

梯棱羊肚菌多糖的理化性质及神经保护活性研究

彭天祥¹, 张娟², 张利³, 黎青⁴, 李健伟⁴, 彭宇⁴, 熊川⁴

(1. 四川省林业科学院, 四川成都 610081) (2. 四川省农业科学院茶叶研究所, 四川成都 610066) (3. 阿坝州林
业科学技术研究所, 四川汶川 623000) (4. 四川省农业科学院生物技术核技术研究所, 四川成都 610061)

摘要: 分离纯化人工栽培的梯棱羊肚菌子实体多糖, 对其结构和神经保护作用进行研究。采用水提醇沉法提取梯棱羊肚菌子实体多糖(MIP), 采用DE-52纤维素柱和Sephadex G-100进行多糖的分离纯化, 借助高效凝胶渗透色谱(HPGPC)和高效液相色谱(HPLC)测定多糖分子量及单糖组成。通过1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基、羟自由基和超氧阴离子自由基的清除作用, 评价MIP自由基清除能力。构建H₂O₂介导的氧化压力损伤的PC12细胞模型, 评估其基于抗氧化的神经保护作用并探索作用通路。结果表明: MIP得率1.15%, 平均分子量为1.35×10⁶ u, 平均粒径为432.20 nm, 异头碳为β-构型, 由木糖、葡萄糖、半乳糖和少量岩藻糖组成。MIP具有优良的自由基清除活性, 对DPPH自由基的IC₅₀值为(1.18±0.04) mg/mL。MIP能够重塑PC12细胞内源性抗氧化酶系, 将受损的SOD活性提高62.15%, 通过调节凋亡分子开关Bax/Bcl的比例和Caspase蛋白家族的活化, 抑制细胞凋亡。MIP可作为一种预防及辅助治疗神经退行性疾病的功效成分加以开发利用。

关键词: 梯棱羊肚菌; PC12细胞; 多糖提取; 神经保护

文章编号: 1673-9078(2019)09-87-95

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.9.010

Physical and Chemical Properties of Polysaccharide Isolated from the Fruiting Bodies of *Morchella importuna* and Its Neuroprotective Effect

PENG Tian-xiang¹, ZHANG Juan², ZHANG Li³, LI Qing⁴, LI Jian-wei⁴, PENG Yu⁴, XIONG Chuan⁴

(1. Sichuan Academy of Forestry, Chengdu 610081, China) (2. Tea Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China) (3. Aba Autonomous Prefecture Forestry Institute of Science and Technology, Wenchuan 623000, China) (4. Biotechnology and Nuclear Technology Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610061, China)

Abstract: The extraction, purification, structure and neuroprotective effects of a polysaccharide (MIP) purified from the fruiting bodies of *Morchella importuna* M. Kuo were investigated in this work. The polysaccharides of *M. importuna* were extracted with boiling water and then purified by DE-52 column and Sephadex G-100 column. The molecular weight and monosaccharide composition were analyzed by HPGPC and HPLC, respectively. In order to investigate the neuroprotective role of MIP, the antioxidant activity of MIP against the H₂O₂-induced cytotoxicity and the underlying preventative mechanisms in rat pheochromocytoma (PC12) cells were illustrated. The results showed that the yield of MIP was 1.15%, the molecular weight of MIP was 1.35×10⁶ U, the average particle size was 432.20 nm and the monosaccharide composition of MIP was mainly composed of xylose, glucose, galactose and a small amount of fucose. The heterocarbon of MIP was β configuration. MIP had excellent free radical scavenging activity and the IC₅₀ value for the DPPH free radical was 1.18±0.04 mg/mL. MIP could considerably enhance the viability of PC12 cells exposure to H₂O₂ and increase the activities of antioxidant enzyme like SOD, CAT and GSH-Px. It was worth noting that MIP could increase the activity of damaged SOD by 62.15%. It inhibited cell apoptosis via reducing caspase-3 activation and down-regulation Bax/Bcl-2 ratio. Accordingly, MIP could be used as a promising neuroprotective compound for nervous diseases treatment.

Key words: *Morchella importuna*; PC12 cell; extraction of polysaccharide; neuroprotective

收稿日期: 2019-06-19

基金项目: 四川省科技支撑计划项目(2016GZ0359); 四川省创新能力提升工程青年基金项目(2018QNJJ-025); 国际科技交流合作提升行动计划(2019GJHZ-001)

作者简介: 彭天祥(1988-), 男, 硕士研究生, 研究实习员, 研究方向: 羊肚菌栽培

通讯作者: 熊川(1990-), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 大型珍稀食用菌栽培及功效评价

羊肚菌 (*Morchella* spp.), 俗称苞谷菌, 羊肚菜、阳雀菌, 隶属于囊菌门 (Ascomycota)、盘菌亚门 (Pezizomycotina)、盘菌纲 (Pezizomycetes)、盘菌目 (Pezizales)、羊肚菌科 (Morchellaceae), 因其菌盖多有褶皱, 状如羊肚而得名^[1]。羊肚菌味道鲜美, 营养丰富, 是享誉世界的美味食用菌和珍稀药用菌。人们认识羊肚菌已有上百年的历史, 世界范围内, 人们从记载、采食羊肚菌逐步深入到研究其地理分布、系统发育、人工栽培、化学成分及保健功效等方面, 取得了突破性进展。我国医学专著《本草纲目》中对于羊肚菌有“甘寒无毒, 化痰理气, 益肠胃”的记载^[2], 现代研究已经确认羊肚菌具有抗肿瘤^[3]、抗氧化^[4]及免疫强化作用^[5], 在功能食品、保健品的开发上具有广阔的应用前景。

作为一种子囊真菌, 羊肚菌对生境条件要求较高, 子实体发生期持续较短, 因此, 野生羊肚菌产量较低。目前, 对于羊肚菌功效的研究大都从其菌丝体或菌丝体发酵液入手, 对于羊肚菌子实体功效的研究报道较少。近年来, 羊肚菌的人工栽培技术取得突破, 我国学者采用大田覆土栽培结合外源营养袋的方法, 成功驯化栽培出梯棱羊肚菌 (*Morchella importuna* M)、七妹羊肚菌 (*M. septimelata* M) 及六妹羊肚菌 (*M. sextelata* M) 等品种, 其中, 主栽品种梯棱羊肚菌的栽培面积占羊肚菌总栽培面积的 70%以上^[6], 人工栽培的成功使得羊肚菌子实体产量充足, 其功效需要进一步的验证。

