

红须腹菌酸多糖及其羧甲基酸多糖 对免疫抑制型小鼠脏器抗氧化作用的影响

袁梦晗, 张夜路, 丁慧敏, 黄馨阅, 陶明煊

(南京师范大学食品与制药工程学院, 江苏 南京 210023)

[摘要] 以红须腹菌酸多糖(Acid Refined polysaccharide from *Rhizopogon rubescens*, RPRR-S)及羧甲基红须腹菌酸多糖(Carboxymethylation of RPRR-S, CM-RPRR-S)为试验材料,通过测定小鼠肾脏、心脏和肝脏的丙二醛(malondialdehyde, MDA)、还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)含量以及其过氧化氢酶(catalase, CAT)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)的活性,研究红须腹菌酸多糖及羧甲基红须腹菌酸多糖对免疫抑制型小鼠肾脏、心脏和肝脏抗氧化作用的影响.结果显示:红须腹菌酸多糖及羧甲基红须腹菌酸多糖对免疫抑制型小鼠肾脏、心脏和肝脏均具有显著的抗氧化作用,能在一定程度上保护并恢复机体损伤的器官,其保护作用随着多糖浓度的增加而增强;且在相同质量浓度下,羧甲基红须腹菌酸多糖效果更明显.

[关键词] 红须腹菌酸多糖,羧甲基红须腹菌酸多糖,肾脏,心脏,肝脏,抗氧化

[中图分类号] TS201.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-1292(2023)04-0057-10

Effect of Acid Refined Polysaccharide from *Rhizopogon Rubescens* and Carboxymethylation of RPRR-S on the Antioxidant Effect of Immunosuppressed Mice Organs

Yuan Menghan, Zhang Yelu, Ding Huimin, Huang Xinyue, Tao Mingxuan

(School of Food Science and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

Abstract: Acid Refined polysaccharide from *Rhizopogon rubescens* (RPRR-S) and Carboxymethylation of RPRR-S (CM-RPRR-S) are used as experimental materials, the contents of malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) and the activities of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in mouse kidney, heart and liver are determined to explore the effects of RPRR-S and CM-RPRR-S on the antioxidant effect of kidney, heart and liver of immunosuppressed mice. The results show that RPRR-S and CM-RPRR-S have significant antioxidant effects on the kidneys, hearts and livers of immunosuppressive mice, which can protect and restore damaged organs to a certain extent, and their protective effects increase with the increase of polysaccharide concentration. And under the same mass liquidity, the effect of CM-RPRR-S is more obvious.

Key words: RPRR-S, CM-RPRR-S, kidney, heart, liver, antioxidant

生活节奏的加快和工作压力的不断增加导致现代人机体免疫力下降,亚健康人群越来越普遍,当免疫系统受损时,会诱发过敏、炎症等不良反应^[1],严重威胁到人的生命健康.肾脏、心脏和肝脏在人体免疫调节中具有重要作用:肾脏排泄代谢废物的功能是与人体免疫调节密切相关的,肾脏疾病容易导致免疫功能紊乱^[2];肝脏是免疫器官,具有强大的天然免疫系统,能维持免疫系统的平衡;心脏为身体的各个器官组织提供充足的血量,使器官组织维持正常的代谢和功能.人们不规则的生活作息,会产生大量的自由基,体内多余的自由基会减弱机体抗氧化能力,导致肾脏、肝脏受损^[3].采用从天然产品中开发出的生物活性

收稿日期:2023-02-01.

基金项目:浙江省动物蛋白食品精深加工技术重点实验室开放基金项目.

通讯作者:陶明煊,副教授,研究方向:食品营养与健康. E-mail:45017@njnu.edu.cn

物质清除体内多余自由基、增强机体抗氧化性能和提高免疫力,已经得到人们越来越多的重视。

红须腹菌隶属于层腹菌目、根须腹菌科、根须腹菌属^[4],是一种珍稀的食用菌,幼嫩时可食,含有蛋白质、多糖等多种营养物质,具有一定的抗氧化活性^[5]。红须腹菌在日本极受欢迎,被称为“松露”“松窝”,常常被制成罐头出售。食用菌多糖主要是从食用菌子实体、菌丝体及发酵液中提取出来的一种具有活性的生物大分子物质^[6],其被证实具有多种促进健康的功效,如抗肿瘤、抗病毒、抗氧化和增强免疫等^[7-11]。红须腹菌作为营养物质含量丰富的食用菌,具有潜在的开发价值,但目前学者对红须腹菌的研究仍处于初级探索阶段,对于红须腹菌多糖的生理活性的具体表现并无完整、深入的探讨。

