

# 碱提桑黄菌丝体多糖的抗氧化活性

王 恺<sup>1</sup>, 丁志超<sup>2</sup>, 裴娟娟<sup>2</sup>, 闫景坤<sup>2,\*</sup>

(1. 黄河水利职业技术学院环境工程学院, 河南开封 475000;

2. 江苏大学食品与生物工程学院, 江苏镇江 212013)

**摘要:** 为了研究碱提桑黄菌丝体多糖 PL-N 的抗氧化活性。利用物理、化学方法分析了 PL-N 的化学组成及基本理化性质, 在此基础上, 通过体外抗氧化模型、细胞试验和 D-半乳糖所致的小鼠亚急性衰老模型综合评价了 PL-N 对 DPPH 和羟自由基的清除作用、过氧化氢诱导 SH-SY5Y 神经细胞的保护作用及体内抗氧化活性。结果表明: PL-N 的总糖和糖醛酸含量分别为 84.92% 和 16.92%, 不含蛋白质, 主要由 D-阿拉伯糖、D-木糖、D-葡萄糖和 D-半乳糖组成, 其分子摩尔比为 5.5:7.8:1.8:1。PL-N 具有明显的清除自由基能力, 且呈剂量依赖关系, 在 2.0 mg/mL 时, PL-N 的 DPPH 和羟自由基清除率分别为 72.1% 和 83.3%。同时, 在 80 μg/mL 时, PL-N 预处理对氧化损伤细胞的存活率达到 88.7%, 揭示其突出的体外抗氧化活性。与模型组相比, 灌胃高剂量 PL-N 的小鼠脏器指数、血清和肝脏中的抗氧化酶活性和总抗氧化能力均极显著增加 ( $P < 0.01$ ), 丙二醛含量极显著降低 ( $P < 0.01$ )。由此可见, PL-N 具有突出的抗氧化活性, 可作为功能性食品应用于膳食、理疗中。

**关键词:** 桑黄菌丝体多糖, 碱提, 自由基, 抗氧化活性

## Antioxidant Activities of Polysaccharides from *Phellinus linteus* Mycelia by Alkaline Extraction

WANG Kai<sup>1</sup>, DING Zhi-chao<sup>2</sup>, PEI Juan-juan<sup>2</sup>, YAN Jing-kun<sup>2,\*</sup>

(1. School of Environmental Engineering, Yellow River Conservancy Technical Institute, Kaifeng 475000, China;

2. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

**Abstract:** In this study, antioxidant activities of polysaccharides (PL-N) isolated from *Phellinus linteus* mycelia were investigated. The chemical compositions and preliminary physicochemical properties of the PL-N were analyzed by physical and chemical methods. On this basis, the scavenging abilities on DPPH and hydroxyl free radicals, the protective effects on hydrogen peroxide-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells, and antioxidant activity *in vivo* of the PL-N were evaluated by using *in vitro* antioxidant trials, cell assay and D-galactose-induced aging mice models. The results showed that the carbohydrate and uronic acid contents of PL-N were 84.92% and 16.92%, respectively, and it had no proteins. PL-N was mainly composed of D-arabinose, D-xylose, D-glucose and D-galactose with the molar ratio of 5.5:7.8:1.8:1.0. PL-N exhibited prominent free-radical scavenging capacities and antioxidant activities *in vitro* in dose-dependent manners. At a concentration of 2.0 mg/mL, the scavenging effects of PL-N on DPPH and hydroxyl radicals were 72.1% and 83.3%, respectively. Meanwhile, the viability of oxidative damaged cells reached 88.7% after PL-N pretreatment at a concentration of 80 μg/mL, which revealed its outstanding antioxidant activity *in vitro*. Compared with the model group, the administration of high-dose of PL-N improved viscera indices of aging mice, enhanced the activity of antioxidant enzymes and total antioxidant capacity ( $P < 0.01$ ), and significantly reduced the content of malondialdehyde in the serum and liver of aging mice ( $P < 0.01$ ). Therefore, these findings implied that PL-N had prominent antioxidant activity and could be explored as a natural antioxidant for potentially used in functional foods or medicines.

**Key words:** polysaccharides from *Phellinus linteus* mycelia; alkaline extraction; free radicals; antioxidant activity

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2020)01-0289-06

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2020.01.047

引文格式: 王恺, 丁志超, 裴娟娟, 等. 碱提桑黄菌丝体多糖的抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2020, 41(1): 289-294.

