

黑牛肝菌多糖对酒精性损伤小鼠心脏 及脾脏抗氧化作用的研究

赵云霞¹, 陶明煊¹, 郭永月¹, 邢佳¹, 程光宇², 龚莲霞¹

(1. 南京师范大学金陵女子学院, 江苏 南京 210097)

(2. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210023)

[摘要] 本文旨在研究黑牛肝菌多糖(RPBA)对酒精性损伤小鼠心脏及脾脏的抗氧化保护作用. 将小鼠随机分为空白对照组、模型对照组、RPBA 中剂量组(200 mg/kg bw·d)和高剂量组(400 mg/kg bw·d), 在给予各受试样品 30 d 后, 各组小鼠禁食不禁水 12 h, 然后除空白组外其余 3 个组都灌以 50% 酒精, 灌胃量 12 mL/kg·bw, 空白对照组灌等体积的蒸馏水. 12 h 后将各组动物处死, 取心脏、脾脏测定各项抗氧化指标. 结果发现, 黑牛肝菌多糖能有效提高 SOD 活性, 降低 MDA 含量. 结论: 黑牛肝菌多糖对急性酒精损伤小鼠的心脏和脾脏有一定的保护作用.

[关键词] 黑牛肝菌多糖, 心脏, 脾脏, 酒精, 抗氧化

[中图分类号] TS201.4 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2014)01-0133-04

Antioxidation of *Boletus Aereus* Polysaccharides on Alcoholic's Injury of Mice Heart and Spleen

Zhao Yunxia¹, Tao Mingxuan¹, Guo Yongyue¹, Xing Jia¹, Chen Guangyu², Gong Lianxia¹

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

(2. School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

Abstract: The antioxidation of refined polysaccharides from *Boletus aereus* (RPBA) on acute alcoholic hepatic injury of heart and spleen in mice were investigated. The mice were randomly divided into blank control group, alcoholic model control group and RPBA groups (200, 400 mg/kg bw). All mice were administered for 30 d prior to the administration with dose of 50% alcohol (12 mL/kg bw) except blank control group. 12 h after alcohol treatment, all mice were dislocation death to assay activities of antioxidant capabilities in heart and spleen. The contents of MDA in heart and spleen revealed an obvious decrease in the RPBA treatment groups when comparing to the model group, while the activity of SOD in the heart and spleen exhibited an obvious increase. Conclusions: RPBA can protect heart and spleen from injury induced by alcohol in mice.

Key words: *Boletus aereus* polysaccharides, heart, spleen, alcohol, antioxidation

饮酒过量会导致机体氧化和抗氧化平衡的失调, 使心肌产生大量氧自由基, 造成脂质过氧化, 形成心肌损伤, 并且伴有心率加快^[1-3]; 还会对哺乳动物脾脏的生长发育起显著的抑制作用, 使脾脏重量显著降低, 引起脾脏细胞发生脂质过氧化, 细胞膜通透性增强, 膜表面受体受损, 进而影响机体的免疫功能^[4].

随着生活水平的提高、生活节奏的加快与工作压力的加大, 酒精消耗量与饮酒人数都在逐年上升. 因此, 从天然的食物中寻找高效安全的自由基清除剂已迫在眉睫, 而食用菌多糖作为保健食品已经逐渐为人们所认知, 尤其在生物活性方面备受关[5]. 越来越多的研究发现^[6-9], 许多食用菌多糖具有清除自由基、提高抗氧化酶活性和抑制脂质过氧化的活性, 起到保护生物膜、延缓衰老和提高机体免疫的作用.

黑牛肝菌 (*Boletus aereus*, BA) 又称枣铜色牛肝菌, 属担子菌门、伞菌纲、牛肝菌目、牛肝菌科、牛肝菌

收稿日期: 2013-06-19.

基金项目: 江苏省高校自然科学基金基础研究项目(10KJD550003).

通讯联系人: 陶明煊, 副教授, 研究方向: 生物活性物质与保健功能因子. E-mail: 45017@njjnu.edu.cn

属^[10],在我国云南、四川、贵州、广西等地^[11]广泛分布,是一种珍稀的野生食用菌,具有较高的营养价值和鲜美的口感。黑牛肝菌含有丰富的矿质元素,特别是人体必需的钙、铁、磷、铜、锰等元素,其中铁、磷、钙、铜、锰均高于常见食用菌^[12-14],该菌还含有人体必需的18种氨基酸^[15,16]。此外,黑牛肝菌还具有清热解毒、养血和中、追风散寒、舒筋和血等功效^[17],可治疗妇女白带症和不孕症^[18]。其水提物还有抗癌、抗病毒作用^[19,20]。黑牛肝菌中含有较多多糖类物质,具有补血、润肠、养发等保健营养功能,更具有抗癌功效^[21],因此其具有很好的开发潜力和市场前景。

