

六妹羊肚菌多糖部分理化性质及抗氧化活性研究

熊川¹, 罗强², 李强¹, 陈诚³, 陈祖琴¹, 黄文丽^{1*}

¹四川省农业科学院生物技术核技术研究所, 成都 610061; ²重庆医科大学附属第二医院 感染病分子重点实验室 肝炎研究所, 重庆 400010; ³四川省农业科学院植物保护研究所, 成都 610066

摘要: 分离纯化人工栽培的六妹羊肚菌子实体多糖, 对其结构和抗氧化活性进行研究。采用水提醇沉法提取六妹羊肚菌子实体多糖(MSP), 采用 DE-52 纤维素柱和 Sephadex G-100 进行多糖的分离纯化, 借助 HPGPC 和 HPLC 测定多糖分子量及单糖组成。通过 DPPH 自由基、羟自由基和超氧阴离子自由基的清除作用, 评估其体外抗氧化活性。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。结果显示, 六妹羊肚菌水溶性多糖平均分子量为 287 588 Da, 单糖组成为甘露糖, 葡萄糖和半乳糖, 占比约为 9: 1: 6。六妹羊肚菌多糖具有优良的自由基清除活性, 同时, 能够通过重塑 SOD、CAT、GSH-Px 等抗氧化酶系活性, 缓解 H₂O₂ 诱发的氧化压力的细胞损伤, 抑制 PC12 细胞凋亡。涉及通路为 Bax/Bcl 及 Caspase。六妹羊肚菌水溶性多糖具有优良的抗氧化活性, 表现出一定的神经保护作用。

关键词: 六妹羊肚菌; 多糖提取; PC12 细胞; 抗氧化; 神经保护

中图分类号: Q246

文献标识码: A

DOI: 10. 16333/j. 1001-6880. 2017. 7. 018

Physical and Chemical Properties of Polysaccharide Isolated from the Fruiting Bodies of *Morchella sextelata* and its Antioxidant Effect

XIONG Chuan¹, LUO Qiang², LI Qiang¹, CHEN Cheng³, CHEN Zu-qin¹, HUANG Wen-li^{1*}

¹Biotechnology and Nuclear Technology Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610061, China; ²Key Laboratory of Molecular Biology for Infectious Diseases (Ministry of Education), Institute for Viral Hepatitis, Department of Infectious Diseases, The Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; ³Institute of Plant Protection, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China

Abstract: This article mainly studied the extraction, purification, structure and antioxidant effects of a polysaccharide (MSP) purified from the fruiting bodies of *Morchella sextelata* M. Kuo. The polysaccharides of *M. sextelata* were extracted with boiling water and purified by DE-52 column and Sephadex G-100 column. The molecular weight, monosaccharide composition were analyzed by HPGPC and HPLC. In order to investigate the neuroprotective role of MSP, the antioxidant activity of MSP against the H₂O₂-induced cytotoxicity and the underlying preventative mechanisms in rat pheochromocytoma (PC12) cells were illustrated. It was shown that the molecular weight of MSP was 287 588 Da (287 588 Da), the monosaccharide composition of MSP was mainly composed of mannose, glucose and galactose, with a ratio near 9: 1: 6. MSP can considerably enhance the viability of PC12 cells exposure to H₂O₂ and increase the activities of antioxidant enzyme like SOD, CAT and GSH-Px. It inhibited cell apoptosis via reducing caspase-3 activation and down-regulation Bax/Bcl-2 ratio. Accordingly, MSP can be used as a promising neuroprotective compound for nervous diseases treatment.

Key words: *Morchella sextelata*; extraction of polysaccharide; PC-12 cell; antioxidant; neuroprotective

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, 其菌盖多有褶皱, 似羊肚状凹陷, 故名羊肚菌^[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。

