

## 洋虫内产 $\beta$ -葡萄糖苷酶内生菌发酵液转化人参皂苷产物分析及其抗肿瘤活性研究

胡茜<sup>1</sup>, 王艺凝<sup>1</sup>, 申鹏飞<sup>2</sup>, 李雅倩<sup>1</sup>, 杨阳<sup>1</sup>, 王艳成<sup>1</sup>,  
姬文秀<sup>1\*</sup>, 董微巍<sup>1\*</sup>

(1. 延边大学农学院, 吉林 延吉 133000; 2. 吉林省和龙市工商联, 吉林 和龙 133400)

**摘要:**为提高人参皂苷生物利用度,明确人参皂苷药用洋虫体内生物转化规律及其代谢产物抗肿瘤活性,通过MRS(含七叶苷和柠檬酸铁)培养基筛选洋虫内生菌中高产 $\beta$ -葡萄糖苷酶的菌株,制备复合菌发酵剂液体转化人参皂苷提取物,利用高效液相色谱-串联质谱法分析发酵产物中人参皂苷的化学组成及其动态变化规律,采用四甲基噻唑蓝(methylthiazoletrazolium, MTT)染色法阐明发酵产物低( $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )、中( $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )、高( $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )剂量对A549细胞抗肿瘤活性的影响。人参提取物中共检测出Re、Rg1、Rf、Rb1、Rc、Rb2、Rd 7种皂苷,代谢产物中有去糖基化人参皂苷Rh1、Rg3和compoud K产生,发酵产物MTT试验显示高剂量组( $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )反应72 h抑制肿瘤细胞率可达85%。由此表明,利用洋虫内生菌复合菌液转化人参皂苷提取物可提高中药人参和洋虫的药用价值,为中草药的发酵改性提供了新思路。

**关键词:**人参皂苷; 洋虫内生菌; 发酵产物; 抗肿瘤活性; 高效液相色谱质谱

**doi:** 10.13304/j.nykjdb.2021.0691

中图分类号: R284

文献标志码: A

文章编号: 1008-0864(2023)02-0119-09

## Fermentation Products Analysis of Producing $\beta$ -glucosidase Endophytic Bacteria in *Martianus dermestoides* Transformed to Ginsenoside and Its Anti-tumor Activity

HU Qian<sup>1</sup>, WANG Yining<sup>1</sup>, SHEN Pengfei<sup>2</sup>, LI Yaqian<sup>1</sup>, YANG Yang<sup>1</sup>, WANG Yancheng<sup>1</sup>, JI Wenxiu<sup>1\*</sup>, DONG Weiwei<sup>1\*</sup>

(1. Agricultural College, Yanbian University, Jilin Yanji 133000, China; 2. Helong City Federation of Industry and Commerce in Jilin Province, Jilin Helong 133400, China)

**Abstract:** In order to improve the bioavailability of ginsenosides, and clarify the transformed products of ginsenosides in *Martianus dermestoides* and the anti-tumor activity of their metabolites, the functional strains of high-yield  $\beta$ -glucosidase in the endophytes of *Martianus dermestoides* were screened by MRS (esculin, ferric citrate) medium to prepare compound fermentation agent liquid fermentation ginsenoside extract. The chemical composition and dynamic changes of ginsenosides in fermentation products were analyzed by HPLC-MS/MS. The anti-tumor activities of the fermentation product in low ( $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), medium ( $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), and high ( $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) dose groups on A549 cells were clarified using methylthiazoletrazolium (MTT) blue staining method. A total of 7 saponins (Re, Rg1, Rf, Rb1, Rc, Rb2, Rd) were detected in ginseng extract. Among the metabolites, deglycosylated ginsenosides Rh1, Rg3 and compoud K were formed. The MTT experiment showed that the inhibition rate of tumor cells was 85% after treated 72 h in the high does group with the does  $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . These results suggested that a variety of high-activity stimulating ginsenosides were transformed by endophytic bacteria of *Martianus dermestoides*, which improved the medicinal value of Chinese herbal medicine ginseng and onion, and provided a new idea for fermentation and modification of Chinese herbal medicine.

收稿日期: 2021-08-12; 接受日期: 2021-09-21

基金项目:吉林省教育厅“十三五”科学技术项目(JJKH202002518KJ);吉林省教育厅“十三五”规划科研项目(JJKH20191131KJ)。

联系方式:胡茜 E-mail:326029463@qq.com

\*通信作者 董微巍 E-mail:wwdong@jyu.edu.cn; 姬文秀 E-mail:jwxlyq@jyu.edu.cn

**Key words:** ginsenoside; endophytic fungi of *Martianus dermestoides*; fermentation products; antitumor activity; HPLC-MS/MS

人参(*Panax ginseng* C. A. mey)为五加科人參属多年生草本植物<sup>[1]</sup>。在2012年,人参(人工种植)被国家卫生部批准为新资源食品,同时其在保持人体健康和平衡机体状态方面的保健作用日渐引起人们的关注<sup>[2-3]</sup>。人参皂苷是人参中主要的活性成分,具有抗肿瘤、抗衰老、降血糖、降血脂、促进细胞再生等多种功效<sup>[4-9]</sup>。研究表明,人参皂苷口服后在人体肠道菌作用下转化为人参皂苷的去糖基代谢产物更具药理活性<sup>[10]</sup>,如Rh1、Rg3和compound K等都可以直接作用于癌症组织,具有较强的抗肿瘤活性<sup>[11-14]</sup>。但是,由于人体肠道菌群的个体差异及人参皂苷在体内的停留时间等原因,使有些皂苷未在转化前就被排出体外,因此口服人参皂苷的作用效果较低,在生物体内的利用率不高。因此,体外人参皂苷去糖基化修饰对于提高人参的药用价值具有十分重要的意义。