桑黄菌 (*Phellinus linteus*) 属担子菌亚门 (Basidiomycotina)、多孔菌科、木层孔菌属 (*Phellinus*), 是一种珍稀的药用真菌, 有“森林黄金”

之美称<sup>[1]</sup>。现代药理学研究证明, 桑黄菌具有免疫调节、抗肿瘤、抗炎、抗过敏、抗血管生成和抗氧化等多种生理活性<sup>[1]</sup>。其中, 多糖是其主要生物活性

收稿日期: 2019-03-28

作者简介: 王恺 (1980-), 男, 硕士, 讲师, 研究方向: 食品生物技术、食品添加剂, E-mail: 84264292@qq.com。

\* 通讯作者: 闫景坤 (1980-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品碳水化合物, E-mail: jkyan\_27@163.com。

成分之一<sup>[2-4]</sup>。由于受自身生物特性和外界环境的影响,野生桑黄菌子实体稀少,人工栽培周期长,无法满足人们对珍稀桑黄菌资源的广泛需求,对桑黄菌进行人工发酵培养以获取桑黄菌丝体为其产业化开发提供了可能,且发酵周期短,不受季节和环境的限制,发酵所得菌丝体多糖与子实体多糖功效相当<sup>[1]</sup>。

目前,国内外研究桑黄多糖还主要以水提物或水提多糖为研究对象探究其抗氧化活性,对于涉及其他提取介质如酸、碱制备的多糖及其生物活性的研究也多以体外活性评价为主,限制了桑黄活性多糖的深度开发及应用<sup>[5-7]</sup>。如 Kozarski 等<sup>[6]</sup>通过热水提取和乙醇沉淀得到桑黄粗多糖,多糖含量为 62.6%,在 0.1~10 mg/mL 浓度范围内,桑黄粗多糖的 DPPH 自由清除率为 77.9%~86.9%。同样地, Luo 等<sup>[7]</sup>通过热水提取和乙醇沉淀得到 *P.baumii* Pilát 菌丝体多糖 (PBMP),多糖含量为 61.82%,灌胃 400 mg/kg BW 的 PBMP 能够提高 D-半乳糖诱导衰老小鼠血清中抗氧化酶活性和总抗氧化能力。由此可见,以往的研究大多采用水提醇沉的方法来制备桑黄多糖。

研究揭示<sup>[8-9]</sup>,不同溶剂(如热水、酸、碱)提取对多糖的得率、理化性质、结构特征、生物活性及功能特性均有着重要影响。其中碱性溶液在提取过程中能够更好地破坏细胞壁中纤维素和半纤维素之间的氢键,这样使不溶性多糖从细胞壁当中释放出来,转化为可溶性多糖<sup>[10]</sup>,能够使多糖的提取率明显提升,已被科技工作者广泛应用。张俐娜等经过多年研究建立了一种以 1.25 mol/L NaOH/0.05% NaBH<sub>4</sub> 碱性溶液提取香菇子实体多糖的新方法,并证实该方法具有高质、高效、低成本的优点,且提取的香菇多糖具有三螺旋结构<sup>[11]</sup>。因此,在前期研究基础上,为了进一步明确 1.25 mol/L NaOH/0.05% NaBH<sub>4</sub> 所制备多糖的功能活性,本文以液体发酵桑黄菌丝体为原料,采用 1.25 mol/L NaOH/0.05% NaBH<sub>4</sub> 为溶剂进行桑黄菌丝体多糖 (PL-N) 的提取与制备,分析 PL-N 的化学组成及基本理化性质,研究其体外清除自由基能力和对过氧化氢损伤神经细胞的保护作用;在此基础上,建立 D-半乳糖诱导的小鼠衰老模型,评价 PL-N 的体内抗氧化活性,为充分利用桑黄资源、开发桑黄活性多糖类功能性食品或医药保健品提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

桑黄菌丝体 江西康道生物科技有限公司;液体发酵所用桑黄 (*P. linteus*) 菌株(菌株编号:KCTC 6190) 韩国模式培养物保藏所;雌性 ICR 种小白鼠 60 只(SPF 级,6~8 周龄、体重(20±2) g) 江苏大学试验动物中心,动物许可证号:UJS-LAER-2017032201;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH)、过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、胎牛血清(FBS) 美国 Sigma 公司;超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽-过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)、丙二醛(MDA)及总

抗氧化能力(TAOC)等试剂盒 南京建成生物工程研究所;抗坏血酸(V<sub>C</sub>)、D-半乳糖 国产分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

SECURA124-1CN 分析天平 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;HH-A 恒温水浴搅拌器 江苏金坛市中大仪器厂;DL-5C 离心机 上海安亭科学仪器厂;TGL-16 高速台式冷冻离心机 长沙湘仪离心机仪器有限公司;101-3 型电热恒温干燥箱 金坛市医疗仪器厂;LRH-250 生化培养箱 上海恒科技有限公司;UV-1601 紫外/可见分光光度计 北京瑞利分析仪器公司;Synergy HT 多功能酶标检测仪 美国 Bio-Tek 公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 碱提桑黄菌丝体多糖的提取与制备 桑黄菌丝体粉末通过石油醚回流处理 6 h,去除脂类及色素,自然干燥 12 h,备用。预处理的桑黄菌丝体粉末(100 g)按体积比 1:10 (W/V)加入 1.25 mol/L 氢氧化钠/0.05% 硼氢化钠溶液,常温提取 3 h,2 次。提取结束后,提取液用 36% 的乙酸中和至 pH7.0,离心(4000×g,20 min),弃去沉淀。上清液减压浓缩,加入 4 倍体积 95% 乙醇沉淀,4℃静置过夜,离心(4000×g,20 min),取沉淀溶于水,Sevag 试剂法脱蛋白 9 次,蒸馏水透析(截留分子量:8~14 kDa)48 h,冷冻干燥,得到碱提桑黄菌丝体多糖,记为 PL-N<sup>[11]</sup>。

