

蛹虫草多糖降胆固醇作用的机制探讨

邵波¹, 刘伯言², 陈刘欣¹, 温元元², 王效琰¹, 翟晓天¹, 周正¹, 李英², 赵亚南², 司艳红¹, 秦树存²
(山东第一医科大学 山东省医学科学院 1. 基础医学院, 2. 动脉粥样硬化研究所, 山东省泰安市 271000)

[关键词] 蛹虫草; 多糖; 胆固醇; 胆酸盐; HepG2 细胞

[摘要] **目的** 提取并纯化蛹虫草多糖 (CMPS), 分析相对分子质量分布, 初步探讨其降胆固醇的作用机制。**方法** 通过热水提取-醇沉法分离 CMPS, 采用 Sevage 试剂、AB-8 大孔吸附树脂进行纯化, 应用高性能凝胶渗透色谱明确 CMPS 相对分子质量分布。模拟机体胃肠道环境, 测定不同质量浓度 CMPS 结合胆酸盐能力; 培养 HepG2 细胞, 观察 CMPS 对肝细胞增殖率及细胞内胆固醇水平的影响, 蛋白免疫印迹分析肝细胞内 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (HMG-CoA-R) 及甾醇调节元件结合蛋白 2 (SREBP-2) 表达变化。**结果** CMPS 中相对分子质量为 3 119 kDa 的多糖含量最高; CMPS 体外结合胆酸盐能力较强, 与胆酸钠、牛磺胆酸钠及甘氨酸胆酸钠的结合率分别达到 63%、62% 和 50%。细胞实验数据表明低于 200 mg/L 的 CMPS 干预 HepG2 细胞 24 h 没有抑制其增殖率。同时, 在安全质量浓度范围内 (<200 mg/L), CMPS 可显著下调肝细胞内 SREBP-2 和 HMG-CoA-R 蛋白表达, 降低肝细胞内总胆固醇水平。**结论** CMPS 具有良好的体外降胆固醇活性。

[中图分类号] R33;R5

[文献标识码] A

Study on the mechanism of *Cordyceps militaris* polysaccharides on cholesterol lowering

SHAO Bo¹, LIU Boyan², CHEN Liuxin¹, WEN Yuanyuan¹, WANG Xiaoyan¹, ZHAI Xiaotian¹, ZHOU Zheng¹, LI Ying², ZHAO Yanan², SI Yanhong¹, QIN Shucun²

(1. College of Basic Medical Sciences, 2. Institute of Atherosclerosis, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Tai'an, Shandong 271000, China)

[KEY WORDS] *Cordyceps militaris*; polysaccharides; cholesterol; cholic acid salt; HepG2 cells

[ABSTRACT] **Aim** To extract and purify *Cordyceps militaris* polysaccharides (CMPS), analyze its molecular weight distribution and preliminarily explore its mechanism of cholesterol lowering. **Methods** CMPS was separated by hot water extraction and alcohol precipitation, and purified by seavage reagent and AB-8 macroporous adsorption resin. The molecular weight distribution of CMPS was determined by high-performance gel permeation chromatography. Then, the ability of CMPS to bind cholic acid salt was measured in a simulated gastrointestinal environment. Meanwhile, HepG2 cells were cultured and the effect of CMPS on proliferation rate and total cholesterol (TC) level was observed in HepG2 cells. The protein expressions of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMG-CoA-R) and sterol regulatory element binding protein-2 (SREBP-2) in hepatocytes were analyzed by Western blot. **Results** The content of polysaccharides with molecular weight of 3 119 kDa in CMPS was the most, followed by 649 kDa and 20 kDa. The binding ability of CMPS to cholic acid salt was strong, and the binding rates of CMPS to sodium cholate, sodium taurocholate and sodium glycine cholate were respectively 63%, 62% and 50%. Cell culture showed CMPS concentration lower than 200 mg/L did not inhibit the growth of HepG2 cells after treatment for 24 hours. CMPS significantly down-regulated the protein expressions of HMG-CoA-R and SREBP-2 and decreased TC level in hepatocytes. **Conclusion** CMPS has the potential to lower cholesterol level.

