

4 种虫草相关真菌菌丝体粗多糖的生物活性评价

袁源^{1, 2*} 戚梦^{1, 2*} 张凤培^{1, 2} 刘钊³ 刘昆⁴ 吴小平^{1, 2}

张君丽⁵ 傅俊生^{1, 2*}

①福建农林大学生命科学学院 福建 福州 350002

②福建农林大学菌物研究中心 福建 福州 350002

③三明市农业农村局茶叶技术推广站 福建 三明 365099

④丽水市农业科学研究院 浙江 丽水 323000

⑤西藏自治区农牧科学院蔬菜研究所 西藏 拉萨 850000

摘要:本研究以细脚棒束孢、蛹虫草、蝉棒束孢和球孢白僵菌的菌丝体粗多糖为对象,分析4种虫草相关真菌菌丝体粗多糖含量与生物量的相关性,并进一步对其抗氧化能力和抗肿瘤活力进行评价。液体发酵结果表明,蝉棒束孢 MF12、MF13 和蛹虫草 MF27、MF1 的菌丝体粗多糖含量(>40mg/g)显著高于其他菌株,蝉棒束孢 MF11、MF13 和蛹虫草 MF27 菌丝体生物量(>12g/L)显著高于其他菌株,但相关性分析表明,4种虫草相关真菌10个菌株菌丝体的多糖含量与生物量之间没有显著相关性;抗氧化活性表明,蛹虫草 MF27、MF1 和球孢白僵菌 MF10 菌丝体粗多糖具有良好的体外抗氧化活性,其 EC₅₀ 均小于 0.9mg/mL;抗肿瘤活性表明,蛹虫草 MF1、MF28、MF27 和球孢白僵菌 MF10 菌丝体粗多糖在体外能有效抑制 HepG-2 细胞增殖,其 IC₅₀ 均小于 1.5mg/mL。综上,蛹虫草 MF27、MF1 和球孢白僵菌 MF10 虫草菌株具有良好的开发和应用潜力。

关键词: 虫草, 粗多糖, 抗氧化, 抗肝癌, 活性评价

[引用本文] 袁源, 戚梦, 张凤培, 刘钊, 刘昆, 吴小平, 张君丽, 傅俊生, 2021. 4 种虫草相关真菌菌丝体粗多糖的生物活性评价. 菌物学报, 40(6): 1446-1457

Yuan Y, Qi M, Zhang FP, Liu Z, Liu K, Wu XP, Zhang JL, Fu JS, 2021. Evaluation of the biological activities of four species of *Cordyceps* (*Isaria*, *Beauveria*) mycelial crude polysaccharides. *Mycosystema*, 40(6): 1446-1457

基金项目: 特色食用菌种质资源创新研究与菌种繁育关键技术集成示范 (XZ202001ZY0041N)

Supported by Innovative Research of Characteristic Edible Fungi Germplasm Resources and Integrated Demonstration of Key Techniques for Strain Breeding (XZ202001ZY0041N).

* Corresponding author. E-mail: fujunsheng81@163.com

* Contributed equally to this work.

Received: 2020-11-06, accepted: 2021-01-11

Evaluation of the biological activities of four species of *Cordyceps* (*Isaria*, *Beauveria*) mycelial crude polysaccharides

YUAN Yuan^{1, 2*} QI Meng^{1, 2*} ZHANG Feng-Pei^{1, 2} LIU Zhao³ LIU Kun⁴ WU Xiao-Ping^{1, 2}
ZHANG Jun-Li⁵ FU Jun-Sheng^{1, 2*}

①College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China

②Mycological Research Center, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China

③Promotion Station of Tea Technology, Sanming Agricultural and Rural Bureau, Sanming, Fujian 365099, China

④Lishui Academy of Agricultural Science, Lishui, Zhejiang 323000, China

⑤Tibet Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Lhasa, Tibet 850000, China

Abstract: The correlation between the content of crude polysaccharides and mycelial biomass of *Isaria tenuipes*, *Cordyceps militaris*, *Isaria cicadae* and *Beauveria bassiana* were analysed and antioxidant ability and anti-tumor activity of mycelial crude polysaccharides were evaluated. The results of liquid fermentation show that the mycelial crude polysaccharide content of *Isaria cicadae* MF12 and MF13 and *Cordyceps militaris* MF27 and MF1 are more than 40mg/g and significantly higher than that of other strains. The mycelial biomass of *Isaria cicadae* MF11 and MF13 and *Cordyceps militaris* MF27 are more than 12g/L and significantly higher than that of other strains. Correlation analysis shows that there is no significant correlation between mycelial biomass and crude polysaccharide content of 10 experimental strains. Antioxidant activity *in vitro* of *Cordyceps militaris* MF27 and MF1 and *Beauveria bassiana* MF10 mycelial crude polysaccharides are excellent, with EC₅₀ of less than 0.9mg/mL. The mycelial crude polysaccharides of *Cordyceps militaris* MF1, MF28 and MF27 and *Beauveria bassiana* MF10 can effectively inhibit the proliferation of HepG-2 cells *in vitro*, with IC₅₀ of less than 1.5mg/mL, suggesting that *Cordyceps militaris* MF27 and MF1 and *Beauveria bassiana* MF10 have a good development and application potential.

Key words: *Cordyceps*, crude polysaccharides, antioxidant, anti-liver cancer, activity evaluation

虫草菌是广义虫草属 *Cordyceps s.l.* 真菌的统称, 其种类繁多且分布广泛, 主要寄生于昆虫、少数植物和真菌中 (董彩虹等 2016)。世界上已报道约 500 种虫草菌, 国内报道的虫草菌约 120 种, 常见的虫草菌有冬虫夏草 *Ophiocordyceps sinensis* (Berk.) G.H. Sung *et al.*、蛹虫草 *Cordyceps militaris* (L.) Fr.

