

赵爽,荣成博,张淑曼,等. 毛木耳多糖对乙醇性肝损伤的保护作用[J]. 江苏农业科学,2017,45(12):142-144.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.12.037

# 毛木耳多糖对乙醇性肝损伤的保护作用

赵爽<sup>1,2</sup>, 荣成博<sup>1,2</sup>, 张淑曼<sup>1</sup>, 刘宇<sup>1,2</sup>, 陈杰<sup>1</sup>

(1. 北京市农林科学院植物保护环境保护研究所/北京市食用菌工程技术研究中心, 北京 100097;

2. 农业部都市农业(北方)重点实验室, 北京 100097)

**摘要:**采用乙醇诱导正常人肝细胞 L02 形成乙醇性肝损伤的体外模型,通过检测细胞内甘油三酯(TG)、活性氧(ROS)含量、胞外谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)活性等指标,评价毛木耳多糖提取物对乙醇性肝损伤的保护作用及机理。结果表明,毛木耳多糖提取物的最佳作用浓度为 40  $\mu\text{g/mL}$  时,与模型组相比较,细胞的存活率提高了 26.84 百分点,细胞内甘油三酯的含量显著下降,胞外转氨酶 ALT 和 AST 的活性降低。这一结果说明毛木耳多糖提取物能够提高损伤细胞的存活率,降低乙醇引发的肝内脂肪堆积,减少细胞凋亡,同时游离活性氧的检测结果显示毛木耳多糖提取物能够显著降低细胞内活性氧的含量,从而可推断其可能是通过抗氧化途径发挥防护作用。

**关键词:**毛木耳;多糖;乙醇性肝损伤;活性氧;胞外转氨酶

**中图分类号:** R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)12-0142-03

乙醇进入体内后主要是通过肝脏来完成代谢的,如果摄入的乙醇量过大,细胞色素 P450 2E1 (CYP2E1) 会被诱导表达参与乙醇的代谢,产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)。ROS 能够与生物大分子反应造成蛋白变性、酶失活、DNA 结构改变、脂质过氧化,从而造成细胞的损伤<sup>[1]</sup>。大量摄入乙醇不仅引发肝损伤,还会促使乙醇性脂肪肝的形成,并向乙醇性肝炎、乙醇性肝纤维化、肝硬化转变<sup>[2]</sup>。据 2006 年公布的我国首部《中国居民营养与健康之行为和生活方式调查报告》中显示,我国居民现在饮酒率为 21%,这一数字还在不断上升<sup>[3]</sup>,乙醇已成为继病毒性肝炎之后导致肝损害的第二大病因。

食用菌类多糖是一种非特异性免疫促进剂,能增强网状内皮系统的吞噬功能,提高调整机体免疫功能<sup>[4]</sup>;研究表明大多数食用菌多糖对各种病毒如流感病毒、单纯疱疹病毒等具有抑制作用<sup>[5]</sup>;研究发现多糖的多种生物活性均与抗氧化性有关,通过缓解疾病、辐射、代谢等引起的氧化应激达到治疗和预防肿瘤发生、免疫力低下等疾病<sup>[6]</sup>。多糖的抗氧化性可能是其多种活性的作用机理之一。毛木耳多糖具有抗氧化<sup>[7]</sup>、提高免疫<sup>[8]</sup>、降低血糖血脂<sup>[9]</sup>等功能,并且可以抑制化学致癌物及促癌物对肿瘤的诱发<sup>[10]</sup>,因此在保健食品方面具有广阔的应用前景。毛木耳多糖保护乙醇性肝脏损伤功能研究是一个全新的领域。本研究主要目的是在乙醇性肝损伤模型的基础上,探索毛木耳多糖提取物保护肝细胞乙醇性损伤的作用,为毛木耳多糖的开发以及深加工食品的研发奠定

基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

细胞株 L02,购自中国医学科学院肿瘤医院;毛木耳 3 号菌株,笔者所在实验室保藏菌株;胎牛血清(FBS)、RPMI 1640 培养液、胰酶和双抗(青霉素和链霉素),购自美国 Invitrogen 公司;MTT 测试液,购自美国 Sigma 公司;二甲基亚砜(DMSO),购自美国 Amresco 公司;台盼蓝染液和无水乙醇,购自国药集团化学试剂有限公司;BCA 蛋白质定量检测试剂盒,购自北京博迈德生物技术有限公司;甘油三酯(TG)酶法测定试剂盒、谷草转氨酶(AST)测试盒、谷丙转氨酶(ALT)测试盒和细胞活性氧(ROS)试剂盒,购自南京建成科技有限公司。

