

蛹虫草水提取物及其对 HaCaT 细胞氧化损伤的保护作用

孙彦庆¹, 张京良², 朱宗敏¹, 江晓路², 尚丽丽¹, 宗雯雯^{2*}

1 青岛黛优佳生物科技有限公司, 山东 青岛 266100

2 青岛海洋生物医药研究院, 山东 青岛 266100

摘要: 本研究对蛹虫草水提取物(CME)的主要活性成分及抗氧化活性进行分析, 并建立 H₂O₂ 诱导的 HaCaT 氧化损伤模型, 探究其对皮肤细胞氧化损伤的保护作用。结果显示, CME 中富含多糖、多酚、腺苷、虫草素、N⁶-(2-羟乙基)腺苷等活性物质, 且能够有效清除 DPPH、ABTS 和·OH 自由基, IC₅₀ 分别为 0.63、2.97 和 3.24 mg/mL, 提示其具有良好的抗氧化能力; 在 H₂O₂ 诱导的 HaCaT 细胞中, CME 随浓度递增而显著地提高细胞活力, 其中 50 μg/mL CME 预处理可使 HaCaT 细胞存活率由 55.39% 提高到 83.90%; 分析其作用机制, CME 可能通过上调细胞内 SOD、GSH-Px 和 CAT 等抗氧化酶活力, 减少细胞内丙二醛(MDA)含量, 极显著地降低细胞内活性氧(ROS)水平 ($P < 0.01$), 从而平衡氧化和抗氧化体系降低氧化损害。因此, CME 具有保护皮肤细胞氧化损伤的作用, 提示其具有成为天然抗氧化剂应用于化妆品等领域的潜力。

关键词: 蛹虫草水提取物; 过氧化氢; 氧化损伤; 抗氧化

[引用本文]

孙彦庆, 张京良, 朱宗敏, 江晓路, 尚丽丽, 宗雯雯, 2025. 蛹虫草水提取物及其对 HaCaT 细胞氧化损伤的保护作用. 菌物学报, 44(4): 240280

Sun YQ, Zhang JL, Zhu ZM, Jiang XL, Shang LL, Zong WW, 2025. *Cordyceps militaris* aqueous extract and its protective effects against oxidative damage in HaCaT cells. Mycosystema, 44(4): 240280

*Corresponding author. E-mail: 17864272822@163.com

ORCID: ZONG Wenwen (0000-0001-6203-2284)

Received: 2024-10-10; Accepted: 2024-11-24

Cordyceps militaris aqueous extract and its protective effects against oxidative damage in HaCaT cells

SUN Yanqing¹, ZHANG Jingliang², ZHU Zongmin¹, JIANG Xiaolu², SHANG Lili¹, ZONG Wenwen^{2*}

1 Qingdao Drenergy Biotechnology CO., LTD., Qingdao 266100, Shandong, China

2 Qingdao Marine Biomedical Research Institute, Qingdao 266100, Shandong, China

Abstract: The main active components and antioxidant activities of *Cordyceps militaris* aqueous extract (CME) were analyzed, and protective effects of the extract on skin cell oxidative damage in HaCaT cell model induced by hydrogen peroxide were evaluated. The results showed that CME was rich in polysaccharides, polyphenols, adenosine, cordycepin, N⁶-(2-hydroxyethyl) adenosine and other active substances, and could scavenge DPPH free radical, ABTS free radical and ·OH free radical, with IC₅₀ values of 0.63, 2.97 and 3.24 mg/mL, respectively, indicating the CME possessed effective antioxidant activity. The CME could improve HaCaT cell survival rate through concentration-dependent manner, and the cell viability was increased from 55.39% to 83.90% at the concentration of 50 µg/mL. CME could reduce the intracellular malondialdehyde (MDA) content and significantly decrease the intracellular reactive oxygen species (ROS) level by up-regulating the activity of antioxidant enzymes such as SOD, GSH-Px and CAT ($P < 0.01$), thereby balancing oxidation and antioxidant systems and reducing oxidative damage. This study comes to the conclusion that CME can protect skin cell avoiding oxidative damage of hydrogen peroxide, suggesting that it has the potential to be used as a natural antioxidant in cosmetics and other fields.

Keywords: *Cordyceps militaris* aqueous extract; hydrogen peroxide; oxidative damage; antioxidant

蛹虫草 *Cordyceps militaris* (L.) Fr., 又称“北虫草”，是一种独特而珍贵的食药两用真菌，具有抗氧化、抗衰老、抗肿瘤、抗炎、保肝和免疫调节等多种药理活性(戴玉成和杨祝良 2008; Wu *et al.* 2019; Ren *et al.* 2020)，并已被我国原卫生部批准为新资源食品，具有重要的研究开发价值。近年来，蛹虫草的抗氧化活性已得到国内外学者的广泛验证和认可。研究表明，蛹虫草具有多种自由基清除能力(Yu *et al.* 2007)，并且能够有效降低细胞内活性氧水平(叶章正等 2012)。同时，蛹虫草及相关产物还能够提升抗氧化酶活性，降低丙二醛(MDA)含量，起到抵御氧化应激损伤的作用(Liu *et al.* 2016; Zhang *et al.* 2019)。因此，蛹虫草已经成为天然抗氧化功效产物筛选

的重要真菌资源，在食品、医药以及化妆品领域均受到广泛关注，并表现出较好的潜力。

随着社会整体生活水平的提高，皮肤防护问题逐渐成为人们关注的焦点。当皮肤受到环境污染、紫外线等不利刺激时，会产生大量活性氧(reactive oxygen species, ROS)从而使细胞内源性抗氧化系统失衡，引起氧化应激，进而诱发炎症、皮肤肿瘤和异常衰老等皮肤问题(Kang *et al.* 2014; Kammeyer & Luiten 2015; Kim *et al.* 2016)。因此，及时清除自由基，提高机体抗氧化能力成为预防和治疗细胞氧化应激的理想策略。近年来，天然提取物对皮肤氧化损伤的保护作用越来越受到研究人员的关注。Abate *et al.* (2020)研究发现灵芝提取物可诱导人永生化角质形成细胞

(HaCaT)增殖,并增加周期蛋白依赖性激酶 CDK2 和 CDK6 的表达,保护 HaCaT 细胞免受 H₂O₂ 诱导细胞毒性。丁亚男等(2024)通过 HaCaT 细胞氧化损伤模型研究油橄榄叶提取物抗氧化活性,发现其能够有效清除细胞内自由基,明显改善 HaCaT 细胞氧化应激状态。目前,有关蛹虫草活性的研究多集中于体外抗氧化和肝损伤保护等方面,对蛹虫草保护皮肤细胞氧化损伤作用的研究较少。

因此,本研究以蛹虫草水提物为研究对象,表征其主要活性成分,并以 H₂O₂ 诱导氧化损伤的 HaCaT 细胞为模型,探究蛹虫草水提物抗氧化能力以及对皮肤细胞氧化损伤的保护作用,为其在功效化妆品方向的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 试验材料

蛹虫草子实体,购自沈阳聚鑫生物有限公司,栽培基质为大米,并经中国海洋大学江晓路教授鉴定为蛹虫草。子实体 60 °C 烘干至恒重,粉碎过 60 目筛,阴凉处密封保存备用。

