

灵芝麦角硫因高通量检测方法研究

徐晴元¹, 游俊健¹, 林俊芳^{1,2}, 薛玲娜¹, 余颖豪¹, 郭丽琼^{1,2*}

¹华南农业大学食品学院生物工程系; ²广东省微生态制剂工程技术研究中心, 广州 510640

摘要:麦角硫因(ergothioneine, EGT)基于其强抗氧化及体内消耗率低的特点,在人体内拥有多种重要的生理功能。但是在高产 EGT 微生物筛选和新菌株的选育研究中,现有的 EGT 检测方法因其步骤繁琐、使用的试剂和设备昂贵而亟待改进。本研究基于 EGT 的理化性质,建立了 EGT-硫氰酸铁高通量快速检测体系,同时选用不同 EGT 产量的灵芝菌株以及灵芝融合新菌株对该检测体系的准确性进行验证。结果表明该方法可以快速准确地比较出样本间 EGT 产量高低,使原本需 3~4 天的工作缩短至 2~3 h, HPLC 验证结果显示, EGT-硫氰酸铁高通量快速检测体系效果良好,体系稳定。本研究结果将为高产 EGT 微生物的高通量筛选及高产 EGT 新菌株的选育提供新的方法和思路。

关键词:麦角硫因;高通量检测方法;高效液相色谱;灵芝

中图分类号:Q93-31

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)1-0114-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.1.015

A high-throughput detection method of ergothione in *Ganoderma* spp.

XU Qing-yuan¹, YOU Jun-jian¹, LIN Jun-fang^{1,2}, XUE Ling-na¹, YU Ying-hao¹, GUO Li-qiong^{1,2*}

¹College of Food Science, South China Agricultural University;

²Research Center for Microecological Agent Engineering and Technology of Guangdong Province, Guangzhou 510640, China

Abstract: EGT (ergothioneine) has a variety of important physiological functions in human body because of its strong antioxidant and low consumption rate. However, the existing EGT detection methods are time-consuming and the reagents & equipments required are expensive in the screening of high-producing EGT microorganisms and the breeding of new strains. In this study, based on the physical and chemical properties of EGT, a high-throughput rapid detection system of EGT-ferric thiocyanate was established. Meanwhile, *Ganoderma* spp. strains with different EGT production and new *Ganoderma* spp. fusion strains were selected to verify the accuracy of the detection system. The results showed that this method can quickly and easily determine the difference of EGT yield between samples and shorten the detection time from original 3-4 days to present 2-3 hours. HPLC verification results show that the EGT- ferric thiocyanate high-throughput rapid detection system is effective and stable. The results of this study provided a new method for high-throughput screening of EGT-producing microorganisms and the breeding of new strains with high EGT production.

Key words: ergothioneine; high throughput detection method; high performance liquid chromatography; *Ganoderma* spp.

麦角硫因(ergothioneine, EGT)又称为 2-巯基-L-组氨酸三甲基内盐,是存在于很多动植物体内含量丰富的天然氨基酸^[1],仅在部分微生物(放线菌、链霉菌)、蕈菌、某些蓝细菌中合成,不能由动物机体自身合成 EGT^[2],人体只能从食物中摄入并通过高特异性的有机阳离子转运蛋白 1 型(organic cation

transporter novel type-1, OCTN1)^[3]在各种细胞和组织中积累高浓度 EGT^[4]。EGT 被认为是一种很强的抗氧化剂, Servillo 等^[5]对其抗氧化机理进行了探讨,认为其拥有独特的氧化还原机制,并提出了一种 EGT 在细胞中的独特抗氧化作用。EGT 的标准氧化还原电位是-0.06 V,其它硫醇的电势一般在-0.32 V ~ -0.2V 之间,因此 EGT 在生理 pH 环境下比其他抗氧化剂更稳定,不易自发氧化^[6]。研究表明, EGT 具有多种重要的生理功能,如抗炎作用^[7];通过保护 DNA 实现的细胞保护功能^[8];通过促进神

收稿日期:2021-07-22 接受日期:2021-11-02

基金项目:国家自然科学基金(31772373, 32072646);广东省科技创新战略专项资金重点领域研发计划(2018B020205003)

