

桦褐孔菌子实体多糖的提取及体外降血糖活性

於雨碟 张佳妍 张酥 蔡铭 孙培龙 杨开[✉]

浙江工业大学食品科学与工程学院 浙江 杭州 310014

摘要: 通过响应面设计得到桦褐孔菌子实体 *Inonotus obliquus* 多糖的优化提取条件, 利用酶和细胞体外实验, 探究桦褐孔菌子实体多糖的降血糖活性, 确定活性多糖组分, 并初步分析其降糖机理及单糖组成。优化条件下多糖得率为(2.79±0.03)%。粗多糖经乙醇分级沉淀分别获得 IOP30、IOP60、IOP80 组分。其中 IOP30 显示出最强的 α -葡萄糖苷酶抑制活性($IC_{50}=38.20\mu\text{g/mL}$), 且在酶动力学上属于非竞争性抑制。HepG2 细胞经 0.01、0.10、1.00mg/mL 的 IOP30 处理, 葡萄糖消耗与对照组相比差异极其显著 ($P<0.01$); 同时添加 10^{-7}mmol/L 的胰岛素和 0.10、1.00mg/mL 的 IOP30 后葡萄糖消耗增加更显著 ($P<0.01$)。IOP30 主要由鼠李糖 (7.93%)、阿拉伯糖 (3.12%)、木糖 (11.15%)、甘露糖 (19.08%)、葡萄糖 (39.17%) 和半乳糖 (19.15%) 等单糖组成。桦褐孔菌子实体 IOP30 多糖组分具有显著的降血糖活性, 其降糖可通过抑制 α -葡萄糖苷酶活性减少餐后血糖的形成, 促进细胞周围组织对葡萄糖的代谢, 加强肝细胞对胰岛素的敏感性。

关键词: 桦褐孔菌, 多糖, 响应面, 提取, α -葡萄糖苷酶抑制, HepG2 细胞, 降血糖

[引用本文] 於雨碟, 张佳妍, 张酥, 蔡铭, 孙培龙, 杨开, 2021. 桦褐孔菌子实体多糖的提取及体外降血糖活性. 菌物学报, 40(1): 189-202

Yu YD, Zhang JY, Zhang S, Cai M, Sun PL, Yang K, 2021. Molecular screening of medicinal fungus *Inonotus obliquus* and anti-breast cancer activity of its submerged fermentation broth. Mycosystema, 40(1): 189-202

Molecular screening of medicinal fungus *Inonotus obliquus* and anti-breast cancer activity of its submerged fermentation broth

YU Yu-Die ZHANG Jia-Yan ZHANG Su CAI Ming SUN Pei-Long YANG Kai[✉]

College of Food Science and Technology, Zhejiang University of Technology, Hangzhou, Zhejiang 310014, China

Abstract: The extraction conditions of polysaccharides from *Inonotus obliquus* (IO) fruiting body were optimized by response surface methodology (RSM). The hypoglycemic activities of the IO polysaccharides were evaluated and bioactive polysaccharide fraction (BPF) was confirmed

基金项目: 浙江省重点研发计划项目 (2018C02003)

Supported by the Key Research and Development Projects of Zhejiang Province (2018C02003).

✉ Corresponding author. E-mail: yangkai@zjut.edu.cn

Received: 2020-06-09, accepted: 2020-07-28

through enzyme and cell modes *in vitro*. The hypoglycemic mechanism and monosaccharide composition of BPF were preliminarily analyzed. The yield of polysaccharides was $(2.79 \pm 0.03)\%$ under the optimal conditions. Fractions of IOP30, IOP60 and IOP80 were obtained from crude polysaccharide extracts by differential alcohol precipitation. Among them, IOP30 showed the strongest α -glucosidase inhibitory activity ($IC_{50}=38.20\mu\text{g/mL}$) and acted as a noncompetitive inhibitor in enzyme kinetics. The glucose consumption rate of HepG2 cells was obviously different from that of the experimental control group ($P<0.01$), after treating with IOP30 of 0.01, 0.10 and 1.00mg/mL. When insulin (10^{-7}mmol/L) and IOP30 (0.10, 1.00mg/mL) were added together, the glucose consumption rate of HepG2 cells was increased more obviously ($P<0.01$). IOP30 was mainly composed of rhamnose (7.93%), arabinose (3.12%), xylose (11.15%), mannose (19.08%), glucose (39.17%) and galactose (19.15%). In conclusion, IOP30 isolated from the fruiting body of IO possessed significant hypoglycemic activity by reducing the formation of postprandial blood glucose via α -glucosidase inhibitory activity, promoting the glucose metabolism in the surrounding tissues of cells, and enhancing the sensitivity of liver cells to insulin.

Key words: *Inonotus obliquus*, polysaccharides, response surface methodology, extraction, α -glucosidase inhibitory activity, HepG2 cell, hypoglycemic effect

糖尿病是一种以高血糖为特征的慢性代谢紊乱疾病，主要分成 1 型、2 型和妊娠型糖尿病 (Cudworth & Woodrow 1997)。其中，2 型糖尿病约占 90%–95% (American Diabetes Association 2019)。高血糖会损伤肾脏、心脏、眼睛、血管等器官组织 (Mirmiran *et al.* 2014)。现代药理学研究表明，相比化学合成药，来自天然产物中的降血糖活性物质普遍具有效果显著、副作用小等优点 (Rautn *et al.* 2016)。因此，开发此类天然活性物质具有显著的社会和经济效益。

桦褐孔菌 *Inonotus obliquus* 是一种珍稀食药真菌，又名桦树茸、白桦茸、斜管纤孔菌等，主要分布于北欧、俄罗斯、日本及我国的黑龙江和吉林等寒冷地区 (戴玉成和李玉 2011)。研究表明，已发现的桦褐孔菌活性成分有 200 多种，其中多糖为最主要活性成分 (常晨和包怡红 2017)。桦褐孔菌多糖

具有抗氧化、抗肿瘤、抗糖尿病以及免疫调节等生理活性 (孙军恩等 2009)。其抗糖尿病活性研究最引人关注，研究证实人工栽培和野生桦褐孔菌子实体 (陈艳秋等 2018)、发酵菌丝体中的多糖 (Sun *et al.* 2008) 都具有显著的降血糖功效。目前，关于桦褐孔菌多糖降血糖的机制说法不一，主要集中在改善胰岛素抵抗、提高机体对胰岛素的敏感性和调节糖代谢 3 个方面 (吴宇锋和颜美秋 2018)。虽然桦褐孔菌子实体多糖抑制 α -葡萄糖苷酶活性已有少数报道 (沈心怡等 2016)，但其抑制类型及作用机理却鲜有探究，而且不同提取分离过程得到的多糖组成及结构各不相同。

抑制 α -葡萄糖苷酶活性减少葡萄糖形成和处理 HepG2 细胞增加葡萄糖吸收，是两种有效的体外筛选降血糖活性物质方法 (Gil-Campos *et al.* 2004; Tang *et al.* 2018)。

