

Effect of Ethanol Extracts from *Hericium erinaceum* Solid-State Fermented Wheat on Nerve Cells Growth

Chun-Yi He¹, Su-Der Chen^{1*}, Want-Ju Lu¹, Hung-Cheng Wang¹, Yung-Chung Chang¹,
Yeong-Hsiang Cheng², Yu-Shen Lai²

¹Department of Food Science, National Ilan University, Taiwan

²Department of Biotechnology and Animal Science, National Ilan University, Taiwan

Email: *sdchen@niu.edu.tw

Received: Jan. 14th, 2015; accepted: Jan. 29th, 2015; published: Feb. 4th, 2015

Copyright © 2015 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Nerve growth factor (NGF) is one of neurotrophic factors, which is responsible for neuronal growth and prevents from neurodegeneration. *Hericium erinaceums* (*H. erinaceus*) is an important medicinal and edible mushrooms, and it has bioactive components such as erinacines and hericenones, which can induce nerve growth factor (NGF) production, and increase the neurite outgrowth. This study was to observe the growth of PC 12 cell and analyze NGF contents by producing 28-days *H. erinaceus* solid-state fermented wheat and feeding the rat pheocromocytoma PC12 cell with the ethanol extracts. The concentration 1 - 100 µg/mL ethanol extracts (HEE) from *H. erinaceum* solid-state fermented wheat product did not significantly cause cytotoxicity of cultured PC12 cells. The NGF contents and neurite development of PC12 cells were significantly increased by adding 10 µg/mL 28-days HEE to medium.

Keywords

Hericium erinaceus, Solid-State Fermentation, Nerve Growth Factor (Ngf), Neurite

猴头菌固态发酵小麦的萃取物 对神经细胞生长的影响

何纯谊¹, 陈淑德^{1*}, 吕宛儒¹, 王桢翔¹, 张永钟¹, 郑永祥², 赖裕顺²

*通讯作者。

¹国立宜兰大学, 食品科学系, 台湾

²国立宜兰大学, 生物技术和动物科技系, 台湾

Email: sdchen@niu.edu.tw

收稿日期: 2015年1月14日; 录用日期: 2015年1月29日; 发布日期: 2015年2月4日

摘要

神经生长因子(nerve growth factor, NGF)是神经营养因子之一, 为神经细胞生长的重要因素, 可防止神经退化。猴头菇(*Hericium erinaceum*)为一种重要的药膳兼用真菌, 它含有猴头素和猴头酮等生理活性成分, 可促进NGF的生成, 增加神经轴突的生长。本研究通过猴头菌小麦固态发酵28天的乙醇萃取物与大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞株(rat pheochromocytoma cell line, PC12)共培养, 观察其生长情形及检测NGF含量。结果显示浓度为1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的猴头菌小麦固态发酵萃取物(HEE)对PC12细胞无明显的细胞毒性作用。同时发现, 添加10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 猴头菌固态发酵小麦的萃取物可显著促使PC12细胞产生轴突及分泌NGF。

关键词

猴头菌, 固态发酵, 神经生长因子, 轴突

1. 引言

神经营养因子(neurotrophic factors)是主要调节神经细胞的生长以及活性的因子, 为神经细胞生长的重要因素, 也是维护许多神经元的关键。其中包含有神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、神经营养因子-3(neurotrophin-3, NT-3)、神经营养因子-4/5(neurotrophin-4/5, NT-4/5)、神经营养因子-6(neurotrophin-6, NT-6)。NGF为最早发现并广泛被用于研究的一个神经营养因子, 可防止神经退化, 其分子量约为140 kD, 而这些因子主要可与神经细胞表面上的Tyrosine specific receptor kinases (Trk) A、B、C等专一性接受器结合[1], 进而促使神经细胞的轴突长度增加以利讯息传递。但由于其分子量过大, 无法通过血脑障壁(blood-brain barrier), 故对于脑部神经退化性疾病并无法以外源性方式进行治疗[2] [3]。

猴头菌是中国传统的菇蕈类, 为著名药膳兼用菌[4]。其产地主要为黑龙江、四川、云南、湖北、广西等一带, 而美国、日本、俄罗斯、欧洲也有分布, 在台湾则是分布于南投和宜兰山区[5] [6]。近年来多使用液态发酵的方法培养猴头菌[7] [8], 林玉婷等人[8]将猴头菌液添加至5%葡萄糖培养液下, 培养14天期间的菌丝干重变化, 预活化5天可得最多的菌丝干重为0.54 g, 即发酵液中菌丝浓度为3.6 mg/mL; 孙红斌等人[9]及刘艳芳等人[10]皆以淀粉当作碳源其多醣含量可达0.6 mg/mL以上; Krzyczkowski等人[11]以50 mg/mL葡萄糖、10 mg/mL酵母萃取物、10 mg/mL酪蛋白胨及1.0 mg/mL磷酸二氢钾添加于培养液中, 并于pH 5.0、110 rpm、25°C下进行猴头菌液态发酵8天, 可得猴头素A 192 mg/mL。另一方面也可以固态发酵、椴木栽培及使用瓶栽或袋栽(俗称太空包)的栽培法, 取得菌丝和子实体中含有生理活性的代谢产物, 包括多醣、猴头素(erinacines)、猴头酮(hericenones); 其中猴头素主要来自于猴头菌发酵的菌丝体, 若改以固态发酵可得到产量高之菌丝体, 且培养后期亦会造成子实体生长, 其花费成本低、加工原料少、技术简单并没有操作上的问题, 低水分含量的固态谷类基质也利于真菌的生长, 可大幅缩短后段干燥的时间及成本。

