

小刺猴头菌发酵浸膏多糖体外抗氧化活性分析

任桂红^{1,2,3} 苗月^{1,3} 李肖宏² Mahfuz Shad^{1,4} 甄东^{1,3} 宋慧^{1,3*}

(1. 吉林农业大学 生命科学院, 长春 130118;

2. 北华大学 理学院, 吉林 吉林 132013;

3. 食药菌教育部工程研究中心, 长春 130118;

4. 锡尔赫特农业大学 动物营养系, 锡尔赫特 3100 孟加拉)

摘要 为研究小刺猴头菌 [*Hericium caput-medusae* (Bull. :Fr.) Pers] 发酵浸膏多糖的抗氧化活性。以工厂化小刺猴头菌发酵浸膏为原料, 采用透析法分级, DEAE sepharose fast flow 柱层析纯化, 分别获得粗多糖组分 HFCP1 和中性多糖 HFCP1-1; 通过 PMP 柱前衍生-高效液相色谱法和红外光谱法对单糖组成和结构进行分析, 单糖组成均以葡萄糖和半乳糖为主。化学法检测多糖抗氧化活性, 结果显示: HFCP1 和 HFCP1-1 清除羟基自由基、超氧阴离子自由基、2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐 (2,2'-azinobis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate, ABTS⁺) 和 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 的 IC₅₀ 值分别为 7.66 和 6.77 mg/mL、6.16 和 5.30 mg/mL、0.63 和 0.85 mg/mL、0.39 和 2.62 mg/mL。以 RAW264.7 细胞建立 H₂O₂ 诱导损伤模型, 细胞抗氧化结果表明: HFCP1 和 HFCP1-1 处理组与模型组相比均显著增强细胞活力 ($P < 0.05$), 浓度为 100 和 200 mg/L 时 MDA 含量与模型组相比均显著下降 ($P < 0.05$); HFCP1 浓度为 100 和 200 mg/L 时与模型组相比显著增加 SOD 和 GSH-Px 的活性 ($P < 0.05$); HFCP1-1 浓度为 200 mg/L 时与模型组相比显著增加 SOD 活性 ($P < 0.05$); 也能增加 GSH-Px 的活性, 但未达到显著水平 ($P > 0.05$)。

关键词 小刺猴头菌; 多糖; 清除自由基; RAW264.7 巨噬细胞; 抗氧化酶

中图分类号 S567.3+9

文章编号 1007-4333(2018)12-0050-09

文献标志码 A

In vitro antioxidant activity of polysaccharides extracted from *Hericium caput-medusae* (Bull. :Fr.) Pers

REN Guihong^{1,2,3}, MIAO Yue^{1,3}, LI Xiaohong², SHAD Mahfuz^{1,4}, ZHEN Dong^{1,3}, SONG Hui^{1,3*}

(1. School of Live Science, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2. College of Science, Beihua University, Jilin 132013, China;

3. Engineering Research Center of Chinese Ministry of Education for Edible and Medicinal Fungi, Changchun 130118, China;

4. Department of Animal Nutrition, Sylhet Agricultural University, Sylhet 3100, Bangladesh)

Abstract To analyze the antioxidant activity of *Hericium caput-medusae* (Bull. :Fr.) Pers (HFC), an industrial extraction of *H. erinaceus* polysaccharide fermentation extract was taken as study object. Using dialysis method and DEAE sepharose fast flow column purification crude polysaccharide components HFCP1 and neutral polysaccharides HFCP1-1 were obtained. The composition and structure of monosaccharides were preliminarily analyzed by PMP pre-column derivatization-high performance liquid chromatography and infrared spectroscopy. The monosaccharides were mainly composed of glucose and galactose. The results showed that the IC₅₀ values of HFCP1 and HFCP1-1 to scavenge hydroxyl radical scavenging, superoxide anion scavenging, ABTS⁺ and DPPH were 7.66 and 6.77, 6.16 and 5.30, 0.63 and 0.85, 0.39 and 2.62 mg/mL, respectively. A H₂O₂ - induced injury model was established in RAW264.7

收稿日期: 2018-01-17

基金项目: 吉林省经济菌物创新平台项目资助课题(2014-2016)

第一作者: 任桂红, 博士研究生, E-mail: 460807264@qq.com

通讯作者: 宋慧, 教授, 主要从事功能性生物分子研究, E-mail: songhuinongda@163.com

cells, the results of anti-oxidation of cells showed that the cell viability of HFCP1 and HFCP1-1 treatment group were significantly increased compared with those the model group ($P < 0.05$). The content of MDA was significantly decreased compared with the model group when its concentration was 100 and 200 mg/L ($P < 0.05$). The activities of SOD and GSH-Px were significantly increased compared with those of the model group when HFCP1 concentrations were 100 and 200 mg/L ($P < 0.05$). In conclusion, compared with model group, 200 mg/L HFCP1-1 significantly increased SOD activity ($P < 0.05$), but also increased GSH-Px activity, but did not reach significant level ($P > 0.05$).