MSC-1.2 生物安全柜,购自美国 Thermo 公司;Steti-cycle371 CO<sub>2</sub> 培养箱,购自美国 Thermo 公司;R-215 旋转蒸发器,购自瑞士 Buchi 公司;HYC-360 药品保存箱,购自中国海尔公司;SHZ-88A 恒温水浴锅,购自北京精科华瑞仪器有限公司;5810R 冷冻离心机,购自美国 Eppendorf 公司;IX-71 倒置显微镜,购自日本 Olympus 公司;移液器,购自美国 Drummond 公司。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 毛木耳多糖提取物的制备** 将毛木耳子实体放入高速万能破碎机进行破碎制备成约 100 目的均一干粉。称取 50 g 干粉,按 1:60 比例加入去离子水,静置 3 h,利用水浴摇床控制温度和转速对混合溶液进行提取,条件控制为 90  $^{\circ}\text{C}$ 、水浴 4 h,6 000 r/min 离心 30 min,取上清,将沉淀物以上述方法再提取 1 次,合并上清液,利用旋转蒸发技术浓缩,确定多糖溶液的体积,加入 4 倍体积的无水乙醇使多糖析出,静置过夜待固液分离。通过 6 000 r/min 离心 30 min,获得固体多糖,放至 60  $^{\circ}\text{C}$  的烘箱中烘干直至质量恒定,研磨成粉末状待用。功能检测时将多糖粉末配制成 500  $\mu\text{g/mL}$  的母液,其中

收稿日期:2016-12-14

基金项目:北京市优秀人才培养资助项目(编号:2015000020060G138);北京市农林科学院青年基金(编号:QNJJ201524);北京市农林科学院科技创新能力建设专项(编号:KJCX20170205)。

作者简介:赵爽(1982—),女,北京人,博士,助理研究员,研究方向为食用菌功能及加工技术。Tel:(010)51503432;E-mail:shuangzhaow@126.com。

多糖浓度以硫酸-苯酚法测定<sup>[11]</sup>。

1.2.2 乙醇性损伤模型的建立 L02 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液(含 1% 青霉素、链霉素混合液)置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的培养箱中培养,待细胞生长至 80%~90% 时,用 0.25% 胰蛋白酶消化,调整细胞浓度以  $8 \times 10^3$  个/孔的细胞量接种于 96 孔培养板中,置于 37 °C 培养箱中培养至细胞贴壁后,更换培养液,使培养液中乙醇浓度达到 1.6%、1.8%、2.0%、2.2%、2.5%、3.0%,设置对照组,继续培养 48 h。以 MTT 方法测定细胞的存活率,以未加入乙醇的空白组作为对照,设定其细胞存活率为 100%。

1.2.3 毛木耳多糖提取物对乙醇性肝损伤的保护作用

1.2.3.1 毛木耳多糖提取物对 L02 细胞的毒性评价 取对数生长期的 L02 细胞,以  $8 \times 10^3$  个/孔接种于 96 孔培养板中,待细胞贴壁后,分别加入含多糖的培养液,使终浓度达到 0、50、100、200、500、1 000  $\mu\text{g/mL}$ ,继续培养 24 h,测定细胞存活率,分析多糖对 L02 细胞的毒性作用,设定对照组的细胞存活率为 100%。

1.2.3.2 毛木耳多糖提取物保肝作用 细胞以浓度为  $8 \times 10^3$  个/孔的接种量置于 96 孔培养板中,待细胞贴壁后,设置对照组(不加乙醇)和损伤模型组(乙醇终浓度为 3%),治疗组的细胞中加入终浓度为 3% 的乙醇和不同浓度的多糖提取物(10、20、30、40、50  $\mu\text{g/mL}$ ),37 °C 培养 48 h 后,测定细胞存活率,设定对照组的细胞存活率为 100%。

1.2.3.3 肝细胞特征性指标检测 细胞以  $3 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔培养板中,选用多糖提取物终浓度为 40  $\mu\text{g/mL}$  和损伤模型 37 °C 培养 48 h 后,分别收集培养液和细胞,利用胞外谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)试剂盒测定培养液中的酶活力,利用组织甘油三酯测定试剂盒测定 TG 含量,用 BCA 法测定蛋白含量,细胞中加入荧光探针,利用组织内活性氧(ROS)测定试剂盒测定 ROS 的含量。