世界范围内, 人们采食羊肚菌已有上千年的历史, 许多学者致力于对羊肚菌的功效评价研究。《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],现代科学研究则更精细的报道了羊肚菌抗氧化、抗肿瘤、调节免疫等功效的作用机制^[3-5]。受制于羊肚菌较短的发生时间及自然环境的影响,野生羊肚菌产量较低^[6]。因此,目前有关羊肚菌功效研究大都从羊肚菌菌丝体及其发酵产物入手,少有关于羊肚菌子实体功效的报道。近年来,羊肚菌人工栽培研究进展迅速,中国学者采用大田覆土栽培,已成功栽培出梯棱羊肚菌(*Morchella importuna* M. Kuo *et al.*)、七妹羊肚菌(*M. septimelata* M. Kuo)及六妹羊肚菌(*M. sextelata* M. Kuo)等品种^[7],获得经济价值的同时也使得羊肚菌子实体产量较为充足,其功效有待验证。

氧化反应贯穿许多生命活动,为生物体提供能量。通常情况下,生物体氧化反应产生的中间氧化性物质能够被体内抗氧化系统清除,维持一种氧化与抗氧化的动态平衡,而一旦平衡被打破(环境、疾病、药物等因素),就会形成氧化压力(oxidative stress)。研究发现超过100种人类疾病与氧化压力有关,氧化压力介导的细胞损伤可直接诱导帕金森综合征、阿尔茨海默病等神经退行性疾病(neurodegenerative diseases)^[8,9]。真菌多糖具有优良的抗氧化活性,能够有效缓解氧化压力^[10],延缓神经退行性疾病发生,对疾病预防治疗具有一定的意义。

基于以上分析,本实验收集人工栽培的六妹羊肚菌子实体,通过水提醇沉法获得六妹羊肚菌多糖(MSP),采用高效凝胶渗透色谱(HPGPC)完成MSP的分子量测定,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,为人工栽培的羊肚菌保健功效的开发提供数据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大鼠嗜铬瘤细胞(PC-12)株由成都医学院王建东老师惠赠。胎牛血清、马血清购自Gibco公司;DE-52和Sephadex G-100购自Whatman公司;DP-PH、TCA及MTT购自Sigma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。其余试剂均为分析纯。

1.2 制备六妹羊肚菌多糖(MSP)

1.2.1 粗多糖提取

采用水提醇沉法获得MSP^[11]。新鲜采集的六妹羊肚菌于37℃下烘干。取200g六妹羊肚菌子实体经粉碎后,加入1L95%乙醇脱脂过夜,离心去除乙醇,样品自然干燥,加入20倍体积纯水,95℃水浴6h,反复提取3次,6000rpm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6000rpm离心收集沉淀,沉淀用适量纯水溶解,加入5倍体积Savage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6000rpm离心,除去残留Savage试剂,减压蒸馏浓缩与醇沉,收集沉淀溶解后经7500kD分子量透析袋流水透析3d,冷冻干燥得到粗多糖。

1.2.2 粗多糖分离纯化

称取5g粗多糖样品,溶解于50mL蒸馏水中,离心除去沉淀,上清液加到DE-52纤维素柱(4.5cm×80.0cm)分离^[12],洗脱液为0.5mol/LNaCl,洗脱速度为1.0mL/min,每管收集3mL,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MSP的半纯品。称取MSP的半纯品1g,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(2.6cm×100cm)进行分离,用0.1mol/LNaCl溶液洗脱,控制洗脱速度为1.0mL/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MSP纯品。

1.3 六妹羊肚菌多糖(MSP)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MSP的分子量测定^[13],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MSP单糖组成。称取20mgMSP置于具塞试管中,加入2mol/L硫酸溶液2mL,封管后于110℃水解6h,获得MSP水解样品。用4mol/L氢氧化钠水溶液中和至pH值为7.0,并以纯化水稀释到5mL,离心,取上清液待衍生化。将单糖对照品、混合单糖对照品溶液及MSP水解样品液各取200μL分别置于1.5mL离心管中,然后向离心管中依次加入0.5mol/LPMP甲醇溶液100μL和0.3mol/L氢氧化钠溶液100μL,混匀后置于70℃水浴中加热反应30min,取出室温