Keywords *Hericium caput-medusae* (Bull.: Fr.) Pers.; polysaccharide; free radical scavenging; RAW 264.7 macrophage; antioxidantase

目前研究表明,炎症、肿瘤和衰老等许多疾病的发生、发展与细胞中自由基的积累密切相关,使用抗氧化剂清除过量自由基,维持机体氧化还原的平衡状态,对多种慢性疾病的预防和治疗具有积极的作用。真菌多糖因能缓解氧化损伤,且具有提取简单、原料丰富和毒副作用低的特点,在天然抗氧化剂的开发中受到广泛关注^[1-2]。

小刺猴头菌 [*Hericium caput-medusae* (Bull.: Fr.) Pers.] 是一种珍贵的食用和药用真菌,通常以子实体入药。由于人工栽培周期长,收率低,因此无法满足对其药用需求,目前已具备成熟的液体深层发酵生产技术,可以进行工厂化生产。“胃乐新颗粒”即是以小刺猴头菌发酵液过滤浓缩后的发酵浸膏为主要成分的传统中成药,用于治疗慢性浅表性胃炎引起的胃痛及消化不良等。小刺猴头菌发酵浸膏 [fermentation concentrate of *Hericium caput-medusae* (Bull.: Fr.) Pers. (HFC)] 药用成分的分析表明, HFC 多糖 (HFC Polysaccharide, HFCP) 是重要的活性组分之一,具有免疫调节^[3] 和抗肿瘤^[4] 等生物活性,但对与慢性疾病防治有关的抗氧化活性及作用机制的报道较少。

本研究以 HFC 为原料,对分离获得的 HFCP 分别进行化学抗氧化活性和细胞抗氧化活性分析,以期为更好地利用小刺猴头菌这一珍贵食药资源提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

HFC 由吉林大学白求恩医大制药厂提供。

RAW264.7 小鼠巨噬细胞株由东北师范大学台桂花教授实验室馈赠。

1.2 试验方法

1.2.1 HFCP 的分离纯化

将 HFC 用 95% 的乙醇除脂,依次利用截留分子量 5 和 50 ku 的透析袋进行分级,收集分子量 5~

50 ku 和 >50 ku 的 2 个组分,透析液分别浓缩冻干得到粗多糖。采用 svage 法除蛋白^[5],使用美国 GE 公司的 DEAE sepharose fast flow 阴离子交换柱 (3.6 cm×20 cm) 进行粗多糖纯化。上样量 100 mg,依次用超纯水和不同浓度 NaCl 溶液 (0.2、0.5 和 1.0 mol/L) 洗脱,流速 2 mL/min。根据苯酚-硫酸法测得的糖谱,收集含糖组分进行透析、浓缩和冻干,得到初步纯化多糖。

1.2.2 化学组成和结构分析

总糖含量测定采用苯酚-硫酸法^[5];蛋白质含量测定采用考马斯亮蓝 G-250 法^[6];还原糖含量测定采用 DNS 法^[7];单糖组成分析采用 PMP 柱前衍生-高效液相色谱法^[8] (日本岛津公司 LC-10Avp 高效液相色谱仪);使用日本岛津公司的 IRAffinity-1S 傅立叶变换红外光谱仪进行红外光谱测定,扫描波长范围 4 000~400 cm^{-1} ,使用 KBr 粉末压片^[9]。

1.2.3 化学抗氧化活性测定

还原力测定参照尚红梅等^[10]的方法。

$$\text{总还原力} = A_1 - A_2 \quad (1)$$

式中: A_1 ,样品吸光度; A_2 ,空白吸光度。

羟自由基清除能力测定参照 xia 等^[6]的方法。超氧阴离子自由基清除能力根据 Feng 等^[11]的方法测定。ABTS⁺ (2,2'-联氮-二(3-乙基苯噻唑-6-磺酸)二铵盐) 自由基清除能力测定参照尚红梅等^[10]方法进行适当改进,96 孔板中分别加入 160 μL ABTS⁺ 工作液和 80 μL 不同浓度的样品溶液,室温避光反应 6 min,于 734 nm 处测定吸光值(上海闪谱生物科技有限公司 SP-Max2300A2 全波长酶标仪)。DPPH (1,1'-二苯基-2-三硝基苯肼) 自由基清除能力测定参照尚红梅等^[10]的方法稍作修改,96 孔板中加入 100 μL 样液,和 100 μL DPPH 溶液 (0.1 mol/L,溶剂为无水乙醇),室温避光静置 30 min,于 517 nm 处测定 OD 值。

$$\text{自由基清除率}/\% = [1 - (A_1 - A_2)/A_0] \times 100\% \quad (2)$$

式中: A_1 , 样品吸光度; A_2 , 样品对照吸光度; A_0 , 空白吸光度。

所有测定均以 Vc(维生素 C)为阳性对照。

1.2.4 细胞抗氧化活性测定

1) 细胞培养。小鼠 RAW264.7 巨噬细胞在 DMEM 高糖培养基(含 10% 热灭活的胎牛血清, 购于杭州四季青公司), 37 °C, 含 5% CO₂ 细胞培养箱(美国 NUAIRE 公司)中培养。细胞长至对数生长期用于试验。

2) H₂O₂ 损伤模型建立。将 RAW264.7 细胞制成密度 5×10^5 个/mL 细胞悬液, 接种于 96 孔板中, 每孔 100 μ L, 加入 100 μ L H₂O₂ 溶液(用不含血清的 DMEM 完全培养基配制), 每个浓度设置 5 个平行。培养 24 h 后用 MTT(噻唑蓝, 购于美国 Sigma 公司)法检测细胞活力^[12]。按照下列公式计算细胞相对存活率:

$$\text{细胞活力} = A_1 / A_0 \times 100\% \quad (3)$$

式中: A_1 , H₂O₂ 处理组吸光度; A_0 , 空白组吸光度。

3) 测定 HFCP 对 RAW264.7 细胞增殖影响试验。在 96 孔板中每孔加入 100 μ L 密度为 5×10^5 个/mL 的细胞悬液, 再加入 100 μ L 用不含血清的 DMEM 培养基配制的多糖样品溶液, 培养 24 h 后用 MTT 法检测细胞活力^[12]。

4) 测定 HFCP 对 H₂O₂ 氧化损伤 RAW264.7 细胞活力影响试验。在 96 孔板中每孔加入 100 μ L 密度 5×10^5 个/mL 的细胞悬液, 加入 100 μ L 用不含血清的 DMEM 培养基配制的含 0.2 mmol/L H₂O₂ 和不同

