

黑牛肝菌多糖对小鼠酒精性肝损伤的改善作用

郭永月, 徐杰, 邢佳, 王美菊, 陶明焯*
(南京师范大学金陵女子学院, 江苏南京 210097)

摘要:目的:旨在研究黑牛肝菌多糖(refined polysaccharide from *Boletus aereus*, RPBA)对小鼠酒精性肝损伤的保护作用。方法:将60只小鼠适应性喂养3 d后,随机分为空白对照组、阳性对照组(联苯双酯滴丸, 150 mg/kg·bw)、模型组、RPBA各剂量组(100、200、400 mg/kg·bw),连续灌胃30 d,第31 d禁食不禁水12 h,除空白组外的其余各组灌胃50%乙醇溶液(12 mL/kg·bw),建立动物急性肝损伤模型。结果:小鼠酒精灌胃后,模型组谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、甘油三酯(TG)水平及丙二醛(MDA)含量与空白对照组相比显著($p < 0.05$)升高,超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活力、还原型谷胱甘肽(GSH)含量显著($p < 0.05$)低于空白对照组,RPBA各剂量组ALT、AST、TG水平及MDA含量与模型组相比明显降低,而以上各抗氧化酶活性明显提高。结论:RPBA能明显降低小鼠血清中AST、ALT及TG水平,提高血清中抗氧化酶活性,减少脂质过氧化,对小鼠酒精性肝损伤具有明显的保护作用。

关键词:黑牛肝菌多糖,酒精性肝损伤,血清,抗氧化

Improvement effect of polysaccharides from *Boletus aereus* on alcoholic liver injury in mice serum

GUO Yong-yue, XU Jie, XING Jia, WANG Mei-ju, TAO Ming-xuan*

(Ginling College, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: Objective: The improvement effect of refined polysaccharide from *Boletus aereus* (RPBA) on acute alcoholic hepatic injury in mice was investigated. Methods: The 60 mice were fed adaptively for 3 days, then were randomly divided into six groups, including blank control group, alcoholic model group, positive control group (administered with 150 mg/kg·bw bifendate by gavage), and RPBA (100, 200, 400 mg/kg·bw) group. After housing for 30 days, the mice were kept fasting but retained water for 12 hours, then 50% alcohol (12 mL/kg·bw) were administered orally into animals of all groups except blank control group to induce hepatotoxicity. Results: The results showed that the levels of ALT, AST, TG and MDA of mice in model group were increased obviously ($p < 0.05$), while the levels of SOD, CAT, GSH-Px, and GSH were lower ($p < 0.05$) compared with the control group. After BAP administration, the levels of AST, ALT and MDA were decreased while the levels of SOD, CAT, GSH-Px, and GSH were increased. Conclusion: RPBA could significantly reduce the levels of AST, ALT and TG in serum of mice, increase the activities of antioxidant enzymes in serum, and reduce lipid peroxidation. RPBA could protect liver from injury induced by alcohol in mice.

Key words: *Boletus aereus* polysaccharides; alcohol liver injury; serum; antioxidation

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)24-0325-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.24.062

长期大量饮酒,将导致酒精性脂肪肝、肝炎、肝纤维化、肝硬化甚至发展成为肝癌^[1-2]。日益严重的酒精性肝损伤(Alcoholic liver disease, ALD),需找出一种天然有效无毒的药物来治疗,现在市场上虽有针对酒精所致肝损伤的药物,如糖皮质类固醇、多烯磷

脂酰胆碱、美他多辛等,但这些药却不能改善酒精性脂肪肝^[3-4]。据报道食用菌多糖具有清除自由基、抗氧化、保护生物细胞膜、延缓衰老及提高机体免疫等作用^[5-7],因此考虑从食用菌中寻找出舒肝解毒的天然产品。黑牛肝菌学名枣铜色牛肝菌(*Boletus aereus*),