[收稿日期] 2019-12-16

[修回日期] 2020-02-18

[基金项目] 国家自然科学基金(81600681); 山东省泰山学者岗位专项科研基金(ts201511057); 国家级大学生创新创业训练计划项目(201810439061)

[作者简介] 邵波, 研究方向为虫草多糖药理作用, E-mail 为 15552849287@163.com。通信作者秦树存, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为脂蛋白代谢与心脑血管疾病的防治, E-mail 为 13583815481@163.com。通信作者司艳红, 硕士, 副教授, 研究方向为动脉粥样硬化分子机制, E-mail 为 zhaosixinkang@163.com。

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)性心脑血管疾病严重危害人类健康,是引起发达国家和部分发展中国家人类死亡的主要原因之一,有效地降胆固醇治疗可显著减少 As 发病率。目前已有多种降胆固醇药物应用于临床,然而,合成药物存在不耐受及毒副作用等问题^[1]。因此,寻找天然降胆固醇药物并确证其生物学活性具有重要意义。蛹虫草(*Cordyceps militaris*),又名北蛹虫草、北冬虫夏草等,可寄生于鳞翅目、鞘翅目、双翅目等昆虫的幼虫或蛹体内。与冬虫夏草相比,蛹虫草生长速度快,易于人工培养产生子实体。大量研究表明,蛹虫草的有效组分和药理效果接近或超过冬虫夏草,可作为冬虫夏草的替代品^[2]。蛹虫草多糖(polysaccharides from *Cordyceps militaris* (L.) Link, CMPS)是蛹虫草的主要活性成分之一,药理研究发现 CMPS 具有免疫调节、降血压、抗氧化、抗炎、抗肿瘤等生物活性^[3]。中国科学院联合北京大学^[4]和韩国研究机构^[5]报道了蛹虫草提取物具有降脂活性,但具体分子机制尚未完全阐明。本研究提取并初步纯化获得 CMPS,通过体外结合胆酸盐实验和肝细胞合成胆固醇干预实验,探讨 CMPS 降胆固醇的可能机制,为 CMPS 作为降胆固醇药物的开发利用提供更多的理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要药品和试剂

蛹虫草购于泰安岱珍生物科技有限公司;胆酸钠、牛磺胆酸钠、甘氨酸胆酸钠购于阿拉丁试剂有限公司;HepG2 细胞购自中国科学院上海细胞研究所;胎牛血清购自 Gibco 公司;DMEM 培养基、胰酶购自 Hyclone 公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒、RIPA 裂解液购自北京索莱宝科技有限公司;组织总胆固醇试剂盒购自中生北控生物科技股份有限公司;一抗 β 肌动蛋白(β -actin)、3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, HMG-CoA-R)、甾醇调节元件结合蛋白 2(sterol regulatory element binding proteins-2, SREBP-2)购自 Abcam 公司;二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 主要仪器和设备

旋转蒸发仪购自德国 Heidolph 公司;FD8508 真空冷冻干燥机购自韩国 Ilshin 公司;SpectraMax iD3

多功能酶标仪购自美国 Molecular Devices 公司;CO₂ 培养箱购自德国 Binder 公司。

1.3 多糖的制备

首先,用 5 倍体积 95% 乙醇回流脱脂 2 次,每次 2 h,晾干后用 5 倍体积纯净水在 95 ℃ 条件下回流提取 3 次,每次 2 h,获取蛹虫草水提液,合并浓缩,80% 乙醇醇沉 24 h,离心,得沉淀,依次用无水乙醇、丙酮、乙醚各洗涤 2 次,晾干,获取粗多糖。然后,把粗多糖按照 $\rho(\text{多糖}) = 0.05 \text{ g/mL}$ 重新溶于水中,按照 $V(\text{多糖溶液}) : V(\text{Sevage 试剂}) [V(\text{氯仿}) : V(\text{正丁醇}) = 4 : 1] = 3 : 1$ 搅拌 30 min,5 000 r/min 离心 20 min,去掉底层有机相和蛋白层,重复 5~6 次至蛋白完全去除。随后,用 AB-8 大孔吸附树脂去色素,真空冷冻干燥机干燥后储存,获得初步纯化多糖。