1.2.2 多糖基本理化性质测定 采用苯酚硫酸法测定总糖含量<sup>[12]</sup>;采用硫酸味唑法测定糖醛酸含量<sup>[12]</sup>;采用考马斯亮蓝染色法测定蛋白质含量<sup>[12]</sup>;采用酸降解联合气相色谱进行单糖组成分析<sup>[12]</sup>。

1.2.3 清除 DPPH 自由基活性的测定 清除 DPPH 自由基试验方法参考 Konwarh 等<sup>[13]</sup>的方法。不同质量浓度(0.05、0.1、0.5、1.5、2.0 mg/mL)的样品液 3 mL 分别加入 1 mL 0.1 mmol/L DPPH 乙醇溶液中,放置暗处室温反应 30 min,于 517 nm 条件下测定其吸光值,V<sub>C</sub> 作为阳性对照。按式(1)计算 DPPH 自由基清除率:

$$\text{清除率}(\%) = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100 \quad \text{式(1)}$$

式中,A<sub>0</sub>、A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub> 分别是空白对照(去离子水+DPPH 溶液)、样品和 DPPH、样品和乙醇溶液的吸光值。

1.2.4 清除羟自由基活性的测定 清除羟自由基试验参考闫景坤、Delattre 等<sup>[12,14]</sup>的方法。向 0.2 mL 不同浓度(0.05、0.1、0.5、1.5、2.0 mg/mL)的样品中加入 0.2 mL 5 mmol/L FeSO<sub>4</sub>,混匀后再加入 0.2 mL 1% (v/v)H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,混匀后置室温下反应 60 min。反应完成后,再加入 1 mL 去离子水,于 510 nm 处测定其吸光值,V<sub>C</sub> 作为阳性对照。按式(2)计算羟自由基清除率:

$$\text{清除率}(\%) = [(A_0 - A) / A_0] \times 100 \quad \text{式(2)}$$

式中,A<sub>0</sub>、A 分别是去离子水代替样品和样品的吸光值。

1.2.5 细胞保护试验 体外细胞保护试验参考 Li 等<sup>[15]</sup>的方法。多糖样品预先用 0.1 mol/L PBS 溶解

成 10 mg/mL 的浓度,用 0.1 mol/L PBS 新鲜配制 100 mmol/L 过氧化氢,备用。SH-SY5Y 神经细胞用含 10% 胎牛血清(FBS)的 RPMI 1640 培养液在 37 °C 含 CO<sub>2</sub> 的培养箱中进行常规培养。将细胞以 5 × 10<sup>4</sup> 个/孔细胞悬液接种到 96 孔板中,加入不同浓度的多糖溶液(10~80 μg/mL) 预孵育 24 h。随后,加入终浓度为 80 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 培养 24 h,以正常细胞作为阳性对照,以未添加多糖氧化损伤的细胞作为阴性对照。细胞存活率通过 MTT 法测定,以百分比表示,如式(3)所示:

$$\text{细胞存活率}(\%) = \left[ \frac{(A_1 - A_0)}{(A_2 - A_0)} \right] \times 100 \quad \text{式(3)}$$

式中, A<sub>0</sub>、A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub> 分别是阴性对照、氧化损伤及多糖处理、阳性对照的吸光值。

**1.2.6 动物饲养与试验设计** 健康雌性 ICR 小鼠饲养在环境温度(23.0 ± 0.5) °C、相对湿度 55% ± 5%、具有 12 h 白昼、12 h 黑夜的昼夜循环周期的试验动物房中,试验期间小鼠自由摄食和饮水。适应性饲养 3 d 以后,将 60 只小鼠随机分为 6 组,每组 10 只,分别设定为第 I 组,正常对照组:每天腹腔注射生理盐水(10 mL/kg BW)、灌胃生理盐水(25 mL/kg BW);第 II 组,模型对照组:每天腹腔注射 D-半乳糖(100 mg/kg BW)、灌胃生理盐水(25 mL/kg BW);第 III 组,阳性对照组:每天腹腔注射 D-半乳糖(100 mg/kg BW)、灌胃维生素 C(V<sub>C</sub>, 100 mg/kg BW);第 IV 组、第 V 组和第 VI 组,分别为 PL-N 低剂量组、PL-N 中剂量组和 PL-N 高剂量组:每天分别腹腔注射 D-半乳糖(100 mg/kg BW)、灌胃 PL-N 低、中、高剂量(100、200、400 mg/kg BW),每三天禁食称重一次,连续饲养 40 d<sup>[16]</sup>。

**1.2.7 试样采集与制备** 试验小鼠末次给药后禁食 12 h,称重并断头处死,收集血液于 1500 × g 离心 10 min 制备小鼠血清;取肝脏和肾脏称重用小剪刀将肝脏和肾脏样品剪碎,在研钵中倒入适量的经过冰浴的生理盐水快速充分研磨,然后用生理盐水配成 10% 的组织匀浆液,4000 × g 离心 10 min,取匀浆上清液分别测定有关生化指标<sup>[16]</sup>。