收稿日期: 2015-05-04

作者简介: 郭永月(1988-),女,硕士研究生,研究方向:生物活性物质与保健功能因子, E-mail: xy4z@sina.com。

* 通讯作者: 陶明焯(1970-),男,硕士,副教授,研究方向:生物活性物质与保健功能因子, E-mail: 45017@njnu.com。

基金项目: 江苏省高校自然科学基金基础研究项目(10KJD550003)。

是一种世界性珍稀食用菌,在我国云南等地分布广泛,在欧洲及非洲也有分布^[8-9]。它不但味道鲜美营养丰富,还具有清热消暑、解烦、舒筋活血、抗癌、抗肿瘤、抗病毒等功效^[10-13]。此外,黑牛肝菌中富含多糖类物质,具有补血、养发、抗癌等功效^[14]。

本实验通过研究黑牛肝菌多糖(RPBA)对急性酒精性肝损伤模型小鼠血清生化指标及体内抗氧化能力的影响,评价其对急性酒精性肝损伤的改善作用,旨在为黑牛肝菌功能性保健食品的研制和开发提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

ICR雄性小鼠 6周龄左右,体重(20±2) g,在江苏省中医院动物饲养中心饲养,实验动物许可证编号SYXK(苏)2014-0047;全价颗粒饲料 江苏省中医院动物饲养中心;黑牛肝菌 云南丽江市古城区喜马拉雅贸易有限责任公司;AST、ALT和TG试剂盒 南京建成生物技术工程研究所;氯化硝基四氮唑蓝(NBT) 上海恒星应用化学研究所;5'-二硫双-2-硝基苯甲酸(DTNB) 南京卓尔有限公司;乙二胺四乙酸(EDTA) 南京宁试化学试剂有限公司;联苯双酯滴丸 浙江医药有限公司新昌制药厂;四乙氧基丙烷(TEP) FLUKA公司;谷胱甘肽(GSH) 美国Sigma公司;磺基水杨酸 上海久亿化学试剂公司南京分公司。

722可见分光光度计 上海精密科学仪器有限公司;GL-22M高速冷冻离心机 湖南赛特湘仪离心机厂;超声破碎仪 宁波新芝生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 黑牛肝菌多糖的制备 取黑牛肝菌子实体经烘干粉碎过60目筛,取其细粉10 g,按料液比1:20加入蒸馏水,在90℃恒温水浴中浸提3 h,冷却后5000 r/min离心10 min,滤渣再反复提取2次,分别收集上清液,旋转蒸发浓缩至原体积的1/4,加入3倍体积95%乙醇沉淀多糖,于4℃冰箱内静置12 h。然后5000 r/min离心10 min,回收上清液,沉淀依次用无水乙醇、丙酮、乙醚抽滤洗涤除去小分子物质,65℃低温烘干后即得黑牛肝菌粗多糖^[15-17]。

取适量黑牛肝菌粗多糖粉末溶解于少量蒸馏水中。按Sevag法^[18](多糖溶液:Sevag试剂=5:1)脱蛋白5至6次,直至无变性蛋白质出现为止,将脱蛋白后的溶液装入透析袋中流水透析48 h,再用蒸馏水透析24 h,透析液用3倍体积95%乙醇沉淀多糖,离心后将沉淀低温干燥,即得到精制黑牛肝菌多糖(RPBA)。

1.2.2 酒精诱导肝损伤动物模型的建立 60只小鼠适应性喂养3 d后,随机分为6组,每组10只,分别为空白对照组、模型组、联苯双酯阳性对照组和RPBA高、中、低剂量处理组。RPBA样品及联苯双酯用蒸馏水配制,每天灌胃一次,灌胃剂量分别为100、200、400、150 mg/kg·bw,连续灌胃30 d,实验期间供给全价颗粒饲料,不限制饮食饮水。空白组和模型组前30 d灌胃等剂量蒸馏水。每周称量两次小鼠体重,及时根据体重变化调整药物供给量,并观察小鼠状态。

实验至第31 d,各组小鼠禁食不禁水12 h后,阳性对照组、多糖组及模型组以12 mL/kg·bw的量,用50%浓度的乙醇溶液灌胃,建立小鼠急性肝损伤模型,空白对照组灌胃等体积的蒸馏水。12 h后,小鼠摘眼球取血并分离血清,用于测定谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、甘油三酯(TG)及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、丙二醛(MDA)、还原型谷胱甘肽(GSH)水平^[19-20]。