放置 10 min;再加入 0.3 mol/L 盐酸溶液 100 μ L 中和,混匀后用等体积乙酸异戊酯萃取,振摇,离心 10 min,小心弃去有机层,再用乙酸异戊酯萃取 1 次,再加等体积的氯仿,振摇,离心 10 min,弃去氯仿相得到上层。将水相定容至 1.0 mL,过 0.45 μ m 微孔滤膜后供 HPLC 进样分析。色谱流动相为 0.1 mol/L 磷酸盐 (KH_2PO_4 -NaOH, pH 6.8) 缓冲液-乙腈 (84:16),柱温预设 30 $^{\circ}\text{C}$,检测波长 250 nm,体积流量 0.8 mL/min,进样体积 10 μ L。

1.4 MSP 自由基清除能力测定

依据 Oktay 等^[14]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。样品 (40 mg) 溶解在 10 mL 去离子水中,稀释成合适浓度 (0~5 mg/mL)。采用 Vc 作为阳性对照,同一测定重复 3 次。

1.5 MSP 对 PC12 细胞抗氧化酶系的影响

取对数生长期 PC12 细胞以密度 6×10^5 个/孔完成 6 孔板接种,培养 16 h 后,弃去培养基,添加 80 μ mol/L H_2O_2 处理 30 min,之后弃去 H_2O_2 ,PBS 清洗 2 遍,加入不同浓度的 MSP 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^[15]。

1.6 MSP 对 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞的凋亡的影响

建模方法同 1.5,凋亡细胞测定依照测定试剂盒完成 (Invitrogen, 中国)。依据说明书,采用 Alexa Fluor1 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。

1.7 MSP 神经保护作用通路探索

采用实时定量荧光 PCR 完成 Bax 和 Bcl-2 基因的定量分析^[16]。细胞处理方法同 1.5,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'-TGCAGCTGACTGGACATCTC-3';内参基因选择 GAPDH: F: 5'-CACTCACGGCAAATTC AACGGCA-3', R: 5'-GACTC-CACGACATACTCAGCAC-3'。应用 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒 (Selleckchem, 美国),完成 30 次循环。

1.8 Caspase-3 活性测定

细胞处理方法同 1.5,采用 Caspase-3 Activity Assay Kit 完成测定 (碧云天, 中国)。收集 PC12 细胞,加入细胞裂解液,冰上裂解 4 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。

1.9 数据处理及统计

各组实验数据以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,应用统计软件 SPSS17.0 进行分析,多组均数比较采用 ANOVA 检验, $P < 0.05$ 视为显著性差异。

2 结果与分析

2.1 分离纯化结果

200 g 六妹羊肚菌子实体热水浸提得到六妹羊肚菌粗多糖 24.6 g,得率为 12.3%。取其中 5 g 六妹羊肚菌粗多糖经过 DE-52 纤维素柱 (4.5 cm \times 80 cm) 分离,在 0.5 mol/L NaCl 洗脱时得到 MSP 半纯品 1 244 mg,再经过分子筛柱 Sephadex G-100 (4.5 cm \times 100 cm) 分离纯化过后,得到 MSP 纯品 368 mg, MSP 纯品得率 0.91%。经 HPGPC 测定, MSP 平均分子量 287 588 Da,经 PMP 柱前衍生分析, MSP 由甘露糖,葡萄糖及半乳糖组成,占比约为 9:1:6 (图 1)。

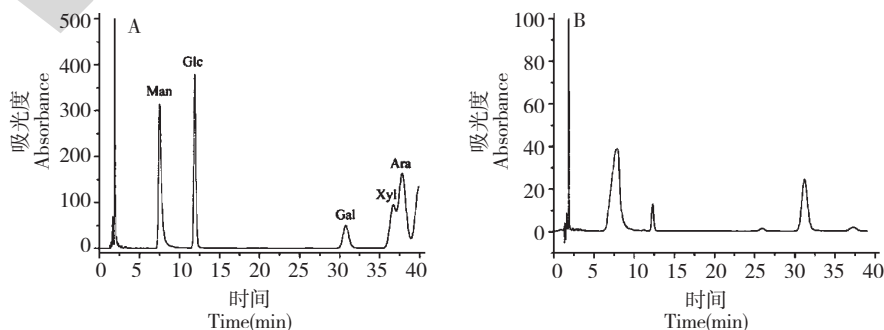


图 1 5 种单糖-PMP 衍生物 (A) 及 MSP-PMP 衍生物 (B) 的 HPLC 色谱图

2.2 MSP 自由基清除效果

DPPH 是一种稳定的用于测定各种样品的自由基清除能力的试剂,在样品的抗氧化能力作用下,通过肉眼即可直接观察到颜色由紫色到黄色的变化。MSP 自由基清除能力测定结果如图 2A 所示,MSP 的 IC_{50} 值约为 1.68 mg/mL 且具有剂量依赖关系,具有较显著的抗氧化能力,但是低于阳性对照 Vc。过量的羟自由基很容易导致机体组织的损伤或者细胞的死亡,因此,羟自由基的清除对于活的有机体是一

