高筱雅, 牟海津, 郁东兴, 等. 松茸多糖制备及抑制 UVB 诱导黑色素生成和分子机制 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(4): 143−153. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030386
GAO Xiaoya, MOU Haijin, YU Dongxing, et al. Preparation, UVB-induced Melanogenesis Inhibition and Mechanistic Elucidation of *Tricholoma matsutake* Polysaccharides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(4): 143−153. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030386

· 研究与探讨 ·

松茸多糖制备及抑制 UVB 诱导黑色素生成和分子机制

高筱雅[1], 牟海津[1], 郁东兴[2], 刘家鸣[2], 李东钰[1,*]
（1.中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东青岛 266000;
2.山东省宏福慧科技有限公司, 山东临沂 276000）

摘　要: 为探究松茸多糖抑制 UVB 辐射诱导的黑色素生成作用及其分子机制，本研究以松茸（*Tricholoma matsutake*，TM）为原料，采用热水浸提法制备松茸多糖（*Tricholoma matsutake* polysaccharides，TMP），经工艺优化和 DEAE Sepharose Fast Flow 纯化后得到松茸多糖 TMP-N，通过建立小鼠黑色素瘤细胞（Mouse melanoma cells，B16-F10）模型探究了松茸多糖 TMP-N 抑制 UVB 诱导黑色素生成的分子机制。结果表明，松茸多糖 TMP-N 的分子量为 7819.5 Da，主要由葡萄糖、半乳糖、甘露糖和岩藻糖组成；使用 TMP-N 孵育 B16-F10 细胞能够有效抑制酪氨酸酶活性，增强细胞的抗氧化能力，减少 UVB 诱导的黑色素生成；荧光定量 PCR 测定结果表明，该活性可通过调控 PKA 和 MAPK 通路中关键基因的表达而实现。本研究解析了松茸多糖 TMP-N 调控黑色素生成的机制，为天然活性成分替代化学合成光保护剂提供了理论支撑，对 UVB 辐射损伤的安全高效防护具有重要应用价值。

关键词: 松茸, 多糖, UVB, 抗氧化, 黑色素生成
中图分类号: TS201.2　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)04−0143−11
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030386
本文网刊:

Preparation, UVB-induced Melanogenesis Inhibition and Mechanistic Elucidation of *Tricholoma matsutake* Polysaccharides

GAO Xiaoya[1], MOU Haijin[1], YU Dongxing[2], LIU Jiaming[2], LI Dongyu[1,*]
（1.College of Food Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266000, China;
2.Shandong Searsport Biotechnology Company, Linyi 276000, China）

Abstract: In order to investigate the inhibitory effect of *Tricholoma matsutake* polysaccharides (TMP) on UVB radiation-induced melanogenesis and the molecular mechanism of melanin synthesis. The study used *Tricholoma matsutake* as raw material and a new polysaccharide TMP-N was prepared by hot water extraction and DEAE Sepharose Fast Flow purification. The mouse melanoma cells (B16-F10) were utilised as a model to evaluate the effects of TMP-N on melanin content, antioxidant capacity and related gene expression levels after UVB irradiation. The results demonstrated that the molecular weight of TMP-N was 7819.5 Da, mainly composed of glucose, galactose, mannose and fucose. Cellular experimentation demonstrated that the treatment of TMP-N could effectively reduce melanogenesis by inhibiting tyrosinase activity and enhancing the antioxidant capacity of B16-F10 cells. The analysis of the fluorescence quantitative PCR assay demonstrated that TMP-N functioned by downregulating melanogenic pathways through modulation of both PKA and MAPK signalling cascades. This study elucidates the mechanism by which the *T. matsutake* polysaccharide TMP-N regulates melanin production, providing theoretical support for replacing chemically synthesized photoprotective agents with natural bioactive compounds. The results have significant application value in terms of providing safe and effective

收稿日期: 2025−04−01
基金项目: 山东省重点扶持区域引进急需紧缺人才项目; 山东省海洋养殖创新创业共同体（YZ2024004）。
作者简介: 高筱雅（1999−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学与工程, E-mail: 18368908167@163.com。
*** 通信作者:** 李东钰（1992−）, 女, 博士, 讲师, 研究方向: 海洋活性成分功效评价, E-mail: ldy1516@ouc.edu.cn。

protection against UVB radiation damage.

Key words: *Tricholoma matsutake*; polysaccharides; UVB; antioxidant activity; melanogenesis

紫外线(UV)照射会对皮肤健康造成许多不利影响, 如黑色素积累[1]、光老化[2]、细胞凋亡[3] 等, 根据生物效应及波长, 紫外线可划分为 Ultraviolet A(UVA, 320~400 nm)、Ultraviolet B(UVB, 280~320 nm)和 Ultraviolet C(UVC, 100~280 nm)三种类型。近年来, 由于臭氧层的消耗与破坏, 中波段紫外线 UVB 的辐射显著增强, 研究表明, UVB 可直达皮肤的真皮层和表皮层, 诱导黑色素的合成[4], 这不仅会造成色素沉积, 还被证实会造成光老化[5]、光致癌[6] 等严重后果。

黑色素的生成是一个复杂的过程, 需要多种因子的协同参与。其中, 酪氨酸酶(TYR)、酪氨酸酶相关蛋白-1(TRP-1)和酪氨酸酶相关蛋白-2(TRP-2)在这一过程中发挥着重要作用[7], 酪氨酸酶是黑色素合成过程中关键步骤的限速酶[8]。研究表明, 酪氨酸酶的酶活主要受小眼畸形相关转录因子(MITF)的调控[9], 紫外线的刺激能够激活 MITF 的表达, 从而促进其与 TYR 的启动子结合, 最终促进黑色素生成[10]。此外, 抗氧化能力在抑制黑色素生成的过程中具有重要意义[11]。紫外线辐射能够诱导褐黑素通过刺激脂质过氧化而产生大量自由基[12], 这些自由基在黑色素生成的最后阶段通过加速二羟基吲哚和吲哚醌之间的反应来刺激黑色素生成, 进而造成黑色素的积累[13]。

松茸(*T. matsutake*, TM)又称松口蘑、松蕈, 是一种名贵的食药用真菌[14]。松茸多糖在抗黑色素生成和抗氧化[15]、美白[16] 活性方面的研究受到广泛关注。研究表明, 松茸菌丝体多糖具有清除自由基与抗脂质过氧化的能力, 还能通过抑制酪氨酸酶的活性从而展示出美白的潜能[16]。安全等[17] 研究了松茸多糖的提取精制工艺以及美白功效, 结果显示松茸多糖粗提物和精制物均对酪氨酸酶有一定的抑制作用; 程华等[18] 对松茸多糖提取物进行分离纯化, 得到了具有美白功效的松茸多糖 TMSP-6Ⅱ, 实验表明 TMSP-6Ⅱ对酪氨酸酶活性的半抑制浓度(IC_{50})为 136.4 mg/L; 王琪等[19] 的研究进一步表明松茸多糖能够抑制 TYR、MITF 等与酪氨酸酶生成相关的主要因子的基因表达水平, 从而抑制酪氨酸酶的活性, 进而影响黑色素的形成。Yang 等[20] 的研究探讨了松茸多糖提取物 PETM 的安全性和脱色作用, 通过体外和临床实验表明 PETM 显著抑制了 8-MOP 诱导的小鼠黑色素瘤细胞中的黑色素生成, 抑制了相关关键因子的表达。综上可知, 松茸多糖已被证实具有抗氧化与抗黑色素生成的活性, 但其在 UVB 诱导下活性的效果以及抗黑色素生成的详细机制研究还不明确。因此, 本研究通过热水浸提法提取松茸多糖 TMP-N, 并测定其基本结构组成, 以小鼠黑色素瘤细胞 B16-F10 构建 UVB 损伤模型, 结合抗氧化能力评价来探究 TMP-N 抗 UVB 诱导的黑色素生成作用及其机制, 为松茸多糖的进一步开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜松茸 威海迪普森生物科技有限公司; 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS) 大连美仑生物技术有限公司; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH) 上海梯希爱化成工业发展有限公司; 小鼠黑色素瘤细胞 B16-F10 中科院上海细胞库; 酪氨酸酶活性检测试剂盒、丙二醛检测试剂盒(细胞用) 北京索莱宝科技有限公司; 总抗氧化能力(T-AOC)检测试剂盒 南京建成生物工程研究所; BCA 蛋白检测试剂盒 上海源叶生物科技有限公司; SYBR green 荧光染料 上海翌圣公司; 反转录试剂盒 加拿大 ABMgood 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