1.2.3 指标测定 ALT、AST活性及TG含量测定:将血样静置2 h,3000×g离心10 min后取上清,分别按照ALT、AST和TG试剂盒说明书提供的方法测定。

SOD活性:按Stewart等采用的NBT光化还原法测定^[21];CAT活性:采用紫外吸收法测定^[22];GSH-Px活性:采用DTNB法测定^[23];MDA含量:采用TBA法测定^[24];GSH含量:按文献[25]方法测定。

1.3 统计方法

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用DPS 13.50统计软件进行单因素方差分析,以 $p<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 RPBA对酒精所致急性损伤小鼠血清AST、ALT和TG水平的影响

由表1可以看出,模型组中AST、ALT和TG水平显著高于空白对照组($p<0.05$),说明造模成功。多糖各剂量组的AST、ALT和TG水平随着多糖剂量的增大而逐渐降低,且均与模型组存在显著性差异。多糖高剂量组的AST和TG水平与阳性对照组无显著性差异,ALT水平虽高于阳性对照,但与模型组相比仍大大降低,提示RPBA可改善急性酒精性肝损伤造成的小鼠血清转氨酶(AST和ALT)升高及TG含量升高,且存在一定的剂量-效应关系。

表1 RPBA对血清中AST、ALT和TG含量的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Effects of RPBA on AST, ALT activities and TG content in serum of mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	AST(U/L)	ALT(U/L)	TG(mmol/L)
空白对照组	32.64±5.43 ^d	27.96±6.03 ^e	1.26±0.081 ^e
模型组	74.93±6.76 ^a	330.16±23.97 ^a	1.66±0.036 ^a
多糖低剂量组	67.01±5.44 ^b	256.97±5.26 ^b	1.51±0.030 ^b
多糖中剂量组	62.92±8.21 ^b	227.53±29.46 ^{bc}	1.38±0.021 ^c
多糖高剂量组	47.49±1.77 ^c	197.71±17.38 ^c	1.27±0.042 ^c
阳性对照组	46.55±1.32 ^c	169.47±11.05 ^d	1.31±0.027 ^c

注:同列不同小写字母表示在5%水平差异显著,相同字母表示差异不显著,表2、表3同。

2.2 RPBA对酒精所致急性损伤小鼠血清中SOD、CAT和GSH-Px活力的影响

由表2可知,模型组血清中SOD、CAT和GSH-Px活力均显著低于空白对照组($p<0.05$),表明造模成功。给予RPBA灌胃处理后,SOD、CAT和GSH-Px活力逐渐提高,且有一定的剂量-效应关系。高剂量RPBA灌胃组SOD、CAT和GSH-Px活力与阳性对照组处在同一水平,说明RPBA可改善酒精所致小鼠体内以上

各抗氧化酶的活力。

表2 RPBA对小鼠血清SOD、CAT和GSH-Px活力的影响
($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effects of RPBA on SOD, CAT and GSH-Px activities in serum of mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	血清SOD (U/mL)	血清CAT (U/mL)	血清GSH-Px (U/mL)
空白对照组	15.17±0.49 ^a	169.17±19.55 ^a	50.49±2.41 ^a
模型组	10.14±0.28 ^c	99.67±9.04 ^c	27.17±1.77 ^d
多糖低剂量组	11.45±0.28 ^d	107.33±10.98 ^{bc}	29.61±2.96 ^d
多糖中剂量组	12.52±0.30 ^c	105.63±5.90 ^c	38.46±1.82 ^c
多糖高剂量组	14.25±0.40 ^b	118.47±7.61 ^{bc}	41.47±1.44 ^{bc}
阳性对照组	13.76±0.43 ^b	128.13±2.46 ^b	44.03±1.19 ^b