本研究以桦褐孔菌子实体为原料经水提和分级醇沉得到粗多糖和 3 个多糖组分, 通过 α -葡萄糖苷酶筛选出效果较好的多糖组分, 并进一步研究其酶动力学以及对 HepG2 细胞葡萄糖吸收的作用, 为桦褐孔菌相关医药保健品的研发和生产提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 材料和试剂: 桦褐孔菌野生子实体, 采自长白山野生林区, 由庆元县金源真菌多糖制品责任有限公司提供; 95%食品级乙醇 (杭州长青化工); α -葡萄糖苷酶(10U/mg)、PNPG (4-硝基酚- α -D-吡喃葡萄糖苷)、葡萄糖测试盒、胰岛素、盐酸二甲双胍和单糖标准品 (L-鼠李糖, D-葡萄糖, D-木糖, D-岩藻糖, D-半乳糖, D-甘露糖) 等标准品 (美国 Sigma 公司); 二甲基亚砷 (DMSO)、噻唑蓝 (MTT)、胰蛋白酶消化液 (南京建成生物工程研究所); HepG2 (人肝癌细胞) (中国科学院细胞库); DMEM (dulbecco's modified eagle medium) 培养基、磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS)、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)(美国 Gibco 公司)。

1.1.2 仪器与设备: PL602 分析天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司); DJ-02 小型粉碎机 (上海淀久中药机械); Spectra Max i3 酶标仪 (美国 MD 公司); 725 型紫外分光光度计 (上海光谱仪器有限公司); HH-2 型恒温水浴锅 (荣华仪器制造有限公司); RE-2000A 旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂); 311 型 CO₂ 培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); TDL-60B 低速冷冻离心型机 (上海安亭科学仪器厂); ALPHA 2-4 LD 真空冷冻干燥机 (德国 Christ 公司)。

1.2 方法

1.2.1 提取时间对多糖得率的影响: 桦褐孔

菌子实体经 50℃干燥 3h 后, 采用小型粉碎机粉碎, 过 60 目筛。称取 100g 粉末, 固定料液比 1:20 和提取温度 90℃, 分别在 5 个不同的时间 (1、1.5、2、2.5、3h) 提取多糖, 重复 2 次, 合并上清液后浓缩、离心、干燥, 根据公式测定得率: 得率(%)=(提取物干燥后质量/原料质量)×100。

1.2.2 提取温度对多糖得率的影响: 称取 100g 过筛后的桦褐孔菌子实体粉末, 固定料液比 1:20 和提取时间 2h, 分别在 5 个不同的温度 (80、85、90、95、100℃) 提取多糖, 重复 2 次, 合并上清液后浓缩、离心、干燥, 根据 1.2.1 公式测定得率。

1.2.3 提取料液比对多糖得率的影响: 称取 100g 过筛后的桦褐孔菌子实体粉末, 固定温度 90℃和提取时间 2h, 分别以 5 个不同的料液比 (1:10、1:15、1:20、1:25、1:30) 提取多糖, 重复 2 次, 合并上清液后浓缩、离心、干燥, 根据 1.2.1 公式测定得率。

1.2.4 响应面优化提取多糖条件: 以单因素为前提, 根据 Box-Behnken 中心组合实验设计原理, 进行 3 因素 3 水平的响应面分析, 试验因素与水平设计见表 1。以多糖得率为评判标准, 确定最优提取条件, 并在实际条件下进行验证试验。

表 1 Box-Behnken 设计试验因素与水平

Table 1 Factors and levels in Box-Behnken design

因素 Factors	代码 Code	水平 Level			
			-1	0	1
时间 Time (h)	A		1	2	3
温度 Temperature (°C)	B		80	90	100
液料比 Liquid-solid ratio (mL/g)	C		10	20	30

1.2.5 多糖的分级: 将桦褐孔菌子实体粉末 (500g) 按照优化条件提取, 重复两次。合并两次上清液, 减压浓缩至一定体积, 然后量取 1/4 体积量的浓缩液离心、冷冻干燥得

到桦褐孔菌子实体粗多糖, 其余 $3/4$ 体积量的浓缩液加入终浓度为 30%、60%、80% 的乙醇分级沉淀, 然后离心、冷冻干燥, 分别得到 IOP30、IOP60、IOP80 3 种组分 (张佳妍 2015), 并根据 1.2.1 公式测定得率。

1.2.6 总糖含量的测定: 采用苯酚-硫酸法 (张惟杰 1994), 准确配置 0.2mg/mL 的待测样品液, 向试管中加入 1mL 的样品液、1mL 蒸馏水、5% 苯酚试剂以及 5mL 浓硫酸, 摇匀后沸水浴 15min, 冷却后测定 490nm 处的吸光值。每组 3 个平行, 总糖含量由葡萄糖标准曲线获得。

1.2.7 还原糖含量的测定: 采用 3,5-二硝基水杨酸法 (王健壮等 2008)。配置 5.0mg/mL 的待测样品溶液, 取 1mL 加入试管, 再加入 3.0mL DNS 试剂, 摇匀后沸水浴 5min, 取出后冰浴冷却, 加蒸馏水定容至 25mL, 混匀后在 520nm 处测吸光值。每组 3 个平行, 还原糖含量由葡萄糖标准曲线获得。

1.2.8 多糖含量及纯度的测定: 多糖含量 (%) = (总糖含量 - 还原糖含量) × 100; 多糖纯度 (%) = (多糖含量 / 多糖提取物干重) × 100。

1.2.9 蛋白质、脂肪、水分含量测定: 蛋白质含量测定采用考马斯亮蓝法 (Baradford 1976)。将牛血清蛋白配置成 0.1mg/mL 的标准溶液, 吸取标准液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mL 于试管中, 加入蒸馏水至 1.0mL, 后加入考马斯亮蓝溶液 5.0mL, 混匀静置, 于 595nm 测吸光值, 绘制标曲。按照上述操作测定样品溶液 (2.0mg/mL) 蛋白质含量, 结果由标曲得出。

脂肪含量依照 GB/T 15647-2009 分析测定; 水分含量依照 GB/T 6435-2014 分析测定。

1.2.10 α -葡萄糖苷酶活性测定: 按照 Dong *et al.* (2012) 的方法, 并稍作修改。分别向 96 孔板中加入 40 μ L 的多糖样品溶液和 30 μ L 的 α -葡萄糖苷酶 (0.2U/mL), 混匀后在 37℃ 下

孵育 10min, 然后每孔加入 30 μ L 的 PNP (5mmol/L), 混匀后在 37℃ 下孵育 20min, 最后每孔加入 100 μ L 的 Na_2CO_3 (0.2mol/L) 终止反应, 阿卡波多糖作为阳性对照。每组 3 次平行, 利用酶标仪在 405nm 下测吸光值, α -葡萄糖苷酶的抑制活性计算如下:

$$\alpha\text{-葡萄糖苷酶抑制率}(\%) = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100$$

式中, A_0 为空白对照吸光值; A_1 为样品吸光值; A_2 为磷酸缓冲液代替 PNP 溶液的本底吸光值。所有结果的测定均以半抑制浓度 (IC_{50}) 表示。

