

姬菇多糖对急性酒精性肝损伤小鼠的肝组织  
超微结构的影响

陶明煊,周 斌,郭永月,赵云霞

(南京师范大学金陵女子学院,江苏 南京 210097)

[摘要] 目的:研究以热水浸提法从姬菇中提取的姬菇多糖(PCNP)对酒精所致的急性损伤小鼠肝组织超微结构的影响. 方法:84 只小鼠被随机分为空白对照组、模型组、阳性对照组(150 mg/kg·bw)、多糖各剂量组((100、200、400)mg/kg·bw). 连续灌胃 30 d 后,给予浓度为 50% 的乙醇溶液,建立动物急性肝损伤模型. 12 h 后,小鼠脱臼处死,取肝脏制成超薄切片,电镜观察肝组织超微结构的变化. 结果:模型组细胞核的核膜不规则、呈锯齿状,线粒体畸形、嵴不清楚、糖原增多、出现空泡,内质网扩张、其膜上附着的核糖体脱失,细胞核周围脂滴数明显增多、胆管微绒毛脱失;姬菇多糖组肝细胞核膜凹凸不平,线粒体肿胀、线粒体内糖原沉积较少,内质网扩张不明显,细胞内脂滴减少. 结论:姬菇多糖对酒精性肝损伤小鼠的肝细胞具有保护作用.

[关键词] 姬菇多糖,急性肝损伤,肝组织,超微结构

[中图分类号] TS201.3 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2013)01-0085-05

Effects of Polysaccharides from *Pleurotus Cornucopiae* on Ultrastructure  
Change of Acute Alcoholic Injured Liver in Mice

Tao Mingxuan, Zhou Bin, Guo Yongyue, Zhao Yunxia

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

**Abstract:** Objective: The present study investigated the protective effect of polysaccharide from *Pleurotus cornucopiae* (PCNP) on electron microscopic changes in acute alcoholic hepatic injury in mice. Methods: The 84 mice were randomly divided into blank control group, alcoholic model groups. The mice in alcoholic model groups were administered by gavage with BIFENDATE (150 mg/kg·bw) or PCNP ((100, 200, 400) mg/kg·bw) for 30 d before the administration with dose of 50% alcohol (12 mL/kg·bw). After the last alcohol treatment for 12 h, in order to observe the ultrastructural changes of liver cells, all mice were dislocation death to collect samples for preparing ultrathin section for electron microscopy. Result: In model group, hepatic cells exhibited in different degrees of karyopycnosis and the nuclear membranes were irregular; The pathological changes in mitochondria had been clearly observed. In the hepatic cell, vacuoles can be seen and glycogen was increased. The rough endoplasmic reticulum were found as expansion and degranulation; Many large lipid droplets were found around the nucleus and microvilli of bile duct lost. In the PCNP groups, karyolemma were uneven. There were less expansion of mitochondria and less glycogen deposition compared with other groups; In addition, endoplasmic reticulum was not obvious outspread and lipid droplets reduced in cells. Conclusion: It can be seen that PCNP has the protective effect on hepatic ultrastructure induced by alcohol.

**Key words:** *Pleurotus cornucopiae* polysaccharides, acute liver injury, liver tissue, ultrastructure

酒精性肝损伤(Alcoholic liver disease, ALD)是指长期或大量饮用含有乙醇的饮料造成的肝脏疾患,是常见的导致肝硬化的原因. 近年来酒精性肝损伤的发病率明显增加,日益引起社会的高度重视<sup>[1]</sup>. 虽然关于 ALD 发病的分子机制的研究已取得重大的突破,但 ALD 的治疗措施并未有所进展,人们尚不能有效地防治 ALD<sup>[2]</sup>. 目前临床上广泛应用的抗氧化药物(谷胱甘肽和水飞蓟素)虽然能够消除酒精所致的氧化应

收稿日期:2012-06-08.

基金项目:江苏省高校自然科学基金基础研究项目(10KJD 550003)、江苏省普通高校研究生科研创新计划项目(CXLX11\_0895).

通讯联系人:陶明煊,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.edu.cn

激,然而这类抗氧化物质却不能有效地改善酒精性脂肪性肝炎的症状<sup>[3]</sup>. 因而开发安全有效的能够预防 ALD 的药物具有重要意义.