猴头菇及猴头菌发酵产物中之多醣体[12]-[16], 具增强免疫力[17] [18]、抗肿瘤[17]、抗氧化[18]、降

血压[19]、降血糖[20]等生理功能；猴头菇及其菌丝含有猴头素及猴头酮，猴头素具有多种类型，猴头素 A [21] [23]、B [21] [23]、C [23] [24]、E、F、G [25]、H、I [26]、J、K [27]、P [21] [24]、Q [24]和 R [28]，其中 A、B、C、E、F 及 H 均可刺激老鼠星状细胞(rat astroglial cells)分泌神经生长因子(NGF) [23] [25] [26]，其他不同类型之猴头素也可促使神经细胞产生轴突或树突[29]，治疗智力衰退[25]、神经衰弱[30]及抗阿兹海默症、帕金森氏症[21] [22] [25]等效果。猴头酮也具有多种类型，而猴头酮 C、D、E [31] [32]、F、G、H [33]也与 NGF 的合成有关，但两者相较下又以猴头素较能促使神经细胞分泌 NGF [23]。

本研究的目的是探讨以小麦作为基质，进行猴头菌固态发酵，并将 28 天猴头菌小麦固态发酵乙醇萃取物培养于 PC12 神经细胞，观察其生长情形及检测 NGF 含量，以研究其对神经细胞轴突生长之影响。

2. 材料与方 法

2.1. 材 料

猴头菌 *Hericiumerinaceus* (BCRC 36470)购自生物资源保存及研究中心(Hsinchu, Taiwan)。猴头菇子实体购自礁溪松杉灵芝场(Ilan, Taiwan)。大鼠嗜铬性瘤细胞(PC12)由阳明大学附设医院(Ilan, Taiwan)所提供。小麦购自鸿鑫米行(Ilan, Taiwan)。马铃薯葡萄糖洋菜培养基(potato dextrose agar, PDA)、酵母抽出物(yeast extract)购自 Difco Co. (Sparks, MD, USA)。磷酸氢二钾(K_2HPO_4)、硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)、葡萄糖($C_6H_{12}O_6$)、碳酸钙($CaCO_3$)购自日本和光纯药工业株式会社(Osaka, Japan)。乙醇(C_2H_5OH)购自 Lab-Scan (Asia Co., Ltd., USA)。胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)、马血清(Horse serum, HS)、盘尼西林(Penicillin)、左旋麸酰胺酸(L-glutamine)、磷酸缓冲溶液(Phosphate-buffered saline, PBS)购自(Gibco, Grand Island, NY, USA)。Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)、Dimethyl sulfoxide (DMSO)、MTT、Poly-D-Lysine、Trypsin 购自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)。BSA、Tween-20 购自(Gibco, Grand Island, NY, USA)。

2.2. 方 法

2.2.1. 菌种培养与活化

猴头菌 *Hericiumerinaceus* (BCRC 36470)置于 PDA 平板培养基，在 25℃培养箱中培养，每个月继代培养，而长出菌落后将菌丝移至具有挡板三角瓶的 5%葡萄糖培养液(含 5%葡萄糖、0.1%酵母萃取物、0.1%磷酸氢二钾及 0.05%硫酸镁，以蒸馏水定量至 150 mL)，在 25℃、pH 5-6、150 rpm 条件下进行预活化摇瓶培养七天。

2.2.2. 固态发酵

将预活化猴头菌液 10 mL 接种于已杀菌的 1 kg 小麦基质中(含 0.1%酵母萃取物、0.1%磷酸氢二钾、0.1%碳酸钙及 0.05%硫酸镁)，其水分含量约为 50%，于 25℃恒温培养箱中培养 28 天，再将发酵产物进行 121℃杀菌 60 min、50℃热风干燥后并磨粉收集。

2.2.3. 猴头菌小麦固态发酵乙醇萃取物(HEE)与猴头菇子实体乙醇萃取物(FBE)之制备

分别称取已干燥磨粉的猴头菌小麦固态发酵产物和猴头菇子实体 0.2 g，加入 85%乙醇 1 mL 进行超音波震荡 2 h，再以 5000 × g 离心 10 min 后，取上清液以 50℃干浴至干，再加入 1 mL 细胞培养液以超音波震荡 10 min 溶解，最后用 0.22 μm 滤膜过滤，将萃取液配置成适当浓度备用。

2.2.4. 猴头素之高效能液相层析(HPLC)分析

取 5 g 的未发酵小麦原料和猴头菌小麦固态发酵产物，与 15 mL 的乙醇以超音波震荡萃取 10 min，经 6000 × rpm 离心 10 min，进行过滤、减压浓缩，而后加入 15 mL 的乙酸乙酯以超音波震荡回溶，进行过滤、减压浓缩，最后加入乙醇回溶，以 0.22 μm PTFE 滤膜过滤后，进行初步 HPLC 分析猴头菌发酵前

