

# 猴头菌子实体与菌丝体粗多糖理化性质及抗胃粘膜细胞氧化活性比较

肖旭朗<sup>1</sup>, 薛德冬<sup>2</sup>, 张薇<sup>3</sup>, 张洪贺<sup>1</sup>, 高阳<sup>1</sup>, 徐多多<sup>1</sup>, 王明星<sup>1\*</sup> (1. 长春中医药大学药学院, 吉林长春 130117; 2. 山东省东营市胜利医院药剂科, 山东东营 257000; 3. 长春银诺克药业有限公司, 吉林长春 130000)

**摘要** [目的]比较猴头菌子实体、菌丝体粗提物理化性质,以及2组粗多糖对胃粘膜上皮细胞氧化模型保护能力的差异。[方法]采用水提醇沉法提取粗多糖,用苯酚-浓硫酸法测定葡萄糖含量、间羟基联苯法测糖醛酸含量、BCA法测量蛋白质含量。每组分别加入一定浓度的含糖多糖的培养基,分别培养12、24、48 h后加入含过氧化氢培养基。用MTT法测细胞活性。[结果]猴头菌菌丝体、子实体粗多糖中葡萄糖含量分别为49.5%、44.5%,糖醛酸含量分别为22.01%、29.23%,蛋白质含量分别为27.69%、23.54%。菌丝体组12、24、48 h抑制率分别为75.1%、68.1%、16.9%;子实体组分别为70.2%、61.8%、16.7%。[结论]猴头菌菌丝体与子实体粗多糖中糖醛酸、葡萄糖、蛋白质含量相近。子实体粗多糖比菌丝体粗多糖抗氧化活性短时间内略强,长时间无差异。

**关键词** 猴头菌菌丝体;猴头菌子实体;理化性质;胃粘膜细胞;抗氧化

中图分类号 S567.3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2016)24-123-02

## Comparison of Physicochemical Properties between *Hericium Erinaceus* Mycelium and Fruit Body Crude Polysaccharides and Their Anti-oxidation Effects of Gastric Mucosal Cell

XIAO Xu-lang<sup>1</sup>, XUE De-dong<sup>2</sup>, ZHANG Wei<sup>3</sup>, WANG Ming-xing<sup>1\*</sup> et al (1. College of Pharmacy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun, Jilin 130117; 2. Pharmacy Department of Shengli Hospital Dongying City, Dongying, Shandong 257000; 3. Changchun Yinuoque Pharmaceutical Co., Ltd., Changchun, Jilin 130000)

**Abstract** [Objective] To compare the physicochemical properties of crude polysaccharides compare of *Hericium erinaceus* mycelium and fruit body, and to compare the differences of the effects of two crude extracts on oxidation protection ability of gastric mucosa epithelial cell. [Method] Crude polysaccharides were extracted by water-extraction and alcohol-precipitation method. Glucose content was detected by phenol-sulphuric acid method; uronic acid content was detected by m-hydroxydiphenyl method; and protein content was detected by BCA method. Culture medium containing certain content of polysaccharides compare was added into each group. After cultivated for 12, 24 and 48 h, culture medium containing hydrogen peroxide was added. Viability of cells was detected by MTT. [Result] Glucose contents in mycelium and fruit body were 49.5% and 44.5%, respectively. The uronic acid contents were 22.01% and 29.23%; protein contents were 27.69% and 23.54%. The inhibitory rates of mycelium group at 12, 24 and 48 h were 75.1%, 68.1% and 16.9%, respectively; those of fruit body were 70.2%, 61.8% and 16.7%, respectively. [Conclusion] In the crude polysaccharides of mycelium and fruit body of *Hericium erinaceus*, contents of uronic acid, glucose and protein are close. Crude polysaccharides of fruit body have stronger antioxidant activity than extracts of mycelium in short term, but there were no differences in long term.