*通信作者 Tel:86-013926003612; E-mail: guolq@scau.edu.cn

经细胞分化作用促进神经新生达到的抗抑郁功能^[9];通过抵抗氧化应激实现的眼睛保护功能^[10];通过中断与动脉粥样硬化发生相关的黏附分子表达实现的心脑血管保护功能^[11];通过抑制毒性达到的对神经退行性疾病的预防和治疗作用^[12]等,且本身具有安全性^[13,14],因此,EGT 在医药、食品和化妆品等行业具有广泛的应用前景。

EGT 生产方式有化学合成、食用菌提取及微生物发酵等,由于前两者成本较高,工序复杂,因此食用菌菌丝的深层发酵是目前 EGT 工业化生产的主流模式^[15],但自然菌株 EGT 产量低,需要通过育种技术培育 EGT 高产工业化菌种,培育工业食用菌菌种的方法有诱变育种^[16]、杂交育种^[17]、基因工程育种^[18]及原生质体融合育种^[19]等,但每种育种方法都需要进行多次、大样本量 EGT 含量检测,需说明的是,育种过程中 EGT 含量检测的意义更多在于比较样本间含量高低。目前 EGT 的检测方法有高效液相色谱法^[20,21]、高效毛细管电泳法^[22]和薄层电泳法^[23]等。使用最为广泛的是高效液相色谱法,该方法可以从物质复杂的体系中准确检测出 EGT 的含量,但高效液相色谱法有其明显缺陷,即需探索针对不同样品不同的检测条件,且由于 EGT 出峰时间晚,标品昂贵,在育种需从大量样本中筛选出高产样本的情况下会导致检测耗时过长,成本过高,极大地阻碍了 EGT 的开发与应用研究,因此,急需建立一种可准确测定样本间 EGT 浓度的高通量快速检测方法。

由于 EGT 具有强抗氧化性,2 价铁离子还原性适中(既不会受空气中氧气接触干扰,也不会因为还原性太弱导致指示性降低),EGT 能与 2 价铁离子反应生成无色螯合物,同时硫氰酸根离子与二价铁离子反应生成红色络合物,根据以上特点,本研究选用硫氰酸铁为还原剂,使用麦角硫因标准品与硫氰酸铁反应,旨在建立一种麦角硫因的高通量检测体系。同时以不同灵芝菌株 EGT 产量不同对该高通量检测体系进行验证。本研究结果将为高产 EGT 微生物的筛选及高产 EGT 新菌株的选育提供了新的方法和思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

灵芝菌株 NH8(元宝灵芝, *Ganoderma lucidum*)、NH11(盆景 3 号, *Ganoderma lucidum*)、NH12

(美国大灵芝, *Ganoderma resinaceum*)、NH13(黑芝, *Ganoderma sinense*)购于山东省寿光食用菌研究所;FQ16(硫因灵芝, *Ganoderma sessile*)为野外采集并由本实验室(华南农业大学食品学院精准营养与健康实验室)分离纯化菌株;灵芝融合子菌株 RS10、RS11、RS12、RS13、RS14、RS15、RS16 为本实验室培育。

1.1.2 试剂

硫氰酸铁 $\text{Fe}(\text{SCN})_3$ (CAS 登录号 4119-52-2)购自湖北广奥生物科技有限公司。麦角硫因标准品纯品购自天津诺信公司,纯度 99%。

1.1.3 仪器

本实验所用主要仪器如下:高效液相色谱仪 LC-2030(日本,株式会社岛津制作所);酶标分析仪 SAF-680T(上海巴玖实业有限公司);冷冻干燥机 FD-10-50(博医康);氮吹仪 NAI-DCY-12Y(上海那艾仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 麦角硫因标准品配制

使用分析天平准确称取麦角硫因标准品,使用一级水溶解并配置成 5 个质量浓度梯度溶液:0.022、0.011、0.005 5、0.002 7、0.002 2 mg/mL。每个质量浓度设置 3 个平行。