1.2.11 α -葡萄糖苷酶抑制动力学: 按照 Ettxeberria *et al.* (2012) 的方法, 并稍作修改。PNP 标准曲线的制作: 依次向试管中加入 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mL 的 PNP 溶液 (0.5mmol/L), 再加入 0.2mol/L 的 Na_2CO_3 至 2.31mL, 以蒸馏水为空白对照, 利用酶标仪在 405nm 处测定吸光值。以 PNP 的体积为横坐标, 吸光值 A 为纵坐标, 做线性回归方程。 α -葡萄糖苷酶抑制类型的确定: 以 0.125、0.25、0.5、1、2mmol/L 的 PNP 溶液为底物, 加入不同浓度的桦褐孔菌多糖溶液, 测定体系的反应速度。以底物浓度的倒数 $1/[S]$ 为横坐标, 反应速率的倒数 $1/[V]$ 为纵坐标作图, 即 Lineweaver-Burk (L-B) 法作图, 确定反应类型。

1.2.12 HepG2 细胞培养: 人肝癌细胞株 HepG2 细胞置于 25cm² 细胞培养瓶, 加入 5mL 完全培养基 (DMEM+10% FBS+1% 青链霉素), 在 37℃、5% CO_2 的培养箱中培养, 隔天换液, 当汇合度达 80%–90% 以上, 利用胰酶消化, 传代培养 (Chen *et al.* 2018)。

1.2.13 MTT 法测定细胞存活率: 参照 Li *et al.* (2014) 的方法。HepG2 细胞浓度调整为 1×10^5 个/mL, 每孔加入 100 μ L 细胞悬液于 96 孔板中, 在 37℃、5% CO_2 的培养箱中培养 24h, 每孔加入样品液 100 μ L, 以不加入样品

液为空白对照,继续培养 24h,每孔加入 20 μ L MTT (5mg/mL) 培养 4h,吸去培养液,每孔再加入 100 μ L 的 DMSO,振荡至紫色结晶物完全溶解,每组 6 个平行孔。用酶标仪在 490nm 处测定吸光值。

1.2.14 HepG2 细胞葡萄糖消耗: HepG2 细胞浓度 1×10^5 个/mL,每孔加入 100 μ L 细胞悬液于 96 孔板中,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养箱中培养 24h。将试验细胞分为对照组(不加胰岛素;加入 10^{-7} mmol/L 的胰岛素)、桦褐孔菌组(1.0, 0.1, 0.01, 0.001 mg/L)、阳性对照组(二甲双胍 10^{-3} mmol/L),每组 6 个平行孔。给药后继续孵育 24h,利用试剂盒测定葡萄糖的消耗量。

1.2.15 样品衍生化处理: 按照张安强等(2006)的方法处理。称取等摩尔(2.0 mmol/L)的鼠李糖、阿拉伯糖、岩藻糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖混合标准品,用 3.0 mL 蒸馏水溶解,加入 20–30 mg 的 NaBH₄ 振荡 3h,用冰醋酸中和过量的 NaBH₄,重复 3 次,减压浓缩除去反应产生的副产物硼酸和水,冷冻干燥后加 4.0 mL 醋酐,100 $^{\circ}$ C 反应 1h,冷却后加入 3.0 mL 甲苯,减压浓缩除去醋酐。用氯仿溶解乙酰化后的产物并转移至分液漏斗,加入等量的蒸馏水振荡混匀,分层后去除水溶液,重复 3 次,氯仿层加入无水硫酸钠,再转移至 10 mL 容量瓶定容,待分析。称取 IOP30 (2 mg),加入 4 mL 三氟乙酸(2 mol/L),110 $^{\circ}$ C 水解 2h,冷却后减压蒸发,再加入 3 mL 甲醇,减压蒸发,重复 3 次,完全去除三氟乙酸。按照上述同样的方法进行还原和乙酰化。

1.2.16 气相色谱条件: HP-5 毛细管柱(30 m $\times$ 0.32 mm $\times$ 0.25 μ m);升温程序:120 $^{\circ}$ C 保持 3 min,以 10 $^{\circ}$ C/min 升温至 240 $^{\circ}$ C,保持 46.5 min;气体体积流量 1.0 mL/min;进样口温度 250 $^{\circ}$ C;检测器温度 250 $^{\circ}$ C;柱温 210 $^{\circ}$ C;

空气、氮气及氢气体积流量分别为 350、30、35 mL/min;分流比 1:50;进样量 2.0 μ L。

1.2.17 数据处理: 采用每组实验重复 3 次,结果以平均值 $\pm$ 标准误差表示。采用 SPSS 软件进行单因素方差(One-Way ANOVA)分析,来判断显著性差异, $P < 0.05$ 代表有显著性差异, $P < 0.01$ 代表有极显著性差异。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

为探究提取时间、温度、液料比对桦褐孔菌多糖得率的影响,固定其中两个因素,考察另一因素在不同条件时的作用效果。在 1–2.5 h 内,多糖得率随着提取时间的增加而增加,2.5 h 时到达峰值,随后在 2.5–3 h 得率有所下降(图 1A);在 80–95 $^{\circ}$ C 时,多糖得率增加幅度较大,而在 95–100 $^{\circ}$ C 增长趋缓(图 1B);提取料液比为 1:10–1:25 时,多糖得率随着料液比的增加而增加,其中,1:20–1:25 增加较少,而 1:25–1:30 时,得率减少(图 1C)。综上所述,结合实际情况,选取时间 2.5 h,温度 100 $^{\circ}$ C 和料液比 1:20 为桦褐孔菌多糖提取的优化条件。

2.2 响应面优化试验

使用 Design-Expert 8.0.5 软件进行响应面设计,以得率(%)为响应值,提取时间(A)、温度(B)、液料比(C)为自变量,响应面设计和结果见表 2,对其进行回归分析,得到回归方程模型为: $Y = 2.43 + 0.19A + 0.64B + 0.19C + 0.028AB + 0.005AC + 0.13BC - 0.2A^2 - 0.32B^2 - 0.42C^2$,通过方差分析检验自变量的充分性和适应度,从而验证自变量对多糖得率的影响。

方差分析见表 3,模型的 $F = 86.47$, $P < 0.0001$,差异极显著;失拟项 $F = 2.42$, $P = 0.3054$,无显著性差异,因此,该模型拟合度较高。结果显示,提取时间 A 和温度 B