浓度的样品溶液, 空白组不含 H₂O₂ 和样品, 模型组含 0.2 mmol/L H₂O₂, 培养 24 h 后用 MTT 法检测细胞活力^[12]。

5) 细胞抗氧化酶活性测定。取对数生长期 RAW264.7 细胞, 接种于 60 mm 培养皿, 接种数量为 2.5×10^6 个/皿, 空白组不含 H₂O₂ 和样品, 模型组含 0.2 mmol/L H₂O₂, 试验组含 0.2 mmol/L H₂O₂ 和不同浓度样品溶液。培养 24 h 后, 弃去上清液, 每皿加入 500 μ L 细胞裂解液, 冰上裂解 20 min, 4 000 r/min、4 °C 离心 10 min, 吸取上清液备用。MDA、T-SOD 和 GSH-Px 活性使用南京建成生物工程研究所的试剂盒进行测定。

1.3 统计分析

所有数据采用单因素方差分析(ANOVA, SPSS 23.0)进行分析, $P < 0.05$ 表示显著性差异。结果数据以均值 \pm SD 表示。

2 结果与分析

2.1 HFCP 的制备和组成分析

通过透析方法, 截留获得分子量为 5~50 ku 和 >50 ku 的 2 个粗多糖组分, 分别命名为: HFCP1 (5~50 ku)、HFCP2 (>50 ku), 产率分别为 1.56% 和 0.92%。选择 HFCP1 通过 DEAE sepharose fast flow 层析进行纯化, 结果如图 1, 其中超纯水洗脱得到的中性糖部分是主要组分, 命名为 HFCP1-1。HFCP1 和 HFCP1-1 化学组成测定结果: 总糖含量分别为 16.78% 和 54.43%, 还原糖含量分别为 6.00%

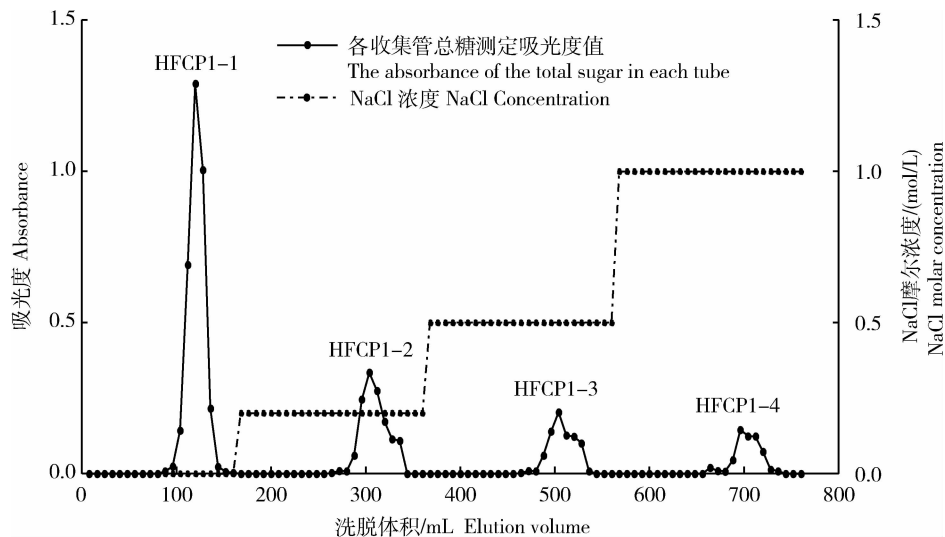


图 1 DEAE Sepharose fast flow 柱层析图谱

Fig. 1 Chromatography of DEAE Sepharose fast flow column

和 6.92%，蛋白质含量分别为 1.11% 和 0.07%，HFCP1 单糖组成及摩尔比如表 1。HFCP1-1 与 HFCP1 相比 Glc 和 Gal 含量明显提高，但缺少 GlcUA 和 GalUA。

HFCP1-1 红外光谱分析如图 2。在 $3\,363.9\text{ cm}^{-1}$ 处有宽而钝的吸收峰，是由多糖中-OH 的伸缩振动引

起， $2\,934.7\text{ cm}^{-1}$ 的吸收峰与多糖中 C-H 非对称伸缩振动有关，均为多糖特征吸收峰；在 $1\,652.0\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收，是由于结合水的原因； $1\,147.6$ 和 $1\,028.0\text{ cm}^{-1}$ 处是由多糖中的 C-O-C 和 C-O-H 的伸缩振动引起； 923.0 cm^{-1} 的吸收峰为吡喃环的非对称伸缩振动所致^[12-13]。

表 1 HFCP1 和 HFCP1-1 的单糖组成

Table 1 Monosaccharide compositions of HFCP1 and HFCP1-1

样品 Sample	单糖组成及摩尔比 Monosaccharide composition and molar ratio							摩尔比
	甘露糖 Mannose	鼠李糖 Rhamnose	葡萄糖醛酸 Glucuronic acid	半乳糖醛酸 Galacturonic acid	葡萄糖 Glucose	半乳糖 Galactose	木糖 Xylose	阿拉伯糖 Arabinose
	HFCP1	4.5	1.0	1.0	1.0	44.8	4.1	1.5
HFCP1-1	1.0	0.5			52.5	11.3	0.1	1.3

注：HFCP1 为分子量 5~50 ku 的粗多糖组分，HFCP1-1 为 HFCP1 纯化后的中性糖组分。下同。

Note: HFCP1 is a crude polysaccharide component with a molecular weight of 5 to 50 ku, and HFCP1-1 is a neutral polysaccharide component after purification of HFCP1. The same below.