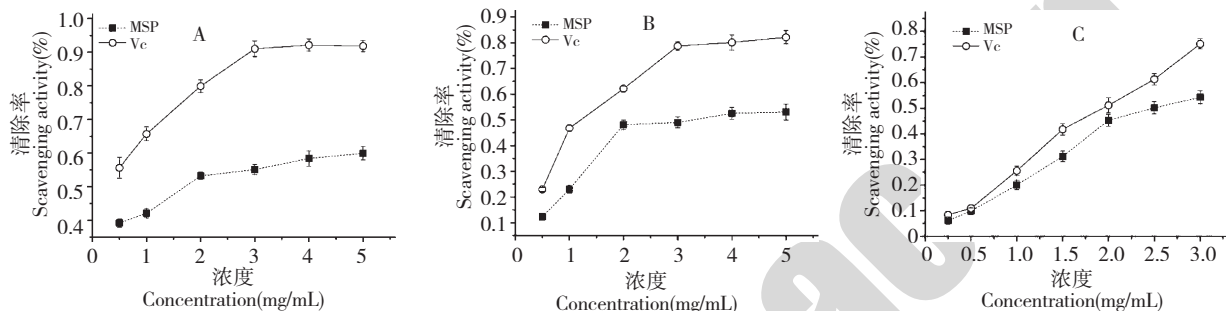


图2 MSP 清除 DPPH 自由基 (A)、羟自由基 (B) 及超氧阴离子自由基 (C) 的活性

Fig. 2 Scavenging activity of MSP on DPPH radical (A), hydroxyl radical (B) and superoxide radical (C)

2.3 MSP 对 H_2O_2 胁迫损伤的 PC12 细胞的保护作用

80 mM H_2O_2 处理 PC12 细胞 30 min 后,PC12 细胞出现皱缩,细胞内空泡明显增多,细胞存活率为 $49.14 \pm 2.02\%$ (图 3)。添加不同浓度 MSP 处理细胞后,细胞存活率上升,且随着剂量的增加其存活率升高,给以 200 $\mu\text{g/mL}$ MSP 处理后,细胞存活率达到 $80.56 \pm 4.02\%$,继续增大 MSP 浓度,细胞存活率没有明显提高。可见 MSP 对于 H_2O_2 胁迫损伤的 PC12 细胞有一定的保护作用。

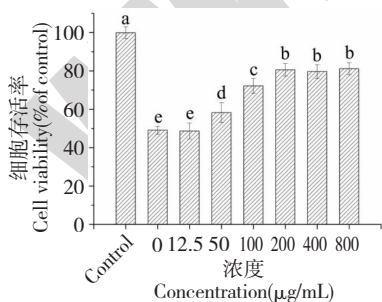


图3 MSP 对 PC12 细胞的保护作用

Fig. 3 Cytoprotective activity of MSP

注:数值为 3 个重复的平均值 \pm 标准误,不同字母表示 5% 差异显著性水平

Note: Data were expressed as mean \pm SD ($n = 3$). Values with the different superscript letters indicated significantly different from each other at $P < 0.05$ level

种重要的保护作用。如图 2B 所示,MSP 的浓度与抗氧化能力呈正相关性,MSP 的 IC_{50} 值约为 2.45 mg/mL,可见其显著的羟自由基的清除能力,且在低剂量时与同等剂量的阳性对照 Vc 非常接近,但高剂量下要明显弱于同等剂量的 Vc。如图 2C 可见 MSP 不同浓度时,其对超氧阴离子的清除能力,在上述浓度下 MSP 的超氧阴离子清除能力,随剂量的增加而增加, IC_{50} 值约为 3.25 mg/mL。