神经退行性疾病 (Neurodegenerative diseases) 包括阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD)、亨廷顿病 (Huntington's disease, HD)、帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 等, 是由于神经元变性、凋亡所导致的进行性发展的致死性复杂疾病。世界卫生组织预测, 到 2030 年, 全球范围内罹患神经退行性疾病的人数将高达近 1 亿人, 而到 2040 年, 神经退行性疾病将取代癌症成为人类第二大致死疾病^[7]。神经退行性疾病病因复杂, 目前的研究发现, 氧化应激 (Oxidative stress) 是诱发神经退行性疾病的主要原因之一。氧化应激能导致生物大分子的损伤、能量代谢紊乱和递质传递障碍等^[8], 因此, 清除活性氧自由基和修复氧化损伤被认为是预防和治疗神经退行性疾病行之有效的策略。真菌多糖是一种优良的自然抗氧化剂, 能够有效清除自由基, 并且能够重塑氧化压力破坏的机体内源性抗氧化酶系, 在预防及辅助治疗神经退行性疾病上有广阔的应用前景。

基于以上分析, 本实验收集人工栽培的梯棱羊肚菌子实体, 通过水提醇沉法获得梯棱羊肚菌多糖

(MIP), 通过扫描电镜 (SEM) 观察 MIP 的形貌, 采用高效凝胶渗透色谱 (HPGPC) 完成 MIP 分子量的测定, 通过 PMP-柱前衍生分析其单糖组成, 进一步验证其对 H₂O₂ 介导的 PC12 细胞的细胞毒性的缓解作用, 评估其神经保护功效, 为基于人工栽培的羊肚菌功能食品和保健品的开发提供数据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

梯棱羊肚菌子实体采集自四川省林业科学院德阳食用菌栽培基地; 葡萄糖、鼠李糖、甘露糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖、岩藻糖等单糖标准品购买自 Sigma 公司; PC12 细胞购买自美国模式培养物集存库 (American type culture collection, ATCC) 菌种保藏中心; 胎牛血清、细胞培养液 (dulbecco's modified eagle medium, DMEM), Thermo Scientific 公司; 青霉素、链霉素, 美国 Sigma 公司; DE-52 和 Sephadex G-100 填料购自 Whatman 公司; SOD、CAT、GSH-Px 及 MDA 试剂盒购自碧云天公司; RNA 提取试剂盒及相关引物合成由 Invitrogen 公司提供; RNA 荧光测定试剂盒购自 Selleck 公司; DPPH、TCA 及 MTT 购自 Sigma 公司; 其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

MCO-15AC CO₂ 细胞培养箱, 日本 SANYO 公司; Spectra max plus 384 酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司; LSC plus 真空冷冻干燥机, 德国 Christ 公司; IX73 倒置显微镜, 日本 Olympus 公司; CFX96 Touch PCR 仪, 美国 BIO-RAD 公司; 高效液相色谱, 美国 PerkinElmer 公司。

1.3 方法

1.3.1 粗多糖提取

采用水提醇沉法提取 MIP^[9]。梯棱羊肚菌子实体于 37 °C 烘箱中恒温干燥, 中药材粉碎机粉碎。称取 200 g 梯棱羊肚菌子实体粉末, 加入 1 L 95% 乙醇脱脂过夜, 离心去除乙醇, 样品自然干燥。干燥后的子实体粉末加入 20 倍体积的纯水, 水浴 6 h (温度设定 95 °C), 反复提取 3 次, 6000 r/min 离心收集上清, 然后减压蒸馏浓缩, 浓缩产物加入 9 倍体积无水乙醇过夜醇沉。醇沉产物 6000 r/min 离心收集沉淀, 沉淀用适量纯水溶解, 加入 5 倍体积 Sevage 试剂 (氯仿: 正丁醇=4:1, V/V) 剧烈振荡, 静置分层后收集上层溶液, 重复操作直至蛋白除尽, 除蛋白后的产物经过

6000 r/min 离心, 除去残留 Sevage 试剂, 减压蒸馏浓缩与醇沉, 收集沉淀溶解后经 7500 u 分子量透析袋流水透析 3 d, 去除小分子杂质, 截留透析液冷冻干燥得到粗多糖。

1.3.2 多糖 (MIP) 纯化

称取 5 g 粗多糖样品, 溶解于 50 mL 蒸馏水中, 离心除去沉淀, 上样到 DE-52 纤维素柱 (4.5 cm×80.0 cm) 分离^[10], 洗脱液为 0.5 mol/L NaCl, 洗脱速度为 1.0 mL/min, 每管收集 3 mL, 采用苯酚硫酸法检测, 合并洗脱峰洗脱液进行浓缩, 透析, 冷冻干燥, 得到 MIP 的半纯品。称取 MIP 的半纯品 1 g, 溶解于蒸馏水中, 离心除去沉淀, 上清液上样到 Sephadex G-100 凝胶柱 (2.6 cm×100 cm) 进行分离, 用 0.1 mol/L NaCl 溶液洗脱, 控制洗脱速度为 1.0 mL/min, 采用苯酚硫酸法检测收集液, 收集各洗脱峰洗脱液, 浓缩, 透析, 冷冻干燥得到 MIP 纯品。

1.3.3 MIP 形貌观察

用扫描电子显微镜 (SEM) 观察多糖的形态。样品固定在 SEM 支架上, 真空下溅射镀金, 然后用扫描电子显微镜 (Tescan S.R.O., Brno, 捷克) 进行显微镜检查。配置 MIP 溶液, 浓度为 100 μg/mL, 上样于 Zetasizer Nano ZS90 粒径测定仪, 测定 MIP 的粒径。

1.3.4 MIP 分子量及单糖组成测定

通过高效凝胶渗透色谱 (HPGPC) 完成测定 MIP 的分子量测定^[11], 流动相设定为 0.1 mol/L NaNO₃ & 0.2% NaN₃, 柱温 40 °C, 流速设定为 0.7 mL/min, MIP 用 0.3% 的流动相溶解, 单针上样量为 20 μL。通过标准 T 葡聚糖进行标定 (T-500、T-110、T-70、T-40 和 T-10), Water GPC 软件进行分析。

通过 PMP-柱前衍生法分析 MIP 的单糖组成^[12]。硫酸处理 MIP, 得到 MIP 的单糖水解溶液。通过 PMP 柱前衍生制备上机液。色谱条件设定为: 流动相组成为 0.1 mol/L 磷酸盐 (KH₂PO₄-NaOH, pH 6.8) 缓冲液: 乙腈 (84:16), 柱温保持 30 °C, 检测波长设定为 250 nm, 体积流量设定为 0.8 mL/min, 样品进样量 10 μL。

1.3.5 MIP 红外光谱分析

通过傅立叶红外光谱仪分析 MIP 的功能基团。取 MIP 冻干样品 5 mg 放入研钵中, 加入 1 g 溴化钾充分研磨后压片, 上机扫描。扫描参数: 扫描范围 4000~400 cm⁻¹, 扫描 32 次, 分辨率为 4 cm⁻¹。