2.3 RPBA对小鼠血清MDA和GSH含量的影响

MDA是机体受到氧自由基的攻击而产生的脂质过氧化产物,测定MDA的含量可反映机体内脂质氧化的程度。GSH是非酶抗氧化体系中重要的自由基清除剂,对于维持生物体内的氧化还原平衡具有重要的意义。由表3可知,正常小鼠中,MDA含量比较低,但用大量酒精灌胃(模型组)后,血清中MDA含量显著($p < 0.05$)增加,是空白对照组的2.44倍,表明酒精代谢引发了小鼠体内的氧化应激。与空白对照组相比,模型组GSH含量显著降低($p < 0.05$)。RPBA各剂量组可显著($p < 0.05$)降低酒精肝损伤小鼠血清MDA含量,并提高GSH含量,表明RPBA能够通过升高小鼠体内GSH含量等途径增强机体的抗氧化能力,并降低酒精引发的小鼠体内脂质过氧化水平。

表3 RPBA对小鼠血清MDA和GSH含量的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Effects of RPBA on MDA and GSH contents in serum of mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	血清MDA (nmol/mL)	血清GSH (μ mol/L)
空白对照组	46.24±3.16 ^c	850.19±20.20 ^a
模型组	112.94±6.66 ^a	648.05±7.07 ^d
多糖低剂量组	89.06±5.49 ^b	657.81±8.75 ^d
多糖中剂量组	77.29±4.49 ^b	670.67±31.65 ^d
多糖高剂量组	78.59±9.98 ^b	717.57±31.99 ^c
阳性对照组	81.76±0.17 ^b	816.62±5.05 ^b

3 讨论

乙醇在体内代谢过程中会产生氧化应激作用,氧化应激产生的活性氧自由基,可作用于肝细胞损伤细胞膜,导致AST和ALT释放入血^[25-27]。另外,酒精代谢还将导致烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)/烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)降低,使细胞内的氧化还原状态改变,同时乙醇还动员周围的脂肪组织,增加脂肪合成原料,使得细胞内形成大量脂滴,导致肝细胞内TG的升高^[28-29]。因此,通过AST、ALT和TG的测定来反映酒精对肝细胞的损坏程度及RPBA对ALD的保护作用。本研究结果表明,灌胃RPBA可显著抑制酒精引发的小鼠血清中ALT、AST和TG水平的升高,

间接反映出RPBA对肝损伤的保护作用。

自由基是人体氧化作用过程中的副产物,过多的自由基将会导致机体发生病变,引起生物细胞氧化损伤,而肝细胞是活性氧攻击的主要对象^[30]。脂质过氧化也是造成酒精性肝损伤的重要发病因素,乙醇代谢过程中产生大量自由基可激活磷脂酶,并进一步催化过氧化反应,导致细胞磷脂双层膜通透性改变,从而改变与膜结合的酶、受体和离子通道等^[31-32],SOD、CAT、GSH-Px和GSH构成了生物体内最主要的抗氧化酶及非酶体系,能够有效抑制自由基引发的氧化损伤^[33-35],而MDA是膜脂质过氧化的终端产物,可引起细胞代谢及功能障碍甚至死亡^[36],因此通过测定上述指标可以间接反映出RPBA对ALD的改善作用。实验结果表明,RPBA各剂量组可显著提高血清中SOD、CAT和GSH-Px的活力及GSH含量并降低MDA含量,并呈现一定的量效关系,表明RPBA可通过提高机体对自由基的防御能力而减轻酒精对肝脏的损伤。

4 结论

RPBA可提高小鼠血清中的SOD、CAT、GSH-Px活力及GSH水平,从而抑制脂质过氧化进程,降低小鼠血清中的ALT、AST及TG水平,在预防酒精性肝损伤方面具有较好的效果,由此也提示黑牛肝菌是一种具有开发前景的天然保健品。