**1.2.8 脏器指数的测定** 将取出的肝脏、脾脏和胸腺用生理水洗净,擦干,称重,按照下面公式计算小鼠的各个脏器指数:

肝脏、脾脏和胸腺指数(mg/g BW) = 脏器质量/小鼠体重

**1.2.9 血清、肝脏匀浆中的抗氧化指标检测** 肝脏匀浆中蛋白质含量以及血清和肝脏匀浆中的谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活力、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)含量以及总抗氧化能力(TAOC)等指标采用南京建成生物工程研究所研制的抗氧化试剂盒,按试剂盒说明书要求检测。

### 1.3 数据处理

试验中所有数据都是三次测定的平均值(Mean) ± 标准偏差(SD),方差分析(ANOVA)用来评价各参数的显著性。

## 2 结果与讨论

### 2.1 碱提桑黄菌丝体多糖的基本理化性质

通过研究表明,碱提桑黄菌丝体多糖的总糖和糖醛酸含量分别为 84.92% ± 0.51%、16.92% ± 0.40%,且不含蛋白质。Kim 等<sup>[17]</sup>用碱溶液提法从裂褶菌中提取出来的水溶性多糖具有较高的多糖含量,与本研究具有一致性。单糖组成分析研究发现,PL-N 主要由 D-阿拉伯糖、D-木糖、D-葡萄糖和 D-半乳糖组成,其分子摩尔比为 5.5:7.8:1.8:1。这些结果表明通过 1.25 mol/L NaOH/0.05% NaBH<sub>4</sub> 提取得到的 PL-N 为酸性杂多糖,这和 Kozarski 等<sup>[6]</sup>和 Wang 等<sup>[18]</sup>得出的结论一致。

### 2.2 碱提桑黄菌丝体多糖的体外抗氧化活性

**2.2.1 清除 DPPH 自由基能力** PL-N 和 V<sub>C</sub> 的清除 DPPH 自由基能力如图 1 所示。从图 1 中可以看出,PL-N 显示出明显的清除 DPPH 自由基能力,且呈剂量依赖关系。当浓度为 2.0 mg/mL 时,PL-N 的 DPPH 自由基清除率为 72.1%,显示出良好的清除 DPPH 自由基能力,但是低于 V<sub>C</sub> (0.1 mg/mL, 94.1%)。Wang 等<sup>[19]</sup>通过热水提取和柱层析分离从桑黄(*P. nigricans*)菌丝体中得到 3 个多糖组分(PNMP1、PNMP2 和 PNMP3),研究发现,含有硫酸基团的 PNMP2 和 PNMP3 比中性多糖 PNMP1 具有较高的 DPPH 自由基清除能力。同样地,PL-N 为含有羧基的酸性杂多糖,也显示出良好的 DPPH 自由基清除能力。多糖的清除自由基能力与它们的供氢能力有关,基团高活性的能力意味着更强的供氢能力,多糖中糖醛酸、硫酸基团的存在能够激活异头碳上的氢原子,进而显示出突出的清除自由基能力<sup>[19]</sup>。

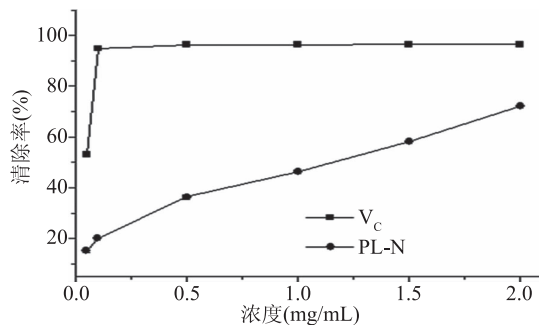


图 1 PL-N 的 DPPH 自由基清除能力

Fig.1 DPPH free radical scavenging capacity of PL-N

**2.2.2 清除羟自由基(·OH)能力** PL-N 对羟自由基清除能力的试验结果如图 2 所示。从图 2 中可以发现,随着样品浓度的增加,PL-N 的·OH 清除能力呈增加趋势,在测定的浓度(0~2 mg/mL)范围内呈现明显的剂量依赖关系。在同样的浓度下,V<sub>C</sub> 显示出很强的清除·OH 能力,且在 0.5 mg/mL 时,达到最大清除率为 91.2%。当样品浓度为 2.0 mg/mL 时,PL-N 的·OH 清除率为 83.3%,说明 PL-N 桑黄菌丝体多糖具有良好的清除·OH 活性,这与清除 DPPH 自由基的作用是一致的。谢丽源等<sup>[20]</sup>考察了桑黄粗多糖(SH)、纯化多糖组分(P-47000、P-8700)的体外清除自由基活性,研究表明,P-8700 对羟自由基具

有良好的清除效果,在浓度 5.0 mg/mL 时清除率达到 53.42%,且高于 SH 和 P-47000,但远低于 PL-N 的 (83.3%, 2.0 mg/mL)。这可能是由于通过 1.25 mol/L NaOH/0.05% NaBH<sub>4</sub> 提取分离得到的 PL-N 具有较高的总糖和糖醛酸含量,糖醛酸含量的高低与清除自由基能力及抗氧化活性有着直接关系<sup>[12]</sup>。此外,多糖的单糖组成、分子量、结构及其链构象也对清除自由基能力起到一定作用。