ELx800 酶标仪 美国 Biotek 公司; 1260 Infinity 高效液相色谱仪 美国 Agilent 公司; Nexus470 红外光谱仪 美国 Thermo Scientific 公司; CB-型超净工作台 北京东联哈尔仪器制造有限公司; 308 nm UVB 照射灯 上海宝山顾村电光仪器厂; HXMETE 紫外辐射照度计 贵州嘉乐岛电子科技有限公司; Wonbio-96c 型高通量细胞破碎仪 上海万柏生物科技有限公司; Gene AmpR PCR 仪 美国 ABI 公司; 2720 Thermal Cycler 型 PCR 仪 德国 Eppendorf 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品制备 新鲜松茸洗净、冻干, 粉碎后过 50 目筛网, 加入 95% 乙醇搅拌脱色 6 h, 沉淀物在 50 ℃ 烘干。按照 1∶20 的料液比称取松茸粉和去离子水, 在 80 ℃ 下, 水浴搅拌 2 h, 上清液中加入 3 倍体积的 95% 乙醇, 充分混匀后在 4 ℃ 下静置 12 h 以上。离心, 沉淀用少量超纯水复溶后, 冻干得到松茸粗多糖(TMP), 其得率的计算公式为:

$$W(\%) = \frac{m_1}{m_2} \times 100$$

式中: W 为粗多糖得率, %; m_1 为冻干得到的粗多糖重量, mg; m_2 为称取的松茸粉末重量, mg。

1.2.2 单因素实验 以温度 80 ℃, 提取时间 2 h, 提取次数 1 次, 料液比 1∶20 为基本实验条件, 以 1.2.1 的方法作为基本实验方案。通过控制单一变量, 以去离子水为溶剂, 松茸多糖得率为指标, 从提取温度、提取时间、提取次数、料液比四个方面考察对得率的影响。在单因素实验中, 设置提取温度为 75、80、85、90、95 ℃; 提取时间为 1、1.5、2、2.5、3 h; 提取次数 1、2、3、4、5 次; 料液比 1∶10、1∶20、1∶30、

1∶40、1∶50 g/mL。

1.2.3　响应面优化松茸粗多糖提取工艺　根据单因素实验优化结果，选择各个因素的合适范围，以松茸粗多糖得率为响应值，设计四因素三水平的 Box-Behnken 试验，确定松茸多糖提取的最佳条件。试验设计因素及水平见下表 1。

表 1　响应面试验设计因素与水平

Table 1　Response surface experimental design factors and levels

水平	因素			
	A: 提取温度(℃)	B: 提取时间(h)	C: 提取次数(次)	D: 料液比(g/mL)
−1	85	1.5	1	10
0	90	2.0	2	20
1	95	2.5	3	30

1.2.4　粗多糖的纯化　使用 DEAE Sepharose Fast Flow 柱对松茸粗多糖进行纯化洗脱[21]。将粗多糖配制为 10 mg/mL 的溶液，过 0.22 μm 水相滤膜。纯化时单次上样量 3 mL，用 0.2 mol/L 的 NaCl 溶液洗脱。流速为 1 mL/min，洗脱液每 2 min 收集一管。苯酚硫酸法检测每管的总糖含量，检测 490 nm 处的吸光值，做洗脱曲线图。收集主要组分，透析除盐，冷冻干燥收集样品。

1.2.5　总糖与总蛋白测定　将纯化后的多糖配制为 1 mg/mL 的溶液。以葡萄糖为标准品，采用苯酚硫酸法测定总糖含量，方法参照国标 GB/T 15672-2009 食用菌中总糖含量的测定进行[22]。采用 BCA 蛋白含量试剂盒测定总蛋白含量，按照试剂盒中提示的方法进行。

1.2.6　松茸多糖结构表征

1.2.6.1　分子量测定　使用 Telgsk G4000 PWXL 柱测定相对分子量。流动相 A 为 0.2 mol/L $NaNO_3$，流动相 B 为 0.01 mol/L NaH_2PO_4，流动相比例为 1∶1。使用不同分子量的葡萄糖标准品绘制标准曲线，横坐标为 lg(Mw)，纵坐标为保留时间。

1.2.6.2　单糖组成测定　采用高效液相色谱(HPLC)测定单糖组成[23]。称取适量样品加 72% 硫酸水解，PMP 柱前衍生法进行上样前处理。流动相 A: 15% 乙腈(采用 0.05 mol/L 的 KH_2PO_4 稀释，pH=6.8)，流动相 B: 40% 乙腈(由 0.05 mol/L 的 KH_2PO_4 稀释，pH=6.8)。按照流动相 A 100%-92%-63%-100%(0-8-37-50 min)进行梯度洗脱。

1.2.6.3　傅里叶变换红外光谱测定　将多糖样品和光谱级 KBr 以 1∶100 的比例混合研磨，波数范围 4000~400 cm^{-1}，使用 FT-IR 进行红外分析[24]。

1.2.7　体外抗氧化能力检测

1.2.7.1　$ABTS^+$自由基清除率　参考 Yuan 等[25] 的方法稍作修改。将 7 mmol/L ABTS 和 2.45 mmol/L 过硫酸钾溶液以 1∶1 的体积比混合，室温避光放置 14 h，得到 ABTS 母液。实验进行时，用适量去离子水稀释得到 ABTS 工作液。配制不同浓度的 TMP-N 溶液，96 孔板上加入 200 μL ABTS 工作液，再加入 10 μL 样品，轻轻混匀后室温孵育 10 min，测定 734 nm 处的吸光度。用去离子水代替样品为空白组，对照组用去离子水代替 ABTS 工作液，V_C 为阳性对照。

$$ABTS^+自由基清除率(\%) = \frac{A_0 - (A_i - A_s)}{A_0} \times 100$$

式中：A_0 为超纯水代替样品时的吸光值；A_i 为样品组吸光值；A_s 为去离子水代替 ABTS 后的吸光值。

1.2.7.2　DPPH 自由基清除率　参考 Ribeiro 等[26] 的方法稍作修改。配制不同浓度的松茸多糖溶液，取上述多糖溶液 0.1 mL 分别加入 0.1 mL 的 DPPH 溶液(浓度为 0.125 mg/mL，用 75% 乙醇溶解)。混匀后室温避光静置 30 min，于 517 nm 处测吸光度。空白组用去离子水代替样品，75% 的乙醇代替 DPPH 工作液为对照组，V_C 为阳性对照。

$$DPPH自由基清除率(\%) = \frac{A_0 - (A_i - A_s)}{A_0} \times 100$$

式中：A_0 为超纯水代替样品时的吸光值；A_i 为样品组吸光值；A_s 为 75% 乙醇代替 DPPH 后的吸光值。

1.2.7.3　羟自由基清除率　参考李菀等[27] 的方法稍作修改。配制不同浓度的松茸多糖溶液，取 0.1 mL 多糖溶液，加入 0.1 mL 硫酸亚铁溶液(9 mmol/L)和 0.1 mL 水杨酸乙醇溶液(9 mmol/L)；混合均匀后立即加入 0.1 mL 过氧化氢溶液(9 mmol/L)，最后加入 1.2 mL 去离子水作为参比溶液；混合均匀，37 ℃ 下恒温水浴 60 min；于 510 nm 处测吸光度。空白组用去离子水代替样品，对照组用去离子水代替过氧化氢，以 V_C 为阳性对照。

$$羟自由基清除率(\%) = \frac{A_0 - (A_i - A_s)}{A_0} \times 100$$

式中：A_0 为超纯水代替样品时的吸光值；A_i 为样品组吸光值；A_s 为超纯水代替过氧化氢后的吸光值。

1.2.8　B16-F10 细胞实验

1.2.8.1　细胞培养方式与 UVB 损伤模型建立方法　B16-F10 细胞在添加 10% 胎牛血清和 1% 青霉素链霉素的 DMEM 培养基中培养。建立 UVB 损伤模型时，在 96 孔板的每个孔中加入 100 μL 细胞悬液，约含有 1×10^4 个细胞。培养 12 h 后，取出培养基，用 PBS 洗涤细胞 3 次。随后将细胞暴露于 6 W，302 nm 的 UVB 灯下进行照射，根据紫外照度计上显示的示数记录照射强度，当强度显示为 100 mJ/cm^2 关闭 UVB 灯，满足这一照射强度的时间约为 10 min，照射后的细胞在显微镜下观察形态正常，未出现明显的细胞碎片。

1.2.8.2　松茸多糖对 B16-F10 细胞增殖的影响　首

先通过 MTT 法检测不同浓度 TMP-N 对 B16-F10 细胞活力的影响[11]。将未经 UVB 照射的 B16-F10 细胞接种到 96 孔培养板中, 37 ℃ 恒温培养箱培养 24 h; 随后用 PBS 洗涤, 每孔分别加入 100 μL 不同浓度的 TMP-N, 37 ℃ 再孵育 24 h。孵育结束后每孔中加入 50 μL 2 mg/mL 的 MTT 溶液, 37 ℃ 下孵育 3 h, 孵育结束后吸干每孔的培养基并加入 200 μL DMSO, 避光水浴振荡 3 h, 酶标仪在波长 540 nm 处检测各孔吸光度。以空白组为对照, 计算细胞存活率。

$$细胞存活率(\%)=\frac{A_2-A_0}{A_1-A_0}\times 100$$

式中: 其中 A_0、A_1 和 A_2 分别为溶剂空白组、阴性对照组和样品组的吸光值。

1.2.8.3 对黑色素生成相关参数的影响 收集 UVB 照射(100 mJ/cm^2)后的细胞, 用不同浓度的松茸多糖处理 24 h, 然后收集细胞。检测 B16-F10 细胞的黑色素含量的变化, 采用氢氧化钠裂解法[28], 将细胞样品溶解在含有 10% DMSO 的 1 mol/L NaOH 中, 80 ℃ 下溶解 1 h。用酶标仪在 405 nm 处测量吸光度。