1.4 多糖含量测定

采用苯酚-硫酸法测定多糖质量浓度,简述如下:配制 5% 苯酚溶液,配制 0.2 g/L 葡萄糖溶液标准品,取 5 mg CMPS 溶于 10 mL 水中配制 CMPS 母液。分别吸取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 葡萄糖溶液标准品至试管中,并以纯净水补至 2.0 mL,同时吸取不同稀释浓度的 CMPS 溶液 2.0 mL,在避光环境中加入 5% 苯酚 1.0 mL 及浓硫酸 5.0 mL 混匀,60 ℃ 水浴 20 min 后于 490 nm 处测吸光度。绘制标准曲线,计算 CMPS 溶液多糖质量浓度和多糖含量。

1.5 多糖相对分子质量分布的测定

首先,测定多糖相对分子质量标准曲线:配制不同相对分子质量的葡聚糖标准品溶液,质量浓度为 5.0 g/L,用 4.5 μm 滤器过滤,采用高效液相凝胶渗透色谱法测定出峰时间,色谱柱型号为 TSKgel G4000 pwXL,流动相为纯净水,上柱流速 0.8 mL/min,上柱体积 5.0 μL ,根据测定结果绘制标准曲线。将 CMPS 配制成 5.0 g/L 溶液,按上述条件测定出峰时间,根据标准曲线,计算不同出峰时间处相对分子质量分布^[6]。

1.6 结合胆酸盐实验

1.6.1 绘制胆酸盐标准曲线 用 PBS 配制 0.3 mmol/L 的胆酸钠、牛磺胆酸钠和甘氨酸胆酸钠母液,分别取上述胆酸盐母液 0、10、20、30、40、50 μL 于 96 孔板中,加 PBS 至 50 μL ,再加 150 μL 60% 硫酸溶液,在 70 ℃ 条件下放烘箱 20 min,用冰块冷却 5 min,在 387 nm 处测吸光度。根据测定结果分别绘

制 3 种胆酸盐浓度-吸光度曲线。

1.6.2 模拟人体胃肠道环境结合胆酸盐 称取适量 CMPS 于试管中,加入 0.01 mol/L 的盐酸溶液(模拟胃液酸性环境)1 mL,37 ℃摇床震荡消化 2 h,而后调节酸碱度为 pH 7.6(模拟小肠液碱性环境),加入 4 mL 上述胆酸盐母液,于 37 ℃继续恒温震荡 2 h。混合物以 4 000 r/min 速度离心 20 min,吸取上清液。

1.6.3 样品测定 分别吸取上述上清液 50 μ L,按胆酸盐标准曲线方法测吸光度,并根据标准曲线求得胆酸盐浓度。胆酸盐结合率 = (1-样品上清液胆酸盐浓度/空白溶液胆酸盐浓度)×100%。

1.7 细胞处理

HepG2 细胞在含有 10% 胎牛血清、1% 双抗的高糖 DMEM 培养基中,置于 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养。取处于对数生长期细胞,种于 96 孔板或 6 孔板,细胞贴壁后给予不同浓度 CMPS 干预,检测细胞增殖率、胆固醇水平及蛋白表达变化。

1.8 细胞毒性实验

采用 MTT 比色法测定。实验分为:调零组(仅培养液)、空白对照组、CMPS 组(100、200、400、800 mg/L),各组细胞种于 96 孔板,每组 6 个复孔,每孔 6 000 个细胞,待细胞贴壁后,改用无血清培养基。不同质量浓度药物干预 24 h 后,加入 MTT 使其最终质量浓度为 0.5 g/L,37 ℃继续孵育 4 h,小心吸掉 MTT,加入 DMSO 150 μ L,避光震荡 10 min,在酶标仪 490 nm 处检测吸光度 OD 值,根据数值计算细胞增殖率(proliferation rate, PR)。PR = (OD₂ - OD₀) / (OD₁ - OD₀) × 100%, OD₀ 为调零组吸光度, OD₁ 为空白对照组吸光度, OD₂ 为 CMPS 组吸光度。

