

# 猴头菇多糖的理化性质及其神经保护活性

晋雅<sup>1</sup>, 彭国庆<sup>1</sup>, 李萍<sup>2</sup>, 邹鑫<sup>1</sup>, 熊川<sup>2</sup>, 金鑫<sup>2</sup>, 黄文丽<sup>2\*</sup>

(1. 成都大学食品与生物工程学院, 四川成都 610106)

(2. 四川省农业科学院生物技术核技术研究所, 四川成都 610066)

**摘要:** 在明确猴头菇多糖的理化特性的基础上, 探讨其神经保护作用机制。以猴头菇子实体为原料, 水提醇沉制备猴头菇粗多糖, DEAE-52 纤维素层析柱和 Sephacryl S-300 HR 色谱柱进行分离纯化, 获得猴头菇精多糖组份 (HEP), SEM、FT-IR 分析多糖的形貌及结构特性, PMP 柱前衍生法明确其单糖组分。自由基清除活性实验分析 HEP 的抗氧化活性, 构建 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 胁迫诱导的 PC12 细胞损伤模型, 探索 HEP 的神经保护活性及其作用机制。结果显示: HEP 精多糖得率为 1.07%, 分离获得三个多糖片段, 颗粒状态不均, 主要由甘露糖、木糖、葡萄糖、半乳糖醛酸和岩藻糖组成, FT-IR 明确 HEP 异头碳为  $\beta$  构型。通过 HEP 对 DPPH 自由基、羟基自由基、超氧阴离子清除活性测定发现其对三种自由基都表现出清除活性, IC<sub>50</sub> 值分别为 1.61、2.23 和 2.89 mg/mL。此外, HEP 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 胁迫损伤的 PC12 细胞具有保护作用, 其作用机理涉及细胞内源性抗氧化酶活性重塑和降低 Caspases-3 的活性。HEP 具有抗氧化活性, 对氧化损伤引发的细胞凋亡有保护作用, 可能成为治疗或预防神经退行性疾病的一种新策略。

**关键词:** 猴头菇; 多糖; PC12 细胞; 神经保护

文章编号: 1673-9078(2024)09-178-187

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.9.1036

## Physicochemical Properties and Neuroprotective Activity of Polysaccharides from *Hericium erinaceus*

JIN Ya<sup>1</sup>, PENG Guoqing<sup>1</sup>, LI Ping<sup>2</sup>, ZHOU Xin<sup>1</sup>, XIONG Chuan<sup>2</sup>, JIN Xin<sup>2</sup>, HUANG Wenli<sup>2\*</sup>

(1.School of Food and Bioengineering, Chengdu University, Chengdu 610106, China)(2.Biotechnology and Nuclear Technology Researado Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China)

**Abstract:** Upon identifying the physicochemical properties of polysaccharides extracted from *Hericium erinaceus* (HEP), the neural protective mechanisms were investigated. HEP was prepared from the fruiting bodies of *Hericium erinaceus* via aqueous extraction and alcohol precipitation. Separation and purification were achieved using DEAE-52 cellulose chromatography columns and Sephacryl S-300 HR chromatography columns. Scanning electron microscopy (SEM) and Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy were used to analyze the morphology and structural characteristics of the polysaccharides. The monosaccharide composition was determined via pre-column derivatization with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP). Free radical scavenging assays were conducted to analyze the antioxidant activity of HEP. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced PC12 cell model was established to explore the neuroprotective activity of HEP and its underlying mechanisms. The

引文格式:

晋雅, 彭国庆, 李萍, 等. 猴头菇多糖的理化性质及其神经保护活性[J]. 现代食品科技, 2024, 40(9): 178-187.

JIN Ya, PENG Guoqing, LI Ping, et al. Physicochemical properties and neuroprotective activity of polysaccharides from *Hericium erinaceus* [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(9): 178-187.

收稿日期: 2023-08-31

基金项目: 四川省自然科学基金项目 (22NSFSC3818)

作者简介: 晋雅 (1996-), 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: 1436493283@qq.com

通讯作者: 黄文丽 (1983-), 博士, 研究员, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: wenlih11@126.com

results demonstrated that HEP had a yield of 1.07% and could be divided into three polysaccharide fractions. These fractions exhibited non-uniform granular structures and primarily consisted of mannose, xylose, glucose, galacturonic acid, and fucose. FTIR analysis confirmed the  $\beta$ -configuration of HEP. HEP displayed scavenging activity against DPPH, hydroxyl radicals, and superoxide anions, with  $IC_{50}$  values of 1.61 mg/mL, 2.23 mg/mL, and 2.89 mg/mL, respectively. Furthermore, HEP exhibited a protective effect on  $H_2O_2$ -induced PC12 cell damage. The mechanism of action involved endogenous antioxidant enzyme activity remodeling and Caspase-3 activity reduction. HEP demonstrated antioxidant activity and protected against oxidative damage-induced apoptosis, suggesting its potential as a novel strategy for the treatment or prevention of neurodegenerative diseases.

**Key words:** *Hericium erinaceus*; polysaccharides; PC12 cells; neuroprotection

猴头菇 (*Hericium erinaceus*) 隶属担子菌纲、非褶菌目、猴头菇科、猴头菇属，因子实体形似猴头而得名。猴头菇的营养丰富，是传统医药的重要组成部分<sup>[1]</sup>。猴头菇的药用价值主要归功于其丰富的生物活性成分，多糖是猴头菇重要的生物活性成分之一。研究证明，猴头菇多糖 (HEP) 具有生物活性和药理作用，包括免疫调节、抗肿瘤、抗氧化、保护肠胃健康、保护神经等作用<sup>[2-4]</sup>。HEP 已经成为备受瞩目的研究热点，其药理特性和生物活性使其成为开发功能性食品和药品的理想来源，具有潜在的应用前景。

神经退行性疾病 (Neurodegenerative Disease, ND) 是与年龄相关联的慢性进行性神经疾病，全球患有神经退行性疾病的人数不断攀升，给社会和医疗带来巨大压力。其发病机制很复杂，常规治疗手段只能有限缓解症状，不能阻止疾病的进展，现研究学者已将注意力集中在具有潜在神经保护特性的天然化合物上。近年来，猴头菇在大量关于中枢神经系统的体外和体内临床前研究中被证实具有神经保护作用，如阿尔茨海默病、帕金森病和脊髓损伤<sup>[5]</sup>。Park 等<sup>[6]</sup>发现猴头菇胞外多糖对大鼠肾上腺神经细胞生长和神经轴突延伸有促进作用。猴头菇乙醇提取物能促进人星形细胞瘤细胞神经生长因子 NGF 基因表达<sup>[7]</sup>。口服猴头菇可改善认知功能障碍并防止其恶化<sup>[8]</sup>，临床上证实服用猴头菇四周能减少抑郁和焦虑<sup>[9]</sup>。在  $\beta$  淀粉样蛋白 (25-35) 肽诱导的学习和记忆缺陷小鼠模型中，Mori 等<sup>[10]</sup>发现喂养猴头菇饲料对小鼠的空间短时记忆和视觉识别记忆损伤具有保护作用。口服两个月猴头菇提取物可以恢复运动能力，改善小脑体积缩小和神经元萎缩，缓解小鼠的炎症和氧化应激，增加关键寿命调节因子和神经保护因子的表达<sup>[11]</sup>。这都说明猴头菇可以