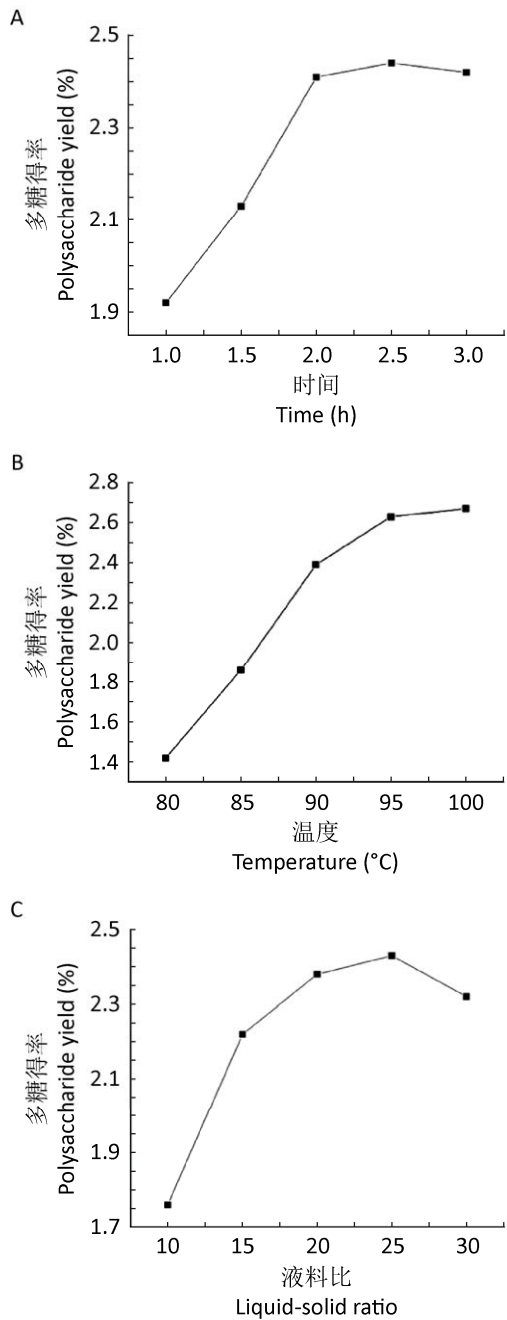


图 1 提取时间 (A)、温度 (B) 和液料比 (C) 对多糖提取率的影响
Fig. 1 Effects of extraction time (A), temperature (B) and liquid-solid ratio (C) on polysaccharide yield.

以及料液比 C 对 Y 有显著意义；二次项 BC 对 Y 有显著性，AB 和 AC 对 Y 均无显著性；交叉项 A²、B²和 C²对 Y 具有显著性。因此揭示响应与自变量之间的关系合适。

表 2 响应面设计方案与结果

Table 2 Response surface methodology design scheme and results

试验点 Run No.	时间 Time (h)	温度 Temperature (°C)	液料比 Liquid-solid ratio (mL/g)	得率 Yield (%)
1	3	90	10	1.88
2	2	100	30	2.66
3	2	80	30	1.18
4	1	90	30	1.77
5	3	90	30	2.25
6	1	80	20	1.15
7	2	80	10	1.03
8	1	90	10	1.42
9	2	90	20	4.07
10	2	100	10	1.99
11	3	80	20	1.38
12	2	90	20	2.52
13	1	100	20	2.23
14	3	100	20	2.77
15	2	90	20	2.43

对于 3 个自变量,选取其中一个因素为固定值,其余两个因素相互交叉作用对桦褐孔菌多糖得率的影响见图 2。运用 Design-expert 8.0 软件对回归模型进行优化分析,结果显示提取多糖的理论最佳工艺参数为:提取时间 2.01h,温度 99.96℃,液料比 23.56mL/g,此条件下桦褐孔菌子实体多糖的理论得率为 2.84%。考虑到实际操作情况,将最佳提取条件修改为:提取时间 2h,温度 100℃,液料比 24mL/g。在此条件下,重复 3 次进行实验验证,桦褐孔菌子实体的多糖物提取率为(2.79±0.03)%,与预测值基本一致。

2.3 桦褐孔菌子实体主要成分

IOP30 中多糖含量最高 (26.52%±0.20%); IOP60 中蛋白质含量最高 (18.76%±0.08%),粗多糖中脂肪含量最高 (13.10%±0.30%); IOP80 中水分含量最高(14.97%±0.05%)(表 4)。

表 3 响应面回归模型方差分析

Table 3 Box-Behnken regression equation analysis of variance

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
Source	Sum of squares	Df	Mean square	F value	P value	Significant level
模型	4.96	9	0.55	86.47	<0.0001	***
A	0.29	1	0.29	44.75	0.0011	**
B	3.26	1	3.26	512.54	<0.0001	***
C	0.30	1	0.30	46.55	0.0010	***
AB	3.025×10^{-3}	1	3.025×10^{-3}	0.48	0.5214	NS
AC	1.00×10^{-4}	1	1.00×10^{-4}	0.016	0.9052	NS
BC	0.068	1	0.068	0.016	0.0225	*
A ²	0.15	1	0.15	23.87	0.0045	**
B ²	0.37	1	0.37	58.60	0.0006	***
C ²	0.65	1	0.65	102.48	0.0002	***
残差 Residual	0.032	5	6.368×10^{-3}			
失拟项 Lack of fit	0.025	3	8.325×10^{-3}	2.42	0.3054	NS
纯误差 Pure error	6.867×10^{-3}	2	3.433×10^{-3}			
总和 Cor total	4.99	14				

注: NS 表示无显著性; *表示 $0.01 < P < 0.1$; **表示 $0.001 < P < 0.01$; ***表示 $P < 0.001$

Note: NS represents no significance; * represents $0.01 < P < 0.1$; ** represents $0.001 < P < 0.01$; *** represents $P < 0.001$.

2.4 桦褐孔菌多糖抑制 α -葡萄糖苷酶活性

将桦褐孔菌粗多糖、IOP30、IOP60、IOP80 分别首先进行 α -葡萄糖苷酶抑制实验,筛选出最有效的降血糖活性多糖组分。

当多糖浓度在 0–200 $\mu\text{g/mL}$ 时,桦褐孔菌多糖的 4 种多糖均有一定的 α -葡萄糖苷酶抑制活性,并且抑制率与多糖浓度呈正相关的量效关系(图 3)。在相同的多糖浓度(100 $\mu\text{g/mL}$)下,不同多糖组分对 α -葡萄糖苷酶抑制率为: IOP30>IOP60>粗多糖>IOP80。其中, IOP30 ($\text{IC}_{50}=38.20 \mu\text{g/mL}$) 的抑制活性远远优于阳性对照阿卡波糖 ($\text{IC}_{50}=3.36 \text{mg/mL}$)。

2.5 IOP30 抑制 α -葡萄糖苷酶动力学

桦褐孔菌多糖 IOP30 抑制 α -葡萄糖苷酶的类型见图 4。在酶体系反应过程中, IOP30 对 α -葡萄糖苷酶抑制程度与浓度正向相关,

当 IOP30 浓度递增,动力学曲线在纵坐标上的截距变大而在横坐标相交于同一点,说明最大反应速率 $V_{\max}$ 减小,米氏常数 K_m 保持不变。通过上述规律可知, IOP30 抑制 α -葡萄糖苷酶属于典型的非竞争性抑制(Kim *et al.* 2006),其中米氏常数 K_m 为 1.74 mmol/L。

2.6 IOP30 对 HepG2 细胞增殖及葡萄糖消耗的影响

经 0.001–1 mg/mL 的 IOP30 处理后, HepG2 细胞的吸光值与对照组无显著性差异(表 5),说明在此浓度范围内 IOP30 对细胞无毒性作用。HepG2 细胞在不添加胰岛素,只添加 IOP30 时,在 0.001–1 mg/mL 的 IOP30 浓度下,细胞葡萄糖消耗与 IOP30 呈正向量效关系。HepG2 细胞经 0.01、0.1、1 mg/mL 的 IOP30 为处理后,细胞的葡萄糖消耗分别增加了 1.62、2.46、3.34 mmol/L,