1.9 细胞内总胆固醇测定

实验分为:空白对照组、CMPS 组(50、100、200 mg/L),各组细胞种于 6 孔板,每组 3 个复孔,细胞密度为 9×10⁷个/L。药物干预 24 h 后,收集细胞,每孔加入 300 μ L RIPA 裂解,12 000 g 离心后取上清,其中 100 μ L 上清液用于细胞内总胆固醇测定,200 μ L 用于蛋白的提取。分别按照组织总胆固醇试剂盒说明书和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书检测总胆固醇和总蛋白浓度,结果以每毫克蛋白中胆固醇的相对水平进行表示。

1.10 蛋白免疫印迹分析

将各组提取的细胞蛋白变性,按 50 μ g/孔加至

10% 分离胶中,电泳转膜,含 5% 脱脂奶粉的 TBS-T 封闭 2 h,一抗(1:1 000) 4 ℃过夜孵育,TBS-T 洗膜 3 次后孵育二抗 2 h,ECL 化学发光系统显影,采用 Image J 软件测量灰度值。

1.11 数据处理

SPSS 19.0 统计软件分析数据,以($\bar{x} \pm s$)表示,实验组与空白组的比较采用 *t* 检验,检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 蛹虫草多糖的提取及相对分子质量分析

采用“水提醇沉法”制备 CMPS 粗提物,而后通过去蛋白、去色素获得纯化多糖。苯酚-硫酸法测定多糖质量浓度的标准曲线如图 1 所示,不同稀释质量浓度多糖与吸光度的相关系数 R² 为 0.997 9,提示测定结果可信度高。根据回归方程,最终计算 CMPS 多糖含量为 62%。

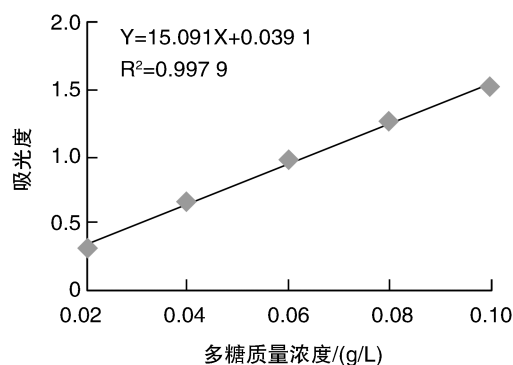


图 1. 苯酚-硫酸法测定多糖的标准曲线

Figure 1. Standard curve of polysaccharides concentration by phenol-sulfuric acid method

随后,我们采用“高效液相凝胶渗透色谱法”测定多糖相对分子质量分布。首先,以 9 个相对分子质量不同的葡聚糖为标准品,以出峰时间为横坐标,以相对分子质量的对数值为纵坐标,绘制相对分子质量标准曲线(图 2A)。然后,根据 CMPS 溶液出峰时间和信号强度绘制图 2B,从中发现在出峰时间为 7.185 65、8.308 85、10.814 47 min 时多糖信号强度(含量)较高,把时间点代入公式 $Y = -0.606 9X + 10.855$,求得 lgMv 分别为 6.494 029 015、5.812 358 935、4.291 698 157,其对应的多糖相对分子质量分别为 3 119、649、20 kDa。其中,相对分子质量为 3 119 kDa 的多糖所占比例最大。