1.2.4 数据统计分析 采用 SPSS 11.5 统计软件对数据进行处理,试验结果以“平均值  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )”表示,采用 One-way ANOVA 检验, $P < 0.05$  表示具有显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 肝细胞乙醇性损伤模型

本研究采用正常肝脏细胞株 L02 为载体细胞,以不同浓度的乙醇作为诱导条件建立损伤模型,评价毛木耳多糖对乙醇性肝损伤的改善作用。以前期建立模型的条件为基础<sup>[12]</sup>,检测乙醇刺激对 L02 细胞存活率的影响。从表 1 可知,在单纯乙醇因素的刺激下,随着乙醇浓度增加,细胞存活率明显下降,从 86.59% 下降到 50.77%,各处理组与对照组比较均达到显著性差异( $P < 0.05$ )。这一检测结果与之前的研究结果相近,具有良好的重复性,说明此诱导方法能够建立起稳定的乙醇性肝损伤模型。细胞存活率检测结果显示 3.0% 乙醇对细胞损伤较大,细胞存活率降低至 50.77%,满足模型的需求,设定其为模型损伤浓度。

### 2.2 毛木耳多糖提取物细胞毒性检测

多糖以终浓度 0~1 000  $\mu\text{g/mL}$  直接处理细胞,通过 MTT 检测发现所有细胞处理组的细胞存活率均在 90% 以上,且与对照组未达到显著性差异( $P \geq 0.05$ ),说明毛木耳多糖对

表 1 乙醇浓度对 L02 细胞存活率的影响

| 乙醇浓度 (%) | 吸光度 ( $D_{562 \text{ nm}}$ ) | 细胞存活率 (%)          |
|----------|------------------------------|--------------------|
| 0        | $1.30 \pm 0.05$              | $100.00 \pm 3.85$  |
| 1.6      | $1.12 \pm 0.02^*$            | $86.59 \pm 1.54^*$ |
| 1.8      | $1.10 \pm 0.09^*$            | $84.62 \pm 6.92^*$ |
| 2.0      | $1.05 \pm 0.08^*$            | $80.77 \pm 6.15^*$ |
| 2.2      | $0.90 \pm 0.05^*$            | $69.23 \pm 3.85^*$ |
| 2.5      | $0.69 \pm 0.01^*$            | $53.58 \pm 0.77^*$ |
| 3.0      | $0.66 \pm 0.11^*$            | $50.77 \pm 8.46^*$ |

注:数据结果均以平均值  $\pm$  标准差表示( $n = 5$ ),“\*”表示与对照组达到显著性差异( $P < 0.05$ )。

L02 细胞不具有明显的细胞毒性。图 1 显示的是不同浓度多糖处理条件下细胞存活率的变化趋势,虽然未达到显著性差异程度,但是随着多糖浓度增加,细胞存活率还是呈现下降的趋势。因此功能检测中应选取低浓度的多糖开展研究,以降低试验结果受浓度的影响。

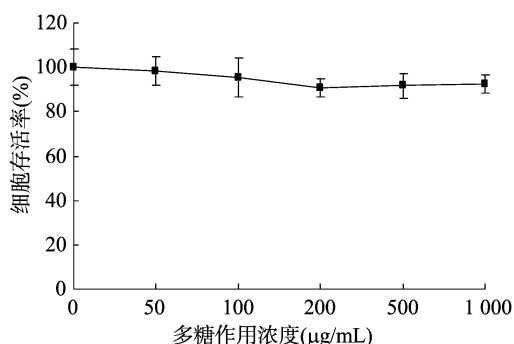
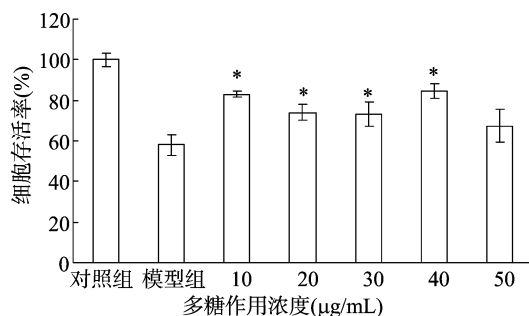


