

# 贺兰山紫蘑提取物 对H<sub>22</sub>小鼠抗氧化能力的影响

马 茜,慕家琪,杨遂群,喻乐乐,张自萍\*

(宁夏大学生命科学学院,西部特色资源保护与利用教育部重点实验室(宁夏大学),  
宁夏银川 750021)

**摘要:**通过研究贺兰山紫蘑不同提取物对H<sub>22</sub>荷瘤小鼠体内抗氧化酶系统的影响,探讨其可能的抗肿瘤机制。给予紫蘑石油醚、乙酸乙酯、正丁醇提取物、紫蘑粗多糖、阳性对照香菇多糖灌胃及氟尿嘧啶腹腔注射后,采用比色法分别测定小鼠肝组织中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性。结果表明,与阳性对照相比,紫蘑提取物均可不同程度提高荷瘤小鼠SOD、CAT、GSH-Px的活性,降低MDA含量,其中尤以乙酸乙酯部位和紫蘑粗多糖最为显著,说明贺兰山紫蘑可通过提高荷瘤小鼠抗氧化酶系统的活力,发挥其抗肿瘤机制。

**关键词:**贺兰山紫蘑,荷瘤小鼠,超氧化物歧化酶,过氧化氢酶,谷胱甘肽过氧化物酶,丙二醛

## Effect of the extract from cortinarius rufo-olivaceus on antioxidation activities in H<sub>22</sub> tumor bearing mouse

MA Qian, MU Jia-qi, YANG Sui-qun, YU Le-le, ZHANG Zi-ping\*

(College of Life Sciences, Key Laboratory of Ministry of Education for Protection and Utilization of  
Special Biological Resources in Western China (Ningxia University), Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

**Abstract:** To study the antioxidation activities of the different extract from cortinarius rufo-olivaceus via H<sub>22</sub>-bearing mice, discussed the possible mechanism of anti-tumor. The colorimetric analysis was adopted to determine the level of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in liver of H<sub>22</sub>-bearing mice after by giving petroleum ether, ethyl acetate, butanol phase extractions. Different extractions from cortinarius rufo-olivaceus could increase the activities of SOD, MDA, CAT, GSH-Px and decrease the level of MDA especially the ethyl acetate part and polysaccharide. The result showed that the extract of cortinarius rufo-olivaceus could obviously enhance the antioxidant activity and prevent lipid peroxidation damage in H<sub>22</sub>-bearing mouse.

**Key words:** cortinarius rufo-olivaceus; mouse bearing tumor; superoxide dismutase; malondialdehyde; catalase; glutathione peroxidase

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)14-0342-04

贺兰山紫蘑(以下简称紫蘑)隶属于担子菌门伞菌目丝膜菌科丝膜菌属,是生长于海拔2300~3100m的贺兰山青海云杉林中以紫红丝膜菌(*Cortinarius rufo-olivaceus* (Pers.) Fr.)为主的数种丝膜菌的统称<sup>[1-2]</sup>。其肉质滑厚、口感纯正、气味香醇、含有丰富的粗纤维、总糖、蛋白质、多种矿物质元素以及17种游离氨基酸<sup>[3]</sup>,被誉为“贺兰山珍”。食用菌中所含有的营养成分丰富,长期食用能提高人体免疫力,起到防癌抗癌<sup>[4-6]</sup>、抗衰老抗氧化<sup>[7-10]</sup>、抗炎<sup>[11-12]</sup>等作用,是一种纯天然的营养保健品,深受人们青睐。然而有关贺兰

山紫蘑生物活性方面的研究罕见报道。本课题组以肝癌为例,已证实紫蘑具有抗肿瘤活性,并且通过体外抗氧化实验发现,紫蘑能有效清除自由基。现以紫红丝膜菌为材料,通过建立H<sub>22</sub>肝癌荷瘤小鼠模型,研究不同提取物对其体内抗氧化酶系统的影响,探讨其可能的抗肿瘤机制,并为贺兰山紫蘑的开发利用提供理论依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与仪器

**实验动物** 117只昆明种雌鼠,体重18~22g,宁夏医科大学实验动物中心,动物质量合格证号:SCXK(宁)2010-001;H<sub>22</sub>肝癌瘤株 宁夏医科大学张鸣号老师惠赠;贺兰山紫蘑紫红丝膜(*Cortinarius rufo-olivaceus* (Pers.) Fr.)子实体 2011年8月出菇期采自贺兰山西侧大西沟,经专家形态鉴定后,清洗、晒干,-20℃冰