作为有效的膳食补充剂，辅助治疗或预防老年相关的神经退行性疾病。

目前，HEP 的神经保护作用已在体内外得到证实，Hu 等<sup>[12]</sup>发现猴头菇菌丝体中分离的多糖具有抗阿尔茨海默病 (AD) 的活性，多糖处理的 AD 小鼠中，小鼠的认知行为显著改善，脑损伤、淀粉样蛋白沉积和 tau 过度磷酸化得到缓解，大脑氧化应激减轻。猴头菇菌丝体多糖水提物对 L- 谷氨酸诱导的 PC12 细胞凋亡和  $AlCl_3$  联合 d- 半乳糖诱导的 AD 小鼠具有保护作用<sup>[13]</sup>。然而 HEP 的神经保护作用鲜有报道，因此，本研究采用水提醇沉法从猴头菇子实体中提取多糖，离子交换色谱和分子排阻色谱进行纯化，傅里叶红外光谱和 PMP 柱前衍生确定多糖的单糖组成和糖苷键类型，构建模拟氧化压力引发的细胞损伤模型，探讨 HEP 的神经保护作用和作用机理。能够为猴头菇的深入开发与利用提供基础，有助于猴头菇及相关多糖类保健品和药品的研发。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

猴头菇 (*H. erinaceus*) 子实体购买自市场，单糖标准品，包括半乳糖、木糖、葡萄糖、鼠李糖、甘露糖、岩藻糖、阿拉伯糖，购于 Sigma 公司；PC12 细胞菌株采自美国模式培养物集存库 (American Type Culture Collection, ATCC) 菌种保藏中心 (GRL-1721)；胎牛血清、马血清和细胞培养液 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM)、青霉素和链霉素、0.25% 胰酶，均为 GIBCO，采购自美国 Thermo 公司；DEAE-52 和 Sephacryl S-300 HR 层析柱购自 GE Healthcare；超氧化物歧化酶

(SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 以及丙二醛 (MDA) 试剂盒采购自南京建成科技有限公司; RNA 提取试剂盒及相关引物从 Invitrogen 公司购买; 荧光定量 PCR 试剂盒购自 Selleck 公司; 除以上所列试剂外, 余下试剂皆为分析纯级别。

## 1.2 仪器与设备

MCO-15AC CO<sub>2</sub> 细胞培养箱, 日本 Sanyo 公司; SpectraMax iD3 酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司; 冷冻干燥机 L-300, 瑞士 Buchi World 公司; IX73 倒置显微镜, 日本 Olympus 公司; 1260Infinity II 高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; NGC Chromatography System, 美国 Bio-Rad 公司; N-1200B 旋转蒸发仪, 日本 Eyela 公司。

## 1.3 方法

### 1.3.1 猴头菇粗多糖的提取

干燥的猴头菇子实体打磨成粉末并过 100 目筛, 将 200 g 粉末加入 1 L 无水乙醇中浸泡 24 h 进行脱脂处理, 离心去除乙醇, 沉淀自然干燥。干燥后的猴头菇粉末加入 20 倍体积的纯水, 95 °C 水浴 6 h, 重复 3 次, 合并上清液。采用旋转蒸发仪进行减压蒸馏浓缩, 浓缩液与 9 倍体积的无水乙醇混合, 进行醇沉处理, 沉淀 24 h<sup>[14]</sup>。收集沉淀, 取一定量的纯水使其充分溶解, 随后使用 4 倍体积的 Sevage 试剂 (氯仿: 正丁醇 = 4:1, V/V), 摇晃混匀, 待静置分层后, 收集上层溶液, 重复以上步骤, 直至蛋白彻底清除。离心除去残留的 Sevage 试剂。采用减压蒸馏浓缩后, 透析过夜, 去除小分子杂质。最终通过冷冻干燥获得猴头菇粗多糖样品。

### 1.3.2 猴头菇多糖的分离纯化

准确配置 10 mg/mL 的猴头菇粗多糖水溶液, 经活性炭脱色处理后, 采用 4.5 cm×80.0 cm 的 DEAE-52 纤维素柱进行分离, 上样量 1 mL, NaCl 溶液 (0~0.3 mol/L) 梯度洗脱, 洗脱流速为 0.7 mL/min, 自动分收器收集洗脱液, 每管收集 1 mL, 采用苯酚-硫酸法来测定所收集液体中的多糖含量<sup>[15]</sup>。将 DEAE-52 纤维素离子交换柱层析分离得到的单一洗脱峰的各管洗脱液合并, 浓缩干燥后获得猴头菇多糖半纯品, 进一步利用分子筛柱分离。

称取猴头菇多糖半纯品 1 g, 加入适量的蒸馏水于烧杯中完全溶解, 将其倒入离心管中同时置于

16 141 g 的高速离心机, 离心 10 min, 除去沉淀, 收集上清液, 使用 0.22 μm 滤膜将其过滤, 随后上样至 NGC 色谱纯化系统, 通过 Sephacryl S-300 HR 层析柱进行分离。在分离过程中, PBS 溶液洗脱, 同时将洗脱速度有效限制在 1.0 mL/min。在洗脱完成后, 使用苯酚-硫酸法来检测所收集的液体中的多糖的含量, 同时充分收集各个洗脱峰产生的洗脱液。随后, 通过浓缩、透析和冷冻干燥的三个步骤对其进行处理, 获得较高纯度的猴头菇多糖 (HEP) 样品<sup>[16]</sup>。

### 1.3.3 多糖形貌观察

采用扫描电子显微镜 (JSM-7500F, JEOL, 日本) 对猴头菇多糖的微观形态特征进行观察, 多糖样品固定在 SEM 支架上, 真空镀金处理后, 在 5.0 kV 加速电压下观察拍照。

### 1.3.4 多糖单糖组成测定

通过 PMP 柱前衍生法分析 HEP 的单糖组成。准确称取 20 mg 多糖样品, 置于带塞试管中, 加入 2 mol/L 的硫酸溶液 2 mL。封管后于 110 °C 水解 6 h, 得水解样品溶液。用 4 mol/L 氢氧化钠水溶液中和至 pH 值 7.0, 并以纯水稀释至 5 mL, 离心弃沉淀, 上清液待衍生化。将单糖对照品、混合单糖对照品 (阿拉伯糖 Ara、半乳糖醛酸 Gala、甘露糖 Man、木糖 Xyl、葡萄糖 Glu、岩藻糖 Fuc、鼠李糖 Rha、核糖 Rib) 以及猴头菇多糖水解样品各取 200 μL 分别置于 1.5 mL 离心管中, 依次加入 0.5 mol/L PMP 甲醇溶液 100 μL 和 0.3 mol/L 氢氧化钠溶液 100 μL, 混匀后置于 70 °C 水浴中加热反应 30 min, 自然冷却。加入 0.3 mol/L 的盐酸进行中和, 混匀后用等体积的乙酸异戊酯萃取, 震荡, 离心 10 min, 小心弃去有机层, 重复一次。将水相定容至 1 mL, 过 0.22 μm 滤膜后待 HPLC 分析。色谱条件: 色谱柱为 C18 (250 mm×4.6 mm), 紫外检测器, 检测波长 250 nm, 流动相为 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH, pH 值 6.8)-乙腈 (85:15), 柱温 30 °C, 流量 1.0 mL/min, 进样体积 10 μL。