本文以红须腹菌酸多糖及其羧甲基酸多糖为试验材料,通过环磷酰胺诱导建立免疫抑制小鼠模型^[12],探究红须腹菌酸多糖及其羧甲基酸多糖对免疫抑制型小鼠肾脏、心脏和肝脏抗氧化作用的影响,以期红须腹菌多糖在保健食品和天然药物等领域的应用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 材料

以红须腹菌子实体为原材料,经过提取分离纯化得到红须腹菌纯多糖(RPRR);对经 DEAE-Cellulose 52 纯化得到的红须腹菌酸多糖(RPRR-S)进行羧甲基修饰,得到羧甲基红须腹菌酸多糖(CM-RPRR-S);两种多糖均由南京师范大学食品与制药工程学院本课题组提供。

ICR 雄性小鼠(5 周龄)70 只,体重(35±2)g,购于杭州子源实验动物科技有限公司,于南京师范大学生命科学学院动物实验中心饲养(SYXK(苏)2020-0047),饲养室温度为(23±2)℃,湿度为(50±5)%,每日照明 12 h。

1.1.2 试剂

无水乙醇、氯仿、正丁醇、甲硫氨酸、三氯乙酸、硫代巴比妥酸(TBA)、四乙氧基丙烷,国药集团化学试剂有限公司;氯化硝基四氮唑蓝、2-硝基苯甲酸(DTNB),北京兰杰科技有限公司;核黄素、乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2 Na),中国医药(集团)上海化学试剂公司;还原型谷胱甘肽(GSH)标准溶液、牛血清白蛋白标准溶液,美国 Sigma 公司;三羟基甲基氨基甲烷,成都科龙化工试剂厂;考马斯亮蓝 G-250 溶液,美国 Fluka 公司;98%香菇多糖,上海源叶生物科技有限公司;注射用环磷酰胺,百特肿瘤制药有限公司;Elisa 试剂盒,南京建成生物工程研究所;其余试剂均为分析纯。

1.1.3 仪器

HH-8 数显恒温水浴锅,金坛市杰瑞尔电器有限公司;GL-22M 高速冷冻离心机,湖南赛特湘仪器有限公司;754 紫外分光光度计,上海光谱仪器有限公司;722 可见光光度计,上海精密科学仪器有限公司;JY92-II 超声细胞破碎仪,宁波新芝生物科技有限公司;KQ-300B 超声清洗仪,昆山超声仪器有限公司;JA5003N 电子天平,上海精科天美有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 环磷酰胺免疫抑制小鼠模型建立

参考杨旭^[13]的试验方法,适应性饲养 3 d 后,挑选出状态良好的 ICR 雄性小鼠 70 只,随机分为 7 组,分别为空白对照组(NC)、模型组(Model)、阳性对照组(PC)、红须腹菌酸多糖低/高剂量组(RPRR-S-L/H)、羧甲基红须腹菌酸多糖低/高剂量组(CM-RPRR-S-L/H),每组 10 只。适应性饲养后的第 1-3 d,向空白对照组试验小鼠腹腔注射 70 mg 生理盐水,其他 6 组小鼠均注射环磷酰胺 70 mg/kg bw/d(以小鼠体重计)。3 d 后,观察小鼠状态,若出现食欲缺乏、精神萎靡等状况,则表示造模成功。模型建立成功后,每天上午固定同一时间段对各组实验小鼠进行灌胃处理,连续进行 14 d,实验过程中给予小鼠正常进水进食。末次给药 24 h 后,剔除已死亡的小鼠,每组选取 8 只,称重后,颈椎脱臼处死,取出肾脏、肝脏和心脏并用生理盐水漂洗,洗去血污后,称量各脏器重量,而后置于-20℃冰箱中储存,用以测定各种抗氧化指标。具体分组及给药情况如表 1 所示,其中,环磷酰胺(CY)用生理盐水配制,香菇多糖(LNT)、红须腹菌酸多糖(RPRR-S)、羧甲基红须腹菌酸多糖(CM-RPRR-S)均用蒸馏水配制。