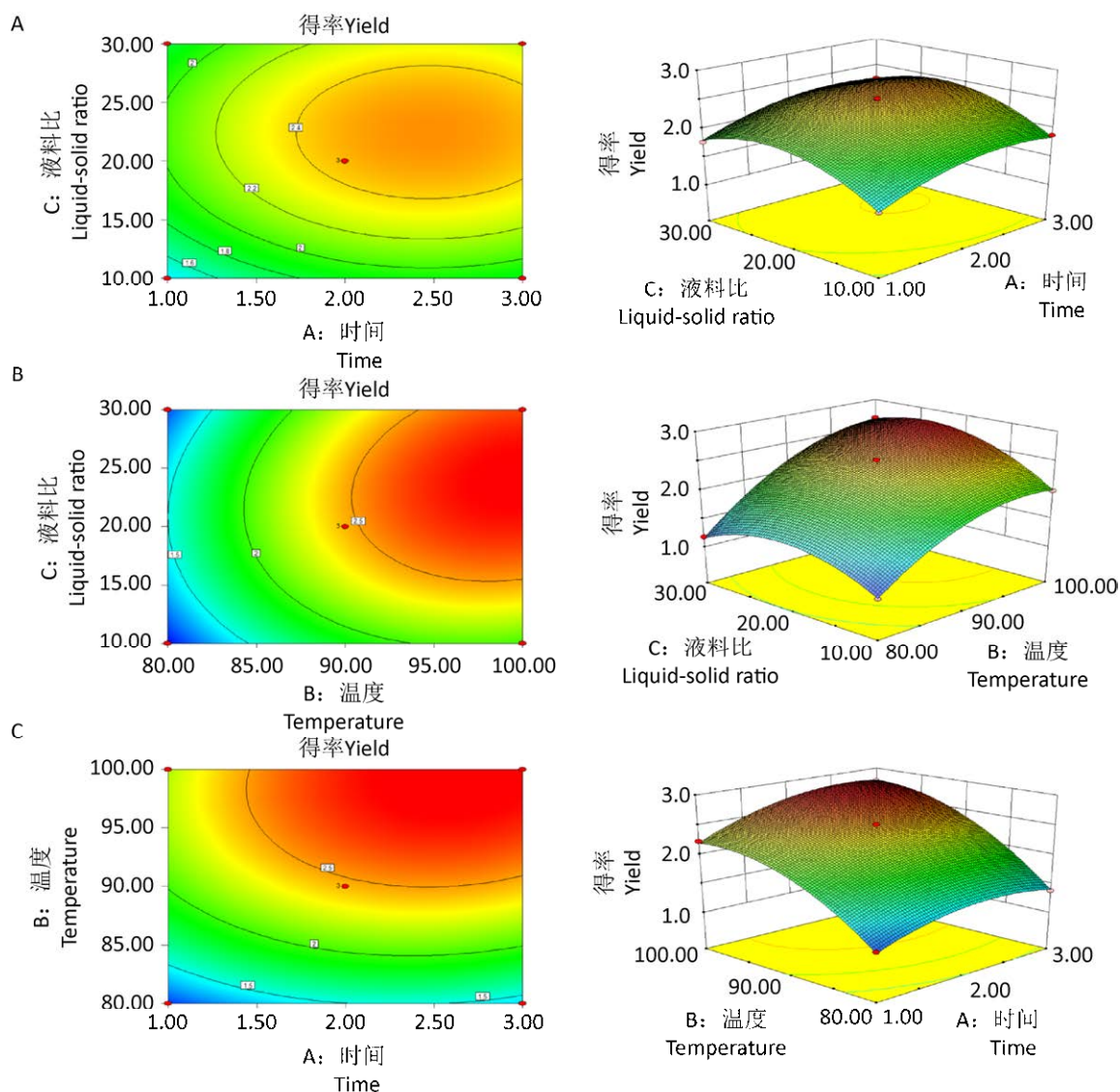


图 2 两因素交互作用对多糖得率影响的响应曲面图 A: 提取时间和液料比等高线图以及三维响应面图; B: 温度和液料比等高线图以及三维响应面图; C: 时间和温度等高线图以及三维响应面图

Fig. 2 Response surface plots of the interaction of various extraction conditions. A: Contour plots and 3D response surface plot of extraction time and liquid-solid ratio; B: Contour plots and 3D response surface plot of extraction temperature and liquid-solid ratio; C: Contour plots and 3D response surface plot of extraction time and extraction temperature.

与对照组相比差异极其显著 ($P < 0.01$), 经 0.001 mg/mL 的 IOP30 处理后, 细胞的葡萄糖消耗增加了 1.39 mmol/L , 与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$), 其中 1.0 mg/mL 的 IOP30 处理效果优于阳性对照二甲双胍。

此外, 在 HepG2 细胞同时添加胰岛素

(10^{-7} mmol/L) 和 IOP30 时, 细胞的葡萄糖消耗增加更显著, 表明加入的胰岛素对 HepG2 细胞的葡萄糖消耗起到了协同效应, 而且在 0.1 、 1 mg/mL 的 IOP30 处理 HepG2 细胞后, 与对照组相比差异极其显著 ($P < 0.01$), HepG2 细胞经 0.001 、 0.01 mg/mL

表 4 主要成分分析

Table 4 Analysis of proximate compositions (%)

成分 Components	粗多糖 Crude polysaccharides	IOP30	IOP60	IOP80
总糖 Total sugar	18.62±0.10	27.48±0.20	21.46±0.20	16.31±0.13
还原糖 Reducing sugar	0.92±0.05	0.96±0.08	1.01±0.06	0.40±0.08
多糖 Polysaccharides	17.70±0.10	26.52±0.20	20.45±0.20	9.91±0.15
蛋白质 Protein	12.46±0.02	14.11±0.06	18.76±0.08	12.28±0.06
脂肪 Fat	13.10±0.30	10.70±0.20	6.25±0.20	3.89±0.10
水分 Water	11.63±0.08	9.50±0.07	11.27±0.08	14.97±0.05

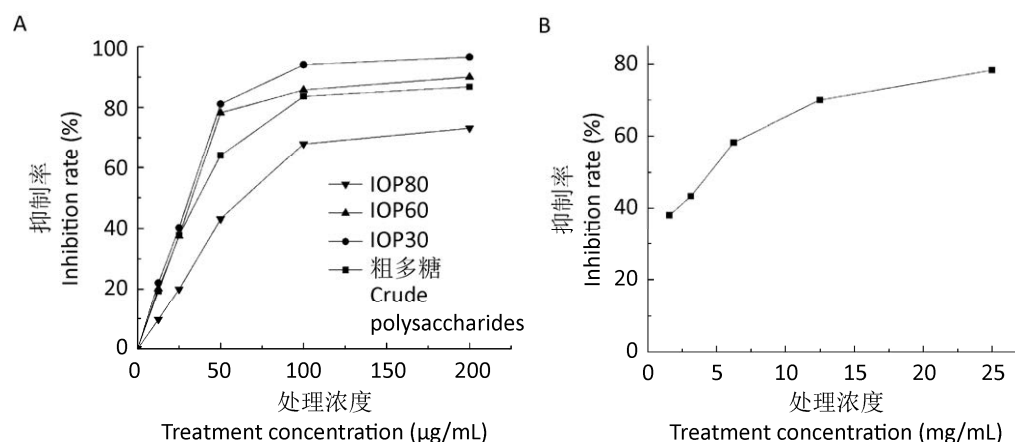


图 3 (A) 桦褐孔菌子实体粗多糖、IOP30、IOP60、IOP80 抑制 α -葡萄糖苷酶活性；(B) 阿卡波多糖抑制 α -葡萄糖苷酶活性

Fig. 3 (A) The α -glucosidase inhibitory activities of crude polysaccharides, IOP30, IOP60 and IOP80 from the fruiting body of *Inonotus obliquus*; (B) The α -glucosidase inhibitory activities of acarbose.