使用酪氨酸酶检测试剂盒测定细胞内酪氨酸酶活性, 按照试剂盒的指示, 在细胞样品中按照比例加入提取液, 用细胞破碎仪辅助破碎细胞(功率 200 W, 超声 3 s, 间隔 10 s, 重复 30 次), 离心后取上清进行测定。

1.2.8.4 对细胞的抗氧化作用 收集造模后经不同浓度的松茸多糖孵育 24 h 的细胞, 离心去上清, 按照一定的比例加入少量 PBS, 用细胞破碎仪辅助破碎(功率 200 W, 超声 3 s, 间隔 10 s, 重复 30 次)。使用细胞丙二醛(MDA)含量检测试剂盒, 检测 B16-F10 细胞中的脂质氧化水平。同样的方法收集并处理细胞, 使用 ABTS 和 FRAP 总抗氧化能力检测试剂盒检验 B16-F10 细胞的总抗氧化能力(T-AOC)。

1.2.8.5 相关基因表达水平的变化 以不同浓度松茸多糖处理的 B16-F10 细胞的总 RNA 逆转录得到的 cDNA 第一链产物为模板, 向体系中依次加入 SYBR 染色液、去酶水、模板、引物, 反应体系为 20 μL, 混合均匀后放入 q-PCR 仪中进行分析。以 *β*-actin 基因作为内参, 根据每个基因的 Ct 值, 计算 ΔΔCt 数值和差异倍数($2^{-\Delta\Delta Ct}$), 评估不同组间基因转录水平的差异, 分析黑色素生成过程中相关基因的表达水平[19]。引物名称与序列见表 2。

表 2 引物名称与序列

Table 2 Primer names and sequences

引物名称	引物序列
β-actin-F	CACTGTCGAGTCGCGTCC
β-actin-R	TCATCCATGGCGAACTGGTG
MITF-F	GGGAGCTCACAGCGTGTATT
MITF-R	AGCTCCTTAATGCGGTCGTT
ENK-F	GCAATGGTCTGATTCAGGGCT
ENK-R	AGGCTTCCAGATGCGTTCAC
p38 MAPK-F	GGACACCCCCTGCTTATCTC
p38 MAPK-R	TCCAGTAGGTCGACAGCCAG
CREB-F	CCGTCTCCTTTAGCACAGGT
CREB-R	TGTATCCGAGGCCAAAGTCG
TYR-F	TGACAAAGCCAAAACCCCCA
TYR-R	CAGCCATTGTTCAAAAATACTTCCA
TRP-1-F	ACCTCTGCTGCAAGTAGCCT
TRP-1-R	TGGGCAACCATCACTCTGCT

1.3 数据处理

所有实验均重复 3 次, 实验结果以平均值±标准差表示, 使用 SPSS 26、Design Expert 8.0、Origin 2025 软件进行数据统计分析和制图。

2 结果与分析

2.1 多糖提取单因素实验结果

图 1 显示着单因素优化结果。从图 1A 中可知, 多糖得率随着温度升高, 85 ℃ 以上得率趋于稳定, 90 ℃ 时得率达到了 5.60%±0.13%。图 1B 显示随提取时间延长, 多糖得率先上升后下降, 并在 2 h 处得到最大得率为 5.23%±0.08%, 2 h 之后多糖的得率下降, 这可能是由于长时间处在高温环境中引起了部分多糖的降解[29]。图 1C 中, 多糖得率在提取 2 次时达到 5.06%±0.06%, 而继续增加提取次数多糖得率则有所降低, 这可能与反复提取使得细胞被破坏地更加完全从而导致其他成分的溶出有关[30]。料液比对于松茸粗多糖得率的影响如图 1D 所示, 料液比为 1∶20(g/mL)时得率最高, 为 4.90%±0.11%。适宜量的溶剂有利于多糖的提取, 但当料液比较大时也会导致部分非多糖物质的析出, 影响多糖得率[31]。

2.2 响应面试验优化提取工艺结果

2.2.1 响应面模型设计方案与实验结果 参考单因素实验结果, 以松茸多糖得率为响应值, 提取温度、提取时间、提取次数、料液比四个因素为自变量, 采用 Design Expert 8.0 软件设计响应面试验方案, 确定最佳条件。根据软件的设计方案, 按照表 3 中的因素水平分别进行实验, 中心点处重复 3 次, 分别计算松茸多糖得率。

表 4 中可以看出, 模型极显著(P<0.0001)且失拟项(P>0.05)不显著, 模型拟合系数为 0.9786, 校正决定系数为 0.9284, 以上数据表明回归方程与实际情况拟合度高, 本模型中 C.V%=1.93<10, 表明实验的可信度和精确度高[30]。提取温度和料液比对得率(Y)有极显著影响(P<0.01), 提取时间也有显著的影响(P<0.05), 各因素对多糖得率的影响顺序为: 提取温度>料液比>提取时间>提取次数。根据各项的回归系数, 并舍掉不显著项后, 得到模型的回归方程为:

$$Y(\%)=5.94+0.18A+0.066B+0.15D+0.22BC+0.13CD-0.72A^2-0.57B^2-0.44C^2-0.60D^2$$

2.2.2 曲面交互作用分析 图 2A 反映整个响应面模型的拟合趋势, 点均匀分布在线上, 显示出较好的拟合状态。图 2B 中的响应曲面图显示了交互作用显著的 BC 组(P<0.05)和 CD 组(P<0.01)的响应面

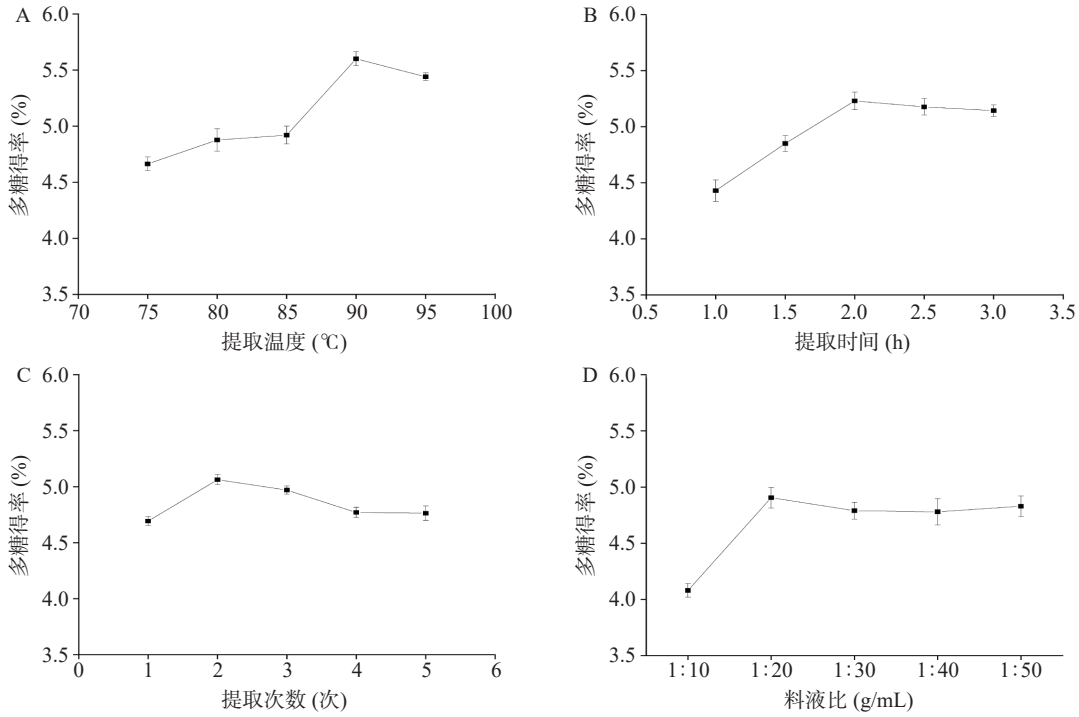


图 1　单因素优化实验结果

Fig.1　Results of one-factor optimization experiments

注：A. 提取温度；B. 提取时间；C. 提取次数；D. 料液比。

表 3　Box-Behnken 试验设计及结果

Table 3　Box-Behnken test design and result

实验号	A：提取温度（℃）	B：提取时间（h）	C：提取次数（次）	D：料液比（g/mL）	Y：得率(%)
1	85	1.5	2	1∶20	4.57
2	95	1.5	2	1∶20	4.65
3	85	2.5	2	1∶20	4.51
4	95	2.5	2	1∶20	4.89
5	90	2.0	1	1∶10	4.99
6	90	2.0	3	1∶10	4.64
7	90	2.0	1	1∶30	4.92
8	90	2.0	3	1∶30	5.09
9	85	2.0	2	1∶10	4.19
10	95	2.0	2	1∶10	4.56
11	85	2.0	2	1∶30	4.60
12	95	2.0	2	1∶30	5.16
13	90	1.5	1	1∶20	5.10
14	90	2.5	1	1∶20	4.8
15	90	1.5	3	1∶20	4.62
16	90	2.5	3	1∶20	5.19
17	85	2.0	1	1∶20	4.58
18	95	2.0	1	1∶20	4.95
19	85	2.0	3	1∶20	4.62
20	95	2.0	3	1∶20	5.01
21	90	1.5	2	1∶10	4.59
22	90	2.5	2	1∶10	4.73
23	90	1.5	2	1∶30	4.79
24	90	2.5	2	1∶30	4.99
25	90	2.0	2	1∶20	5.95
26	90	2.0	2	1∶20	5.88
27	90	2.0	2	1∶20	6.00