姬菇(*Pleurotus cornucopiae*),学名黄白侧耳,属担子菌亚门(*Basidiomycotina*)、层菌纲(*Hymenomycetes*)、伞菌目(*Agaricales*)、侧耳科(*Pleurotaceae*)、侧耳属(*Pleurotus*)<sup>[4]</sup>. 姬菇作为一种大宗食用菌,其菇体幼嫩、细腻、味道鲜美,在我们的日常消费中备受青睐<sup>[5]</sup>. 它不仅富含蛋白质、氨基酸、碳水化合物、矿物质、维生素等多种营养成分,而且含有多糖、酚类、洛伐他汀、外源凝结素等生物活性物质<sup>[6,7]</sup>. 据报道,姬菇提取物有较好的清除自由基的作用,抑制肿瘤生长、降血糖、抗病毒及调节机体免疫等功能<sup>[8-12]</sup>. 本实验探讨了姬菇多糖(*Pleurotus cornucopiae* polysaccharide, PCNP)对酒精所致的小鼠急性肝损伤超微结构的影响,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、试剂与仪器

#### 1.1.1 PCNP 的制备

姬菇子实体干品购自浙江省庆元县,经去杂质、剪去含培养基的根部,于 60℃ 烘干后粉碎加工成 60 目细粉. 将细粉经热水提取、浓缩、4 倍体积乙醇沉淀、低温干燥等步骤后,得到粗多糖. 粗多糖经 Sevag 法脱蛋白、透析、乙醇沉淀、低温干燥后得姬菇子实体精多糖(PCNP),经测定多糖含量约为 70.12%,蛋白含量为 2.20%.

#### 1.1.2 实验动物

昆明种雄性小鼠(6 周龄左右),体重(20±2)g,购自南京医科大学实验动物中心.

#### 1.1.3 主要试剂和仪器

无水乙醇和丙酮购自上海久亿化学试剂公司南京分公司;联苯双酯滴丸产自浙江医药有限公司新昌制药厂.

H-7650 日立透射电镜(TEM)产自日本日立公司;LEICA EMUC7 切片机产自德国莱卡公司.

### 1.2 方法

#### 1.2.1 酒精诱导肝损伤动物模型的建立

小鼠适应性喂养 3 d,随机分为空白对照组、模型组、联苯双酯阳性对照组(150 mg/kg·bw)、PCNP 各剂量组(100、200、400)mg/kg·bw,每组 14 只. 受试样品用蒸馏水配制,每天灌胃受试样品一次,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. 实验至第 31 d,各组小鼠禁食不禁水 12 h 后,阳性对照组、实验组及模型组以 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;空白对照组灌予等体积的蒸馏水. 12 h 后,小鼠脱臼处死,取肝脏制成超薄切片.

#### 1.2.2 透射电镜样本的制备

取肝脏左叶相同部位的肝组织,切成 1mm<sup>3</sup> 大小,用 4% 戊二醛 4℃ 固定 24 h,随后放入 0.1M PBS 配制的 1% 四氧化锇酸固定 2 h,经缓冲液清洗,随后分别用 30%、50%、70%、80%、90% 丙酮各脱水一次,每次 15 min,接着用无水丙酮再脱水 2 次,每次 10 min,脱水之后分别用 1:1 的丙酮树脂混合液和 1:2 的丙酮树脂混合液浸透 1 h,最后用纯树脂浸透 2 h,浸透之后将样品放入包埋板中,立即加入包埋剂进行包埋,包埋之后将装有样品的包埋板依次放入 30℃、45℃、60℃ 的聚合炉中聚合,聚合之后取出装有样品的包埋块,修块后进行半薄切片定位,用钻石刀切成超薄切片并附到铜网上,用醋酸铀和柠檬酸铅染色,透射电子显微镜(TEM)进行观察和拍照.

## 2 结果与分析

空白组:细胞核大而圆,核膜完整无变形,核内染色质均匀,核内可见核仁 1~3 个(图 1A2). 细胞质内线粒体数量多,多为圆形或椭圆形,嵴清晰,粗面内质网也较丰富(图 1A1),在核周围或绕线粒体平行排列(图 1A2). 肝窦状隙肝细胞的微绒毛丰富(图 1A3).