硫氰酸铁试剂按照固液比(g/mL)0.1:10 加入无水乙醇溶解,过膜 0.22 μm ,制得硫氰酸铁溶液(现配现用)。

先加入 10 μL 硫氰酸铁溶液于 96 孔板中,再加入 100 μL 麦角硫因标准品梯度溶液,吹打混合。使用酶标仪记录吸光度,酶标仪所用波长为 450 nm。

1.2.2 灵芝菌株 EGT 的提取

配置 PSB 培养基(马铃薯 200 g/L(煮汁),蔗糖 25 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g/L, NH_4Cl 2 g/L,自然 pH),250 mL 容量三角瓶分装 100 mL,加入约 20 颗玻璃珠,115 $^\circ\text{C}$ 高压湿热灭菌 30 min。从菌株平板上切取大小约为 0.5 cm $\times$ 0.5 cm 的菌丝块,接种至 PSB 培养基中,控制接种量为 5%,置于摇床,28 $^\circ\text{C}$,150 rpm 培养 4 天,获得种子液。

从种子液中吸取菌液至新的已分装好的无玻璃珠 PSB 培养基中,控制接种量为 5%,置于摇床,28 $^\circ\text{C}$,150 rpm 培养 10 天,每个菌株设置 3 平行。

预处理大孔树脂:称取大孔树脂 NKA-9 适量,使用无水乙醇浸泡 4 h 以上。使用一级水冲洗大孔树脂至无明显醇味,同时静置后水呈澄清透明,抽滤

收集大孔树脂,使用 1 M HCl 浸泡大孔树脂 4 h 以上。使用一级水冲洗大孔树脂至冲洗液 pH 呈中性,抽滤收集大孔树脂,使用 1 M NaOH 浸泡大孔树脂 4 h 以上。使用一级水冲洗大孔树脂至冲洗液 pH 呈中性,抽滤收集大孔树脂,加入一级水,于 4 ℃ 保存。

10 天后收取菌丝,过滤以将发酵液与菌丝分离,收集菌丝用 50 mL 蒸馏水冲洗,将菌丝移至培养皿中,45 ℃ 急速冷冻干燥 36 h。称取干燥后菌丝体 0.1 g,研磨粉碎,加入一级水 10 mL,300 W 超声提取 10 min。提取后置于 65 ℃ 水浴 30 min,使用过滤法收集上清液 4 mL,加入 70 % 乙醇 8 mL 和 1 % SDS 溶液 2 mL,4 ℃ 静置 12 h。

将静置后溶液常温离心 8 000 rpm,15 min,取

上清。使用氮吹仪,85 ℃,氮吹至 4 mL 以下,使用一级水定容样品至 4 mL,添加 1 g 预处理大孔树脂(抽滤收集),置于摇床,30 ℃、150 rpm 震荡 4 h,取 1 mL 样品加入 1 mL 氯仿混匀,30 ℃ 水浴 30 min,吸取上层液体至新的离心管中,加入等体积一级水进行稀释,使用 HCl 调节 pH 至 2,即为待测样品液。

1.2.3 EGT-硫氰酸铁体系对不同灵芝菌株的测验

选择麦角硫因产量不同的灵芝菌株(见表 1),按“1.2.2”中的培养和提取方法获得的待测样品 100 μL,加入已预先加入 10 μL 硫氰酸铁溶液的 96 孔板中,静置等待 30 min,观察颜色变化。麦角硫因含量越高的样品,显色越浅。在 450 nm 波长下检测吸光度,麦角硫因含量越高的样品,吸光度越小。每株灵芝菌株设置 3 个平行。

表 1 应用于 EGT-硫氰酸铁体系的灵芝菌株

Table 1 *Ganoderma* spp. strains applied in ferric thiocyanate-EGT system

编号 Number	拉丁文学名 Latin name	菌种来源 Source of strains
NH8	<i>G. lucidum</i>	山东省寿光市食用菌研究所
NH11	<i>G. resinaceum</i>	山东省寿光市食用菌研究所
NH12	<i>G. resinaceum</i>	山东省寿光市食用菌研究所
NH13	<i>G. sinense</i>	山东省寿光市食用菌研究所
FQ16	<i>G. sessile</i>	本实验室保藏

1.2.4 高效液相色谱法验证

高效液相色谱(high performance liquid chromatography,HPLC)检测条件:仪器使用岛津 LC-2030 高效液相色谱仪进行麦角硫因高效液相色谱检测,色谱柱为:Welch Ultimate HILIC Amphion II 色谱柱,检测波长为 257 nm,流动相为乙腈:水(85:15),流速 0.8 mL/min,进样量为 20 μL,柱温 30 ℃。麦角硫因标准曲线制作参考 Hu 等^[24]报道方法,采用上述 HPLC 检测条件进行检测,以 EGT 质量浓度(mg/g)为横坐标,HPLC 检测峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。