内生菌资源在天然产物的生物转化中作为一类新型生物催化剂备受关注<sup>[15-16]</sup>。药用昆虫洋虫内生菌资源丰富,体内生存环境独特<sup>[17]</sup>,因其喜食中药人参所以推测其体内具有产β-葡萄糖苷酶水解人参皂苷功能的内生菌。因此,本研究对洋虫体内高效产β-葡萄糖苷酶内生菌进行筛选、鉴定,制备复合工程菌剂,液态发酵转化人参皂苷,提高Rh1、Rg3、compound K等去糖基化人参皂苷的转化率,对动态发酵反应过程中人参皂苷及其代谢产物化学组成进行研究,采用体外模拟人参皂苷在洋虫体内的代谢过程,明确其生物转化机制,利用四甲基噻唑蓝(methylthiazoletrazolium, MTT)染色法阐明低、中、高剂量发酵产物对肺癌A549细胞抗肿瘤活性,为人参皂苷系列产品及功能产品的开发奠定基础,为中药资源的综合利用提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料与仪器

试验材料:人肺腺癌耐顺铂株(A549/DDP)购自武汉普诺赛生命科技有限公司(Procell Life Science & Technology Co., Ltd.);洋虫来自延边大学植物保护实验室;正丁醇、无水乙醇、次氯酸钠

等均为分析纯,购于南京化学试剂股份有限公司;新鲜人参根(4年生植物)来自于吉林集安人参培育基地;人参皂苷标准品Rg1、Re、Rf、Rh1、Rb2、Rc、Rd、Rh1、Rg2、Rg3、F1、PPD和compound K购于国家标准物质网。

仪器包括离心机(TD-4C型,金坛区金城海澜仪器制造厂)、旋转蒸发仪(RE-2010型,郑州予达仪器科技有限公司)、培养箱(德国 Heraus公司)、倒置荧光相差显微镜(CR15-860HD型,苏州倍特嘉光电科技有限公司)。

### 1.2 人参皂苷提取物的制备及定性分析

人参粗皂苷制备:取100 g洗净的人参,干燥后粉碎成粉末,利用80%乙醇在82 °C条件下索氏回流提取3 h,反复提取2次后将萃取液合并,真空旋干,再置于烘箱50 °C干燥脱水,制备人参粗皂苷粉末,备用。

定性分析:使用甲醇溶解人参皂苷粉末后用0.22 μm滤膜过滤,利用液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)分析人参粗皂苷中的单体皂苷组成。

### 1.3 洋虫内生菌液的制备

以红枣和人参饲料按4:1的混合比例对洋虫进行饲养,培养箱体积40 cm×60 cm×20 cm,培养箱恒温24 °C、湿度75%的饲养条件下饲养1年。取洋虫成虫、幼虫各45只,同龄期洋虫15只为1组,每组生物学重复3次;将洋虫用无菌水清洗干净后,在厌氧培养箱内将其头部、翅部去除,放置于75%乙醇中90 s,后经次氯酸钠溶液浸泡15 s,去除洋虫体表微生物后用灭过菌的蒸馏反复冲洗,研钵研磨,加入蒸馏水移至离心管;500 r·min<sup>-1</sup>离心5 min,将上清液取出,再10 000 r·min<sup>-1</sup>离心5 min,收集沉淀;最后向沉淀中加入PBS缓冲液,制备成洋虫内共生菌液。

### 1.4 产β-葡萄糖苷酶功能菌株筛选、鉴定及高产 β-葡萄糖苷酶复合菌发酵液的制备

**1.4.1 七叶苜培养基筛选高效产β-葡萄糖苷酶功能菌株** 取100 μL稀释好的洋虫菌液加到MRS筛选培养基(添加秦皮甲素和柠檬酸铁),将洋虫菌液均匀地涂布在培养基上,于恒温培养箱

中颠倒放置,在厌氧条件下培养72 h,观察菌落生长。将边缘整齐且呈黑褐色的单一菌落挑选出来,将其接种到新的纯化培养基上,进行多次重复纯化直至得到单一菌株。从菌株中挑选出4株菌落颜色较深且生长状态良好的菌株,即为高效功能菌株。

**1.4.2 产 $\beta$ -葡萄糖苷酶功能菌株的分子生物学鉴定** 采用土壤基因组DNA提取试剂盒(DP336)提取基因组DNA,采用通用引物(上游引物ITS1:5'-TCCGTAGGTGAAACCTGCGG-3'和下游引物ITS4:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')进行PCR。PCR体系25  $\mu$ L,包括:1×PCR buffer,1.5 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>、200  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> dNTPs 0.5  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>上下游引物、50 ng模板DNA以及0.5 U Taq DNA聚合酶。以i-Cycler热循环仪进行扩增,PCR程序:94 °C 3 min;94 °C 30 s,56 °C 30 s,72 °C 50 s,32个循环;72 °C 7 min。PCR产物检测合格后送北京百迈客生物科技有限公司进行测序。