**Key words** *Hericium Erinaceus* mycelium; *Hericium erinaceus* fruit body; Physicochemical properties; Gastric mucosal cell; Antioxidant

猴头菌(*Hericium Erinaceus* Pers.)属担子菌纲多孔菌目齿菌科猴头属,是一种珍贵的药食两用真菌,其性平、味甘,助消化、利五脏,自古以来被誉为“山珍”。猴头菌富含多种营养成分,据近现代研究发现,其活性成分主要有多糖、脂肪酸、甾醇、酚类等,现代医学证明其具有保肝护胃<sup>[1]</sup>、增强人体免疫力<sup>[2]</sup>、降血糖<sup>[3]</sup>、抗癌<sup>[4]</sup>、抗氧化<sup>[5]</sup>等功效。我国现有以猴头菌为原料治疗萎缩性胃炎及胃穿孔的药品,但制备工艺简单、有效成分不清楚、作用机理不明确。另外,猴头菌菌丝体与子实体均能入药,但两者成分的差异及其抗胃粘膜氧化活性差异目前尚无相关研究。为此,笔者采用水提醇沉法提取大分子化合物,用苯酚-浓硫酸法、间羟基联苯法、BCA法测定猴头菌子实体及菌丝体中粗多糖理化性质,用过氧化氢制造胃粘膜氧化应激模型,并用MTT法比较两者抗氧化能力,研究猴头菌子实体与菌丝体粗多糖理化性质及抗胃粘膜氧化活性差异。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 原材料。猴头菌子实体,购于北京同仁堂长春药店;

**基金项目** 国家自然科学基金项目(30873370)。

**作者简介** 肖旭朗(1990-),女,辽宁沈阳人,硕士研究生,研究方向:中药化学。\*通讯作者,副研究员,博士,硕士生导师,从事多糖的化学结构分析及药效机理研究。

**收稿日期** 2016-06-27

猴头菌菌丝体,产自山西康欣药业有限公司,国药准字H14023098;GES-1细胞来源于中科院上海细胞库。

1.1.2 主要试剂。DMEM-高糖、胎牛血清购于美国Gibco;标准品葡萄糖、葡萄糖醛酸购于美国Sigma;苯酚、硫酸,分析纯,北京化工厂;BCA试剂盒、MTT,上海碧云天生物试剂有限公司;H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,美国Fisher。

1.1.3 主要仪器。UV-752紫外分光光度计,上海第三分析仪器厂;MK-3酶标仪,美国Thermo;实验室专用超纯水机,Millipore公司;二氧化碳培养箱,日本三洋电器。

## 1.2 方法

### 1.2.1 猴头菌粗多糖提取。

1.2.1.1 子实体粗多糖提取。猴头菌干燥子实体切制,加5倍体积蒸馏水,煮沸持续3 h后滤出残渣,残渣再加入2倍体积水持续煮沸3 h,合并煎煮液后浓缩至粘稠,冷却后加95%乙醇至药液浓度为80%沉降8~12 h。取出沉淀冷冻干燥。

1.2.1.2 菌丝体粗多糖提取。猴头菌菌丝体粉末,加入3倍体积水于70℃水浴中温浸12 h,离心,将沉淀中加入1倍水于70℃水浴中温浸8 h合并温浸液,浓缩至粘稠,加95%乙醇使药液浓度到80%沉降8~12 h。取出沉淀冷冻干燥。

### 1.2.2 总糖含量测定。

1.2.2.1 标准曲线绘制。将葡萄糖标准品置于含五氧化二磷的保干器中干燥至恒重,精密称取10 mg,置于100 mL容

量瓶中,加蒸馏水定容,振荡摇匀配制成为  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  的葡萄糖对照品溶液。吸取葡萄糖对照品溶液  $0$ 、 $0.2$ 、 $0.4$ 、 $0.6$ 、 $0.8$ 、 $1.0 \text{ mL}$ ,分别置于试管中,向各试管中加蒸馏水补足到  $1.0 \text{ mL}$ ,再分别向其中加入  $5\%$  苯酚水溶液  $1.0 \text{ mL}$ ,涡流振荡,再加入浓硫酸  $5 \text{ mL}$ ,振荡均匀后冷却至室温,于  $490 \text{ nm}$  处测定吸光度值<sup>[6]</sup>。以葡萄糖质量为横坐标、吸光度值为纵坐标绘制标准曲线,计算线性回归方程。