取 1 mL 经“1.2.2”方法取纯化后的菌丝提取液,经 0.22 μm 水系微孔滤膜过滤后,进行 HPLC 检测,每株灵芝菌株设置 3 个平行。得到样品中代表麦角硫因含量的峰面积,将峰面积代入上述麦角硫因标准曲线方程得到相应样品中麦角硫因含量,然后通过下式换算。

$$EGT(\text{mg/g DW}) = C \times 40$$

式中:C 代表通过麦角硫因标准曲线换算得到

的麦角硫因质量浓度值(mg/mL),EGT 为每克干重菌丝中麦角硫因含量。

1.2.5 EGT-硫氰酸铁体系应用于高产 EGT 灵芝新菌株的筛选

为检验 EGT-硫氰酸铁体系在育种实验中的实用性,将本实验室通过基因组重组技术获得的灵芝融合子新菌株 RS10、RS11、RS12、RS13、RS14、RS15、RS16 使用 EGT-硫氰酸铁体系进行高产 EGT 菌株的筛选。

2 结果与分析

2.1 EGT-硫氰酸铁体系的建立

使用不同浓度的 EGT 标准品溶液加入到硫氰酸铁的溶液中,结果表明硫氰酸铁的显色反应与 EGT 的浓度呈线性依赖关系,EGT 浓度越高颜色越浅,各处理浓度之间显色差异显著(见图 1A)。测定各样品 450 nm 处的吸光值,利用 GraphPad Prism 软件绘制其散点图(见图 1B),线性回归方程为 $y = -18.40x + 1.002$, R^2 值为 0.979 1,说明体系 $A_{450\text{ nm}}$ 值随着样品 EGT 浓度的增加而减少,趋势稳定,因

此可以推论各处理间通过 $A_{450\text{ nm}}$ 值测定判断样品中

的 EGT 含量的稳定性是可行的。

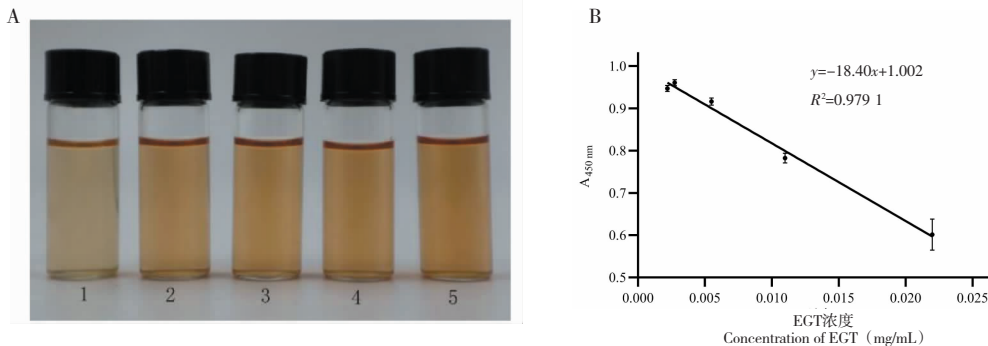


图1 不同质量浓度 EGT 与硫氰酸铁反应后的吸光值 $A_{450\text{ nm}}$

Fig. 1 Absorbance of EGT with different contents reacted with ferric thiocyanate

注:A;1~5 分别为 0.022、0.011、0.005 5、0.002 75、0.002 2 mg/mL EGT 标准品的 EGT-硫氰酸铁反应体系;B:EGT 标准品溶液浓度-体系 $A_{450\text{ nm}}$ 值线性拟合图。Note:A;1-5 are the EGT ferric thiocyanate reaction system of 0.022, 0.011, 0.005 5, 0.002 75, 0.002 2 mg/mL EGT standard respectively. B:The linear fitting diagram of solution concentration-system $A_{450\text{ nm}}$ value of EGT standard.