**1.4.3 高产 $\beta$ -葡萄糖苷酶复合菌液的制备** 按照相同比将4株功能菌株进行5 d的规模化培养驯化,制备成复合工程菌种子液,备用。

## 1.5 复合菌液与人参皂苷的发酵反应

取人参皂苷粗提物4 mg,加入种子液500  $\mu$ L至2 mL离心管中,混合均匀,在厌氧条件下(N<sub>2</sub> 85%,H<sub>2</sub> 10%,CO<sub>2</sub> 5%)将筛选出的菌株及筛选菌株的混合菌株富集培养24 h后,将菌液与人参皂苷反应20 d,分别在生物反应时间为0、1、2、3、7、12和20 d时采集发酵产物,利用LC-MS/MS测定分析。

## 1.6 HPLC-MS/MS发酵产物分析

**1.6.1 色谱条件** 采用安捷伦1260系列液相色谱系统与安捷伦Poroshell ZORBAX SB-C<sub>18</sub>柱(4.6 mm×250 mm,5  $\mu$ m)和C<sub>18</sub>保护柱进行检测分析。该系统使用Mass Hunter采集软件B.07.00进行操作。流动相A为0.1%甲酸-水溶液、B为0.1%甲酸-乙腈溶液。采用梯度洗脱程序:B体积分数由0%于0—20 min内线性升至23%;在13—33 min由23%提升至46%;在33—38 min由46%提升至68%;在38—45 min以68%维持7 min;在45—55 min由68%提升至100%;在55—63 min由100%降至23%。进样量2  $\mu$ L,流速0.5 mL·min<sup>-1</sup>,

检测波长203 nm。

**1.6.2 质谱条件** 采用安捷伦1260HPLC系统联用安捷伦6420三重四级杆串联质谱(ESI-QQQ-MSMS, Agilent Technologies, Santa Clara, USA)进行质谱分析。离子化条件如下:ESI电离源,正离子扫描,喷雾电压4 kV。采用二级全扫描模式,扫描质荷比范围500~1 500。采用多离子检测模式作为筛选及评价方法,对各天然物样品中皂苷类物质进行初步筛选检测,数据处理软件为Mass Hunter工作站B.06.06软件<sup>[18]</sup>。

## 1.7 发酵产物对A549细胞抗肿瘤活性

取处于对数生长期的A549细胞,将细胞悬液的含量调至5×10<sup>4</sup> cell·mL<sup>-1</sup>。96孔培养板中每个孔加入100  $\mu$ L细胞悬液,将其放入5% CO<sub>2</sub>,37 °C培养箱培养24 h,至细胞长至单层;然后将孔中上部澄清的液体吸出舍弃,利用PBS缓冲液洗1~2遍后,加入培养基(不含血清)稀释分别得到0、0.5、2.0、5.0 mg·L<sup>-1</sup>的筛选组分。每个水平6次重复。每个孔抽取100  $\mu$ L筛选出来的组分。将细胞板放在培养箱中孵育48 h,继续将孔中上部澄清的液体吸出舍弃,用PBS溶液淋洗2遍。在MTT法中,向每孔加入20  $\mu$ L MTT溶液(5 mg·L<sup>-1</sup>,即0.5% MTT)和80  $\mu$ L培养基(不含血清),4 h后培养终止,小心吸去孔内培养液。每孔加入150  $\mu$ L DMSO,摇床低速振荡10 min,使结晶物充分溶解。利用ELISA reader在波长490 nm测得OD值,同时观察细胞活性。试验中设立空白对照(无细胞,加培养基、MTT和DMSO)。3次重复试验,取平均值用来计算细胞抑制率。

$$\text{细胞抑制率} = (\text{对照组吸光度值} - \text{试验组吸光度值}) / \text{对照组吸光度值} \times 100\% \quad (1)$$

## 1.8 方法评价

进样液体为10种人参皂苷标准品的混合溶液。以混合标准系列溶液的浓度为横坐标,以定量离子色谱的峰面积为纵坐标,进行线性回归,绘制标准曲线。稀释混合标准溶液,用信噪比S:N=3:1时的含量计算各人参皂苷标准品的最低检出含量(limit of detection, LOD),用信噪比S:N=10:1时的含量计算定量限(limit of quantitation, LOQ)。向空白菌液发酵产物样品中分别添加高(5 mg·L<sup>-1</sup>)、中(2 mg·L<sup>-1</sup>)、低(0.5 mg·L<sup>-1</sup>)3种不同

水平的混合标准溶液,每个水平平行制备3份,进行加标回收率试验。

### 1.9 数据分析

采用SPSS11.5软件进行数据的统计分析。

## 2 结果

### 2.1 人参皂苷样品的统计与评价

配制100、200、500、1 000、2 000、5 000、8 000

和10 000 ng·mL<sup>-1</sup>人参皂苷标准液,以人参皂苷标准品质量浓度为x轴,其对应峰面积为y轴绘制标准曲线。结果(表1)表明,在100~10 000 ng·mL<sup>-1</sup>范围内,10种皂苷标准品的线性关系较好,R<sup>2</sup>均在0.99以上。以3倍信噪比计算10种标准品的检测限,不同标准品的检测限在8.5~12.9 ng·mL<sup>-1</sup>之间;以10倍信噪比定量限,不同标准品的定量限在28.8~34.9 ng·mL<sup>-1</sup>之间,平均回收率为83.9%~119.3%,表明该方法可以满足检测要求。

表1 人参皂苷样品的回归方程、相关系数、线性范围、检测限、定量限及回收率

Table 1 Regression equation, correlation coefficient, linear range, detection limit, quantification limit and recovery rate of ginsenoside samples