收稿日期:2012-12-24 \* 通讯联系人

作者简介:马茜(1988-),女,硕士研究生,研究方向:天然产物研究与开发。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(21162020)。

箱保存;香菇多糖片(国药准字Z20026215) 浙江普洛康裕天然药物有限公司;氟尿嘧啶注射液(国药准字H12020959) 天津金耀氨基酸有限公司;考马斯亮兰蛋白测定试剂盒、超氧化物歧化酶试剂盒、过氧化氢酶试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶试剂盒及脂质过氧化终末产物丙二醛测定试剂盒 均购自南京建成生物工程研究所;其他试剂 均为国产分析纯,天津市大茂化学试剂厂。

DHG-9240A电热恒温鼓风干燥箱 上海一恒科学仪器有限公司;RE-52A旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂;SHB-III循环水式多用真空泵 郑州长城科工贸有限公司;AL104电子天平 梅特勒-托利多仪器上海有限公司;U-5100可见分光光度计 日本日立公司。

## 1.2 实验方法

1.2.1 贺兰山紫蘑提取物的制备 紫蘑冷冻样品经粉碎机粉碎成粉末状,超声辅助95%乙醇浸泡提取2次,料液比1:10,接着用甲醇:氯仿(1:1),料液比1:4,超声提取2次。抽滤后将所得残渣自然挥干溶剂备用,提取液旋蒸浓缩,去离子水分散,选用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇依次进行萃取,重复多次。最终得石油醚相、乙酸乙酯相、正丁醇相三个部分,萃取部分减压浓缩,挥干溶剂得浸膏,将适量提取物依据提取溶剂的极性大小分别用花生油或蒸馏水配制成一定浓度,4℃冰箱保存备用。将抽滤所得紫蘑残渣料液比1:10, (98±2)℃热水回流提取3次,每次4h,6000r/min离心15min后将上清液旋蒸浓缩,4倍乙醇沉淀,所得沉淀蒸馏水复溶,反复醇沉3次,后经乙醚轻微脱色,得紫蘑粗多糖。紫蘑冷冻样品经粉碎机直接粉碎成粉末状即得紫蘑干粉。

1.2.2 小鼠H<sub>22</sub>实体瘤造模<sup>[3]</sup>及分组 实验选取117只小鼠,按体重随机分为9组,每组13只(其中3只用于防止意外死亡作为补充)。即正常组、模型组、香菇多糖组、氟尿嘧啶组、石油醚组、乙酸乙酯组、正丁醇组、紫蘑粗多糖组及紫蘑干粉组。

将H<sub>22</sub>瘤株经腹水传代,5d无菌条件下取腹水,为乳白色,用无菌生理盐水稀释成肿瘤细胞悬液(细胞计数约为1×10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup>cfu/mL),除正常组外,每只小鼠左前肢腋下接种0.2mL,整个操作过程在30min内完成。

自由摄食及饮水,各组均于接种后24h开始给药,正常组与模型组每日1次灌胃0.2mL生理盐水,香菇多糖组每日1次灌胃204mg/kg,氟尿嘧啶组每日1次腹腔注射0.2mL 20mg/kg,紫蘑石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、紫蘑粗多糖组按800mg/kg每日1次灌胃给药,紫蘑干粉组每日1次灌胃1000mg/kg。各实验组连续灌胃9d,监测小鼠体重,观察其生存状态。

1.2.3 样本的采集及制备 各实验组于末次给药24h后,将小鼠轻微乙醚麻醉,称体重,眼眶取血,处死,取肝脏组织,用预冷生理盐水漂洗除去血渍,滤纸拭干,称取一定量肝组织,按重量体积比加生理盐水,组织匀浆器制备成10%的组织匀浆,1000~3000r/10min,取上清液,再用生理盐水稀释成一定浓度组织匀浆,待测。

## 1.3 指标的测定

1.3.1 肝组织蛋白含量的测定 利用考马斯亮兰蛋白测定试剂盒。肝组织蛋白含量的计算公式如下:

$$C = \frac{A_s - A_i}{A_c - A_i} \times 0.563$$

式中,C:待测样本蛋白浓度,mg prot/mL;A<sub>s</sub>,测定管吸光度;A<sub>i</sub>,空白管吸光度;A<sub>c</sub>,标准管吸光度;0.563,标准管浓度,g/L。