### 1.3.5 多糖红外光谱分析

采用傅立叶红外光谱仪对猴头菇多糖进行红外光谱分析, 进一步探究其功能性基团。准确称取 5 mg 的猴头菇多糖冻干样品, 置于研钵内, 加入适量的溴化钾, 充分研磨混合后进行压片处理。样品放于置物台上进行扫描, 扫描参数: 扫描范围 4 000~400 cm<sup>-1</sup>, 扫描 32 次, 分辨率 4 cm<sup>-1</sup>。

### 1.3.6 多糖自由基清除能力测定

通过测定清除 DPPH 自由基能力、超氧自由基 ( $O_2^{\cdot-}$ ) 和羟自由基 ( $\cdot OH$ ) 清除率来反应猴头菇多糖的抗氧化活性。HEP 对 DPPH 自由基的清除力、超氧阴离子的清除活性以及羟基自由基的清除力都参照之前报道的方法<sup>[15]</sup>，并略作修改，具体方法如下：

HEP 对 DPPH 自由基的清除力。于 519 nm 处测定吸光值，多糖对 DPPH 自由基的清除率按照以下公式计算：

$$C_{DPPH} = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100\% \quad (1)$$

式中：

$C_{DPPH}$ ——DPPH 自由基清除率，%；

$A_0$ ——对照组（采用蒸馏水代替样品）的吸光值；

$A_i$ ——样品组的吸光值用；

$A_j$ ——空白组的吸光值（采用乙醇代替 DPPH 溶液）。

HEP 对超氧阴离子的清除活性采用邻苯三酚自氧化法测定。于 320 nm 处测定吸光值。以超氧自由基清除率计算公式如下：

$$C_o = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (2)$$

式中：

$C_o$ ——超氧阴离子自由基清除率，%；

$A_1$ ——含有邻苯三酚样品的吸光值；

$A_2$ ——不含邻苯三酚的样品吸光值；

$A_0$ ——空白对照的吸光值。

HEP 对羟基自由基的清除力。于波长 562 nm 处测定其吸光值。以下公式计算其清除率：

$$C_{OH} = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100\% \quad (3)$$

式中：

$C_{OH}$ ——羟基自由基清除率，%；

$A_0$ ——空白组的吸光值，

$A_i$ ——样品组的吸光值，

$A_j$ ——不加  $H_2O_2$  的样品溶液的吸光值。

### 1.3.7 细胞存活率测定

未分化的大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞 (PC12 细胞) 采用含 5 wt.% 胎牛血清、10 wt.% 马血清和 1 wt.% 青链霉素的 DMEM 高糖培养基中培养，收集对数期细胞，调整浓度按照每孔  $1 \times 10^4$  个接种于 96 孔板，于 37 °C，5%  $CO_2$  培养箱中孵育过夜。PC12

细胞中加入 60  $\mu mol/L$  的  $H_2O_2$  处理 45 min，诱导细胞损伤后，充分去除  $H_2O_2$ ，并用 PBS 溶液 2 遍。随后损伤后的 PC12 细胞中加入含不同浓度的猴头菇多糖溶液的完全培养基孵育 6 h，孵育结束后每孔加入 10  $\mu L$  CCK8 溶液，37 °C 孵育 4 h 后，于 450 nm 处测定吸光值。细胞的存活率采用以下公式计算：

$$S = \frac{W_1 - W_0}{W_2 - W_0} \times 100\% \quad (4)$$

式中：

$S$ ——细胞存活率，%；

$W_1$ ——为多糖处理后的吸光值；

$W_0$ ——为空白样本的吸光值；

$W_2$ ——为对照组样本的吸光值。

### 1.3.8 细胞凋亡分析

对数生长期的 PC12 细胞按照密度每毫升  $1 \times 10^5$  个接种于六孔板中，60  $\mu mol/L$  的  $H_2O_2$  处理 45 min，加入不同浓度的猴头菇多糖溶液，孵育 6 h 结束后，细胞经冷 PBS 冲洗并重悬。细胞悬液中加入 5  $\mu L$  Annexin V-FITC 和 5  $\mu L$  PI，混匀后避光染色 15 min，随后利用流式细胞仪进行细胞凋亡分析。

### 1.3.9 酶活测定

细胞处理如 1.3.8。 $H_2O_2$  处理后的细胞经不同质量浓度的 HEP 溶液 (50、100、200、400  $\mu g/mL$ ) 孵育，细胞经冷 PBS 冲洗并重悬，在冰水浴条件下用超声细胞破碎仪处理，超声功率 300 W，每次超声 3~5 s，间隔 30 s，重复 4~5 次，离心去沉淀，取上清液进行酶活测定。GSH-Px、SOD、CAT 活性检测严格按照试剂盒说明执行。Caspase-3 活性分析以 Ac-DEVD-pNA 作为底物，催化反应完成后于 405 nm 处测定吸光值。

### 1.3.10 荧光定量 PCR

采用荧光定量 PCR 对凋亡相关基因 Bax 和 Bcl-2 的表达水平进行检测，PC12 细胞处理如 1.3.8。利用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA，1  $\mu g$  RNA 采用 PrimeScript™ RT reagent Kit (Takara, 日本) 反转录合成 cDNA。以 GAPDH 作为内参基因，其引物序列为：前引物 (F)：5'-CACTCACGGCAAAT TCAACGGCA-3'，后引物 (R)：5'-GACTCCACGA CATACTCAGCAC-3；Bcl-2 基因的引物序列为：前引物 (F)：5'-ATCTTCTCCTTCCAGCCTGA-3'，后引物 (R)：5'-TGCAGCTGACTGGACATCTC-3'，

Bax 基因的引物序列为：前引物 (F) : 5'-CTGCAGA GGATGATTGCTGA-3', 后引物 (R) : 5'-GAGGAAGT CCACTGTCCAGC-3'。实验采用 TB Green Premix Ex Taq II 试剂盒 (Takara, 日本) 进行荧光定量 PCR 反应, 反应条件为: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 34 s, 循环 30 次。

### 1.3.11 数据处理及统计

实验结果以平均值 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用统计软件 SPSS 19.0 对各组数据进行差异性分析, Graphpad Prism 绘图。多组均值比较采用方差分析 (ANOVA) 检验方法, 当  $P < 0.05$  时, 结果被视为有显著性差异。