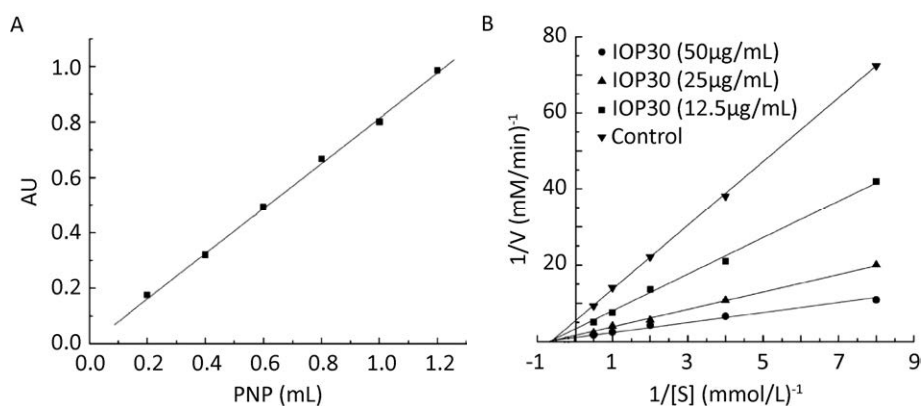


图 4 (A) PNP 标准曲线；(B) IOP30 对 α -葡萄糖苷酶抑制的双倒数动力学曲线

Fig. 4 (A) The standard curve of PNP; (B) Double reciprocal plots for IOP30 inhibition on α -glucosidase.

表 5 IOP30 对 HepG2 细胞的影响

Table 5 The effect of IOP30 on HepG2 cell

组别	培养条件		MTT (A490)	葡萄糖消耗
Group	Culture conditions			Glucose consumption (mmol/L)
	IOP30 (mg/L)	胰岛素 Insulin (mmol/L)		
对照组	—	—	0.38±0.01	1.65±0.21
Control				
桦褐孔菌组	—	10 ⁻⁷	0.38±0.06	2.47±0.32
Treatment of <i>Inonotus obliquus</i>				
	1.0	—	0.38±0.07	4.99±0.21 ^{**}
	1.0	10 ⁻⁷	0.37±0.10	5.24±0.39 ^{##}
	0.1	—	0.38±0.08	4.11±0.27 ^{**}
	0.1	10 ⁻⁷	0.38±0.03	4.65±0.13 ^{##}
	0.01	—	0.37±0.07	3.27±0.33 ^{**}
	0.01	10 ⁻⁷	0.37±0.10	3.50±0.23 [#]
	0.001	—	0.37±0.08	3.04±0.18 [*]
	0.001	10 ⁻⁷	0.38±0.11	3.12±0.20 [#]
二甲双胍			0.38±0.02	4.29±0.36 ^{**}
Metformin				

注：与对照组（不加胰岛素）相比，^{*}*P*<0.05，^{**}*P*<0.01；与对照组（添加胰岛素）相比，[#]*P*<0.05，^{##}*P*<0.01
Note: Compared with the control group (without insulin), ^{*}*P*<0.05, ^{**}*P*<0.01; Compared with the control group (insulin added), [#]*P*<0.05, ^{##}*P*<0.01.

的 IOP30 处理后，与对照组相比差异显著（*P*<0.05），在该条件下，其中 0.1mg/mL 的 IOP30 处理效果优于阳性对照二甲双胍。

2.7 桦褐孔菌多糖 IOP30 的单糖组成分析

单糖标品的 GC-MS 见图 5A，根据出峰时间，从左到右依次是鼠李糖（10.49min）、阿拉伯糖（10.60min）、岩藻糖（10.64min）、木糖（10.79min）、甘露糖（12.84min）、葡萄糖（12.89min）、半乳糖（13.00min）。IOP30 的 GC-MS 见图 5B，对照单糖标品及相对峰面积，IOP30 主要由鼠李糖（7.93%）、阿拉伯糖（3.12%）、木糖（11.15%）、甘露糖（19.08%）、葡萄糖（39.17%）、半乳糖（19.15%）6 种单糖组成。

3 讨论

以单因素为前提，结合响应面优化得到桦褐孔菌子实体多糖的实际最佳提取条件：提取时间 2h，温度 100℃，液料比 24mL/g 下多糖提取率为(2.79±0.03)%，与模型预测的结果基本一致。

经乙醇分级沉淀，得到了桦褐孔菌粗多糖和 IOP30、IOP60、IOP80 4 个组分，其中 IOP30 多糖含量最高，达到了(26.52±0.20)%。而方妤露等（2017）从桦褐孔菌子实体中提取的粗多糖（14.88%）和许泓瑜等（2008）从桦褐孔菌粉中提取的多糖（24.58%）都要低于 IOP30。α-葡萄糖苷酶抑制剂用于治疗