**1.2.2.2 样品含量测定。**精密称取“1.2.1”中干燥后粉碎的2种样品各3份,每份约  $20.00 \text{ mg}$ ,置于  $100 \text{ mL}$  容量瓶中,加蒸馏水定容,依次吸取  $1 \text{ mL}$  于6支试管中,重复“1.2.2.1”操作测吸光度值,根据回归曲线计算总糖的含量。

**1.2.3 糖醛酸含量测定。**

**1.2.3.1 标准曲线绘制。**将葡萄糖醛酸标准品置于含五氧化二磷的保干器中干燥至恒重,精密称取  $25 \text{ mg}$ ,置于  $50 \text{ mL}$  容量瓶中,加蒸馏水定容,振荡摇匀后取出  $10 \text{ mL}$  定容至  $100 \text{ mL}$ ,配制成为  $50 \mu\text{g}/\text{mL}$  的葡萄糖醛酸对照品溶液。精密吸取葡萄糖对照品溶液  $0$ 、 $0.1$ 、 $0.2$ 、 $0.3$ 、 $0.4 \text{ mL}$ ,分别置于试管中,向各试管中加蒸馏水补足至  $0.4 \text{ mL}$ ,于冰水浴中加入  $2.4 \text{ mL}$   $0.0125 \text{ mol/L}$  的四硼酸钠-硫酸溶液,再置于沸水浴中加热  $5 \text{ min}$ ,取出迅速冷却至室温,加入  $0.15\%$  间羟基联苯 ( $0.5\%$   $\text{NaOH}$  溶液配制)  $40 \mu\text{L}$ ,立即混匀,于  $525 \text{ nm}$  处测定吸光度值<sup>[7]</sup>。以葡萄糖醛酸质量为横坐标、吸光度值为纵坐标绘制标准曲线,计算线性回归方程。

**1.2.3.2 样品含量测定。**精密称取“1.2.1”中2种样品各约  $25 \text{ mg}$ ,置于  $25 \text{ mL}$  容量瓶中,加蒸馏水定容,各取6支试管,每支精密吸取  $400 \mu\text{L}$ 。“1.2.3.1”方法测吸光度值,并根据标准曲线计算出实际含糖醛酸的含量。

**1.2.4 蛋白质含量测定。**

**1.2.4.1 标准曲线绘制。**取  $\text{BCA}$  试剂盒中标准品  $10 \mu\text{L}$ ,加  $90 \mu\text{L}$   $\text{PBS}$  使标准品终浓度为  $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ,在  $96$  孔板中分别加  $0$ 、 $1$ 、 $2$ 、 $8$ 、 $12$ 、 $16$ 、 $20 \mu\text{L}$ ,再在各孔中加入  $\text{PBS}$  补足至  $20 \mu\text{L}$ ,工作液  $\text{A}:\text{B}$  按  $1:50$  比例配置好混匀,每孔加入  $200 \mu\text{L}$ ,于  $60^\circ\text{C}$  反应  $30 \text{ min}$ ,在  $595 \text{ nm}$  处测吸光度值<sup>[7]</sup>。以标准品质量 ( $\mu\text{g}$ ) 为横坐标、吸光度值为纵坐标绘制标准曲线,计算线性回归方程。

**1.2.4.2 样品含量测定。**将“1.2.1”中2种样品精密称量各约  $50 \text{ mL}$ ,加蒸馏水定容至  $25 \text{ mL}$ ,配制成为  $2.0 \text{ mg}/\text{mL}$  溶液。以“1.2.4.1”方法测吸光度值,带入标准曲线计算出蛋白质含量。

**1.2.5 抗氧化活性试验。**

**1.2.5.1 样品配制。**将“1.2.1”中2种样品各用  $\text{DMEM}$ -高糖培养基配制成为  $1 \text{ mg}/\text{mL}$  的供试样品,在无菌环境中用  $0.22 \mu\text{m}$  滤器过滤待用。

**1.2.5.2 细胞准备。**收集对数生长期  $\text{GES}-1$  细胞,使细胞浓度为  $2 \times 10^4$  个/ $\text{mL}$  吹吸均匀,将细胞加入  $96$  孔板,每孔  $100 \mu\text{L}$ 。将细胞分为空白组、对照组、菌丝体组、子实体组。用无血清培养基培养  $24 \text{ h}$  后扣去培养基,空白组、对照组加入无血清培养基,给药组分别加入“1.2.5.1”供试样品  $100$