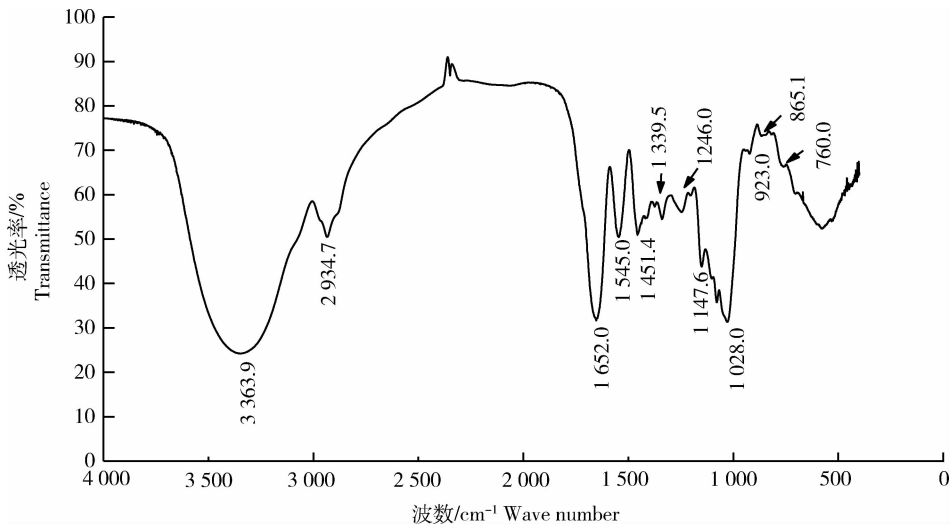


图 2 HFCP1-1 的 FT-IR 图谱

Fig. 2 Fourier-transform infrared spectroscopy of HFCP1-1

2.2 HFCP 的还原能力和清除自由基能力测定

HFCP1 和 HFCP1-1 的还原能力，以及清除超氧阴离子、羟自由基、ABTS⁺ 自由基和 DPPH 自由基的能力测试结果如图 3。分别对抗氧化曲线进行拟合后得到各样品指标的 IC₅₀ 值见表 2。

2.2.1 还原能力测定

如图 3(a) 和表 2 所示，在浓度为 0~8 mg/mL

的范围内，HFCP1 和 HFCP1-1 还原能力随着浓度增大都明显增强，变化趋势相似，说明都具有还原能力，可以作为电子或氢供体参与氧化还原反应，但在低浓度时与 Vc 相差较大。

2.2.2 羟自由基清除能力测定

如图 3(b) 和表 2 所示，HFCP1 和 HFCP1-1 对羟自由基的清除率均随浓度增加而升高，变化趋势

相似,在达到 8 mg/mL 浓度时清除率在 40%~60%,显著低于 Vc($P<0.05$)。IC₅₀ 值 HFCP1-1<HFCP1,二者具有显著性差异($P<0.05$)。

2.2.3 超氧阴离子清除能力测定

如图 3(c)和表 2 所示, HFCP1 在 0~6 mg/mL 的超氧阴离子自由基清除率低于 HFCP1-1, HFCP1-1 在 0~8 mg/mL 清除率随浓度增加逐渐升高,变化较平缓。二者均具有一定的超氧阴离子自由基清除作用,但显著低于 Vc($P<0.05$)。IC₅₀ 值 HFCP1-1<HFCP1,二者具有显著性差异($P<0.05$)。

2.2.4 ABTS⁺ 自由基清除能力测定

如图 3(d)和表 2 所示。HFCP1 和 HFCP1-1 在 0~2 mg/mL 随浓度增加清除率迅速升高,在 2 mg/mL 时清除率分别为 99.16%和 95.59%,均接近 Vc 水平,因此具有较高的 ABTS⁺ 清除活性。低浓度阶段 IC₅₀ 值 HFCP1<HFCP1-1,二者间有显著性差异($P<0.05$)。

2.2.5 DPPH 自由基清除能力测定

如图 3(e)和表 2 所示, HFCP1 在低浓度时即表现出良好的清除效果,1 mg/mL 时达到了 91.59%;而 HFCP1-1 在 0~8 mg/mL 随着浓度升高清除能力逐渐增大,达到 90.10%,但 IC₅₀ 值显著高于 HFCP1($P<0.05$)。