蝉棒束孢 *Isaria cicadae* Miq.、细脚棒束孢 *Isaria tenuipes* Peck. 和球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. 等 (梁宗琦 2007; 张姝等 2013)。虫草菌富含多糖、腺苷以及虫草酸等活性物质, 具有丰富的营养价值和较高的药用功效 (戴玉成和杨祝良 2008; 戴玉成等 2010; 吴子聪 2019), 受到越来越多

的消费者的青睐，需求量也逐年攀升（左锦辉等 2018）。然而，野生虫草资源匮乏，加之环境资源的破坏，其产量难以满足人们逐年增长的需求。研究发现液体深层发酵技术可通过液体发酵培养虫草快速制备大量菌丝体，以促进虫草资源的开发和利用，如百令胶囊和金水宝胶囊分别是虫草菌中华被毛孢 *Hirsutella sinensis* 和蝙蝠蛾拟青霉 *Paecilomyces hepiali* 通过液体发酵的菌丝体加工制备而成的产品（吴玲芳等 2014；刘建兵等 2018）。

在正常条件下，自由基在体内的产生和消除处于动态平衡，当体内自由基过度积累时往往会引起细胞内蛋白质、脂质过氧化以及核酸断裂，容易诱发肝癌等癌症的发生（张亦凡等 2013）。肝癌是我国一种常见癌症，

其发生率在癌症中排名第 4，死亡率排名第 3，仅次于胃癌和食管癌（王宁等 2019）。虫草菌中含有多种抑癌活性物质，多糖是其主要活性物质之一，具有抗肿瘤、增强免疫力、抗氧化和降血糖等功效（杨建鑫和李向阳 2019）。Jayakumar *et al.*（2014）发现冬虫夏草菌丝体多糖 CME-1 在体外可以抑制黑色素瘤细胞 B16-F10 的迁移。本研究通过对 4 种虫草相关真菌菌丝体粗多糖含量及其体外生物学活性进行测定分析，为虫草优质菌株的筛选和开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和细胞：本研究以 4 种虫草相关真菌为试验材料，详细信息见表 1。HepG-2：

表 1 菌株信息

Table 1 Information of experimental strains

菌株编号 Number of strains	种类 Species	菌株来源及地点 Source and location of strains	GenBank 登录号 GenBank accession number
MF7	细脚棒束孢 <i>Isaria tenuipes</i>	浙江云和县凤凰山 Fenghuang Mountain, Yunhe County, Zhejiang Province	MG559659
MF9	细脚棒束孢 <i>I. tenuipes</i>	浙江丽水市南明山 Nanming Mountain, Lishui City, Zhejiang Province	MG559660
MF14	细脚棒束孢 <i>I. tenuipes</i>	浙江丽水市白云山 Baiyun Mountain, Lishui City, Zhejiang Province	MG559661
MF1	蛹虫草 <i>Cordyceps militaris</i>	本实验室研究用菌株，福建 Laboratory, Fujian Province	MF377346
MF27	蛹虫草 <i>C. militaris</i>	本实验室研究用菌株，福建 Laboratory, Fujian Province	MF379055
MF28	蛹虫草 <i>C. militaris</i>	菌誉食用菌科技有限公司，山东 Junyu Edible Fungus Technology Co., Ltd., Shandong Province	MF379054
MF11	蝉棒束孢 <i>I. cicadae</i>	浙江丽水市下东方村 Xiadongfang Village, Lishui City, Zhejiang Province	MG559662
MF12	蝉棒束孢 <i>I. cicadae</i>	浙江丽水市下东方村 Xiadongfang Village, Lishui City, Zhejiang Province	MG559663
MF13	蝉棒束孢 <i>I. cicadae</i>	浙江丽水市下东方村 Xiadongfang Village, Lishui City, Zhejiang Province	MG559664
MF10	球孢白僵菌 <i>Beauveria bassiana</i>	浙江丽水市白云山 Baiyun Mountain, Lishui City, Zhejiang Province	MG559665

肝癌细胞, 购自赛百慷生物技术股份有限公司。

1.1.2 试剂: 胎牛血清 FBS (四季青); RPMI 1640 培养液 (Gibco 公司); 四甲基偶氮唑盐 MTT (Sigma 公司); ABTS、水杨酸、抗坏血酸、硫酸、苯酚等试剂均为国产分析纯。

1.2 菌丝体生物量测定

1.2.1 PDB 加富培养基: 200g 马铃薯、20g 葡萄糖、5g 胰蛋白胨、2g 硫酸镁、1.5g 磷酸二氢钾、10mg VB₁、1L 水, pH 自然。

1.2.2 培养条件: 将同期活化的 4 种虫草相关真菌, 采用直径为 0.7cm 的打孔器接种 4 块于 100mL 的 PDB 加富培养基, 置于温度 25℃、转速 160r/min 摇床避光培养 13d, 每个菌株 3 个重复。

1.2.3 生物量测定: 对 4 种虫草相关真菌菌丝体与发酵液进行抽滤分离, 菌丝体置于烘箱中 60℃ 烘干至恒重, 称量并记录菌丝体干重。

1.3 菌丝粗多糖提取

1.3.1 培养条件: 将活化的 4 种虫草相关真菌按照 1.2.2 方法进行培养, 待培养结束后过滤收集菌丝体, 用蒸馏水清洗 3 遍, 于烘箱中 60℃ 烘干备用。

1.3.2 菌丝体粗多糖提取: 参照戚梦等(2018)的方法, 并稍做修改。使用粉碎机将 4 种虫草相关真菌菌丝体打磨成粉末, 过 100 目筛, 按液料比 100:1 加入 85%乙醇超声提取 2h, 离心取沉淀, 再按液料比 30:1 加入去离子水, 置于 98℃ 水浴 2h, 将滤液减压浓缩为初始体积的 1/3, 加入无水乙醇稀释至 80%, 4℃ 条件下静置 24h, 通过 Sevage 法除蛋白, 流水透析 48h, 冷冻干燥获得粗多糖。

1.4 菌丝体粗多糖含量检测

参照刘城移等(2020)的方法配制葡萄糖标准溶液, 由标准曲线可获得回归方程: $Y=5.4088X+0.0258$, $R^2=0.9973$ 。配制浓度为

1.0mg/mL 的粗多糖样品溶液, 采用苯酚-硫酸法测定 490nm 下吸光值, 依据回归方程计算菌丝体粗多糖含量(戚梦等 2018)。

1.5 菌丝体粗多糖抗氧化研究

1.5.1 样品处理: 准确称量 20mg 菌丝体粗多糖, 溶于 10mL 去离子水配置成 2mg/mL 的虫草菌丝体粗多糖溶液, 用去离子水将其依次稀释为 0.3、0.5、0.8、1mg/mL 虫草菌丝体粗多糖溶液。