2.4 MSP 对细胞内抗氧化酶系的重塑作用

80 mM H_2O_2 处理 PC12 细胞 30 min 后,细胞内的抗氧化酶系活性明显降低,SOD(图 4A)、CAT(图 4B)及 GSH-Px(图 4C)依次递减为 $51.7 \pm 4.9\%$ 、 $44.2 \pm 3.1\%$ 和 $50.8 \pm 2.7\%$,通过不同浓度的 MSP 处理细胞后,细胞内抗氧化酶系活性明显升高,给以 400 $\mu\text{g/mL}$ MSP 处理后,抗氧化酶系依次上升到 $78.88 \pm 2.9\%$ 、 $61.82 \pm 6.8\%$ 和 $82.28 \pm 6.4\%$,与未添加 MSP 的试验组相比,差异显著。可见 MSP 对细胞内抗氧化酶系具有重塑作用,以此缓解 H_2O_2 介导的氧化压力对细胞的损伤,具有一定的神经保护功能。

2.5 MSP 神经保护作用机制探索

如图 5 所示,0.8 mM H_2O_2 处理 30 min 后,PC12 细胞的凋亡率和坏死率升至 $18.9 \pm 1.6\%$ 和 $9.3 \pm 1.5\%$,分别给以 100 $\mu\text{g/mL}$ 和 200 $\mu\text{g/mL}$ MSP 处理,PC12 细胞凋亡率下降至 $14.8 \pm 2.1\%$ 和 $9.6 \pm 1.8\%$,皆与对照组 ($2.7 \pm 0.2\%$) 存在显著性差异,但 MSP 对于 PC12 细胞的坏死率则没有明显影响。

图 6A 展示了 MSP 对于细胞 Bcl-2 及 Bax 基因表达的影响。0.8 mM H_2O_2 处理后,Bax mRNA 的表达量上升至 $188.6 \pm 12.9\%$,而 Bcl-2 mRNA 的表

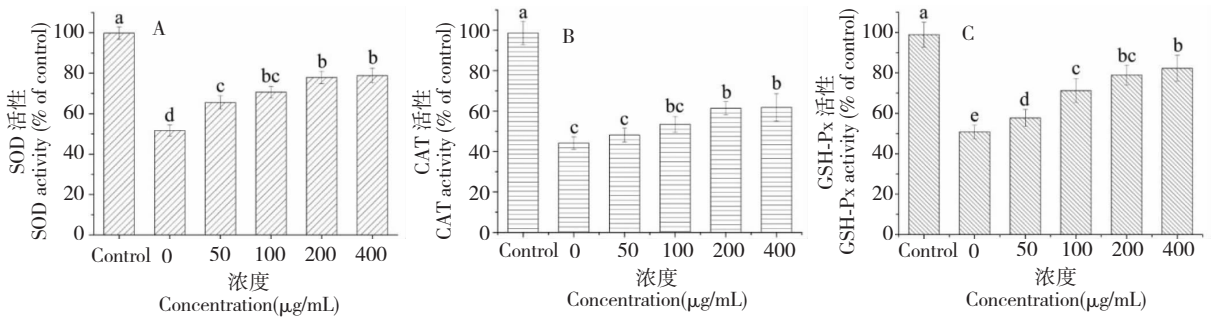


图4 MSP对细胞内抗氧化酶系SOD(A)、CAT(B)及GSH-Px(C)的重塑作用

Fig. 4 Remodeling effects of MSP on endogenous antioxidant enzymes SOD (A), CAT (B) and GSH-Px (C) in H_2O_2 -induced PC12 cells

注:数值为3个重复的平均值 \pm 标准误,不同字母表示组内5%差异显著性水平

Note: Data were expressed as mean \pm SD ($n=3$). Values with the different superscript letters indicated significantly different from each other in the same group at $P < 0.05$ level