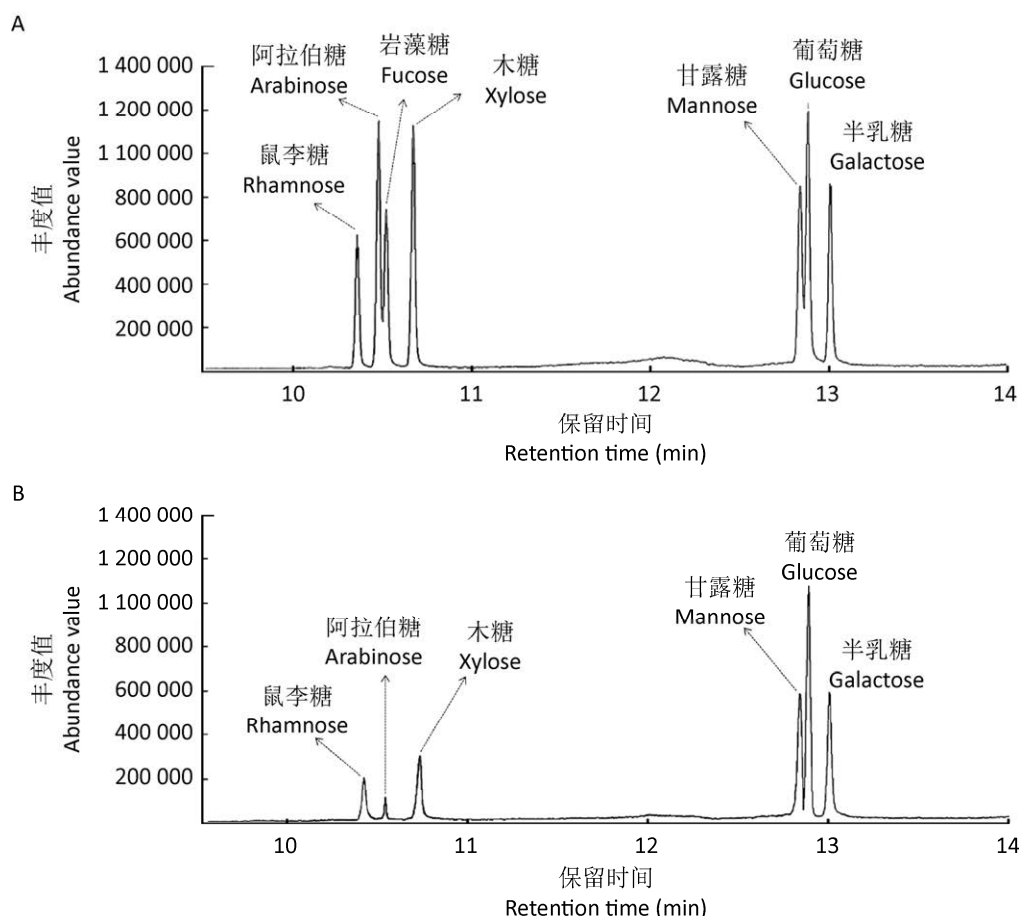


图 5 (A) 标准单糖 GC-MS 图; (B) IOP30 的 GC-MS 图

Fig. 5 (A) GC-MS of the monosaccharides in standard sample; (B) GC-MS of the IOP30.

糖尿病在临床医学已取得成功，它的作用机制是减少进入肠胃中葡萄糖的释放，从而达到降低餐后血糖 (Stefano *et al.* 2018)。结果表明，粗多糖、IOP30、IOP60、IOP80 都具有较好地抑制 α -葡萄糖苷酶活性，其中桦褐孔菌 IOP30 效果最佳 ($IC_{50}=38.20\mu g/mL$)，其半抑制浓度仅为阳性对照阿卡波糖 ($IC_{50}=3.36mg/mL$) 的 1.14%。沈心怡等 (2016) 报道了桦褐孔菌子实体粗多糖抑制 α -葡萄糖苷酶 IC_{50} 为 $150\mu g/mL$ ，其抑制效果低于本文的 IOP30；IOP30 与王梦雅等 (2020) 从桦褐孔菌发酵液分离纯化得到的 EIOP1 抑制 α -葡萄糖苷酶活性相似 ($IC_{50}=39.18\mu g/mL$)。经查阅文献，本研究首次经酶动力学分析提

出了 IOP30 抑制 α -葡萄糖苷酶属于非竞争性抑制，为后续相关酶抑制剂靶向活性制剂的研发和生产提供了理论参考。

HepG2 细胞是一种肝癌细胞，而肝脏是葡萄糖代谢的主要器官 (Xu *et al.* 2003)。因此，HepG2 细胞是一种体外研究葡萄糖消耗模拟体内的理想细胞。采用 HepG2 细胞模型对 IOP30 进一步降血糖研究，结果显示，0.01–1.0mg/mL 的 IOP30 能够极显著 ($P<0.01$) 增加 HepG2 细胞的葡萄糖消耗量，在 1.0mg/mL 时的效果优于二甲双胍。龙凯等 (2017) 发现相对分子量为 1×10^4 – 3×10^4 的桦褐孔菌多糖 (0.1mg/mL) 改善 HepG2 细胞的葡萄糖消耗 $[(3.08\pm 0.35)mmol/L]$ 效果最

佳,而本研究证实 IOP30 (0.1mg/mL) 具有更好的改善 HepG2 细胞的葡萄糖消耗能力 (4.65 ± 0.13) mmol/L。MTT 实验可知, 0.001–1mg/mL 的 IOP30 对 HepG2 细胞增殖无显著影响, 说明桦褐孔菌多糖 IOP30 各浓度组的葡萄糖消耗量的增加以及其协同胰岛素的作用并不是由于 HepG2 细胞数目的增加而导致, 潜在的原因可能是桦褐孔菌多糖通过促进细胞周围组织对葡萄糖的代谢, 及加强肝细胞对胰岛素的敏感性而起作用。

对照单糖标品及相对峰面积, IOP30 主要由鼠李糖 (7.93%)、阿拉伯糖 (3.12%)、木糖 (11.15%)、甘露糖 (19.08%)、葡萄糖 (39.17%)、半乳糖 (19.15%) 6 种单糖组成。这与 Wang *et al.* (2018) 和方好露等 (2017) 的研究组成单糖成分相同, 但是由于制备方法的差异, 各种单糖的含量存在差异。

综合来看, 桦褐孔菌 IOP30 降血糖可通过抑制 α -葡萄糖苷酶活性减少餐后血糖的形成, 促进细胞周围组织对葡萄糖的代谢, 加强肝细胞对胰岛素的敏感性而起作用。本研究成果可为桦褐孔菌这一珍稀药食真菌资源的开发和利用奠定相关理论基础。

[REFERENCES]

- American Diabetes Association, 2019. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes-2019. *Diabetes Care*, 42(1): S13-S28
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1): 248-254
- Chang C, Bao YH, 2017. Research progress of *Inonotus obliquus* polysaccharides. *Food & Machinery*, 33(1): 201-204 (in Chinese)
- Chen JW, Kong ZL, Tsai ML, Lo CY, Ho CT, Lai CS, 2018. Tetrahydrocurcumin ameliorates free fatty acid-induced hepatic steatosis and improves insulin resistance in HepG2 cells. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(3): 1075-1085
- Chen YQ, Zhou LJ, Li Y, 2006. A comparative study on the hypoglycemic effect of *Inonotus obliquus* from artificial culture mycelium, sclerotia and wild sclerotia of *Inonotus obliquus*. *Edible Fungi*, 28(3): 52-54 (in Chinese)
- Cudworth AG, Woodrow JC, 1997. Classification of diabetes. *The Lancet*, 1(8018): 949-950
- Dai YC, Li Y, 2011. Notes on the nomenclature of six important medicinal fungi in China. *Mycosystema*, 30(4): 515-518 (in Chinese)
- Dong HQ, Li M, Zhu F, Liu FL, Huang JB, 2012. Inhibitory potential of trilobatin from *Lithocarpus polystachyus* Rehd. against α -glucosidase and α -amylase linked to type 2 diabetes. *Food Chemistry*, 130(2): 261-266
- Etcheberria U, de la Garza AL, Campión J, Martínez JA, Milagro FI, 2012. Antidiabetic effects of natural plant extracts via inhibition of carbohydrate hydrolysis enzymes with emphasis on pancreatic alpha amylase. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 16(3): 269-297
- Fang SL, Zhu CJ, Gao LD, Diao ML, Hou Z, 2017. Nutrient component and monosaccharide composition of water extracts from *Inonotus*. *Guangzhou Chemical Industry*, 45(9): 155-157 (in Chinese)
- Gil-Campos M, Cañete R, Gil A, 2004. Adiponectin, the missing link in insulin resistance and obesity. *Clinical Nutrition*, 23(5): 963-974
- Kim JH, Ryu YB, Kang NS, Lee BW, Heo JS, Jeong IY, Park KH, 2006. Glycosidase inhibitory flavonoids from *Sophora flavescens*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 29(2): 302-305
- Li J, Wang Y, Lei JC, Hao Y, Yang Y, Yang CX, Yu JQ, 2014. Sensitisation of ovarian cancer cells to cisplatin by flavonoids from *Scutellaria barbata*.