1.3.6 MIP 自由基清除能力测定

依据 Oktay 等的方法完成 DPPH 自由基、羟自由基及超氧阴离子自由基的清除能力测定^[13]。样品 (1 mg) 溶解于 10 mL 的纯水中, 稀释成浓度为 0~50 μg/mL 待用。阳性对照设定为 Vc (浓度为 1 mg/mL),

同一测定重复 3 次。

1.3.7 MIP 神经保护作用评价

构建 H₂O₂ 处理诱发氧化损伤的 PC12 细胞模型进行验证。取对数生长期 PC12 细胞以密度 6×10⁵ 个/孔接种于 6 孔板, 细胞培养箱中培养 16 h。弃去培养基, 添加 80 mM H₂O₂ (已验证, 能够诱发接近 50% 的凋亡率) 处理 30 min, 之后弃去 H₂O₂, PBS 清洗 2 遍, 加入不同浓度的 MIP 溶液培养 6 h, 采用 MTT 法测定细胞的存活率。

细胞存活率 = (MIP 组 OD 值 - 空白组 OD) / (对照组 OD - 空白组 OD)。

1.3.8 MIP 神经保护作用机制探索

细胞处理同 1.3.7, 不同浓度的 MIP 溶液培养 6 h, 预冷 PBS 溶液清洗并重悬 PC12 细胞, 采用 SOD、CAT 及 GSH-Px 试剂盒测定细胞中 SOD、CAT 及 GSH-Px 的含量, 采用 Alexa Fluor 488 Annexin V 和 Propidium iodide (PI) 来区分凋亡细胞和坏死细胞, 借助于自动细胞计数器 (Life Technologies, 美国) 完成统计, 测定细胞的凋亡率 (凋亡率计算 AI = 凋亡细胞数 / (凋亡细胞数 + 正常细胞数))。

采用实时定量荧光 PCR 完成 Bax 和 Bcl-2 基因的定量分析^[14]。H₂O₂ 损伤细胞后, 通过 Trizol 试剂 (Sigma, 美国) 完成 PC12 细胞 RNA 提取。Bax 引物: F: 5'-CTGCAGAGGATGATTGCTGA-3', R: 5'-GAGGAAGTCCAGTGTCCAGC-3'; Bcl-2 引物: F: 5'-ATCTTCTCCTTCCAGCCTGA-3', R: 5'-TGCAGC TGACTGGACATCTC-3'; 内参基因选择 GAPDH: F: 5'-CACTCACGGCAAATTCAACGGCA-3', R: 5'-GACTCCACGACATACTCAGCAC-3'。应用 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒 (Selleckchem, 美国), 完成 30 次循环。

通过 Caspase-3 Activity Assay Kit 完成测定细胞中 Caspase-3 活性测定。收集处理后的 PC12 细胞, 加入细胞裂解液, 冰上裂解 5 min, 重悬, 离心收集上清液用以测定 Caspase-3 活性。405 nm 条件下读数并统计。

1.3.9 数据处理及统计

实验获得的数据以平均值±标准差 (x±s) 表示并采用 SPSS 19.0 分析, 采用 ANOVA 检验进行多组均数比较, p<0.05 视为显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 多糖分离纯化结果

200 g 梯棱羊肚菌子实体通过热水浸提共得到羊

肚菌粗多糖 27.62 g, 得率为 13.81%。5 g 羊肚菌粗多糖经过 DE-52 纤维素柱 (4.5 cm×80 cm) 分离, 通过 0.5 mol/L 的 NaCl 洗脱, 共收集到 MIP 半纯品 1588 mg。上样于 Sephadex G-100 (4.5 cm×100 cm), 得到 MIP 共 416 mg, 综上得出 MIP 的得率为 1.15%。扫描电镜观察, MIP 呈现小的片状颗粒, 表面不光滑, 存在小面积的断裂和褶皱 (图 1)。

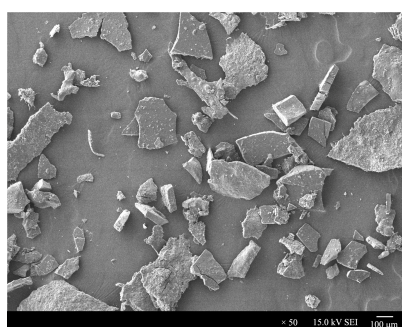


图 1 MIP 的形貌

Fig.1 Morphology of MIP

通过 PMP 柱前衍生确定, MIP 由木糖 (Xyl)、葡萄糖 (Glc)、半乳糖 (Gal) 和少量岩藻糖 (Fuc) 组成, 通过峰面积比对, 确认其占比为 9.21:8.59:3.73:1。

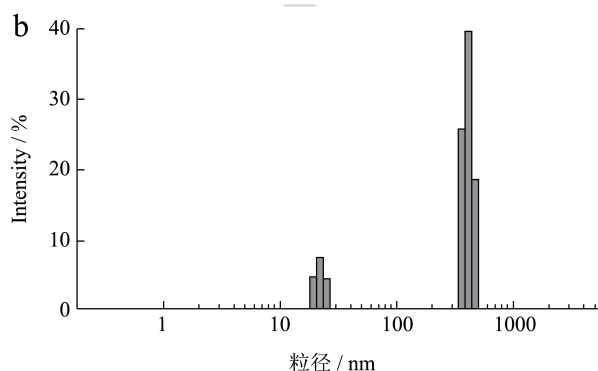
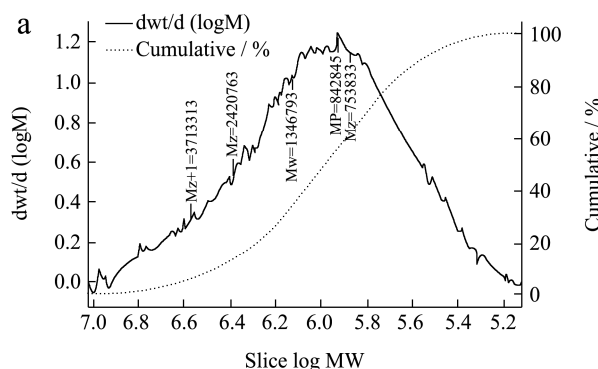


图 2 MIP 的形貌和粒径

Fig.2 Morphology and Particle Size of MIP

已有学者报道, 灵芝 (*Ganoderma lucidum*) 多糖的分子量介于 $2 \times 10^4 \sim 2 \times 10^6$ u 之间^[15], 变化较大。羊肚菌 (*M. esculenta*) 菌丝发酵液多糖分子量介于 $2.3 \times 10^4 \sim 4.4 \times 10^4$ u 之间^[16], 分子量是多糖的重要理化