表 4　回归方程的分析结果

Table 4　Analysis result of regression equation

项目	平方和	自由度	均方	*F*值	*P*值	显著性
模型	4.93	14	0.35	39.13	<0.0001	**
A-提取温度	0.39	1	0.39	42.81	<0.0001	**
B-提取时间	0.052	1	0.052	5.78	0.0333	*
C-提取次数	2.408×10^{-3}	1	2.408×10^{-3}	0.27	0.6143	
D-料液比	0.29	1	0.29	31.7	0.0001	**
AB	0.023	1	0.023	2.5	0.1398	
AC	1.000×10^{-4}	1	1.000×10^{-4}	0.011	0.9178	
AD	9.025×10^{-3}	1	9.025×10^{-3}	1	0.3363	
BC	0.19	1	0.19	21.03	0.0006	**
BD	9.000×10^{-4}	1	9.000×10^{-4}	0.1	0.7572	
CD	0.068	1	0.068	7.51	0.0179	*
A^2	2.74	1	2.74	304.1	<0.0001	**
B^2	1.76	1	1.76	195.14	<0.0001	**
C^2	1.03	1	1.03	114.11	<0.0001	**
D^2	1.9	1	1.9	210.74	<0.0001	**
残差	0.11	12	8.997×10^{-3}			
失拟项	0.1	10	0.01	2.77	0.2942	不显著
净误差	7.267×10^{-3}	2	3.633×10^{-3}			
总误差	5.04	26				
拟合度			0.9786			
矫正决定系数			0.9284			

注："**"表示差异极显著，$P<0.01$；"*"表示差异显著，$P<0.05$。

等高图和 3D 图。从图 2 中可以看出，BC 和 CD 所形成的响应面曲面坡度较陡，等高线椭圆明显，表示交互作用明显，与方差分析结果一致。

2.2.3　最佳提取条件的确定和验证　基于上述模型，预测松茸粗多糖的最佳提取条件为：提取温度

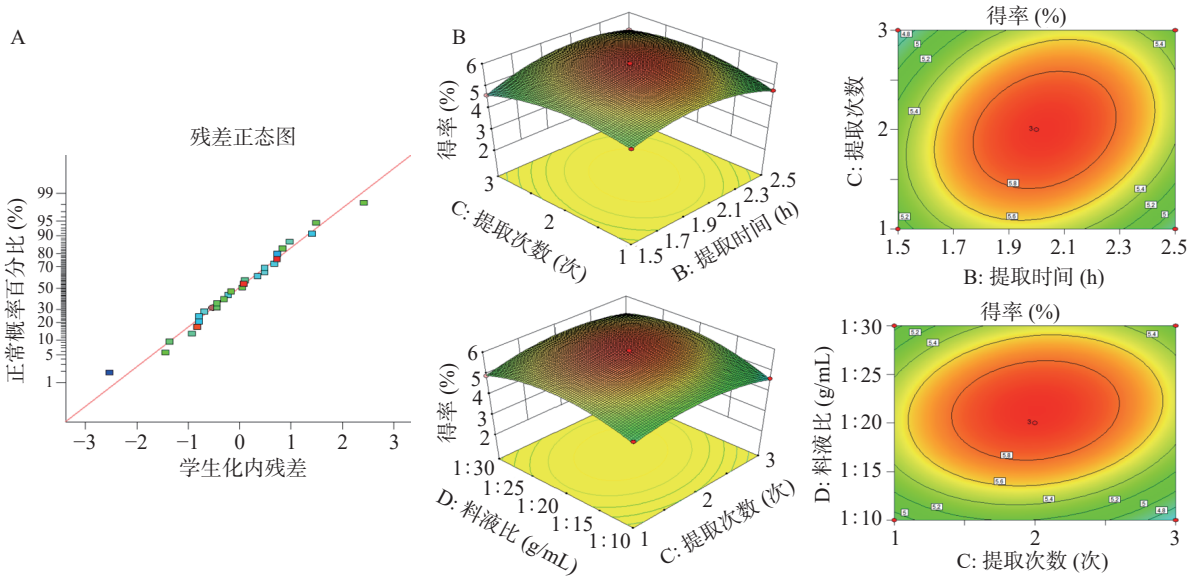


图 2　交互作用分析

Fig.2　Effect of interaction of factors

90.66 ℃, 提取时间 2.04 h, 提取次数 2.02 次, 料液比 1∶21.38 g/mL, 得率为 5.97%。考虑可行性后将条件调整为: 提取温度 91 ℃, 提取时间 2 h, 提取次数 2 次, 料液比 1∶21 g/mL。在此条件下进行了三次平行实验验证, 实际得率分别为 5.93%、5.85%、5.74%, 平均值为 5.84%±0.09%, 与模型预测值较为接近, 当前文献中所报道的松茸多糖得率大多介于 3%[21] 到 9%[15] 之间, 得率的差异可能与松茸样品的种类和处理方式有关。以上结果证明用响应面方法所优化的松茸多糖提取条件对实际提取工艺具有较高的参考价值。

2.3　松茸粗多糖纯化结果

粗多糖经过 DEAE Sepharose Fast Flow 柱洗脱出两个组分, 洗脱曲线如图 3A 所示。收集主要组分并将其命名为 TMP-N, 进行后续实验。同时, 为验证多糖的纯化水平, 测定了纯化后 TMP-N 的总糖与总

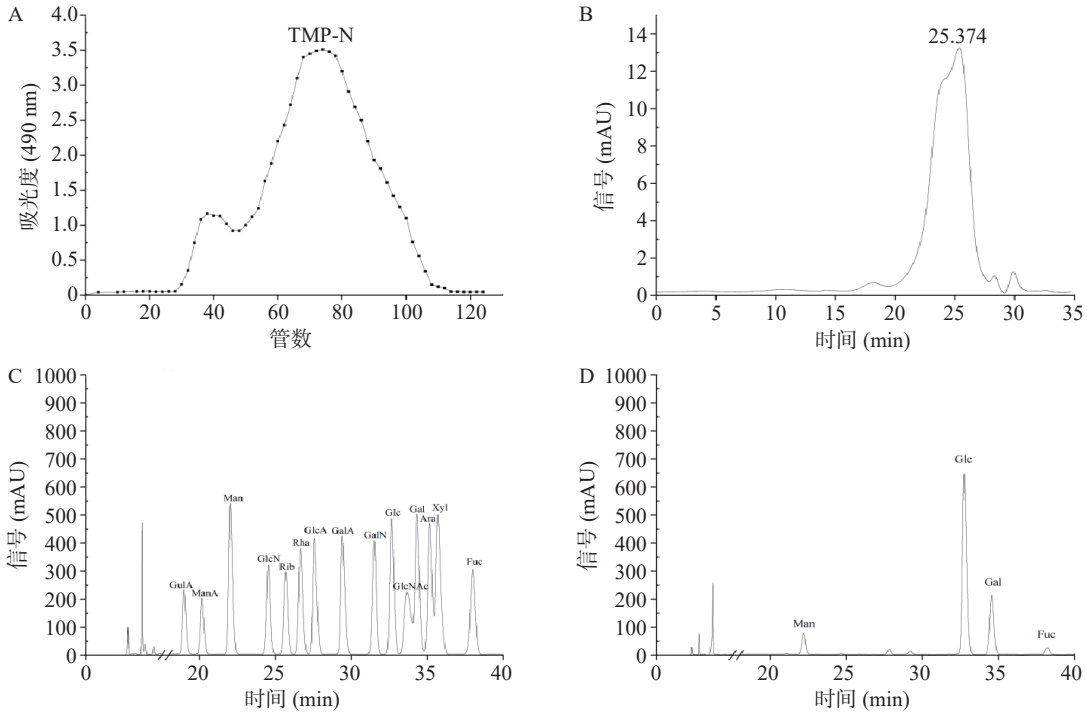


图 3　TMP-N 的纯化与基本结构解析

Fig.3　Purification and basic structure elucidation of TMP-N

注: A. TMP-N 纯化洗脱曲线; B. TMP-N 相对分子量色谱图; C. 单糖标准品色谱图(GulA 为古洛糖醛酸; ManA 为甘露糖醛酸; Man 为甘露糖; GlcN 为氨基葡萄糖; Rib 为核糖; Rha 为鼠李糖; GlcA 为葡萄糖醛酸; GalA 为半乳糖醛酸; GalN 为氨基半乳糖; Glc 为葡萄糖; GlcNAc 为 N-乙酰氨基葡萄糖; Gal 为半乳糖; Ara 为阿拉伯糖; Xyl 为木糖; Fuc 为岩藻糖); D. TMP-N 单糖组成色谱图。