$\mu\text{L}$ 。分别培养  $12$ 、 $24$ 、 $48 \text{ h}$  后加入含  $100 \text{ nmol}/\text{mL}$  过氧化氢的  $\text{DMEM}$ -高糖培养基<sup>[8]</sup>  $100 \mu\text{L}$  培养  $4 \text{ h}$  后扣除培养基,每孔加入含  $10\%$   $\text{MTT}$  试剂  $100 \mu\text{L}$  的培养基,  $30 \text{ min}$  后扣除  $\text{MTT}$ ,加入  $150 \mu\text{L}$   $\text{DMSO}$  在  $490 \text{ nm}$  处测吸光度值,以空白组为对照,计算各处理组细胞抑制率,公式如下:

$$\text{抑制率} = \frac{OD_{\text{空白组}} - OD_{\text{处理组}}}{OD_{\text{空白组}}} \times 100\%$$

## 2 结果与分析

**2.1 总糖含量测定** 以葡萄糖质量为横坐标、吸光度为纵坐标得到线性回归方程为:  $y = 10.350x - 0.0023$  ( $R^2 = 0.9997$ ),根据样品吸光度计算菌丝体粗多糖中总糖占样品质量的  $49.5\%$ ,子实体中总糖含量为  $44.5\%$ 。

**2.2 糖醛酸含量测定** 以糖醛酸质量为横坐标、吸光度为纵坐标得到线性回归方程为:  $y = 28.960x - 0.0098$  ( $R^2 = 0.9984$ ),根据样品吸光度计算得知菌丝体粗多糖中糖醛酸含量为  $22.01\%$ ,子实体提取物中含  $29.23\%$  糖醛酸。

**2.3 蛋白质含量测定** 根据蛋白质质量及相应的吸光度值制作标准曲线,其线性回归方程为:  $y = 0.0358x + 0.1330$  ( $R^2 = 0.9993$ ),测得样品中蛋白质含量分别为菌丝体中含  $27.69\%$ 、子实体中含  $23.54\%$ 。

**2.4 抗氧化活性比较** 从图1可看出,  $12 \text{ h}$  时各组抑制率分别为过氧化氢组  $36.8\%$ 、菌丝体组  $75.1\%$ 、子实体组  $70.2\%$ ;  $24 \text{ h}$  时各组抑制率分别为过氧化氢组  $50.2\%$ 、菌丝体组  $68.1\%$ 、子实体组  $61.8\%$ ;  $48 \text{ h}$  时各组抑制率分别为过氧化氢组  $78.6\%$ 、菌丝体组  $16.9\%$ 、子实体组  $16.7\%$ 。

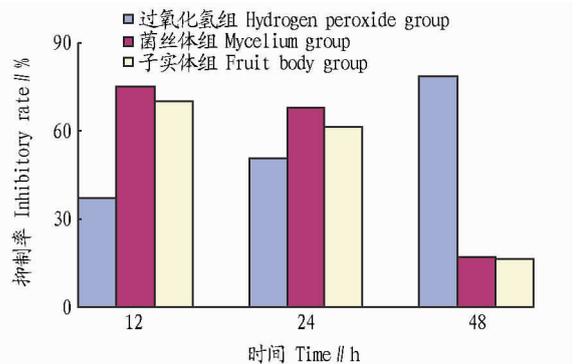


图1 不同时间时过氧化氢对细胞损伤情况

Fig. 1 Cell damage by hydrogen peroxide in different time periods

## 3 结论与讨论

该试验结果显示,猴头菌的菌丝体与子实体粗多糖中成分均以葡萄糖为主,说明其抗氧化活性成分主要为多糖,这与黄萍等<sup>[1]</sup>研究的结论一致。现代医学研究表明,众多疾病均与过氧化损伤有一定相关性,其中包括心血管疾病、神经系统疾病及消化系统疾病等<sup>[4]</sup>。猴头菌子实体与菌丝体多糖对胃粘膜上皮细胞 ( $\text{GES}-1$  细胞) 氧化模型的保护程度长时间内活性相同。猴头菌子实体生长周期长,对环境要求严格,生产成本较高,如果仅考虑药用价值,猴头菌菌丝体更加经济合理。菌丝体以发酵条件温和、生长条件较为宽泛,且

