

水溶性黑木耳根多糖对四氯化碳所致小鼠肝损伤的保护作用

郭国丽, 陈悦, 佟长青, 曲敏, 李伟*

(大连海洋大学食品科学与工程学院, 辽宁大连 116023)

摘要: 研究黑木耳根多糖的特性及其对四氯化碳(CCl₄)所致小鼠肝损伤的保护作用。采用热水浸提及乙醇沉淀方法从黑木耳根中提取水溶性粗多糖(AARP)。采用分子筛层析法测定所提取的AARP的相对分子量约为 8.6×10^5 u。HPLC层析分析AARP由6种单糖组成, 其甘露糖:鼠李糖:葡萄糖:半乳糖:木糖:岩藻糖的摩尔比为3.389:0.406:7.003:1.248:1.405:4.86:0.45。与模型组相比, AARP中(50 mg/(kg·d))、高(100 mg/(kg·d))剂量组可极显著抑制CCl₄所致小鼠肝损伤的血清中AST活性的升高, 极显著降低了肝组织中MDA的含量, 并且抑制肝组织中SOD活性的下降。结果表明, AARP对CCl₄所致小鼠肝损伤具有保护作用。

关键词: 黑木耳根, 多糖, 四氯化碳, 肝损伤

A water-soluble polysaccharide from *Auricularia auricula* root and its hepatoprotective effect against acute carbon tetrachloride-induced liver injury in mice

GUO Guo-li, CHEN Yue, TONG Chang-qing, QU Min, LI Wei*

(College of Food Science and Engineering, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

Abstract: To study the characteristic of the *Auricularia auricula* root polysaccharide(AARP) and protective effect of AARP on acute carbon tetrachloride-induced liver injury. A water-soluble AARP was isolated by hot-water extraction and 80% (v/v) ethanol precipitation. Based on the calibration with Dextran, AARP had a molecular weight of approximately 8.6×10^5 u. The quantification of monosaccharides of AARP was analyzed using high-performance liquid chromatography. According to the corresponding relationship of peak and migration time, AARP mainly consisted of six kinds of monosaccharides apparently. The mole ratio of mannose, rhamnose, glucose, galactose, xylose and fucose of AARP were calculated as 3.389:0.406:7.003:1.248:1.405:4.86:0.45. The protective effect of AARP on acute carbon tetrachloride-induced liver injury was investigated in mice. Compared with model control group, treatment with middle(50 mg/(kg·d)) and high(100 mg/(kg·d)) doses of AARP were significantly decreased serum aspartate aminotransferase (AST) and malondialdehyde aldehyde (MDA) levels, increased superoxide dismutase (SOD) activity, and improved hepatic injury in the acute model of liver injury in mice. These results suggest that AARP possesses potent hepatoprotective activity.

Key words: *Auricularia auricula* root; polysaccharide; carbon tetrachloride; liver injury

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)24-0341-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.24.066

黑木耳 (*Auricularia auriculajudae*) 又名木耳、光木耳, 属于真菌学分类属担子菌纲, 木耳目, 木耳科。吴瑞宪对黑木耳的营养成分做了全面的分析, 发现它富含大量的糖类和蛋白质, 同时也是一种钙和铁含量较高的食品^[1]。我国黑木耳资源丰富, 为黑木耳的开发及研究应用提供了有利条件。随着人们营养及保健意识的增强, 对黑木耳营养成分及在医疗保

健作用方面的研究也逐步深入。黑木耳多糖(AAP)具有重要的生物活性, 如抗肿瘤^[2]、降胆固醇、降血脂^[3]、提高免疫活性、抗衰老^[4]、降血糖^[5]、抗辐射、抗突变、抗病毒等活性。因此, 黑木耳多糖成为食品领域研究和开发的热点。然而关于从黑木耳根中提取多糖及其活性的研究鲜有报道。黑木耳根是除去木耳可食用部分后所剩余的部分, 它含有一定的可利

收稿日期: 2015-06-16

作者简介: 郭国丽(1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 农产品加工与贮藏, E-mail: 498922473@qq.com。