蛋白含量。经实验计算，其总糖和总蛋白含量分别为 89%、6%，这说明 TMP-N 中可能还存在一些连接比较紧密的糖蛋白，无法通过 DEAE 柱的洗脱将其全部除去。

2.4　松茸多糖初级结构表征

2.4.1　相对分子量　相对分子量计算的标准曲线为：$y=-0.2415x+10.021$，$R^2=0.9911$。根据图 3B 计算得到 TMP-N 的分子量 Mw 为 7819.5 Da。

2.4.2　单糖组成　松茸多糖 TMP-N 的液相色谱图如图 3D 所示。TMP-N 主要由甘露糖、葡萄糖、半乳糖和岩藻糖 4 种组分构成，各单糖组成的摩尔质量比分别为 1.66∶26.3∶5.2∶1，其中葡萄糖为主要成分。这与目前已经报道的松茸多糖单糖组成的结果基本一致[32]，但单糖组成的摩尔比存在差异。

2.4.3　红外光谱　TMP-N 的红外光谱图如图 4 所示，参考文献的报道对其进行分析[33]，1450~1200 cm^{-1} 附近的吸收峰为多糖的特征吸收峰，1660 cm^{-1} 附近的峰表明多糖中具有酰胺键。1200~1000 cm^{-1} 区间的特征峰可用来鉴别糖环部分的大小[21]，吡喃糖在此区域出现两个吸收峰，而呋喃糖只有一个吸收峰，图中在此区域有明显的两个峰，表明松茸多糖是吡喃型的多糖。此外，图 4 中 3000~2800 cm^{-1} 区的吸收峰由 C-H 的伸缩振动引起，而 3600~3100 cm^{-1} 区的宽强峰由多糖分子内的 O-H 键或分子间氢键的伸缩振动引起[33]。876 cm^{-1} 的吸收峰代表 TMP-N 具有 β-糖苷键[21]。因此，结合上述分析可知，松茸多糖 TMP-N 可能是含有 β-糖苷键的吡喃型多糖。

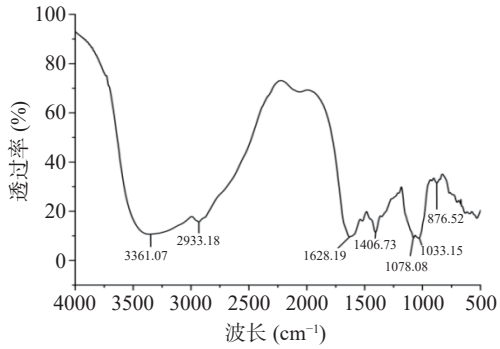


图 4　松茸多糖的红外光谱图

Fig.4　FT-IR spectrum of TMP-N

2.5　松茸多糖体外抗氧化能力

UVB 诱导的损伤与 ROS 介导的氧化应激紧密相关，体外抗氧化能力的检测可以初步验证松茸多糖清除自由基的生物学活性，为后续实验提供参考依据，本研究通过三项自由基清除实验评估松茸多糖的体外抗氧化效果，实验结果如图 5 所示。

结果可知，松茸多糖 TMP-N 清除 $ABTS^+$、DPPH、羟自由基的 IC_{50} 分别为 1.41、1.51、3.49 mg/mL，这与郑爽等[16]、梁双敏等[15] 对松茸多糖体外抗氧化能力的检测结果相似，证明 TMP-N 具备体外抗氧化能力，不同自由基 IC_{50} 值的差异可能与自由基的性质以及不同的抗氧化机理有关[30]。上述结果表明，松茸多糖具备体外抗氧化效果，但对不同自由基的清除效果存在差异。

2.6　松茸多糖对 B16-F10 细胞增殖的影响

通过检测 TMP-N 对 B16-F10 的细胞毒性来评估松茸多糖是否能抑制黑色素瘤细胞的增殖。实验结果如图 6A 所示，松茸多糖 TMP-N 在浓度大于 25 μg/mL 时对黑色素瘤细胞增殖有显著的抑制作用，这在一定程度上证实了 Yang 等[34] 报道的松茸多糖对黑色素瘤的抗肿瘤效果。TMP-N 在浓度小于 25 μg/mL 时表现出较低的细胞毒性，这一浓度低于王琪[19]、Yang 等[20] 的报道，说明 TMP-N 可能具有更强的生物利用度，这可能与其分子量较低有关。因此，结合实验结果，选择在细胞毒性较低范围内的 6、12、25 μg/mL 三个浓度进行进一步的实验。

2.7　松茸多糖对 UVB 诱导的 B16-F10 细胞中黑色素生成相关参数的影响

酪氨酸酶是催化黑色素合成中限速步骤的关键酶，UVB 的照射会刺激酪氨酸酶酶活增强，引起黑色素大量生成，通过抑制酪氨酸酶的酶活可以抑制黑色素的生成[28]。如图 6B 显示，UVB 诱导后，细胞内酪氨酸酶的酶活与空白对照组相比增加了 31.1%，而 TMP-N 干预后的三个浓度组均表现出显著的抑制酪氨酸酶活的效果（$P<0.01$）。

酪氨酸酶的酶活直接影响着细胞内黑色素的含量[16]。如图 6C 所示，B16-F10 细胞在经过 UVB 诱导后，细胞内的黑色素含量显著增加（$P<0.001$），这说