化合物 Compound	回归方程 Regression equation	R <sup>2</sup>	线性范围	检测限	定量限	回收率 Recovery rate/%		
			Linear range/ (ng·mL <sup>-1</sup> )	LOQ/ (ng·mL <sup>-1</sup> )	LOD/ (ng·mL <sup>-1</sup> )	100 ng·mL <sup>-1</sup>	500 ng·mL <sup>-1</sup>	2 000 ng·mL <sup>-1</sup>
Re	y=4.301 0x-50.003	0.997 4	100~10 000	9.8	28.8	114.1±6.1	92.2±7.3	105.3±11.9
Rg1	y=1.897 0x-35.112	0.994 6	100~10 000	8.5	31.9	108.9±4.6	86.2±7.3	100.8±9.2
Rf	y=0.700 3x-4.213	0.990 2	100~10 000	12.9	34.2	98.1±7.3	83.9±6.3	110.5±9.2
Rb1	y=2.198 0x+50.013	0.997 3	100~10 000	10.7	30.3	89.9±4.8	81.7±8.4	109.7±8.6
Rc	y=2.603 0x+30.227	0.998 5	100~10 000	8.6	29.8	111.9±7.9	104.8±6.9	99.3±6.4
Rb2	y=7.699 0x+26.989	0.991 7	100~10 000	11.5	37.7	97.2±9.8	102.3±0.7	105.8±2.4
Rd	y=3.494 0x-59.306	0.993 5	100~10 000	12.1	41.7	95.1±7.9	100.3±0.6	96.2±4.7
Rh1	y=0.565 6x+4.012	0.999 2	100~10 000	10.0	33.2	119.3±8.2	94.1±9.4	87.5±5.5
Rg3	y=0.159 8x+2.476	0.992 6	100~10 000	9.6	34.9	101.9±7.6	87.9±6.9	103.9±9.4
Compound K	y=8.983 0x-17.006	0.995 7	100~10 000	11.2	28.9	87.9±9.4	112.1±2.1	76.7±10.0

### 2.2 产β-葡萄糖苷酶功能菌株的分子生物学鉴定

通过筛选培养基培养,从洋虫成虫、幼虫菌液中筛选出4株具有明显显色反应的产β-葡萄糖苷酶功能菌株,经18S rRNA基因扩增进行分子生物

学鉴定和Blast数据库比对,4个菌株分别为烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)、鸽色蓝状菌(*Talaromyces columbinus*)、长枝木霉(*Trichoderma longibrachiatum*)及粉色面包霉菌(*Neurospora crassa*)(表2)。

表2 4株菌的18S rRNA基因相似性对比及鉴定结果

Table 2 Comparison of 18S rRNA gene similarity of 4 strains and identification results

菌株 Strain	基因登录号 Gene ID	相似性 Similarity/%	种 Species
AD-01	MZ558029	98.26	烟曲霉 <i>Aspergillus fumigatus</i>
AD-03	MZ558030	99.82	鸽色蓝状菌 <i>Talaromyces columbinus</i>
AD-04	MZ558031	96.53	长枝木霉 <i>Trichoderma longibrachiatum</i>
AD-08	MZ558033	98.75	粉色面包霉菌 <i>Neurospora crassa</i>