表1 实验小鼠分组及具体给药情况
Table 1 Experimental mice group and specific administration

组别	腹腔注射(第1-3 d)	灌胃(第1-14 d)
NC	生理盐水	生理盐水
Model	70 mg CY/kg bw/d	生理盐水
PC	70 mg CY/kg bw/d	50 mg LNT/kg bw/d
RPRR-S-L	70 mg CY/kg bw/d	25 mg RPRR-S/kg bw/d
RPRR-S-H	70 mg CY/kg bw/d	100 mg RPRR-S/kg bw/d
CM-RPRR-S-L	70 mg CY/kg bw/d	25 mg CM-RPRR-S/kg bw/d
CM-RPRR-S-H	70 mg CY/kg bw/d	100 mg CM-RPRR-S/kg bw/d

1.2.2 脏器指数测定

脏器指数是指实验动物某一脏器的重量与其总体重的比值. 正常情况下, 动物脏器指数较为恒定, 经药物灌胃处理后, 脏器重量会有所变化, 进而导致脏器指数也随之改变. 将从1.2.1中取出清理完毕的肾脏、心脏、肝脏进行称重处理, 按如下公式计算脏器指数:

$$\text{脏器指数}(\%) = (\text{器官重量}/\text{体重}) \times 100\%. \quad (1)$$

1.2.3 脏器匀浆液制备

取小鼠肾脏, 用冰生理盐水漂洗, 除去污血, 滤纸拭干后准确称取0.2 g, 剪碎并加入1.8 mL的生理盐水中, 冰水浴中进行超声破碎(600 W, 10 s, 4次)后, 于4 °C条件下10 000 r/min离心10 min, 取上清液即为10%肾脏匀浆液. 10%肾脏匀浆液与饱和硫酸铵溶液按体积比为3:1混合, 在4 °C、2 500 r/min条件下离心10 min, 取上清液, 即可得小鼠肾脏粗酶液, 于4 °C低温环境下放置备用.

制备10%心脏、肝脏匀浆及粗酶液方法同上.

1.2.4 蛋白质含量测定

参考王新宇等^[14]的试验方法, 采用考马斯亮蓝G-250法测定蛋白质含量. 将1.2.3中制得的10%小鼠脏器匀浆液稀释为1%, 而后按照表2所示, 向各管中分别加入相应剂量的样品或试剂, 充分混合均匀, 静置10 min, 于595 nm处测定吸光值, 记录取平均值. 蛋白质含量计算公式为:

$$\text{蛋白质含量}(\text{mg prot}/\text{mL}) = \frac{\text{测定 OD 值} - \text{空白 OD 值}}{\text{标准 OD 值} - \text{空白 OD 值}} \times \text{标准管浓度} \times \text{测定前样品稀释倍数}. \quad (2)$$

表2 蛋白质含量测定中各管所加样品或试剂剂量

试剂	空白管	标准管	测定管
1%小鼠脏器匀浆液	0	0	0.05
蒸馏水	0.05	0	0
0.5 mg/mL的牛血清白蛋白标准溶液	0	0.05	0
考马斯亮蓝显色液	3	3	3

1.2.5 GSH含量测定

参考陆文蔚等^[15]的试验方法, 采用2-硝基苯甲酸(DNTB)法测定GSH含量. DTNB在pH 8.0条件下与巯基反应, 生成4-硝基苯硫酚化合物, 其离子呈黄色, 在412 nm处有强烈的吸收峰. 向样品中加入少量的DTNB, 在412 nm处测定生成物吸光值, 根据吸光值的大小即可求得样品中巯基的含量. 取1.2.3中制得的10%小鼠脏器匀浆液0.1 mL置于干净试管中作为测定管, 并设置空白组作对照, 每组作两组重复. 按照表3所示, 向各管中分别加入相应剂量的样品或试剂, 充分混合均匀, 室温下反应10 min后离心(3 500 r/min, 10 min), 取上清液于423 nm处测定吸光值, 记录取平均值. GSH含量的计算公式为:

$$10\% \text{小鼠脏器匀浆液 GSH 含量}(\mu\text{mol}/\text{g prot}) = \frac{\text{GSH 浓度} \times \text{样液体积} \times \text{稀释倍数}}{\text{蛋白质浓度}}. \quad (3)$$