1.3.2 总超氧化物歧化酶(T-SOD)的测定 采用总超氧化物歧化酶测定试剂盒,按照说明书指导操作,测定各实验组吸光度,求出肝组织匀浆中的SOD活力。计算公式如下:

$$\text{SOD}_{\text{总}} = \frac{(A_o - A_s) / A_o}{50\%} \times \frac{V_t / V_s}{C}$$

式中:SOD<sub>总</sub>,组织匀浆中总SOD活力,U/mg prot;A<sub>o</sub>,对照管吸光度;A<sub>s</sub>,测定管吸光度;V<sub>t</sub>,反应液总体积;V<sub>s</sub>,取样量,mL;C,待测样本蛋白浓度,mg prot/mL。

1.3.3 丙二醛(MDA)含量的测定 利用试剂盒,按说明书操作,计算各粗提物对肝组织MDA含量的影响。计算公式如下:

$$\text{MDA含量} = \frac{A_s - A_{si}}{A_c - A_{ci}} \times 10 / C$$

式中:MDA,nmol/mg prot;A<sub>s</sub>,测定管吸光度;A<sub>si</sub>,测定空白管吸光度;A<sub>c</sub>,标准管吸光度;A<sub>ci</sub>,标准空白管吸光度;10,标准品浓度,nmol/mL;C,待测样本蛋白浓度,mg prot/mL。

1.3.4 过氧化氢酶(CAT)的测定 参照试剂盒说明书,测定吸光值,计算CAT含量。计算公式如下:

$$\text{CAT含量} = (A_o - A_s) \times 271 \times \frac{1}{60 \times V_s} / C$$

式中:CAT,U/mg prot;A<sub>o</sub>,对照管吸光度;A<sub>s</sub>,测定管吸光度;V<sub>s</sub>,取样量;C,待测样本蛋白浓度,mg prot/mL。

1.3.5 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-P<sub>x</sub>)含量的测定 按照试剂盒说明书操作,通过测定吸光值,计算GSH-P<sub>x</sub>活力。计算公式如下:

$$\text{GSH-P}_x \text{活力} = \frac{A_{\text{非酶}} - A_{\text{酶}}}{A_c - A_i} \times 20 \times D / T / (V_s \times C)$$

式中:GSH-P<sub>x</sub>,组织GSH-P<sub>x</sub>酶活力,规定为每毫克蛋白质,每分钟扣除非酶反应的作用,使反应体系中GSH浓度降低1μmol/L为一个酶活力单位;A<sub>非酶</sub>,非酶管吸光度;A<sub>酶</sub>,酶管吸光度;A<sub>c</sub>,标准管吸光度;A<sub>i</sub>,空白管吸光度;20,标准管浓度,μmol/L;D,稀释倍数;T,反应时间;V<sub>s</sub>,取样量;C,待测样本蛋白浓度,mg prot/mL。

## 1.4 统计处理

数据分析采用统计软件SPSS 17.0处理,均数加减标准差以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析, $p < 0.05$ 表示差别有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 紫蘑提取物对H<sub>22</sub>荷瘤小鼠肝组织SOD的影响

由图1所示,模型组肝组织SOD活力低于正常组,说明经荷瘤处理后会降低机体内SOD活力;紫蘑干粉组H<sub>22</sub>小鼠肝组织中SOD活力最高,且高于正常

组,说明荷瘤小鼠经紫薯干粉处理后其SOD活力恢复到正常动物水平,优于正常小鼠,但差异不显著;乙酸乙酯组、正丁醇组、紫薯粗多糖组肝组织SOD含量与正常组、香菇多糖组含量相当,并且均高于模型组及氟尿嘧啶组,具有显著性差异( $p < 0.05$ )。结果显示,紫薯提取物恢复 $H_{22}$ 小鼠SOD活力的能力与阳性对照香菇多糖作用相当。