2.2 EGT-硫氰酸铁体系检测不同灵芝菌株中的 EGT 含量

为确定 EGT-硫氰酸铁体系的实际应用的可行性,将表 1 中灵芝菌株按照“1.2.2”方法进行处理,按照“1.2.3”方法应用本体系进行检测,得到表 1 各灵芝菌株对应的 450 nm 处吸光值显著性差异图(见图 2),图中显示,除了 FQ16 和 NH12EGT 产量差异不显著外,其余均有显著差异,而且吸光值大小与 EGT 含量呈负相关。可见所测菌株 $A_{450\text{ nm}}$ 值组间存在显著性差异($P < 0.05$),组内样本间差异较小。证明本方法可实际应用于菌株 EGT 浓度判断,能灵敏明确区分菌株 EGT 浓度的高低,体系稳定。

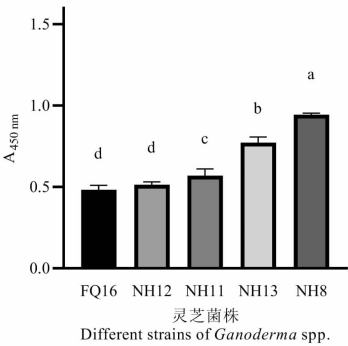


图2 EGT-硫氰酸铁体系检测不同灵芝菌株的 EGT 含量吸光值 $A_{450\text{ nm}}$

Fig. 2 Detection of EGT content and absorbance of different *Ganoderma* spp. strains by EGT- ferric thiocyanate system

注:图中 a~d 为样本间显著性差异标识,字母不同表示样本间 $P < 0.05$ 。Note:a-d are the mark of significant difference between samples, different letters indicate $P < 0.05$ between samples.

2.3 EGT-硫氰酸铁体系检测 EGT 含量的准确性验证

采用高效液相色谱法验证 EGT-硫氰酸铁体系的准确性。使用高效液相色谱仪测定不同浓度 EGT 标准品溶液的峰面积,绘制麦角硫因-峰面积标准曲线(见图 3)。

得出标准曲线: $C = \frac{S + 35714}{8 \times 10^7}$,式中 C 代表麦角硫因质量浓度(mg/mL), S 代表峰面积, $R^2 = 0.9999$,符合标准曲线标准,可用于通过峰面积计算 EGT 质量浓度。

使用与标准品溶液相同的色谱条件测定实验各灵芝菌株的 EGT 含量,使用 GraphPad Prism 绘制其峰面积值柱状图(见图 4),可见菌株 EGT 含量由 FQ16 至 NH8 依次降低,与高通量检测结果相符。

进一步对以上图 2 和图 4 的结果进行对比分析,结果见图 5,可见各灵芝菌株 EGT-硫氰酸铁体系的 $A_{450\text{ nm}}$ 值随着 EGT 浓度的增加而减小,且两种检测方法测得各样品 EGT 浓度高低趋势一致,EGT-硫氰酸铁体系检测结果组内差异更小,EGT 浓度相近的样品也能通过本体系吸光值准确反映出 EGT 含量高低,证明本体系检测结果正确可用,检测体系灵敏稳定。