* 通讯作者: 李伟(1964-), 男, 教授, 研究方向: 食品科学, E-mail: aisingioro@hotmail.com。

基金项目: 大连海洋大学引进人才及在职培养博士启动项目(100914262)。

用的成分。目前,黑木耳根通常作为废弃物被丢弃,这不仅造成资源的浪费,也污染了环境。本研究从黑木耳根中提取粗多糖(AARP),并研究其对CCl₄所致小鼠急性肝损伤的保护作用。旨在为AARP的进一步开发和综合利用提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

黑木耳根 东宁县德金菌业有限责任公司;单糖标准品有葡萄糖(Glc)、半乳糖(Gal)、鼠李糖(Rha)、甘露糖(Man)、岩藻糖(Fuc)及木糖(Xyl) 购于Sigma公司;清洁级昆明种小鼠(体重18~22 g,雌雄各半) 大连医科大学实验动物中心提供;联苯双酯(DDB,批号(13010104) 北京协和药厂;血清谷丙氨酸转移酶(ALT/GPT)测定试剂盒(批号20140708)、谷草氨酸转移酶(AST/GOT)测定试剂盒(批号20140709)、超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒(批号20140705)、考马斯亮兰蛋白测定试剂盒(批号20140702)、丙二醛(MDA)测定试剂盒(批号20140705) 南京建成生物工程公司。

多功能摇摆粉碎机 上海兆申科技有限公司;721型可见分光光度计 上海光谱仪器有限公司;FD-1冷冻干燥机 上海博通经贸有限公司;GL-21M高速冷冻离心机 长沙湘仪离心机仪器有限公司;UV-754紫外分光光度计 上海光谱仪器有限公司;Frontier FT-IR光谱仪 Perkin-Elmer;酶标仪 美国Thermo。

1.2 AARP的制备

采用传统的热 水浸提法进行粗AARP的提取^[4]。干燥的黑木耳根去除杂质,然后用多功能摇摆粉碎机粉碎成粉末状。称取100 g黑木耳根粉末,以1:40的料液比蒸煮至沸并持续煮沸10 min。然后在8000 r/min条件下,离心15 min,弃去沉淀,收集上清液。残渣再次蒸煮,按上述过程操作。合并上清液,加入95%的乙醇沉淀多糖,加入乙醇的体积使其终浓度达到80%,隔夜沉淀。然后在8000 r/min条件下,离心15 min,弃去上清液,收集沉淀。真空冷冻干燥,得到粗AARP。采用苯酚-硫酸法测定其多糖含量为62.39%。

1.3 AARP分子量的测定

用双蒸水配制5 mg/mL的Dextran T-10、Dextran T-40、Dextran T-70及Dextran T-500的标准葡聚糖溶液,以孔径0.45 μm水膜过滤后,使用TSK-gel G4000 PWXL色谱柱(TOSOH, Japan),通过P230型高效液相色谱仪,以双蒸水为流动相,流速0.6 mL/min,进行洗脱。以苯酚-硫酸法检测各个洗脱组分的糖含量,绘制葡聚糖分子量标准曲线,从而计算出AARP的分子量^[9]。

1.4 AARP的单糖组成分析

采用1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)柱前衍生高效液相色谱法分析AARP的单糖组成^[7]。单糖标准品有葡萄糖(Glc)、半乳糖(Gal)、鼠李糖(Rha)、甘露糖(Man)、岩藻糖(Fuc)及木糖(Xyl)。

取AARP 5 mg加入到2 mL三氟乙酸中溶解,溶解完全后转移至安瓿瓶中,充N₂封管,100 ℃水解6 h。然后冷却至室温,加入2 mL 4 mol/mL的NaOH溶液中和,然后取水解液200 μL加入100 μL 0.5 mol/mL的

NaOH溶液,100 μL 0.5 mol/mL的PMP-甲醇溶液,置于70 ℃水浴锅中水浴1 h,取出加入100 μL 0.5 mol/mL的HCl溶液进行中和,然后移入2 mL离心管中,加入900 μL氯仿,用漩涡振荡器强烈振荡1 min,9000 r/min离心10 min。如此萃取3次,取上清过微滤膜。