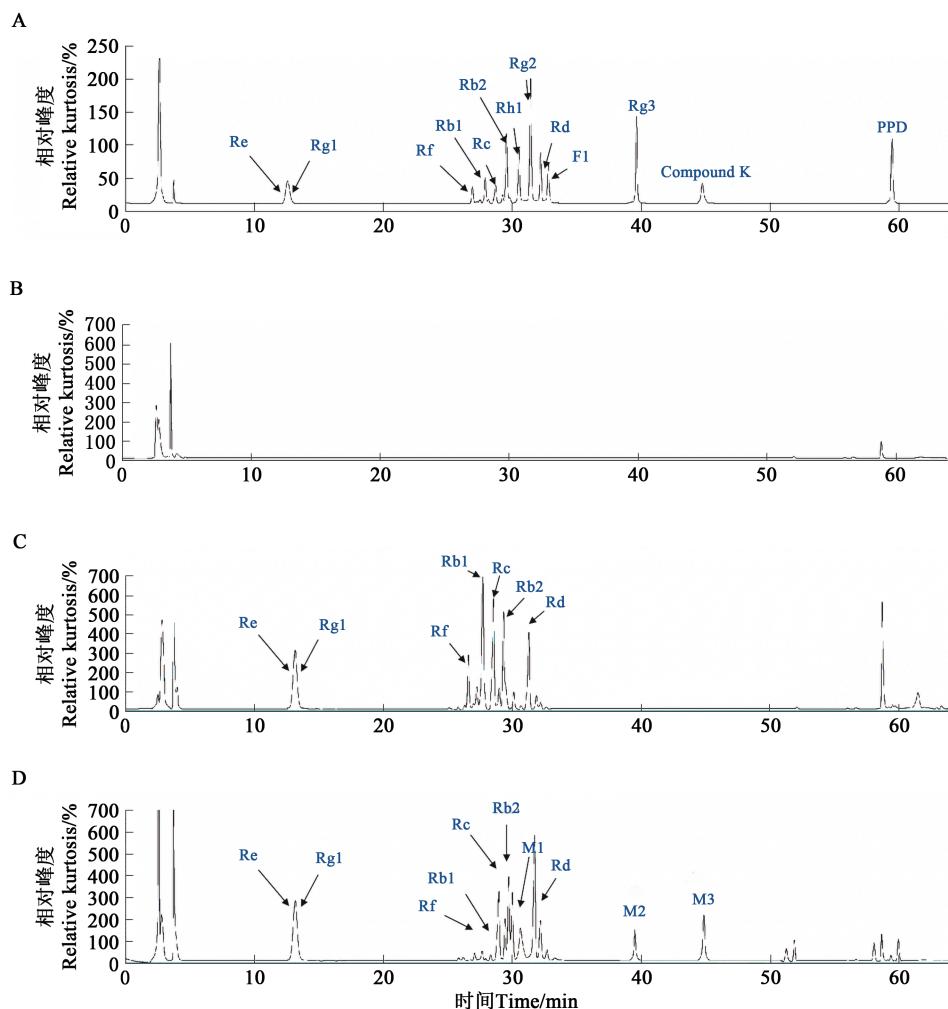
### 2.3 洋虫内生菌复合菌液发酵人参皂苷粗提物发酵产物分析

2.3.1 复合菌液与人参皂苷发酵产物定性分析由图1和图2可知,在人参皂苷提取物中共检测出

Rg1、Re、Rf、Rb1、Rc、Rb2和Rd 7种人参皂苷;在复合菌液中功能菌的协同作用下,转化产物中检测出Rg1、Re、Rf、Rb1、Rc、Rb2和Rd 7种人参皂苷和Rg3、compound K和Rh1 3种人参皂苷去糖基

化产物,且随着时间的延长其代谢产物含量呈明显升高趋势。由此表明,利用洋虫内生菌复合菌

液直接发酵人参皂苷粗提物可同时制备多种高活性次级人参皂苷产物。



A:人参皂苷标准品;B:菌液空白对照;C:人参皂苷粗提物;D:菌液与人参皂苷发酵20 d产物

A: Ginsenoside standard product; B: Bacterial liquid blank control; C: Ginsenoside crude extract; D: Bacterial liquid and ginsenoside fermented product for 20 d

图1 4株产 $\beta$ -葡萄糖苷酶真菌联合发酵人参皂苷提取液产物分析

**Fig. 1** Analysis of the product of 5 strains of  $\beta$ -glucosidase-producing fungi combined fermentation of ginsenoside extract

**2.3.2 复合菌液与人参皂苷发酵产物定量分析**  
由图3可知,大部分人参皂苷随着发酵反应的进行含量逐渐减少;而人参皂苷Rd的含量为先降低后升高;发酵产物人参皂苷Rg3的含量先增加后降低,8 d时含量最高,为 $425 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,20 d时降至 $221 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;去糖基化人参皂苷Rh1和compound K含量呈上升趋势。这可能是随着发酵反应进行人参皂苷被水解,大部分人参皂苷含量降低,其中人参皂苷Rd作为代谢中间产物在代谢初期被水解转化,同时二醇类皂苷Rb1、Rc、

Rb2在发酵反应过程中C-20位外部糖基被水解掉又转化生成Rd,因此,0~3 d人参皂苷Rd含量呈下降趋势,在3~20 d又呈升高趋势。Rd在 $\beta$ -葡萄糖苷酶等水解酶的作用下(水解掉C-20位糖基)转化为分子量更小的人参皂苷Rg3,同时C-3位糖基被复合功能菌水解产生人参皂苷compound K,因此,Rg3和compound K含量随发酵时间的延长逐渐增加。三醇类人参皂苷Rg1、Re、Rf的主要发酵产物为稀有人参皂苷Rh1,其中,Re在 $\beta$ -葡萄糖苷酶等水解酶的作用下C-6位外部糖基被水解