后之变化, 依据 Kenmoku 等人[24]的分析条件使用 C18 (250 × 4.6 mm)为管柱, 移动相: 80% 甲醇, 流速为 1.5 mL/min, 温度条件在室温中进行, 以紫外光检测器测波长: 210 nm, 直到 60 min 结束。其报告指出 HPLC 图谱在 4.1 min 出现的波峰, 经 NMR 和 IR 分析鉴定后分别为猴头素 A。

2.2.5. 神经细胞培养与继代[34]

细胞培养皿先以 50 μg/mL 之 poly-D-lysine 进行涂抹, 待 5 min 后备用, 以利细胞黏着。

大鼠肾上腺髓质嗜铬性细胞瘤细胞株(PC12)培养于含有 1% L-glutamine、1% penicillin、10% FBS 和 5% HS 的 DMEM 培养液中, 调整 pH 7 置于 5% CO₂、90% 相对湿度 37℃ 的恒温培养箱中。约二至三天九成满时, 以 PBS 溶液轻轻延着罐壁清洗细胞, 注入 1.5 mL 0.25% trypsin 拍打使细胞完全剥落, 此时再注入 6 mL 培养液中中止反应, 将细胞均匀冲散、离心, 依实验目的进行继代培养(passage)。

2.2.6. 细胞存活率分析

以细胞存活率试验(MTT assay) [35]评估未发酵小麦萃取物、HEE 和 FBE 处理前后细胞的存活比例。MTT 的基本作用原理, 是利用活细胞内粒线体酵素能将黄色 tetrazolium salt 代谢成 formazan 针状结晶, 再利用有机溶剂 DMSO 将之溶解后可在酵素免疫分析仪(ELISA reader)下读取 560 nm 吸光值, 依据读值的高低可以代表活细胞的多寡。

将 PC12 接种(seeding)约 6×10^4 个细胞于 96 孔盘 24 h, 吸除培养液, 加入不同浓度未发酵小麦乙醇萃取物、HEE 和 FBE 0、1、10 及 100 μg/mL 培养 24 h, 吸除培养液且倒扣拍干, 加入 100 μL MTT 在 37℃ 下作用 3 h, 之后将含有 MTT 的培养液吸除, 加入 100 μL DMSO 将结晶溶解 10 min, 以酵素免疫分析仪读取 560 nm 吸光值。

2.2.7. 神经突触外观分析

将 PC12 接种约 6×10^4 个细胞于 6 孔盘 24 h, 吸除培养液, 加入 1、10 及 100 μg/mL HEE 及 10 μg/mL FBE 培养 72 h, 以 200 倍倒立式显微镜观察并拍摄。

2.2.8. 神经生长因子分析

PC12 神经细胞接种(seeding)约 6×10^4 个细胞于 6 孔盘 24 h, 吸除培养液, 分别加入 10 μg/mL HEE 和 FBE 培养 72 h, 分别取上清液备用测 NGF 分泌量。

利用 Human β-NGF ELISA development kit 分析, ELISA 96 well plate 前置备先用 PBS 稀释 capture antibody 至 1 μg/mL, 立即取 100 μL/well 抗体置 plate, 于室温下放置过夜配用; 再吸除上清液后, 用 300 μL 缓冲液(0.05% Tween-20/PBS)清洗每 well 四次, 最后清洗完后, 用擦手巾铺底, 将 plate 倒扣在纸巾上至干, 每 well 加入 300 μL block buffer (1% BSA/PBS), 于室温下静置至少 1 h, 再吸除上清液并用缓冲液清洗四次备用。

标准液、样品用稀释液将标准液从 2 ng/mL 到 0 稀释, 立即加入 100 μL 标准液、样品(固定浓度)到每 well 三重复, 于室温下静置 2 h, 吸除上清液后用 200 μL 缓冲液清洗每 well 四次且倒扣, 有气泡时需搓破以免残留, 用稀释液稀释 detection antibody 到 0.25 μg/mL, 取 100 μL 至每 well 于室温下静置 2 h, 吸除上清液并用缓冲液清洗四次, 取 5.5 μL avidin-HRP conjugate 用稀释液稀释至总体积 11 μL, 取 100 μL 至每 well 于室温下静置 30 min, 吸除上清液并用缓冲液清洗四次, 加入 100 μL 受质(ABTS 液态受质, 使用前须回温)于室温下反应, 直至颜色产生, 于 ELISA reader 450 nm 侦测颜色变化, 650 nm 校正。

2.2.9. 统计分析

试验结果三重复, 并以平均值±标准偏差表示, 所得之数据使用 Statistical Package for Social Science (SPSS, SPSS INC. 宏德国际软件咨询顾问有限公司) 14.0 版统计软件包进行统计分析, 以多元全距检定分

析(Duncan's Multiple Range Test), 以显著水平 $\alpha = 0.05$, 以较其差异之显著性。

3. 结果与讨论

3.1. 猴头菌固态发酵产物之猴头素分析

将未发酵小麦及猴头菌小麦固态发酵产物进行猴头素之检测, 并以 Kenmoku 等人[24]之报告为对照, 其结果指出 HPLC 图谱在 4.1 min 出现的波峰, 经 NMR 和 IR 分析鉴定后分别为猴头素 A。本研究在相同的 HPLC 分析条件下, 图 1 HPLC 图谱显示未发酵小麦(a)之乙醇萃取物并无 4.1 min 之波峰, 而 HEE 则在 4.1 min 有明显波峰(b), 且此波峰和 Kenmoku 等人[24]的猴头素分析结果接近, 由此波峰之对照可显示, 本研究所使用之猴头菌固态发酵产物, 与一般液态发酵之猴头菌有相同之有效成分猴头素产生, 显示经由固态发酵可节省成本且与一般液态发酵达相同之有效成分。除了本篇所使用之分析条件外, 另有 Krzyczkowski 等人[36]是以 HPLC 分析猴头菌液态发酵产物之乙醇和乙酸乙酯萃取物, 其条件为 C18 管柱, 40°C、70%甲醇水溶液以 1 mL/min 流速冲提, 检测波长为 340 nm, 则于 6.33 min 时同样出现明显猴头素 A 的波峰, 其浓度为 192 mg/mL。