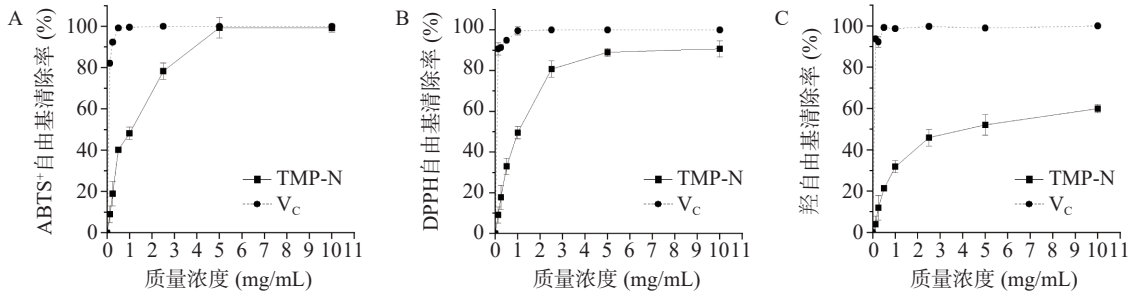


图 5　TMP-N 的体外自由基清除能力

Fig.5　*In vitro* radical scavenging capacity of TMP-N

注：A. $ABTS^+$自由基清除率；B. DPPH 自由基清除率；C. 羟自由基清除率。

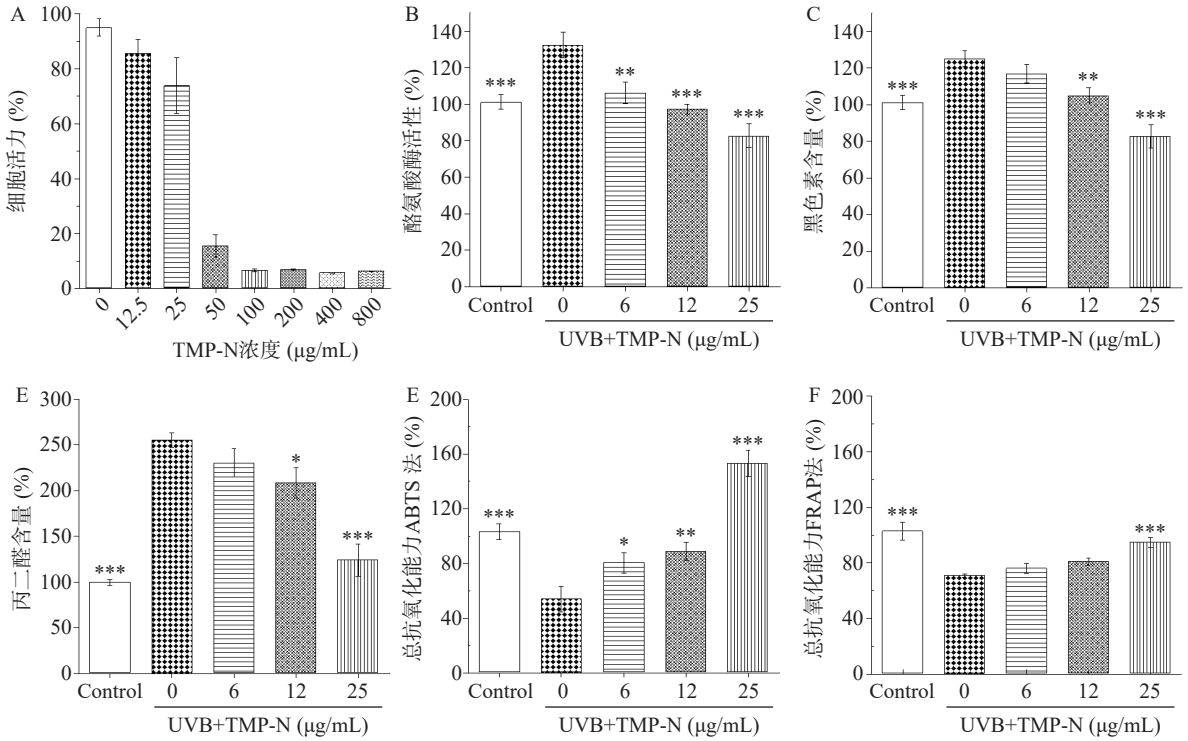


图 6　B16-F10 细胞实验结果

Fig.6　Results of B16-F10 cell experiments

注: A. TMP-N 浓度对 B16-F10 细胞活力的影响; B. 酪氨酸酶活性; C. 黑色素含量; D. 丙二醛含量; E、F. 总抗氧化能力。其中, 显著性与 UVB+0 μg/mL TMP-N 组对比, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001。

明 UVB 诱导了黑色素的大量生成。不同浓度 TMP-N 的处理均降低了细胞内的黑色素含量, 与 UVB 诱导组相比, 12 μg/mL 和 25 μg/mL 的 TMP-N 干预使黑色素含量分别降低 20.0% 和 42.3%(P<0.01)。这一结果说明, TMP-N 的干预能够抑制 UVB 诱导后酪氨酸酶的活性增加, 能够减少细胞内黑色素的含量[13], 且与目前文献 [16−18,19] 中报道过的有效浓度相比, TMP-N 能够在更低浓度下发挥抑制酪氨酸酶活性和减少黑色素生成的效果。

2.8　松茸多糖对 B16-F10 细胞的抗氧化作用

皮肤中的黑色素主要分为真黑素和褐黑素两种类型, 它们的比例决定着皮肤的颜色[13]。当紫外线照射后, 褐黑素通过刺激脂质过氧化而产生大量自由基, 能够加速黑色素的合成并导致其他不良反应[35]。丙二醛(MDA)是脂质过氧化的产物, 这是过量活性氧的积累而造成的损害的一个典型性指标, 实验通过检测细胞内 MDA 的含量来评估脂质过氧化损伤的程度。

如图 6D 所示, UVB 诱导后 B16-F10 细胞的 MDA水平与空白组相比显著升高(P<0.001), TMP-N 的干预能够降低 MDA 水平, 在 25 μg/mL 时的效果极显著(P<0.001)。说明 TMP-N 有抗脂质过氧化的效果, 且作用效果与浓度呈正相关, 这与文献 [16] 报道的松茸多糖可缓解脂质过氧化的结果一致。

黑色素合成的本质是一个氧化过程[13], 提高抗氧化能力对降低 UVB 辐射后细胞中黑色素的合成也具有重要意义。实验分别使用 ABTS 法和 FRAP 法检测了 B16-F10 细胞的总抗氧化能力(图 6E 和图 6F)。与空白对照组相比, UVB 照射后 B16-F10 细胞的总抗氧化能力均显著下降(P<0.001)。在 ABTS 法的实验中, 与 UVB 诱导组相比, 各组 TMP-N 的处理均显著恢复了细胞的抗氧化能力(P<0.05), 其中 25 μg/mL 组的总抗氧化能力提升了 2 倍左右, 抗氧化能力优于空白对照组。在 FRAP 法的检测结果中, 仅在 25 μg/mL 的 TMP-N 干预下显示出抗氧化能力的极显著提升(P<0.001)。总抗氧化能力提升这一结果与 TMP-N 在体外具备清除自由基的抗氧化能力相印证, 表明松茸多糖 TMP-N 能够缓解 UVB 诱导的氧化应激。通过提高细胞的总抗氧化能力, 从而降低黑色素细胞氧化应激的损伤[11], 防止黑色素的进一步合成与积累。

2.9　黑色素合成相关基因表达水平的变化

黑色素的合成是一个复杂的机制, 其产生过程涉及多条信号通路[13]。据报道, 黑色素的合成主要受酪氨酸酶(TYR)和酪氨酸酶相关蛋白(TRP-1/2)的调控[1]。在黑色素细胞中, 酪氨酸酶及其相关蛋白的表达水平受到小眼相关转录因子(MITF)的调控。MITF 是黑色素细胞的主要调控因子, 它控制着对色素合成、黑色素细胞周期进程和分化至关重要的基因的表达[9], 其表达水平与 PKA 和 MAPK 通路密切相关[11]。因此, 为了说明 TMP-N 抑制 UVB 诱导的黑色素生成机制, 本实验通过 q-PCR 检测了 PKA 和 MAPK 通路中关键因子表达水平的变化, 结果如图 7 所示。

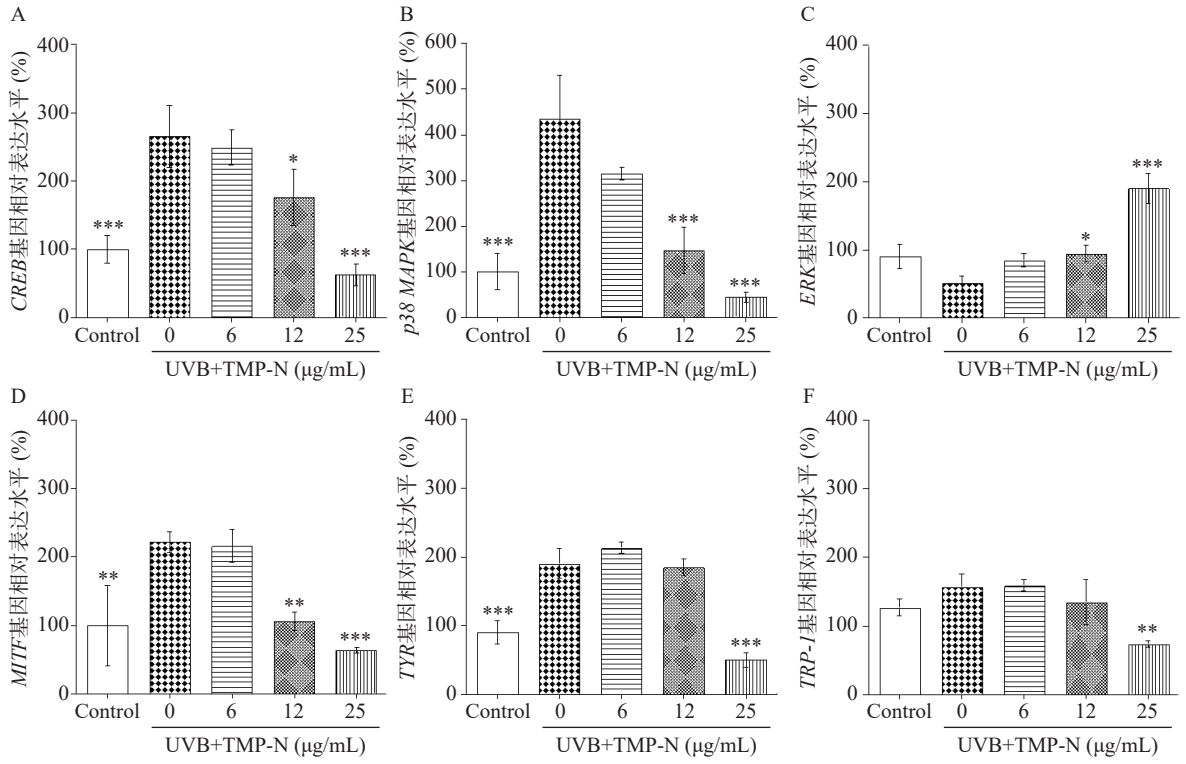


图 7　相关基因表达水平

Fig.7　Expression levels of related genes

注：A. *CREB* 基因；B. *p38 MAPK* 基因；C. *ERK* 基因；D. *MITF* 基因；E. *TYR* 基因；F. *TRP-1* 基因。其中，显著性与 UVB+0 μg/mL TMP-N 组对比，**P*<0.05，***P*<0.01，****P*<0.001。

q-PCR 的实验结果显示，与空白对照组相比，UVB 照射诱导后，B16-F10 细胞中 *CREB*、*p38 MAPK*、*MITF*、*TYR* 和 *TRP-1* 基因的表达水平上调，且除 *TRP-1* 外，表达水平的变化均具有显著性（*P*<0.05）。TMP-N 干预后，有 5 个基因的表达水平显示出下调趋势。与 UVB 诱导组相比，在 25 μg/mL 的 TMP-N 干预下，*CREB*、*p38 MAPK* 和 *MITF*、*TYR*、*TRP-1* 的基因表达水平均显著下调（*P*<0.05）。同时，UVB 照射抑制了 *ERK* 基因的表达，25 μg/mL 的 TMP-N 干预上调 *ERK* 基因的表达水平为极显著（*P*<0.001）。