模型组:核膜不规则呈锯齿状,细胞内脂滴丰富(图 1B2),细胞质内可见畸形线粒体,糖原颗粒增多(图 1B1),线粒体肿胀、膜断裂、嵴模糊或空泡(图 1B4),内质网扩张(图 1B5)、脱颗粒(图 1B6). 整体细胞

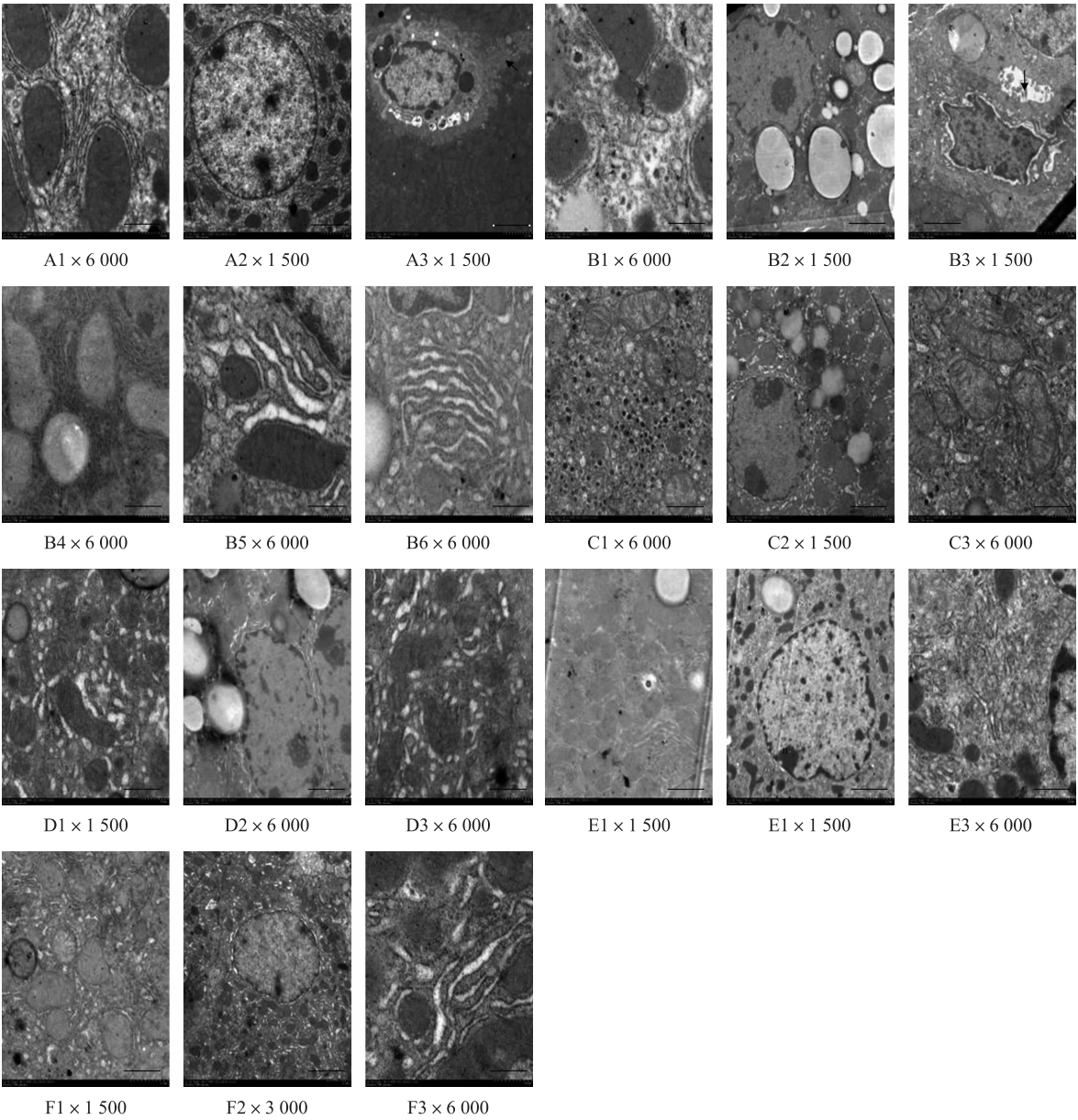
质结构混乱,微绒毛脱失(图 1B3).

药物组:核膜仍存在,核皱缩变形,细胞内脂滴数量明显比模型组少(图 1C2),未见畸形线粒体,线粒体嵴清晰可见,细胞质糖原颗粒丰富(图 1C1),内质网扩张不明显(图 1C3).

低剂量组:核膜凹凸不平,肝细胞内脂滴的数量较模型组减少(图 1D2),线粒体嵴模糊偶见空泡(图 1D1),内质网可见一定程度肿胀及脱颗粒(图 1D3),但较模型组减轻.

中剂量组:核膜凹凸不平,偶见肝细胞内脂滴(图 1E2、E1). 线粒体较模型组明显增多,内质网轻微扩张和脱颗粒(图 1E3).

高剂量组:肝细胞核近似圆形(图 1F2),线粒体丰富(图 1F1),线粒体内膜上嵴较多,内质网只有轻微肿胀(图 1F3).