人永生化角质形成细胞(HaCaT),购自南京科佰生物科技有限公司。

1.1.2 主要试剂

DMEM 高糖培养基、血清、胰酶,普诺赛生命科技有限公司;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS),Sigma 公司;水杨酸、无水乙醇、甲醇、硫酸亚铁、30%过氧化氢均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司;蛋白质定量(BCA)测试盒、活性氧(ROS)测试盒、总超氧化物歧化酶(T-SOD)测试盒、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)测试盒、过氧化氢酶(CAT)测试盒、丙二醛(MDA)测试盒,南京建成生物科技公司。

1.1.3 主要仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪(安捷伦公

司);TECAN Infinite E Plex 酶标仪(上海帝肯贸易有限公司);HF90 型二氧化碳培养箱(力康仪器有限公司);HCB-900V 型超净台(青岛海尔生物医疗有限公司);DXS-2 型普通倒置显微镜(上海缔伦光学仪器有限公司)。

1.2 蛹虫草水提物的制备

称取一定量的蛹虫草粉末,按料液比 1:10 (质量体积比)于沸水中浸提 40 min 后,4 000 r/min 离心 10 min 取上清,重复两次,合并上清液,浓缩、冻干得蛹虫草水提物(*Cordyceps militaris* aqueous extract, CME)。

1.3 CME 主要活性成分分析

1.3.1 多糖含量及单糖组成

多糖的提取:精密称取 CME 粉末 1.0 g,用水溶解并定容至 50 mL 容量瓶中,向样品溶液中加入 3 倍体积 95%乙醇,4 °C 静置 12 h 后,离心弃去上清,沉淀经除蛋白、60 °C 烘干即得蛹虫草多糖。

多糖含量测定:将得到的多糖样品加水定容到 100 mL,根据 GB/T 15672-2009 以苯酚-硫酸法测定多糖含量,以葡萄糖浓度为横坐标,波长 490 nm 下吸光值为纵坐标,标准曲线回归方程为: $y=15.909x+0.0412$, $R^2=0.999$ 。CME 中多糖含量按照公式(1)计算:

$$\text{多糖含量}(\%) = \frac{\text{糖含量}}{(10 \text{ mg/mL})} \times 100 \quad (1)$$

单糖组分分析:根据宗雯雯等(2018)的方法,精密称取多糖粉末 10 mg,经三氟乙酸水解和 PMP 衍生后,取上清以 0.22 μm 滤膜过滤后进行 HPLC 分析。色谱条件:色谱柱为 Agilent Eclipse XDB-C18 柱,流动相为乙腈-50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(17:83,体积比)(pH 6.9),流速 1.0 mL/min,检测波长 245 nm,柱温 25 °C,进样量 10 μL。

1.3.2 核苷类成分

参照朱丽娜等(2018)的方法,精密称取 CME 粉末 0.5 g,加 25 mL 蒸馏水振荡 15 min 使粉末完全浸透,超声提取 20 min。离心取上清,以 0.22 μm

滤膜过滤后进行 HPLC 分析。色谱条件：色谱柱 Agilent Zorbax Extend-C18 柱、流动相为甲醇-水梯度洗脱,流速 0.5 mL/min,检测波长 260 nm,柱温 25 °C,进样量 10 μ L。

1.3.3 其他活性成分

总多酚的测定参照李剑梅等(2023)的 Folin-Ciocalteu 法;类胡萝卜素的测定参照周翔宇等(2021)的方法。

1.4 CME 抗氧化活性研究

参照吴梦思等(2024)的方法检测 CME 对 DPPH 自由基和 ABTS 自由基的清除效果,参照 Meng *et al.* (2015)的方法检测 CME 对 \cdot OH 自由基的清除效果。清除率按照公式(2)计算:

$$\text{清除率(\%)}=[1-(T-T_0)/C]\times 100 \quad (2)$$

T 表示样品管的吸光值;T₀表示样品本底的吸光值;C 表示以蒸馏水代替样品溶液测得空白对照管的吸光值。

1.5 CME 对 HaCaT 细胞氧化损伤的保护作用

1.5.1 细胞培养

用含 10%胎牛血清、1%双抗的 DMEM 培养基培养 HaCaT 细胞,并置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱,备用。

1.5.2 CME 对 HaCaT 细胞的毒性

以 MTT 比色法(金银萍等 2015)检测细胞活力。取对数生长期的细胞按 5 \times 10³ 个/孔的密度接种于 96 孔板中,接种量 100 μ L,待细胞培养至融合度 70%–80%后,加入不同浓度(0、10、25、50、100、200、400、600、1 000 μ g/mL)的 CME 处理 HaCaT 细胞 24 h。每孔加入 20 μ L MTT 溶液,于培养箱中孵育 4 h 后弃液,每孔加入 150 μ L DMSO 溶液,振荡 10 min 充分溶解后,用酶标仪测 490 nm 波长下吸光值,并以空白孔调零,每个浓度设 6 个平行。

1.5.3 HaCaT 氧化损伤模型建立

选择对数生长期的细胞按 5 \times 10³ 个/孔的密度接种于 96 孔板中,接种量 100 μ L,待细胞培

养至融合度 70%–80%后,加入含不同浓度(0、100、200、400、600、800、1 000 μ mol/L) H₂O₂ 溶液的 DMEM 培养基处理 HaCaT 细胞 4 h,按 1.5.2 的方法测定细胞活性。

1.5.4 CME 对 H₂O₂ 损伤 HaCaT 细胞的影响

取对数生长期的细胞按 5 \times 10³ 个/孔的密度接种于 96 孔板中,接种量 100 μ L,待细胞培养至融合度 70%–80%后,将细胞分为对照组、模型组、阳性组和样品组。样品组分别加入不同浓度的 CME,阳性组加入 200 μ mol/L 抗坏血酸(VC)为阳性对照,孵育 24 h 后,除对照组外,各组均加入 H₂O₂ 孵育 4 h,按 1.5.2 的方法测定细胞活性。

1.5.5 细胞内活性氧(ROS)水平测定

取对数生长期的细胞按 1.2 \times 10⁶ 个/孔的密度接种于 6 孔板中,接种量 2.5 mL,并按 1.5.4 的方法进行细胞分组及培养。培养完成后以 PBS 清洗细胞,按照 ROS 检测试剂盒说明书操作,使用多功能酶标仪在 525 nm 发射波长(488 nm 激发波长)下检测荧光 DCF 强度。

1.5.6 细胞内 SOD、GSH-Px、CAT 和 MDA 含量的测定

取对数生长期的细胞按 1.2 \times 10⁶ 个/孔的密度接种于 6 孔板中,接种量 2.5 mL,并按 1.5.4 的方法进行细胞分组及培养。培养完成后收集细胞,并进行细胞裂解收集上清液,按照试剂盒说明书测定 HaCaT 中 SOD、GSH-Px、CAT 活力和 MDA 含量。

1.6 统计学分析

用 Graphpad 软件对结果进行统计分析,测定结果数据均用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析($P<0.05$ 差异具有统计学意义)。

2 结果与分析

2.1 CME 中主要活性成分分析

蛹虫草的主要活性成分与冬虫夏草较为接近,目前被公认的包括虫草多糖、腺苷、虫草素、

多酚、类胡萝卜素等活性成分。本研究通过分光光度法对 CME 的主要活性成分含量进行了测定(表 1), 并采用高效液相色谱法对核苷类成分及单糖组分进行了初步分析。

表 1 CME 中主要活性成分含量

Table 1 Content of main active components in CME

成分 Components	含量 Content (mg/g)
多糖 Polysaccharide	509.47±14.73
尿苷 Uridine	1.21±0.10
鸟苷 Guanosine	0.66±0.03
腺苷 Adenosine	1.47±0.11
虫草素 Cordycepin	2.66±0.15
N ⁶ -(2-羟乙基)腺苷 N ⁶ -(2-hydroxyethyl)-adenosine	2.15±0.09
总多酚 Total polyphenols	9.21±0.37
类胡萝卜素 Carotenoid	0.95±0.04