色谱条件:C₁₈柱,流动相为0.1 mol/L磷酸盐缓冲液(pH6.0)-乙腈;柱温20 ℃;检测波长245 nm;流速1 mL/min;进样体积20 μL。

1.5 红外光谱(FT-IR)分析

取一定量的AARP粉与KBr混合压片,在400~4000 cm⁻¹范围内进行红外光谱扫描。

1.6 对CCl₄引起的小鼠急性肝损伤的保护作用

1.6.1 小鼠急性肝损伤模型的建立及给药 按体重将60只昆明小鼠随机分成正常组、模型组、联苯双酯阳性对照组(200 mg/(kg·d))、AARP低(25 mg/(kg·d))、中(50 mg/(kg·d))、高(100 mg/(kg·d))剂量组,每组各10只。各给药组每天灌胃给药1次,连续14 d。对照组和模型组给予相同体积的生理盐水^[8]。

于末次给药2 h后,正常组腹腔注射植物油,其余每组均按10 mL/kg腹腔注射含有0.2% CCl₄的植物油溶液。禁食20 h后,摘除眼球取血,离心得血清,备用。快速处死小鼠取肝脏,并在肝左叶组织相同部位取约0.3 g,用4 ℃生理盐水冲尽残血,滤纸拭干,用组织匀浆器制成10%肝组织匀浆,各测。

1.6.2 生化指标检测与病理学观察 取血清按照试剂盒说明书进行丙氨酸氨基转移酶(ALT)与谷草转氨酶(AST)的活性测试。肝组织超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)的含量以及肝组织中的蛋白含量均按试剂盒说明进行操作。处死小鼠后,取肝右叶组织,用10%中性甲醛溶液固定,石蜡包埋切片,苏木精-伊红(HE)染色,在显微镜下进行病理学观察^[9]。

1.7 数据处理

运用统计学分析软件SPSS 17.0对各项数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 AARP的性质

通过热水浸提及95%的乙醇沉淀的方法,从黑木耳根中制备出AARP。以Dextran T-10、Dextran T-40、Dextran T-70及Dextran T-500为标准,测出AARP的相对分子量约为8.6×10⁵ u(图1)。

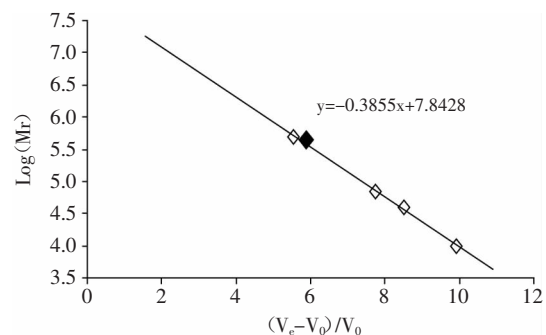


图1 高效液相法测定多糖AARP分子量

Fig.1 Estimation of the molecular mass of AARP by HPLC

采用PMP柱前衍生HPLC色谱法测定黑木耳根粗多糖的单糖组成。结果表明AARP含有6种单糖,分别是Man、Rha、Glc、Gal、Xyl、Fuc,其摩尔比分别为3.389:0.406:7.003:1.248:1.405:4.86。

红外光谱结果如图2所示。在3403 cm⁻¹处一个较宽的-OH基团的伸缩振动峰,在1241 cm⁻¹处的伸缩振动为C-O-S,在约2921 cm⁻¹处有弱的C-H的振动频带。另外两个重要的频带出现在1628 cm⁻¹和1049 cm⁻¹分别为相应的糖醛酸中C=O和糖苷的C-O-C的振动拉伸。大约1634 cm⁻¹处有吸收峰表示与H₂O结合产生的峰。在890 cm⁻¹处存在β-型糖苷键的特征吸收峰。