A1-3:空白对照组;B1-6:模型组;C1-3:阳性对照组;D1-3:PCNP 低剂量组;E1-3:PCNP 中剂量组;F 1-3:PCNP 高剂量组(k:核膜;n:核仁;m:线粒体;e:内质网;c:嵴;g:糖原颗粒;l:脂滴)

A1-3:the control group;B1-6:the vehicle-treated alcohol group;C1-3:positive control group;D1-3:the low dose PCNP group;E1-3:the medium dose PCNP group;F1-3:the high dose PCNP group(k:nuclear membrane;n:nucleolu;m:mitochondria;e:endoplasmic reticulum;c:crista;g:glycogenosome;l:lipid droplet)

图 1 姬菇多糖对酒精性肝损伤小鼠超微结构的影响

Fig.1 Effect of PCNP on hepatocyte ultrastructure in mouse model of liver injury induced by acute ethanol administration

### 3 讨论

细胞核是细胞生命活动的调节中心,通过细胞核内 DNA 的复制,使遗传信息一代又一代地传递,同时又通过 DNA 转录成 mRNA,合成细胞内蛋白质.本实验中,模型组小鼠肝细胞的细胞核有少量变形,核膜不规则.而多糖组小鼠肝细胞中细胞核虽然有不同程度的损伤,但是与模型组相比,已经有很大程度的改善,尤其是高剂量组,细胞核多数呈圆形.说明姬菇多糖对肝细胞的细胞核有一定的保护和修护作用.

线粒体是活细胞进行生物氧化产生能量的重要细胞器,肝细胞中的线粒体含量非常丰富,糖、蛋白、脂肪等都是在线粒体内氧化生成 ATP 产生的,细胞生命活动所需能量的 80% 都是由线粒体电子传递链反应提供的<sup>[13]</sup>.当摄入大量酒精,乙醇通过微粒体氧化酶系代谢,生成大量乙醛.乙醇在肝细胞氧化成乙醛的过程中消耗了大量的 NAD(氧化型辅酶 I)而抑制了许多脱氢酶的活性,同时酒精或乙醛还可抑制呼吸链的电子传递,可使线粒体能量生成障碍,进而发生形态的改变.线粒体结构的改变影响了线粒体的功能,氧化磷酸化和三羧酸循环被抑制<sup>[14]</sup>.而大部分中、长链脂肪酸均是通过线粒体  $\beta$ -氧化进行代谢,由于乙醛干扰三羧酸循环的正常进行,从而影响脂肪酸的  $\beta$ -氧化,阻碍蓄积脂肪酸的清除,最终形成脂肪肝<sup>[15]</sup>.本实验发现,模型组小鼠肝细胞的线粒体出现糖原颗粒增多,线粒体膜断裂,嵴模糊或空泡,膜通透性增高,提示酒精已经导致肝细胞坏死.而姬菇多糖组有效地改善了线粒体的病理状况,且随着剂量的提高效果越明显,高剂量组线粒体状况与空白组无太大差异.提示姬菇多糖增强了线粒体的功能和脂肪酸在肝细胞内的代谢.

内质网分为粗面内质网和滑面内质网,粗面内质网的膜表面有大量的核糖体.在合成和分泌蛋白质旺盛的细胞中,粗面内质网丰富,在蛋白质合成和加工过程中起着重要作用<sup>[16]</sup>.内质网功能紊乱,使得脂蛋白合成受到抑制,但甘油三酯的合成正常,脂肪不能运输出去,引发脂肪堆积、沉积,出现脂滴.实验中模型组粗面内质网出现肿胀、区域性集聚、扩张、脱颗粒等病变,在姬菇多糖组中,这些病状有很大改善.提示姬菇多糖可有效地恢复和增强粗面内质网的功能,减少脂肪在肝细胞内的沉积.