3.2. MTT 细胞存活率试验

进一步检测不同浓度的未发酵小麦乙醇萃取物、HEE 与 FBE 对 PC12 细胞存活率的影响(见表 1), 结果显示, 不同浓度的(1、10、100 $\mu\text{g/mL}$)未发酵小麦乙醇萃取物处理的细胞存活率并无显著差异性, 均不会产生毒性。HEE 及 FBE 均促进 PC12 细胞生长, 且 HEE 在三种不同浓度下均较 FBE 及未发酵小麦乙醇萃取物更有效。

Nagai 等人[37]将 0.01 及 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 猴头菇萃取物培养于小鼠神经细胞瘤细胞系(Neuro2a)中 24 h, 可有效地减少因内质网压力所造成的细胞凋亡, 可将约 10%的细胞存活率提高至约 65%及 75%。Park 等人[29]也取用不同浓度(0.2、0.5、0.8、1 $\mu\text{g/mL}$)的猴头菇菌丝体萃取物将其培养 PC12 细胞 0~8 天, 检测其细胞数目, 可发现添加猴头菇菌丝体萃取物含量越高的组别其细胞数目成长越快, 并无低于控制组的死亡情形, 故均显示猴头菇及其菌丝体萃取物不会造成神经细胞的死亡, 还有助提高其存活率。

3.3. 不同浓度 HEE 对 PC12 神经细胞生长之影响

观察 HEE 浓度对 PC12 细胞生长之影响, 添加浓度 1~100 $\mu\text{g/mL}$ 之 HEE 培养 PC12 细胞 72 h 后, 以酵素免疫分析各浓度之 HEE 促进细胞分泌至胞外之 NGF 总含量, 并与未发酵小麦乙醇萃取物之效果比较。由图 2 摄像观察结果可发现, 控制组(a)并无明显之轴突生长, 各浓度之未发酵小麦萃取物组别(b)(c)(d)也只有少数细胞有单一短小轴突生长, 而 HEE 各浓度组别(f)(g)(h)可观察到许多细胞均有明显较长的轴突之产生及生长, 与 10 $\mu\text{g/mL}$ FBE 组别(e)有相同之生长情形, 其结果显示 HEE 可促使大多数的细胞分化产生明显且多分支之轴突, 并与 FBE 有相同之效果。

3.4. HEE 浓度对 PC12 神经细胞分泌 NGF 含量之影响

接着进一步的分析各种乙醇萃取物促使 PC12 细胞所产生之 NGF 含量。由表 2 的结果显示, 各种浓度之 HEE 均能促使 PC12 细胞分泌 NGF, 其中又以 10 $\mu\text{g/mL}$ 可促使 PC12 细胞分泌于 3 mL 培养液中之 NGF 分泌量最高可达 492.63 pg, 其次为 100 $\mu\text{g/mL}$ 所产生之浓度为 470.46 pg, 添加 1 $\mu\text{g/mL}$ 所产生之浓度为 453.54 pg, 相较控制组 173.54 pg 均达显著差异($p < 0.05$)。而与相同浓度之 10 $\mu\text{g/mL}$ FBE 相较, 无显著之差异。虽未发酵的小麦基质于 NGF 检测中也有提高 NGF 的表现量, 推测可能未发酵小麦的萃取物中虽有一些营养成分可使神经细胞产生 NGF 的表达, 但仍显著低于 HEE 及 FBE 所能促使分泌 NGF