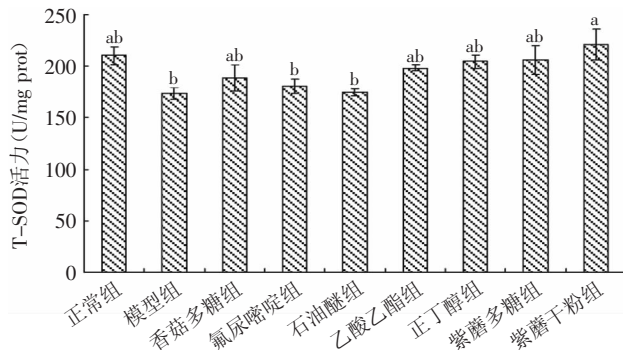


图1 各组 $H_{22}$ 荷瘤小鼠肝组织SOD活力

Fig.1 Activity of SOD in liver tissue of  $H_{22}$ -bearing mouse

注:不同字母表示组间存在显著差异( $p < 0.05$ );图2~图4同。

## 2.2 紫薯提取物对 $H_{22}$ 荷瘤小鼠肝组织MDA含量的影响

由图2所示,氟尿嘧啶组MDA含量最高,与模型对照组处于同一水平,说明经荷瘤处理后机体MDA含量处于升高状态,且经西药治疗后机体脂质过氧化程度加重。而经乙酸乙酯、正丁醇、紫薯粗多糖及紫薯干粉处理后的 $H_{22}$ 小鼠肝组织MDA含量与正常组小鼠处于同一水平,无显著差异( $p > 0.05$ ),并且低于香菇多糖组( $p > 0.05$ )。

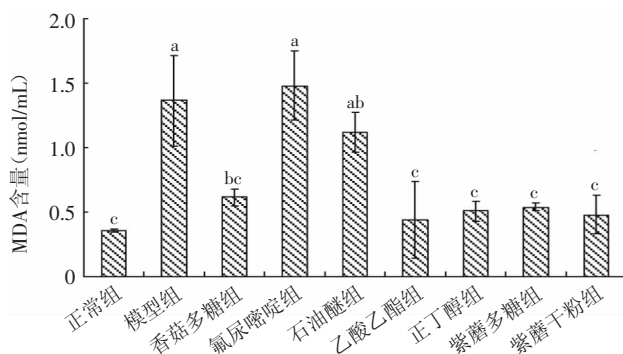


图2 各组 $H_{22}$ 荷瘤小鼠肝组织MDA含量

Fig.2 Content of MDA in liver tissue of  $H_{22}$ -bearing mouse

## 2.3 紫薯提取物对 $H_{22}$ 荷瘤小鼠肝组织CAT的影响

图3结果显示,经药物处理后,除石油醚组外各组动物肝脏中的CAT含量均高于模型组,提示药物治疗可提高荷瘤小鼠肝组织CAT活力;其中,乙酸乙酯组CAT含量在7个实验组中最高,但仍低于正常组( $p < 0.05$ );正丁醇组、紫薯粗多糖及紫薯干粉组的CAT含量与阳性对照香菇多糖和氟尿嘧啶处于同一水平( $p > 0.05$ )。

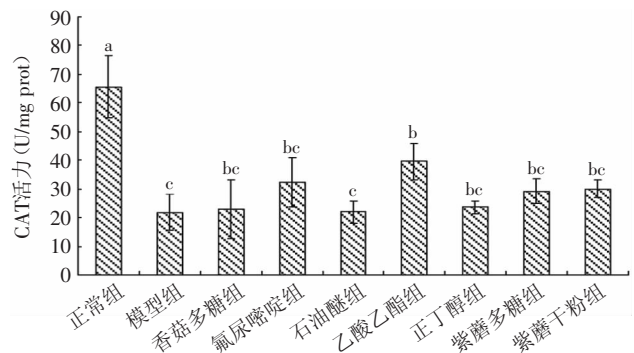


图3 各组 $H_{22}$ 荷瘤小鼠肝组织CAT活力

Fig.3 Activity of CAT in liver tissue of  $H_{22}$ -bearing mouse

## 2.4 紫薯提取物对 $H_{22}$ 荷瘤小鼠肝组织GSH-Px的影响

由图4可知,乙酸乙酯组及紫薯粗多糖组肝组织GSH-Px活力与阳性对照香菇多糖组、氟尿嘧啶组相当( $p > 0.05$ ),达到正常组水平( $p > 0.05$ )。且以上4个实验组均显著高于模型组( $p < 0.05$ )。