## 2 结果与讨论

### 2.1 猴头菇多糖 (HEP) 的分离纯化

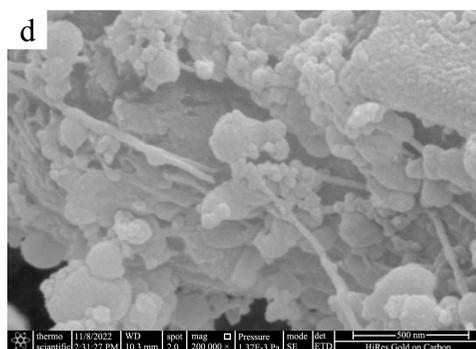
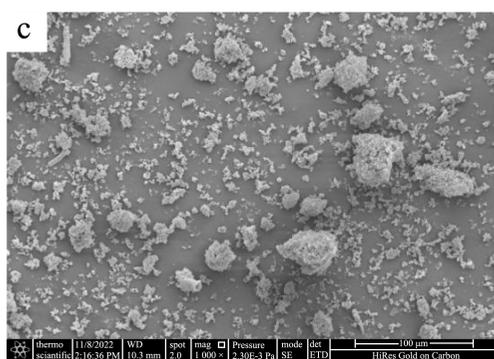
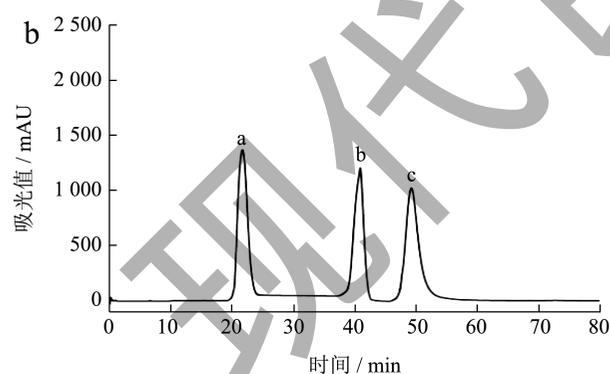
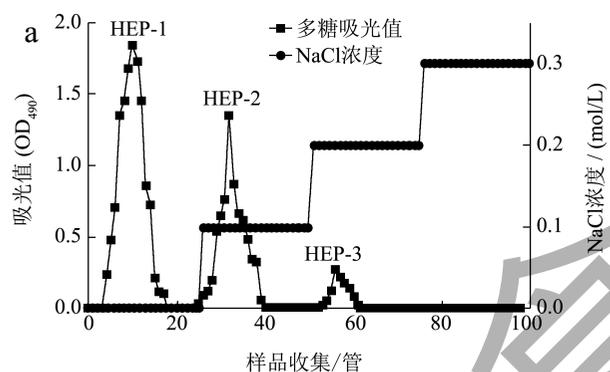


图 1 HEP 的分离纯化和形貌观察

Fig.1 Separation, purification and morphological observation of HEP

注: (a) DEAE-52 色谱图; (b) Sephadex G-100 色谱图; (c-d) SEM 图片。

200 g 干燥过筛的猴头菇粉末通过水提醇沉法获得粗多糖 35.31 g, 得率为 17.66%。5 g 猴头菇粗多糖通过 DEAE-52 纤维素离子交换柱层析后, 共分离出 3 个洗脱峰, 如图 1a 所示, 分别收集并冻干, 通过体外抗氧化实验, 测定了 3 个组分的自由基清除活性, 确认 HEP-1 具备最佳的自由基清除活性, 收集并冻干 HEP-1, 共得猴头菇多糖的半纯品 (HEP-1) 2 256 mg。最终将 HEP-1 上样于 Sephadex G-100 层析柱, 共洗脱出 3 个峰, 如图 1b 所示, 洗脱后收集, 测定自由基清除活性, 确认 b 峰具备最佳自由基清除活性, 收集并冻干 b 吸收峰, 共获得猴头菇多糖 HEP 534 mg。综上, 水提醇沉并通过色谱法分离纯化 HEP 的得率为 1.07%。将 HEP 冻干, 通过扫描电镜观察, HEP 呈现颗粒状 (图 1c), 表面有簇状结构 (图 1d), 整体粘度较大。

### 2.2 多糖的单糖组成及结构

HEP 单糖的组成, 采用 PMP 柱前衍生法来进行<sup>[17]</sup>。如图 2a 所示, HEP 由甘露糖 (Man)、木糖 (Xyl)、葡萄糖 (Glu)、半乳糖醛酸 (Gala) 和岩藻糖 (Fuc) 组成, 其摩尔比为 3.25:1:2.09:3.01:4.58。HEP 的红外光谱如图 2b 所示, 通过扫描图谱能够看到 HEP 的特征吸收峰在 891、1 120、1 425、1 620、2 950 和 3 420  $\text{cm}^{-1}$  处出现。香菇多糖的特征吸收峰在 524、1 042、1 416、1 648、2 920、3 412  $\text{cm}^{-1}$  处<sup>[18]</sup>, 上述吸收峰与香菇多糖的特征吸收峰相同。O-H 的伸缩振动造成 3 420  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰; C-H 的伸缩振动引发了约 2 950  $\text{cm}^{-1}$  处的峰出现。另外, 1 425  $\text{cm}^{-1}$  处的峰可能是结构  $-\text{CH}_2-$  和  $-\text{CH}_3$  基团引起的。此外, C=O 的存在也导致了在 1 620  $\text{cm}^{-1}$  附

近出现了明显的峰；C-O-C 伸缩振动引发了其特征吸收峰在  $1\ 120\ \text{cm}^{-1}$  处的显现。值得注意的是，在右侧出现的较小吸收峰  $891\ \text{cm}^{-1}$ ，它是吡喃葡聚糖和  $\beta$ -型糖苷键连接作用的产物，形成一个独特的特征峰。由此可认为 HEP 是  $\beta$  构型的异头碳。

已有学者研究报道，猴头菇多糖主要是由岩藻糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖及少量的葡萄糖醛酸构成，本研究中的 HEP 多糖的单糖组成与已有报道相符<sup>[19]</sup>。