PKA 信号通路在黑素生成过程中起着重要作用[36]。当受到紫外线刺激时，这条通路上的关键因子 *CREB* 将会被激活，进而上调 *MITF* 的表达。*MITF* 将结合并触发 TYR 启动子进行 *TYR* 基因的转录，以此来增加黑色素的合成[37]。由实验结果可知，UVB 诱导后，*CERB* 的表达水平相比于空白对照组上调了 2.6 倍，*MITF* 的表达水平相比与空白对照组上调了 2.2 倍，均显著增强（*P*<0.01），12 μg/mL 和 25 μg/mL 组 TMP-N 的干预均显著下调了 *CERB* 和 *MITF* 的表达（*P*<0.05），表明 PKA 信号通路受到抑制。

MITF 也受到 MAPK 信号通路的调节[38]。当 UVB 照射刺激细胞时，MAPK 信号通路上的 *ERK* 表达被抑制，它与 *MITF* 之间存在着一种负反馈调节机制[39]，而同在 MAPK 通路上的 *p38 MAPK* 基因的表达将会在 UVB 的照射后增加，其表达水平相比于空白对照组上调了 4.34 倍，这一结果与空白组相比极显著（*P*<0.001），p38 MAPK 蛋白的磷酸化可以激活 MITF，以此进一步增加黑色素的合成[40]。12 μg/mL 和 25 μg/mL 组 TMP-N 的干预均能显著上调 *ERK* 的基因表达（*P*<0.05），抑制 *p38 MAPK* 基因的表达，这表明 TMP-N 的干预也能够调控 MAPK 信号通路。

实验结果可知，TMP-N 的干预能够恢复由 UVB 照射引起的 *CREB*、*p38 MAPK*、*JNK* 的转录水平异常，并激活 *ERK* 的表达，表明 TMP-N 能够调控 PKA 和 MAPK 通路。这一结果与 Hu 等[41] 关于灵芝多糖抑制 UVB 诱导的黑色素生成实验结果一致，在松茸中验证了真菌多糖抑制黑色素生成的机制涉及 *PKA* 和 *MAPK* 通路的调节。*ERK* 的激活以及 *CREB* 等基因的下调将抑制 *MITF* 基因的转录水平，从而抑制 *TYR* 基因的表达水平，影响酪氨酸酶的活性，降低 *TRP-1* 的表达，最终减少黑色素的生成。在现有的研究中，王琪等[19] 使用未经外界刺激诱导的基础模型研究松茸多糖的美白活性，结果表明松茸多糖 TMSP-5 亚组分Ⅱ可以通过降低 *MITF* 和 *TYR* 基因的表达水平来减少黑色素的生成；Yang 等[20] 通过体外和临床试验探讨了松茸多糖 PETM 的安全性和脱色作用，表明 PETM 显著抑制了 8-MOP 诱导的 B16-F10 细胞中的黑色素生成，抑制了 JNK 介导的相关途径中关键因子的表达，但基础细胞模型与 8-MOP

的刺激无法对机体造成氧化应激，因此该模型与真实皮肤应激状态存在差异。本研究证实了松茸多糖 TMP-N 能够在 B16-F10 细胞中抑制 UVB 诱导的黑色素生成，这一模型更加切合真实皮肤受到紫外刺激后的状态，且 TMP-N 在比 TMSP-5 亚组分Ⅱ与 PETM 更低的浓度状态下就能表现出抑制相关基因的表达与减少黑色素生成的效果。以上结果表明，TMP-N 的干预可以有效抑制 UVB 诱导的黑色素大量合成，这一活性是通过调控 PKA 和 MAPK 通路关键基因的表达水平来实现的。

3 结论

多种真菌多糖已被报道能够通过抗氧化、抑制酪氨酸酶活性、调控黑色素生成相关通路等方式来抑制 UVB 诱导的黑色素生成。本研究通过热水浸提与纯化得到松茸多糖 TMP-N，这是一种由 β-糖苷键连接的吡喃型多糖，分子量 Mw 为 7819.5 Da，单糖组成主要为葡萄糖、半乳糖、甘露糖和岩藻糖。在 UVB 照射损伤的 B16-F10 细胞模型中，25 μg/mL 的 TMP-N 可以有效抑制酪氨酸酶的活性、减少黑色素含量，同时能够缓解脂质过氧化，提高细胞的抗氧化能力。q-PCR 的实验结果进一步表明，TMP-N 抑制 UVB 照射诱导的黑色素生成是通过调控 PKA 和 MAPK 通路上关键基因表达水平的变化来实现的。综上，本研究验证了松茸多糖 TMP-N 抗 UVB 诱导的黑色素生成作用，为松茸多糖在减少色素沉积、修复 UVB 损伤等光保护领域的应用提供了理论参考。未来将借助皮肤模型进一步探究松茸多糖抑制黑色素的分子机制和构效关系，以期为天然成分用作光保护剂的开发与结构优化提供精准指导。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] PAN Chunxing, LIU Xiaoying, ZHENG Yating, et al. The mechanisms of melanogenesis inhibition by glabridin: Molecular docking, PKA/MITF and MAPK/MITF pathways[J]. Food Science and Human Wellness, 2023, 12(1): 212−222.

[2] OUYANG Qianqian, LI Yancai, MEI Si, et al. Protective effects of GLHP from *Gracilaria lemaneiformis* against UVB-induced photodamage in human immortalized keratinocytes cells and BALB/c mice[J]. Experimental Gerontology, 2021, 155: 111550.

[3] PARK G, SIM Y, LEE W, et al. Protection on skin aging mediated by antiapoptosis effects of the water lily (*Nymphaea tetragona* Georgi) via reactive oxygen species scavenging in human epidermal keratinocytes[J]. Pharmacology, 2016, 97(5−6): 282−293.

[4] MARIONNET C, TRICAUD C, BERNERD F. Exposure to non-extreme solar UV daylight: Spectral characterization, effects on skin and photoprotection[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(1): 68−90.

[5] SALMINEN A, KAARNIRANTA K, KAUPPINEN A. Photoaging: UV radiation-induced inflammation and immunosuppression accelerate the aging process in the skin[J]. Inflammation Research, 2022, 71(7): 817−831.

[6] KLIGMAN L H, AKIN F J, KLIGMAN A M. Sunscreens prevent ultraviolet photocarcinogenesis[J]. Journal of the American Academy of Dermatology, 1980, 3(1): 30−35.

[7] SNYMAN M, WALSDORF R E, WIX S N, et al. The metabolism of melanin synthesis: From melanocytes to melanoma[J]. Pigment Cell & Melanoma Research, 2024, 37(4): 438−452.

[8] 刘露露, 张思瑾, 秦少通, 等. 酸枣叶缩合单宁的分离鉴定及其对黑色素生成的抑制机制[J]. 食品工业科技, 2023, 44(1): 78−86. [LIU L L, ZHANG S J, QIN S T, et al. Isolation and identification of condensed tannins from *Ziziphus jujuba* leaves and their inhibition mechanism for melanogenesis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(1): 78−86.]

[9] LIU Zaizhou, CHEN Kaige, DAI Jun, et al. A unique hyperdynamic dimer interface permits small molecule perturbation of the melanoma on coprotein MITF for melanoma therapy[J]. Cell Research, 2023, 33(1): 55−70.

[10] BALLESTEROS-ÁLVAREZ J, DILSHAT R, FOCK V, et al. MITF and TFEB cross-regulation in melanoma cells[J]. PLoS One, 2020, 15(9): e0238546.

[11] CHEN Haoying, LIN Changhui, WU Yan, et al. Protective effects of degraded *Bletilla striata* polysaccharides against UVB-induced oxidative stress in skin[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 277: 134462.

[12] NAPOLITANO A, PANZELLA L, MONFRECOLA G, et al. Pheomelanin-induced oxidative stress: Bright and dark chemistry bridging red hair phenotype and melanoma[J]. Pigment Cell & Melanoma Research, 2014, 27(5): 721−733.

[13] SOLANO F. Photoprotection and skin pigmentation: Melanin-related molecules and some other new agents obtained from natural sources[J]. Molecules, 2020, 25(7): 1537.