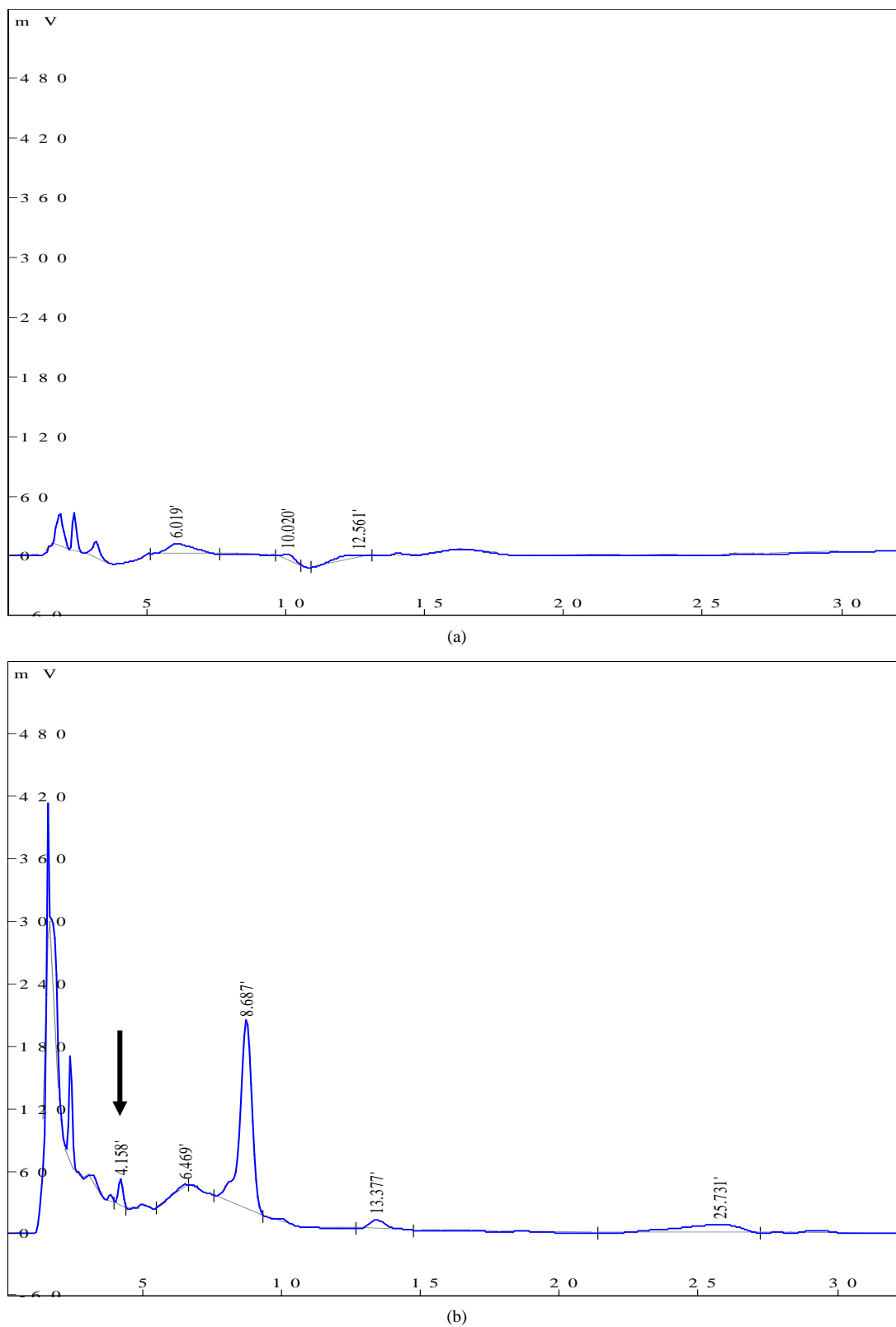


Figure 1. HPLC analysis diagrams of ethanol and ethyl acetate extracts from (a) wheat and (b) *H. erinaceus* 28-days solid-state fermented wheat product

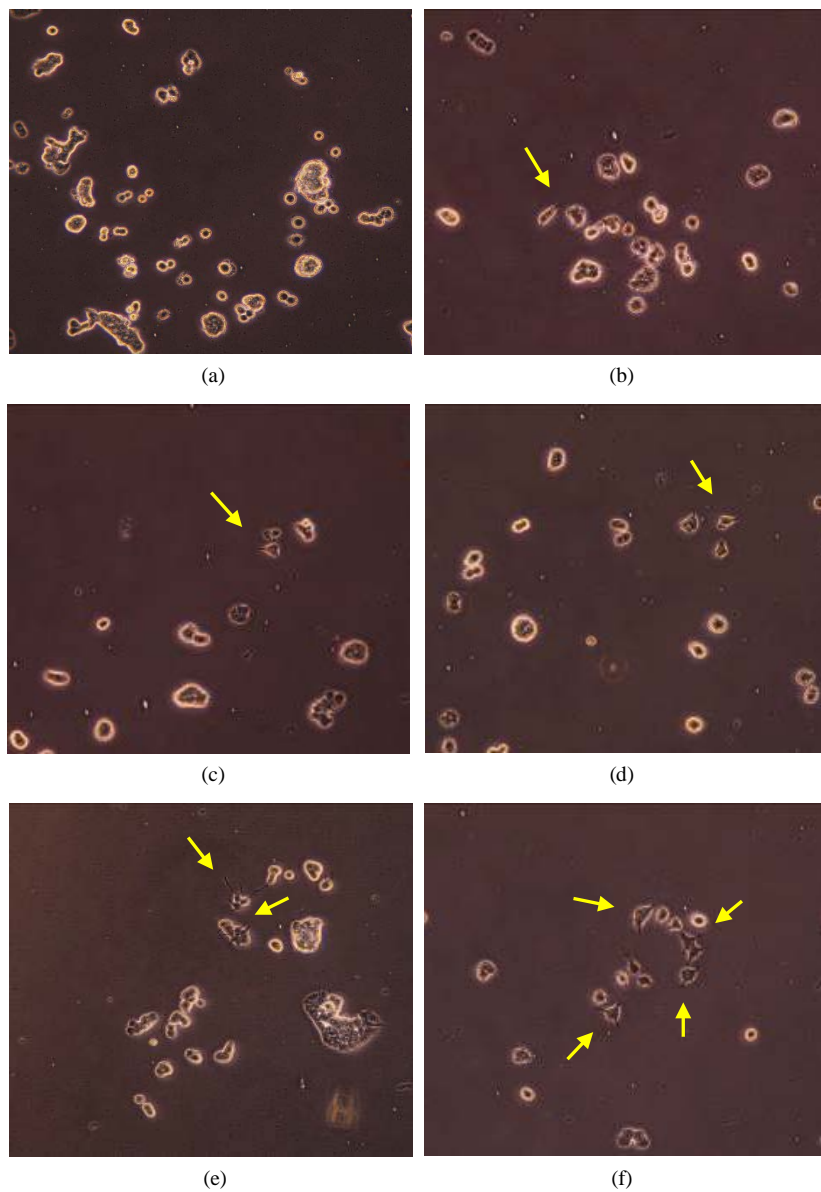
图 1. (a)纯小麦、(b)猴头菌固态发酵 28 天小麦产物的乙醇、乙酸乙酯萃取物之 HPLC 分析图