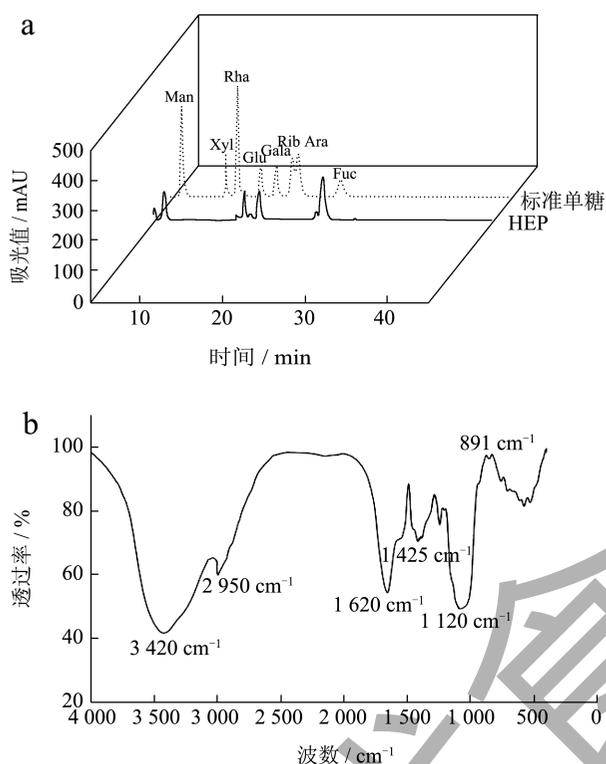


图 2 HEP 的单糖组成及结构分析

Fig.2 Monosaccharide composition and structure analysis of HEP

注：(a) 8 种单糖 -PMP 衍生物及 HEP-PMP 衍生物的 HPLC 色谱图；(b) HEP 的红外吸收光谱。

### 2.3 多糖的自由基清除活性

HEP 的自由基清除活性如图 3 所示，结果显示，HEP 对 3 中常见的自由基 (DPPH·、·OH、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) 都具有清除活性。其中，HEP 对羟自由基表现出最佳的清除效果，且呈现剂量依赖关系，在低质量浓度时 ( $<1.5\ \text{mg/mL}$ )，HEP 的清除活性与 Vc 相当， $\text{IC}_{50}$  为  $2.89\ \text{mg/mL}$ 。此外，HEP 对 DPPH·、超氧阴离子自由基清除能力的  $\text{IC}_{50}$  值分别为  $1.61\ \text{mg/mL}$ 、 $2.23\ \text{mg/mL}$ 。已有研究报道指出，HEP 对该 3 种常见自由基的清除率随 HEP 样品质量浓度的增加而增加<sup>[20]</sup>。

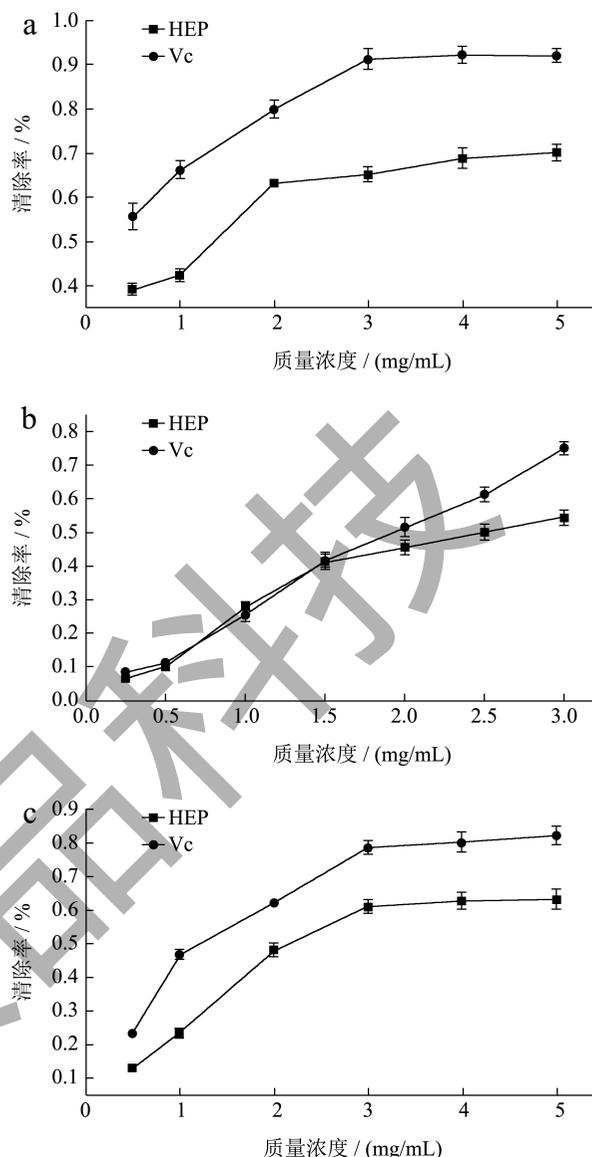


图 3 HEP 清除 DPPH 自由基 (a)、羟自由基 (b) 及超氧阴离子自由基 (c) 的活性

Fig.3 HEP scavenging activity of DPPH free radicals (a), hydroxyl free radicals (b) and superoxide anion free radicals (c)

注：数值为 3 个重复的平均值  $\pm$  标准误，不同字母代表处理组间显著性差异， $P < 0.05$ ，下同。

### 2.4 多糖的神经保护作用

$60\ \mu\text{mol/L}\ \text{H}_2\text{O}_2$  处理 PC12 细胞 45 min 后，细胞存活率为  $51.77\%$  (表 1)。改变 HEP 孵育细胞的浓度这一变量后，其存活率缓慢上升，且剂量的逐步加大，其存活率也呈正相关。当使用  $200\ \mu\text{g/mL}$  的 HEP 时，其存活率上升明显，可达  $77.73\%$ 。HEP 的浓度超过  $200\ \mu\text{g/mL}$  后，PC12 细胞的存活率不再显著升高，故后续实验中 HEP 的作用浓度最高设定为  $200\ \mu\text{g/mL}$ 。由此可知，在一定

浓度范围内,  $H_2O_2$  胁迫诱导的 PC12 细胞损伤过程中, HEP 显示出明显的细胞保护效应。HEP 在一定程度上对  $H_2O_2$  胁迫损伤的 PC12 细胞提供防护, 且呈现剂量依赖关系。

表 1 不同浓度 HEP 保护  $H_2O_2$  诱导的 PC12 细胞损伤的存活率

Table 1 Effects of HEP on cell viability in  $H_2O_2$ -induced

PC12 cells		
组别	质量浓度/( $\mu\text{g/mL}$ )	细胞存活率/%
对照组	0	100.0
$H_2O_2$ 组	0	51.77 $\pm$ 3.32**
HEP 组 1	50	60.38 $\pm$ 3.65 <sup>A</sup>
HEP 组 2	100	68.41 $\pm$ 2.53 <sup>A</sup>
HEP 组 3	200	77.73 $\pm$ 5.01 <sup>AA</sup>
HEP 组 4	400	76.68 $\pm$ 4.35 <sup>AA</sup>

注: 数值是采用的 3 个重复的平均值  $\pm$  标准误, 和空白对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组 ( $H_2O_2$  组) 比较,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

正常培养的 PC12 细胞呈梭状, 贴壁紧密, 边缘清晰 (图 4a)。  $H_2O_2$  处理后的 PC12 细胞显著皱缩 (图 4b), 胞内出现小空泡。通过不同浓度的 HEP 孵育后, 细胞的皱缩减轻, 保持梭状的细胞数目显著增多, 且胞内空泡显著减少 (图 4c-4f)。

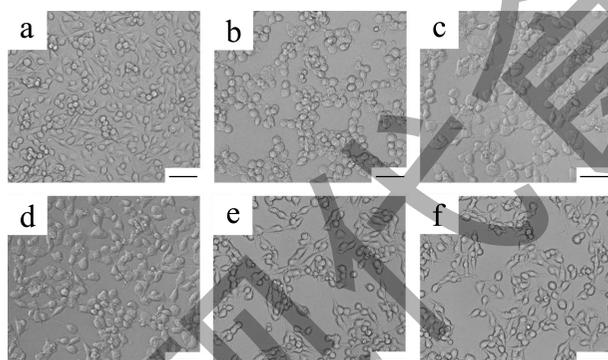


图 4 HEP 对  $H_2O_2$  引发的氧化压力对 PC12 细胞损伤的保护作用

Fig.4 Effects of HEP on protection against  $H_2O_2$ -induced PC12 cell cytotoxicity