2.1.1 多糖含量和单糖组成分析

多糖是已报道的蛹虫草抗氧化活性的主要来源(Shweta *et al.* 2023)。CME 中多糖含量达 509.47 mg/g (表 1), 说明 CME 活性成分以多糖为主, 可预估其有良好的抗氧化活性, 与芦叶等(2024)研究结果一致。进一步分析其单糖组成发现(图 1), CME 的多糖样品主要由甘露糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖组成, 物质的量比为 4.58:1.65:5.16:5.23:1.0 (表 2)。其中, 以甘露糖、葡萄糖和半乳糖 3 种单糖含量最为突出, 与朱丽娜等(2021)的报道一致。甘露糖、葡萄糖和半乳糖作为生物体重要的能量来源, 与蛹虫草抗氧化、肝脏保护等功能密切相关(Zhang

et al. 2020), Lan *et al.* (2024)从蛹虫草中分离出一种主要由甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成的多糖 CM-1, 发现其能有效清除自由基, 并对氧化应激具有显著的保护作用。由此可推测甘露糖、葡萄糖和半乳糖可共同作用发挥 CME 的抗氧化能力。

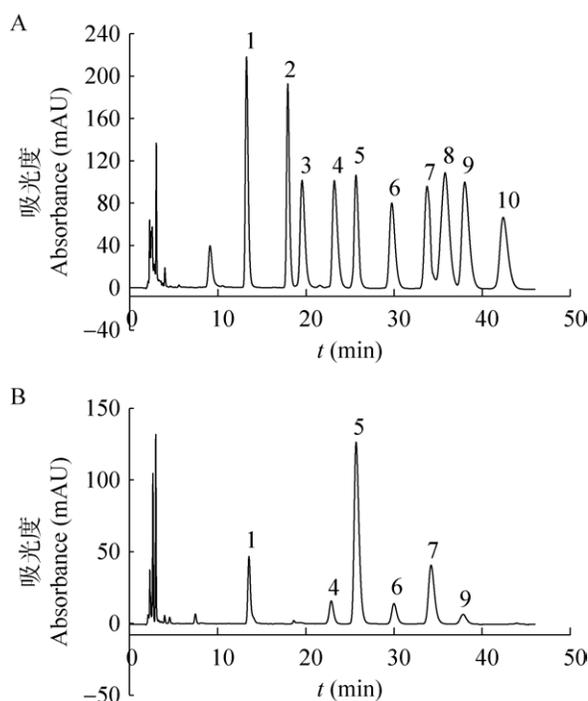


图 1 HPLC 检测单糖组成 A: 混合对照品; B: 供试品. 1: 甘露糖; 2: 鼠李糖; 3: 葡萄糖醛酸; 4: 半乳糖醛酸; 5: 乳糖内标; 6: 葡萄糖; 7: 半乳糖; 8: 木糖; 9: 阿拉伯糖; 10: 岩藻糖

Fig. 1 Determination of monosaccharide composition by HPLC. A: Mixed reference substance; B: Tested samples. 1: Man; 2: Rha; 3: Glc-UA; 4: Gal-UA; 5: Lactose (internal standard); 6: Glc; 7: Gal; 8: Xyl; 9: Ara; 10: Fuc.

表 2 蛹虫草多糖的单糖组成

Table 2 Monosaccharide composition of *Cordyceps militaris* polysaccharide

样品 Sample	甘露糖 Man	半乳糖醛酸 Gal-UA	葡萄糖 Glc	半乳糖 Gal	阿拉伯糖 Ara
含量 Content (mol%)	25.73	9.26	29.01	29.39	5.62

2.1.2 核苷类成分分析

核苷类化合物是蛹虫草有效成分的重要组成部分,目前已成为评价虫草类制品质量控制的重要指标(薛亚甫等 2016),虫草素和 N⁶-(2-羟乙基)腺苷是已报道的蛹虫草中的特有成分(李赫宇等 2018),对蛹虫草及其提取物的质量控制有重要意义。HPLC 分析结果显示(图 2),CME 中主要核苷类成分为尿苷、鸟苷、腺苷、虫草素和 N⁶-(2-羟乙基)腺苷,与李赫宇等(2018)的检测结果一致。其核苷类成分总量为 8.15 mg/g,其中,虫草素是 CME 中含量最高的核苷类成分,为 2.66 mg/g, N⁶-(2-羟乙基)腺苷的含量为 2.15 mg/g,仅次于虫草素(表 1)。

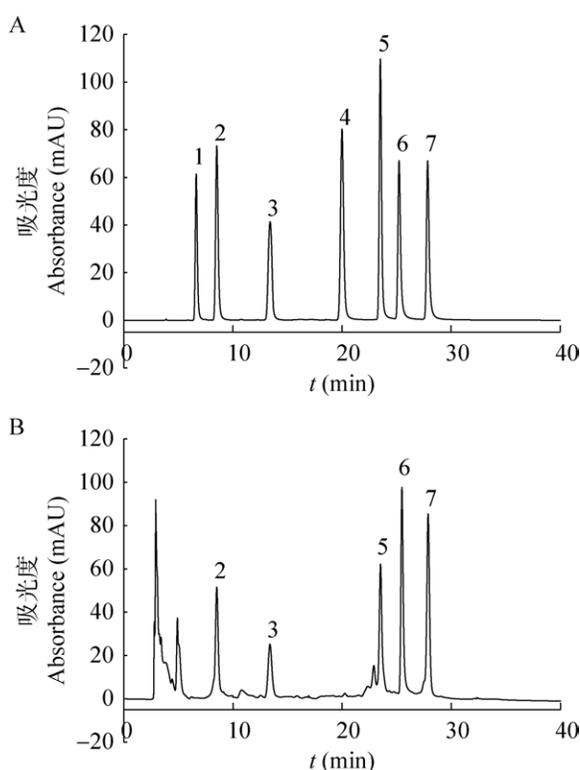


图 2 HPLC 检测核苷类成分 A: 混合对照品; B: 供试品。1: 胞苷; 2: 尿苷; 3: 鸟苷; 4: 胸苷; 5: 腺苷; 6: 虫草素; 7: N⁶-(2-羟乙基)腺苷
 Fig. 2 Determination of nucleosides by HPLC. A: Mixed reference substance; B: Test sample. 1: Cytidine; 2: Uridine; 3: Guanosine; 4: Thymidine; 5: Adenosine; 6: Cordycepin; 7: N⁶-(2-hydroxyethyl)-adenosine.