1.5.2 ABTS 自由基清除能力测定: 参照 Miller *et al.* (1993) 的方法, 并稍做修改。混匀 7.0mmol/L ABTS 溶液和 2.45mmol/L 过硫酸钾溶液, 置于 25℃ 黑暗保存 12–16h 可得到 ABTS⁺母液。将 ABTS⁺母液稀释至吸光值在波长 734nm 处为 0.70 ± 0.023 , 进一步在 30℃ 条件下静止 30min 即可获得 ABTS⁺工作液。各取 10μL 浓度为 0.3、0.5、0.8、1、2mg/mL 的虫草菌丝体粗多糖溶液和 75μL ABTS⁺工作液, 依次加入 96 孔板中, 充分混匀后 25℃ 避光放置 20min, 于 734nm 波长处测定吸光值。每个浓度设定 3 个重复, 测定平均值。依据如下公式计算清除率。

$$\text{ABTS 自由基清除率}(\%)=[1-(A_{\text{样品}}-A_{\text{对照}})/A_{\text{空白}}]\times 100$$

其中 $A_{\text{样品}}$ 为添加不同浓度粗多糖溶液体系的吸光值, $A_{\text{对照}}$ 为以去离子水替代 ABTS 工作液体系的吸光值, $A_{\text{空白}}$ 为以去离子水替代不同浓度粗多糖溶液体系的吸光值。

1.5.3 羟自由基清除能力测定: 依据 Smirnoff & Cumbes (1989) 的方法, 并稍做修改。在 96 孔板中加入浓度为 0.3、0.5、0.8、1、2mg/mL 的粗多糖溶液 75μL, 加入相同体积的反应体系 (8.8mmol/L H₂O₂, 9mmol/L Fe²⁺, 9mmol/L 水杨酸-乙醇溶液) 各 15μL, 置于 37℃ 恒温反应 30min, 置于 510nm 波长处测量吸光值 $A_{\text{样品}}$ 。以 15μL 去离子水替代样品溶液和 H₂O₂ 溶液测定吸光值分别为 $A_{\text{空白}}$ 和 $A_{\text{对照}}$ 。每个浓度设定 3 个平行, 求平均值。根据 1.5.2 公式

计算不同浓度的菌丝体粗多糖对羟自由基的清除率。

1.6 菌丝体粗多糖对肝癌 HepG-2 细胞的增殖抑制作用

1.6.1 样品处理: 准确称量 20mg 菌丝体粗多糖溶于 10mL 含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养液, 配成 2mg/mL 的粗多糖溶液, 过 0.22 μ m 过滤器除菌, 并使用相同的完全培养液将其依次稀释为 0.3、0.5、0.8、1mg/mL 粗多糖溶液。

1.6.2 细胞培养: 参照戚梦等 (2018) 的方法, 使用含 10% FBS 的细胞培养液对 HepG-2 细胞进行培养, 置于细胞培养箱中培养至对数生长期。

1.6.3 MTT 法检测肝癌细胞的体外增殖抑制作用: 参照刘城移等 (2020) 的方法, 使用浓度为 2.5mg/mL 的胰酶将对数生长期的细胞消化至悬浮, 离心去上清, 加入培养基制备成 2×10^4 个/mL 的细胞悬液。将细胞悬液按照 100 μ L/孔的体积加到 96 孔板, 边缘用无菌 PBS 填充, 置于 5% CO₂、37℃ 的细胞培养箱中恒温孵育大约 48h, 直到细胞贴壁, 处理组分别加入 100 μ L 不同浓度的菌丝体粗多糖 (0.3、0.5、0.8、1、2mg/mL), 对照组细胞加入完全培养基, 空白组加入不含细胞的完全培养基, 每组设定 4 个复孔, 置于 5% CO₂、37℃ 条件下培养 24h。培养结束后去上清, 每孔各加入 5mg/mL 的 MTT 溶液 20 μ L, 完全培养基 180 μ L, 再培养 4h 后去上清, 每孔分别加入二甲基亚砜 200 μ L, 置于 37℃ 振荡混匀 15min, 在波长 570nm 处测定吸光值, 并按照以下公式测定细胞存活率。

$$\text{细胞存活率}(\%) = (\text{OD}_{\text{处理组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}) / (\text{OD}_{\text{对照组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}) \times 100\%$$

1.7 相关性分析

采用 SPSS 23.0 软件进行 Pearson 相关性分析, 相关系数 R 越大, 相关性越强。当 R 大于 0.6, $P < 0.05$ 表示有显著相关性。

1.8 统计学分析

参照刘建兵等 (2018) 的方法, 采用 SPSS 23.0 软件对数据进行显著性分析, 不同处理组间比较采用 one-way ANOVA 检验, $P < 0.05$ 表示有显著差异, $P < 0.01$ 表示有极显著差异。采用 GraphPad Prism 8 软件计算 EC₅₀ 值 (半数清除率的浓度) 和 IC₅₀ (半数抑制率的浓度)。

2 结果与分析

2.1 发酵生物量分析

本研究对 4 种虫草相关真菌菌丝体生物量进行比较, 发现不同虫草菌生物量差异较大。蝉棒束孢 MF13 和 MF11 菌丝生物量大于 17g/L, 极显著高于其他虫草菌; 蛹虫草 MF27 菌丝生物量大于 12g/L, 显著高于其他虫草菌, 表明蝉棒束孢 MF13、MF11 和蛹虫草 MF27 生长活力较为旺盛 (图 1)。

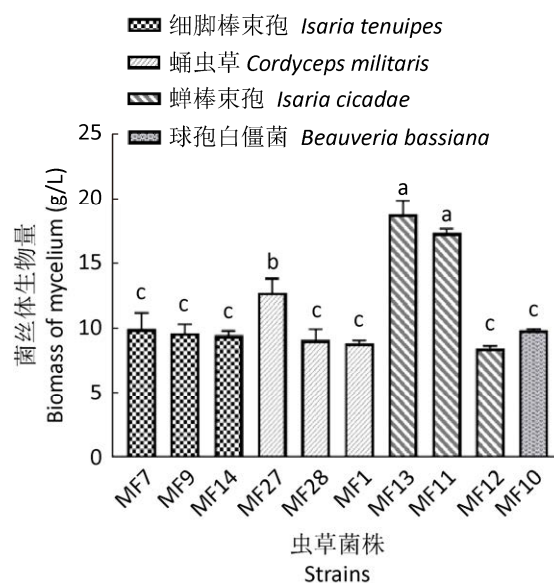


图 1 虫草菌丝体生物量 小写字母表示不同菌株菌丝体生物量差异显著 ($P < 0.05$)。图 2 同

Fig. 1 The mycelial biomass of experimental strains. Different lowercase characters suggest significant difference in mycelial biomass of different strains ($P < 0.05$). Fig. 2 is the same.