注: (a) 正常 PC12 细胞; (b) 60  $\mu\text{mol/L}$   $H_2O_2$  处理 45 min 后的 PC12 细胞; (c) 50  $\mu\text{g/mL}$  HEP 处理后的 PC12 细胞; (d) 100  $\mu\text{g/mL}$  HEP 处理后的 PC12 细胞; (e) 200  $\mu\text{g/mL}$  HEP 处理后的 PC12 细胞; (f) 400  $\mu\text{g/mL}$  HEP 处理后的 PC12。细胞比例尺 = 100  $\mu\text{m}$ 。

## 2.5 多糖的神经保护作用机制探索

将 PC12 细胞置于浓度为 60 mmol/L 的  $H_2O_2$  溶液中浸泡 45 min, 发现其内源性抗氧化酶系活力

均呈现显著的下降趋势, 与对照组相比, 其 SOD、CAT、GSH-Px 活性分别降至 48.24%、39.94%、53.38% (图 5a、5b、5c)。改变 HEP 质量浓度这一变量, 导致其的内源性抗氧化酶系的活力进一步提高且十分显著。当 HEP 的作用浓度达到 200  $\mu\text{g/mL}$  时, PC12 细胞中 SOD、CAT 和 GSH-Px 的活力依次提升至 74.45%、66.72% 和 81.17%。由此可知, 当外源氧化压力损伤细胞的内源性抗氧化酶活力后, 其活力可被 HEP 导致重塑。

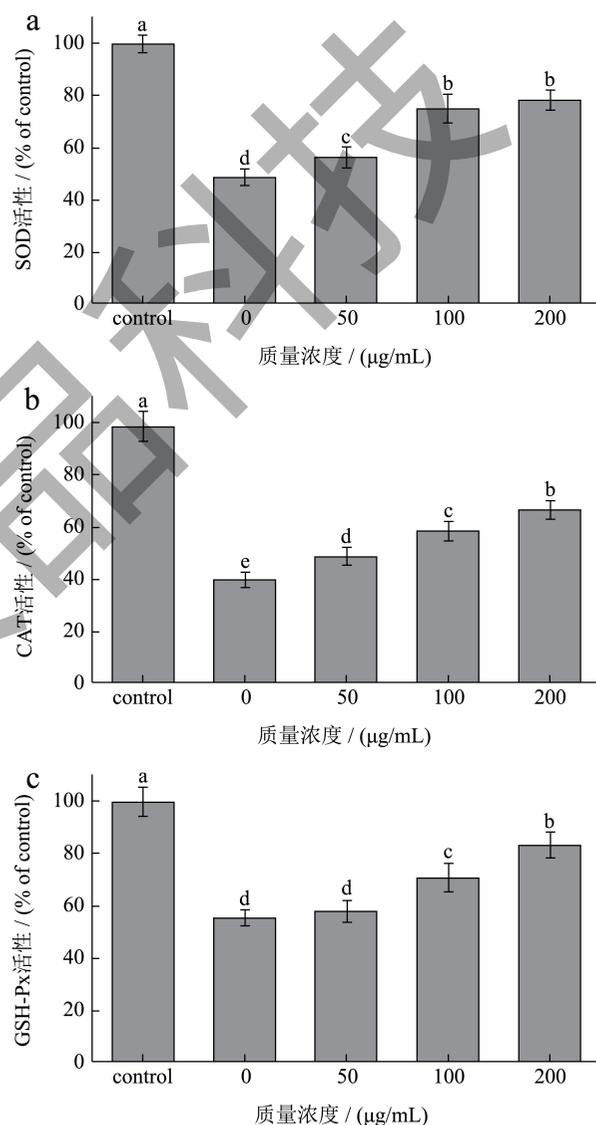
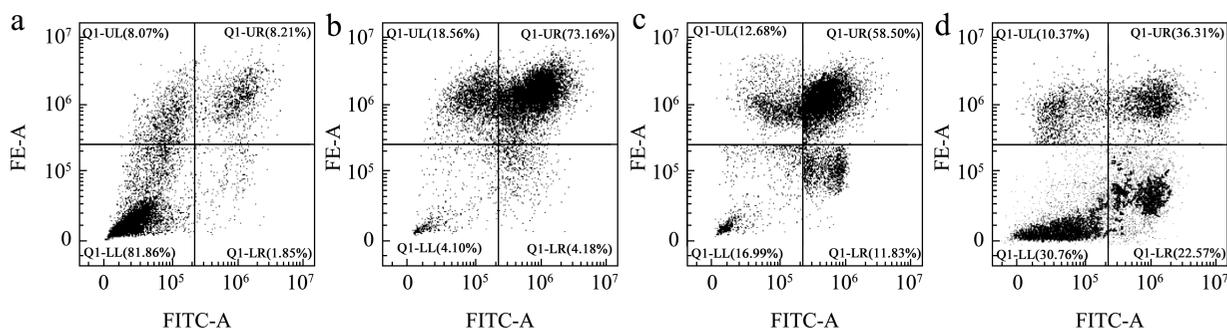


图 5 HEP 对 PC12 细胞内抗氧化酶系 SOD (a)、CAT (b) 及 GSH-Px (c) 的重塑作用

Fig.5 HEP-mediated remodeling of endogenous antioxidant enzymes: SOD (a), CAT (b), and GSH-Px (c) in  $H_2O_2$ -induced PC12 cells

注: 每个数值用三次重复实验的平均值  $\pm$  标准误表示。在不同处理组之间, 不同的字母代表处理组间显著性差异,  $P < 0.05$ , 下同。

图6 流式细胞术评估 HEP 对  $H_2O_2$  诱导的 PC12 细胞凋亡的抑制作用Fig.6 Flow cytometry evaluation of the inhibitory effect of HEP on  $H_2O_2$  induced apoptosis in PC12 cells

注: (a) 正常 PC12 细胞; (b) 60  $\mu\text{mol/L}$   $H_2O_2$  处理 45 min 后的 PC12 细胞; (c) 100  $\mu\text{g/mL}$  HEP 处理后的 PC12 细胞; (d) 200  $\mu\text{g/mL}$  HEP 处理后的 PC12 细胞。

进一步, 采用 Annexin V/PI 双染法结合流式细胞术测定了 HEP 对  $H_2O_2$  诱导的 PC12 细胞凋亡的抑制作用。结果显示, 在 60  $\mu\text{mol/L}$   $H_2O_2$  处理 45 min 后, PC12 细胞凋亡率明显上升, 如图 6b 所示, 早期凋亡细胞占 4.18%, 晚期凋亡细胞占 73.16%。不同 HEP 浓度的孵育明显减少了 PC12 细胞的凋亡率, 当 HEP 质量浓度达到 200  $\mu\text{g/mL}$  时, PC12 细胞的总凋亡率下降至 58.88%。