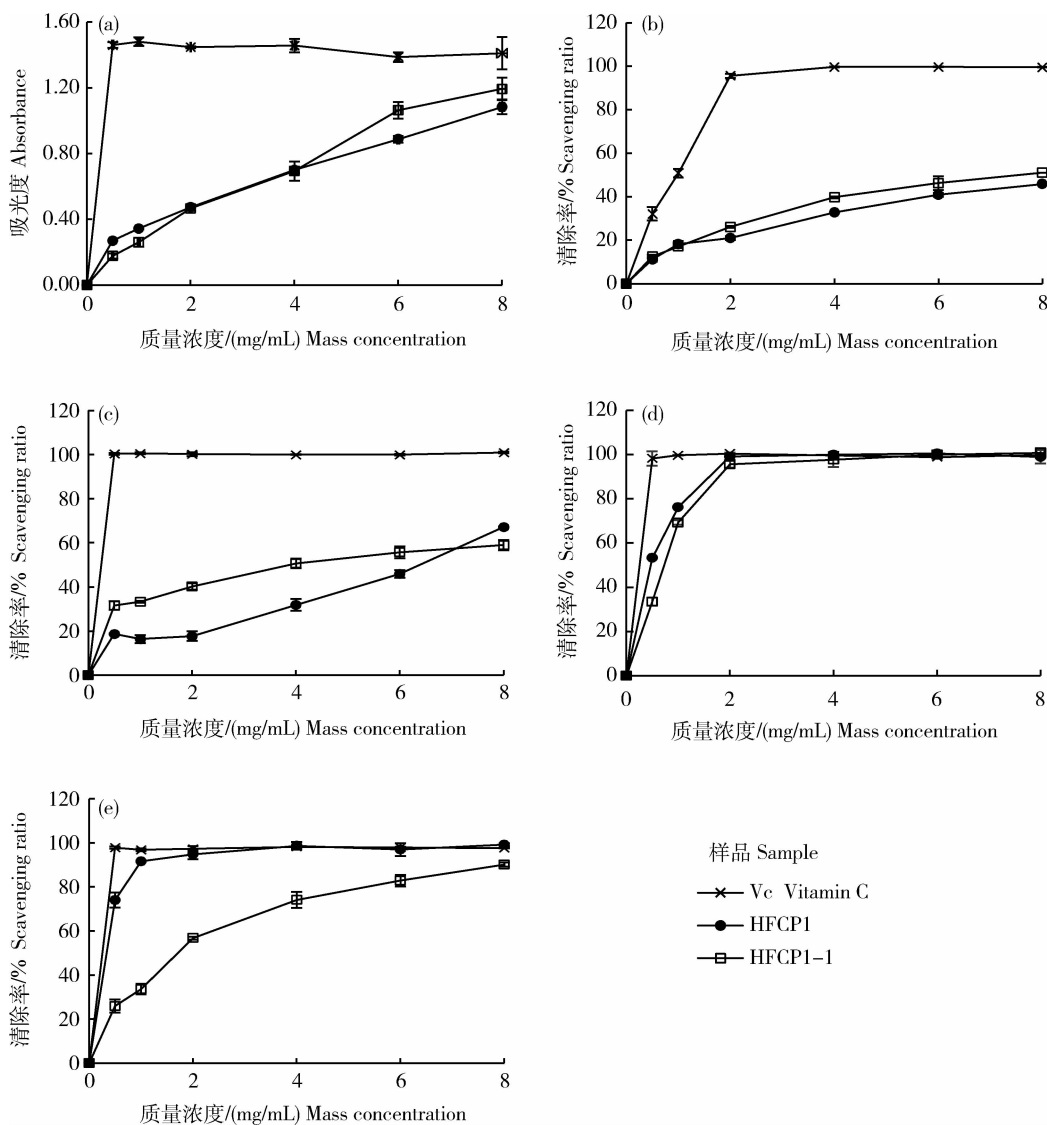


图 3 HFCP1 和 HFCP1-1 的还原力(a)以及清除羟自由基(b)、超氧阴离子(c)、ABTS⁺(d)和 DPPH(e)的活性

Fig. 3 Reducing capacity of HFCP1 and HFCP1-1 (a), and radical scavenging activity of Hydroxyl radicals(b), Superoxide anion radicals(c), ABTS(d)⁺ and DPPH(e)

表 2 HFCP1 和 HFCP1-1 清除自由基活性的 IC₅₀ 比较Table 2 Comparison of IC₅₀ of antioxidant activity of HFCP1 and HFCP1-1 mg/mL

样品 Sample	自由基类型 Free radical type			
	羟自由基	超氧阴离子	ABTS ⁺	DPPH
	Hydroxyl radical	Superoxide anion	ABTS ⁺	DPPH
Vc	0.96±0.03 a	0.28 a	0.36±0.15 a	0.10±0.03 a
HFCP1	7.66±0.56 c	6.16±0.03 c	0.63±0.02 b	0.39±0.04 b
HFCP1-1	6.77±0.14 b	5.30±0.21 b	0.85±0.06 c	2.62±0.11 c

注：同列数据后不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Note: In the same column, while with the different small letters mean significant differences ($P < 0.05$)

2.3 HFCP 的细胞抗氧化活性测定

2.3.1 建立 H₂O₂ 诱导损伤模型

不同浓度 H₂O₂ 对 RAW264.7 细胞活力的影响如图 4。与对照组相比, H₂O₂ ≥ 0.1 mmol/L 的各组均显著抑制细胞增殖 ($P < 0.05$), 并且随着 H₂O₂ 浓度增大, 细胞活力急剧下降, 0.2 mmol/L 时细胞活力为 51.52%, 接近 IC₅₀ 值 (0.257 mmol/L), 所以选择 0.2 mmol/L H₂O₂ 培养 24 h 作为损伤条件, 建立细胞 H₂O₂ 损伤模型用于下一步试验。

2.3.2 对 RAW264.7 细胞增殖的影响

用 MTT 法测试结果如图 5(a)。与对照相比, 12.5 和 25 mg/L 的 HFCP1 处理显著促进细胞增殖 ($P < 0.05$), 其余各处理对细胞增殖影响无显著性 ($P > 0.05$), 因此, 将 50、100 和 200 mg/L 作为样品测定剂量。

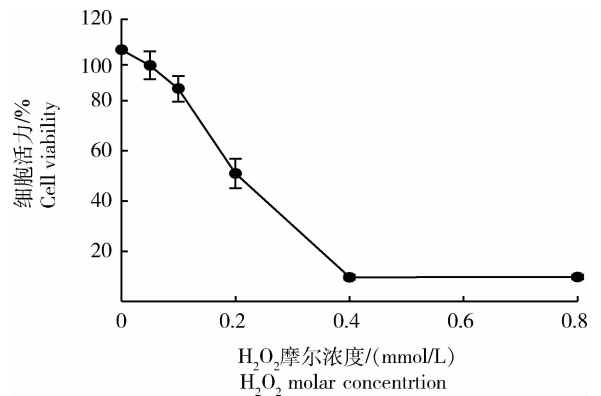
2.3.3 对氧化损伤 RAW264.7 细胞活力的影响

HFCP1 和 HFCP1-1 对 H₂O₂ 损伤细胞活力影响结果如图 5(b)。培养基中添加 H₂O₂ 显著降低了细胞活力, 同时添加 HFCP1 和 HFCP1-1 的试验组均比模型组细胞活力高, 且表现浓度依赖性, 与模型组相比均达到显著水平 ($P < 0.05$), 并且 200 mg/L 处理组细胞活力与空白组无显著性差异 ($P > 0.05$)。这表明 HFCP1 和 HFCP1-1 都可以有效缓解 H₂O₂ 对 RAW264.7 细胞的损伤。