2.2 菌丝体粗多糖含量分析

多糖是虫草菌中一种主要的活性物质，本研究比较了 4 种虫草相关真菌菌丝体粗多糖含量。4 种虫草相关真菌菌丝体粗多糖含量较高，均大于 25mg/g。其中，蝉棒束孢 MF12、MF13 和蛹虫草 MF27、MF1 菌丝体粗多糖含量显著高于其他虫草菌，均大于 40mg/g，表明蝉棒束孢 MF12、MF13 和蛹虫草 MF27、MF1 菌丝体粗多糖含量较高（图 2）。

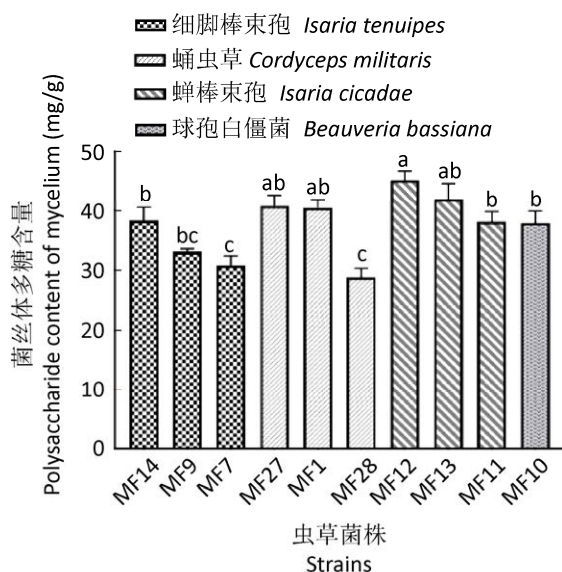


图 2 虫草菌丝体粗多糖含量

Fig. 2 The crude polysaccharide content of mycelium of experimental strains.

2.3 菌丝体生物量与粗多糖含量的相关性分析

为了探究虫草菌丝体生物量和粗多糖含量的关系，实验进一步对 4 种虫草相关真菌菌丝体生物量与粗多糖含量进行相关性分析。通过相关性分析发现虫草菌丝体生物量与粗多糖含量相关系数 R 为 0.268，小于 0.6， P 大于 0.05，说明菌丝体生物量与粗多糖含量没有显著相关性（图 3）。

2.4 菌丝体粗多糖体外抗氧化活性比较

2.4.1 羟自由基清除效果：羟自由基氧化效率

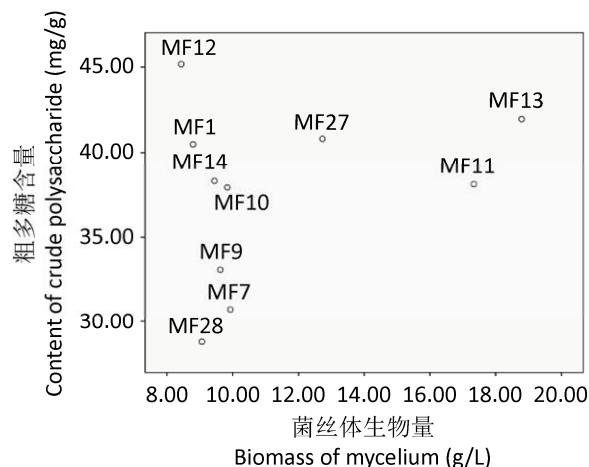


图 3 菌丝体生物量与粗多糖含量的相关性分析

Fig. 3 Correlation analysis between mycelial biomass and crude polysaccharide content.

高、反应速度快，并且寿命极短，是一种强氧化剂，严重危害生物体健康（Zhang *et al.* 2016）。本研究使用 Fenton 反应测定虫草菌丝体粗多糖对羟自由基清除能力，该反应体系中水杨酸能与羟自由基反应并生成有色物质，在 510nm 波长处有最大吸收值（孟歌等 2018）。相应的，抗氧化活性物质可降低体系中的有色物质，通过测定吸光值可测定该物质的清除能力（Smirnoff & Cumbes 1989）。实验以 VC 作为阳性对照，探究了 4 种虫草相关真菌菌丝体粗多糖对羟自由基的清除能力。结果发现 VC 的 EC_{50} 值为 0.368mg/mL，4 种虫草相关真菌菌丝体粗多糖的 EC_{50} 值从低到高分别为蛹虫草 MF27（0.73mg/mL）、球孢白僵菌 MF10（0.741mg/mL）、蛹虫草 MF1（0.782mg/mL）、蝉棒束孢 MF13（1.032mg/mL）、细脚棒束孢 MF14（1.14mg/mL）、蝉棒束孢 MF12（1.389mg/mL）、蝉棒束孢 MF11（1.396mg/mL）、蛹虫草 MF28（1.418mg/mL）、细脚棒束孢 MF7（1.418mg/mL）、细脚棒束孢 MF9（>2.0mg/mL），其中 MF27、MF10 和 MF1 的 EC_{50} 值均小于 0.8mg/mL，提示蛹虫草 MF27、MF1 和球孢白僵菌 MF10 菌丝体粗多糖对羟自由基的清

除能力较好（表 2）。

2.4.2 ABTS 自由基清除效果: ABTS 溶于水会氧化为蓝绿色 ABTS⁺, 在波长 734nm 下具有最大吸收值（孟歌等 2018）。抗氧化活性物质能促进 ABTS⁺自由基还原成为 ABTS, 导致溶液颜色变浅, 吸光值下降（吴子聪等 2019）。以 VC 作为对照, 探索了 4 种虫草相关真菌菌丝体粗多糖对 ABTS 自由基的清除能力（表 3）。结果发现 VC 的 EC₅₀ 值为 0.290mg/mL, 4 种虫草相关真菌菌丝体粗多糖的 EC₅₀ 值从低到高依次为蛹虫草 MF1（0.537mg/mL）、蛹虫草 MF27（0.61mg/mL）、蛹虫草 MF28（0.847mg/mL）、球孢白僵菌 MF10（0.851mg/mL）、蝉棒束孢 MF11（0.996mg/mL）、蝉棒束孢 MF13（1.01mg/mL）、蝉棒束孢 MF12（1.42mg/mL）、