图1 毛木耳多糖提取物的细胞毒性检测

### 2.3 毛木耳多糖提取物的保肝功能

以 3.0% 乙醇浓度的损伤条件和毛木耳多糖共同处理细胞 48 h 后发现,不同浓度的多糖均对细胞具有保护作用,但是保护效果并未呈现出剂量的依赖性。图 2 显示的是各浓度多糖对肝细胞的保护作用,其中多糖终浓度为 10、20、30、40  $\mu\text{g/mL}$  的处理组与模型组比较都能够显著提高细胞存活率。其中多糖终浓度为 40  $\mu\text{g/mL}$  时,细胞的存活率最高,为 84.79%,与模型组比较提高了 26.86 个百分点,设定其为最佳护肝剂量。



“\*”表示与模型组的差异达到显著水平( $P < 0.05$ )

图2 毛木耳多糖提取物的保护损伤肝细胞活性趋势

### 2.4 多糖提取物对肝细胞特征指标的影响

本试验不仅研究了多糖对细胞存活率的影响,同时以 TG、胞外 AST 和 ALT 的指标反映多糖对肝细胞功能的保护

作用。胞内 TG 含量检测结果显示毛木耳多糖提取物具有降低肝细胞中 TG 的作用,与模型组比较能够降低 76.51%,说明其可以减少乙醇引起的胞内脂肪堆积;胞外转氨酶的检测结果显示多糖可以明显减少 ALT 和 AST 的胞外释放,保护肝

细胞的结构完整性。ROS 检测结果显示多糖提取物能够降低胞内活性氧的含量,说明毛木耳多糖具有抗氧化的作用,可以减小细胞因氧化而发生的损伤,推断其是通过抗氧化途径来发挥护肝功效的。

表 2 毛木耳多糖提取物保护肝脏特征指标的作用

| 组别     | TG<br>(μmol/mg) | ROS<br>(525 nm 下荧光值) | ALT<br>(U/mg)  | AST<br>(U/mg) |
|--------|-----------------|----------------------|----------------|---------------|
| 对照组    | 309 ± 41        | 3 318 ± 232          | 4 014 ± 279    | 3 018 ± 627   |
| 提取物处理组 | 617 ± 52 *      | 5 258 ± 582 *        | 10 628 ± 437 * | 6 389 ± 374 * |
| 模型组    | 2 627 ± 11      | 10 548 ± 319         | 16 544 ± 468   | 15 072 ± 579  |

注:数据结果均以平均值 ± 标准差表示(n = 3),“\*”表示与模型组达到显著性差异(P < 0.05)。

3 结论与讨论

乙醇在肝细胞内主要是由乙醇脱氢酶和乙醛脱氢酶催化代谢的,摄入肝内后在脱氢酶和乙醇氧化酶系统作用下被氧化成乙醛,再氧化成乙酸,最后进入三羧酸循环被彻底氧化成 CO<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub>O,并释放出能量<sup>[13]</sup>。此过程使辅酶不断转变为还原型辅酶,二者比例的改变抑制线粒体内三羧酸循环,脂肪氧化减弱,肝内脂肪酸合成增多<sup>[14]</sup>,最终导致肝脏中脂肪含量升高,因此 TG 是评价肝损伤的特征指标。从表 2 可知,48 h 后提取物处理组的 TG 含量较模型组明显降低,说明毛木耳多糖能够有效缓解细胞中的脂质沉积作用。

ROS 是以氧原子为中心的自由基及其活性衍生物<sup>[15-16]</sup>,细胞内线粒体是 ROS 产生的最主要来源<sup>[17]</sup>。氧化应激与乙醇性肝损伤关系密切,当体内产生的 ROS 过多,无法被抗氧化物质完全清除时,会发生氧化应激,过量的 ROS 会与生物大分子反应,造成机体的损伤,甚至导致疾病。从表 2 可知,经提取物处理 48 h 后,ROS 指标检测结果表明毛木耳多糖提取物有效改善了肝细胞内的氧化水平。