- Natural Product Research, 28(10): 683-689
- Long K, Li DW, Su MS, Liang YH, Xie XM, 2017. Improvement on insulin resistance in HepG2 cells by polysaccharide from solid-state cultured *Inonotus obliquus*. Acta Edulis Fungi, 24(4): 39-43 (in Chinese)
- Mirmiran P, Bahadoran Z, Azizi F, 2014. Functional foods-based diet as a novel dietary approach for management of type 2 diabetes and its complications: a review. World Journal of Diabetes, 5(3): 267-281
- Runt NA, Dhore PW, Saoji SD, Kokare DW, 2016. Selected bioactive natural products for diabetes mellitus. Studies in Natural Products Chemistry, 48: 287-322
- Shen XY, Diao ML, Fang SL, Zhang MT, Chen T, Zhu CJ, 2016. Research on *Inonotus obliquus* extracts in α -glucosidase activity. Guangzhou Chemical Industry, 44(18): 59-61 (in Chinese)
- Stefano ED, Oliviero T, Udenilgwe CC, 2018. Functional significance and structure-activity relationship of food-derived α -glucosidase inhibitors. Current Opinion in Food Science, 20: 7-12
- Sun JE, Ao ZH, Lu ZM, Xu HY, Zhang XM, Dou WF, Xu ZH, 2008. Antihyperglycemic and antilipidperoxidative effects of dry matter of culture broth of *Inonotus obliquus* in submerged culture on normal and alloxan-diabetes mice. Journal of Ethnopharmacology, 118(1): 7-13
- Sun JE, Xu HY, Ao ZH, Lu ZM, Xu ZH, 2009. Hypoglycemic effect of dry matter of culture broth of *Inonotus obliquus* and *Tricholoma matsutake* in submerged culture. Natural Product Research and Development, 21(2): 339-342 (in Chinese)
- Tang HJ, Zhao DS, Xue ZL, 2018. Exploring the interaction between *Salvia miltiorrhiza* and α -glucosidase: insights from computational analysis and experimental studies. RSC Advances, 8: 24701-24710
- Wang C, Li WW, Chen ZQ, Gao XD, Yuan GQ, Pan YX, Chen HX, 2018. Effects of simulated gastrointestinal digestion *in vitro* on the chemical properties, antioxidant activity, α -amylase and α -glucosidase inhibitory activity of polysaccharides from *Inonotus obliquus*. Food Research International, 103: 280-288
- Wang JZ, An J, Lv HC, 2008. Methodological study on the determination of plant polysaccharides content. Strait Pharmaceutical Journal, 100(5): 48-50 (in Chinese)
- Wang MY, Zhao JZ, Xue J, Hu JR, Zhang JZ, Liu P, 2020. Hypoglycemic activity of purified polysaccharides from *Inonotus obliquus* *in vitro*. Science and Technology of Food Industry, 41(10): 316-320 (in Chinese)
- Wu YF, Yan MQ, 2018. Progress in hypoglycemic effect and mechanism of *Inonotus obliquus*. Journal of Chinese Medicinal Materials, 41(11): 2716-2720 (in Chinese)
- Xu HY, Sun JE, Lu ZM, Xu ZH, 2008. Optimization of extraction technique of polysaccharides from fermentation powder of *Inonotus obliquus*. Food and Fermentation Industries, 34(11): 175-179 (in Chinese)
- Xu JS, Ma MW, Purcell WM, 2003. Characterisation of some cytotoxic endpoints using rat liver and HepG2 spheroids as *in vitro* models and their application in hepatotoxicity studies. I. Glucose metabolism and enzyme release as cytotoxic markers. Toxicology and Applied Pharmacology, 189(2): 100-111
- Zhang AQ, Ni SY, Zhang JS, Zhao ZG, Pan YJ, 2006. Identification of 3-O-methyl methylpentose in polysaccharides from *Hericium erinaceus* Pers. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 26(10): 1477-1479 (in Chinese)
- Zhang JY, 2015. Study on hypoglycemic activity of aqueous extract from *Inonotus obliquus*. Master Thesis, Zhejiang University of Technology, Hangzhou. 32-33 (in Chinese)
- Zhang WJ, 1994. Biochemical research techniques for glycoconjugate. Zhejiang University Press,

Hangzhou. 16-17 (in Chinese)

[附中文参考文献]

常晨, 包怡红, 2017. 桦褐孔菌多糖的研究进展. 食品与机械, 33(1): 201-204

陈艳秋, 周丽洁, 李玉, 2006. 桦褐孔菌人工培养菌丝体、菌核与野生菌核多糖的降血糖比较试验研究. 食用菌, 28(3): 52-54

戴玉成, 李玉, 2011. 中国六种重要药用真菌名称的说明. 菌物学报, 30(4): 515-518

方好露, 朱长俊, 高丽丹, 刁苗璐, 侯哲, 2017. 桦褐孔菌水提物营养成分及单糖组成分析. 广州化工, 45(9): 155-157

龙凯, 李东文, 苏明声, 梁永红, 谢小梅, 2017. 桦褐孔菌菌质多糖改善 HepG2 细胞胰岛素抵抗作用的研究. 食用菌学报, 24(4): 39-43

沈心怡, 刁苗璐, 方好露, 张梦婷, 陈涛, 朱长俊, 2016. 桦褐孔菌提取物影响 α -糖苷酶活性研究. 广州化工, 44(18): 59-61

孙军恩, 许泓瑜, 敖宗华, 陆震鸣, 许正宏, 2009.

桦褐孔菌与松口蘑菌粉降血糖作用的研究. 天然产物研究与开发, 21(2): 339-342

王健壮, 安洁, 吕华冲, 2008. 植物多糖含量测定的方法学研究. 海峡药学, 100(5): 48-50

王梦雅, 赵喆祺, 薛娇, 胡锦荣, 张京生, 刘萍, 2020. 桦褐孔菌纯化多糖体外降血糖活性研究. 食品工业科技, 41(10): 316-320

吴宇锋, 颜美秋, 2018. 桦褐孔菌降血糖作用及机制研究进展. 中药材, 41(11): 2716-2720

许泓瑜, 孙军恩, 陆震鸣, 许正宏, 2008. 桦褐孔菌菌粉多糖提取工艺的优化. 食品与发酵工业, 34(11): 175-179

张安强, 倪扬亿, 张劲松, 赵子高, 潘迎捷, 2006. 猴头菌多糖的 3-O-甲基-甲基戊糖的鉴定. 药物分析杂志, 26(10): 1477-1479

张佳妍, 2015. 桦褐孔菌水提物降血糖活性研究. 浙江工业大学硕士论文, 杭州. 32-33

张惟杰, 1994. 糖复合物生化研究技术. 浙江大学出版社, 杭州. 16-17

(本文责编: 王敏)