表征之一, MIP 的平均分子量较大, 在机体吸收上可能有一定的阻碍, 后期可以通过超声、辐照处理等修饰 MIP, 以期获得更好的活性。羊肚菌 (*M. esculenta*) 菌丝发酵液多糖由木糖、葡萄糖、甘露糖、果糖、阿拉伯糖和半乳糖组成, 本研究中 MIP 由木糖、葡萄糖、半乳糖和少量岩藻糖组成, 与已有报道相符^[16]。

通过 HPGPC 测定, MIP 的相对分子质量为 1.35×10^6 u (图 2a)。通过 Zetasizer Nano ZS90 粒径测定仪测定, 确定 MIP 平均粒径为 432.20 nm (图 2b)。

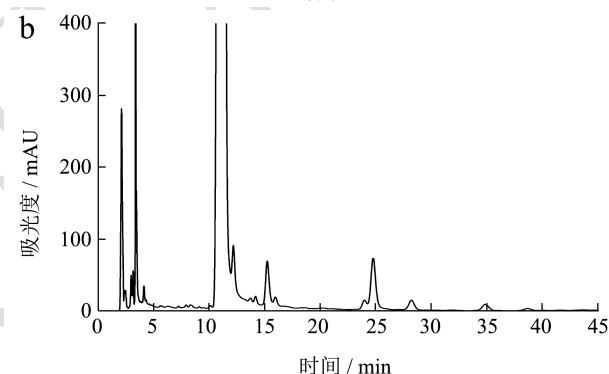
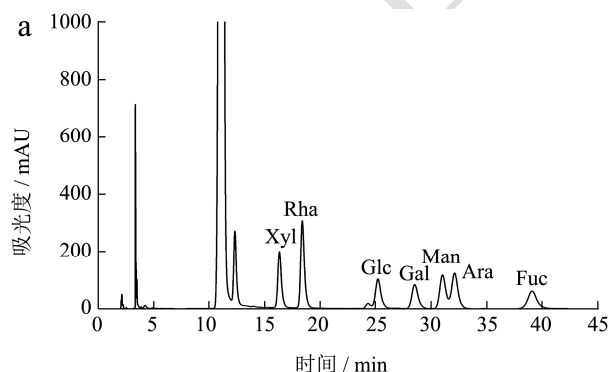


图 3 7 种单糖-PMP 衍生物(a)及 MIP-PMP 衍生物(b)的 HPLC 色谱图

Fig.3 HPLC chromatograms of PMP derivatization for 7 monosaccharides reference substances (a) and MIP (b)

2.2 MIP 红外光谱分析

通过扫描图谱发现 MIP 的特征吸收峰主要出现在 889, 1120, 1430, 1618, 2925 和 3365 cm^{-1} 处。上述吸收峰与多糖的特征吸收峰相符合。3365 cm^{-1} 处出现的宽峰是由 O-H 的伸缩振动引起, 说明 MIP 的结构中存在羟基; 2925 cm^{-1} 左右出现的峰是由 C-H 的伸缩振动引起, 与 1425 cm^{-1} 处出现的峰综合表明有 $-\text{CH}_2$ 和 $-\text{CH}_3$ 基团存在; 而 1620 cm^{-1} 处出现的较强峰是由 C=O 引起; 1120 cm^{-1} 是 C-O-C 伸缩振动的特征吸收峰; 889 cm^{-1} 左右较小的吸收峰是典型的吡喃葡聚糖和 β -型糖苷键连接特征吸收峰^[17]。该结果表明 MIP 的异头碳为 β 构型。

组成多糖的单糖间的连接方式是多糖一级结构

的重要特征,此外,其侧链的种类和结构也影响多糖的生物活性^[18]。研究表明,真菌 β -葡聚糖是机体天然免疫和获得性免疫的有效调节剂^[19]。已有学者报道,灵芝(*G. lucidum*)多糖、六妹羊肚菌(*M. sextelata*)多糖、香菇(*Lentinus edodes*)多糖等都为 β -(1,3)-D葡聚糖,且活性与其分支度和分子量有关^[20]。通过红外光谱分析,MIP的异头碳为 β 构型,因此,从结构上分析可知MIP可能具有免疫调节活性。其次,羟基的特征吸收峰表明,MIP具有一定的还原型,在体外能够表现出一定的自由基清除活性。

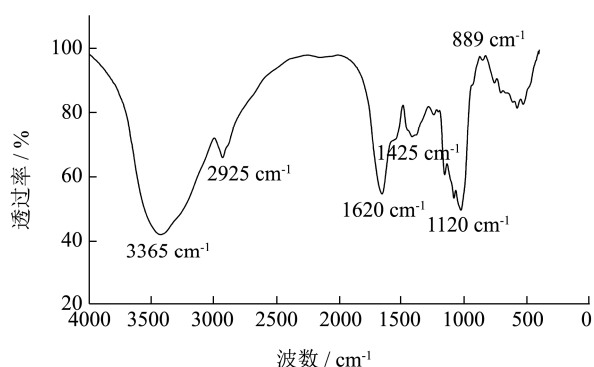


图4 MIP 红外光谱吸收图谱

Fig.4 Infrared absorption spectra of MIP

2.3 MIP 的自由基清除活性

MIP 对 DPPH 自由基,羟自由基和超氧阴离子自由基的清除活性如图 3 所示。MIP 对 DPPH 自由基具有较强的清除能力,表现出剂量依赖关系,高浓度的 MIP 对 DPPH 自由基清除率超过 60%,测定其 IC₅₀ 值为 1.18±0.04 mg/mL。MIP 对羟自由的清除活性相对较弱,5 mg/mL 的 MIP 其清除活性为 39.92%。MIP 对超氧阴离子自由基清除活性较强,IC₅₀ 值为 2.10 mg/mL,高浓度的 MIP 其清除活性接近 70%,与 Vc 相近。

人体众多疾病的发生都可归因于氧化压力,已有研究报道,动脉粥样硬化、肿瘤、神经退行性疾病等发生都与氧化压力有关^[21]。多种自由基可产生氧化压力,因此,自由基清除实验是评估天然产物抗氧化活性的基础。DPPH 被广泛用于测定样品的自由基清除活性。实验过程中发现,在样品的抗氧化能力作用下,DPPH 溶液会发生肉眼即可直接观察的颜色变化,通常由紫色变为黄色。许多真菌多糖的 DPPH 自由基清除活性都完成了测定,本实验中,MIP 对 DPPH 自由基的 IC₅₀ 值为 1.18±0.04 mg/mL,优于块菌多糖 TIP-1 (IC₅₀ 为 1.72 mg/mL)^[10],优于松茸多糖 TMP-A (IC₅₀ 为 2.2 mg/mL)^[22],略弱于羊肚菌 (*Morchella esculenta* (L.) Pers.) 多糖,其 IC₅₀ 值为 (1.09±0.03) mg/mL^[4]。