2.3.4 对氧化损伤 RAW264.7 细胞脂质过氧化和抗氧化酶活性的影响

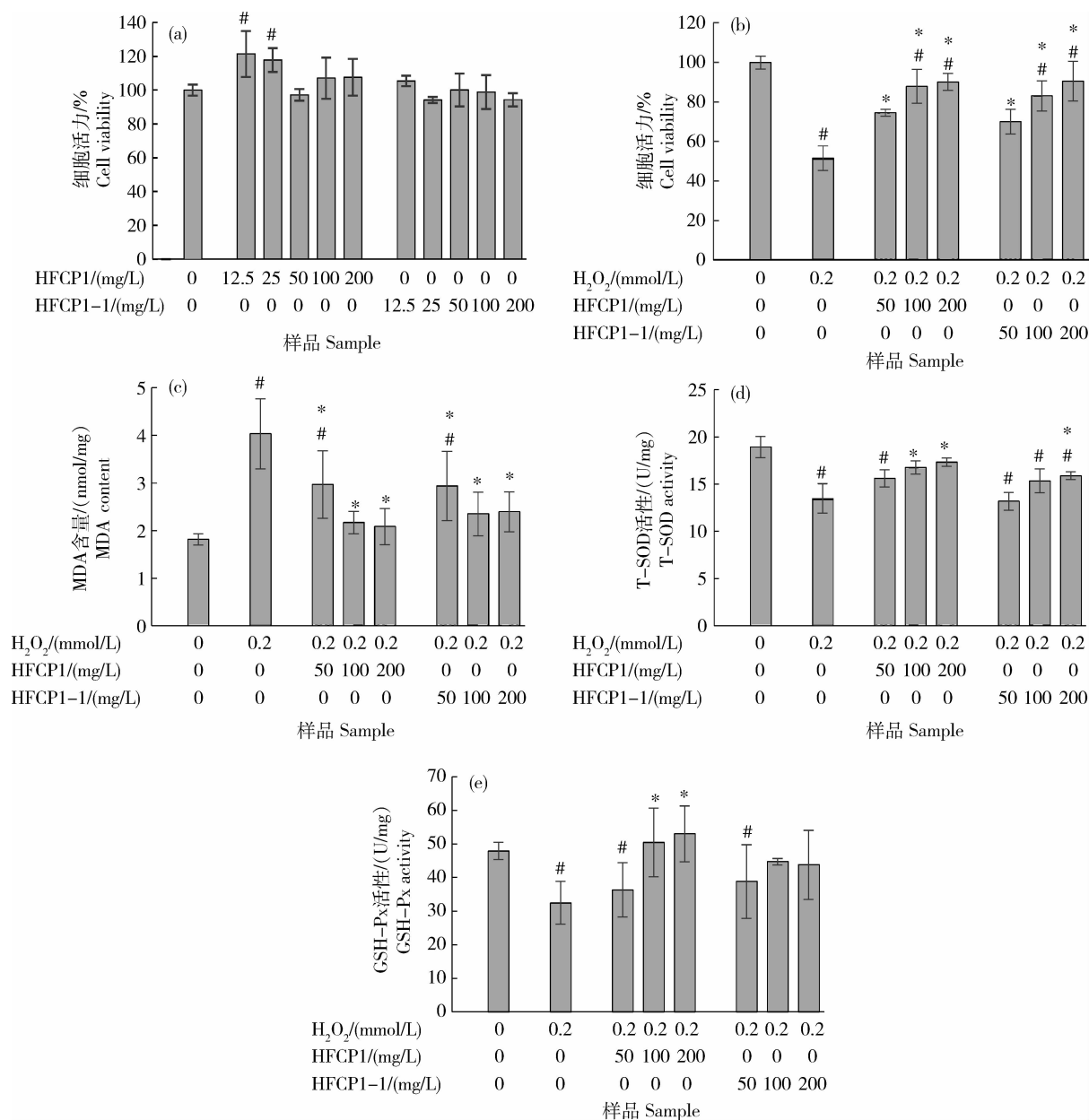
结果如图 5(c)、(d) 和 (e) 所示。与对照组相比, 培养基中添加 H₂O₂ 显著升高细胞中 MDA 含量 ($P < 0.05$), 降低 T-SOD 和 GSH-Px 的活性。而培养基中同时添加 HFCP 或 HFCP1-1 的试验组, 与模型组相比均使 MDA 含量下降, T-SOD 和 GSH-Px

活性升高。其中 100 和 200 mg/L 处理组 MDA 含量与模型组相比均显著下降 ($P < 0.05$), 如图 5(c)。添加 100 和 200 mg/L 的 HFCP1 处理组与模型组相比显著升高 T-SOD 的活性 ($P < 0.05$), 添加 HFCP1-1 处理组也能升高 GSH-Px 的活性, 但均未达到显著水平, 如图 5(d)。HFCP1 添加 100 和 200 mg/L 处理组与模型组相比 GSH-Px 的活性显著升高 ($P < 0.05$), 如图 5(e)。HFCP1 和 HFCP1-1 都能提高抗氧化酶活性, 增强细胞清除活性氧的能力, 且 HFCP1 的效果略好于 HFCP1-1。

图 4 H₂O₂ 氧化损伤模型Fig. 4 Modeling of H₂O₂-damage

3 讨论

多糖具有大量活性羟基能提供活泼氢或电子, 直接清除细胞及微环境中的活性氧避免细胞伤害, 其衍生物增加了羧基、硫酸基和氨基等活性基团, 可以提高清除能力, 因此, 直接清除活性氧是各种不同来源多糖抗氧化活性的共同机制^[14-15]。本研究的 HFCP1 和 HFCP1-1 都具有较高的还原能力, 均表



表示和对照组有显著性差异 ($P < 0.05$), * 表示和 H_2O_2 处理组有显著性差异 ($P < 0.05$)。

#, represents significant difference in relation to the control group ($P < 0.05$) and * indicates significant difference in relation to the H_2O_2 -treated group ($P < 0.05$).