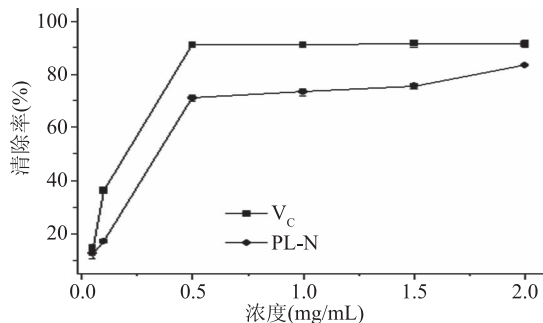


图2 PL-N的羟自由基清除能力

Fig.2 ·OH scavenging capacity of PL-N

2.2.3 细胞保护作用 图3为不同浓度的PL-N对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的SH-SY5Y细胞的保护作用。与正常细胞相比,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的神经细胞活性极显著降低( $P < 0.01$ ),但是用不同浓度(10~80 μg/mL)的PL-N进行预处理后其细胞活性出现了显著提高( $P < 0.05$ )。在浓度为80 μg/mL时,用PL-N进行预处理后的细胞存活率为88.7%。结果表明,PL-N具有良好的细胞保护作用,从而显示了其突出的抗氧化活性。这与前面的清除DPPH和羟自由基试验具有很好的一致性。

## 2.3 碱提桑黄菌丝体多糖的体内抗氧化活性

2.3.1 PL-N对模型小鼠脏器指数的影响 各组小鼠肝脏、胸腺、脾脏指数结果如表1所示,和正常组相比,D-半乳糖处理的模型组小鼠的三种脏器指数显著降低( $P < 0.05$ );与模型组对比,阳性对照(V<sub>c</sub>)组、PL-N处理组的三种脏器指数均有不同程度的提高,中剂量和高剂量PL-N处理组显著性提高( $P < 0.05$ ),且均呈现一定的浓度依赖关系。总的来讲,D-半乳糖处理的模型组的肝脏、胸腺和脾脏重量降低,功能衰退,灌胃不同剂量的PL-N对以上三种脏器的衰老均有一定程度的抑制作用,从而对机体的免疫器官起到保护作用。

2.3.2 PL-N对模型小鼠血清和肝脏中抗氧化酶活性的影响 超氧化物歧化酶(SOD)是机体内超氧阴

表2 PL-N对衰老小鼠血清中抗氧化酶活性和丙二醛含量的影响

Table 2 Effect of PL-N on the activities of antioxidant enzymes and the content of MDA in serums of senile mice

组别	SOD(U/mg prot)	CAT(U/mg prot)	GSH-Px(U/mg prot)	MDA(nmol/mg prot)
I	237.70 ± 19.47 *	19.63 ± 0.21 **	303.11 ± 12.94 ***	8.23 ± 0.19 ***
II	196.17 ± 5.39	9.44 ± 0.43	172.09 ± 12.02	13.63 ± 0.63
III	330.56 ± 35.84 ***	30.23 ± 0.63 **	457.58 ± 12.72 ***	5.75 ± 0.21 ***
IV	241.35 ± 21.61 *	27.66 ± 0.34 **	416.45 ± 5.52 ***	6.62 ± 0.12 **
V	275.94 ± 12.17 ***	31.57 ± 0.23 ***	523.20 ± 9.76 ***	5.18 ± 0.15 ***
VI	309.84 ± 12.36 ***	36.33 ± 0.36 ***	638.52 ± 14.43 ***	2.32 ± 0.31 ***

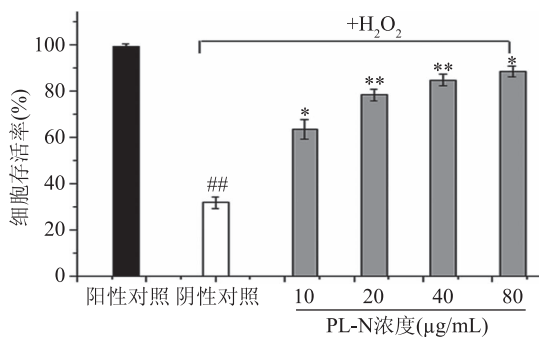


图3 不同浓度PL-N对过氧化氢诱导的SH-SY5Y细胞损伤的保护作用

Fig.3 Cytoprotective effects of different concentrations of PL-N on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced SH-SY5Y cell injury

注:与阴性对照相比,\*表示显著( $P < 0.05$ ),\*\*表示极显著( $P < 0.01$ );与阳性对照相比,##表示极显著( $P < 0.01$ )。