ALT、AST 是反映肝细胞损害情况最常用的酶学检查指标。AST 是一种线粒体酶,乙醇在代谢过程中产生的中间产物乙醛、自由基等,可导致氧应激和脂质过氧化反应,造成线粒体损伤,使大量存在于线粒体的 AST 进入周围的循环系统<sup>[1]</sup>,因此乙醇性肝损伤细胞的培养液中 AST 升高。ALT 主要分布于胞浆,在肝细胞质中有传输氨基酸的作用,研究表明仅有 1% 的肝细胞坏死,就可以使 ALT 增高 1 倍,因此,ALT 被世界卫生组织推荐为肝功能损害最敏感的检测指标<sup>[18]</sup>。从表 2 可知,经提取物处理 48 h 后,ALT 和 AST 的释放量降低,说明毛木耳多糖提取物能够保护细胞的完整性,具有保肝的作用。

本研究通过细胞毒性检测表明毛木耳多糖提取物对肝细胞不具有细胞毒性,其能够提高肝损伤细胞的存活率,具有保护乙醇性损伤的作用。在多糖作用浓度为 40 μg/mL 时,细胞存活率与模型组比较可提高 26.86 百分点,细胞内甘油三酯和 ROS 的含量分别降低了 76.51% 和 50.15%,培养液中 ALT、ASL 含量分别降低了 35.76%、57.61%。研究结果证明毛木耳多糖不仅对肝细胞具有保护作用,而且可以促进肝细胞行使功能,具有开发应用前景。

参考文献:

[1] Miranda - Mendez A, Lugo - Baruqui A, Armendariz - Borunda J.

Molecular basis and current treatment for alcoholic liver disease[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2010,7:1872 - 1888.

[2] 胡克章,黄正明. 脂肪肝的发病机制与防治[J]. 解放军药学报,2008,24(5):433 - 435.

[3] 李 怡. 推拿预防大鼠乙醇性脂肪肝的实验研究[D]. 南京:南京中医药大学,2008:3 - 4.

[4] 郝瑞芳,李荣春. 灵芝多糖的药理和保健作用及应用前景[J]. 食用菌学报,2004,11(4):57 - 62.

[5] 杜 巍,李元瑞,袁 静. 食用菌多糖生物活性与结构的关系[J]. 中国食用菌,2001,21(2):28 - 30.

[6] 魏 磊,郑朝辉,侯成林,等. 四种野生食用菌粗多糖的抗氧化活性[J]. 微生物学通报,2011,38(10):1533 - 1539.

[7] 周学君,俞 发. 毛木耳多糖的抗氧化作用[J]. 中国医院药杂志,2000,20(10):610 - 611.

[8] 吴春敏,陈琼华. 毛木耳多糖对机体细胞的保护作用[J]. 中国药科大学学报,1991,22(5):305 - 307.

[9] 吴春敏,陈琼华. 毛木耳多糖抗凝血和降血脂作用[J]. 中国药科大学学报,1991,22(3):164 - 166.

[10] 孙运风. 食用菌多糖的药理作用及应用前景[J]. 社区医学杂志,2006,4(1):29 - 31.

[11] 赵 爽,刘 宇,王守现,等. 不同品种姬松茸菌丝体蛋白质和水溶性多糖含量的研究[J]. 食品工业科技,2010,31(12):121 - 122,126.

[12] 张淑曼,徐丽红,荣成博,等. 毛木耳蛋白提取物保护乙醇性肝损伤功能研究[J]. 食品科技,2016,41(2):233 - 236.

[13] 叶 彬,潘发愤. 乙醇性脂肪肝和肝硬化患者各种血清酶的检测及其临床评价[J]. 浙江临床医学,2006,8(12):1252 - 1253.

[14] 叶维法,钟振义. 肝胆病诊断学[M]. 天津:天津科学技术出版社,1997,497 - 502.

[15] 顾蓓蓓,卢劲晔,马 卉,等. 活性氧自由基在试验性乳腺炎大鼠发病机制中的作用[J]. 江苏农业科学,2016,44(8):294 - 297.

[16] 齐付国,刘小飞,孙景生. 不同供水水平对间作甜瓜叶片活性氧代谢及光合特性的影响[J]. 江苏农业科学,2015,43(9):199 - 201.

[17] 何晓瑜,成 军. 线粒体在非乙醇性脂肪肝的作用[J]. 中国肝脏病杂志,2010,2(4):60 - 61.

[18] 叶柱均,林婉媚,叶淑霞,等. 乙醇性脂肪肝与非乙醇性脂肪肝患者生化指标的比较分析[J]. 中国医药导报,2009,6(23):67 - 69.