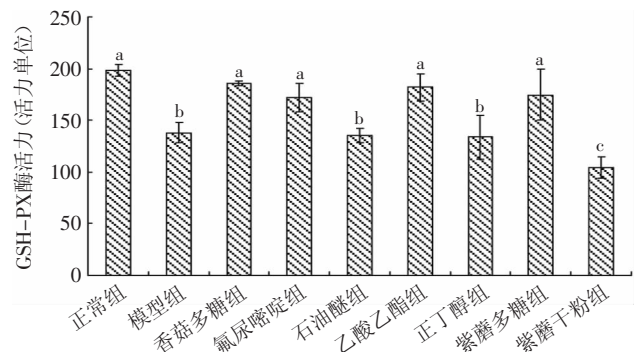


图4 各组 $H_{22}$ 荷瘤小鼠肝组织GSH-Px活力

Fig.4 Activity of GSH-Px in liver tissue of  $H_{22}$ -bearing mouse

## 3 讨论

自由基是指能够独立存在的、含有1个或1个以上不配对电子的任何原子或原子团<sup>[14]</sup>。机体内自由基若维持于正常水平,则是机体有效的防御系统,一旦其产生过多或清除过慢,则会给机体带来一系列的损害、加速衰老并诱发疾病<sup>[15]</sup>。近几年的研究表明,肿瘤的发生、发展与宿主的自由基水平及其代谢有密切关系<sup>[16-19]</sup>。体内过量自由基,会造成细胞DNA损伤或突变,进而诱发细胞癌变,并且产生肿瘤时,氧自由基的代谢失衡,脂质过氧化反应增强,是活性氧诱发肿瘤形成的中间机制<sup>[20-21]</sup>。同时,脂质过氧化反应增强时,使机体内的抗氧化酶的活性降低;氧自由基攻击细胞膜,使膜上的不饱和脂肪酸过氧化产生MDA增多,导致细胞功能丧失和组织损伤,进而促进肿瘤的发生发展及转移。操敏等<sup>[22]</sup>通过对141例原发性患者血清中的氧化代谢产物和抗氧化酶的测定研究发现,较正常组,肺癌患者血清中总抗氧化能力(TAOC)、总超氧化物歧化酶(TSOD)和GSH-Px活力明显降低,而CuZnSOD、 $H_2O_2$ 、MDA含量明显增高,提示恶性肿瘤患者氧化抗氧化反应失衡且抗氧化能力

下降,使得机体受自由基的损伤,进而进一步加重恶性肿瘤对生命的威胁。

小鼠H<sub>22</sub>肝癌实体瘤模型是抗肿瘤药物相关研究中常用的动物移植型肿瘤模型。本课题组研究发现紫蘑提取物对H<sub>22</sub>荷瘤小鼠具有一定的抗肿瘤作用,本实验借助此模型,从体内抗氧化方面分析研究贺兰山紫蘑可能的抗肿瘤机制及对致癌机体自由基清除系统的保护作用。SOD、CAT、GSH-P<sub>x</sub>是体内重要的抗氧化酶,活力大小可反映机体清除自由基的能力;而MDA是细胞膜脂质过氧化物的终产物,其含量可反映体内脂质过氧化的程度及细胞受损程度。因此,通过SOD、CAT及GSH-P<sub>x</sub>等抗氧化酶活力的测定,并结合测定MDA含量,能综合体现机体抗氧化的能力,间接反映致癌机体抗氧化系统受损程度及对恶性肿瘤的抵抗能力。

#### 4 结论

研究表明,给予紫蘑粗多糖后,H<sub>22</sub>荷瘤小鼠肝组织SOD、CAT、GSH-P<sub>x</sub>水平均高于模型对照组;乙酸乙酯组及紫蘑粗多糖组的抗氧化作用优于阳性对照香菇多糖,其SOD、MDA、GSH-P<sub>x</sub>活力均达正常小鼠水平( $p < 0.05$ );给予紫蘑干粉后,H<sub>22</sub>荷瘤小鼠肝组织SOD、CAT水平均高于模型对照组;且紫蘑各提取物组MDA含量具有不同程度的降低,显著低于模型组( $p < 0.05$ ),与正常组无差异( $p > 0.05$ )。此外,氟尿嘧啶用药后,小鼠MDA含量急剧上升,提示该组小鼠脂质代谢失衡、细胞受损程度较为严重。这一现象提示,抗肿瘤西药在治疗肿瘤的同时会造成机体脂质过氧化程度加重,带来较重的毒副作用,而贺兰山紫蘑可显著提高致癌机体抗氧化能力,从而增强机体对恶性肿瘤的抵抗能力。本实验为后续研究贺兰山紫蘑抗肿瘤机制奠定基础,同时,贺兰山紫蘑属地方特色野生物种,首次对其生物活性展开研究,阐述其生物学功能、保健功效及对地方特色资源的保护及合理开发利用具有重要意义。