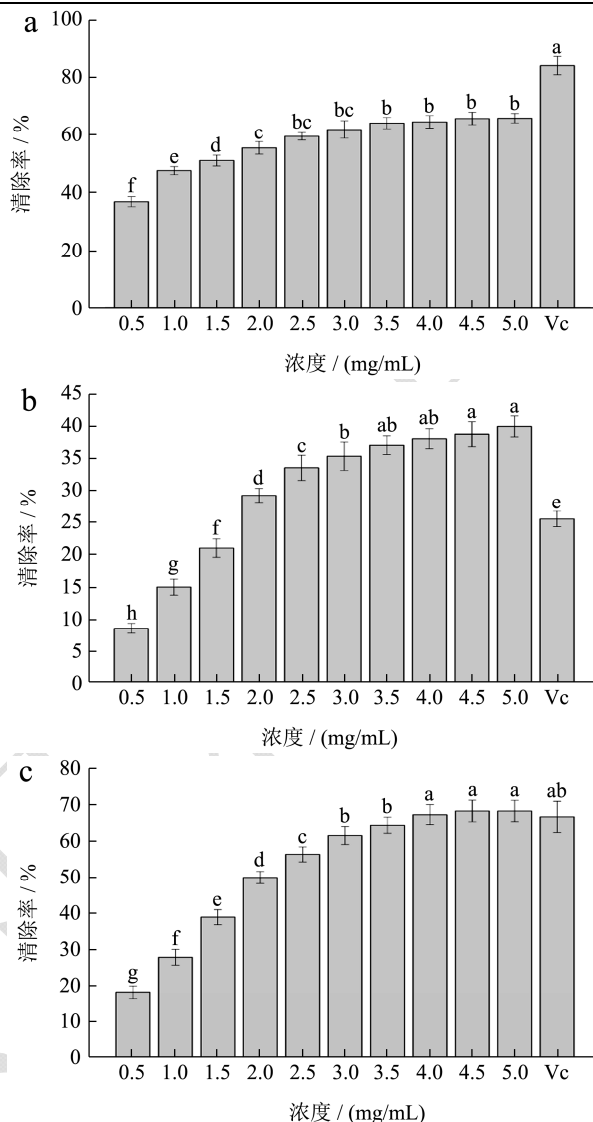


图5 MIP 清除 DPPH 自由基(a)、羟自由基(b)及超氧阴离子自由基(c)的活性

Fig.5 Scavenging activity of MIP on DPPH radical (a), hydroxyl radical (b) and superoxide radical (c)

注:数值为 3 个重复的平均值±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 MIP 的神经保护作用

80 mM H₂O₂ 处理 PC12 细胞 30 min 后,PC12 细胞会变圆,贴合力降低,表面皱缩,观察到细胞内的空泡明显增多,MTT 法测定细胞的存活率仅为 49.14%±2.02% (图 6b)。MIP 处理后,PC12 细胞的存活率明显升高,200 μ g/mL 的 MIP 可以使得 PC12 细胞的存活率升高到 81.23%±4.02% (图 6d),继续升高 MIP 的浓度,PC12 细胞的存活率没有明显的变化。

本实验中,H₂O₂ 作为一种活性氧(reactive oxygen species, ROS)的触发剂。在低浓度下,ROS 作为第二信使在多种信号转导途径中起着重要作用。然而,

如果 ROS 过多地积累在细胞中, 就会产生氧化压力, 并影响到许多重要的细胞成分, 如核酸、蛋白质和脂类。H₂O₂ 处理 PC12 细胞, 形态学上变化明显。H₂O₂ 作用于细胞, 细胞皱缩, 贴壁变松, 细胞内部空泡增多, 处理时间延长, 启动凋亡的细胞逐步出现死亡细胞的特征, 部分细胞开始裂解, 培养基中能够观察到细胞碎片。MIP 处理后, 从形态学上观察, 细胞的凋亡被抑制, 部分细胞形态从圆形渐变为梭状, 贴壁紧密, 逐步恢复正常。

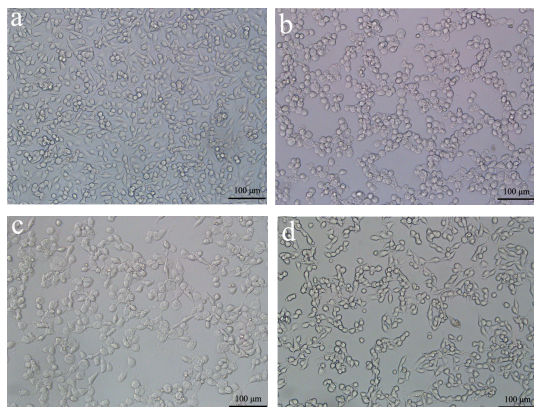


图 6 MIP 对 H₂O₂ 引发的氧化压力对 PC12 细胞损伤的保护作用
Fig.6 Effects of MIP on protection against H₂O₂-induced PC12 cell cytotoxicity

注: a: 正常 PC12 细胞, b: 80 mM H₂O₂ 处理 30 min 后的 PC12 细胞, c: 100 μg/mL MIP 处理后的 PC12 细胞, d: 200 μg/mL MIP 处理后的 PC12 细胞, 比例尺=100 μm。

表 1 不同浓度 MIP 保护 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞损伤的存活率

Table 1 Effects of MIP on cell viability in H₂O₂-induced PC12 cells

PC12 cells		
组别	浓度/(μg/mL)	细胞存活率/%
对照组	0	100.0
过氧化氢组	0	49.14±2.02**
MIP 组 1	50	59.22±2.33 [△]
MIP 组 2	100	69.34±1.85 [△]
MIP 组 3	200	81.23±4.02**
MIP 组 4	400	83.45±2.92**

注: 数值为 3 个重复的平均值±标准误, 与空白对照组比较, **p*<0.05, ***p*<0.01; 与模型组比较, [△]*p*<0.05, ^{△△}*p*<0.01。

2.5 MIP 神经保护作用机制探索

80 mM H₂O₂ 处理 PC12 细胞 30 min 后, PC12 细胞的内源性抗氧化酶系活力都出现明显下降, 试剂盒测定结果显示, SOD 活性降至对照的 52.36%±6.4%(图 7a), CAT 活性降至对照的 44.16%±3.1%(图 7b), GSH-Px 的活性则下降至 51.01%±4.15%(图 7c)。通过不同浓度的 MIP 处理后, PC12 细胞的内源性抗氧

