

红托竹荪多糖对大鼠酒精性肝损伤的保护作用

颜蜜¹, 滕春丽², 陶会¹, 杨鸿波^{1,2}, 孙晓红¹, 谭红^{1,3*}

1 贵州医科大学公共卫生学院 环境污染与疾病监控教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550025

2 贵州健安德科技有限公司, 贵州 贵阳 550014

3 贵州科学院, 贵州 贵阳 550001

摘要: 研究红托竹荪多糖(*Dictyophora rubrovalvata* polysaccharide, DRP)对酒精所致大鼠肝损伤的保护作用。采用苯酚-硫酸法测得 DRP 的含量为 74.68%±1.32%, 利用傅里叶红外光谱初步分析表明 DRP 是含有 α -糖苷键和 β -糖苷键的吡喃环多糖。当 DRP 浓度达到 3.0 mg/mL 时, DPPH 自由基的清除率达到 80.12%, 其还原力为 0.31, 对羟基自由基的清除率达到 88.07%。雄性 SD 大鼠被随机分为 6 组: 空白对照组(NC)、模型对照组(MC)、阳性对照组(PC)、红托竹荪多糖低(LDRP)、中(MDRP)、高(HDRP)剂量干预组, 连续灌胃 28 d 后将其安乐死, 测定血清中 AST、ALT、TG 水平以及肝脏 SOD、GSH、MDA、TNF- α 、IL-6 水平, 并根据病理切片分析红托竹荪多糖对大鼠酒精性肝损伤的保护程度。与 MC 组相比, DRP 各剂量组血清 AST、ALT、TG 水平显著降低($P<0.05$), 肝脏 SOD 和 GSH 水平显著上升($P<0.05$), MDA、TNF- α 、IL-6 含量显著下降($P<0.05$), 肝脏细胞变性和坏死等病理现象明显改善。DRP 具有一定的体外抗氧化能力, 并且能缓解酒精所致的大鼠肝脏损伤, 其缓解作用与抗氧化能力增强、炎症因子表达水平降低有关。

关键词: 食用菌多糖; 红托竹荪; 酒精性肝损伤; 抗氧化作用; 炎症反应

[引用本文] 颜蜜, 滕春丽, 陶会, 杨鸿波, 孙晓红, 谭红, 2022. 红托竹荪多糖对大鼠酒精性肝损伤的保护作用. 菌物学报, 41(2): 291-302

Yan M, Teng CL, Tao H, Yang HB, Sun XH, Tan H, 2022. Protective effects of *Dictyophora rubrovalvata* polysaccharide on alcoholic liver injury in rats. Mycosystema, 41(2): 291-302

基金项目: 贵州省科技计划项目(黔科合重大专项字 ZWCQ[2019]3013-6 号, 黔科合重大专项字 ZWCQ[2019]3013)

Supported by Science and Technology Plan Project of Guizhou Province (Qiankehezhongdazhuanxiangzi ZWCQ[2019]3013-6, and Qiankehezhongdazhuanxiangzi ZWCQ[2019]3013).

*Corresponding author. E-mail: 1178812570@qq.com

ORCID: TAN Hong (0000-0003-1726-884X), YAN Mi (0000-0001-8954-8467)

Received: 2021-08-25, accepted: 2021-10-09

Protective effects of *Dictyophora rubrovalvata* polysaccharide on alcoholic liver injury in rats

YAN Mi¹, TENG Chunli², TAO Hui¹, YANG Hongbo^{1,2}, SUN Xiaohong¹, TAN Hong^{1,3*}

1 School of Public Health, the Key Laboratory of Environmental Pollution Monitoring and Disease Control, Ministry of Education, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China

2 Guizhou Jiandee Technology Limited Company, Guiyang 550014, Guizhou, China

3 Guizhou Academy of Sciences, Guiyang 550001, Guizhou, China

Abstract: The protective effects of *Dictyophora rubrovalvata* polysaccharides (DRP) on rats with alcoholic liver injury were investigated. The content of DRP determined by phenol sulfuric acid method was $74.68\% \pm 1.32\%$. The preliminary analysis using Fourier infrared spectroscopy showed that DRP contained α -glycosidic and β -glycosidic linked pyranocyclic polysaccharides. When the concentration of DRP reached 3.0 mg/mL, the scavenging rate of DPPH radical reached 80.12%, the reducing power reached 0.31, and the scavenging rate of hydroxyl radical reached 88.07%. Male SD rats were randomly divided into six groups: normal control (NC), model control (MC), positive control (PC), low-dose (LDRP), middle-dose (MDRP), and high-dose *D. rubrovalvata* polysaccharides (HDRP) groups. After continuous intragastric administration for 28 d, all rats were euthanized. The serum AST, ALT and TG were examined, and the levels of SOD, GSH, MDA, TNF- α , IL-6 in livers were assayed. The protective effects of *D. rubrovalvata* polysaccharide (DRP) on alcoholic liver injury in rats was analyzed according to pathological sections. Compared with the MC group, the levels of AST, ALT and TG in the DRP intervention groups were significantly decreased ($P < 0.05$), the levels of SOD and GSH in liver were significantly increased ($P < 0.05$), the contents of MDA, TNF- α and IL-6 in liver were significantly decreased ($P < 0.05$). The pathological phenomena of liver cellular degeneration and necrosis were improved obviously. DRP has a certain antioxidant capacity *in vitro*, and can alleviate alcohol-induced liver injury in rats, and its alleviating effect is related to the enhancement of antioxidant capacity and the decrease of the expression level of inflammatory factors.

Keywords: edible fungal polysaccharides; *Dictyophora rubrovalvata*; alcohol-induced liver injury; antioxidation; inflammatory response

酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)是由于长期大量饮酒导致的肝脏疾病。前期通常表现为酒精性脂肪肝,也可逐步发展成酒精性肝炎、肝纤维化、肝硬化等(中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组和中国医师协会脂肪性肝病专家委员会 2018)。根据世界卫生组织关于酒精与健康全球状况报告(World Health Organization 2019),2016 年因滥用酒精导致死亡的人数约为 300 万人,占世界所有死亡人数的

5.3%。在我国酒精性肝病的发病率也逐年上升,酒精性肝病已成为全球重要的公共卫生问题(Liu et al. 2017b)。目前主要治疗方法为戒酒、补充营养、药物治疗等(孙韬华等 2019),但药物治疗存在安全性低、副作用大等问题。故寻找安全有效的天然药物已成为众多学者研究的焦点。食用菌多糖是自然界中一类特殊的生物活性物质,因其安全性高,且具有调节机体免疫功能(Wu et al. 2019; Gao et al. 2020; Ren et al. 2021)、抗氧化

(Kang *et al.* 2019)、抗炎(Sadia *et al.* 2020)、抗疲劳(王新和王强 2020)、降血糖(Liu *et al.* 2017a)和护肝(Xu *et al.* 2017)等功效而颇受关注。