(下转第154页)

明 pH 为 4~11 时,菌丝能够生长但不同 pH 间差异明显,其中 pH 为 6~7 时菌丝生长速度相对较快,是 AG-3 融合群菌丝生长的适宜条件。这一结果与刘宝玉等<sup>[20]</sup>的研究结果一致,但相对于 Ritchie 等<sup>[19]</sup>报道的最适 pH 为 5.6 要略高一点。

在立枯丝核菌耐热性研究方面,国内外的相关报道较少。其中,刘志恒等<sup>[21-22]</sup>对甜瓜果腐病病原立枯丝核菌的生物学特性研究表明,在 10 min 热激条件下其致死温度为 50 ℃。台莲梅等<sup>[23]</sup>报道的马铃薯立枯丝核菌在 10 min 热激条件下的菌丝致死温度为 49 ℃。笔者等也针对菌丝的耐热性开展了初步研究,结果表明,菌丝在 50 ℃ 条件下热激 10 和 15 min 时菌丝仍可以生长,只是与对照相比非常缓慢,只有在热激 20 min 时 50 ℃ 才成为其致死温度。因此,该研究发现短暂热激在一定程度上有促进菌丝生长的作用,当时间过长或温度过高时会对菌丝生长产生严重的抑制作用。该研究结果在热激时间与前人报道存在差异,可能与试验菌株来源不同有关。因长期处于不同的生态环境,为了更好地适应不同的生态环境,不同融合群之间以及同一融合群的不同菌株间可能通过生理生化、表观遗传等方式造成它们在生物学特性方面的各种差异,这部分工作还有待于进一步研究。

#### 参考文献

- [1] JEGER M J, HIDE G A, VAN DEN BOOGERT P H J F, et al. Soilborne fungal pathogens of potato[J]. Potato research, 1996, 39: 437-469.
- [2] BANVILLE G B, CARLING D E. *Rhizoctonia* canker and black scurf [C]// STEVENSON W R, LORIA R, FRANC G, et al. Compendium of potato diseases. St Paul, MN: APS Press, 2001: 36-37.
- [3] LEAH T. Biology, epidemiology and management of *Rhizoctonia solani* on potato[J]. Journal of phytopathology, 2010, 158: 649-658.
- [4] 陈万利. 马铃薯黑痣病的研究进展[J]. 中国马铃薯, 2012, 26(1): 49-51.
- [5] 李乾坤, 孙顺娣, 李敏权. 马铃薯立枯丝核菌病的研究[J]. 中国马铃薯, 1988, 2(2): 79-84.
- [6] YANG Y G, ZHAO C, GUO Z J, et al. Anastomosis group and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* associated with stem canker and black scurf of