2.4 EGT-硫氰酸铁体系在高产 EGT 灵芝新菌株筛选中的应用

将灵芝融合子新菌株分别用 EGT-硫氰酸铁体系法和高效液相色谱法检测 EGT 含量,反应体系颜色与色谱结果比对(见图 6),可见融合子菌株 EGT-

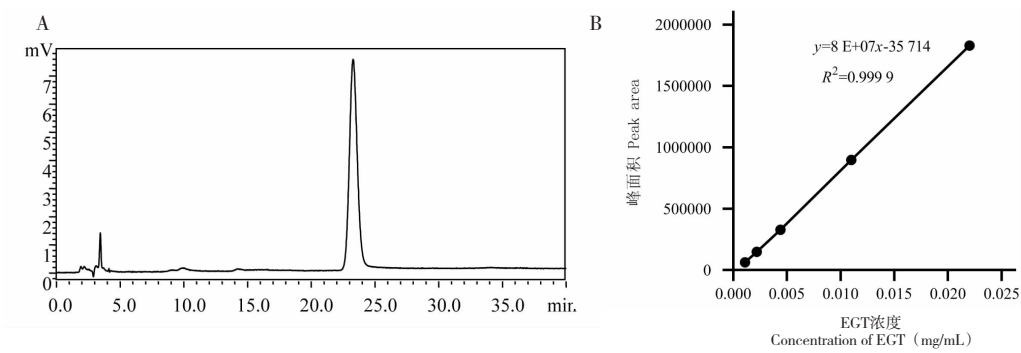


图3 麦角硫因标准品 HPLC 检测结果

Fig. 3 HPLC test results of ergothione standard

注:A;EGT 标准品液相色谱图,检测波长 257 nm;B;EGT 浓度(mg/mL)-峰面积标准曲线。Note:A;Liquid chromatogram of EGT standard,the detection wavelength is 257 nm B;EGT concentration (mg/mL)-peak area standard curve.

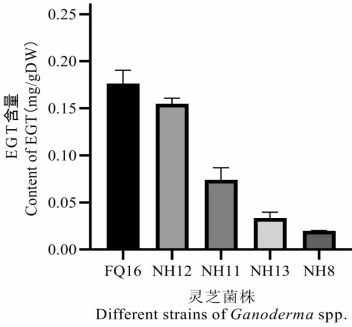


图4 高效液相色谱检测不同灵芝菌株的 EGT 含量

Fig. 4 Determination of EGT content of different *Ganoderma* spp. strains by high performance liquid chromatography

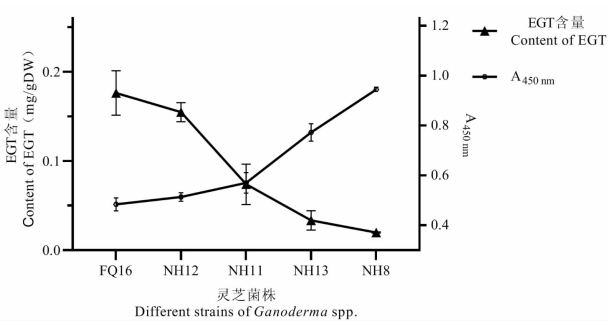


图5 不同灵芝菌株 EGT 含量两种检测方法结果对比

Fig. 5 Comparison of the results of two detection methods for EGT contents from *Ganoderma* spp. strains

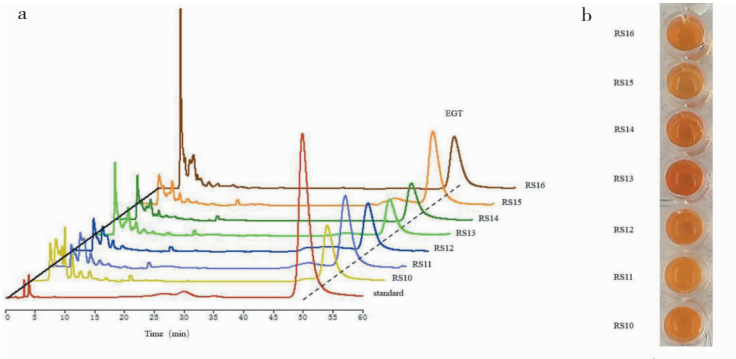


图6 灵芝融合子菌株 EGT 含量两种检测方法对比

Fig. 6 Comparison of two methods for detecting EGT content of *Ganoderma* spp. fusant strain

注:a:融合子 RS10-RS16 液相色谱图;b:高通量体系显色结果。

Note:a;Fusant RS10-RS16 liquid chromatogram;b;Color results of high throughput system.

硫氰酸铁反应体系颜色由深到浅依次为 RS13、RS14、RS16、RS12、RS10、RS15、RS11,与色谱图结果完全吻合,推论本体系方法适用于产 EGT 灵芝菌株育种过程 EGT 含量的检测比较。

3 讨论与结论

根据麦角硫因具有强还原性的理化性质,在构

建出 EGT-硫氰酸铁体系之前,还先后实验构建碱性高锰酸钾体系、溴甲酚绿体系、蓝瓶子亚甲基蓝体系、愈创木酚体系、氯化铁-EGT 体系,结果表明:碱性高锰酸钾体系因为稳定性低失败;溴甲酚绿体系显色结果因为与 pH 有关失败;蓝瓶子亚甲基蓝体系中,由于还原态亚甲基蓝的还原性太强,与空气中