大量研究报道,食用菌多糖在预防和治疗酒精性肝损伤中发挥重要作用。Zheng *et al.* (2019)研究发现东方栓孔菌 *Trametes orientalis* 多糖可通过其抗氧化和抗炎作用,减轻酒精诱导的肝脏毒性。Wang *et al.* (2018)用长根菇 *Oudemansiella radiata* 多糖灌胃小鼠 20 d,发现长根菇多糖能显著降低血清谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)和碱性磷酸酶(ALP)水平,抑制丙二醛(MDA)和脂质过氧化物(LPO)的形成,激活乙醇脱氢酶(ADH)和醛脱氢酶(ALDH),降低细胞色素 P450 2E1 (CYP2E1)水平,从而有效改善酒精代谢。Zhao *et al.* (2017)研究发现硫磺菌 *Laetiporus sulphureus* 多糖可通过缓解氧化应激损伤,降低脂质过氧化来保护小鼠酒精性肝损伤。

红托竹荪 *Dictyophora rubrovolvata* M. Zang, D.G. Ji & X.X. Liu 是藏穆等人于 1976 年在云南发现并命名的新种(饶军和张云珍 1998),是我国西南地区的重要食用菌(戴玉成等 2010)。该菌具有多种生物活性物质,包括多糖、维生素、氨基酸等,其中多糖起着关键性作用。目前国内外关于红托竹荪多糖的研究大多集中在对多糖的提取、成分分析、体外抗氧化等方面(Deng *et al.* 2015; 杨晶莹和张驰 2020),基于动物实验探索红托竹荪多糖的生物活性功能报道较少,这在一定程度上影响了红托竹荪多糖的开发利用。因此,本实验以 SD 大鼠为研究对象,探索红托竹荪多糖对酒精性肝损伤大鼠的保护作用,为红托竹荪多糖是否可作为预防和治疗酒精性肝损伤的功能因子提供开发依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 材料

红托竹荪子实体购于贵州织金县(经贵州省

生物研究所三级研究员杨彝华老师鉴定其为红托竹荪)。SD 雄性大鼠,SPF 级,体重 160–180 g,生产许可证号:SCXK (浙)2019-0001,由浙江维通利华实验动物技术有限公司提供。

1.1.2 试剂和仪器

超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、还原型谷胱甘肽(GSH)、肿瘤坏死因子(TNF- α)、白介素-6(IL-6)试剂盒:南京建成生物工程研究所;苏木精-伊红染液(hematoxylin eosin, HE)试剂盒:常德比克曼生物科技有限公司;联苯双酯滴丸:北京协和药厂;其他试剂均为国产分析纯;JY98-IIIDN 超声波细胞粉碎机:宁波新芝生物科技股份有限公司;RE-2000A 旋转蒸发仪:上海亚荣生化仪器厂;FD-1A-50 冷冻干燥机:北京博医康实验仪器有限公司;iCAN9 傅里叶变换红外光谱仪:天津市能谱科技有限公司;ST16R 台式高速冷冻离心机、Multiskan GO 全波长扫描型酶标仪:美国 Thermo 公司;日立 3110 型全自动生化分析仪:日立诊断产品(上海)有限公司;DM500 生物显微镜:德国 Leica 公司。

1.2 方法

1.2.1 红托竹荪多糖的制备

红托竹荪多糖提取物由实验室自制(滕春丽等 2021),将红托竹荪子实体烘干后粉碎,过 100 目筛得到红托竹荪粉末,根据实验室前期优化的方法提取红托竹荪多糖,提取条件:超声功率 480 W、超声时间 35 min、提取次数 2 次、料液比 1:20 g/mL 进行超声提取,4 000 r/min 离心 10 min,合并 2 次提取液,旋转蒸发浓缩、加入 3 倍体积的无水乙醇 4 °C 沉淀过夜,冷冻干燥后,得到红托竹荪粗多糖。用少量蒸馏水复溶,采用 Sevage 试剂(氯仿:正丁醇=4:1)去除蛋白杂质、流水透析、旋转蒸发、冷冻干燥后得到红托竹荪精多糖。

1.2.2 红托竹荪多糖含量测定

采用苯酚-硫酸法测定红托竹荪多糖的含量(中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局

2009)。以葡萄糖为标准样,配制不同浓度的葡萄糖溶液,于 490 nm 处测定吸光度值。以吸光度为纵坐标,葡萄糖标准溶液浓度为横坐标,绘制葡萄糖标准曲线。取一定浓度红托竹荪多糖溶液按同样方法操作,测定其吸光度值,同时做 3 个平行。

1.2.3 红托竹荪多糖红外光谱分析

取少量干燥的红托竹荪多糖,与适量 KBr 混匀研磨,压片后进行傅里叶红外光谱测试,扫描波数为 4 000–400 cm^{-1} 。

1.2.4 体外抗氧化实验

DPPH 自由基清除率的测定:配置 0.08 mmol/L 的 DPPH 溶液,将 2.0 mL 不同浓度的红托竹荪多糖溶液(0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 mg/mL)与 3.0 mL 的 DPPH 溶液混匀,在室温下避光 30 min。于 517 nm 处测定吸光度值,以蒸馏水为空白。试验重复 3 次(韩晴等 2020)。DPPH 清除率计算公式: $\text{DPPH 清除率}(\%)=[A_0-(A_S-A_C)]/A_0 \times 100\%$, A_0 —2.0 mL 蒸馏水+3.0 mL DPPH 溶液吸光度值; A_C —2.0 mL 样品溶液+3.0 mL 蒸馏水吸光度值; A_S —2.0 mL 样品溶液+3.0 mL DPPH 溶液吸光度值。

还原力的测定:量取 2.0 mL 不同浓度的红托竹荪多糖溶液(0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 mg/mL),将样品溶液与 2.5 mL 0.2 mol/L pH 为 6.6 的磷酸盐缓冲溶液和 2.5 mL 1%的铁氰化钾溶液充分混合,50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 20 min 后,加入 2.5 mL 10%的三氯乙酸溶液,将混合液在 3 000 r/min 条件下离心 10 min。吸取上清液 2.5 mL,依次加入 2.5 mL 蒸馏水和 0.5 mL 0.1%的三氯化铁溶液,于 700 nm 处测定吸光度值,以蒸馏水为空白,试验重复 3 次。

羟基自由基清除率的测定:将 1.0 mL 9.0 mmol/L 的 FeSO_4 溶液和 1.0 mL 10.0 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液充分混合,分别加入 1.0 mL 不同浓度的红托竹荪多糖溶液(0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 mg/mL),加入 2.0 mL 蒸馏水和 1.0 mL 6.0 mmol/L H_2O_2 溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min,于

