和细胞毒性 (CC₂₀)

Table 2 Anti-proliferative (EC₅₀) and cytotoxic (CC₂₀) activity of phenolics in mushroom (*Lentinus edodes*) caps after different grinding methods

样品	游离酚		结合酚	
	EC ₅₀ /(mg/mL)	CC ₂₀ /(mg/mL)	EC ₅₀ /(mg/mL)	CC ₂₀ /(mg/mL)
CMC	3.379	2.990	3.067	2.745
JMC	1.446	1.841	1.457	4.492
NMC	5.201	3.180	3.7752	5.030

注: CMC-普通粉碎伞粉; JMC-气流超微粉碎伞粉; NMC-纳米超微粉碎伞粉。

综上所述,当达到一定浓度时,三种粉碎处理的香菇伞粉游离酚和结合酚均显示细胞毒性作用,但在其无毒性范围内均有一定抗增殖作用。由表 2 可知,三种粉碎处理的香菇伞粉多酚 EC₅₀ 值(即当细胞增殖率下降至 50%时所需样品浓度)有较大差异,气流超微粉碎组香菇游离酚和结合酚的 EC₅₀ 值均较低,表明具有较强抗增殖能力。

3 结论

通过对三种不同粉碎处理的香菇菌伞多酚含量测定,并以人肝癌细胞 HepG2 为细胞模型的细胞抗氧化活性(CAA)评价方法来研究不同粉碎处理的香菇伞粉多酚抗氧化效果和细胞抗增殖作用。结果证明,香菇菌伞经过不同粉碎处理后能够影响多酚物质含量,且表现出不同的细胞抗氧化活性和抗增殖活性。多酚含量测定结果显示,多酚存在形式以游离酚为主,超微粉碎处理后结合酚含量显著减少,总酚和游离酚含量显著升高,以气流超微粉碎效果最为明显。不使用 PBS 清洗时的抗氧化活性优于使用 PBS 清洗,其中不使用 PBS 清洗时,不同粉碎处理的香菇伞粉游离酚的 CAA 值大小顺序为 CMC-F>JMC-F>NMC-F,即随伞粉粒径减小,CAA 值减小;使用 PBS 清洗时,CAA 值为 NMC-F>JMC-F>CMC-F,即随伞粉粒径减小,CAA 值增大,这说明粒径越小,香菇游离酚越容易进入细胞内部,发挥其抗氧化活性。抗增殖活性试验中发现,在无细胞毒性范围内,三种粉碎处理的香菇游离酚和结合酚均有抑制 HepG2 细胞增殖的作用,其中以气流超微粉碎处理组的香菇多酚抗增殖活性最强。

参考文献

[1] 徐晓飞,闫慧丹,罗珍,等.香菇多糖 *Lentinan* 的提取分离、生物活性和构效关系的研究进展[J].食品工业科技, 2012, 33(7):435-439
XU Xiao-fei, YAN Hui-dan, LUO Zhen, et al. Research progress in exaction and purification methods, bio-activities,

relationship between structure and function of *Lentinan* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(7): 435-439
[2] Finimundy T C, Dillon A J P, Henriques J A P, et al. A review on general nutritional compounds and pharmacological properties of the *Lentinula edodes* mushroom [J]. Food and Nutrition Sciences, 2014, 5: 1095-1105
[3] Carneiro A A J, Ferreira I C F R, Dueñas M, et al. Chemical composition and antioxidant activity of dried powder formulations of *Agaricus blazei* and *Lentinus edodes* [J]. Food Chemistry, 2013, 138: 2168-2173
[4] 马洪娟.香菇多酚含量的测定及抗氧化活性研究[J].黑龙江农业科学,2013,7:116-119
MA Hong-juan. Determination of polyphenol content and research on antioxidant activity in *Lentinula edodes* (Berk) Pegle [J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2013, 7: 116-119
[5] 夏春燕,郭晓晖,李富华,等.细胞抗氧化活性方法在食物抗氧化活性评价中的研究进展[J].食品科学,2012,33(15): 297-302
XIA Chun-yan, GUO Xiao-hui, LI Fu-hua, et al. Research progress of cellular antioxidant activity assay for antioxidant evaluation of foods [J]. Food Science, 2012, 33(15): 297-302
[6] Zhang M, Zhang C J, Shrestha S. Study on the preparation technology of superfine ground powder of *Agrocybe chaxingu* Huang [J]. Journal of Food Engineering, 2005, 67: 333-337
[7] 张小利,夏春燕,王慧清,等.超微粉碎对香菇多酚组成及抗氧化活性的影响[J].食品科学,2015,36(11):42-49
ZHANG Xiao-li, XIA Chun-yan, WANG Hui-qing, et al. Effect of superfine grinding on compositions and antioxidant activity of phenolic compounds from shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) [J]. Food Science, 2015, 36(11): 42-49
[8] Sun J, Chu Y F, Wu X Z, et al. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits [J]. Journal of

- Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(25): 7449-7454
- [9] Okarter N, Liu C S, Sorrells M E, et al. Phytochemical content and antioxidant activity of six diverse varieties of whole wheat [J]. Food Chemistry, 2010, 119: 249-257
- [10] Faller A L K, Fialho E, Liu R H. Cellular antioxidant activity of *Feijoad* whole meal coupled with an *in vitro* digestion [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60: 4826-4832
- [11] Wolfe K L, Kang X M, He X J, et al. Cellular antioxidant activity of common fruits [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(18): 8418-8426
- [12] 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
- [13] Felice D L, Sun J, Liu R H. A modified methylene blue assay for accurate cell counting [J]. Journal of Functional Foods, 2009, 1(1): 109-118
- [14] Wang L F, Chen J Y, Xie H H, et al. Phytochemical profiles and antioxidant activity of *Adlay* varieties [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61: 5103-5113