为了分析 PC12 细胞凋亡相关基因的表达情况, 采用荧光定量 PCR 法对 Bcl-2 及 Bax 基因的表达情况进行分析, 将细胞置于 60  $\mu\text{mol/L}$  的  $H_2O_2$  溶液中浸泡 45 min 后, Bax 基因的表达相较于对照组提高至 198.81%, 而 Bcl-2 基因却相反, 其表达量下降十分明显, 为 41.68%。在试验中应用 HEP 进行孵育的处理, 导致变化趋势相对减缓, Bcl-2 基因的 mRNA 的表达量明显上升, 但是 Bax 的 mRNA 表达量则有所降低。综上所述, PC12 细胞的凋亡受到抑制, 是因为 HEP 在基因水平中影响了 Bax/Bcl-2 的值。此外, 用化学发光法探究 Caspases-3 的活性, 结果发现,  $H_2O_2$  处理后 Caspases-3 活性明显增加, 但在 HEP 存在下, 其活性有所抑制, 从而导致存在阻断凋亡的现象。

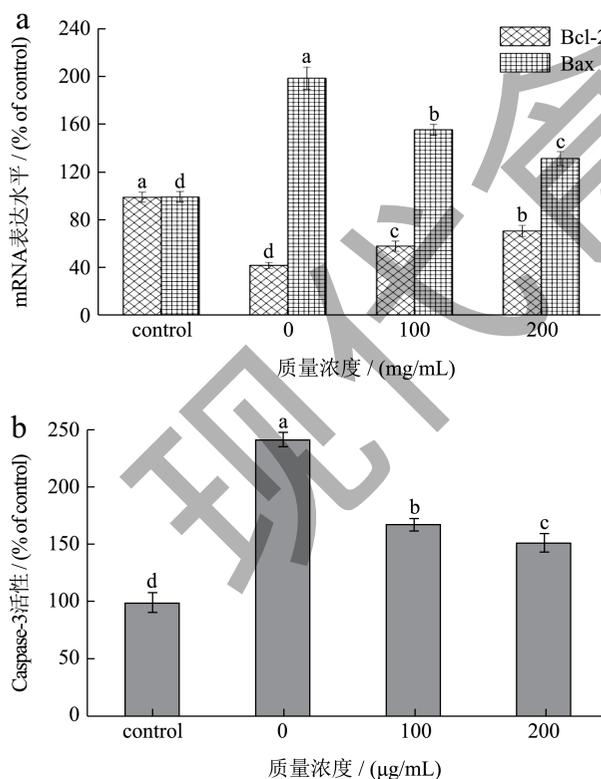


图7 HEP 保护 PC12 细胞免受  $H_2O_2$  损伤的作用机制  
Fig.7 Mechanism of HEP Protecting PC12 Cells from  $H_2O_2$  Damage

注: (a) mRNA 表达水平; (b) Caspase 活性。

### 3 讨论

生物体老化的过程涉及多种因素, 包括是活性氧自由基的生成和能量代谢的紊乱, 这一现象成为多种与衰老有关疾病的显著特征。有证据表明氧化应激与神经退行性疾病的发病密切相关<sup>[20,21]</sup>, 导致线粒体中 ROS 的过量积累, 引起自噬缺陷、转运受损和电子传递链功能障碍, 从而导致细胞和组织的损伤<sup>[22]</sup>。此外, 它还通过促进  $A\beta$  沉积、tau 超磷酸化以及随后的突触和神经元丢失参与神经退行性疾病的发展<sup>[23]</sup>。正常组织中, 生物体内多种内源性抗氧化酶通过催化反应来中和自由基和活性氧, 包括过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH) 和超氧化物歧化 (SOD) 等, 维持氧化还原平衡, 从而保护细胞免受损伤。过量的 ROS 会导致脂质过氧化、DNA 损伤以及蛋白氧化, 从而进一步引发细胞凋亡。 $H_2O_2$  是一种高活性的 ROS, 大量证据表明,

它可以通过激活线粒体相关的凋亡信号来诱导神经元功能障碍。因此,  $H_2O_2$  被广泛应用于构建多种不同种类的神经细胞体外氧化损伤模型<sup>[24,25]</sup>。

预防和治疗神经退行性疾病的策略包括清楚活性氧自由基和修复氧化损伤, 以及使用天然抗氧化剂。通过减少氧化应激、抑制细胞凋亡、促进神经再生、抑制  $A\beta$  积累和恢复钙稳态, 发挥神经保护作用<sup>[23]</sup>。从猴头菇子实体中分离得到一种  $\beta$ - 构型的多糖 HEP, 体外抗氧化实验表明 HEP 具有一定的清除能力, 并且其清除羟自由基、超氧阴离子自由基的能力比 Tu 等<sup>[26]</sup>分离的多糖更强。这可能是与多糖的构型、糖醛酸含量和单糖组成等因素有关。大多数  $\beta$ - 构型的多糖表现出均更强的抗氧化性能, 多糖的抗氧化性能还与其供氢能力密切相关。多糖中存在的糖醛酸基团等酸性基团可以激活 O-H 键中的氢原子, 从而起到清除自由基的作用, 糖醛酸含量越高, 多糖的抗氧化性能越强<sup>[27]</sup>。在  $H_2O_2$  诱导 PC12 细胞氧化损伤的模型中, HEP 大幅提升细胞的存活率, 表现出明显的细胞保护作用。HEP 能够重塑细胞内源性抗氧化酶系, 显著增强 CAT, GSH-PX 和 SOD 的活性, 防止 ROS 的过度积累, 从而保护细胞免受氧化损伤。

已有大量研究证明,  $H_2O_2$  诱导的细胞毒性主要依赖于线粒体的凋亡途径, 位于线粒体外膜 Bcl-2 和 Bax 是关键性的凋亡调控基因<sup>[28]</sup>。Bax 通过改变线粒体膜通透性, 诱导细胞色素 c 释放至胞浆, 与凋亡蛋白酶因子 (Apaf) 结合形成凋亡小体, 随后激活 caspase 依赖的凋亡通路。而 Bcl-2 起到稳定线粒体膜电位的作用, 也可与 Bax 形成异源二聚体, 以此来阻止细胞色素 c 的释放。Caspase-3 是凋亡过程中的关键蛋白酶, 凋亡小体的形成导致 Caspase-3 的激活, 最终诱导细胞核 DNA 缩聚和断裂<sup>[29]</sup>。在本研究中, 同样发现  $H_2O_2$  诱导 PC12 细胞经 HEP 处理后, Bax 和 Bcl-2 基因表达的改变得到改善, Bax/Bcl-2 比值下调, Caspase-3 的活性得到抑制, 减少细胞凋亡, 从而起到氧化损伤细胞的保护效果。

#### 4 结论

本文从猴头菇子实体中分离纯化获得  $\beta$ - 构型多糖 HEP, 它主要由甘露糖、木糖、葡萄糖、半乳糖醛酸和岩藻糖组成。HEP 在体外表现出优异的抗氧化活性, 具备能够有效清除 DPPH 自由基、超氧自