510 nm 处测定吸光度值,以蒸馏水为空白。试验重复 3 次。羟基自由基清除率计算公式:羟基自由基清除率($\%$) $=[A_0-(A_S-A_C)]/A_0 \times 100\%$, A_0 —加入硫酸亚铁、水杨酸-乙醇、过氧化氢的吸光度值; A_S —加入硫酸亚铁、水杨酸-乙醇、过氧化氢、红托竹荪多糖溶液的吸光度值; A_C —加入硫酸亚铁、水杨酸-乙醇、红托竹荪多糖溶液的吸光度值。

1.2.5 动物实验设计

将体重为 160–180 g 的雄性 SD 大鼠在屏障系统中适应性喂养一周,随机分为空白对照组(NC 组)、模型对照组(MC 组)、阳性对照组(200 mg/kg 联苯双酯,PC 组)、竹荪多糖低剂量组(100 mg/kg, LDRP 组)、竹荪多糖中剂量组(200 mg/kg, MDRP 组)、竹荪多糖高剂量组(400 mg/kg, HDRP 组),每组 10 只。实验期间,动物自由摄取饲料、饮水,阳性对照组和红托竹荪多糖组分别按 10 mL/kg BW 灌胃联苯双酯和不同浓度的红托竹荪多糖,空白组和模型组灌胃等体积的蒸馏水。4 h 后,模型组、阳性对照组和红托竹荪多糖干预组按 12 mL/kg BW 灌胃 60%酒精,空白组灌胃等体积的蒸馏水,连续灌胃 28 d (Tang *et al.* 2017; Yang *et al.* 2020)。动物每周称量 2 次,按体重调整灌胃量。在末次给药后,禁食不禁水 16 h,按照 CO_2 吸入法处死动物,腹主动脉取血,离心后得到上层血清。立即解剖大鼠,用冰生理盐水冲洗肝脏,滤纸拭干后将肝左叶浸入 10%中性缓冲福尔马林组织固定液中,剩余肝组织液氮冷冻后,置于–80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.6 血生化指标的测定

采用全自动生化分析仪测定血清中 ALT、AST、TG 的活力。

1.2.7 肝脏生化指标的测定

将肝脏液氮研磨后加入生理盐水制成 10% 肝脏组织匀浆,4 $^{\circ}\text{C}$ 、4 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,根据试剂盒说明书方法检测 SOD 活力、MDA、GSH、TNF- α 、IL-6 含量。

1.2.8 肝脏组织病理学观察

将大鼠肝左叶中部置于 10% 中性缓冲福尔马林组织固定液中浸泡 3 d, 经酒精梯度脱水, 石蜡包埋, 预冷切片, 苏木精-伊红染色处理后, 在 400 倍显微镜下观察肝脏组织形态变化。

1.3 统计学方法

实验数据均采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 结果以均数 $\pm$ 标准差表示, 多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 红托竹荪多糖含量的测定

标准曲线见图 1, 回归方程为 $y = 7.8813x - 0.0051$, $R^2 = 0.9997$ 。采用苯酚-硫酸法测得红托竹荪多糖的含量约为 $74.68\% \pm 1.32\%$ 。

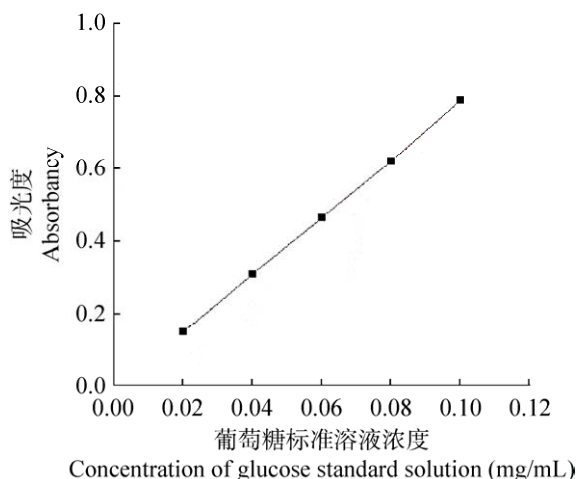


图 1 葡萄糖标准曲线

Fig. 1 Standard curve of glucose.

2.2 红托竹荪多糖红外扫描分析

红托竹荪多糖在 3432.23 cm^{-1} 处有一个较强吸收峰, 是糖类的 O-H 伸缩振动; 在 2925.29 cm^{-1} 处的吸收峰是甲基或亚甲基 C-H 伸缩振动; $1400\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ 处的一组峰为 C-H 变角振动 (图 2), 以上 3 个特征峰可以判断红托竹荪多糖具有糖类结构。O-H 宽吸收峰的较低波数处的肩峰,

为 N-H 伸缩振动, 表明红托竹荪多糖含有氨基基团。 $1200\text{--}950\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰为吡喃环吸收峰; 在 1046.10 cm^{-1} 、 1080.25 cm^{-1} 和 1150.29 cm^{-1} 有 3 个吸收峰, 为环内醚 C-O-C 和 C-O-H 中的 C-O 伸缩振动; 918.86 cm^{-1} 处的吸收峰为甘露糖特征吸收峰; 901.12 cm^{-1} 处的吸收峰为 β -构型糖苷键; 573.48 cm^{-1} 处的吸收峰为 α -构型糖苷键。说明红托竹荪多糖是含有 α -糖苷键和 β -糖苷键的吡喃环多糖。

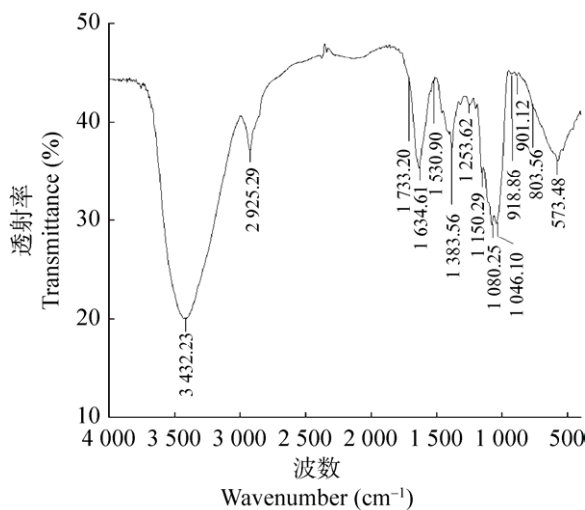


图 2 红托竹荪多糖红外光谱图

Fig. 2 Infrared spectra of *Dictyophora rubrovalvata* polysaccharide (DRP).