表1 PL-N对D-半乳糖诱导衰老小鼠脏器指数的影响

Table 1 Effect of PL-N on organ index of D-galactose-induced senile mice

组别	肝脏 (mg/g BW)	胸腺 (mg/g BW)	脾脏 (mg/g BW)
I	42.00 ± 4.10 **	2.55 ± 0.41 *	3.07 ± 0.26 *
II	36.65 ± 2.05	2.33 ± 0.27	2.65 ± 0.40
III	42.30 ± 1.93 *	2.83 ± 0.15 ***	3.17 ± 0.39
IV	40.43 ± 2.93	2.36 ± 0.48 *	3.34 ± 0.36 **
V	42.42 ± 2.44 *	2.37 ± 0.34 *	3.45 ± 0.40 ***
VI	44.41 ± 2.71 **	2.52 ± 0.42 ***	3.98 ± 0.64 ***

注:与模型对照组相比,\*表示显著( $P < 0.05$ ),\*\*表示极显著( $P < 0.01$ ),\*\*\*表示高度显著( $P < 0.001$ );表2、表3同。

离子自由基(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)的天然消除剂,能催化生物体内O<sub>2</sub><sup>-</sup>发生歧化反应,能够防御O<sub>2</sub><sup>-</sup>的毒性、抗衰老以及预防肿瘤和抗炎等<sup>[21]</sup>。谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)能够特异地催化谷胱甘肽(GSH)对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的还原反应,起到保护细胞膜结构完整和功能的作用<sup>[22]</sup>。过氧化氢酶(CAT)能够将H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>分解成H<sub>2</sub>O,从而保护肌体细胞稳定的内环境及细胞的正常活动<sup>[23]</sup>。因此,测定抗氧化酶(SOD、CAT、GSH-Px)活力的大小可以间接反映机体清除自由基的能力。

碱提桑黄菌丝体多糖PL-N对衰老小鼠血清和肝脏中抗氧化酶活力的影响如表2和表3所示。从表2、表3中可以看出,与正常对照组相比,D-半乳糖诱导模型组衰老小鼠的血清和肝脏中抗氧化酶

表3 PL-N对衰老小鼠肝脏中抗氧化酶活性和丙二醛含量的影响

Table 3 Effect of PL-N on the activities of antioxidant enzymes and the content of MDA in livers of senile mice

组别	SOD(U/mg prot)	CAT(U/mg prot)	GSH-Px(U/mg prot)	MDA(nmol/mg prot)
I	252.69 ± 6.52 <sup>***</sup>	20.47 ± 1.66 <sup>***</sup>	308.03 ± 17.22 <sup>***</sup>	3.33 ± 0.24 <sup>***</sup>
II	203.99 ± 4.36	6.85 ± 0.89	210.44 ± 31.74	4.83 ± 0.43
III	284.36 ± 5.26 <sup>***</sup>	28.20 ± 0.76 <sup>**</sup>	430.03 ± 12.47 <sup>***</sup>	3.83 ± 0.14 <sup>***</sup>
IV	329.38 ± 4.44 <sup>***</sup>	21.85 ± 1.73 <sup>**</sup>	386.95 ± 17.67 <sup>***</sup>	3.96 ± 0.20 <sup>**</sup>
V	389.75 ± 12.61 <sup>***</sup>	35.61 ± 0.54 <sup>***</sup>	449.50 ± 20.54 <sup>**</sup>	2.82 ± 0.30 <sup>***</sup>
VI	446.26 ± 12.94 <sup>***</sup>	43.60 ± 1.45 <sup>***</sup>	533.21 ± 27.80 <sup>**</sup>	1.93 ± 0.16 <sup>**</sup>

(SOD、CAT、GSH-Px)活性显著减小( $P < 0.05$ ),说明模型建造成功。与模型对照组相比,阳性对照组的抗氧化酶活力均极显著提高( $P < 0.01$ );碱提桑黄菌丝体多糖 PL-N 各处理组小鼠血清和肝脏中抗氧化酶活力均显著提高( $P < 0.05$ ),其中 PL-N 高剂量组的效果最佳。这些结果表明,PL-N 能够提高 D-半乳糖所致的氧化损伤小鼠体内的 SOD、CAT 和 GSH-Px 活力,增强其体内自由基清除能力。

通过测定丙二醛(MDA)量能够反映机体内脂质过氧化程度,间接地反映出细胞损伤的程度<sup>[24]</sup>。如表2和表3所示,正常对照组小鼠血清和肝脏中MDA含量均低于模型对照组,差异显著( $P < 0.05$ ),说明D-半乳糖致小鼠衰老模型建模成功。阳性对照组、PL-N低剂量、PL-N中剂量和PL-N高剂量组的小鼠血清和肝脏中MDA含量与模型对照组相比差异极显著( $P < 0.01$ ),且呈一定的剂量效应关系。这些结果表明,碱提桑黄菌丝体多糖 PL-N 能够显著降低衰老小鼠血清和肝脏中的MDA含量,抑制生物膜脂质过氧化反应,具有明显的抗氧化作用。