图5 细胞抗氧化活性检测对 RAW264.7 细胞增殖的影响 (a), 对氧化损伤 RAW264.7 细胞活力的影响 (b), MDA 含量 (c), T-SOD 活性 (d) 和 GSH-Px 活性 (e)

Fig. 5 Evaluation of cells antioxidant activity including the effects on proliferation of RAW264.7 cell proliferation (a), cell vitality on of oxidative damage RAW264.7 cells (b), MDA levels (c), SOD activity (d) and GSH-Px activity (e)

现出强的 $ABTS^+$ 和 DPPH 清除能力, 这可能是由于它们具有将活性自由基转化成稳定状态的能力^[15]。HFCP1 和 HFCP1-1 对羟自由基和超氧阴离子也具有较弱的清除能力, 能够清除两种自由基。

因此, HFCP 具有良好的自由基清除活性。试验结果与同为猴头菌属的猴头菌 (*Hericium erinaceus*) 发酵菌丝体多糖具有较强的体外清除自由基能力^[16] 结果一致, 也有研究结果表明, 猴头菌菌丝体

多糖的抗氧化活性高于子实体多糖^[17]。

以细胞为基础的抗氧化试验能相对真实地模拟生物体的内部环境,利于进一步研究多糖抗氧化作用机理^[18]。抗氧化酶是细胞抗氧化防御系统的重要组成部分,主要包括超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和过氧化氢酶(CAT)等,SOD可以催化超氧阴离子发生歧化反应生成 H_2O_2 和 O_2 ,再由CAT将 H_2O_2 分解为 H_2O 和 O_2 ,从而彻底消除自由基;GSH-Px能广泛地还原过氧化物,阻断由过氧化物引发的自由基对机体的伤害^[19],这些重要的抗氧化酶和抗氧化物质相互协作,在细胞内构成动态的抗氧化网络系统,共同保护细胞免受氧化损伤。因此,抗氧化酶活性体现了细胞清除活性氧的能力。Shang等^[20]报道AA肉鸡的日粮中添加HFC,血清、肝脏和肌肉中SOD、CAT和GSH-Px的活性显著升高($P < 0.05$),MDA含量显著下降($P < 0.001$),王雪利用醇沉法从HFC中提取的粗多糖组分HP2能提高被 H_2O_2 损伤的PK(猪肾细胞)细胞活力^[3]。因此,本研究在化学抗氧化活性测定的基础上,通过建立 H_2O_2 诱导损伤的细胞模型检测HFCP对细胞氧化损伤的保护作用,进一步验证小刺猴头菌发酵浸膏多糖的抗氧化活性。结果证明HFC粗多糖和中性糖能引发细胞内的生理反应,增加抗氧化酶的活性,提高抗氧化防御能力,对氧化损伤的细胞具有保护作用。HFCP显示出的清除细胞内外过量自由基能力,对其发挥抗炎和抗肿瘤等功效是否有促进作用,还需要进一步研究予以阐明。

物质抗氧化活性的强弱与其化学组成和结构有关,因为活性基团的类型和数量决定了物质提供电子和活泼氢的能力。经过纯化的HFCP1-1与粗多糖HFCP1相比,其总糖含量相对提高、蛋白质含量降低,清除羟基自由基和超氧阴离子的能力增强,清除ABTS⁺和DPPH的能力减弱,因此推测这种化学组成的变化可能有利于对羟自由基和超氧阴离子的清除。此外,据报道,多糖的抗氧化性质还与其单糖组成有关,Li对双孢菇(*Agaricus bisporus* Shangshang)子实体酸性多糖的研究表明,丰富的单糖组成、Rha和Glc的增加可能在其维持抗氧化和抗衰老过程中发挥重要作用^[19]。本研究HFCP1比HFCP1-1增加了GlcUA和GalUA 2种单糖,提高了Glc和Gal含量,同时表现出更强的清除ABTS⁺和DPPH自由基的能力,以及调节抗氧化

酶活性和防止膜质过氧化的效果,因此,单糖组成的多样性和比例也影响了HFCP的抗氧化能力。但是多糖的抗氧化活性不是单一因素的作用,而是多个因素共同作用的结果^[15],因此对小刺猴头菌多糖抗氧化活性的构效关系还需要进行深入研究。

4 结 论

在本研究中,从HFC中获得粗多糖HFCP1和中性多糖HFCP1-1。二者都具有还原力,清除DPPH和ABTS⁺自由基的活性较高,清除羟基自由基和超氧阴离子活性次之。可以通过提高抗氧化酶(T-SOD、GSH-Px)活性,清除细胞活性氧,降低细胞MDA水平,提高 H_2O_2 氧化损伤的RAW264.7细胞活力。因此,HFCP和HFCP1-1具有较强的抗氧化活性,对 H_2O_2 氧化损伤的RAW264.7细胞具有保护作用。