由基和羟自由基的能力, 并且对  $H_2O_2$  诱导氧化损伤的 PC12 细胞有良好的保护效果。HEP 通过重塑细胞内源性抗氧化酶系活力, 缓解氧化应激压力, 调节 Bcl-2 及 Bax 基因的表达以及抑制 Caspases-3 蛋白活性, 从而抑制细胞的凋亡。综上, HEP 具有良好抗氧化活性, 且对氧化损伤引发的细胞凋亡有一定保护作用, 这使得 HEP 可能成为治疗或预防神经退行性疾病的一种新策略。

#### 参考文献

- [1] KHAN MA, TANIA M, LIU R, et al. *Hericium erinaceus*: an edible mushroom with medicinal values [J]. *Journal of Complementary & Integrative Medicine*, 2013, 10(1): 253-258.
- [2] WANG X Y, ZHANG D D, YIN J Y, et al. Recent developments in *Hericium erinaceus* polysaccharides: extraction, purification, structural characteristics and biological activities [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2019, 59(sup1): S96-S115.
- [3] HE X R, WANG X X, FANG J C, et al. Structures, biological activities, and industrial applications of the polysaccharides from *Hericium erinaceus* (Lion's Mane) mushroom: A review [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 97: 228-237.
- [4] 张胜男, 武美华, 敬隆鑫, 等. 猴头菇多糖的研究进展 [J]. *中国林副特产*, 2023(3): 68-71, 76.
- [5] BRANDALISE F, RODA E, RATTO D, et al. *Hericium erinaceus* in Neurodegenerative Diseases: From Bench to Bedside and Beyond, How Far from the Shoreline? [J]. *J Fungi (Basel)*, 2023, 9(5): 551.
- [6] PARK YS, LEE HS, WON MH, et al. Effect of an exopolysaccharide from the culture broth of *Hericium erinaceus* on enhancement of growth and differentiation of rat adrenal nerve cells [J]. *Cytotechnology*, 2002, 39(3): 155-162.
- [7] MORI K, BARA Y, HIROTA M, et al. Nerve growth factor-inducing activity of *Hericium erinaceus* in 1321N1 human astrocytoma cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31(9): 1727-1732.
- [8] SAITSU Y, NISHIDE A, KIKUSHIMA K, et al. Improvement of cognitive functions by oral intake of *Hericium erinaceus* [J]. *Biomedical Research*, 2019, 40(4): 125-131.
- [9] NAGANO M, SHIMIZU K, KONDO R, et al. Reduction of depression and anxiety by 4 weeks *Hericium erinaceus* intake [J]. *Biomedical Research*, 2010, 31(4): 231-237.
- [10] MORI K, OBARA Y, MORIYA T, et al. Effects of *Hericium erinaceus* on amyloid  $\beta$ (25-35) peptide-induced

- learning and memory deficits in mice [J]. Biomedical Research, 2011, 32(1): 67-72.
- [11] RODA E, PRIORI EC, RATTO D, et al. Neuroprotective Metabolites of *Hericium erinaceus* Promote Neuro-Healthy Aging [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(12): 6379.
- [12] HU W, SONG M, WANG C, et al. Structural characterization of polysaccharide purified from *Hericium erinaceus* fermented mycelium and its pharmacological basis for application in Alzheimer's disease: Oxidative stress related calcium homeostasis [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 193(Pt A): 358-369.
- [13] ZHANG J R, AN S S, HU W J, et al. The neuroprotective properties of *Hericium erinaceus* in glutamate-damaged differentiated PC12 cells and an Alzheimer's disease mouse model [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(11): 1810.
- [14] 熊川, 黄文丽, 金鑫, 等. 一种羊肚菌源多肽MIP-16的分离纯化及其神经保护活性[J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(9): 1519-1526.
- [15] 贾联盟, 刘柳, 董群, 等. 猴头菇子实体中的主要多糖成分[J]. 中草药, 2005, 1: 10-12.
- [16] 蔡铭, 陈思, 骆少磊, 等. 膜分离与醇沉技术纯化猴头菇粗多糖的比较[J]. 食品科学, 2019, 40(9): 83-90.
- [17] 彭天祥, 张娟, 张利, 等. 梯棱羊肚菌多糖的理化性质及神经保护活性研究[J]. 现代食品科技, 2019, 35(9): 87-95.
- [18] 赵婷婷, 商洛华, 姚肖翰, 等. 香菇菌柄营养成分、多糖结构表征及其体外抗氧化活性[J/OL]. 菌物研究, 1-10[2024-01-11] <https://doi.org/10.13341/j.jfr.2022.1522>.
- [19] 温雅慧. 猴头菇多糖提取、结构表征及抗氧化活性研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2020.
- [20] 和法涛, 刘光鹏, 朱凤涛, 等. 微波超声波组合提取猴头菇多糖工艺优化及其抗氧化活性[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(1): 74-82.
- [21] AMORIM J A, COPPOLTELLI G, ROLO A P, et al. Mitochondrial and metabolic dysfunction in ageing and age-related diseases [J]. Nature Reviews Endocrinology, 2022, 18(4): 243-258.
- [22] U RM, NOUROZ S, JOHN DN, et al. Mitochondrial dysfunctions, oxidative stress and neuroinflammation as therapeutic targets for neurodegenerative diseases: An update on current advances and impediments [J]. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 2022, 144: 104961.
- [23] 赵保路. 氧化应激及天然抗氧化剂对阿尔茨海默病的缓解作用(英文)[J]. 生物化学与生物物理进展, 2023, 50(5): 1144-1158.
- [24] KUSHAIRI N, PHANH CW, SABARATNAM V, et al. Lion's mane mushroom, *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. suppresses H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage and LPS-induced inflammation in HT22 hippocampal neurons and BV2 microglia [J]. Antioxidants (Basel), 2019, 8(8): 261.
- [25] 董艺薇, 杨智超, 姜维佳, 等. 原花青素 B2 通过调节 PI3K/Akt 和 Nrf2/HO-1 信号通路保护 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 PC12 细胞氧化损伤[J]. 中国药理学通报, 2023, 9: 1654-1661.
- [26] TU Jianqiu, LIU Huiping, WEN Yahui, et al. A novel polysaccharide from *Hericium erinaceus*: Preparation, structural characteristics, thermal stabilities, and antioxidant activities *in vitro* [J]. J Food Biochem, 2021, 45(9): e13871.
- [27] 郝金斌, 傅明通, 王玲玲, 等. 奶油栓孔菌菌丝体多糖的提取工艺优化、结构表征及抗氧化活性[J]. 菌物学报, 2021, 40(9): 2461-2479.
- [28] HU L G, SUN Y K, HU J. Catalpol inhibits apoptosis in hydrogen peroxide-induced endothelium by activating the PI3K/Akt signaling pathway and modulating expression of Bcl-2 and Bax [J]. Eur J Pharmacol, 2010, 628(1-3): 155-163.
- [29] LUO X J, CHEN B G, ZHENG R, et al. Hydrogen peroxide induces apoptosis through the mitochondrial pathway in rat Schwann cells [J]. Neuroscience Letters, 2010, 485(1): 60-64.