- potato in China[J]. European journal of plant pathology, 2015, 143(1): 99-111.
- [7] 谭宗九, 郝淑芝. 马铃薯丝核菌溃疡病及其防治[J]. 中国马铃薯, 2007, 21(2): 108-109.
- [8] 常来, 王文桥, 朱杰华. 北方一季作区马铃薯黑痣病的发生及防控策略[J]. 安徽农学通报, 2010, 16(7): 116-117.
- [9] CARLING D E, KUNINAGA S, BRAINARD K A. Hyphal anastomosis reactions, rDNA-internal transcribed spacer sequences, and virulence levels among sunsets of *Rhizoctonia solani* anastomosis group - 2 (AG - 2) and AG BI[J]. Phytopathology, 2002, 92: 43-50.
- [10] SHARON M, KUNINAGA S, HYAKUMACHI M, et al. Classification of *Rhizoctonia* spp. using rDNA - ITS sequence analysis supports the genetic basis of the classical anastomosis grouping[J]. Mycoscience, 2008, 49: 93-114.
- [11] 田晓燕, 蒙美莲, 张笑宇, 等. 马铃薯黑痣病菌菌丝融合群的鉴定[J]. 中国马铃薯, 2011, 25(5): 298-301.
- [12] 王宇, 杨志辉, 秦宇轩, 等. 马铃薯黑痣病菌 AG2-1 和 AG3 融合群分析[J]. 农业生物技术学报, 2013, 21(2): 230-237.
- [13] VIRTGEN C G, OLALDE-PORTUGAL V, CARLING D E. Anastomosis group of *Rhizoctonia solani* on potato in central Mexico and potential for biological and chemical control[J]. American journal of potato research, 2000, 77(4): 219-224.
- [14] 尤国信. 禾谷丝核菌生物学的研究 II: 温度和光照对生长的影响[J]. 信阳师范学院学报, 1986(2): 83-88.
- [15] 赵桂东, 朱海波, 周玉梅, 等. 大麦纹枯病菌与其轮作物丝核菌的生物学特性及致病力比较研究[J]. 大麦科学, 1999(1): 37-39.
- [16] 张穗. 丝核菌融合群种类、寄生专化性及与温度的关系[J]. 生态学杂志, 1999, 18(1): 9-14.
- [17] MOROMIZATO Z, ISHIZAKI F, TADARA K. The effects of phosphorus and magnesium on sclerotium formation in *Rhizoctonia solani* Kühn[J]. Annals of the phytopathological society of Japan, 1991, 57: 649-656.
- [18] ANGUIZ P, MARTIN C. Anastomosis groups, pathogenicity, and other characteristics of *Rhizoctonia solani* isolated from potatoes in Peru[J]. Plant disease, 1989, 73: 199-201.
- [19] RITCHIE F, BAIN R A, MCQUILKEN M P. Effects of nutrient status, temperature and pH on mycelial growth, sclerotial production and germination of *Rhizoctonia solani* from potato[J]. Journal of plant pathology, 2009, 91(3): 589-596.
- [20] 刘宝玉, 胡俊, 蒙美莲, 等. 马铃薯黑痣病病原菌分子鉴定及其生物学特性[J]. 植物保护学报, 2011, 38(4): 379-380.
- [21] 刘志恒, 侯悦, 胡积祥, 等. 辽宁省甜瓜果腐病病原菌鉴定及生物学特性初探[J]. 园艺学报, 2013, 40(1): 89-97.
- [22] 侯悦, 刘志恒, 曹友文, 等. 辽宁省甜瓜新病害: 果腐病病原菌生物学特性研究[J]. 中国蔬菜, 2013(6): 74-80.
- [23] 台莲梅, 赵巧兰, 靳学慧, 等. 马铃薯立枯丝核菌生物学特性研究[J]. 植物保护, 2015, 41(1): 89-92.

(上接第 124 页)

泛,且生产周期短、单次收获量较大等优势已被广泛关注。国内外很多药用菌类均已陆续发掘菌丝体的利用价值,猴头菌菌丝体的开发前景广阔,值得引起重视。

#### 参考文献

- [1] 黄萍, 罗珍, 郭重仪, 等. 猴头菇多糖胃粘膜保护作用研究[J]. 中药材, 2011, 34(10): 1588-1591.
- [2] 初云海, 刘雨. 猴头菇多糖对小鼠中性粒细胞吞噬和杀菌功能的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2010, 19(13): 1575-1577.
- [3] 杜志强, 任大明, 葛超, 等. 猴头菌丝多糖降血糖作用研究[J]. 生物技术, 2006, 16(6): 40-42.
- [4] LEE J S, HONC E K. *Hericium erinaceus* enhances doxorubicin - induced

- apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells[J]. Cancer letters, 2010, 297(2): 14-17.
- [5] XU H, WU P R, SHEN Z Y, et al. Chemical analysis of *Hericium erinaceum* polysaccharides and effect of the polysaccharides on derma antioxidant enzymes, MMP-1 and TIMP-1 activities[J]. Biological macromolecules, 2010, 47: 33-36.
- [6] LIU X H, CHEN Y G, LIN L, et al. Comparison of methods in determination of polysaccharide in *Lycium barbarum* L. [J]. Food science and technology, 2009, 34(9): 270-273.
- [7] WANG M X, GAO Y, XU D D, et al. Physicochemical properties and anti-gastric ulcer activity of *Hericium erinaceus* polysaccharide[J]. Food science and technology, 2015, 40(6): 224-227.
- [8] 崔丽金, 徐兴国. 石决明提取液对晶状体抗氧化能力的影响[J]. 医学研究杂志, 2014, 43(3): 22-24.