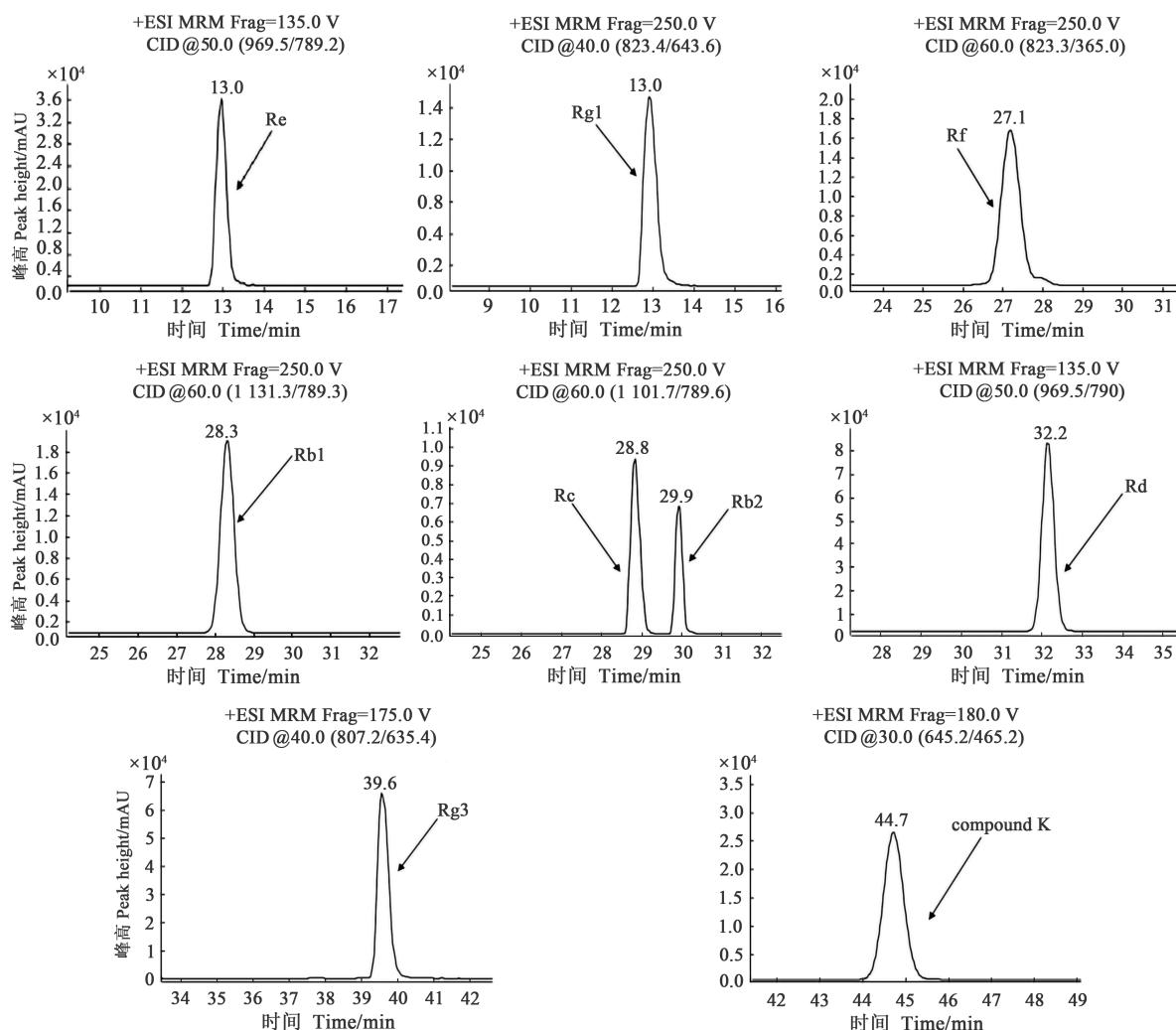


图2 发酵产物EIC色谱图

Fig. 2 EIC chromatogram of fermentation products of ginseng extract

掉,转化生成人参皂苷Rg1,Rg1再水解掉C-6位外部糖基转化生成人参皂苷Rh1;Rf直接被水解掉C-6位外部糖基转化生成Rh1,因此,Rh1含量呈上升趋势。综上所述,人参皂苷二醇类皂苷以Rd为中间代谢产物,生物转化途径为Rb1/Rb2/Rc→Rd→Rg3/compound K;三醇类人参皂苷的转化途径为Re→Rg1→Rh1和Rf→Rh1,且人参皂苷二醇类皂苷更容易被发酵菌剂水解。

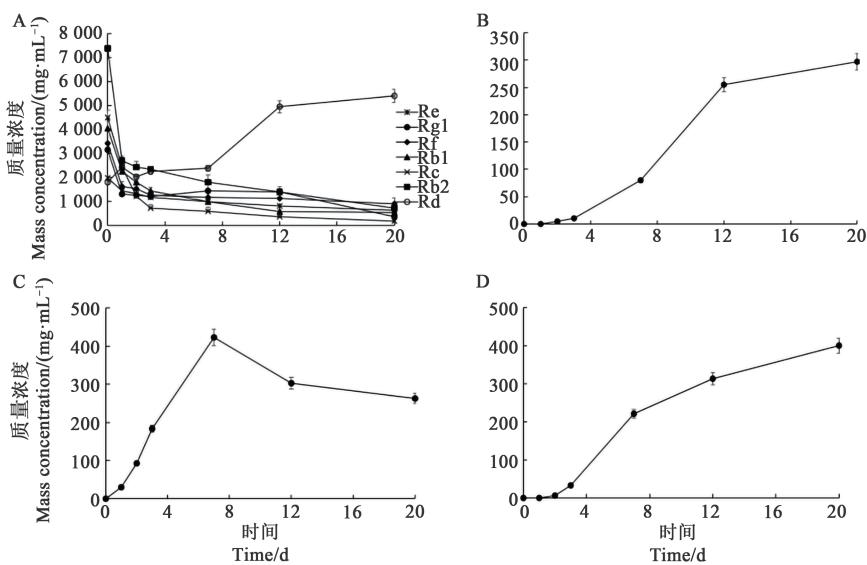
#### 2.4 复合菌液与人参皂苷发酵产物对肺癌A549细胞活性的影响

由图4可知,复合菌液与人参皂苷发酵产物具有较好的抗肿瘤活性,抗肿瘤效果优于发酵菌液及人参皂苷粗提物。对比复合菌液与人参皂苷发酵20 d产物在不同剂量(0.5、2.0和5.0 mg·L<sup>-1</sup>)和不同处理时间下对肺癌A549细胞抑制效果,结

果(图5)表明,发酵产物在5.0 mg·L<sup>-1</sup>、反应72 h时对肿瘤细胞的抑制率达85%,且在一定的范围内随着发酵产物质量浓度的升高对肿瘤细胞的抑制率明显升高。

#### 3 讨论

稀有人参皂苷的各种生物活性越来越受到人们的重视,但是由于其天然含量低,使其在开发利用时备受限制,利用生物转化法对人参皂苷的糖链进行结构修饰,成为获得稀有人参皂苷的有效途径。目前,多数研究停留于单一菌株转化单一皂苷,如程雅韵等<sup>[19]</sup>从发酵食品中分离筛选出1株产β-葡萄糖苷酶的植物乳杆菌菌株E9,可将Rb1转化成Rg3;张丽娜等<sup>[20]</sup>从人参种植土中筛选到1株可将Re转化为Rh1的菌株S329,但是皂苷