的氧气接触也极易被氧化成亚甲基蓝,导致实验无现象而失败;愈创木酚体系同样因为还原性太强受氧气接触干扰而失败;氯化铁体系因为显色程度太低而失败。EGT-硫氰酸铁体系可以用于 EGT 高通量检测方法的研究。

EGT-硫氰酸铁检测体系构建过程中发现,待测样品按照普通 EGT 粗提方法即醇沉-氮吹-定容提取时,提取液中残留的酚类物质会影响体系的显色反应,降低体系的灵敏度,因此粗提液在氮吹定容后,需增加氯仿除酚步骤。

灵芝是我国传统名贵的药用真菌,含有多种生物活性物质和生理功能,其麦角硫因含量在众多食用菌中含量较高,但是作为商业化生产的菌株其产量还偏低,因此培育高产麦角硫因的灵芝新菌株具有重要的意义及实际应用价值,基于以上原因,本实验室通过原生质体融合再生,分离鉴定得到一批拟融合子,本方法验证过程使用的灵芝融合子,均来源于此。

本研究建立的方法基于 EGT 本身理化性质,检测体系灵敏稳定,适用于产 EGT 工业发酵菌株选育过程中,大批量样本的快速比较,且理论上只需经过简单的样品 EGT 提取优化,即可适用于绝大部分菌株 EGT 含量的高通量快速检测,打破了原有 EGT 研究检测的局限性,为 EGT 的整体开发应用研究提供了新的方法和思路。

参考文献

- Liu Q, Zhang WY, Jiang WX. Biosynthesis and catabolism of *L*-ergothioneine[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2015, 27: 1112-1117.
- Pan HY, Guo LQ, Lin JF. Recent advances in understanding the *in vivo* distribution and metabolism of ergothioneine and its roles in disease prevention[J]. Food Sci(食品科学), 2019, 40(23): 334-340.
- Halliwell B, Cheah IK, Drum CL. Ergothioneine, an adaptive antioxidant for the protection of injured tissues? A hypothesis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 470(2): 245-250.
- Tanaka N, Kawano Y, Satoh Y, et al. Gram-Scale fermentative production of ergothioneine driven by overproduction of cysteine in *Escherichia coli*[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 1895.
- Servillo L, Castaldo D, Casale R, et al. An uncommon redox behavior sheds light on the cellular antioxidant properties of ergothioneine[J]. Free Radic Biol Med, 2015, 79: 228-236.
- Cumming BM, Chinta KC, Reddy VP, et al. Role of ergothioneine in microbial physiology and pathogenesis[J]. Antioxid Redox Signal, 2018, 28: 431-444.
- Asahi T, Wu X, Shimoda H, et al. A Mushroom-Derived amino acid, ergothioneine, is a potential inhibitor of inflammation-related dna halogenation[J]. Biosci Biotech Biochem, 2016, 80: 313-317.
- Zhu BZ, Mao L, Fan R M, et al. Ergothioneine prevents copper-induced oxidative damage to dna and protein by forming a redox-inactive Ergothioneine-Copper complex[J]. Chem Res Toxicol, 2011, 24(1): 30-34.
- Nakamichi N, Nakayama K, Ishimoto T, et al. Food-derived hydrophilic antioxidant ergothioneine is distributed to the brain and exerts antidepressant effect in mice[J]. Brain Behav, 2016, 6(6): e477.
- Tang R, Cheah IK, Yew T, et al. Distribution and accumulation of dietary ergothioneine and its metabolites in mouse tissues[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 1601.
- Smith E, Ottosson F, Hellstrand S, et al. Ergothioneine is associated with reduced mortality and decreased risk of cardiovascular disease[J]. Heart, 2020, 106: 691-697.
- Song TY, Lin HC, Chen CL, et al. Ergothioneine and melatonin attenuate oxidative stress and protect against learning and memory deficits in C57Bl/6J mice treated with *D*-galactose[J]. Free Radic Res, 2014, 48: 1049-1060.
- Forster R, Spezia F, Papineau D, et al. Reproductive safety evaluation of *L*-ergothioneine[J]. Food Chem Toxicol, 2015, 80: 85-91.
- Turck D, Bresson JL, Burlingame B, et al. Statement on the safety of synthetic *L*-ergothioneine as a novel food-supplementary dietary exposure and safety assessment for infants and young children, pregnant and breastfeeding women[J]. EFSA J, 2017, 15(11): e5060.
- Han Y, Tang X, Zhang Y, et al. The current status of biotechnological production and the application of a novel antioxidant ergothioneine[J]. Crit Rev Biotechnol, 2021, 41: 580-593.
- Dong Y, Miao J, Cao Z, et al. UV mutagenization of protoplast for screening and breeding of high-yield organogermanium-producing strains of *Ganoderma lucidum*[J]. Food Sci(食品科学), 2009, 30(15): 188-192.
- Sheng-Rong L, Bin-Rong K, Wei-Rui Z, et al. Breeding of new *Ganoderma lucidum* strains simultaneously rich in polysaccharides and triterpenes by mating basidiospore-derived monokaryons of two commercial cultivars[J]. Sci Hortic-Amsterdam, 2017, 216: 58-65.
- Zhang DH, Li N, Yu X, et al. Overexpression of the homolo-