短时期大量摄入酒精可引起急性酒精性肝损伤.其发生机制与乙醇及代谢产物损伤、氧化应激及炎症介质等有关<sup>[17,18]</sup>.食用菌多糖的分子结构多数是由 3 股单糖链构成的一种无序形的螺旋状构型,螺旋层之间主要以氢键固定定位,常存在近似于 DNA 分子的螺旋状的三维结构,其构型一般为  $\beta$ -D-型多糖<sup>[19]</sup>.由于人体内没有  $\beta$ -淀粉酶,食用菌多糖进入人体后不会被消化、分解、吸收,其生物活性通过和肠壁细胞膜上的受体结合而产生<sup>[20]</sup>.模型组小鼠肝细胞的细胞核、线粒体、内质网等细胞器均受到破坏,并出现了大量脂滴、内质网扩张、糖原颗粒增多以及绒毛脱落等病理改变.姬菇多糖各剂量组减轻了肝细胞的损伤程度,姬菇多糖中,高剂量组和联苯双酯组保肝效果比较明显,其中多糖高剂量组接近空白对照组,内质网轻微肿胀.可见姬菇多糖能明显改善酒精所致的急性肝损伤小鼠肝细胞超微结构的病理改变,对酒精所致的急性肝损伤有较好的保护作用.PCNP 对小鼠急性酒精性肝损伤的保护作用机制可能是由于其预处理可以提前增强机体的内源抗氧化防御能力和机体免疫力,拮抗急性酒精肝损伤的氧化应激作用,减少自由基的产生,抑制自由基介导的脂质过氧化反应,保护细胞膜,促进肝细胞的再生和修复,增强脂肪酸在肝细胞内代谢,减少脂肪在肝细胞内沉积<sup>[21]</sup>.

### [参考文献]

- [1] 鞠辉,魏良洲.酒精性肝病的流行病学现状[J].肝脏,2006,11(1):57-58.
- [2] Reuben A. Alcohol and the liver[J]. Current Opinion in Gastroenterology,2008,24(3):328-338.
- [3] Day C P. Treatment of alcoholic liver disease[J]. Liver Transplantation,2007,13(11 Suppl. 2):69-75.
- [4] 王波.彩色图解姬菇、肺形侧耳栽培新技术[M].成都:四川科学出版社,2003:1-2.
- [5] 郭勇,周洁,谭伟,等.我国姬菇研究现状[J].中国食用菌,2009,28(6):12-13.
- [6] 姜自彬,曹锦花,魏学彦.糙皮侧耳真菌的研究进展[J].中草药,1999,30(1):72-75.
- [7] Eluhan S, Ranogajec A. Composition and non-volatile components of croatian wild edible mushrooms[J]. Food Chemistry, 2011,124(3):1076-1082.
- [8] Elmasta M, Isildak O, Turkekul I, et al. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible

- p>mushrooms[J]. Journal of Food Composition and Analysis,2007,20(3):337-345.
- [9] Wasser S P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides[J]. Microbiol Biotechnol, 2002,60(3):258-274.
- [10] 王峰,陶明煊,程光宇,等. 4种食用菌提取物自由基清除作用及降血糖作用的研究[J]. 食品科学,2009,30(21):343-347.
- [11] Elbohi K,Sabik L,Muzandu K,et al. Antigenotoxic effect of *Pleurotus cornucopiae* extracts on the mutagenesis of *Salmonella typhimurium* TA98 elicited by benzo pyrene and oxidative DNA lesions in V79 hamster lung cells[J]. Japanese Journal of Veterinary Research,2005,52(4):163-172.
- [12] Khloodm E B, Yoshiharu H, Kaampwe M, et al. Protective effect of *Pleurotus cornucopiae* mushroom extract on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity[J]. Japanese Journal of Veterinary Research,2009,57(2):109-118.
- [13] 徐莉. 医学生物学[M]. 上海:上海科学技术出版社,2005.
- [14] Betaller R,North K E,Brenner D A. Genetic polymorphisms and the progression of liver fibrosis;a critical appraisal[J]. Hepatology,2003,37:493-503.
- [15] Bergeron R,Previs S F,Cline G W,et al. Effect of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside infusion on in vivo glucose and lipid metabolism in lean and obese Zucker rats[J]. Diabetes,2001,50:1076-1082.
- [16] Malhi H,Kaufman R J. Endoplasmic reticulum stress in liver disease[J]. J Hepatol,2011,54(4):795-809.
- [17] Beier J I,Mclain C J. Mechanisms and cell signaling in alcoholic liver disease[J]. Biol Chem,2010,391(11):1249-1264.
- [18] Song Z,Joshi B S,Barve S,et al. Advances in alcoholic liver disease[J]. Curr Gastroenterol Rep,2004,6(1):71-76.
- [19] 刘洁,李文香,王文亮,等. 多糖空间结构与生物活性相关性研究进展[J]. 农业机械,2011,6(17):153-155.
- [20] 黄芳,蒙义文. 活性多糖的研究进展[J]. 天然产物的研究与开发,1999,11(5):90-97.
- [21] 朱良,沈耀威,赵冠欣,等. 橄榄总黄酮对小鼠急性酒精性肝损伤的保护作用[J]. 食品与机械,2010,26(3):91-93.

[责任编辑:黄 敏]