参考文献

- [1] Diehl A M. Liver disease in alcohol abusers: clinical perspective [J]. Alcohol, 2002, 27(1): 7-11.
- [2] 魏新峰, 于元元. 酒精性肝损伤的实验研究进展[J]. 贵阳中医学院学报, 2006, 28(2): 56-58.
- [3] Reuben A. Alcohol and the liver[J]. Current Opinion in Gastroenterology, 2008, 24(3): 328-338.
- [4] Day C P. Treatment of alcoholic liver disease[J]. Liver Transplantation, 2007, 13(11): 69-75.
- [5] 李波, 徐贵华, 芦菲, 等. 七种云南产食用菌的抗氧化活性研究[J]. 食用菌, 2010(2): 66-67.
- [6] 李芳亮, 赵立冬, 高杨, 等. 两种食用菌多糖提取物的抗氧化活性比较研究[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2011(9): 108-111.
- [7] 孙娟, 郑朝辉, 刘磊, 等. 4种珍稀食用菌粗多糖的抗氧化活性研究[J]. 安徽农业大学学报: 自然科学版, 2011, 38(3): 404-409.
- [8] Owen L M, Ernst E. Both Boletus dupainii in North America [J]. Field Mycology, 2002, 3(3): 103-104.
- [9] 邓百万, 陈文强. 美味牛肝菌营养菌丝体与野生子实体品质分析[J]. 中国食用菌, 2004, 23(5): 44-46.
- [10] 李志洲. 美味牛肝菌多糖的抗氧化性[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(4): 49-51.
- [11] 王一心, 杨桂芝, 狄勇, 等. 黑牛肝菌对高脂血症大鼠血脂及抗氧化能力的影响[J]. 中华预防医学杂志, 2004, 38(5): 6-8.
- [12] 江正辉, 王泰龄. 酒精性肝病[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2001: 57-59.
- [13] 杨万枝. 酒精性肝病发病机制研究进展[J]. 安徽医科大学学报, 2012, 47(1): 97-100.

- [14] 唐薇,鲁新成. 美味牛肝菌多糖的生物活性及其抗S-180肿瘤的效应[J]. 西南师范大学学报:自然科学版,1999(4):478-481.
- [15] 杨立红,刘德林,钟旭生. 野生牛肝菌多糖的分离鉴定及其抗氧化性研究[J]. 食品科学,2008,29(8):335-338.
- [16] 朱建华,杨晓泉. 真菌多糖研究进展—结构、特性及制备方法[J]. 中国食品添加剂,2005(6):75-80.
- [17] 李磊,王卫国. 真菌多糖药理作用及其提取、纯化研究进展[J]. 河南工业大学学报:自然科学版,2008(2):87-92.
- [18] 齐惠珍,魏绍云,王继伦,等. Sevag法去除白及多糖中蛋白的研究[J]. 天津化工,2000(2):20-21.
- [19] 赵敏,池莉平,王凤岩,等. 小鼠急性酒精性肝损伤模型的建立及应用[J]. 华南预防中医,2005,31(1):14-16.
- [20] 齐慧慧,宋佳,陈岳祥. 小鼠急性酒精性肝损伤模型的建立[J]. 世界华人消化杂志,2012(9):759-763.
- [21] Stewert R R, Bewley J D. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes[J]. PlantPhysiol,1980,65(2):245-248.
- [22] Chiang M L, Chou C C. Expression of superoxide dismutase, catalase and thermostable direct hemolysin by, and growth in the presence of various nitrogen and carbon sources of heat-shocked and ethanol-shocked *Vibrio parahaemolyticus*[J]. International Journal of Food Microbiology,2008,121(3):268-274.
- [23] 董卫华,赵春澎,谷兆侠,等. 宁夏枸杞谷胱甘肽过氧化物酶的测定[J]. 新乡医学院报,2006,23(1):31-32.
- [24] 中华人民共和国卫生部,保健食品检验与评价技术规范(2003年版)[S]. 2003:110-112.
- [19] Akira N, Kiyofumi Y, Li B Z. Interleukin 6 protects pc12 cells from 4-hydroxynonenal-induced cytotoxicity by increasing intracellular glutathione levels[J]. Free Radical Biology & Medicine,2002,32(12):1324-1332.
- [25] Nanji A A. Apoptosis and alcoholic liver disease[J]. Seminars in Liver Disease,1998,18(2):87-90.
- [26] Harmeet M, Randal J. Kaufman. Endoplasmic reticulum stress in liver disease[J]. Journal of Hepatology,2011,54(4):795-809.
- [27] 彭文锋,钟政永. ADA与ALT、AST、GGT联合检测在肝脏疾病诊断中的意义[J]. 当代医学,2011,17(9):4-6.
- [28] 朱萍. 线粒体与酒精性肝病关系的研究[D]. 济南:山东大学医学院,2007.
- [29] 谭华炳,贺琴,李金科. 脂肪肝肝组织脂质含量与肝功能关系的实验研究[J]. 山西医药杂志,2009,38(1):25-27.
- [30] 辛晓林,刘长海. 中药多糖抗氧化作用研究进展[J]. 北京中医药大学学报,2000,23(5):54-55.
- [31] Loguerill C, Federico A. Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis[J]. Free Radical Biology & Medicine,2003,34(1):1-10.
- [32] Jones B E, Liu H, Lo CR, et al. Cytochrome P450 2E1 expression induces Hepatocyte resistance to cell death from oxidative stress[J]. Antioxid Redox Signal,2002,4(5):701-709.
- [33] 张俊会,王谦. 杏鲍菇多糖的抗氧化活性研究[J]. 中国食用菌,2002,22(2):38-39.
- [34] 刁雪峰,王单一,熊正英,等. 云芝多糖对运动训练大鼠脑组织抗氧化能力和ATPase活性的影响[J]. 食品科学,2012,33(5):256-259.
- [35] Penninckx M. A short review on the role of glutathione in the response of yeast to nutritional, environmental, and oxidative stresses[J]. Enzyme Microb Technol,2000,26(9-10):737-742.
- [36] Masalkar P D, Abhang S A. Oxidative stress and antioxidant status in patients with alcoholic liver disease[J]. Clinica Chimica Acta,2005,355(1-2):61-65.