参考文献 References

- [1] Li K, Yu M, Hu Y, Zang T, Xu X, Qu J. Three kinds of *Ganoderma lucidum* polysaccharides attenuate DDC-induced chronic pancreatitis in mice [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2016, 247(3):30-38
- [2] Ren Z, Li J, Xu N, Zhang J, Song X, Wang X, Gao Z, Jing H, Li S, Zhang C, Liu M, Zhao H, Jia L. Anti-hyperlipidemic and antioxidant effects of alkali-extractable mycelia polysaccharides by *Pleurotus eryngii* var *tuolensis* [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 175(11):282-292
- [3] 王雪. 小刺猴头液体深层发酵浸膏多糖的生物活性研究[D]. 长春:吉林农业大学, 2011
Wang X. Bioactivity of polysaccharides extracted from submerged fermentation of *H. caput-medusae* (Bull: Fr) Pers [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2011 (in Chinese)
- [4] 苏玲, 李雨婷, 宋慧, 吕金超. 小刺猴头菌液体深层发酵浸膏多糖HFP及HFA的抗肿瘤活性[J]. *中国生化药物杂志*, 2012, 33(1):20-22
Su L, Li Y T, Song H, Lv J C. Antitumor activity of polysaccharides from the liquid submerged fermentation extract of *H. caput-medusae* (Bull: Fr) Pers [J]. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*, 2012, 33(1):20-22 (in Chinese)
- [5] 董亚茹, 王瑶, 赵立艳, 陈梅香, 程抒劼, 陈贵堂. 金针菇多糖分离纯化及多糖铁复合物的制备[J]. *食品科技*, 2017, 42(1):208-214
Dong Y R, Wang Y, Zhao L Y, Chen X M, Cheng S J, Chen G T. Separation, purification of polysaccharides and preparation of polysaccharide-iron complex from *Flammulina*

- velutipes*[J]. *Food Science and Technology*, 2017, 42(1): 208-214(in Chinese)
- [6] Xia Z Q. Preparation of the oligosaccharides derived from *Flammulina velutipes* and their antioxidant activities [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 118(3):41-43
- [7] 董扬, 郝利民, 刘宇琪, 张黎明, 鲁吉珂, 江庆伍, 贾士儒. 不同破壁方法对灵芝孢子粗多糖抗氧化活性的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(17):101-106
Dong Y, Hao L M, Liu Y Q, Zhang L M, Lu J K, Jiang Q W, Jia S R. Effect of different cell wall disruption methods on in vitro antioxidant activity of crude polysaccharides *Ganoderma lucidum* spores[J]. *Food Science*, 2017, 38(17): 101-106 (in Chinese)
- [8] Kang O L, Ghani M, Hassan O, Rahmati S, Ramli N. Novel agaro-oligosaccharide production through enzymatic hydrolysis: Physicochemical properties and antioxidant activities[J]. *Food Hydrocolloids*, 2014, 42(12):304-308
- [9] Meng M, Cheng D, Han L R, Chen Y Y, Wang C L. Isolation, purification, structural analysis and immunostimulatory activity of water-soluble polysaccharides from *Griifola frondosa* fruiting body [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 157(2):1134-1143
- [10] 尚红梅, 王雪昭, 潘丹, 杨忠富, 马培东, 吴成扬. 干燥方式对菊苣叶多酚含量和抗氧化活性的影响[J]. 中国农业大学学报, 2015, 20(1):96-102
Shang H M, Wang X Z, Pan D, Yang Z F, Ma P D, Wu C Y. Effect of drying methods on polyphenol content and antioxidant activities of chicory leaf[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2015, 20(1):96-102 (in Chinese)
- [11] Feng K, Chen W, Sun L W, Liu J Z, Zhao Y X, Li L X, Wang Y X, Zhang W J. Optimization extraction, preliminary characterization and antioxidant activity in vitro of polysaccharides from *Stachys sieboldii* Miq tubers[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 125(7):45-52
- [12] Sun X B, Zhao C, Pan W, Wang J P, Wang W J. Carboxylate groups play a major role in antitumor activity of *Ganoderma applanatum* polysaccharide [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 123(6):283-287
- [13] Yang J J, Yang F, Yang H M, Wang G Y. Water-soluble polysaccharide isolated with alkali from the stem of *Physalis alkekengi* L.: Structural characterization and immunologic enhancement in DNA vaccine[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 121(5):248-253
- [14] Deng C, Sun Y Y, Fu H T, Zhang S X, Chen J H, Xu X. Antioxidant and immunostimulatory activities of polysaccharides extracted from *Tremella aurantialba* mycelia[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2016, 14(5):4857-4864
- [15] Liu Y, Zhang B, Ibrahim S A, Gao S S, Yang H, Huang W. Purification, characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Flammulina velutipes* residue [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 145(7):71-77
- [16] Zhang Z F, Lv G Y, Pan H J, Pandey S, He W Q, Fan L F. Antioxidant and hepatoprotective potential of endo-polysaccharides from *Hericium erinaceus* grown on tofu whey[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2012, 51(5):1140-1146
- [17] 何晋浙, 徐瑶阳, 孙培龙. 不同来源猴头菌营养成分及其多糖化学组成和抗氧化活性比较[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(1):134-140
He J Z, Xu Y Y, Sun P L. The comparison of nutrients, chemical composition and antioxidant activity of polysaccharides from six *Hericium erinaceus* specimens[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2016, 42(1):134-140 (in Chinese)
- [18] 曾维才, 石碧. 天然产物抗氧化活性的常见评价方法[J]. 化工进展, 2013, 32(6):1205-1213
Zeng W C, Shi B. Common methods of antioxidant activity evaluation for natural products: A review [J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2013, 32 (6): 1205-1213(in Chinese)
- [19] Li S S, Liu H, Wang W S, Wang X X, Zhang C, Zhang J J, Jing H J, Ren Z Z, Gao Z, Song X L, Jia L. Antioxidant and anti-aging effects of acidic-extractable polysaccharides by *Agaricus bisporus*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 106(1):1297-1306
- [20] Shang H M, Song H, Jiang Y Y, Ding G D, Xing Y L, Niu S L, Wu B, Wang L N. Influence of fermentation concentrate of *Hericium caput-medusae* (Bull. :Fr) Pers on performance, antioxidant status, and meat quality in broilers [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2014, 198(12): 166-175

责任编辑: 吕晓梅