Table 1. Effect of 1, 10, 100 $\mu\text{g/mL}$ ethanol extracts from wheat, HEE and FBE on PC12 viability at 24 hr cultivation
表 1. 添加 1、10、100 $\mu\text{g/mL}$ 未发酵小麦乙醇萃取物、HEE 和 FBE 对 PC12 培养 24 h 之细胞存活率的影响

乙醇萃取物	细胞存活率(%) ¹		
	浓度($\mu\text{g/mL}$)		
	1	10	100
未发酵小麦	101.02 \pm 0.86 ^a	102.03 \pm 0.57 ^a	109.15 \pm 0.06 ^a
猴头菌固态发酵(HEE)	127.46 \pm 0.72 ^{a*}	122.37 \pm 0.71 ^{b*}	128.81 \pm 1.26 ^{a*}
猴头菇子实体(FBE)	118.64 \pm 0.48 ^a	117.97 \pm 0.52 ^a	118.64 \pm 0.48 ^a

¹Data are expressed as mean \pm S.D. (n = 4). ^{a-b}Means in 1-100 $\mu\text{g/mL}$ groups with different letters are significantly different ($p < 0.05$). ^{*}Mean values in fermented wheat with * are significantly different from different letters ($p < 0.05$).

¹数据表示为平均 \pm S.D. (n = 4); ^{a-b}不同字母表示 1~100 $\mu\text{g/mL}$ 之组别间达显著差异($p < 0.05$); *表示同浓度组别中之发酵产物组别达显著差异 ($p < 0.05$)。



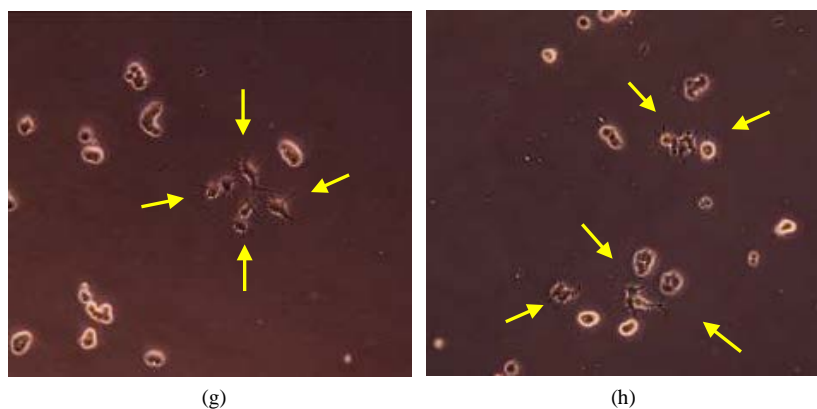


Figure 2. The synapse growth instance of adding different concentration HEE and FBE for PC12 cells after 72 h cultivation. (a) Control; (b) 1 µg/mL unfermented wheat; (c) 10 µg/mL unfermented wheat; (d) 100 µg/mL unfermented wheat; (e) 10 µg/mL FBE; (f) 1 µg/mL HEE; (g) 10 µg/mL HEE (h) 100 µg/mL HEE

图 2. 添加不同浓度未发酵小麦乙醇萃取物、HEE 及 10 µg/mL FBE 培养于 PC12 细胞 72 h 后之生长情形；(a) 控制组；(b) 1 µg/mL 未发酵小麦；(c) 10 µg/mL 未发酵小麦；(d) 100 µg/mL 未发酵小麦；(e) 10 µg/mL FBE；(f) 1 µg/mL HEE；(g) 10 µg/mL HEE；(h) 100 µg/mL HEE；箭头标示为细胞轴突生长处

Table 2. Effect of adding different concentration ethanol extracts from unfermented wheat, HEE and FBE on PC12 cells producing NGF

表 2. 添加不同浓度之未发酵小麦、HEE 及 10 µg/mL FBE 对 PC12 细胞产生 NGF 之影响

浓度(µg/mL)	NGF (pg) ¹			
	控制组	未发酵小麦	猴头菌固态发酵(HEE)	猴头菇子实体(FBE)
0	254.12 ± 25.9 ^d			
1		383.54 ± 23.42 ^b	453.54 ± 5.33 ^a	
10		317.38 ± 10.41 ^c	492.77 ± 7.05 ^a	486.74 ± 75.3 ^a
100		309.69 ± 29.46 ^c	470.46 ± 17.01 ^a	

¹Data are expressed as mean ± S.D. (n = 3); ^{a-b}Means in different NGF group with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