细脚棒束孢 MF9（>2.0mg/mL）、细脚棒束孢 MF14（>2.0mg/mL）、细脚棒束孢 MF7（>2.0mg/mL），其中 MF1、MF27、MF28 和 MF10 的 EC₅₀ 均小于 0.9mg/mL, 提示蛹虫草和球孢白僵菌菌丝体粗多糖对 ABTS 自由基清除效果较好。基于上述抗氧化实验结果表明蛹虫草和球孢白僵菌虫草菌丝体粗多糖具有良好的抗氧化活性。

2.5 菌丝体粗多糖抗肝癌 HepG-2 细胞增殖能力

实验进一步对 4 种虫草相关真菌菌丝体粗多糖体外抑制 HepG-2 细胞增殖活性进行比较, 发现不同种类的虫草活性差异较大。细脚棒束孢 MF7、MF9 和 MF14 菌丝体粗多糖的活性较差, 其对肝癌 HepG-2 细胞的 IC₅₀

表 2 虫草菌丝体粗多糖对羟自由基的清除能力

Table 2 Scavenging ability of mycelial crude polysaccharides of experimental strains on hydroxyl free radical

种类 Species	菌株 Strain	羟自由基清除率 Scavenging rate of hydroxyl radical (mg/mL)					EC ₅₀ (mg/mL)
		0.3	0.5	0.8	1	2	
阳性对照 Positive control	VC	44.44±1.96	56.66±0.91**	82.20±0.72**	92.99±0.64**	96.22±0.58**	0.368
细脚棒束孢 <i>Isaria tenuipes</i>	MF7	7.13±0.61	10.53±2.33	35.21±2.89**	43.29±4.72*	57.34±3.87**	1.418
	MF9	3.25±0.92	11.58±2.89	13.47±5.17	23.96±1.25*	43.10±9.64**	>2.0
	MF14	27.12±3.27	36.47±1.95**	46.61±2.21**	51.86±0.13*	55.42±0.93	1.14
蛹虫草 <i>Cordyceps militaris</i>	MF1	18.55±6.38	35.59±3.70**	50.80±1.43**	58.60±6.02	79.81±1.12**	0.782
	MF27	21.12±3.00	31.86±1.84**	52.87±3.96**	69.03±1.31**	79.26±1.82**	0.73
	MF28	22.25±3.27	34.00±3.08**	54.66±4.18**	62.86±2.46**	78.79±2.04**	1.418
蝉棒束孢 <i>I. cicadae</i>	MF11	13.59±2.82	23.54±1.49**	36.53±1.91**	46.36±2.23**	55.84±1.53**	1.396
	MF12	28.45±1.19	40.91±1.26**	46.14±3.02**	49.07±2.35	50.36±0.49	1.389
	MF13	16.51±2.75	31.98±0.63**	41.49±0.36**	49.80±2.08**	57.37±1.17**	1.032
球孢白僵菌 <i>Beauveria bassiana</i>	MF10	17.02±0.59	32.90±1.86**	56.87±2.20**	67.28±2.06**	77.71±2.36**	0.741

注：与前一浓度相比，*P<0.05，**P<0.01

Note: Compared to the previous concentration, *P<0.05, **P<0.01.

值均大于 2mg/mL; 蝉棒束孢 MF11 和 MF13 对 HepG-2 细胞有一定的增殖抑制作用, IC₅₀ 值均小于 1.6mg/mL; 蛹虫草 MF1、MF28、MF27 和球孢白僵菌 MF10 菌丝体粗多糖对 HepG-2

细胞抑制率较好, 其 IC₅₀ 值均小于 1.5mg/mL。由此表明, 蛹虫草 MF1、MF28、MF27 和球孢白僵菌 MF10 菌丝体粗多糖在体外具有良好的抑制肝癌细胞增殖的能力 (表 4)。

表 3 虫草菌丝体粗多糖对 ABTS 自由基的清除能力

Table 3 Scavenging ability of mycelial crude polysaccharides of experimental strains on ABTS free radical

种类 Species	菌株 Strain	ABTS 自由基清除率 Scavenging rate of ABTS radical (mg/mL)					EC ₅₀ (mg/mL)
		0.3	0.5	0.8	1	2	
阳性对照 Positive control	VC	52.54±2.17	75.89±0.77**	94.96±0.06**	95.91±0.02	97.97±0.03*	0.290
细脚棒束孢 <i>Isaria tenuipes</i>	MF9	9.76±1.93	14.76±1.13*	23.07±2.16**	26.47±1.83	41.97±4.20**	>2.0
	MF7	9.91±1.94	13.41±0.48	18.57±1.67*	22.30±2.79	36.05±4.70**	>2.0
	MF14	14.46±2.37	21.61±1.99*	30.60±5.15**	31.68±2.59	41.08±2.28**	>2.0
蛹虫草 <i>Cordyceps militaris</i>	MF1	29.91±2.92	47.46±4.51**	62.69±2.93**	72.77±3.63**	87.72±0.94**	0.537
	MF27	28.73±1.56	37.23±1.05**	66.40±1.41**	68.95±1.51	80.13±1.46**	0.61
	MF28	23.41±2.15	35.34±2.92**	46.01±2.30**	58.84±4.14**	71.21±3.36**	0.847
蝉棒束孢 <i>I. cicadae</i>	MF11	17.11±0.88	30.89±0.89**	45.49±1.06**	54.86±4.53**	65.35±2.95**	0.996
	MF12	11.36±2.55	19.48±1.22**	28.53±3.07**	47.95±0.97**	57.43±2.78**	1.42
	MF13	20.87±6.52	36.85±5.66**	47.22±1.53*	49.85±5.41	63.34±3.92**	1.01
球孢白僵菌 <i>Beauveria bassiana</i>	MF10	25.83±1.67	31.76±1.21*	48.24±2.73**	55.72±2.38**	72.60±3.75**	0.851

注: 与前一浓度相比, *P<0.05, **P<0.01

Note: Compared to the previous concentration, *P<0.05, **P<0.01.