本研究以黑牛肝菌为原材料,探讨了黑牛肝菌多糖对急性酒精损伤性小鼠心脏和脾脏的保护作用,旨在为保健食品或天然药物的研制和开发提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

黑牛肝菌子实体干品购自云南丽江市古城区喜玛拉雅贸易有限责任公司,经去杂质、剪去含培养基的根部,于60℃低温烘干后粉碎,过60目筛。将细粉经热水提取、浓缩、乙醇沉淀(1:4, *m/v*)、低温干燥等步骤后,得到粗多糖,后经Sevag法脱蛋白、透析、乙醇沉淀、低温干燥后得黑牛肝菌精多糖,经测定多糖含量约为75.02%,蛋白含量为2.11%。

ICR雄性小鼠(6周龄左右),体重(25.75±1.65)g,动物试验在江苏省中医院动物饲养中心进行,动物饲养许可证号(SYXK(苏)2012-0047)。

四乙氧基丙烷购自Fluka公司;谷胱甘肽(GSH)、牛血清白蛋白(BSA)购自Sigma公司;NBT、DTNB购自南京卓尔生化有限公司;硫代巴比妥酸(TBA)、过氧化氢等生化试剂为国产分析纯。

GL-22M高速冷冻离心机购自湖南赛特湘仪离心机仪器有限公司;722可见分光光度计购自上海精密科学仪器有限公司;恒温水浴锅购自金坛市杰瑞尔电器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 造模

小鼠适应性喂养3d,每组10只,随机分为模型组、RPBA中高剂量组((200、400)mg/kg bw),另取10只健康小鼠为空白对照组。受试样品用蒸馏水配制,每天灌胃1次,连续灌胃30d,实验期间供给全价颗粒饲料,不限制饮食饮水,空白对照组和模型对照组每天灌等体积的生理盐水。实验至第31d,各组动物禁食不禁水12h后,模型对照组及RPBA各剂量组以12mL/kg的量,灌以50%的乙醇溶液,建立动物急性肝损伤模型,空白组灌予等体积的生理盐水。各组小鼠均在灌胃12h后取心脏和脾脏测定各项抗氧化指标。

1.2.2 匀浆的制备

准确称取0.1g心脏或脾脏,用生理盐水洗去污血后拭干,剪碎并加入0.9mL预冷的50mmol/L磷酸缓冲液(pH7.8),于冰水浴中进行超声破碎(400W,20s×3)制成10%匀浆。匀浆于4℃10000r/min离心10min,一部分上清液用于测定MDA含量,另一部分上清液以3:1的比例加饱和硫酸铵溶液,同样条件下离心上清液即为粗酶液,用于测定SOD活性。

1.2.3 过氧化脂质降解产物丙二醛(MDA)含量的测定

MDA含量的测定采用改进的硫代巴比妥酸(TBA)法^[22]。

1.2.4 超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定

测定方法在Stewart和Bewly^[23]NBT光还原法的基础上,略有改进。亦即取1mL缓冲液(空白组)、组织粗酶液加入4mLNBT反应液中,光照3min~5min,以加入缓冲液不照光的反应液作为空白对照,在722分光光度计上于560nm波长测定各组吸收值。

1.2.5 数据分析

实验数据用DPS13.5进行统计学分析,单因素方差分析检验组间显著性差异,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果与分析

2.1 RPBA对酒精损伤性小鼠心脏和脾脏MDA含量的影响

丙二醛(MDA)是细胞膜氧化的最终产物之一,可通过其含量的测定简单估计脂质氧化的程度。

MDA 含量越多,表示细胞衰老的程度越大.由表 1 可知,造模后小鼠心脏组织中 MDA 含量明显高于空白对照组($p<0.01$),而脾脏组织中 MDA 含量在 $p<0.05$ 水平上高于空白对照组,表明在过量酒精作用下,细胞衰老程度明显增加,造模成功.给予 RPBA 后,多糖高剂量组小鼠心脏 MDA 含量在 $p<0.05$ 水平上显著低于模型对照组,而与空白对照组相比无显著差异,表明高剂量黑牛肝菌多糖能有效降低小鼠心脏的体内脂质过氧化水平,对酒精性心脏损伤有较好的保护作用;而多糖中剂量组小鼠脾脏匀浆中 MDA 含量虽与模型对照组无显著差异,但随着剂量的增加,MDA 含量逐渐降低,表明黑牛肝菌多糖在一定程度上能有效提高脾脏小鼠体内的脂质过氧化水平,对酒精性脾脏损伤有一定的保护作用.