A: 人参皂苷; B: Rh1; C: Rg3; D: Compound K

A: Ginseng main saponins; B: Rh1; C: Rg3; D: compound K

图3 4株产 $\beta$ -葡萄糖苷酶真菌联合发酵产物人参皂苷定量分析

Fig. 3 Quantitative analysis of ginsenosides from the combined fermentation of 4  $\beta$ -glucosidase-producing

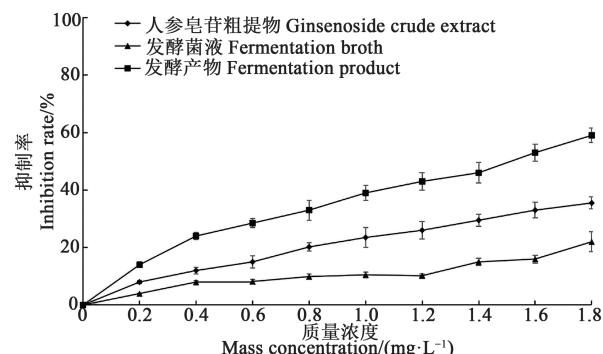
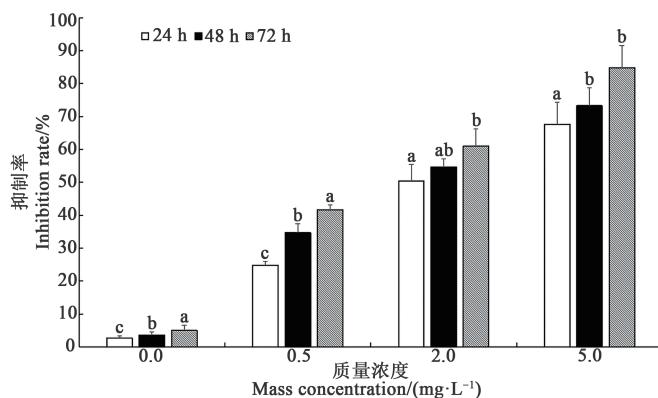


图4 洋虫内生真菌/人参皂苷 20 d 发酵产物对肺癌细胞 A549 的细胞抑制率

Fig. 4 Inhibition rate of 20-day fermentation product of endophytic fungi/ginsenosides of worms on lung cancer cell A549 fermentation



注: 不同小写字母表示不同处理间在  $P<0.05$  水平差异显著。

Note: Different lowercase letters indicate significant differences between different treatments at  $P<0.05$  level.

图5 复合菌液-人参皂苷发酵产物对肺癌 A549 细胞的活性抑制率

Fig. 5 Inhibition rate of compound bacterial liquid-ginsenoside fermentation product on lung cancer A549 cells

单体提纯工艺复杂,产品生产成本价格高,因此难以推广应用于生产实践。本研究利用喜食人参的洋虫源内生菌复合剂直接发酵人参皂苷粗提物,同时制备多种高活性次级人参皂苷产物,使其更具有实际应用价值。

不同人参皂苷单体具备不同的药理活性。目前,人参皂苷发酵产物在抗肿瘤方面取得突破性进展,库受权<sup>[21]</sup>检测红曲霉和人参双向固体发酵产物对宫颈癌Hela细胞的抑制率,当发酵产物质量浓度为200、100、50和25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时抑制率分别为50.89%、36.19%、23.18%、20.68%,与本研究结果一致,即在一定范围内,发酵产物对癌症细胞的抑制率随着其质量浓度的增加逐渐升高。吴彤<sup>[22]</sup>用MTT比色法与流式细胞仪分析Rg3对人大肠癌细胞株HCE8693的生长抑制作用,发现当Rg3含量为0.010%、0.017%、0.025%和0.050%时对HCE8693细胞的生长抑制率分别为8.6%、8.6%、18.7%和21.9%。对比前人研究结果,本研究的复合菌剂与人参皂苷发酵代谢产物更加丰富(10种),乙醇萃取的发酵产物在5.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、反应72 h时的肿瘤细胞抑制率可达85%,且随着发酵产物质量浓度的增加,对肿瘤细胞的生长抑制率明显升高,即对肿瘤细胞生长的抑制效果更加明显。此后,在此基础上本课题组将进一步深入研究,探明复合菌剂与人参皂苷发酵产物抑制肿瘤细胞生长的作用机制,为抗肿瘤先导药物研发奠定理论基础。