[14] 黄振帝, 苗华彪, 裴丁玉, 等. Active components and their research progress of *Tricholoma matsutake*[J]. Mycosystema, 2023, 42(10): 2025−2040. [HUANG Z D, MIAO H B, PEI D Y, et al. Active components and their research progress of *Tricholoma matsutake*[J]. Mycosystema, 2023, 42(10): 2025−2040.]

[15] 梁双敏, 国琦, 葛长荣, 等. 松茸粗多糖的提取工艺优化、单糖组成及体外抗氧化活性[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2024, 39(2): 108−118. [LIANG S M, GUO Q, GE C R, et al. Optimization extraction, monosaccharide composition and antioxidant activity *in vitro* of polysaccharide from *Tricholoma matsutake*[J]. Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science), 2024, 39(2): 108−118.]

[16] 郑爽, 李长田, 李玉. 松茸菌丝体美白抗氧化特性的研究[J]. 中国食用菌, 2014, 33(4): 50−54. [ZHEN S, LI C T, LI Y. Research on the whitening effectiveness and antioxidant ability of polysaccharide from *Tricholoma matsutake* mycelia[J]. Edible Fungi of China, 2014, 33(4): 50−54.]

[17] 安全, 李国庆, 李学涛, 等. 松茸多糖的提取精制工艺及其美白功效验证[J]. 香料香精化妆品, 2022(4): 82−88,115. [AN Q, LI G Q, LI X T, et al. Extraction and refining process of polysaccharide from *Tricholoma matsutake* and verification of its whitening effect[J]. Flavour Fragrance Cosmetics, 2022(4): 82−88,115.]

[18] 程华, 刘月恒, 刘晓英, 等. 松茸多糖的分离纯化和美白功效研究[J]. 日用化学工业, 2013, 43(2): 134−138. [CHENG H, LIU Y H, LIU X Y, et al. Separation and purification as well as whitening efficacy of polysaccharide from *Tricholoma matsutake*[J]. China Surfactant Detergent & Cosmetics, 2013, 43(2): 134−138.]

［19］ 王琪, 王领, 何聪芬, 等. 松茸多糖 TMSP-5 亚组分Ⅱ的美白活性及途径研究[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(1): 134−138. ［WANG Q, WANG L, HE C F, et al. Study on the whitening activity and pathway of *Tricholoma matsutake* TMSP-5 Ⅱ[J]. Natural Product Research and Development, 2015, 27(1): 134−138.］
［20］ YANG Yang, LÜ Zheng, AN Quan, et al. *Tricholoma matsutake* polysaccharides suppress excessive melanogenesis via JNK-mediated pathway: Investigation in 8-methoxypsoralen induced B16−F10 melanoma cells and clinical study[J]. Heliyon, 2024, 10(8): e29363.
［21］ YANG Huirong, CHEN Lianhong, ZENG Yingjie. Structure, antioxidant activity and *in vitro* hypoglycemic activity of a polysaccharide purified from *Tricholoma matsutake*[J]. Foods, 2021, 10(9): 2184.
［22］ 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局、中国国家标准化管理委员会. GB/T 15672-2009 食用菌中总糖含量的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009. ［The General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China and the National Standardization Administration of China. GB/T 15672-2009 Determination of total sugar content in edible Fungi[S]. Beijing: Standard Press of China, 2009.］
［23］ 谭婉, 卫阳飞, 李枫林, 等. 黑果枸杞果实多糖的超声辅助双水相萃取工艺优化、单糖组成分析及胰脂肪酶抑制活性评价[J]. 食品工业科技, 2024, 45(22): 158−168. ［TAN W, WEI Y F, LI F L, et al. Optimization of the ultrasonic-assisted aqueous two-phase extraction of *Lycium ruthenicum* polysaccharides and its monosaccharide composition and pancreatic lipase inhibitory activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(22): 158−168.］
［24］ 康桥, 孙越, 刘梦瑶, 等. 金铃子果皮多糖超声辅助提取工艺优化及其抗氧化和降糖活性研究[J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 164−173. ［KANG Q, SUN Y, LIU M Y, et al. Optimization of the ultrasonic-assisted extraction process of polysaccharides from the peels of wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn. Var. *abbreviata* Ser.) and a preliminary study on their antioxidant and hypoglycemic activities[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 164−173.］
［25］ YUAN Shuwei, WANG Jiahui, LI Xiang, et al. Study on the structure, antioxidant activity and degradation pattern of polysaccharides isolated from *Lotus* seedpod[J]. Carbohydrate Polymers, 2023, 316: 121065.
［26］ RIBEIRO D A, CAMILO C J, DE FÁTIMA ALVES NONATO C, et al. Influence of seasonal variation on phenolic content and *in vitro* antioxidant activity of *Secondatia floribunda* A. DC. (Apocynaceae)[J]. Food Chemistry, 2020, 315: 126277.
［27］ 李菀, 胡月, 李光霞, 等. 纤维素酶和果胶酶提取对甘草渣多糖抗氧化和抗肿瘤性能的影响[J]. 食品工业科技, 2020, 41(9): 309−313,319. ［LI W, HU Y, LI G X, et al. Effects of cellulase and pectinase extraction on the antioxidant and antitumor activities of licorice residue polysaccharide[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(9): 309−313,319.］
［28］ 郑逸帆, 杨丰绮, 付晓婷, 等. 喇叭藻岩藻多糖的抗黑色素生成和抗皱功效[J]. 食品工业科技, 2025, 46(14): 441−447. ［ZHENG Y F, YANG F Q, FU X T, et al. Anti-melanogenesis and anti-wrinkle effects of the fucoidan isolated from *Turbinaria ornata*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(14): 441−447.］
［29］ FENG Shiling, TANG Min, JIANG Zhengfeng, et al. Optimization of extraction process, structure characterization, and antioxidant activity of polysaccharides from different parts of *Camellia oleifera* Abel[J]. Foods, 2022, 11(20): 3185.
［30］ 曹建昌, 李若彤, 曾芬, 等. 藜蒿秆多糖提取工艺优化及抗氧化、α-葡萄糖苷酶抑制活性分析[J]. 食品工业科技, 2025, 46(17): 282−291. ［CAO J C, LI R T, ZENG F, et al. Optimisation of extraction process of polysaccharides from *Artemisia selengensis* Turcz stems and analysis of its antioxidant and α-glucosidase inhibitory activities[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(17): 282−291.］
［31］ CHEN Yaxian, CAI Yini, ZHAO Zhimin, et al. Optimization of extraction process, preliminary characterization and safety study of crude polysaccharides from *Morindae officinalis Radix*[J]. Foods, 2023, 12(8): 1590.
［32］ DING Xiang, FENG Su, CAO Mei, et al. Structure characterization of polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Tricholoma matsutake*[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 81(4): 942−947.
［33］ CHENG Hua, JIA Yan, WANG Ling, et al. Isolation and structural elucidation of a novel homogenous polysaccharide from *Tricholoma matsutake*[J]. Natural Product Research, 2016, 30(1): 58−64.
［34］ YANG Shuang, REN Xiaodong, SHENG Jingxue, et al. Preparation and the antitumor activity *in vitro* of polysaccharides from *Tricholoma matsutake*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 26(3): 497−503.
［35］ JAYAWARDENA T U, WANG L, ASANKA SANJEEWA K K, et al. Antioxidant potential of sulfated polysaccharides from *Padina boryana*; protective effect against oxidative stress in *in vitro* and *in vivo* zebrafish model[J]. Marine Drugs, 2020, 18(4): 212.
［36］ CHEN Yanmei, SU Weichao, LI Chen, et al. Anti-melanogenesis of novel kojic acid derivatives in B16F10 cells and zebrafish[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 123: 723−731.
［37］ BERTOLOTTO C, ABBE P, HEMESATH T J, et al. Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes[J]. The Journal of Cell Biology, 1998, 142(3): 827−835.
［38］ WANG L, OH J Y, JAYAWARDENA T U, et al. Anti-inflammatory and anti-melanogenesis activities of sulfated polysaccharides isolated from *Hizikia fusiforme*: Short communication[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 142: 545−550.
［39］ WANG L, OH J Y, KIM Y S, et al. Anti-photoaging and anti-melanogenesis effects of fucoidan isolated from *Hizikia fusiforme* and its underlying mechanisms[J]. Marine Drugs, 2020, 18(8): 427.
［40］ KANG S, CHOI B, LEE E, et al. Inhibitory effect of dried pomegranate concentration powder on melanogenesis in B16F10 melanoma cells; involvement of p38 and PKA signaling pathways [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(10): 24219−24242.
［41］ HU Shuanghai, HUANG Jinhua, PEI Shiyao, et al. *Ganoderma lucidum* polysaccharide inhibits UVB-induced melanogenesis by antagonizing cAMP/PKA and ROS/MAPK signaling pathways[J]. Journal of Cellular Physiology, 2019, 234(5): 7330−7340.