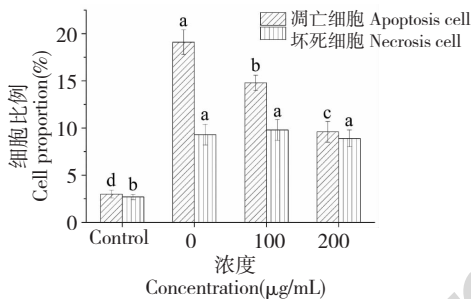
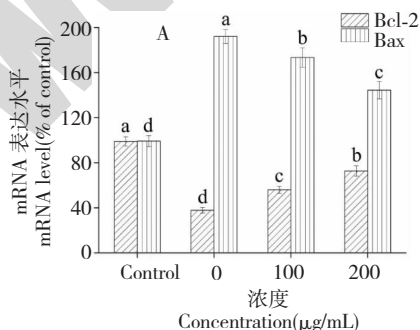


图5 MSP对 H_2O_2 介导的细胞凋亡的影响

Fig. 5 Effect of MSP on apoptosis caused by H_2O_2 in PC12 cells

注:数值为3个重复的平均值 \pm 标准误,相同阴影的不同字母表示同组内5%差异显著性水平

Note: Data were expressed as mean \pm SD ($n=3$). Values with the different superscript letters indicated significantly different from each other in the same group at $P < 0.05$ level



达量则下降至 $37.7 \pm 3\%$ 。MSP 处理后, Bcl-2 mRNA 的表达量显著上升, 达到 $73 \pm 3.5\%$, Bax mRNA 的表达量则下降至 $144.2 \pm 7.3\%$ 。这一证据表明, MSP 能够通过下调 Bax/Bcl-2 比率, 从而抑制 H_2O_2 介导的细胞凋亡。

图6B测定了细胞Caspases-3的活性。0.8 mM H_2O_2 处理后, 细胞内Caspases-3活性显著升高, 到达 $212.5 \pm 9.3\%$, 通过不同浓度的MSP处理后, Caspases-3活性显著降低, 分别为 $199.4 \pm 7.8\%$ (100 $\mu\text{g/mL}$ MSP) 和 $161.9 \pm 5.1\%$ (200 $\mu\text{g/mL}$ MSP)。

3 讨论与结论

氧化压力影响人体众多生理过程, DNA 突变, 衰老, 动脉粥样硬化, 炎症, 神经退行性疾病及肿瘤

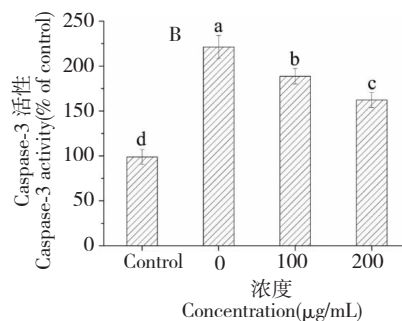


图6 MSP对 H_2O_2 介导PC12细胞损伤的保护作用机制 A. mRNA表达水平; B. Caspase活性

Fig. 6 Protective mechanism of MSP on H_2O_2 -mediated cell injury. A. mRNA level; B. Caspase activity

注:数值为3个重复的平均值 \pm 标准误,不同字母表示组内5%差异显著性水平

Note: Data were expressed as mean \pm SD ($n=3$). Values with the different superscript letters indicated significantly different from each other in the same group at $P < 0.05$ level

病变等都涉及氧化压力^[17]。因此,缓解氧化压力介导的氧化损伤对于预防疾病的发生具有重要意义。氧化压力可由多种自由基产生,包括羟自由基,超氧阴离子自由基等,基于此,本文首先讨论了 MSP 对于自由基的清除能力。MSP 可有效清除 DPPH 自由基,IC₅₀为 1.68 mg/mL,近似于块菌多糖 TIP-1 (IC₅₀为 1.72 mg/mL)^[18],优于松茸多糖 TMP-A (IC₅₀为 2.2 mg/mL)^[12],由此可见,MSP 具有较强的 DPPH 自由基清除能力。

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。生物体会在生命活动中产生足量的抗氧化酶,以此平衡生命活动中产生的自由基,但是外界条件的改变通常会打乱这一平衡,使得机体清除自由基能力下降,累积形成氧化压力^[19]。这种情况下,需要外源性抗氧化剂发挥作用。MSP 表现出优良的抗氧化作用,一方面,其自身具有较强的自由基清除能力,另一方面,MSP 能够高效重塑生物体内源性抗氧化酶系,显著提高 SOD、CAT、GSH-Px 等活性。通过以上两方面的作用,实现基于抗氧化的神经保护作用。