2.3 红托竹荪多糖的体外抗氧化作用

以维生素 C 作阳性对照, 当维生素 C 浓度为 0.5 mg/mL 时, 其对 DPPH 自由基的清除率已达到 92.35% 且趋于稳定; 还原力基本稳定为 3.63 ; 当维生素 C 浓度达到 1.0 mg/mL 时, 其对羟基自由基的清除率已达到 94.20% (图 3)。随着红托竹荪多糖浓度的增加, 还原力、DPPH 自由基、羟基自由基清除率逐渐升高。当红托竹荪多糖浓度达到 3.0 mg/mL 时, DPPH 自由基的清除率达到 80.12% , 其 IC_{50} 值为 1.34 mg/mL ; 其还原力为 0.31 ; 对羟基自由基的清除率达到 88.07% , 其 IC_{50} 值为 1.65 mg/mL 。说明红托竹荪多糖具有较强的体外抗氧化作用。

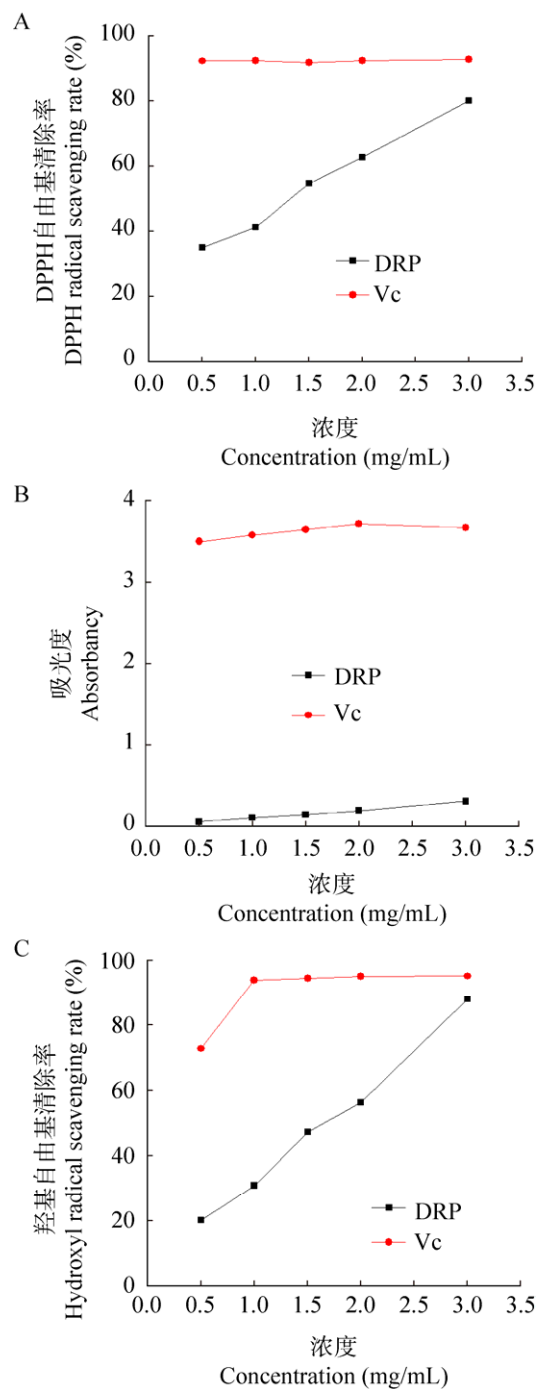


图3 红托竹荪多糖对DPPH自由基、还原力、羟基自由基的清除作用

Fig. 3 Scavenging effects of *Dictyophora rubrovalvata* polysaccharide (DRP) on DPPH radical, reducing power and hydroxyl radical.

2.4 红托竹荪多糖对酒精性肝损伤大鼠体重的影响

适应性喂养一周后，各组大鼠初始体重无显

著性差异(表1)。随着实验的进行，与NC组相比，MC组大鼠体重增幅明显降低($P<0.05$)。与MC组相比，红托竹荪多糖各剂量组大鼠体重增幅逐渐上升。说明红托竹荪多糖的干预可以缓解酒精引起的体重降低，同时也说明红托竹荪多糖对大鼠无毒害作用。

表1 红托竹荪多糖对酒精性肝损伤大鼠体重的影响

Table 1 Effects of *Dictyophora rubrovalvata* polysaccharide (DRP) on body weight of rats with alcoholic liver injury ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	初始体重	终体重
Group	Initial weight (g)	Final weight (g)
NC	195.65±11.28	392.35±34.24 ^a
MC	202.2±18.95	316.9±5.96 ^c
PC	201.9±13.72	368.05±14.57 ^b
LDRP	207.25±13.85	340.05±19.05 ^b
MDRP	194.2±14.21	347.85±12.71 ^b
HDRP	201.75±16.14	359.6±19.33 ^b

注：不同的字母表示各组之间差异显著($P<0.05$)NC：空白对照组；MC：模型对照组；PC：阳性对照组；LDRP：红托竹荪多糖低剂量组；MDRP：红托竹荪多糖中剂量组；HDRP：红托竹荪多糖高剂量组(下同)不同的字母表示各组之间差异显著 ($P<0.05$)

Note: Values not sharing a common superscript letter denote a significant difference ($P<0.05$). NC, normal control; MC, model control; PC, positive control; LDRP, low-dose DRP; MDRP, middle-dose DRP; HDRP, high-dose DRP (the same below). Values not sharing a common superscript letter denote a significant difference ($P<0.05$).

2.5 红托竹荪多糖对酒精性肝损伤大鼠血清AST、ALT、TG的影响

与NC组相比，MC组大鼠血清中的AST、ALT、TG水平显著升高($P<0.05$ ，图4)，说明本研究成功建立了大鼠酒精性肝损伤模型。PC组和DRP各剂量组可抑制ASL、ALT、TG水平的升高。与MC组相比，HDRP组AST、ALT、TG水平分别下降34.76%、53.54%、44.55%。结果表明，红托竹荪多糖能有效缓解酒精引起的大鼠血清AST、ALT、TG水平的升高。

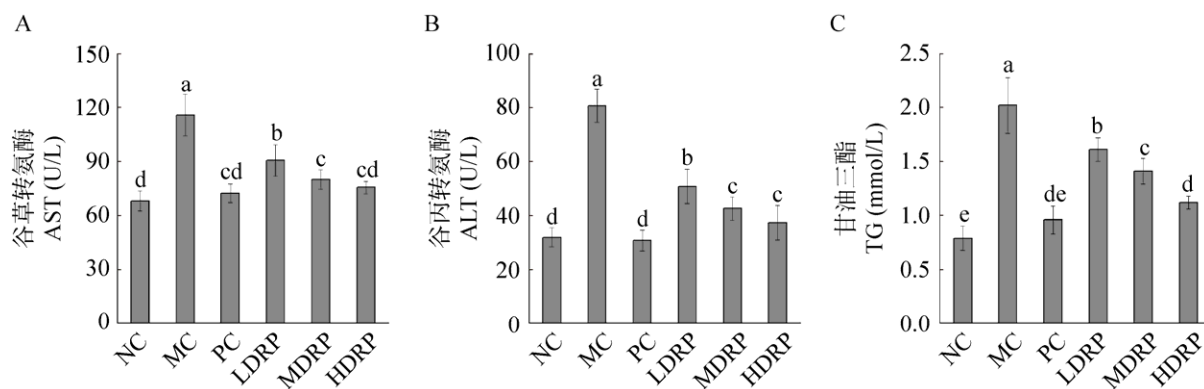


图4 红托竹荪多糖对酒精性肝损伤大鼠血清AST、ALT、TG的影响 不同的字母表示各组之间差异显著(P<0.05)

Fig. 4 Effects of *Dictyophora rubrovalvata* polysaccharide (DRP) on serum AST (A), ALT (B) and TG (C) in rats with alcoholic liver injury. Values not sharing a common superscript letter denote a significant difference (P<0.05).