2.1.3 其他活性成分

除多糖和核苷类成分外,蛹虫草子实体中还含有其他化学成分,如多酚和类胡萝卜素。用比色法测定 CME 中多酚和类胡萝卜素含量,分别为 9.21 mg/g 和 0.95 mg/g (表 1)。

2.2 CME 抗氧化活性评价

本研究通过检测 CME 对 DPPH 自由基、ABTS 自由基和·OH 自由基的清除作用来评价其抗氧化能力(图 3)。随着 CME 浓度的增大,3 种自由基的清除率均逐渐增强,且呈明显的量效关系。VC 作为一种自由基清除剂,在相同的质量浓度下表现出较强的清除能力,当 CME 浓度为 2.5 mg/mL 时对 3 种自由基的清除效果均接近最佳。CME 在浓度为 1.5 mg/mL 时对 DPPH 自由基的清除率已超过 90%,接近 VC 的作用效果(图 3A),其对 DPPH 自由基的 IC₅₀ 值为 0.63 mg/mL。与对 DPPH 自由基的清除能力相比,CME 对 ABTS 和·OH 自由基的清除效果相对较弱,在浓度为 2.5 mg/mL 时,ABTS 和·OH 自由基清除率仅为 41.64%和 39.29%,而当浓度增大到 7.5 mg/mL 时,清除率均接近 90%(图 3B, 3C),说明 CME 对 ABTS 和·OH 自由基也有较强的清除作用,其 IC₅₀ 值分别为 2.97 mg/mL 和 3.24 mg/mL。

2.3 CME 对 HaCaT 细胞氧化损伤的保护作用

2.3.1 对 HaCaT 细胞活力的影响

采用 MTT 法对不同浓度(10、25、50、100、200、400、600、1 000 μg/mL) CME 作用下的 HaCaT 细胞存活率进行检测(图 4)。随着药物浓度的增加,HaCaT 细胞存活率逐渐降低,当质量浓度为 50 μg/mL 时,细胞存活率为 86.27%,当浓度大于 50 μg/mL 时,细胞活力明显下降,均小于 80%。当细胞活力高于 80%时可认为样品对细胞未有明显毒性(朱恒杏等 2024),因此选择 10、25、50 μg/mL 这 3 个浓度为安全作用浓度进行后续实验。

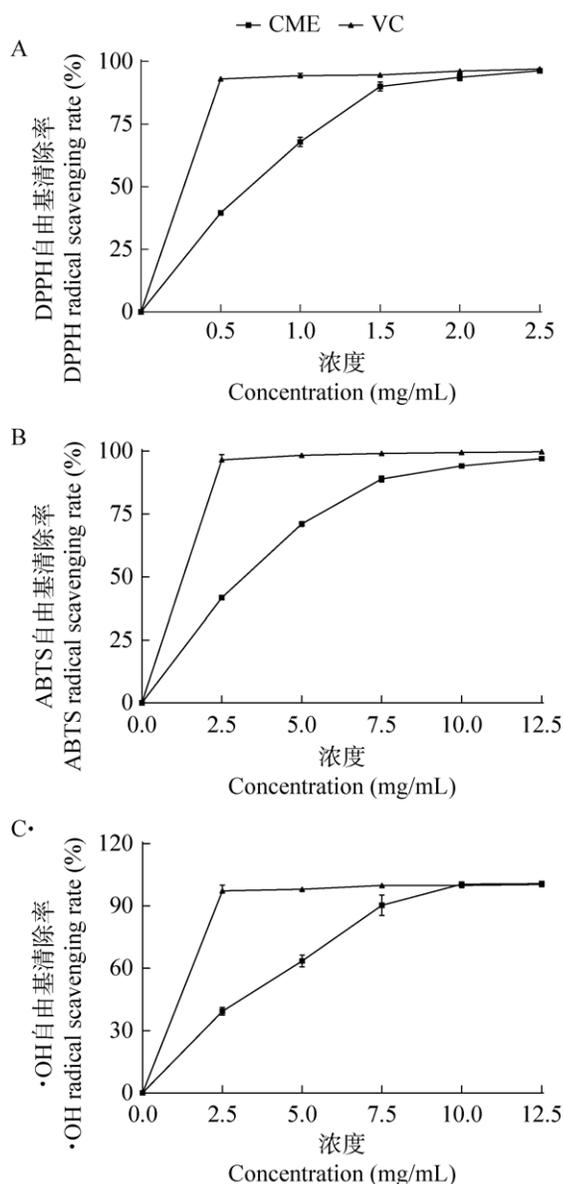


图 3 CME 对自由基的清除作用 A: DPPH 自由基清除率; B: ABTS 自由基清除率; C: 羟基自由基清除率

Fig. 3 Scavenging effects of CME on radicals. A: DPPH radical scavenging activities; B: ABTS radical scavenging activities; C: ·OH radical scavenging activities.

2.3.2 H₂O₂ 诱导氧化损伤模型建立

H₂O₂ 作为最重要的活性氧类物质, 容易在细胞核组织中扩散, 诱导细胞发生氧化应激, 已成为国内外研究各类细胞氧化损伤的重要工具 (Rachitha *et al.* 2023)。实验结果显示(图 5), HaCaT

的细胞活力随 H₂O₂ 浓度的升高而逐渐降低, 当 H₂O₂ 浓度为 400 μmol/L 时, HaCaT 细胞活力降至对照组的 59.81% ($P < 0.01$), 此浓度下细胞在受到氧化损伤的同时还保留了相对的活力, 因此选择 400 μmol/L 作为 H₂O₂ 氧化损伤模型的诱导浓度。

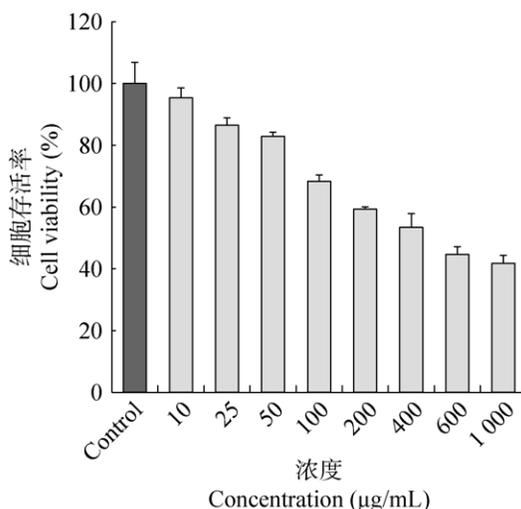


图 4 不同浓度 CME 对 HaCaT 细胞活力的影响
Fig. 4 Effects of different concentrations of CME on the viabilities of HaCaT cells.

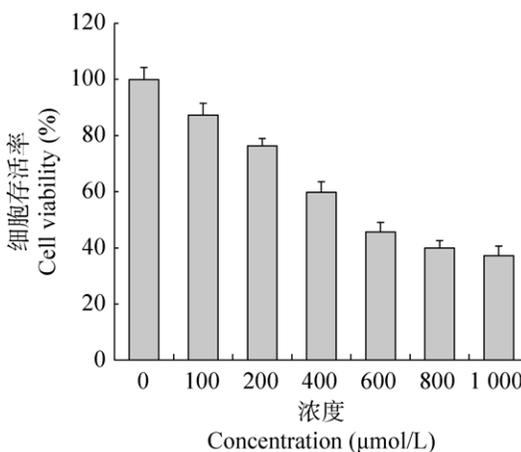


图 5 不同浓度 H₂O₂ 对 HaCaT 细胞活力的影响
Fig. 5 Effects of different concentrations of H₂O₂ on the viabilities of HaCaT cells.