已有研究表明,H₂O₂介导的氧化损伤能够促使 PC12 及原代培养的神经细胞完成细胞凋亡。细胞凋亡又称程序性细胞死亡(programed cell death, PCD),是由基因控制的细胞自主的有序死亡。细胞凋亡中最经典的途径之一为线粒体途径(内途径),这一途径中最重要的调节基因是 Bax/Bcl-2,通过促进 Bax 表达及降低 Bcl-2 表达,能够调节线粒体膜电位,减少活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生,缓解氧化压力。此外,作为凋亡的核心效应器,Caspase 酶系在细胞凋亡中扮演重要角色,例如细胞色素 C 可以与 Apaf-1 聚合,募集 pro-Caspase-9 形成凋亡小体,介导 Caspase-9 的分裂和激活,Caspase-9 进一步分裂和激活下游的 Caspase-3^[20],后者发挥细胞凋亡过程的效应器的作用。活性氧能够激活 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,MSP 既能够抑制 Caspase-3 活性,还能够降低 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。

基于以上分析,MSP 通过缓解氧化压力来抑制 H₂O₂介导的 PC12 细胞凋亡,其作用可总结如下:1、

MSP 具有优良的自由基清除能力,是一种理想的抗氧化补充剂;2、通过重塑生物体内源性抗氧化酶系(SOD、CAT、GSH-Px)等,能够抵御外界因素造成的氧化压力累积。3、通过抑制 Caspase-3 活性,同时降低 Bax/Bcl-2 比值,实现抑制凋亡的作用。

目前,中国羊肚菌人工栽培研究进展巨大,栽培规模迅速扩大,羊肚菌子实体产量逐年增加,基于羊肚菌子实体的功效研究有待加强,作为四川省的主要栽培品种之一,六妹羊肚菌具有优良的抗氧化作用,未来可以作为一种具有神经保护作用的功能食品开发。

参考文献

- Masaphy S. Biotechnology of morel mushrooms: successful fruiting body formation and development in a soilless system. *Biotechnol Lett*, 2010, 32:1523-1527.
- Li SZ (李时珍). Bencao Gangmu (本草纲目). In: Liu HR (ed.) Compendium of Materia Medica. Beijing: People's Medical Publishing House, 1982. 1718.
- Nitha B, Fijesh PV, Janardhanan KK. Hepatoprotective activity of cultured mycelium of Morel mushroom, *Morchella esculenta*. *Exp Toxicol Pathol*, 2013, 65:105-112.
- 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*. *Biotechnol Lett*, 2013, 35(1):1-10.
- Fu L, Wang Y, Wang J, et al. Evaluation of the antioxidant activity of extracellular polysaccharides from *Morchella esculenta*. *Food Funct*, 2013, 4:871-879.
- Du XH (杜慧慧), Zhao Q (赵琪), Yang ZL (杨祝良). Diversity, evolutionary history and cultivation of morels: a review. *Mycosystema* (菌物学报), 2014, 33:183-197.
- He PX (何培新), Liu W (刘伟), Cai YL (蔡英丽), et al. Strain identification and phylogenetic analysis of cultivated and wild strains of *Morchella* belonging to Elata Clade in China. *J. Zhengzhou Univ Light Ind, Nat Sci* (郑州轻工业学院学报, 自科版), 2015, 30(3-4):26-29.
- Mates JM, Segura JA, Alonso FJ, et al. Oxidative stress in apoptosis and cancer: an update. *Arch Toxicol*, 2012, 86:1649-1665.
- Niranjan R. The role of inflammatory and oxidative stress mechanisms in the pathogenesis of Parkinson's disease: focus on astrocytes. *Mol Neurobiol*, 2014, 49(1):28-38.
- Ling SS, Murali ND, Pamela D, et al. Potentiation of neurotogenic activity of medicinal mushrooms in rat pheochromocytoma cells. *BMC Complem Altern Med*, 2013, 13:157-167.