2.2 RPBA 对酒精损伤性小鼠心脏和脾脏 SOD 活性的影响

超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)是生物体内重要的抗氧化酶,能消除生物体在新陈代谢过程中产生的有害物质. SOD 活力的高低间接反映了机体清除氧自由基的能力.由表 2 可见,造模后心脏和脾脏组织中 SOD 的活性均明显低于空白对照组($p<0.01$),给予 RPBA 后, SOD 活性虽未达到空白对照组水平,但随着多糖剂量的上升, SOD 的活性逐渐上升,呈一定的量效关系.说明 RPBA 能显著提高小鼠心脏和脾脏的 SOD 活性,增强机体清除自由基的能力,减轻其对小鼠心脏和脾脏的损害作用.

表 1 RPBA 对小鼠心脏和脾脏 MDA 含量的影响

(mean \pm s, $n=10$)

Table 1 Effect of RPBA on MDA contents in heart and spleen of mice($x\pm s$, $n=10$)

组别	心脏(nmol/mgpro)	脾脏(nmol/mgpro)
空白对照组	0.098 3 \pm 0.01 ^{cB}	0.125 \pm 0.02 ^{bA}
模型对照组	0.197 5 \pm 0.01 ^{aA}	0.227 3 \pm 0.01 ^{aA}
多糖中剂量组	0.193 5 \pm 0.04 ^{aA}	0.217 7 \pm 0.09 ^{aA}
多糖高剂量组	0.139 2 \pm 0.02 ^{bcAB}	0.162 8 \pm 0.02 ^{abA}

注:同列数据肩标相同字母表示差异不显著($p<0.05$, $p<0.01$);肩标不同小写字母表示差异显著($p<0.05$);肩标不同大写字母表示差异极显著($p<0.01$),下同.

表 2 RPBA 对小鼠心脏和脾脏 SOD 活性的影响

(mean \pm s, $n=10$)

Table 2 Effect of RPBA on SOD activity in heart and spleen of mice($x\pm s$, $n=10$)

组别	心脏(U/mgprot)	脾脏(U/mgprot)
空白对照组	74.096 7 \pm 0.75 ^{aA}	79.285 6 \pm 0.47 ^{aA}
模型对照组	41.38 \pm 0.38 ^{dB}	30.308 2 \pm 0.95 ^{dB}
多糖中剂量组	47.526 \pm 1.02 ^{cC}	51.058 3 \pm 0.68 ^{cC}
多糖高剂量组	52.064 \pm 0.73 ^{bB}	54.349 5 \pm 0.53 ^{bB}

3 讨论

急性过量饮酒容易导致机体氧化程度的提高,体内抗氧化体系的平衡受到破坏,酶活性下降,导致自由基大量积累,使过氧化产物不断增加,因此随着酒精消耗量的日益增加,寻找高效低毒的自由基清除剂,特别是从人们公认为“保健食品”的食用菌中进行筛选,是当前抗氧化作用研究的重要方向^[24].已有研究^[25-27]表明,MDA、SOD 水平是衡量氧化损伤的重要指标,许多重要的多糖主要是通过对 SOD 的增强作用及降低 MDA 的作用达到抗氧化的目的.

丙二醛(MDA)为脂质过氧化反应的代谢终产物,其含量可间接反映出机体细胞受自由基攻击程度^[28].过氧化物歧化酶(SOD)可以催化超氧阴离子自由基 $O_2^{\cdot-}$ 与氢离子反应生成氧气与过氧化氢,减少体内生物氧毒害作用,当酶活性降低时,会导致自由基积累,破坏细胞膜的完整性,并引起功能的丧失^[29].

本研究以黑牛肝菌为原材料,通过检测 MDA、SOD 2 个指标研究了黑牛肝菌多糖对小鼠酒精性心脏损伤及脾脏损伤的保护作用.结果显示,造模后小鼠心脏组织 MDA 含量明显高于空白对照组($p<0.01$),脾脏组织中 MDA 含量在 $p<0.05$ 水平上高于空白对照组,而心脏和脾脏组织中 SOD 的活性均明显低于空白对照组($p<0.01$).其机制可能是乙醇通过引起小鼠体内自由基的增多而导致生物膜损伤、MDA 含量增加,同时体内因防御自由基损伤而消耗 SOD,使其活力下降,导致机体氧化-抗氧化防御系统平衡失调,引起脾脏、心脏细胞发生脂质过氧化,细胞膜通透性增强,膜表面受体受损,进而影响机体的免疫功能,与急性酒精损伤机理的结果相同.