化酶系的活力都出现了显著的回升, 其中, 400 μg/mL 的 MIP 可将 SOD, CAT 和 GSH-Px 的活力依次提升至 71.12%±5.43%, 58.84%±5.21%和 82.24%±6.62%。由此可知, MIP 具有重塑 PC12 内源性抗氧化酶系活力的作用。

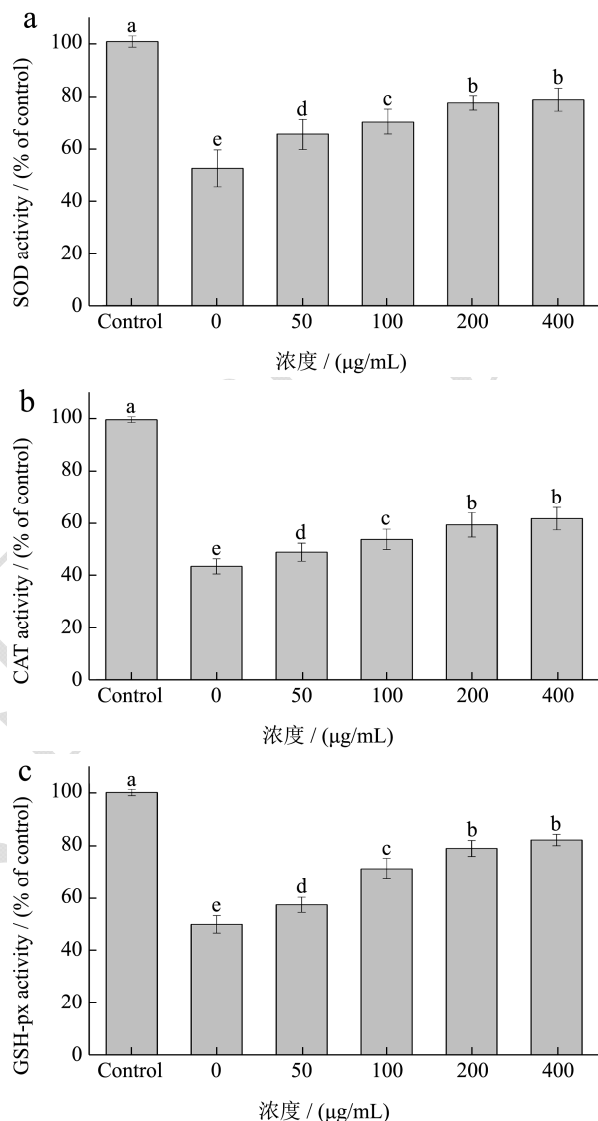


图 7 MIP 对细胞内抗氧化酶系 SOD (a)、CAT (b) 及 GSH-Px (c) 的重塑作用

Fig.7 Remodeling effects of MIP on endogenous antioxidant enzymes SOD (a), CAT (b) and GSH-Px (c) in H₂O₂-induced PC12 cells

H₂O₂ 处理会诱发细胞凋亡, 实验条件下观察到 80 mM H₂O₂ 处理 PC12 细胞 30 min 后, 细胞的凋亡率升高到 20.92%±1.88%, 坏死率为 9.81%±1.34%; 最适浓度的 MIP 可以使凋亡率降低至 14.86%±2.42%, 与处理组呈现显著性差异, 但是, 对于细胞的坏死率没有明显的改变 (坏死率为 9.44%±1.67%)。

通过荧光定量 PCR 法测定了 Bcl-2 及 Bax 基因的表达情况。80 mM H₂O₂ 处理后, Bax mRNA 的表达量

上升至 187.73%±12.71%，Bcl-2 mRNA 的表达量则显著下降，为 38.87%±3.34%。通过 MIP 处理，Bcl-2 mRNA 的表达量显著上升，而 Bax mRNA 表达量则明显下降。以上结果表明，MIP 可以调节 Bax/Bcl-2 的比率，从而抑制细胞凋亡的发生。进一步，测定了凋亡执行者 Caspases-3 的活性。结果发现，80 mM 的 H₂O₂ 处理使得细胞 Caspases-3 的活性显著升高，MIP 处理可抑制 Caspases-3 的活性，阻断凋亡的发生。