- gous lanosterol synthase gene in ganoderic acid biosynthesis in *Ganoderma lingzhi*[J]. *Phytochemistry*,2017,134:46-53.
- 19 He P, Yu M, Wang K, et al. Interspecific hybridization between cultivated morels *Morchella importuna* and *Morchella sextelata* by peg-induced double inactivated protoplast fusion[J]. *World J Microbiol Biotechnol*,2020,36(4):58.
- 20 Halliwell B, Cheah K, Tang R. Ergothioneine—A diet-derived antioxidant with therapeutic potential[J]. *Febs Lett*,2018,592:3357-3366.
- 21 Liu Q, Zhang W, Wang H, et al. Validation of a hplc method for the analysis of ergothioneine in fermentation broth[J]. *J Chromatogr Sci*,2016,54:934-938.
- 22 Sotgia S, Pisanu E, Pintus G, et al. Plasma *L*-ergothioneine measurement by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis after a pre-column derivatization with 5-iodoacetamidofluorescein(5-Iaf) and fluorescence detection[J]. *PLoS One*,2013,8(7):e70374.
- 23 Kaneko I, Takeuchi Y, Yamaoka Y, et al. Quantitative determination of ergothioneine in plasma and tissues by TLC-densitometry[J]. *Chem Pharm Bull*,1980,28:3093-3097.
- 24 Hu JJ, Zhang YX, Wang Y, et al. Optimization of extraction process of ergothioneine from *flamulina velutipes* by response surface methodology[J]. *Sci Technol Food Ind*(食品工业科技),2019,40(9):171-177.

Glabratephrin 通过抑制 P-糖蛋白逆转三阴性乳腺癌的阿霉素耐药

三阴性乳腺癌是最具侵略性的乳腺癌之一。目前首要的治疗方案是化疗,通常以蒽环类药物如阿霉素为主。然而,由于 P-糖蛋白(Pgp)的存在,化疗的疗效受到限制。Pgp 是一种膜转运蛋白,可以排出阿霉素,减少其细胞积累和疗效。因此,如何开发安全有效的药物抑制 Pgp 的活性是一个巨大的挑战。

来自意大利都灵大学的 Chiara Riganti 及其团队证明了一种来自灰毛豆的异戊二烯基黄酮 Glabratephrin (Glab)能增加阿霉素在高 Pgp 含量的三阴性乳腺癌细胞中的积累和细胞毒性。Glab 能够抑制表达 Pgp 的肿瘤的生长,且对阿霉素治疗没有额外明显的毒性。有趣的是,Glab 没有改变 Pgp 的表达,但它降低了 Pgp 对阿霉素的亲和力并且抑制其外排。分子对接预测,Glab 能够与 Pgp 跨膜结构中的两个残基(苯丙氨酸 322、谷氨酰胺 721)结合。定点突变确定了甘氨酸 185 是介导 Glab 诱导的 Pgp 催化效率降低的关键残基。该团队提出 Glab 是一种安全、有效的化合物,能够逆转三阴性乳腺癌中由 Pgp 介导的阿霉素耐药,为一种新的组合方法开辟了道路。相关研究发表在《*Pharmacological Research*》杂志上。

胡乃华编译自:<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661821005594>

原文标题:Glabratephrin reverses doxorubicin resistance in triple negative breast cancer by inhibiting P-glycoprotein