¹数据表示为平均±S.D. (n = 3); ^{a-d}不同字母表示不同 NGF 数值间达显著差异($p < 0.05$)。

之含量。

Mori 等人[38]以不同浓度猴头菇子实体萃取物 50、100 和 150 µg/mL 注入人类星状细胞(1321N1)细胞, 24 h 后检测其合成 NGF 的含量分别约为 60、70 和 175 pg/mL, 而添加 50 及 100 µg/mL 所产生之 NGF 含量并无显著差异。然而在 PC12 神经细胞分化观察中, Mori 等人[38]将 125 及 250 µg/mL 的猴头菇子实体乙醇萃取物先将其培养于 1321N1 细胞中 24 h, 再取其 80% 的培养液培养 PC12 细胞 48 h, 由 PC12 神经细胞产生轴突分化的统计情况也可发现, 125 及 250 µg/mL 的猴头菇萃取物均可间接促使 PC12 细胞产生轴突分化。而本研究则进一步针对 NGF 含量作分析, 也可发现其分泌之 NGF 含量有所提升。故由此结果得知猴头菌固态发酵小麦产物与猴头菇子实体均有促进神经生长之效果, 而猴头菌固态发酵小麦产物可有效缩短其发酵时间, 其萃取物未来可作为健脑食品之发展潜力。

4. 结论

细胞存活率实验中显示 1~100 µg/mL 未发酵小麦萃取物及 HEE 对 PC12 细胞生长之存活率并无显著影响。各浓度之 HEE 均能促使 PC12 产生轴突之生长, 其中又以 10 µg/mL 所产生之 NGF 总含量最高可达 492.63 pg。故采用猴头菌固态发酵菌丝体产物可有效缩短栽培时间, 且促进之 NGF 分泌量与猴头菇子实体相当。

致 谢

本试验感谢农委会科技计划 99 农科-3.1.3-粮-Z1(7) [猴头菌子实体和发酵产物萃取液化学组成和生理功能之探讨(三)]经费支持, 及妍华生技公司的董鸿楠先生协助教导 PC12 细胞的培养, 使本试验得以完成, 特此致谢。

参考文献 (References)

- [1] Schulte-Herbrüggen, O., Jockers-Scherübl, M.C. and Hellweg, R. (2008) Neurotrophins-from pathophysiology to treatment in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, **5**, 38-44.
- [2] Allen, S.J. and Dawbarn, D. (2006) Clinical relevance of the neurotrophins and their receptors. *Clinical Science*, **110**, 175-91.
- [3] Barbara, O.-N. and Bacia, A. (1994) Expression of astroglial nerve growth factor in damaged brain. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, **54**, 73-80.
- [4] 蔡德华, 董洪新, 肖长生, 等 (2003) 猴头菌液体发酵的环境条件试验. *湖北农业科学*, **3**, 78-80.
- [5] 王伯彻 (1990) 食用菌及药用菇系列报导(九)——猴头菌. *食品工业*, **12**, 42-47.
- [6] 王伯彻, 陈启桢, 华杰 (1998) 食药菇类的培养与应用. 食品工业发展研究所, 新竹, 台湾.
- [7] 吴姿宜 (2001) 探讨不同培养方式对猴头菇抗氧化与抗肿瘤性质的影响. 硕士论文, 国立中央大学化学工程所, 新竹, 台湾.
- [8] 林玉婷, 陈淑德, 郑永祥, 等 (2009) 猴头菌发酵米浆之研发. *宜兰大学生物资源学刊*, **2**, 83-89.
- [9] 孙红斌, 刘梅森, 陈海晏 (2001) 液态发酵猴头菌多醣工艺优化研究(I)——碳、氮源对得率的影响. *食品与发酵工业*, **9**, 30-33.
- [10] 刘艳芳, 杨焱, 贾薇, 等 (2003) 猴头菌深层发酵培养基筛选初探. *食用菌学报*, **3**, 26-31.
- [11] Krzyczkowski, W., Malinowska, E. and Herold, F. (2010) Erinacine A biosynthesis in submerged cultivation of *Hericium erinaceum*: Quantification and improved cultivation. *Engineering in Life Sciences*, **10**, 446-457.
- [12] 王进琦, 李聪明, 赖敏男 (1998) 猴头菇以液体浸渍培养产制水溶性多醣类之探讨. *食品科学*, **6**, 714-726.
- [13] 吴云艳, 宋慧, 马福 (2005) 猴头菌属(*Hericium*)真菌多糖的研究进展. *吉林农业大学学报*, **6**, 621-626.
- [14] 但飞君, 付若秋 (2000) 猴头菇的研究概况. *中医药研究*, **4**, 60.
- [15] Jia, L., Liu, L., Dong, Q. and Fang, J. (2004) Structural investigation of a novel rhamnoglucogalactan isolated from the fruiting bodies of the fungus *Hericium erinaceus*. *Carbohydrate Research*, **339**, 2667-2671.
- [16] 姜瑞芝, 王颖, 陈英红 (2007) 猴头菌寡醣的分离及其结构确定. *高等学校化学学报*, **7**, 1313-1315.
- [17] Wang, J.C., Hu, S.H., Su, C.H. and Lee, T.M. (2001) Antitumor and immunoenhancing activities of polysaccharide from culture broth of *Hericium* spp. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, **17**, 461-467.
- [18] 林玉婷 (2009) 研发猴头菌发酵米浆及其抗氧化活性和免疫调节之研究. 硕士论文, 国立宜兰大学食品科学研究所, 宜兰.
- [19] Yang, B.K., Park, J.B. and Song, C.H. (2003) Hypolipidemic effect of exo-biopolymer produced from a submerged mycelial culture of *Hericium erinaceus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **67**, 1292-1298.
- [20] Wang, J.C., Hu, S.H., Wang, J.T., Chen, K.S. and Chia, Y.C. (2005) Hypoglycemic effect of extract of *Hericium erinaceus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **85**, 641-646.
- [21] Kenmoku, H., Sassa, T. and Kato, N. (2000) Isolation of erinacine P, a new parental metabolite of cyathane xylosides, from *Hericium erinaceum* and its biomimetic conversion into erinacines A and B. *Tetrahedron Letters*, **41**, 4389-4393.
- [22] Shimbo, M., Kawagishi, H. and Yokogoshi, H. (2005) Erinacine A increases catecholamine and nerve growth factor content in the central nervous system of rats. *Nutrition Research*, **25**, 617-623.
- [23] Kawagishi, H., Shimada, A., Shirai, R., Okamoto, K., Ojima, F., Sakamoto, H., Ishiguro, Y. and Furukawa, S. (1994) Erinacines A, B and C, strong stimulators of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mycelia of *Hericium erinaceum*. *Tetrahedron Letters*, **35**, 1569-1572.
- [24] Kenmoku, H., Shimai, T., Toyomasu, T., Kato, N. and Sassa, T. (2002) Erinacine Q, a new erinacine from *Hericium erinaceum*, and its biosynthetic route to erinacine C in the basidiomycete. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **66**, 571-575.