2.3.3 PL-N对模型小鼠肝脏中总抗氧化能力的影响 各组小鼠肝脏中的总抗氧化能力(TAOC)如图4所示,与正常对照组相比,模型对照组小鼠肝脏中的TAOC能力极显著降低( $P < 0.01$ ),表明在D-半乳糖的诱导损伤下,小鼠机体的总抗氧化能力明显削弱;与模型对照组相比,阳性对照组的TAOC能力高度显著提高( $P < 0.001$ );灌胃不同浓度 PL-N 后,与模型对照组相比,PL-N各处理组小鼠肝脏中的TAOC明显增加。表明 PL-N 能明显抑制或者治疗 D-半乳糖诱导引发小鼠 TAOC 的降低,并能提高肝脏组织的TAOC水平。经统计学处理,均有高度显著性差异( $P < 0.001$ ),且呈明显的剂量效应关系。结果表明 PL-N 能够显著增强机体总抗氧化能力的活性。

近年来,国内外研究者通过建立 D-半乳糖诱导的小鼠模型来评价不同桑黄菌来源和不同提取分离方法所得到的不同结构特征的桑黄多糖的体内抗氧化活性,并揭示其构效关系,为功能性食品开发提供理论指导。Luo等<sup>[7]</sup>研究了桑黄菌丝体(*P. baumii* Pilát)多糖 PBMP 的理化性质和体内抗氧化活性,研究发现,PBMP 主要由葡萄糖、半乳糖、岩藻糖、甘露糖和鼠李糖组成的杂多糖,灌胃 PBMP 能够明显且呈剂量依赖地增加 D-半乳糖诱导衰老小鼠的体内抗氧化酶活性,降低血清和肝脏中丙二醛含量。同样地,Yan等<sup>[25]</sup>通过热水提取和柱层析分离从桑黄菌丝体(*P. linteus*)得到一高分子量(~290000 kDa)的

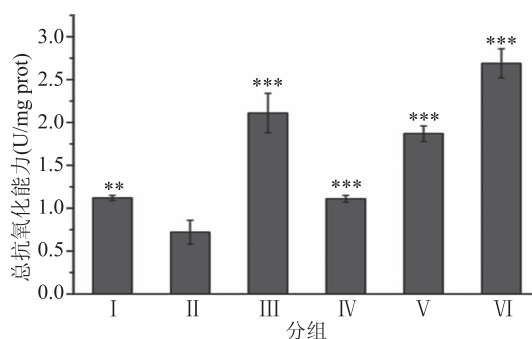


图4 肝脏中的总抗氧化能力

Fig.4 TAOC in liver

注:与模型对照组相比,\*\*表示极显著( $P < 0.01$ ),\*\*\*表示高度显著( $P < 0.001$ )。

水溶性杂多糖(PLP1-1),体内抗氧化研究表明,PLP1-1能够明显地提高血清和肝脏中抗氧化酶(SOD、GSH-Px和CAT)活性,降低丙二醛含量。以往报道的研究结果均略低于本研究 PL-N 的,这可能是因为 PL-N 具有较高的多糖和糖醛酸含量,此外,通过该方法提取得到的多糖或许具有较为有序的链构象,这也将有助于其高抗氧化活性的发挥。

### 3 结论

碱提桑黄菌丝体多糖 PL-N 的总糖和糖醛酸含量分别为 84.92% ± 0.51% 和 16.92% ± 0.40%,且不含蛋白质;PL-N 主要由 D-阿拉伯糖、D-木糖、D-葡萄糖和 D-半乳糖组成,其分子摩尔比为 5.5:7.8:1.8:1。体外清除自由基和细胞实验研究表明,PL-N 能够明显地清除 DPPH 和 ·OH 自由基的能力和其对过氧化氢损伤的神经细胞的保护作用,揭示其具有良好的体外抗氧化活性。利用 D-半乳糖所致的小鼠亚急性衰老模型,综合评价 PL-N 的体内抗氧化活性。研究发现,PL-N 灌胃 40 d 后,小鼠(胸腺、脾脏、肝脏)脏器指数,血清和肝脏中的 SOD、GSH-Px、CAT 活性均显著增加( $P < 0.05$ );MDA 含量极显著降低( $P < 0.01$ );小鼠肝脏中 TAOC 高度显著提高( $P < 0.001$ ),且呈剂量依赖关系。这些结果揭示 PL-N 具有明显的体内抗氧化活性,可作为功能性食品应用于膳食、治疗中。

### 参考文献

- [1] 国家卫生部和国家中医药管理局. 中华本草: 第一卷[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
- [2] Zhu T, Kim S H, Chen C Y. A medicinal mushroom; *Phellinus linteus* [J]. Current Medicinal Chemistry, 2008, 15 (13):

1330-1335.

[3] Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis [J]. Cell, 1996, 86 (3): 353-364.

[4] 闫景坤, 马海乐, 祝子坪, 等. 桑黄菌胞内多糖的理化性质和体外抗氧化活性[J]. 食品科学, 2012, 33(9): 36-40.

[5] Wasser S. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 60(3): 258-274.

[6] Kozarski M, Klaus A, Niksic M, et al. Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus* [J]. Food Chemistry, 2011, 129(4): 1667-1675.

[7] Luo J, Liu J, Sun Y, et al. Medium optimization, preliminary characterization and antioxidant activity *in vivo* of mycelial polysaccharide from *Phellinus baumii* Pilát [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 81(3): 533-540.