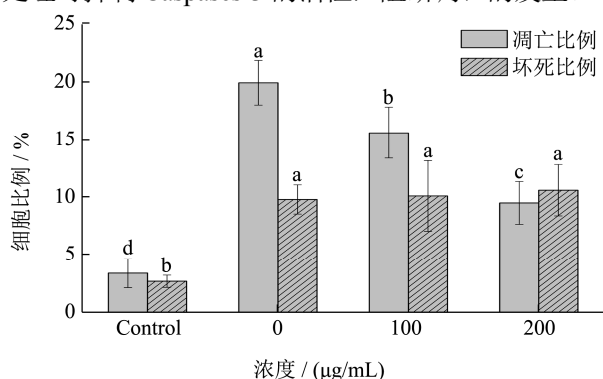


图 8 MIP 抑制 H₂O₂ 介导的 PC12 细胞凋亡

Fig.8 Effect of MIP inhibited H₂O₂-induced apoptosis in PC12

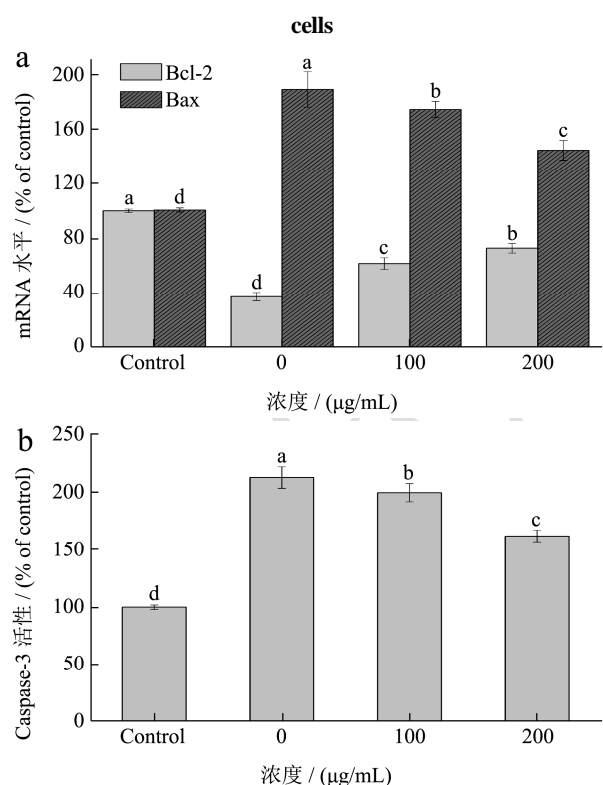


图 9 MIP 对 H₂O₂ 介导 PC12 细胞损伤的保护作用机制

Fig.9 Protective mechanism of MIP on H₂O₂-mediated cell injury

注: a: mRNA 表达水平; b: Caspase 活性。

结合之前的形态观察，我们确认 MIP 可以缓解 H₂O₂ 引发的细胞凋亡。生物体内源性抗氧化酶系 (SOD、CAT、GSH-Px) 是抵御氧化压力的天然屏障。

研究表明，过量的 ROS 会快速降低内源性抗氧化酶系活力，而某些天然抗氧化剂则能够重塑细胞内源性抗氧化酶系的活力，花青素^[23]、黑莓提取物^[24]、红曲米提取物^[25]等活力较强的天然抗氧化剂都能够提高 SOD 和 GSH-Px 的活性。花青素可以缓解氧化压力损伤引起的 SOD 活性下降，处理后 SOD 可以恢复到空白对照的 81.12%，黑莓提取物的恢复效率为 78.45%，MIP 的恢复率为 79.23%，与它们相近。白灵菇多糖^[26]可恢复衰老小鼠脑组织 SOD 活性，提高 45.31%，本研究中，MIP 对 SOD 和 GSH-Px 的恢复作用尤其明显。

H₂O₂ 能够引发氧化压力，降低细胞活力，介导 PC12 细胞启动凋亡程序，造成凋亡调节基因 Bax 和 Bcl-2 的表达失调，凋亡执行蛋白 Caspase 家族活性提高，从而使得细胞内形成凋亡小体，进一步裂解。细胞凋亡中最经典的途径之一为内部线粒体途径，在该途径中，Bcl-2 家族蛋白通过调节膜电位从而控制线粒体外膜通透性而发挥关键作用。Bcl-2 家族蛋白是控制线粒体相关的凋亡因子释放的主要调节因子^[27]。MIP 通过促进 Bax 表达及降低 Bcl-2 表达，能够调节线粒体膜电位，减少 ROS 活性氧的产生，缓解氧化压力。半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶 (Caspase) 家族成员与真核细胞凋亡密切相关，并能够调节细胞的生长、分化与凋亡^[28]。ROS 能够激活 PC12 细胞中的丝裂原活化蛋白激酶家族 (mitogen-activated protein kinases, MAPKs)，该酶系可以激活下游的 Caspase-3 并且调节 Bcl-2 家族的表达量，以此介导细胞凋亡。本研究发现，MIP 既能够抑制 Caspase-3 活性，又能够降低 Bax/Bcl-2 比值，通过这两方面的作用，抑制 H₂O₂ 介导的 PC12 细胞凋亡，实现神经保护作用。

3 结论

本文采用水提醇沉法从人工栽培的梯棱羊肚菌 (*M. importuna*) 子实体中提取到多糖 (MIP)，通过形貌观察、分子量测定、PMP 柱前衍生、红外光谱扫描等方法探究了 MIP 的理化性质，MIP 的平均粒径为 432.20 nm，平均分子量为 1.35×10⁶ u，MIP 的异头碳为 β 构型，结构中含有羟基和碳氧双键，具有一定的还原性。进一步评估了 MIP 的神经保护活性并探索了其作用机制，发现 MIP 能高效清除自由基，对于 H₂O₂ 诱发的氧化压力对 PC12 细胞的损伤具有一定的保护作用，作用机制包括：1. 重塑内源性抗氧化酶系 (SOD, CAT, GSH-Px) 活力；2. 通过调节凋亡控制基因 (Bax, Bcl-2) 的表达，减少细胞凋亡；3. 抑制凋亡执行者 Caspase 蛋白家族的活性。综上，MIP 可以作为一种具有神经保护功能的抗氧化活性物质加以开发利用，

在神经退行性疾病的预防和辅助治疗上具有应用前景。

参考文献

- [1] Masaphy S. Biotechnology of morel mushrooms: successful fruiting body formation and development in a soilless system [J]. *Biotechnology Letters*, 2010, 32: 1523-1527
- [2] 李时珍. 本草纲目 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999, 1718-1982
- LI Shi-zhen. *Bencao Gangmu Compendium of Materia Medica* [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1999, 1718-1982
- [3] Hu M, Chen Y, Wang C, et al. Induction of apoptosis in HepG2 cells by polysaccharide MEP-II from the fermentation broth of *Morchella esculenta* [J]. *Biotechnology Letters*, 2013, 35(1): 1-10
- [4] Fu L, Wang Y, Wang J, et al. Evaluation of the antioxidant activity of extracellular polysaccharides from *Morchella esculenta* [J]. *Food & Function*, 2013, 4(6): 871-879
- [5] Cui H, Chen Y, Wang S, et al. Isolation, partial characterisation and immunomodulatory activities of polysaccharide from *Morchella esculenta* [J]. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 2011, 91(12): 2180-2185
- [6] Liu Q, Ma H, Zhang Y, et al. Artificial cultivation of true morels: Current state, issues and perspectives [J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2017, 38(2): 259-271
- [7] Ling S, Naidu M, David P, Wong K H, et al. Potentiation of neuritogenic activity of medicinal mushrooms in rat pheochromocytoma cells [J]. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 13: 157-167
- [8] Bhat Ah, Dar Kb, Anees S, et al. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2015, 74: 101-110
- [9] Xiong C, Li Q, Chen C, et al. Neuroprotective effect of crude polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Morchella importuna* against H₂O₂-induced PC12 cell cytotoxicity by reducing oxidative stress [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2016, 83: 569-576
- [10] 罗强, 颜亮, 吴俐莎, 等. 印度块菌水溶性多糖的单糖组成与抗氧化活性研究 [J]. *食品科学*, 2010, 31(23): 52-56
- LUO Qiang, YAN Liang, WU Li-sha, et al. Monosaccharide compositions and antioxidant activity of water-soluble polysaccharide isolated from *Tuber indicum* [J]. *Food Science*, 2010, 31(23): 51-56
- [11] 张泽生, 张建平, 史坤, 等. 高效凝胶渗透色谱法检测菊糖相对分子质量 [J]. *食品科学*, 2009, 30(12): 219-221
- ZHANG Zhe-sheng, ZHANG Jian-ping, SHI Kun, et al. HPGPC Determination of relative molecular mass of inulin [J]. *Food Science*, 2009, 30(12): 219-221
- [12] 马耀宏, 郑岚, 杨俊慧, 等. 柱前衍生化 HPLC 法分析真菌多糖的单糖组成 [J]. *食品科技*, 2012, 1: 254-259
- MA Yao-hong, ZHENG Lan, YANG Jun-hui, et al. Analysis on monosaccharide composition of fungal polysaccharides by HPLC with pre-column derivatization [J]. *Food Science and Technology*, 2012, 1: 254-259
- [13] Oktay M, Gulcin I, Kufrevioglu Oi. Determination of *in vitro* antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts [J]. *LWT Food Science and Technology*, 2003, 36: 263-271
- [14] HU W, WANG G, LI P, et al. Neuroprotective effects of macranthoin G from *Eucommia ulmoides* against hydrogen peroxide-induced apoptosis in PC12 cells *via* inhibiting NF- κ B activation [J]. *Chemico Biological Interactions*, 2014, 224: 108-116
- [15] 张劲松, 韩炜玮, 潘迎捷. 云芝子实体多糖化学结构的研究 [J]. *药学学报*, 2001, 36(9): 664-667
- ZHANG Jin-song, HAN Wei-wei, PAN Ying-jie. Studies on chemical structure of polysaccharide from fruit body of *Coriolus versicolor* [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2001, 36(9): 664-667
- [16] 魏芸, 张天佑, 张姝, 等. 羊肚菌多糖的分离纯化及组成结构分析 [J]. *植物资源与环境学报*, 2000, 9(2): 14-17
- WEI Yun, ZHANG Tian-you, ZHANG Shu, et al. Isolation, purification and characterization of polysaccharides from *Morchella esculenta* L. [J]. *Journal of Plant Resources and Environment*, 2000, 9(2): 14-17
- [17] Kozarski M, Klaus A, Niksic M, et al. Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus* [J]. *Food Chemistry*, 2011, 129(4): 1667-1675
- [18] 张冬雪, 王晓玲, 刘高强. 灵芝多糖的结构及构效关系 [J]. *食品工业*, 2015, 36(11): 258-261
- ZHANG Dong-xue, WANG Xiao-ling, LIU Gao-qiang. The structure and the structure-activity relationships of *Ganoderma lucidum* polysaccharides [J]. *The Food Industry*, 2015, 36(11): 258-261
- [19] 刘高强, 王晓玲. 灵芝多糖的抗癌构效关系及其抗癌作用机制 [J]. *菌物学报*, 2006, 25(3): 430-438