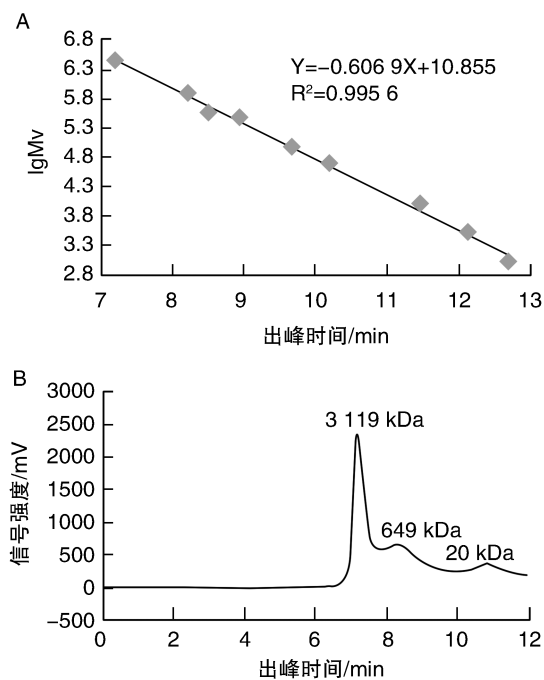


图2. 蛹虫草多糖相对分子质量分布 A为相对分子质量标准曲线, B为相对分子质量色谱图。

Figure 2. Molecular weight distribution of *Cordyceps militaris* polysaccharides

2.2 蛹虫草多糖结合胆酸盐作用

由图3可知, CMPS与肠道中的3种主要胆酸盐均有结合作用。当CMPS质量浓度达到15 g/L时, 其与胆酸盐的结合率最高, 分别为63% (胆酸钠)、62% (牛磺胆酸钠)、50% (甘氨酸胆酸钠)。然而, 质量浓度大于15 g/L后, 3种胆酸盐结合率趋于平缓, 说明CMPS与胆酸盐结合已达到饱和状态。

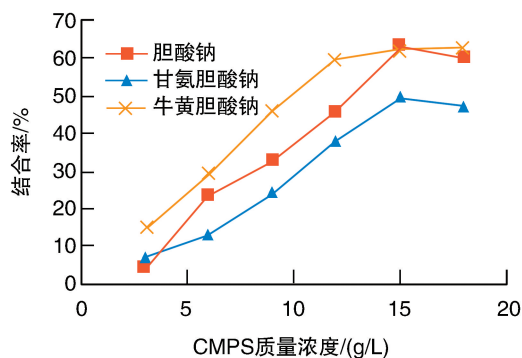


图3. 蛹虫草多糖与胆酸盐的结合率

Figure 3. Binding rate of *Cordyceps militaris* polysaccharides and cholic acid salt

2.3 蛹虫草多糖对 HepG2 细胞增殖率和细胞内胆固醇水平的影响

与空白对照组 (0 mg/L) 相比, 100、200 mg/L

CMPS 干预 HepG2 细胞 24 h 没有抑制细胞生长, 但是 400、800 mg/L CMPS 可使细胞增殖率明显降低 (图4A)。在不影响细胞增殖的前提下, 我们选择 200 mg/L 以内的 3 个药物质量浓度 (50、100、200 mg/L) 观察了 CMPS 对肝细胞胆固醇含量的影响。

图4B可以看出, CMPS 孵育可引起 HepG2 细胞内胆固醇水平出现降低趋势。与空白对照组 (0 mg/L) 相比, 200 mg/L CMPS 可明显降低肝细胞内胆固醇含量 ($P < 0.05$)。

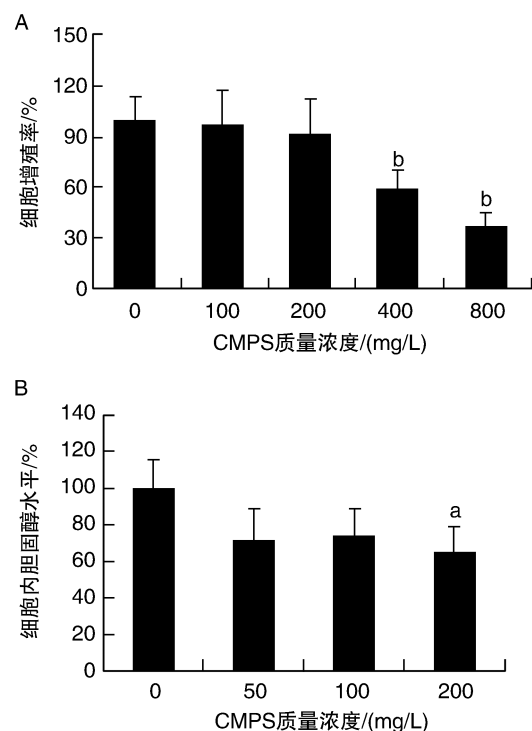


图4. 蛹虫草多糖对 HepG2 细胞增殖率 (A) 和总胆固醇水平 (B) 的影响 a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与空白对照组 (0 mg/L) 比较。

Figure 4. Effect of *Cordyceps militaris* polysaccharides on the proliferation rate (A) and total cholesterol level (B) of HepG2 cells