喂饲黑牛肝菌多糖的小鼠,多糖高剂量组心脏匀浆 MDA 含量仅在 $p<0.05$ 水平上有显著性,而在脾中并无显著性,这可能是由于 2 种器官不同功能所造成的,脾自身强大的免疫功能可以减少酒精带来的伤害;而心脏和脾脏匀浆两者的 SOD 活性虽未达到空白对照组水平,但随着多糖剂量的上升, SOD 的活性逐渐上升,呈一定的量效关系,这可能是通过 RPBA 预处理提高内源性抗氧化防御体系实现的.综上所述,黑牛肝菌多糖在预防自由基诱发氧化心脏和脾脏组织损伤方面,是具有开发前景的一种天然高效抗氧化剂.

[参考文献]

- [1] 王福伟,张翼,谷双振.酒精对心脏的保护和危害作用[J].河北医科大学学报,1999(6):376-377.
- [2] Nicholas S, Aberle II, Jun R. Short-term acetaldehyde exposure depresses ventricular myocyte contraction; role of cytochrome P450 oxidase, xanthine oxidase, and lipid peroxidation[J]. Alcohol Clin Exp Res, 2003, 27(4): 577-583.
- [3] Nicholas S, Aberle II, Jun R. Experimental assessment of the role of acetaldehyde in alcoholic cardiomyopathy[J]. Biological Procedures Online, 2003, 5(1): 1-12.
- [4] 杨郑州,田伟,王正朝,等.长期饮酒对哺乳动物免疫器官生长发育的影响[J].家畜生态学报,2008,29(4):65-67.
- [5] 朱建燕,于智勇.真菌多糖的研究与利用[J].扬州教育学院学报,2000(3):18-21.
- [6] 党蕾,郝佳欣,江海涛.几种食用菌多糖抗氧化活性比较[J].徐州工程学院学报:自然科学版,2007,22(10):36-38.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 杨立红,刘林德,钟旭生,等.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.
- [11] 樊建,赵天瑞,曹建新,等.冻结条件对黑牛肝菌 PPO 和 POD 活性的影响[J].中国食用菌,2007,26(2):47-49.
- [12] 周庆珍,苏维词.贵州野生多汁乳菇营养成分分析[J].营养学报,2003,25(2):130-132.
- [13] 阮海星,张卫国,付家华,等.香菇多糖及营养成分分析[J].微量元素与健康研究,2005,22(3):35-36.
- [14] 刘佳,高敏,殷忠,等.野生牛肝菌营养成分分析及对小鼠免疫功能的影响[J].微量元素与健康研究,2007,24(1):5-7.
- [15] 殷建忠,周玲仙.云南野生菌维生素 B1、B2 含量分析[J].营养学报,2003,25(2):163-166.
- [16] 吴学谦,李海波,吴庆其,等.黄伞牛肝菌子实体营养成分分析评价[J].食用菌学报,2005,12(2):19-23.
- [17] 王一心,桂杨芝,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.
- [18] 王茂盛,连宾.美味牛肝菌研究[J].贵州林业科技,2003,31(3):34-37.
- [19] 李娜,张培正.泰山美味牛肝菌粗多糖热水提取工艺研究[J].中国食物与营养,2008(5):16.
- [20] 杜敏华,张英君,刘明星.野生牛肝菌多糖提取工艺的优化及其对自由基的清除作用[J].食品工业科技,2012,22:292-302.
- [21] 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.
- [22] Jayakumar T, Sakthivel M, Thomas P A, et al. Pleurotus ostreatus, an oyster mushroom, decreases the oxidative stress induced by carbon tetrachloride in rat kidneys, heart and brain[J]. Chemico-Biological Interactions, 2008, 176: 108-120.
- [23] Stewart R C, Bewley J D. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes[J]. Plant Physiol, 1980, 65(2): 245-248.
- [24] 陶明煊,王峰,王晓炜,等.大球盖菇多糖对小鼠心脏抗氧化作用研究[J].食品科学,2007,28(9):529-531.
- [25] 刘俊.金顶侧耳多糖抗氧化作用和对化学性肝损伤保护作用及其机理研究[D].南京:南京师范大学生命科学学院,2011:7-44,49.
- [26] 李燕,蔡东联,胡同杰,等.银耳多糖对实验性衰老小鼠的保护作用[J].第二军医大学学报,2004,25(10):1104-1107.
- [27] 辛小林,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.
- [28] Govinder J S F, Prahald K S. Beneficial effects of S-Adenosyl-L-Methionine on aminolevulinic acid dehydratase, glutathione, and lipid peroxidation during acute lead ethanol administration in mice[J]. Alcohol, 1999, 18(2): 103-108.
- [29] Dai T, Wu Y, Leng A S, et al. RXR α -regulated liver S-Ame and GSH levels influence susceptibility to alcohol induced hepatotoxicity[J]. Experimental and Molecular Pathology, 2003, 75(3): 194-200.

[责任编辑:黄敏]