2.3.3 CME 对 H₂O₂ 诱导 HaCaT 细胞活力的影响

MTT 法检测 CME 对 H₂O₂ 处理的氧化损伤 HaCaT 细胞的保护作用(图 6)。400 μmol/L H₂O₂

处理细胞后, HaCaT 活力显著下降($P<0.01$), 降至对照组的 55.39%; 而经 VC 和 CME 预处理的 HaCaT 细胞活力较模型组明显提高, 且与 CME 浓度呈正相关趋势, 当 CME 浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞存活率高达 83.90% ($P<0.01$), 较模型组提升了 28.51%, 与 VC 的作用效果相近, 表明 CME 对 H_2O_2 诱导的 HaCaT 细胞损伤具有明显的保护作用。

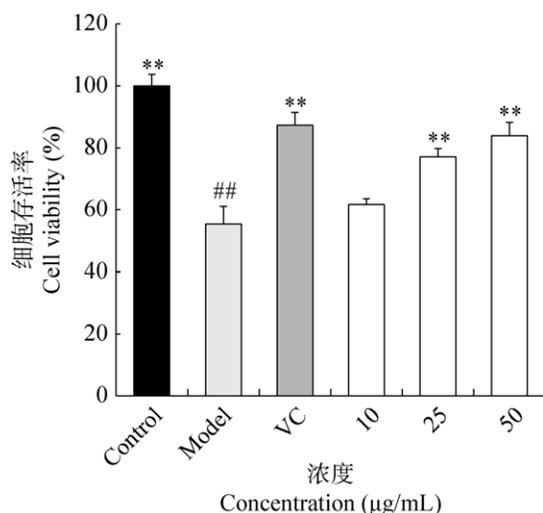


图 6 不同浓度 CME 对 H_2O_2 诱导 HaCaT 细胞活力的影响 与对照组相比, $^{##}P<0.01$; 与模型组相比, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$, 下同

Fig. 6 Effects of different concentrations of CME on the viabilities of HaCaT cells induced by H_2O_2 . Compared with control group, $^{##}P<0.01$; Compared with model group, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$. The same below.

2.3.4 CME 对 HaCaT 内 ROS 水平的影响

活性氧(ROS)是细胞在代谢过程中产生的一系列活性氧簇(包括单线态氧、超氧阴离子和羟基自由基等), 细胞受到氧化应激刺激后会产生过量的 ROS, 损伤细胞结构, 包括蛋白质、脂质和 DNA, 从而导致皮肤受损进而造成老化和疾病等皮肤危害(夏世金等 2014)。因此, 检测 CME 对 HaCaT 中 ROS 含量的影响可用来评估其防护氧化损伤的能力(图 7), 细胞经 H_2O_2 处理后, ROS 相对含量明显升高($P<0.01$), 约为对

对照组的 1.6 倍, 说明 H_2O_2 处理使 HaCaT 细胞受到严重的氧化应激损伤, 导致了 ROS 的积累。CME 和 VC 预处理均能显著降低 H_2O_2 诱导损伤后细胞内 ROS 水平($P<0.01$), 且 CME 浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 时, 对 ROS 抑制率已达到 44.46%, 抑制效果强于 VC。结果表明, CME 能够以剂量依赖的方式有效清除 H_2O_2 刺激而产生的 ROS, 从而减缓 ROS 过多导致的氧化损伤。

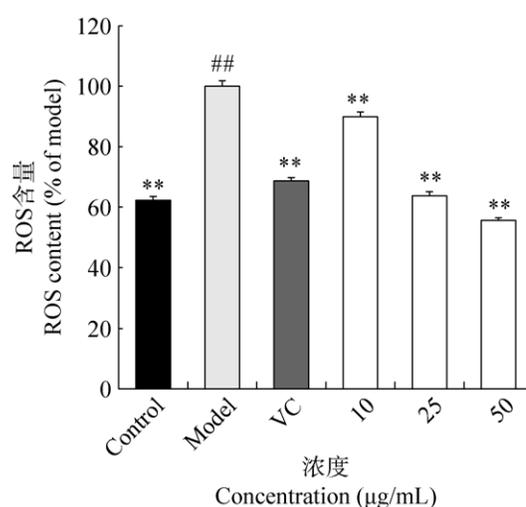


图 7 不同浓度 CME 对 HaCaT 细胞内 ROS 水平的影响

Fig. 7 Effects of different concentrations of CME on ROS levels in HaCaT cells.

2.3.5 CME 对 HaCaT 内氧化应激因子水平的影响

细胞有一个内源性抗氧化系统, 可以通过产生超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和过氧化氢酶(CAT)等抗氧化酶来平衡 ROS, 抵御脂质过氧化(LPO)、蛋白质氧化、DNA 损伤等有害作用对细胞造成的伤害。因此在氧化应激引起细胞损伤的研究中, SOD、GSH-Px、CAT 等抗氧化酶以及 MDA 等 LPO 产物常被用作潜在的生物标志物(Naji *et al.* 2017; Zhang *et al.* 2018)。

H_2O_2 损伤细胞后, 模型组 SOD、GSH-Px 和 CAT 活力均显著降低($P<0.01$), 分别降至对照组的 67.77%、76.59%和 68.49% (图 8)。CME

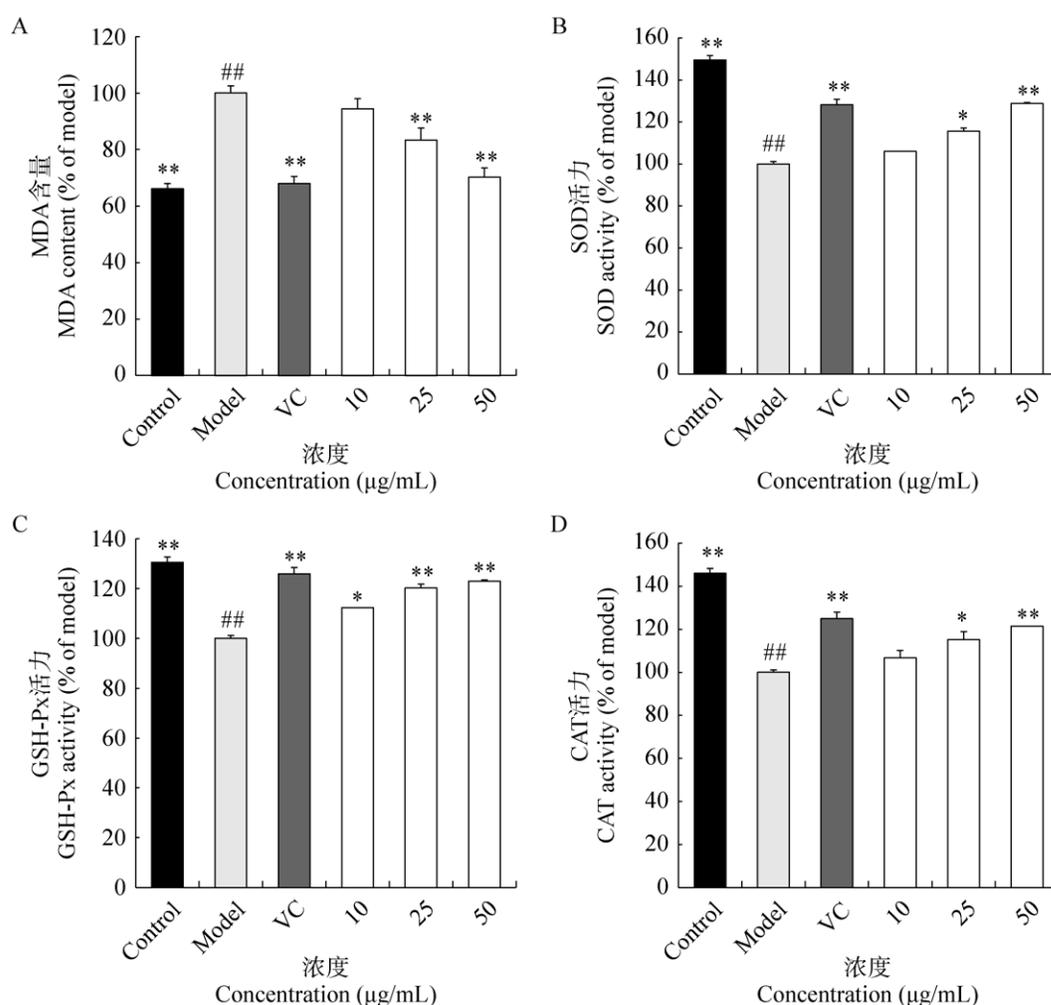


图 8 不同浓度 CME 对 HaCaT 细胞内 MDA 含量(A)和 SOD (B)、GSH-Px (C)、CAT (D)活力的影响
Fig. 8 Effects of different concentrations of CME on MDA contents (A) and the activities of SOD (B), GSH-Px (C), CAT (D) in HaCaT cells.