表 4 菌丝体粗多糖体外抑制肝癌 HepG-2 细胞增殖活性

Table 4 The activity of HepG-2 cell proliferation was inhibited by mycelial crude polysaccharide *in vitro*

种类 Species	菌株 Strain	细胞抑制率 Cell inhibition rate (mg/mL)					IC ₅₀ (mg/mL)
		0.3	0.5	0.8	1	2	
细脚棒束孢 <i>Isaria tenuipes</i>	MF7	6.18±0.70	13.49±1.45**	19.91±0.65**	28.36±1.28**	35.84±0.58**	>2.0
	MF9	9.96±0.26	13.04±0.73**	20.37±0.64**	25.71±0.40**	31.98±1.13**	>2.0
	MF14	3.08±0.30	11.32±0.51**	13.84±0.33**	20.86±0.84**	37.87±0.82**	>2.0
蛹虫草 <i>Cordyceps militaris</i>	MF1	26.05±1.81	30.18±1.21**	48.94±1.20**	54.05±2.12**	68.46±0.47**	0.909
	MF27	3.72±1.31	6.36±1.39*	14.52±0.96**	35.12±1.05**	66.99±0.72**	1.458
	MF28	4.60±0.32	12.16±0.36**	28.70±0.51**	56.96±0.59**	60.62±0.33**	1.279
蝉棒束孢 <i>I. cicadae</i>	MF11	4.15±0.85	10.03±0.04**	16.61±0.90**	44.61±0.34**	55.54±1.61**	1.573
	MF12	12.38±0.39	21.25±1.57**	26.15±0.22**	31.50±1.07**	46.67±1.59**	>2.0
	MF13	5.61±2.52	12.84±2.92*	25.59±1.45**	38.87±3.49**	57.64±4.06**	1.531
球孢白僵菌 <i>Beauveria bassiana</i>	MF10	8.01±3.17	19.86±0.80**	30.06±0.52**	44.97±1.06**	78.36±0.32**	1.101

注: 与前一浓度相比, *P<0.05, **P<0.01

Note: Compared to the previous concentration, *P<0.05, **P<0.01.

3 讨论

虫草是珍贵的食药食用菌,因其较高的保健价值成为当下研究的热点。然而,目前虫草菌种繁杂且市场管理混乱,没有系统的质量评价标准,不利于虫草资源的开发和应用。因此,对不同种类的虫草菌进行科学的质量评价就显得尤为重要。虫草多糖是评价优良虫草菌株的一个重要指标(于海洋等 2017)。研究结果发现,在 4 种虫草相关真菌中,蝉棒束孢 MF12、MF13 和蛹虫草 MF27、MF1 菌丝体粗多糖含量显著高于其他菌株,均大于 40mg/g。于浩翰等(2007)研究报道灵芝液体发酵培养的菌丝体生物量与粗多糖的相关性较小,本研究结果同样发现虫草菌丝体生物量与粗多糖含量没有显著相关性。

蛹虫草是虫草属真菌的模式种,课题组刘建兵等(2018)发现蛹虫草 MF27 的发酵液中虫草素含量为 332.74mg/L,并且其菌糠多糖、发酵液、菌丝体和子实体的水提物以及醇提物对 DPPH 自由基和羟自由基具有良好的清除能力(戚梦等 2019;刘城移等 2020)。因此,本研究进一步对 4 种虫草相关真菌菌丝体粗多糖对羟自由基和 ABTS 自由基的抗氧化能力进行比较,发现蛹虫草 MF27、MF1 和球孢白僵菌 MF10 菌丝体粗多糖对羟自由基和 ABTS 自由基的 EC_{50} 值均小于 0.9mg/mL。张命龙等(2015)发现蛹虫草菌丝多糖对 DPPH 自由基、羟自由基和超氧阴离子自由基的 EC_{50} 值分别为 3.51、7.01 和 19.90mg/mL。汪建中等(2014)研究发现杏鲍菇菌丝体粗多糖对 DPPH 自由基和羟自由基的 EC_{50} 值为 4.15mg/mL 和 1.31mg/mL。刘城移等(2020)研究发现蝉虫草菌丝体多糖对羟自由基和 ABTS 自由基的 EC_{50} 值分别为 3.71mg/mL 和 2.83mg/mL。本研究 MF27、

MF1 和 MF10 菌丝体粗多糖对羟自由基和 ABTS 自由基的 EC_{50} 值均小于上述蛹虫草、杏鲍菇以及蝉虫草菌丝体多糖的 EC_{50} 值,表明蛹虫草 MF27、MF1 和球孢白僵菌 MF10 菌丝体粗多糖具有良好的体外抗氧化能力。

研究表明,虫草菌丝体粗多糖具有良好的体外抗肿瘤活性,如朱俭勋等(2017)发现蛹虫草粗多糖和桑黄粗多糖均能在体外抑制肺腺癌细胞 A549 的增殖。Zhu *et al.* (2016)同样发现冬虫夏草菌丝体粗多糖具有较强的体外抗肿瘤活性,能有效抑制小鼠肿瘤细胞 S180 的增殖。因此,本研究对 4 种虫草相关真菌菌丝体粗多糖体外抗肝癌活性进行比较分析,发现 4 种虫草相关真菌菌丝体粗多糖的抗肝癌活性存在一定的差异。其中,蛹虫草 MF1 菌丝体粗多糖对 HepG-2 细胞的抑制作用最强,其 IC_{50} 值为 0.909mg/mL,蛹虫草 MF28 和 MF27 菌丝体粗多糖对 HepG-2 细胞的 IC_{50} 值均小于 1.5mg/mL。同时,球孢白僵菌 MF10 菌丝体粗多糖对 HepG-2 细胞的 IC_{50} 值为 1.101mg/mL。目前对球孢白僵菌的研究主要集中在生物防控方面,而对其抗氧化和抗肿瘤活性方面的研究较少(徐毓笛等 2020)。前期实验室通过筛选发现球孢白僵菌 MF10 采用乙酸乙酯萃取的活性部位对三阴性乳腺癌细胞的增殖抑制以及促凋亡作用最强(刘鑫等 2017)。刘城移等(2020)研究发现蝉虫草 MF38 菌丝体多糖对 HepG-2 细胞的 IC_{50} 值为 3.23mg/mL,表明蛹虫草 MF1、MF28、MF27 和球孢白僵菌 MF10 菌丝体粗多糖能有效抑制 HepG-2 细胞增殖。综上,在 4 种虫草相关真菌中蛹虫草 MF27、MF1 和球孢白僵菌 MF10 为高抗氧化和高抑制肝癌细胞体外增殖的优质虫草菌株,为蛹虫草 MF27、MF1 和球孢白僵菌 MF10 抗肝癌药物和保健产品的开发和利用提供理论基础。