## 参 考 文 献

- [1] 国家药典委员会.中国药典:一部[M].北京:中国医药出版社,2015:85-96.
- National Pharmacopoeia Committee. Chinese pharmacopoeia: one [M]. Beijing: China Medical Press, 2015:85-96.
- [2] JING R, CHANG Z, LU Q, et al.. Plant resources, C-13-NMR spectral characteristic and pharmacological activities of dammarane-type triterpenoids [J/OL]. Molecules, 2016, 21(8): 1047 [2021-07-10]. <https://doi.org/10.3390/molecules21081047>.
- [3] ZHANG D B, KIM Y J, YANG D C. Biosynthesis and biotechnological production of ginsenosides [J]. Biotechnol. Adv., 2015, 33(6):717-735.
- [4] LEE M, KIM M S, YOO J, et al.. Enhanced anticancer effects of a mixture of low-dose mushrooms and panax ginseng root extracts in human colorectal cancer cells [J]. Oncol. Rep., 2017, 38(3):1597-1604.
- [5] HWANG E, PARK S Y, CHANG S Y, et al.. Antiaging effects of the mixture of panax ginseng and crataegus pinnatifidain human dermal fibroblasts and healthy human skin [J]. J. Ginseng. Res., 2017, 41(1):69-77.
- [6] 钟振东,王春梅,汪为,等.三七总皂苷的抗糖尿病机理及其降血糖成分研究[J].四川农业大学学报,2014,45(2):235-239.
- ZHONG Z D, WANG C M, WANG W, et al.. Major hypoglycemic ingredients of panax notoginseng saponins for treating diabetes [J]. J. Sichuan Univ., 2014, 45(2):235-239.
- [7] DONG Z, XU M, JIE H, et al.. The protective effect of ginsenoside Rg1 on aging mouse pancreas damage induced by D-galactose [J]. Exp. Ther. Med., 2017, 14(1):616-622.
- [8] MIN L, ZHANG H J, FEI W, et al.. Anti-aging effects of ginseng and ginsenosides on the nervous system [J]. Int. J. Pharmacol., 2018, 14(8):1188-1197.
- [9] JI A A, WANG G J, HAO H P, et al.. Differential regulations of blood pressure and perturbed metabolism by total ginsenosides and conventional antihypertensive agents in spontaneously hypertensive rats [J]. Acta. Pharmacol. Sin., 2010, 31(8):930-937.
- [10] 刘明,宋凤媛,李芳彤,等.天然产物与肠道微生物相互作用研究进展[J].应用化学,2021,38(4):367-375.
- LIU M, SONG F Y, LI F T, et al.. Research progress on the interaction between natural products and intestinal microbes [J]. Chin. J. Appl. Chem., 2021, 38(4):367-375.
- [11] VALIUS M, DREIZE N, STANKEVICIUS V, et al.. Proteomic analysis of breast cancer resistance to the anticancer drug Rh1 reveals the importance of cancer stem cells [J]. Cancers, 2019, 11(7):972-977.
- [12] NAKHJAVAN M, SMITH E, TOWNSEND A R, et al.. Anti-angiogenic properties of ginsenoside Rg3 [J]. Molecules, 2020, 25(21):4905-4911.
- [13] CHEN H F, WU L X, LI X F, et al.. Ginsenoside compound K inhibits growth of lung cancer cells via HIF-1 $\alpha$ -mediated glucose metabolism [J]. Cell. Mol. Biol., 2019, 65(4):48-52.
- [14] 罗林明,石雅宁,姜懿纳,等.人参抗肿瘤作用的有效成分及其机制研究进展[J].中草药,2017,48(3):582-596.
- LUO L M, SHI Y N, JIANG Y N, et al.. Research progress on the effective components and mechanisms of ginseng's anti-tumor effect [J]. Chin. Herbal Med., 2017, 48(3):582-596.
- [15] 王宇,戴传超.内生真菌对生物活性物质代谢转化作用研究进展[J].中草药,2009,40(9):1496-1499.
- WANG Y, DAI C C. Research progress of endophytic fungi on the metabolism and transformation of biologically active substances [J]. Chin. Herbal Med., 2009, 40(9):1496-1499.
- [16] FILL T P, SILVA J, OLIVEIRA K, et al.. Oxidative potential of some endophytic fungi using 1-indanone as a substrate [J/OL]. J. Microbiol. Biotechnol., 2012, 22(6):832 [2021-07-15]. <https://doi.org/10.4014/jmb.1112.12014>.
- [17] 房柳,王艳成,姬文秀,等.产β-葡萄糖苷酶洋虫内共生真菌筛选、鉴定及联合转化作用机制[J].食品与机械,2020, 36(11):16-22,90.
- FANG L, WANG Y C, JI W X, et al.. Screening, identification and joint transformation mechanism of β-glucosidase-producing endosymbiont fungi [J]. Food Mach., 2020, 36(11): 16-22,90.
- [18] 陈奕彤,张斯然,张春波,等.基于Endo-M N175Q糖链转移反

- 应与丙酮富集糖肽的LC-MS分析糖蛋白N-糖链[J].分析测试学报,2018,37(11):1311-1315.
- CHEN Y T, ZHANG S R, ZHANG C B, et al.. LC-MS analysis of glycoprotein N-glycans based on Endo-M N175Q sugar chain transfer reaction and acetone enrichment of glycopeptides [J]. J. Analysis Testing, 2018, 37(11):1311-1315.
- [19] 程雅韵,李志华,汪庭瑞,等.产人参转化 $\beta$ -葡萄糖苷酶乳酸菌菌株的筛选[J].食品科技,2014,39(8):13-17.
- CHENG Y Y, LI Z H, WANG T R, et al.. Screening of lactobacillus strains producing giseng to transform  $\beta$ -Glucosidase [J]. Food Sci. Technol., 2014, 39(8):13-17.
- [20] 张丽娜,明有山,曲波权,等.微生物转化人参皂苷Re为人参皂苷Rh1的研究[J].中国酿造,2017,36(11):114-117.
- ZHANG L N, MING Y S, QU B Q, et al.. Study on the microbial transformation of ginsenoside Re into ginsenoside Rh1 [J]. China Brew., 2017, 36(11):14-117.
- [21] 库受权.红曲霉-人参双向固体发酵及其产物药理活性研究[D].延边:延边大学,2014.
- KU S Q. Study on the two-way solid fermentation of monascus-ginseng and its pharmacological activity [D]. Yanbian: Yanbian University, 2014.
- [22] 吴彤.人参皂苷Rg3对大肠癌细胞株HCE8693作用的实验研究[D].杭州:浙江大学,2004.
- WU T. Experimental study on the effect of ginsenoside Rg3 on colorectal cancer cell line HCE8693 [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2004.

(责任编辑:张冬玲)