2.6 红托竹荪多糖对酒精性肝损伤大鼠肝脏SOD、GSH、MDA的影响

与NC组相比,MC组大鼠肝脏中的SOD和GSH水平显著下降(P<0.05,图5),MDA水平显著升高(P<0.05),说明酒精破坏了大鼠肝脏的抗氧化系统。PC组和DRP各剂量组能提高SOD和GSH水平,降低MDA水平。与MC组相比,HDRP组SOD和GSH水平分别升高79.83%和82.14%,MDA水平下降25.78%。结果表明,红托竹荪多糖可通过增强抗氧化能力来缓解酒精

对大鼠肝脏的损害。

2.7 红托竹荪多糖对酒精性肝损伤大鼠肝脏TNF-α和IL-6的影响

与NC组相比,MC组大鼠血清中的TNF-α和IL-6水平显著升高(P<0.05,图6),说明酒精可诱导大鼠肝脏出现炎症反应。PC组和DRP各剂量组可抑制TNF-α和IL-6水平的升高。与MC组相比,HDRP组TNF-α和IL-6水平分别下降23.44%、48.69%。结果表明,红托竹荪多糖可正向调节酒精导致的炎症反应。

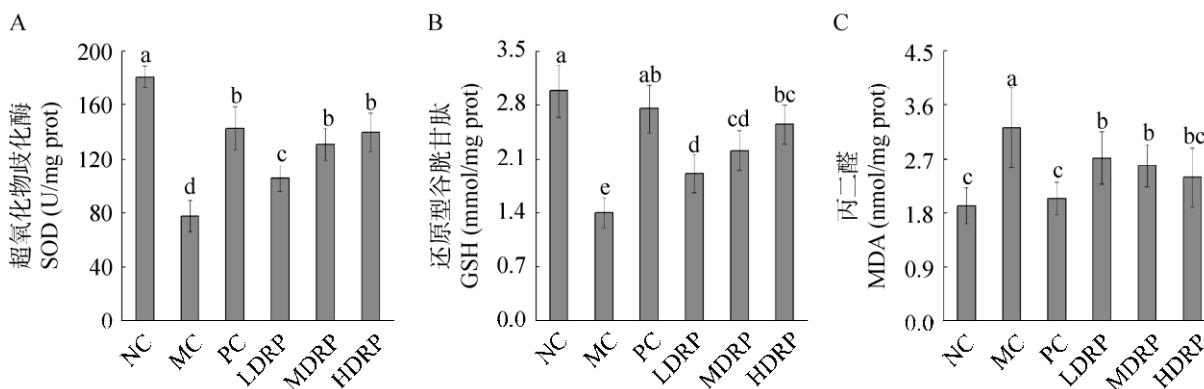


图5 红托竹荪多糖对酒精性肝损伤大鼠肝脏SOD、GSH、MDA的影响 不同的字母表示各组之间差异显著(P<0.05)

Fig. 5 Effects of *Dictyophora rubrovalvata* polysaccharide (DRP) on liver SOD (A), GSH (B) and MDA (C) in rats with alcoholic liver injury. Values not sharing a common superscript letter denote a significant difference (P<0.05).

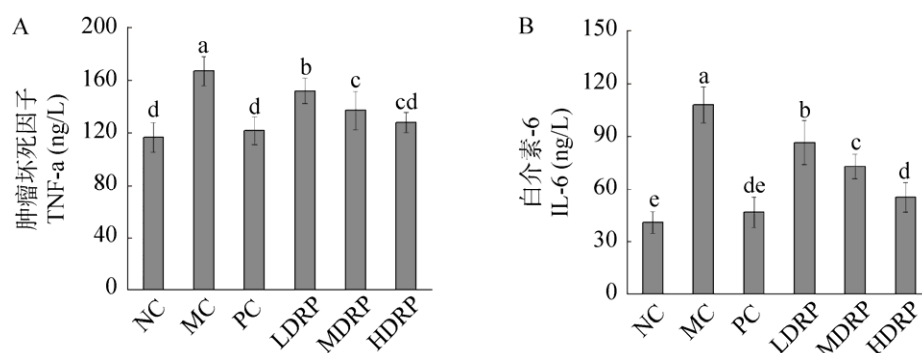


图 6 红托竹荪多糖对酒精性肝损伤大鼠肝脏 TNF- α (A)和 IL-6 (B)的影响 不同的字母表示各组之间差异显著($P < 0.05$)

Fig. 6 Effects of *Dictyophora rubrovalvata* polysaccharide (DRP) on liver TNF- α (A) and IL-6 (B) in rats with alcoholic liver injury. Values not sharing a common superscript letter denote a significant difference ($P < 0.05$).

2.8 红托竹荪多糖对酒精性肝损伤大鼠肝组织形态的影响

NC 组肝细胞形态规则,肝索排列整齐,细胞边界未破裂,没有出现坏死和炎性细胞浸润等现象;MC 组出现严重损伤,大量炎性细胞

浸润,肝细胞坏死等(图 7)。PC 组可明显改善酒精性肝损伤,细胞形态趋于正常。随着红托竹荪多糖剂量的增加,细胞坏死的数量逐渐减少,仅有少量空泡、炎性浸润,且存在一定的剂量效应。

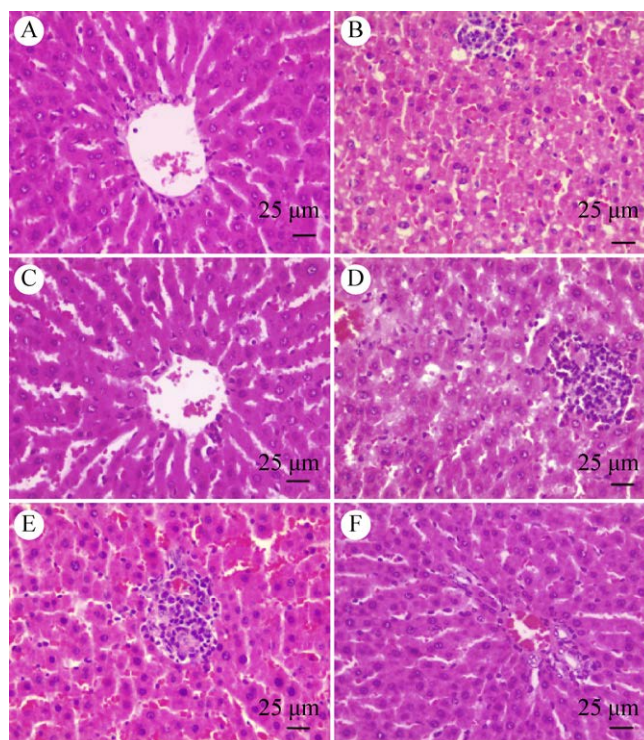


图 7 酒精性肝损伤大鼠的肝脏组织形态学观察(400 $\times$) A: 空白对照组; B: 模型对照组; C: 阳性对照组; D: DRP 低剂量组; E: DRP 中剂量组; F: DRP 高剂量组. 标尺=25 μ m

Fig. 7 Histomorphological observation of liver in rats with alcoholic liver injury (400 $\times$). A: Normal control; B: Model control; C: Positive control; D: Low-dose DRP; E: Middle-dose DRP; F: High-dose DRP. Bars=25 μ m.