[REFERENCES]

- Dai YC, Yang ZL, 2008. A revised checklist of medicinal fungi in China. *Mycosystema*, 27: 801-824 (in Chinese)
- Dai YC, Zhou LW, Yang ZL, Wen HA, Bau T, Li TH, 2010. A revised checklist of edible fungi in China. *Mycosystema*, 29: 1-21 (in Chinese)
- Dong CH, Li WJ, Li ZZ, Yan WJ, Li TH, Liu XZ, Cai L, Zeng WB, Chai MQ, Chen SJ, *et al.*, 2016. *Cordyceps* industry in China: current status, challenges and perspectives—Jinhu declaration for *Cordyceps* industry development. *Mycosystema*, 35(1): 1-15 (in Chinese)
- Jayakumar T, Chiu CC, Wang SH, Chou DS, Huang YK, Sheu JR, 2014. Anti-cancer effects of CME-1, a novel polysaccharide, purified from the mycelia of *Cordyceps sinensis* against B16-F10 melanoma cells. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 10(1): 43-9
- Liang ZQ, 2007. *Flora fungorum sinicorum*. Vol. 32. *Cordyceps*. Science Press, Beijing. 1-190 (in Chinese)
- Liu CY, Hao XY, Lin PL, Huang HC, Liu K, Wu XP, Fu JS, 2020. Identification and biological activity of a medicinal *Inonotus*. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)*, 2020(12): 1-10 (in Chinese)
- Liu CY, Li L, Hao XY, Yuan Y, Wu XP, Fu JS, 2020. Protective effects of polysaccharides from post-harvest waste substrate of *Cordyceps militaris* MF27 on oxidative damage to liver cells. *Mycosystema*, 39(2): 409-420 (in Chinese)
- Liu JB, Liu K, Liu CY, Qi M, Du WR, Hu KH, Fu JS, 2018. Identification of seven wild cordycipitoid fungal strains and inhibiting activities of their mycelium ethanol extract against HepG2 cells. *Mycosystema*, 37(8): 1044-1053 (in Chinese)
- Liu JB, Qi M, Du WR, Fu JS, Hu KH, 2018. Genetic relationship analysis of 22 *Cordyceps militaris* strains based on split network and preliminary screening of high-yield cordycepin strains. *Biotechnology Bulletin*, 34(4): 133-138 (in Chinese)
- Liu X, Hou RL, Liu JB, Hu KH, Lin WX, Zheng MF, Fu JS, 2017. Screening of anti-breast cancer fractions from *Beauveria bassiana* submerged ferment liquid and analysis of the active ingredients. *Mycosystema*, 36(12): 1659-1666 (in Chinese)
- Meng G, Cui BK, Li CD, Liu HX, Si J, 2018. Antioxidant activities of medicinal fungus *Ganoderma lingzhi* in the process of liquid cultivation. *Mycosystema*, 37(4): 486-501 (in Chinese)
- Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A, 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84(4): 407-12
- Qi M, Liu CY, Guo PL, Wu XP, Lin WX, Fu JS, 2019. Screening and hepatoprotective effects of high antioxidant extract from *Cordyceps militaris* MF27. *Mycosystema*, 38(2): 254-263 (in Chinese)
- Qi M, Liu CY, Zhao Q, Zhang QH, Hu KH, Fu JS, 2018. Polysaccharide antioxidant activities of *Panus giganteus*. *Mycosystema*, 37(12): 1707-1716 (in Chinese)
- Smirnoff N, Cumbes QJ, 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28: 1057-1060
- Wang JZ, Li YR, Gong HR, Ren XF, 2014. Studies on the antioxidant activities of crude polysaccharides from *Pleurotus eryngii*. *Journal of Anhui Normal University (Natural Science)*, 37(2): 160-164 (in Chinese)
- Wang N, Liu S, Yang L, Zhang X, Yuan YN, Li HC, Ji JF, 2019. Interpretation on the report of global cancer statistics 2018. *Journal of Multidisciplinary Cancer Management (Electronic Version)*, 5(1): 87-97 (in Chinese)
- Wu LF, Wang XR, Liu ZQ, Zheng YG, 2014. Research advances in submerged fermentation of *Cordyceps sinensis*. *Bulletin of Fermentation Science and Technology*, 43(4): 25-29 (in Chinese)
- Wu ZC, Gao JM, Wang YF, Wang ZP, 2019. *In vitro*