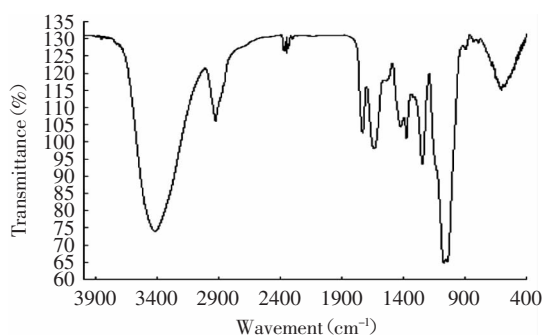


图2 AARP的红外光谱图
Fig.2 FT-IR spectrum of AARP

2.2 AARP对CCl₄引起的小鼠急性肝损伤的保护作用

AARP对CCl₄所致肝损伤小鼠血清ALT和AST的影响如表1所示。模型组灌胃CCl₄后,血清ALT和AST活性明显增加,极显著高于正常组。说明灌胃CCl₄后引起小鼠急性肝损伤,表明造模成功。与模型组相比,给药不同剂量的AARP溶液后均可抑制由CCl₄造成的血清ALT和AST活性的升高,其中,中剂量组和高剂量组的AARP对AST活性的抑制达到了极显著水平($p < 0.01$)。由此可知AARP对CCl₄所致肝损伤小鼠血清中ALT和AST的活性具有一定的抑制作用。

与正常组相比,灌胃CCl₄后小鼠肝组织中MDA含量升高达到了极显著水平($p < 0.01$),SOD活性及GSH含量下降(表1),其中SOD活性的降低达到了极显著水平($p < 0.01$)。与模型组相比,给药AARP溶液后,中、高剂量组均极显著的降低了肝组织中MDA的含量($p < 0.01$)。对于指标SOD活性,与模型组相比,各多糖剂量组均使SOD活性有所增加,其中高剂量组对SOD活性的增加达到了极显著水平($p < 0.01$)。高剂量组

使得小鼠肝组织中GSH含量与模型组有极显著差异($p < 0.01$)。以上结果表明AARP能降低肝组织中MDA含量并相应的使SOD活性有所提高、GSH含量增加。

在显微镜下观察病理切片如图3所示。正常组肝细胞排列整齐,结构完整,肝组织以中央静脉为中心呈条索状向四周放射状排列,肝细胞未见变性、坏死及脂肪变性(图3A)。CCl₄模型组肝细胞紊乱,细胞边界不清,肝组织明显损伤,表现为显而易见的细胞坏死和细胞浸润等病理改变(图3C)。联苯双酯阳性对照组中肝细胞变性减轻,部分细胞恢复正常(图3B)。与模型组相比,给AARP低、中、高剂量组,肝组织损伤均有不同程度的减轻(图3D、E、F)。其中高剂量组效果明显好于低剂量组和中剂量组,高剂量小鼠肝细胞排列趋于整齐,组织几乎完全正常化。

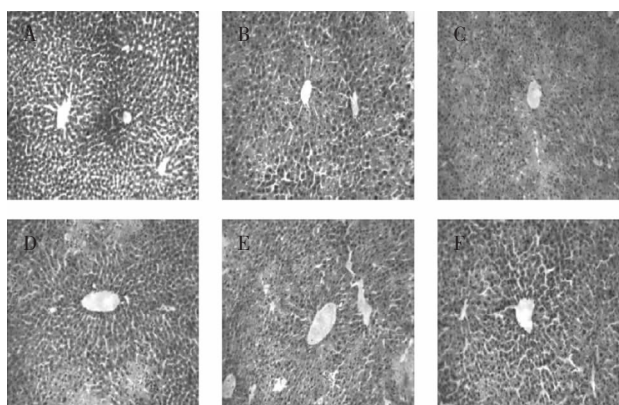


图3 小鼠肝组织病理图(HE,100×)

Fig.3 Histopathological images of the mice liver(HE,100×)
注:A:正常组;B:联苯双酯阳性对照组;C:模型组;D:AARP低剂量组;E:AARP中剂量组;F:AARP高剂量组。

3 讨论

从黑木耳根中提取的粗多糖AARP,其分子量约为 8.6×10^5 u。它由Man、Rha、Glc、Gal、Xyl、Fuc组成。Zhang等从黑木耳中提取的多糖分子量为 7.41×10^4 u,它具有防止衰老小鼠模型中的氧化应激反应的作用^[10]。Zeng等采用微波辅助方法从黑木耳中提取的多糖AAP是一种杂多糖,由Glc、Gal、Rha、Man、Ara组成,分子量为 2.77×10^4 u^[11]。Xu等从黑木耳中提取的水溶性葡聚糖的分子量约为 2.07×10^6 u^[12]。这表明,从黑木耳根中获得的AARP是一种新的多糖。