3 讨论

肝脏是人体酒精代谢的重要器官, 大约 80% 的酒精在肝脏中进行代谢。酒精摄入过多会导致肝脏出现一系列损害性病变。如何安全有效地预防和治疗酒精性肝病已受到全社会的关注。大量研究表明食用菌多糖可有效保护酒精性肝损伤, 如香菇多糖(高艳等 2020)、灵芝多糖(叶丽云等 2021)、多汁乳菇多糖(王秋艳等 2021)等。红托竹荪是一种珍贵的食药两用真菌, 大量研究表明其具有多种生物活性功能, 但目前红托竹荪多糖对大鼠酒精性肝损伤的保护作用研究还处于初步探索阶段。

还原力的测定、DPPH 自由基和羟基自由基清除试验常用于评价化合物抗氧化活性。还原力显示了活性物质提供电子或氢原子的能力, 与抗氧化活性呈正相关。DPPH 是一种稳定的自由基, 对蛋白质、核酸等大分子具有损害作用(王远等 2014)。已有文献报道羟基自由基与生物分子的毒性和诱导脂质过氧化有关(Zhao *et al.* 2017)。本研究发现, 当红托竹荪多糖浓度为 3.0 mg/mL 时, 其对 DPPH 自由基、羟基自由基的清除率分别达到 80.12% 和 88.07%, 表明红托竹荪多糖具有较强的体外抗氧化能力, 这与叶敏(2012)和巩贵丽(2014)的研究结果一致。

本研究显示, 模型对照组大鼠毛发色泽暗淡, 精神萎靡, 活动减少, 且体重相较于空白组显著下降。经红托竹荪多糖干预后, 上述症状均有所改善, 随着多糖剂量的增加, 大鼠体重增长明显。说明红托竹荪多糖的干预可缓解酒精引起的体重降低。血清中的 AST 和 ALT 是评估肝脏损伤的胞浆标记酶(邓燕 2021), 当肝脏受损时, 细胞膜通透性增加, AST 和 ALT 从细胞渗透到血液中, 导致血液中 AST 和 ALT 水平显著升高。血清中 TG 在肝细胞周围堆积, 可导致肝脏脂肪代谢紊乱(Joshua *et al.* 2020)。已有研究表明食用菌多糖可抑制肝脏脂肪的堆积(Xu *et al.* 2019)。本

实验研究发现, 通过红托竹荪多糖的干预可显著改善因酒精造成的肝脏脂肪空泡增多, 炎性浸润等现象; 同时显著降低大鼠血清中 AST、ALT 和 TG 水平, 表明红托竹荪多糖可改善肝脏脂质代谢紊乱。

氧化应激在酒精性肝损伤的发病机制中起着重要作用, 酒精性肝损伤可由促氧化剂和抗氧化剂的失衡引起(Elisabetta *et al.* 2014)。酒精通过多种途径介导氧化应激, 包括活性氧的生成和脂质过氧化等。Zhao *et al.* (2018)用酒精腹腔注射小鼠, 并用鸡腿菇多糖对其进行灌胃, 实验结果表明鸡腿菇多糖有较强的抗氧化能力, 可调节肝脏脂质过氧化水平, 对酒精性肝损伤具有一定的保护作用。Govindan *et al.* (2021)用高、低两种剂量的大榆蘑多糖对酒精性肝损伤大鼠进行干预, 结果也显示大榆蘑多糖可调节机体抗氧化水平, 且存在剂量反应关系。本实验研究发现, 通过红托竹荪多糖的干预可显著提高 SOD 和 GSH 水平, 降低 MDA 水平, 维持机体的氧化还原平衡, 表明红托竹荪多糖可缓解酒精引起的氧化应激。

炎症反应是导致酒精性肝损伤的典型病理机制, 促炎细胞因子在酒精性肝损伤中发挥重要作用(Seitz *et al.* 2018)。其中, TNF- α 和 IL-6 是引发炎症级联反应的主要促炎细胞因子(Elisabetta *et al.* 2014)。在肝脏中, TNF- α 主要由活化的 Kupffer 细胞产生, 可加速中性粒细胞迁移, 增加蛋白水解酶和活性氧自由基的产生, 从而导致肝脏损伤。IL-6 通过诱导免疫细胞分化、溶酶体释放反应, 直接损害肝脏细胞, 诱发炎症性疾病(Kawaratani *et al.* 2013)。Song *et al.* (2018, 2021)研究表明秀珍菇多糖可增强抗炎能力, 减轻小鼠酒精性肝损伤。孙艳辉和张宏波(2020)研究表明灵芝多糖对酒精性肝损伤小鼠具有显著的抗炎作用。本实验研究发现, 通过红托竹荪多糖的干预可显著降低 TNF- α 和 IL-6 水平, 抑制促炎细胞因子, 可有效预防和治疗酒精性肝损伤。

综上所述,红托竹荪多糖是含有 α -糖苷键和 β -糖苷键的吡喃环多糖,具有一定的体外抗氧化能力,且对大鼠酒精性肝损伤具有一定的保护作用。其作用机制是降低 AST、ALT 和 TG 水平,提高 SOD 和 GSH 水平,降低 MDA 含量,降低炎症因子 TNF- α 和 IL-6 的表达。说明红托竹荪多糖可作为预防酒精性肝损伤的功能因子,在功能性食品领域具有广阔的发展前景,但其作用机制还需进一步研究。

致谢: 感谢贵州科学院谭红老师、贵州医科大学杨鸿波老师、孙晓红老师对本文写作的指导;感谢贵州健安德科技有限公司许筱莉老师、赵显莉老师、滕春丽师姐、陶会师妹等在实验方面的指导和帮助。

[REFERENCES]