[8] Wang X, Xu X, Zhang L. Thermally induced conformation transition of triple-helical lentinan in NaCl aqueous solution [J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2008, 112(33): 10343-10351.

[9] Peasura N, Laohakunjit N, Kerdchoechuen O, et al. Characteristics and antioxidant of *Ulva intestinalis* sulphated polysaccharides extracted with different solvents [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 81: 912-919.

[10] Lahaye M, Robic A. Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds [J]. Biomacromolecules, 2007, 8(6): 1765-1774.

[11] Zhang Lina, Li S, Wang X, et al. Advances in lentinan: Isolation, structure, chain conformation and bioactivities [J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25: 196-206.

[12] 闫景坤. 抗氧化新型冬虫夏草胞外多糖的制备, 结构与溶液特征研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2010.

[13] Konwarh R, Pramanik S, Kalita D, et al. Ultrasonication - a complementary 'green chemistry' tool to biocatalysis: A laboratory - scale study of lycopene extraction [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2012, 19(2): 292-299.

[14] Delattre C, Pierre G, Gardarin C, et al. Antioxidant activities

of a polyglucuronic acid sodium salt obtained from TEMPO-mediated oxidation of xanthan [J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 116: 34-41.

[15] Li S P, Zhao K J, Ji Z N, et al. A polysaccharide isolated from *Cordyceps sinensis*, a traditional Chinese medicine, protects PC12 cells against hydrogen peroxide-induced injury [J]. Life Sciences, 2003, 73(19): 2503-2513.

[16] 罗建光. 鲍氏层孔菌菌丝体多糖分离纯化, 结构鉴定及其生物活性的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2010.

[17] Kim G Y, Park S K, Lee M K, et al. Proteoglycan isolated from *Phellinus linteus* activates murine B lymphocytes via protein kinase C and protein tyrosine kinase [J]. International Immunopharmacology, 2003, 3(9): 1281-1292.

[18] Wang Z, Zhou F, Quan Y. Antioxidant and immunological activity *in vitro* of polysaccharides from *Phellinus nigricans* mycelia [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 64: 139-143.

[19] Wang J, Guo H, Zhang J, et al. Sulfaed modification, characterization and structure - antioxidant relationships of *Artemisia sphaerocephala* polysaccharides [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 81(4): 897-905.

[20] 谢丽源, 张勇, 彭卫红, 等. 桑黄胞内多糖免疫及抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2011, 32(9): 276-281.

[21] 陈鸿鹏, 谭晓风. 超氧化物歧化酶(SOD)研究综述[J]. 经济林研究, 2007, 25(1): 59-65.

[22] Urso M L, Clarkson P M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation [J]. Toxicology, 2003, 189: 41-54.

[23] Yao D C, Shi W B, Gou Y L, et al. Fatty acid-mediated intracellular iron translocation: A synergistic mechanism of oxidative injury [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2005, 39(10): 1385-1398.

[24] Bagchi D, Bagchi M, Hassoun E A, et al. *In vitro* and *in vivo* generation of reactive oxygen species. DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides [J]. Toxicology, 1995, 104: 129-140.

[25] Yan J K, Wang Y Y, Ma H L, et al. Structural characteristics and antioxidant activity *in vivo* of a polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* mycelia [J]. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2016, 65: 110-117.

(上接第 288 页)

dietary supplementation using isomeric blends of conjugated linoleic acid on lipid metabolism in healthy human subjects [J]. British Journal of Nutrition, 2002, 88(3): 243-251.

[31] Innis S M. Essential fatty acids in growth and development [J]. Progress in Lipid Research, 1991, 30(1): 39-103.

[32] Narayan B, Miyashita K, Hosakawa M. Physiological effects of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) - A review [J]. Food Reviews International, 2006, 22(3): 291-307.

[33] Aragão C, Costas B, Vargas-Chacoff L, et al. Changes in plasma amino acid levels in a euryhaline fish exposed to different environmental salinities [J]. Amino Acids, 2010, 38(1): 311-317.

[34] Hosoi M, Kubota S, Toyohara M, et al. Effect of salinity

change on free amino acid content in Pacific oyster [J]. Fisheries Science, 2003, 69(2): 395-400.

[35] 黄凯, 蒋煥超, 吴宏玉, 等. 盐度对凡纳滨对虾肌肉中游离氨基酸含量的影响[J]. 海洋渔业, 2010, 32(4): 422-426.

[36] 姚翔, 陶宁萍, 王锡昌. 宝石鱼肌肉氨基酸组成及营养评价[J]. 现代食品科技, 2009, 25(4): 447-450.

[37] 夏保密, 侯俊利, 赵峰, 等. 盐度对日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 渗透压调节的影响[J]. 生态学杂志, 2016, 35(8): 2182-2188.

[38] 王士稳, 梁萌青, 林洪, 等. 海水和淡水养殖凡纳滨对虾呈味物质的比较分析[J]. 渔业科学进展, 2006, 27(5): 79-84.

[39] 彭永兴, 许祥, 程玉龙, 等. 海水和淡水养殖凡纳滨对虾肌肉营养成分的比较[J]. 水产科学, 2013, 32(8): 435-440.