小鼠实验表明,AARP对CCl₄引起的小鼠急性肝

表1 AARP对CCl₄诱导肝损伤小鼠体内生化指标的影响

Table 1 Effects of polysaccharides AARP on the levels of serum markers in mice with CCl₄-induced hepatic injury

组别	剂量(mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	ALT(U·L ⁻¹)	AST(U·L ⁻¹)	MDA(μmol·mg ⁻¹)	SOD(U·mg ⁻¹)	GSH(μmol/L)
正常组		57.19±1.65	84.56±5.67	81.80±4.11	91.82±3.14	17.42±4.74
联苯双酯组	200	56.19±27.83	79.66±11.20	72.68±4.26	92.94±9.19	18.24±0.27
模型组		120.28±29.53**	151.6±11.90**	119.55±1.35**	75.90±3.83**	10.98±2.02
低剂量组	25	110.71±38.39*	136.3±41.95*	106.62±0.88***	83.32±4.33	20.33±11.79
中剂量组	50	114.88±1.23**	76.47±22.03+	97.52±12.49**	86.12±1.76+	50.64±46.14
高剂量组	100	108.36±9.87*	74.34±19.47+	89.64±8.08**	90.08±5.79**	145.32±43.70***

注:与正常组相比,* :显著, $p < 0.05$,** :极显著, $p < 0.01$;与模型组相比,+ :显著, $p < 0.05$,++ :极显著, $p < 0.01$ 。

损伤有一定的保护作用。方伟等研究表明茶多糖对CCl₄引起的小鼠急性肝损伤有一定的保护作用的机理可能与其清除自由基、降低肝内脂质过氧化反应、保护肝细胞膜以及维持膜的正常通透性有关^[13]。CCl₄通过肝脏代谢产生大量自由基,自由基诱发脂质过氧化,产生大量脂质过氧化物,它可使含氨基的蛋白质、核酸、脑磷脂发生交联而丧失活性^[14]。肝损伤是涉及多因素的复杂病理过程,其中体内多种酶的生化代谢途径均有较大的紊乱^[15-16]。当肝脏受到损害时,如肝细胞变性坏死,丙氨酸氨基转移酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)等会从肝组织中逸出,故血清中这些物质的活性会升高^[17]。

4 结论

本研究采用CCl₄导致小鼠急性肝损伤模型,探究了AARP是否对CCl₄引起的小鼠急性肝损伤有一定的保护作用。实验结果表明,AARP中(50 mg/(kg·d))、高(100 mg/(kg·d))剂量组均可极显著抑制由CCl₄造成的小鼠血清中AST活性升高,极显著降低小鼠肝组织中MDA的含量,并且提高肝组织中SOD活性。同时观察肝组织切片得知,AARP低、中、高剂量组均可减轻CCl₄造成的小鼠肝组织损伤,使肝细胞变性减轻、肝细胞索排列趋于整齐,组织趋于正常化。综上所述,研究表明AARP对CCl₄所致急性肝损伤具有一定的保护作用,也为AARP的进一步开发和综合利用提供了依据。

参考文献

- [1] 吴瑞究. 黑木耳的质量标准及营养成分[J]. 中国林副产, 1996, 36(1): 21-22.
- [2] 黄滨南, 张秀娟, 邹翔, 等. 黑木耳多糖抗肿瘤作用的研究[J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2004, 20(6): 648-651.
- [3] 周国华, 于国萍. 黑木耳多糖降血脂作用的研究[J]. 现代食品科技, 2004, 21(1): 46-48.
- [4] 周慧萍, 陈琼华, 王淑如. 黑木耳多糖和银耳多糖的抗衰老作用[J]. 中国药科大学报, 1989, 20(5): 303-306.

[5] 宗灿华, 于国萍. 黑木耳多糖对糖尿病小鼠降血糖作用的研究[J]. 食用菌, 2007(4): 60-61.

[6] 魏远安, 方积年. 高效凝胶渗透色谱法测定多糖的纯度及分子量[J]. 药学学报, 1989, 24(7): 532-536.