- Ceni E, Mello T, Galli A, 2014. Pathogenesis of alcoholic liver disease: role of oxidative metabolism. *World Journal of Gastroenterology*, 20(47): 17756
- Dai YC, Zhou LW, Yang ZL, Wen HA, Bau T, Li TH, 2010. A revised checklist of edible fungi in China. *Mycosystema*, 29(1): 1-21 (in Chinese)
- Deng C, Fu H, Xu J, Shang J, Cheng Y, 2015. Physiochemical and biological properties of phosphorylated polysaccharides from *Dictyophora indusiata*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72: 894-899
- Deng Y, 2021. Significance of serum transaminase and lipid determination in diagnosis of fatty liver. *China Continuing Medical Education*, 13(1): 100-102 (in Chinese)
- Elisabetta C, Tommaso M, Andrea G, 2014. Pathogenesis of alcoholic liver disease: Role of oxidative metabolism. *World Journal of Gastroenterology*, 20(47): 17756-17772
- Gao X, Qi J, Ho CT, Li B, Mu J, Zhang Y, Hu H, Mo W, Chen Z, Xie Y, 2020. Structural characterization and immunomodulatory activity of a water-soluble polysaccharide from *Ganoderma leucocontextum* fruiting bodies. *Carbohydrate Polymers*, 249: 116874
- Gao Y, Zhang JY, Zhou BY, 2020. Study on the protective effect of lentinan on alcoholic liver injury in male Wistar rats. *Chinese Journal of Public Health Engineering*, 19(6): 808-810, 816 (in Chinese)
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, 2009. GB/T 15672-2009 Determination of total saccharide in edible mushroom. Standards Press of China, Beijing. 1-8 (in Chinese)
- Gong GL, 2014. Studies on optimization of extraction process and antioxidant ability in vitro of polysaccharides in *dictyophora indusiata*. Tianjin University, 2014: 1-68 (in Chinese)
- Govindan S, Jayabal A, Shanmugam J, Ramani P, 2021. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Hypsizygus ulmarius* polysaccharide on alcoholic liver injury in rats. *Food Science and Human Wellness*, 10(4): 523-535
- Han Q, Li JG, Cai YX, Ge CY, Zhang JQ, Yang Y, Li J, 2020. Comparative study on functional properties and basic structure of soluble soybean polysaccharides from different sources. *Journal of Food Safety and Quality*, 11(9): 2870-2877 (in Chinese)
- Joshua S, Nicola K, Michael H, Naina S, 2020. Early diagnosis of alcohol-related liver disease and timely intervention: the role of alcohol care teams. *Journal of Hepatology*, 73(Supl.1): 188-189
- Kang Q, Chen S, Li S, Wang B, Liu X, Hao L, Lu J, 2019. Comparison on characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* by ultrasound and conventional extraction. *International Journal of Biological Macromolecules*, 124: 1137-1144
- Kanwal S, Joseph TP, Aliya S, Song S, Saleem MZ, Nisar MA, Wang Y, Meyiah A, Ma Y, Xin Y, 2020. Attenuation of DSS induced colitis by *Dictyophora indusiata* polysaccharide (DIP) via modulation of gut microbiota and inflammatory related signaling pathways. *Journal of Functional Foods*, 64: 103641
- Kawaratani H, Tsujimoto T, Douhara A, Takaya H, Moriya K, Namisaki T, Noguchi R, Yoshiji H, Fujimoto M, Fukui H, 2013. The effect of inflammatory cytokines in alcoholic liver disease. *Mediators of Inflammation*, 2013: 1-11
- Liu M, Song X, Zhang J, Zhang C, Gao Z, Li S, Jing H, Ren Z, Wang S, Jia L, 2017a. Protective effects on liver, kidney and pancreas of enzymatic- and acidic-hydrolysis of polysaccharides by spent mushroom compost (*Hypsizygus marmoreus*). *Scientific Reports*, 7(1): 1-12
- Liu Y, Wang J, Li L, Hu W, Qu Y, Ding Y, Meng L, Teng L, Wang D, 2017b. Hepatoprotective effects of *Antrodia cinnamomea*: the modulation of oxidative stress signaling in a mouse model of alcohol-induced acute liver injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017: 1-12
- National Workshop on Fatty Liver and Alcoholic Liver Disease, Chinese Society of Hepatology, Chinese Medical Association; Fatty Liver Expert Committee, Chinese Medical Doctor Association, 2018. Guidelines of prevention and treatment for alcoholic liver disease: a