(上接第314页)

- [4] Soyer A, Özalp B, Dalmiş Ü, et al. Effects of freezing temperature and duration of frozen storage on lipid and protein oxidation in chicken meat[J]. Food Chemistry,2010,120(4):1025-1030.
- [5] Bertram H, Kristensen M, Andersen H. Functionality of myofibrillar proteins as affected by pH, ionic strength and heat treatment—a low-field NMR study[J]. Meat Science,2004,68(2):249-256.
- [6] Albarraçín W, Sánchez I, Grau R, et al. Salt in food processing; usage and reduction: a review[J]. International Journal of Food Science & Technology,2011,46(7):1329-1336.
- [7] 徐慧文,谢晶,汤元睿,等. 冰藏和冷藏条件下金枪鱼品质变化的研究[J]. 食品工业科技,2014(13):321-326.
- [8] Hong H, Luo Y, Zhou Z, et al. Effects of low concentration of salt and sucrose on the quality of bighead carp (*Aristichthys nobilis*) fillets stored at 4°C[J]. Food Chemistry,2012,133(1):102-107.
- [9] Shi C, Cui J, Luo Y, et al. Effect of lightly salt and sucrose on rigor mortis changes in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) stored at 4°C[J]. International Journal of Food Science & Technology,2014,49(1):160-167.
- [10] Goulas A, Kontominas M. Effect of salting and smoking—method on the keeping quality of chub mackerel (*Scomber japonicus*): biochemical and sensory attributes[J]. Food Chemistry,2005,93(3):511-520.
- [11] Xu Y, Xia W, Yang F, et al. Effect of fermentation temperature on the microbial and physicochemical properties of silver carp sausages inoculated with *Pediococcus pentosaceus*[J]. Food Chemistry,2010,118(3):512-518.
- [12] Kilinc B, Cakli S. Chemical, microbiological and sensory changes in thawed frozen fillets of sardine (*Sardina pilchardus*) during marination[J]. Food Chemistry,2004,88(2):275-280.
- [13] Ge L, Xu Y, Xia W. The function of endogenous cathepsin in quality deterioration of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fillets stored in chilling conditions[J]. International Journal of Food Science & Technology,2015,50(3):797-803.
- [14] Gaarder M, Bahuau D, Veiseth E, et al. Relevance of calpain and calpastatin activity for texture in super-chilled and ice-stored Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fillets[J]. Food Chemistry,2012,132(1):9-17.
- [15] Stefánsson G, Nielsen H, Skåra T, et al. Frozen herring as raw material for spice-salting[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture,2000,80(9):1319-1324.