- [25] Kawagishi, H., Shimada, A., Hosokawa, S., Mori, H., Sakamoto, H., Ishiguro, Y., Sakemi, S., Bordner, J., Kojima, N. and Furukawa, S. (1996) Erinacines E, F, and G, stimulators of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mycelia of *Hericium erinaceum*. *Tetrahedron Letters*, **37**, 7399-7402.
- [26] Lee, E.W., Shizuki, K., Hosokawa, S., Suzuki, M., Suganuma, H., Inakuma, T., Li, J., Ohnishi-Kameyama, M., Nagata, T., Furukawa, S. and Kawagishi, H. (2000) Two novel diterpenoids, erinacines H and I from the mycelia of *Hericium erinaceum*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **64**, 2402-2405.
- [27] Kawagishi, H., Masui, A., Tokuyama, S. and Nakamura, T. (2006) Erinacines J and K from the mycelia of *Hericium erinaceum*. *Tetrahedron*, **62**, 8463-8466.
- [28] Ma, B.J., Zhou, Y., Li, L.Z., Li, H.M., Gao, Z.M. and Ruan, Y. (2008) A new cyathane-xyloside from the mycelia of *Hericium erinaceum*. *Zeitschrift für Naturforschung*, **63**, 1241-1242.
- [29] Park, Y.S., Lee, H.S., Won, M.H., Lee, J.H., Lee, S.Y. and Lee, H.Y. (2002) Effect of an exo-polysaccharide from the culture broth of *Hericium erinaceus* on enhancement of growth and differentiation of rat adrenal nerve cells. *Cytotechnology*, **39**, 155-162.
- [30] 陈清农, 杨梅春, 陈劲初 (1999) 猴头菌. *乡间小路*, **8**, 34-35.
- [31] Kawagishi, H., Ando, M., Sakamoto, H., Yoshida, S., Ojima, F., Ishiguro, Y., Ukai, N. and Furukawa, S. (1991) Hericenones C, D and E, stimulators of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mushroom *Hericium erinaceum*. *Tetrahedron Letters*, **32**, 4561-4564.
- [32] Arnone, A., Cardillo, R., Nasini, G. and de Pava, O.V. (1994) Secondary mold metabolites: Part 46. hericenones A-C and erinapyrone C, new metabolites produced by the fungus *Hericium erinaceus*. *Journal of Natural Products*, **57**, 602-606.
- [33] Kawagishi, H., Ando, M., Shinbab, K., Sakamoto, H., Yoshida, S., Ojima, F., Ishiguro, Y., Ukaia, N. and Furukawa, S. (1992) Chromans, hericenones F, G and H from the mushroom *Hericium erinaceum*. *International Journal of Plant Sciences*, **32**, 175-178.
- [34] Greene, L. and Tischler, A.S. (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **73**, 2424-2428.
- [35] Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology*, **7**, 145-173.
- [36] Krzyczkowski, W., Malinowska, E., Suchocki, P., Kleps, J., Olejnik, M. and Herold, F. (2009) Isolation and quantitative determination of ergosterol peroxide in various edible mushroom species. *Food Chemistry*, **113**, 351-355.
- [37] Nagai, K., Chiba, A., Nishino, T., Kubota, T. and Kawagishi, H. (2006) Dilinoleoyl-phosphatidylethanolamine from *Hericium erinaceum* protects against ER stress-dependent Neuro2a cell death via protein kinase C pathway. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **17**, 525-530.
- [38] Mori, K., Obara, Y., Hirota, M., Azumi, Y., Kinugasa, S., Inatomi, S. and Nakahata, N. (2008) Nerve growth factor-inducing activity of *Hericium erinaceus* in 1321N1 human astrocytoma cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **31**, 1727-1732.