- 2018 update. Journal of Clinical Hepatology, 34(5): 939-946 (in Chinese)
- Rao J, Zhang YZ, 1998. Cultivation of *Dictyophora rubrovalvata*. Bulletin of Biology, 4: 47-49 (in Chinese)
- Ren L, Zhang J, Zhang T, 2021. Immunomodulatory activities of polysaccharides from *Ganoderma* on immune effector cells. Food Chemistry, 340: 127933
- Sadia K, Thomson PJ, Shams A, Siyuan S, Muhammad ZS, Muhammad AN, Yue W, Abdo M, Yu FM, Yi X, 2020. Attenuation of DSS induced colitis by *Dictyophora indusiata* polysaccharide (DIP) via modulation of gut microbiota and inflammatory related signaling pathways. Journal of Functional Foods, 64(C): 103641
- Seitz HK, Bataller R, Cortez-Pinto H, Gao B, Gual A, Lackner C, Mathurin P, Mueller S, Szabo G, Tsukamoto H, 2018. Alcoholic liver disease. Nature Reviews Disease Primers, 4(1): 1-22
- Song X, Liu Z, Zhang J, Yang Q, Ren Z, Zhang C, Liu M, Gao Z, Zhao H, Jia L, 2018. Anti-inflammatory and hepatoprotective effects of exopolysaccharides isolated from *Pleurotus geesteranus* on alcohol-induced liver injury. Scientific Reports, 8(1): 1-13
- Song X, Sun W, Cui W, Jia L, Zhang J, 2021. A polysaccharide of PFP-1 from *Pleurotus geesteranus* attenuates alcoholic liver diseases via Nrf2 and NF- κ B signaling pathways. Food & Function, 12(10): 4591-4605
- Stapleton J, Kalk N, Heneghan M, Shah N, 2020. Early diagnosis of alcohol-related liver disease and timely intervention: the role of alcohol care teams. Journal of Hepatology, 73: S188-S189
- Sun TH, Liu ZS, Xin YN, 2019. Treatment of alcoholic liver disease. Journal of Practical Hepatology, 22(2): 156-159 (in Chinese)
- Sun YH, Zhang HB, 2020. Effects of *Ganoderma* polysaccharide on liver fat deposits and NLRP3 inflammatory corpuscle expression of mice with acute liver injury. World Chinese Medicine, 15(6): 842-845 (in Chinese)
- Tang X, Wei R, Deng A, Lei T, 2017. Protective effects of ethanolic extracts from artichoke, an edible herbal medicine, against acute alcohol-induced liver injury in mice. Nutrients, 9(9): 1000
- Teng CL, Yan M, Xiang RQ, Ao Z, He JL, Sun XH, Tan H, 2021. Study on optimization of extraction and membrane fractionation of polysaccharide from *Dictyophora rubrovalvata*. Journal of Food Safety and Quality, 12(12): 4984-4990 (in Chinese)
- Wang QY, Ding HM, Zhu YN, Huang XY, Tao MX, 2021. Hepatoprotective effect of refined polysaccharide from *Lactarius volemus* Fr. on alcohol-induced acute liver injury in mice. Science and Technology of Food Industry, 16(8): 1-12 (in Chinese)
- Wang X, Liu M, Zhang C, Li S, Yang Q, Zhang J, Gong Z, Han J, Jia L, 2018. Antioxidant activity and protective effects of enzyme-extracted *Oudemansiella radiata* polysaccharides on alcohol-induced liver injury. Molecules, 23(2): 481
- Wang X, Wang Q, 2020. Study on the anti-hypoxia and anti-fatigue ability of polysaccharide from *Dictyophora rotundifolia*. Edible Fungi of China, 39(12): 83-86, 91 (in Chinese)
- Wang Y, Jia G, Wang M, Cheng N, Cao W, Zhao J, 2014. Advances in studies on antioxidant activity of honey. Food and Fermentation Industries, 40(7): 111-114 (in Chinese)
- World Health Organization, 2019. Global status report on alcohol and health 2018. 1-472
- 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
- Xu N, Gao Z, Zhang J, Jing H, Li S, Ren Z, Wang S, Jia L, 2017. Hepatoprotection of enzymatic-extractable mycelia zinc polysaccharides by *Pleurotus eryngii* var. *tuoliensis*. Carbohydrate Polymers, 157: 196-206
- Xu Y, Zhang X, Yan XH, Zhang JL, Wang LY, Xue H, Jiang GC, Ma XT, Liu XJ, 2019. Characterization, hypolipidemic and antioxidant activities of degraded polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. International Journal of Biological Macromolecules, 135: 706-716
- Yang JY, Zhang C, 2020. Research progress on the structure and extraction methods of polysaccharides from *Dictyophora indusiata*. Shandong Chemical Industry, 49(17): 54-56, 59 (in Chinese)
- Yang Q, Luo C, Zhang X, Liu Y, Wang Z, Cacciamani P, Shi J, Cui Y, Wang C, Sinha B, Peng B, 2020. Tartary buckwheat extract alleviates alcohol-induced acute and chronic liver injuries through the inhibition of oxidative stress and mitochondrial cell death pathway. American Journal of Translational Research, 12(1): 70
- Ye LY, Meng GL, Wu LY, Hao JB, Cheng B, 2021. Preventive effect of the *Ganoderma lingzhi* fruit-body polysaccharides on the acute alcoholic injury of mice liver based on metabonomics analysis. Mycosystema, 16(8): 1-14 (in Chinese)
- Ye M, 2012. Extraction technology and *in vitro* antioxidant activity of polysaccharides from *Dictyophora rubrovalvata*. Guizhou Agricultural Sciences, 40(12): 172-175 (in Chinese)
- Zhao H, Lan Y, Liu H, Zhu Y, Liu W, Zhang J, Jia L, 2017.

- Antioxidant and hepatoprotective activities of polysaccharides from spent mushroom substrates (*Laetiporus sulphureus*) in acute alcohol-induced mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017: 5863523
- Zhao H, Zhang J, Liu X, Yang Q, Dong Y, Jia L, 2018. The antioxidant activities of alkaline-extractable polysaccharides from *Coprinus comatus* on alcohol-induced liver injury in mice. *Scientific Reports*, 8(1): 1-12
- Zheng Y, Cui J, Chen AH, Zong ZM, Wei XY, 2019. Optimization of ultrasonic-microwave assisted extraction and hepatoprotective activities of polysaccharides from *Trametes orientalis*. *Molecules*, 24(1): 147
- [附中文参考文献]**
- 戴玉成, 周丽伟, 杨祝良, 文华安, 图力古尔, 李泰辉, 2010. 中国食用菌名录. *菌物学报*, 29(1): 1-21
- 邓燕, 2021. 血清转氨酶及血脂检测诊断脂肪肝的意义. *中国继续医学教育*, 13(1): 100-102
- 高艳, 张晶莹, 周博宇, 2020. 香菇多糖对雄性 Wistar 大鼠酒精性肝损伤的预防保护作用. *中国卫生工程学*, 19(6): 808-810, 816
- 巩贵丽, 2014. 竹荪多糖提取工艺的优化及其体外抗氧化活性的研究. *天津大学*, 2014: 1-68
- 韩晴, 李军国, 蔡云霞, 葛春雨, 张嘉琦, 杨莹, 李俊, 2020. 不同来源水溶性大豆多糖功能特性及基本结构的比较研究. *食品安全质量检测学报*, 11(9): 2870-2877
- 饶军, 张云珍, 1998. 红托竹荪的栽培. *生物学通报*, 4: 47-49
- 孙韬华, 刘振胜, 辛永宁, 2019. 酒精性肝病治疗研究进展. *实用肝脏病杂志*, 22(2): 156-159
- 孙艳辉, 张宏波, 2020. 灵芝多糖对急性酒精性肝损伤小鼠肝脏脂肪沉积及 NLRP3 炎性小体表达的影响. *世界中医药*, 15(6): 842-845
- 滕春丽, 颜蜜, 向瑞琪, 敖珍, 何锦林, 孙晓红, 谭红, 2021. 红托竹荪多糖的提取优化及膜分级分离的研究. *食品安全质量检测学报*, 12(12): 4984-4990
- 王秋艳, 丁慧敏, 朱亚男, 黄馨阁, 陶明煊, 2021. 多汁乳菇多糖对小鼠急性酒精性肝损伤的保护作用. *食品工业科技*, 16(8): 1-12
- 王新, 王强, 2020. 红托竹荪多糖的耐缺氧及抗运动疲劳能力的研究. *中国食用菌*, 39(12): 83-86, 91
- 王远, 贾歌, 王萌, 程妮, 曹炜, 赵静, 2014. 蜂蜜抗氧化活性研究进展. *食品与发酵工业*, 40(7): 111-114
- 杨晶莹, 张驰, 2020. 竹荪多糖的研究进展. *山东化工*, 49(17): 54-56, 59
- 叶丽云, 孟国良, 吴龙月, 郝金斌, 程冰, 2021. 灵芝子实体多糖对小鼠急性酒精肝损伤预防的代谢组分析. *菌物学报*, 16(8): 1-14
- 叶敏, 2012. 红托竹荪多糖的提取工艺及其体外抗氧化活性. *贵州农业科学*, 40(12): 172-175
- 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 2009. GB/T 15672-2009 食用菌中总糖的测定. 北京: 中国标准出版社. 1-8
- 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组, 中国医师协会脂肪性肝病专家委员会, 2018. 酒精性肝病防治指南(2018 年更新版). *临床肝胆病杂志*, 34(5): 939-946