和 VC 保护作用下这些抗氧化酶活力均明显上升,特别是当 CME 浓度为 50 µg/mL 时,细胞内 SOD、GSH-Px 和 CAT 水平分别较模型组显著升高 28.91%、22.97%和 21.48% ($P < 0.01$),与 VC 保护效果相近。脂质过氧化试验表明,HaCaT 发生氧化应激会导致细胞脂质损伤加剧,使细胞内 MDA 含量显著升高($P < 0.01$)。与模型组相比,50 µg/mL CME 以及 VC 预处理使脂质过氧化程度分别降低 29.86%和 32.01% ($P < 0.01$),已恢复至接近正常水平。以上结果表明 CME 可以通过增加细胞抗氧化酶的活力和阻碍过氧化物的产生来清除自由基,有效地保

护 HaCaT 细胞免受氧化应激损伤。

3 讨论

近年来,应用天然产物来干预氧化应激已经成为皮肤氧化损伤保护的重要研究方向,蛹虫草作为一种药用价值极高的菌物资源,因其广泛的生理活性而受到特别的关注(Ren *et al.* 2020; 何华奇等 2023)。本研究对蛹虫草水提物的主要活性成分进行表征,探究其抗氧化能力以及对 HaCaT 细胞氧化损伤的保护作用。

蛹虫草是多糖、多酚、腺苷、虫草素等活性物质的丰富来源。本研究结果表明, CME 中多

糖(509.47 mg/g)和总多酚(9.21 mg/g)含量显著。总多酚含量与药用菌多酚 1.65–19.79 mg/g 范围相近(Robaszkiwicz *et al.* 2010; Choi *et al.* 2020), 而多糖含量明显高于 Thi Nguyen *et al.* (2022)的报道。此外, CME 还含有多种核苷类成分, 以腺苷(1.47 mg/g)、虫草素(2.66 mg/g)和 N⁶-(2-羟乙基)腺苷(2.15 mg/g)含量最为突出。这些活性产物极大地促进了 CME 的抗氧化活性。据报道, 多糖和酚类化合物可有效清除各种自由基(Barros *et al.* 2008; Liu *et al.* 2016), 腺苷能够增强机体抗氧化酶活力(李兵等 2016), 而虫草素具有抑制氧化应激和炎症反应等活性(刘立柱等 2022), 对皮肤具有一定的保护和改善作用。此外, 其他可能存在于 CME 中的化学成分, 如类胡萝卜素、麦角硫因和硒, 也被证实可明显提高蛹虫草的抗氧化性能(左锦辉等 2018; Shweta *et al.* 2023), 这些活性成分可能会共同作用对 CME 的抗氧化活性产生协同效果。因此, 推测 CME 具有很好的抗氧化能力及氧化应激损伤保护作用, 在护肤品领域将有巨大的应用潜力。

CME 对 DPPH 自由基有较强的清除作用, IC₅₀ 值为 0.63 mg/mL, 隋昕怡等(2024)提取的蛹虫草多糖清除 DPPH 自由基 IC₅₀ 值为 0.80 mg/mL, 与之相比, CME 对 DPPH 自由基清除效果更好; 与张曦文等(2017)报道的蛹虫草子实体水提取物对 DPPH 自由基 IC₅₀ 为 0.757 mg/mL 相比也有一定的优势, 表明 CME 具有良好的化学抗氧化活性。在此基础上, 我们以 H₂O₂ 诱导 HaCaT 细胞损伤为模型, 探究 CME 对皮肤氧化损伤的保护作用。结果表明, CME 在 10、25、50 μg/mL 下对 HaCaT 细胞无明显毒副作用, 同时能够提高 H₂O₂ 诱导损伤后的 HaCaT 细胞存活率并呈剂量依赖性减弱细胞内 ROS 水平, 与 Park *et al.* (2014)的研究结果一致。H₂O₂ 是生物体内最常见的活性氧分子, 过量 H₂O₂ 刺激皮肤会打破 ROS 生成和抗氧化酶活性之间的平衡, 引起细胞氧化

应激并诱导损伤(Masaki 2010)。而抗氧化在细胞水平发挥作用的重要机制之一就是增强抗氧化酶活性, 减少脂质代谢产物生成, 提高细胞氧化防御体系(郭玉文等 2016)。本研究发现, CME 使 H₂O₂ 诱导的 HaCaT 细胞中抗氧化酶 SOD、GSH-Px 和 CAT 水平提高了 15%–30%, 使 MDA 抑制率达 29.86%, 这表明 CME 在细胞内可通过提高抗氧化酶的活力和降低脂质氧化水平来清除 ROS, 从而保护 HaCaT 细胞免受 H₂O₂ 诱导的氧化损伤(Dong *et al.* 2021)。

本研究通过自由基清除实验和细胞实验证实 CME 具有较好的抗氧化能力, 并对 H₂O₂ 诱导的 HaCaT 细胞氧化损伤具有保护作用, 表明其具有成为天然抗氧化剂应用于化妆品等领域的潜力, 为蛹虫草提取物的开发应用提供科学依据。

作者贡献

孙彦庆: 查阅文献、初稿撰写; 张京良: 数据收集与分析管理; 朱宗敏: 图表制作、软件; 江晓路: 提供实验材料、文章审核; 尚丽丽: 验证、实际调查研究; 宗雯雯: 论文构思、实验设计实施与编辑写作。

利益冲突

作者声明, 该研究不存在任何潜在利益冲突的商业或财务关系。

[REFERENCES]

- Abate M, Pepe G, Randino R, Pisanti S, Rodriguez M, 2020. *Ganoderma lucidum* ethanol extracts enhance re-epithelialization and prevent keratinocytes from free-radical injury. *Pharmaceuticals*, 13(9): 224
- Barros L, Venturini BA, Baptista P, Estevinho LM, Ferreira ICFR, 2008. Chemical composition and biological properties of Portuguese wild mushrooms: a comprehensive study. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 56(10): 3856