2.4 蛹虫草多糖对胆固醇合成相关蛋白表达的影响

采用 Western blot 技术观察了 CMPS 对肝细胞内 HMG-CoA-R (肝细胞内胆固醇合成的限速酶) 和 SREBP-2 (HMG-CoA-R 的上游调节因子) 两种蛋白表达的影响, 结果表明与空白对照组相比, 100、200 mg/L CMPS 干预 HepG2 细胞后 HMG-CoA-R 蛋白表达量分别降低了 28% 和 63%; 同时, 50、100、200 mg/L CMPS 分别下调 SREBP-2 蛋白表达量的 21%、28%、40% (图5)。

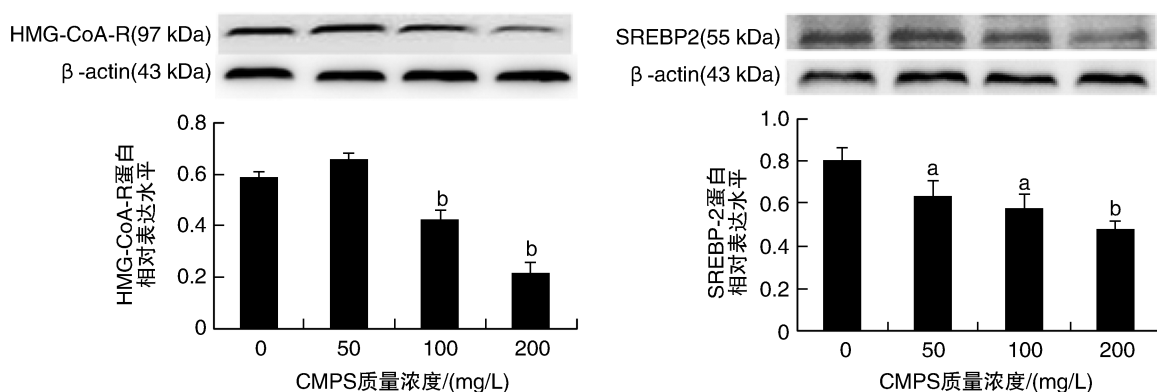


图 5. 蛹虫草多糖对肝细胞内 HMG-CoA-R 和 SREBP-2 蛋白表达的影响 a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与空白对照组 (0 mg/L) 比较。

Figure 5. Effect of *Cordyceps militaris* polysaccharides on HMG-CoA-R and SREBP-2 protein expressions in hepatocytes

3 讨论

动脉粥样硬化性心脑血管疾病是当今社会引起人类死亡的主要原因,而机体总胆固醇(TC)升高是该病的主要危险因素,因此,有效防治高胆固醇血症是降低其发病率和病死率的重要措施。他汀类和贝特类是临床常用的降脂药物,然而,这些药物在长期治疗中可引发一些不良反应,如肌肉损伤、皮肤过敏、高尿酸血症等^[1]。近年来,天然多糖因其具有抗氧化、抗炎、调节免疫、抗肿瘤等功能^[7-10],开始被医学研究所关注。CMPS 是蛹虫草的主要活性成分之一,其药理价值也逐渐被发现和了解。本研究通过热水提取-醇沉法分离 CMPS,采用 Seavage 试剂、AB-8 大孔吸附树脂初步纯化,并应用高性能凝胶渗透色谱明确 CMPS 相对分子质量分布。本实验证实 CMPS 能有效结合体外胆酸盐,显著抑制肝细胞内胆固醇含量,提示 CMPS 可能具有预防和治疗高脂血症的潜能。

机体胆固醇稳态取决于肝脏合成、肠道吸收及胆固醇排出三条途径的平衡。肝细胞合成胆固醇是一个复杂的酶促反应过程,而 HMG-CoA-R 为其限速酶。他汀类药物通过竞争性抑制 HMG-CoA-R,阻断胆固醇合成而有效降低胆固醇水平^[11]。SREBP 是调节脂质代谢的重要转录因子,其成员包括 SREBP-1a、SREBP-1c 和 SREBP-2 三个亚型。其中,SREBP-2 是胆固醇合成的关键核转录调节因子,可上调 HMG-CoA-R 表达从而促进肝细胞合成胆固醇^[12-13]。本实验结果显示,CMPS 可显著下调肝细胞内 SREBP-2 和 HMG-CoA-R 蛋白表达,降低肝细胞内总胆固醇水平。胆固醇在肝内转化为胆