- LIU Gao-qiang, WANG Xiao-ling. Structure-activity relationship and anticancer mechanisms of *Ganoderma lucidum* polysaccharides [J]. *Mycosystema*, 2006, 25(3): 430-438
- [20] Liu Y F, Zhang J S, Tang Q J, et al. Physicochemical characterization of a high molecular weight bioactive β -D-glucan from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum* [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 101: 968-974
- [21] José M Matés, Segura J A, Alonso F J, et al. Oxidative stress in apoptosis and cancer: An update [J]. *Archives of Toxicology*, 2012, 86(11):1649-1665
- [22] Ding X, Tang J, Cao M, et al. Structure elucidation and antioxidant activity of a novel polysaccharide isolated from *Tricholoma matsutake* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2010, 47(2): 271-275
- [23] Shih P H, Yeh C T, Yen G C. Anthocyanins Induce the activation of phase II enzymes through the antioxidant response element pathway against oxidative stress-induced apoptosis [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(23): 9427-9435
- [24] Park E, Cho S M, Lee J E, et al. Effects of Korean black raspberry supplementation on oxidative stress and plasma antioxidant capacity in healthy male smokers [J]. *Journal of Functional Foods*, 2015, 16:393-402
- [25] 张红林,李桂玲,苏国成,等.古田红曲米抗氧化活性物质的分离纯化[J].现代食品科技,2018,34(5):136-142
- ZHANG Hong-ling, LI Gui-ling, SU Guo-cheng, et al. Separation and purification of the antioxidant compounds from gutian red yeast rice [J]. *Food Research and Development*, 2018, 34(5): 136-142
- [26] 李爱红,陈鑫,郭爱松.白灵菇真菌多糖对衰老模型小鼠学习记忆能力、脑组织超氧化物歧化酶活性和丙二醛含量的影响[J].临床神经病学杂志,2012,25(2):126-128
- LI Ai-hong, CHEN Xin, GUO Ai-song. Effects of *Pleurotus nebrodensis* on ability of learning and memory, activity of superoxide dismutase and content of malondialdehyde at brain tissue in aging model mice [J]. *Journal of Clinical Neurology*, 2012, 25(2): 126-128
- [27] 黄秀兰,崔国辉,周克元. PI3K-Akt 信号通路与肿瘤细胞凋亡关系的研究进展[J].癌症,2008,3:331-336
- HUANG Xui-lan, CUI Guo-hui, ZHOU Ke-yuan. Correlation of PI3K-Akt signal pathway to apoptosis of tumor cells [J]. *Chinese Journal of Cancer*, 2008, 3: 331-336
- [28] Porter A G, Jänicke R U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis [J]. *Cell Death & Differentiation*, 1999, 6(2):99-104

(上接第 169 页)

- [20] 郭园园,孔保华.冷冻贮藏引起的鱼肉蛋白质变性及其物理化学特性的变化[J].食品科学,2011,32(7):335-340
- GUO Yuan-yuan, KONG Bao-hua. Advances in the research of denaturation and change in physico-chemical properties of fish proteins during frozen storage [J]. *Food Science*, 2011, 32(7): 335-340
- [21] Zhang B, Fang C D, Hao GJ, et al. Effect of kappa-carrageenan oligosaccharides on myofibrillar protein oxidation in peeled shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during long-term frozen storage [J]. *Food Chemistry*, 2018, 245: 254-261
- [22] 周绪霞,徐黎,丁玉庭.酶解制备褐藻胶寡糖及其产物的抗氧化活性分析[J].食品与发酵工业,2014,40(2):116-120
- ZHOU Xu-xia, XU Jun, DING Yu-ting. Alginate-derived oligosaccharides product by alginate lyase and detection of the antioxidant activity [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2014, 40(2): 116-120
- [23] Estévez M. Protein carbonyls in meat systems: A review [J]. *Meat Science*, 2011, 89(3): 259-279
- [24] Ndoye F T, Alvarez G. Characterization of ice recrystallization in ice cream during storage using the focused beam reflectance measurement [J]. *Journal of Food Engineering*, 2015, 148: 24-34
- [25] Zhang B, Cao H J, Lin H M, et al. Insights into ice-growth inhibition by trehalose and alginate oligosaccharides in peeled Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during frozen storage [J]. *Food Chemistry*, 2019, 278: 482-490
- [26] Ma L K, Zhang B, Deng S G, et al. Comparison of the cryoprotective effects of trehalose, alginate, and its oligosaccharides on peeled shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during frozen storage [J]. *Journal of Food Science*, 2015, 80(3): 540-546