- antioxidant activity study of Lian Ai Jian. Chinese Journal of Ethnomedicine and Ethnopharmacy, 28(5): 14-18+47 (in Chinese)
- Xu YD, Wei HS, Shi JW, Chen HH, Shi WP, Tan SQ, 2020. Comparison of virulence of three *Beauveria bassiana* strains against fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. Journal of Plant Protection, 47(4): 867-874 (in Chinese)
- Yang JX, Li XY, 2019. Research progress of *Cordyceps sinensis* polysaccharides. Journal of Chinese Medicinal Materials, 42(4): 935-940 (in Chinese)
- Yu HH, Xie L, Xiao SG, Liu DB, Xia ZL, 2007. Determination of *Ganoderma lucidum* submerged fermentation mycelium polysaccharide content. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2007(9): 1061-1063 (in Chinese)
- Yu HY, Wang YF, Shi L, Wang JH, Pan CL, Sheng CG, Liu ZT, Zhang P, Dong XM, 2017. Screening on fine *Cordyceps militaris* strains. Edible Fungi of China, 36(5): 17-20 (in Chinese)
- Zhang JJ, Meng GY, Zhai GY, Yang YH, Zhao HJ, Jia L, 2016. Extraction, characterization and antioxidant activity of polysaccharides of spent mushroom compost of *Ganoderma lucidum*. International Journal of Biological Macromolecules, 82: 432-439
- Zhang ML, Jiao CW, Xie YZ, Liang HJ, Zhang S, 2015. Antioxidant activity of intracellular polysaccharides from *Cordyceps militaris* mycelium *in vitro*. Edible Fungi of China, 34(2): 66-69 (in Chinese)
- Zhang S, Zhang YJ, Shrestha B, Xu JP, Wang CS, Liu XZ, 2013. *Ophiocordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris*: research advances, issues and perspectives. Mycosystema, 32(4): 577-597 (in Chinese)
- Zhang YF, Liu GG, Liu Q, Liu XB, 2013. Inhibitory effect of eriodictyol on free radical-induced damage to biological macromolecules and its cytotoxicity on HepG2 Cells. Food Science, 34(17): 126-130 (in Chinese)
- Zhu JX, Zhong S, Li YG, Ji DF, 2017. Effect of crude polysaccharides from *Phellinus* spp. and *Cordyceps sinensis* on synergistic induction of S-phase arrest and apoptosis of lung adenocarcinoma cell A549. Acta Sericologica Sinica, 43(2): 318-326 (in Chinese)
- Zhu ZY, Dong FY, Liu XC, Lv Q, Zhang YM, 2016. Effects of extraction methods on the yield, chemical structure and anti-tumor activity of polysaccharides from *Cordyceps gunnii* mycelia. Carbohydrate Polymers, 140: 461-471
- Zuo JH, Gong XY, Dong YM, Li L, 2018. Research achievements in bioactive components, pharmacological effects and applications of *Cordyceps militaris*. Food Science, 39(21): 330-339 (in Chinese)
- [附中文参考文献]
- 戴玉成, 杨祝良, 2008. 中国药用真菌名录及部分名称的修订. 菌物学报, 27: 801-824
- 戴玉成, 周丽伟, 杨祝良, 文华安, 图力古尔, 李泰辉, 2010. 中国食用菌名录. 菌物学报, 29: 1-21
- 董彩虹, 李文佳, 李增智, 闫文娟, 李泰辉, 刘杏忠, 蔡磊, 曾文波, 柴美清, 陈仕江, 等, 2016. 我国虫草产业发展现状、问题及展望——虫草产业发展金湖宣言. 菌物学报, 35(1): 1-15
- 孟歌, 崔宝凯, 李春道, 刘红霞, 司静, 2018. 药用真菌灵芝液体培养过程中的抗氧化活性研究. 菌物学报, 37(4): 486-501
- 梁宗琦, 2007. 中国真菌志. 第32卷. 虫草属. 北京: 科学出版社. 1-190
- 刘城移, 郝心怡, 林沛霖, 黄海辰, 刘昆, 吴小平, 傅俊生, 2020. 1株野生蝉虫草的鉴定及其胞内和胞外多糖抗肝癌活性比较. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2020(12): 1-10
- 刘城移, 李琳, 郝心怡, 袁源, 吴小平, 傅俊生, 2020. 蛹虫草 MF27 菌糠多糖对肝细胞氧化损伤的保护作用. 菌物学报, 39(2): 409-420
- 刘建兵, 刘昆, 刘城移, 戚梦, 杜苑如, 胡开辉, 傅俊生, 2018. 7株野生虫草菌的鉴定及其菌丝体醇提取物对 HepG2 细胞的抑制活性. 菌物学报, 37(8): 1044-1053
- 刘建兵, 戚梦, 杜苑如, 傅俊生, 胡开辉, 2018.

- 拆分网络分析 22 株蛹虫草亲缘关系及高产虫草素菌株初筛. 生物技术通报, 34(4): 133-138
- 刘鑫, 侯若琳, 刘建兵, 胡开辉, 林文雄, 郑明锋, 傅俊生, 2017. 球孢白僵菌深层发酵液抗乳腺癌活性部位筛选及成分分析. 菌物学报, 36(12): 1659-1666
- 戚梦, 刘城移, 郭佩玲, 吴小平, 林文雄, 傅俊生, 2019. 蛹虫草 MF27 高抗氧化活性提取物筛选及保肝作用研究. 菌物学报, 38(2): 254-263
- 戚梦, 刘城移, 赵强, 张琪辉, 胡开辉, 傅俊生, 2018. 大革耳子实体多糖抗氧化活性. 菌物学报, 37(12): 1707-1716
- 汪建中, 李艳如, 龚华锐, 仁晓凤, 2014. 杏鲍菇粗多糖的抗氧化活性研究. 安徽师范大学学报(自然科学版), 37(2): 160-164
- 王宁, 刘硕, 杨雷, 张希, 袁延楠, 李慧超, 季加孚, 2019. 2018 全球癌症统计报告解读. 肿瘤综合治疗电子杂志, 5(1): 87-97
- 吴玲芳, 王晓瑞, 柳志强, 郑裕国, 2014. 冬虫夏草液体发酵培养的研究进展. 发酵科技通讯, 43(4): 25-29
- 吴子聪, 高嘉敏, 王一飞, 王治平, 2019. 连艾煎的体外抗氧化活性研究. 中国民族民间医药, 28(5): 14-18+47
- 徐毓笛, 魏红爽, 石嘉伟, 陈宏灏, 石旺鹏, 谭树乾, 2020. 三株球孢白僵菌对草地贪夜蛾的毒力比较. 植物保护学报, 47(4): 867-874
- 杨建鑫, 李向阳, 2019. 冬虫夏草活性成分虫草多糖的研究进展. 中药材, 42(4): 935-940
- 于海洋, 王延锋, 史磊, 王金贺, 潘春磊, 盛春鸽, 刘姿彤, 张鹏, 董雪梅, 2017. 蛹虫草优良菌株的筛选. 中国食用菌, 36(5): 17-20
- 于浩翰, 谢林, 肖深根, 刘东波, 夏志兰, 2007. 灵芝深层发酵菌丝体多糖含量测定. 中药材, 2007(9): 1061-1063
- 张命龙, 焦春伟, 谢意珍, 梁慧嘉, 张松, 2015. 蛹虫草菌丝体多糖体外抗氧化活性研究. 中国食用菌, 34(2): 66-69
- 张姝, 张永杰, SHRESTHA Bhushan, 徐建平, 王成树, 刘杏忠, 2013. 冬虫夏草菌和蛹虫草菌的研究现状、问题及展望. 菌物学报, 32(4): 577-597
- 张亦凡, 刘功关, 刘茜, 刘学波, 2013. 圣草酚抑制自由基诱导的生物大分子损伤及对肝癌细胞 HepG2 毒性的作用. 食品科学, 34(17): 126-130
- 朱俭勋, 钟石, 李有贵, 计东风, 2017. 桑黄粗多糖和蛹虫草粗多糖协同增效诱导肺癌细胞 A549 S 期阻滞及凋亡的研究. 蚕业科学, 43(2): 318-326
- 左锦辉, 贡晓燕, 董银卯, 李丽, 2018. 蛹虫草的活性成分和药理作用及其应用研究进展. 食品科学, 39(21): 330-339

(本文责编: 韩丽)