[7] Fu D, O'Neill RA. Monosaccharide composition analysis of oligosaccharides and glycoproteins by high-performance liquid chromatography[J]. Analytical Biochemistry, 1995, 227(2): 377-384.

[8] 许青松, 宫德正, 谭成玉, 等. 壳寡糖对四氯化碳致急性肝损伤小鼠的保护作用[J]. 中国海洋药物, 2006, 25(5): 31-33.

[9] 任丹丹, 汪秋宽, 张甜翠, 等. 海带岩藻聚糖硫酸酯对四氯化碳致肝损伤小鼠的保护作用[J]. 华中农业大学学报, 2009, 28(6): 764-766.

[10] Zhang H, Wang Z, Zhang Z, et al. Purified *Auricularia auricular-judae* polysaccharide (AAP I-a) prevents oxidative stress in an ageing mouse model[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 84: 638-648.

[11] Zeng W, Zhang Z, Gao H, et al. Characterization of antioxidant polysaccharides from *Auricularia auricular* using microwave-assisted extraction[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 89: 694-700.

[12] Xu S, Xu X, Zhang L. Branching Structure and chain conformation of water-soluble glucan extracted from *Auricularia auricular-judae*[J]. Agric Food Chem, 2012, 60: 3498-3506.

[13] 方伟, 陈彦, 孙玉军. 茶多糖对四氯化碳致小鼠肝损伤的保护作用[J]. 茶叶科学, 2008, 28(1): 67-71.

[14] 王巨存, 刑国胜, 胡文铎, 等. 有机锗Ge-132对氧自由基和由羟自由基诱导的脂质过氧化的影响[J]. 中国药理学杂志, 1994, 29(1): 23-25.

[15] 黄兆胜, 黎俏梅. 虎金丸对CCl₄所致实验性肝损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 1999, 5(2): 21-22.

[16] 张国民, 万绍晖, 蒲晓辉, 等. 肝宁颗粒剂对四氯化碳所致大鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(7): 70-71.

[17] 周铁成, 卢宝砾. 天门冬氨酸氨基转移酶测定诊断肝病的意义[J]. 第四军医大学学报, 1993, 14(1): 77-78.

(上接第340页)

mRNA表达水平。

综合上述实验结果, 推测积雪草乙酸乙酯提取物可通过抑制APP和BACE1基因表达而显著改善SAMP8 AD小鼠的学习记忆能力。本实验结果将为进一步开发积雪草提供实验依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2010年版一部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 266-267.
- [2] 王卫霞, 王巍. 改善认知功能的传统植物药研究现状[J]. 中国中医药信息杂志, 2005, 12(6): 53.
- [3] 黄美娥, 肖银波. 积雪草保健饮料的研制[J]. 食品开发与机械, 2008, 33(7): 86-89.
- [4] 段立胜, 彭朝忠. 傣族民间积雪草用于食疗[J]. 中国民族医药杂志, 2008, 2(2): 43.
- [5] 陈明亮, 房娜, 葛振英, 等. 复方积雪草对阿尔茨海默病大鼠学习记忆的影响[J]. 河南外科学杂志, 2007, 13(4): 6-7.

[6] Kumar MH, Gupta YK. Effect of different extracts of *Centella asiatica* on cognition and markers of oxidative stress in rats[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2002, 79(2): 253-260.

[7] 李霏, 黄金兰, 崔雯, 等. 积雪草乙酸乙酯提取物对AB25-35片段所致的PCI2细胞损伤模型及SAMP8小鼠脑内SOD, GSH-PX的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(4): 111-114.

[8] Morris R. Development of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat[J]. J Neurosci, 1984, 11: 47.

[9] Morris RGM, Garrud P, Rawlins JNP, et al. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions[J]. Nature, 1982, 297: 681.

[10] Soldano A, Hassan BA. Beyond pathology: APP, brain development and Alzheimer's disease[J]. Curr Opin Neurobiol, 2014, 27: 61-67.

[11] Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A, et al. Impaired autophagy and APP processing in Alzheimer's disease: The potential role of Beclin 1 interactome[J]. Prog Neurobiol, 2013, 106-107: 33-54.