- Choi EJ, Park B, Lee J, Kim J, 2020. Anti-atopic dermatitis properties of *Cordyceps militaris* on tnf α /ifn γ -stimulated hacat cells and experimentally induced atopic dermatitis in mice. *Open Access*, 24(4): 7-14
- Dai YC, Yang ZL, 2008. A revised checklist of medicinal fungi in China. *Mycosystema*, 27: 801-824 (in Chinese)
- Ding YN, Wang RY, Gao GZ, Wang HQ, Zhou JW, Rao PF, 2024. Protective effect of *Olea europaea* leaves extract against oxidative damage in HaCaT cells and its antibacterial activity. *Natural Product Research and Development*, 36(9): 1584-1591 (in Chinese)
- Dong H, Liu M, Wang L, Liu Y, Lu X, Stagos D, Lin X, Liu M, 2021. Bromophenol bis (2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxybenzyl) ether protects HaCaT skin cells from oxidative damage via Nrf2-mediated pathways. *Antioxidants*, 10(9): 1436
- Guo YW, Cao JR, He LJ, 2016. Research progress in antioxidation mechanism on cellular level. *Medical Recapitulate*, 22(1): 13-16 (in Chinese)
- He HQ, Yin X, Li FS, Lu XM, 2023. Effects of a putative lysine-specific histone demethylase on the growth and development of *Cordyceps militaris*. *Mycosystema*, 42(5): 1129-1138 (in Chinese)
- Jin YP, Hou W, Gao W, Wang YS, Yan S, Wang YP, 2015. Protective effect of *Schisandra chinensis* fructus on hydrogen peroxide-induced oxidative stress injury in HaCaT cells. *Natural Product Research and Development*, 27(11): 1967-1971 (in Chinese)
- Kammeyer A, Luiten RM, 2015. Oxidation events and skin aging. *Ageing Research Reviews*, 21: 16-29
- Kang M, Kim SY, Kim YT, Kim E, Lee S, Ko S, Wijesinghe WJ, Samarakoon KW, Kim Y, Cho JH, Jang H, Jeon Y, 2014. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activities of polysaccharide purified from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis*) gel. *Carbohydrate Polymers*, 99: 365-371
- Kim SY, Kim EA, Kim YS, Yu SK, Choi C, Lee JS, Kim YT, Nah JW, Jeon YJ, 2016. Protective effects of polysaccharides from *Psidium guajava* leaves against oxidative stresses. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91: 804-811
- Lan L, Wang J, Luo H, Cao M, Guo N, Fan G, Wang S, Sun Z, He Q, Li Y, 2024. Absorption and utilization of polysaccharides from *Cordyceps militaris* fruiting bodies and their protective effects against CCl₄-induced acute liver injury in mice. *Food Bioscience*, 58: 103714
- Li B, Zhang WC, Fu CX, Zheng Y, 2016. Effect of *Cordyceps* and adenosine on kidney oxidative stress of diabetic mice. *World Latest Medicine Information*, 16(57): 1-3 (in Chinese)
- Li HY, Yu YH, Zhang DX, Chen MJ, Yan RY, Yu HJ, 2018. Quantitative analysis of five nucleosides in *Cordyceps* by HPLC and quality control of *Cordyceps militaris*. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 49(22): 5410-5417 (in Chinese)
- Li JM, Zhu WQ, Chai LS, Zhang SY, Xie CY, 2023. Optimization of extraction process of *Cordyceps militaris* polyphenols and its antioxidant activity. *Food Research and Development*, 44(8): 111-117 (in Chinese)
- Liu J, Feng C, Li X, Chang M, Meng J, Xu L, 2016. Immunomodulatory and antioxidative activity of *Cordyceps militaris* polysaccharides in mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86: 594-598
- Liu LZ, Li CY, Lin SW, Qu Y, Xu HJ, 2022. Study on the effect of cordycepin on fracture healing by inhibiting oxidative stress and inflammation. *Tianjin Journal of Traditional Chinese Medicine*, 39(3): 380-385 (in Chinese)
- Lu Y, Li L, Liu SX, Qu YL, Jiang WQ, Wang ZX, Zhao HX, 2024. Extraction and activity analysis of active components from *Cordyceps militaris*. *Edible Fungi*, 46(1): 71-76, 84 (in Chinese)
- Masaki H, 2010. Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects. *Journal of Dermatological Science*, 58(2): 85-90
- Meng L, Sun S, Li R, Shen Z, Wang P, Jiang X, 2015. Antioxidant activity of polysaccharides produced by *Hirsutella* sp. and relation with their chemical characteristics. *Carbohydrate Polymers*, 117: 452-457
- Naji KM, Al-Shaibani ES, Alhadi FA, Al-Soudi SA, D'Souza MR, 2017. Hepatoprotective and antioxidant effects of single clove garlic against CCl₄-induced hepatic damage in rabbits. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1): 411
- Park JM, Lee JS, Lee KR, Ha SJ, Hong EK, 2014. *Cordyceps militaris* extract protects human dermal fibroblasts against oxidative stress-induced apoptosis and premature senescence. *Nutrients*, 6(9): 3711-3726
- Rachitha P, Krupashree K, Kandikattu HK, Nagaraj G, Alahmadi TA, Alharbi SA, Shanmuganathan R, Brindhadevi K, Raghavendra VB, 2023. Nanofabrication of cobalt-tellurium using *Allium sativum* extract and its protective efficacy against H₂O₂-induced oxidative damage in HaCaT cells. *Environmental Research*, 226: 115659
- Ren Y, Sun P, Li H, Zhu Z, 2020. Effects of Na₂SeO₃ on growth, metabolism, antioxidase and enzymes involved in polysaccharide synthesis of *Cordyceps militaris*. *Process Biochemistry*, 97: 64-71