#### 参考文献

- [1] 张功,峥嵘,巴图,等. 贺兰山大型真菌资源调查记述[J]. 内蒙古师大学报自然科学:汉文版本,2000,4(4):292-296.
- [2] 胡天华,苏云. 贺兰山紫蘑的资源现状及保护对策[J]. 农业科学研究,2007,28(4):90-93.
- [3] 张靠稳,杨振华,马爱璞. 贺兰山紫蘑营养成分的测定[J]. 北方园艺,2011(15):210-211.
- [4] 赵宏艳,张皖东,吕诚,等. 灵芝提取物对H<sub>22</sub>荷瘤小鼠抗肿瘤

- 作用的实验研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(7):842-845.
- [5] 丛阳,黄敏. 香菇多糖抗肿瘤的基础研究及临床应用进展[J]. 大连医科大学学报,2010,32(4):465-469.
- [6] Kimiya Takesh Ita, Shigeo Watanuki, Michioiida, *et al.* Effect of Lentinan on Lymphocyte Subsets of Peripheral Blood Lymph Nodes and Tumor Tissues in Patients with Gastric Cancer[J]. Surg Today JpnJ Surg, 1993, 23: 125-129.
- [7] 马淑凤,陈利梅,徐化能,等. 白灵菇多糖的分离纯化及清除自由基研究[J]. 食品科学,2009,30(19):109-113.
- [8] 吴艳玲,南极星. 桦褐孔菌多糖对小鼠抗氧化清除自由基作用的研究[J]. 亚太传统医药,2009,5(12):9-10.
- [9] 张志军,李淑芳,魏雪生. 灵芝多糖清除自由基活性的研究[J]. 食品研究与开发,2012,33(3):167-170.
- [10] Chun Xie, Hiroyuki Koshino, Yasuaki Esumi, *et al.* Vialinin A, a novel 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenger from an edible mushroom in China[J]. Biosci Biotechnol, 2005, 69(12):2326-2332.
- [11] 许广波,于富强,李艳茹,等. 我国药用真菌开发应用的研究现状及展望[J]. 食用菌,2006(增刊):1-3.
- [12] 欧阳学农,余宗阳,王文武,等. 香菇多糖抗炎作用[J]. 福州总医院学报,2006(3):172-173.
- [13] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 第3版. 北京:人民卫生出版社,2005:1761-1762.
- [14] 邵颖. 食用菌多糖含量和清除自由基活性的研究[J]. 徐州工程学院学报,2007,22(10):36-39.
- [15] 邱巍译. (美)简·卡珀著. 延缓衰老[M]. 第2版. 北京:新华出版社,2001.
- [16] Kaufmann JA, Bickford PC, Tagliatalata G. Freeradical-dependent Changes in constitutive Nuclear factor kappa B in the aged hippocampus[J]. Neuroreport, 2002, 13(15):1917-1928.
- [17] 陈志宏,齐聪儒,杨松鹤,等. 器官衰老和自由基学说[J]. 承德医学院报,2003,20(2):143-145.
- [18] Nystrom T. The free-radical hypothesis of aging goes prokaryotic[J]. Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS, 2003, 60(7):1333-1341.
- [19] Emerit I. Reactive Oxygen Species, Chromosome Mutation, and Cancer: Possible Role of Clastogenic Factors in Carcinogenesis[J]. Free Radic Biol Med, 1994, 16(1):99-109.
- [20] 柴玉英,张向阳,李勇. 我国人口主要疾病死因构成变化的影响因素[J]. 中国全科医学,2010,13(3):1025-1027.
- [21] 张建忠. 国外抗肿瘤药物的研究进展及其国产化现状[J]. 药物研究与开发,2005,76:20-32.
- [22] 操敏,李琦,张宗德,等. 肺癌患者血清氧化/抗氧化状态的初步研究[J]. 结核病与胸部肿瘤,2009,7(2):102-107.

因本刊已被《中国知网》(包括“中国知网”优先数字出版库)独家全文收录,所以所付稿酬中已包含该网站及光盘应付的稿酬。