汁酸是其主要代谢去路。正常情况下,肝细胞合成的胆固醇 40% 在肝中转变为胆汁酸,随胆汁排入肠道,其中 90% 的胆汁酸为结合型,一般以钠盐的形式存在^[14]。肠道中的胆酸盐被多糖或其他物质结合后,将直接随粪便排出体外,无法进行肝肠循环,因此,促进肠道胆酸盐的结合与排出可加快胆固醇转化,降低体内胆固醇水平。本实验显示,CMPS 与胆酸钠、牛磺胆酸钠及甘氨酸胆酸钠的结合率分别为 63%、62% 和 50%,可促进胆固醇的转化和排出。

综上所述,CMPS 可通过抑制肝细胞合成胆固醇以及促进胆固醇以胆酸盐形式排出,从而发挥降胆固醇功效。此研究可为开发 CMPS 作为一种天然降脂辅助药物提供前期基础,但 CMPS 对肠道胆固醇吸收的影响以及 CMPS 体内具体降脂效应尚需深入研究探索。

[参考文献]

- [1] Wu N, Zhang Y, Ye X, et al. Sulfation pattern of fucose branches affects the anti-hyperlipidemic activities of fucosylated chondroitin sulfate [J]. Carbohydr Polym, 2016, 147: 1-7.
- [2] 杨益广,黄作喜. 蛹虫草人工培养研究进展[J]. 安徽农学通报, 2019, 25(14): 21-24.
- [3] Chen DD, Xu R, Zhou JY, et al. *Cordyceps militaris* polysaccharides exerted protective effects on diabetic nephropathy in mice via regulation of autophagy [J]. Food Funct, 2019, 10(8): 5102-5114.
- [4] 李娟,张晓琳,刘育英,等. 红景天、蛹虫草、大黄配伍治疗代谢综合征的实验研究Ⅳ-改善肝脏脂质堆积作用[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(11): 1789-1794.
- [5] Kim SB, Ahn B, Kim M, et al. Effect of *Cordyceps militaris*

- extract and active constituents on metabolic parameters of obesity induced by high-fat diet in C58BL/6J mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 151(1): 478-484.
- [6] Guo Y, Cao L, Zhao Q, et al. Preliminary characterizations, antioxidant and hepatoprotective activity of polysaccharide from *Cistanche deserticola* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 93(Pt A): 678-685.
- [7] Liu C, Choi MW, Xue X, et al. Immunomodulatory effect of structurally characterized mushroom sclerotial polysaccharides isolated from *Polyporus rhinocerus* on bone marrow dendritic cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(43): 12137-12143.
- [8] Meng X, Liang H, Luo L. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on the structural characteristics, anti-tumor mechanisms and immunomodulating activities [J]. *Carbohydr Res*, 2016, 424: 30-41.
- [9] Chaouch MA, Hafsa J, Rihouey C, et al. Depolymerization of polysaccharides from *Opuntia ficus indica*: antioxidant and antiglycated activities [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 55(1): 156-163.
- [10] Liu X, Sun Z, Zhang M, et al. Antioxidant and antihyperlipidemic activities of polysaccharides from sea cucumber *Apostichopus japonicus* [J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 90(4): 1664-1670.
- [11] 王震, 魏玉杰, 刘惠亮. 他汀类药物抗凝作用的研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2016, 24(3): 316-320.
- [12] 方敏, 李亚梅, 向德标, 等. 依泽替米贝通过上调甾醇调控元件结合蛋白2、低密度脂蛋白受体促进肝细胞摄取低密度脂蛋白胆固醇[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2018, 26(1): 7-13.
- [13] Oteng AB, Loregger A, van Weeghel M, et al. Industrial trans fatty acids stimulate SREBP2-mediated cholesterologenesis and promote non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2019, 63(19): e1900385.
- [14] 胡凯, 黄惠华. 不同茶浸提液对胆酸盐的结合及其降血脂机理的研究[J]. *食品工业科技*, 2011, 32(8): 105-107, 111.
- (此文编辑 许雪梅)