- Robaszkiewicz A, Bartosz G, Lawrynowicz M, Soszyński M, 2010. The role of polyphenols, β -carotene, and lycopene in the antioxidative action of the extracts of dried, edible mushrooms. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2010(11): 173274
- Shweta, Abdullah S, Komal, Kumar A, 2023. A brief review on the medicinal uses of *Cordyceps militaris*. *Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine*, 7: 100228
- Sui XY, Pang MY, Liu D, Ren HF, Du XJ, 2024. Optimization of extraction process for polysaccharides from *Cordyceps militaris* by ultrasonic-assisted deep eutectic solvent and study on its antioxidant activity. *Cereals & Oils*, 37(9): 92-96, 113 (in Chinese)
- Thi Nguyen L, Vo T, Nguyen D, Nguyen M, Nguyen Le U, 2022. Effects of *Cordyceps militaris* extract and its mixture with silica nanoparticles on burn wound healing on mouse model. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 67: 102901
- Wu F, Zhou LW, Yang ZL, Bau T, Li TH, Dai YC, 2019. Resource diversity of Chinese macrofungi: edible, medicinal and poisonous species. *Fungal Diversity*, 98: 1-76
- Wu MS, Jin JY, Shang SY, Ruan J, Li SF, Wang JS, Li R, 2024. Study on antioxidant activity of *Lilium lancifolium* Thunb. flavonoid extract. *Food and Fermentation Industries*, 50(15): 163-169 (in Chinese)
- Xia SJ, Sun T, Wu JZ, 2014. Free radicals, inflammation and aging. *Practical Geriatrics*, 28(2): 100-103 (in Chinese)
- Xue YF, Wu LL, Zhang Q, Tang L, Cui XM, Xu H, 2016. Determination of six nucleosides in *Cordyceps militaris* and its quality control. *Chinese Journal of New Drugs and Clinical Remedies*, 35(11): 796-802 (in Chinese)
- Ye ZZ, Zhu PL, Yu HZ, Huang HW, Ruan JM, Lin F, 2012. Influence of extract of *Cordyceps militaris* on senescence of endothelial cells and reactive oxygen species in cells induced by high glucose. *Chinese Journal of Cardiovascular Rehabilitation Medicine*, 21(2): 129-132 (in Chinese)
- Yu R, Yang W, Song L, Yan C, Zhang Z, Zhao Y, 2007. Structural characterization and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of cultured *Cordyceps militaris*. *Carbohydrate Polymers*, 70(4): 430-436
- Zhang C, Zhang L, Liu H, Zhang J, Hu C, Jia L, 2018. Antioxidation, anti-hyperglycaemia and renoprotective effects of extracellular polysaccharides from *Pleurotus eryngii* SI-04. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111: 219-228
- Zhang J, Wen C, Duan Y, Zhang H, Ma H, 2019. Advance in *Cordyceps militaris* (Linn.) Link polysaccharides: isolation, structure, and bioactivities: a review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 132: 906-914
- Zhang W, Wang S, Kang C, Lv C, Zhou L, Huang L, Guo L, 2020. Pharmacodynamic material basis of traditional Chinese medicine based on biomacromolecules: a review. *Plant Methods*, 16: 26
- Zhang XW, Zhao B, Zhang GC, Yue ZR, Zhang GZ, Zou CS, 2017. Analysis of active components and antioxidant activity of albino *Cordyceps militaris*. *Journal of Jilin Agricultural University*, 39(5): 585-589, 595 (in Chinese)
- Zhou XY, Fan GL, Deng YL, Li YF, 2021. Extraction and anti-oxidant activity of carotenoids from *Cordyceps militaris* by multi-enzyme method. *Journal of Xihua University (Natural Science Edition)*, 40(4): 80-89 (in Chinese)
- Zhu HX, Shao MR, Hong TC, Guan YL, Lin MH, Pan JR, 2024. Synergistic protective effects of anthocyanins from black wolfberry and EGCG on oxidative damage of HaCaT cells induced by UVB. *Modern Food Science and Technology*, 40(8): 1-11 (in Chinese)
- Zhu LN, Liu YF, Zhang HX, Li CH, Zhang Z, Zhou S, Gao XH, Tang QJ, 2021. Effects of culture media and culture technique on the bioactive and nutrition components in *Cordyceps militaris* fruiting bodies. *Mycosystema*, 40(11): 3034-3045 (in Chinese)
- Zhu LN, Liu YF, Zhang HX, Zhou S, Zhang Z, Li CH, Gao XH, Tang QJ, 2018. Comparison of the active components in fruit bodies of different strains of *Cordyceps militaris*. *Mycosystema*, 37(12): 1695-1706 (in Chinese)
- Zong WW, Shen ZP, Bu YM, Zhang JL, Jiang XL, 2018. Methodological study on the monosaccharide composition of polysaccharides in *Cordyceps militaris*. *Mycosystema*, 37(3): 395-404 (in Chinese)
- Zuo JH, Gong XY, Dong YM, Li L, 2018. Research achievements in bioactive components, pharmacological effects and applications of *Cordyceps militaris*. *Food Science*, 39(21): 330-339 (in Chinese)
- [附中文参考文献]
- 戴玉成, 杨祝良, 2008. 中国药用真菌名录及部分名称的修订. *菌物学报*, 27: 801-824
- 丁亚男, 王瑞阳, 高观祯, 汪惠勤, 周建武, 饶平凡, 2024. 油橄榄叶提取物对 HaCaT 细胞氧化损伤的保护作用及抑菌活性. *天然产物研究与开发*, 36(9): 1584-1591

- 郭玉文, 曹婧然, 何立杰, 2016. 细胞水平的抗氧化机制研究进展. 医学综述, 22(1): 13-16
- 何华奇, 尹昕, 李芳盛, 陆晓民, 2023. 赖氨酸特异性组蛋白去甲基化酶基因对蛹虫草生长发育的影响. 菌物学报, 42(5): 1129-1138
- 金银萍, 侯微, 高薇, 王玉帅, 焉石, 王英平, 2015. 五味子对 H₂O₂ 诱导的 HaCaT 细胞氧化应激损伤的保护作用. 天然产物研究与开发, 27(11): 1967-1971
- 李兵, 张文成, 付传香, 郑悦, 2016. 蛹虫草中虫草素及腺苷对糖尿病小鼠肾脏氧化应激的影响. 世界最新医学信息文摘, 16(57): 1-3
- 李赫宇, 于滢慧, 张东星, 陈旻君, 晏仁义, 於洪建, 2018. 虫草类产品中 5 种核苷类成分的测定及蛹虫草质量分析. 中草药, 49(22): 5410-5417
- 李剑梅, 朱万芹, 柴林山, 张疏雨, 谢存一, 2023. 蛹虫草多酚提取工艺优化及其抗氧化活性. 食品研究与开发, 44(8): 111-117
- 刘立柱, 李超艺, 林诗炜, 曲野, 许海军, 2022. 虫草素通过抑制氧化应激和炎症反应对骨折愈合的影响研究. 天津中医药, 39(3): 380-385
- 芦叶, 李丽, 刘舒欣, 曲叶丽, 姜雯琪, 王作新, 赵洪新, 2024. 蛹虫草有效成分提取及活性分析. 食用菌, 46(1): 71-76, 84
- 隋昕怡, 逢梦玉, 刘丹, 任洪飞, 杜秀菊, 2024. 超声辅助低共熔溶剂法提取蛹虫草多糖工艺优化及其抗氧化活性研究. 粮食与油脂, 37(9): 92-96, 113
- 吴梦思, 金建宇, 尚书游, 阮军, 李硕芳, 王劲松, 李蓉, 2024. 卷丹百合黄酮提取物抗氧化活性研究. 食品与发酵工业, 50(15): 163-169
- 夏世金, 孙涛, 吴俊珍, 2014. 自由基、炎症与衰老. 实用老年医学, 28(2): 100-103
- 薛亚甫, 吴蕾蕾, 张倩, 唐亮, 崔星明, 徐红, 2016. 北虫草中 6 种核苷类成分的含量测定与质量控制. 中国新药与临床杂志, 35(11): 796-802
- 叶章正, 朱鹏立, 余惠珍, 黄华玮, 阮景明, 林帆, 2012. 蛹虫草(北冬虫夏草)提取物对高糖诱导的内皮细胞衰老和细胞内活性氧的影响. 心血管康复医学杂志, 21(2): 129-132
- 张曦文, 赵博, 张国财, 岳峥嵘, 张国珍, 邹传山, 2017. 白化型蛹虫草活性成分分析及抗氧化活性测定. 吉林农业大学学报, 39(5): 585-589, 595
- 周翔宇, 樊桂灵, 邓扬龙, 李玉锋, 2021. 复合酶法提取蛹虫草类胡萝卜素工艺优化及其抗氧化能力测定. 西华大学学报(自然科学版), 40(4): 80-89
- 朱恒杏, 邵孟茹, 洪天畅, 关颖琳, 林明豪, 潘家荣, 2024. 黑枸杞花青素、EGCG 对中波紫外线诱导 HaCaT 细胞氧化损伤的协同保护作用. 现代食品科技, 40(8): 1-11
- 朱丽娜, 刘艳芳, 张红霞, 李传华, 张忠, 周帅, 高新华, 唐庆九, 2021. 培养基和栽培方式对蛹虫草子实体活性成分的影响. 菌物学报, 40(11): 3034-3045
- 朱丽娜, 刘艳芳, 张红霞, 周帅, 张忠, 李传华, 高新华, 唐庆九, 2018. 不同来源的蛹虫草子实体活性成分的比较. 菌物学报, 37(12): 1695-1706
- 宗雯雯, 沈照鹏, 卜义明, 张京良, 江晓路, 2018. 蛹虫草多糖单糖组成的方法学研究. 菌物学报, 37(3): 395-404
- 左锦辉, 贡晓燕, 董银卯, 李丽, 2018. 蛹虫草的活性成分和药理作用及其应用研究进展. 食品科学, 39(21): 330-339