表 3 GSH 含量测定中各管所加样品或试剂剂量

Table 3 The dose of sample or reagent added to each tube in the determination of GSH content

mL

试剂	测定管	空白管
上清液	0.1	0
2.5 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲溶液	0	0.1
DNTB 溶液	0.9	0.9

1.2.6 丙二醛(MDA)含量测定

参考张晓文等^[16]的试验,采用 TBA 比色法测定 MDA 含量. 该方法是基于 MDA 在较高温度及酸性环境中可与 TBA 发生反应,形成红色的 MDA-TBA 复合物,测定其在 532nm 波长处的吸光值. 取 1.2.3 中制得的 10%小鼠脏器匀浆液 0.2 mL 置于干净试管中作为测定管,并设置空白组与标准组,每组作两组重复. 按照表 4 所示,向各管中分别加入相应剂量的样品或试剂,充分混合均匀,37 °C 条件下避光水浴 1 h,冷却至室温,加入 1 mL 正丁醇吡啶混合液,离心(6 000 r/min, 10 min),取上清液. 空白管调零后,测定各管在 535 nm 处的吸光值,记录取平均值. MDA 含量计算公式为:

$$\text{MDA 含量 (nmol/mg prot)} = \frac{\text{测定 OD 值} - \text{空白 OD 值}}{\text{标准 OD 值} - \text{空白 OD 值}} \times \text{四乙氧基丙烷浓度} \div \text{取样量} \div \text{蛋白质浓度}. \quad (4)$$

表 4 MDA 含量测定中各管所加样品或试剂剂量

Table 4 The dose of sample or reagent added to each tube in the determination of MDA content

mL

试剂	空白管	标准管	测定管
10%小鼠脏器匀浆液	0	0	0.2
40 mmol/L 的四乙氧基丙烷	0	0.2	0
8%SDS	0.4	0.4	0.4
0.6%TBA	3	3	3
0.2 mol/L 乙酸盐缓冲溶液	3	3	3
蒸馏水	1.6	1.4	1.4

1.2.7 SOD 活性测定

参考 Callegari 等^[17]的实验,采用氮蓝四唑(NBT)光化还原法测定 SOD 活性. 该方法是依据 SOD 抑制 NBT 在光下的还原作用来确定酶活性大小. 在有氧化物质存在下,核黄素可被光还原,被还原的核黄素在有氧条件下极易再氧化而产生 O₂⁻, O₂⁻ 可将 NBT 还原为蓝色的甲腓,后者在 560 nm 处有最大吸收. 而 SOD 可清除 O₂⁻,从而抑制了甲腓的形成. 光还原反应后,反应液蓝色愈深,说明酶活性愈低,反之酶活性愈高. 据此可以计算出酶活性大小. 取 1.2.3 中制得的小鼠脏器粗酶液 0.02 mL 置于干净试管中作为测定管,并设置对照管,每组设两组重复.

按照表 5 所示,向各管中依次加入相应剂量的样品或试剂,充分混合均匀,日光下反应 25 min,对照管调零后,于 560 nm 处测定各管的吸光度,记录取平均值.

SOD 活性计算公式为:

$$\text{总 SOD 活力 (U/mg prot)} = \frac{(\text{对照 OD 值} - \text{测定 OD 值}) \times \text{样品测定前稀释倍数}}{\text{对照 OD 值} \times 50\% \times \text{样品蛋白质含量}}. \quad (5)$$

1.2.8 CAT 活性测定

参考王芳等^[18]的试验方法,采用紫外吸收法测定 CAT 活性. 取 1.2.3 中制得的脏器粗酶液 0.2 mL,置于干净试管中作为测定管,并用同体积的磷酸缓冲液(pH=7.8)作为对照管,每组设两组重复. 各管所加脏器粗酶液、磷酸缓冲液、蒸馏水如表 6 所示,添加完毕后,在 25 °C 水浴中预温 1-3 min,加入 H₂O₂ 溶液(剂量如表 6 所示),在对照管调零后迅速于 240 nm 处测定各管样品的吸光值,隔 1 min 再测定一次,记录并取平均值. CAT 活性计算公式为:

$$\text{CAT 活力 (U/mg prot)} = \frac{\text{初始 OD 值} - 1\text{minOD 值}}{0.1 \times \text{蛋白质含量}} \times \text{样品测定前稀释倍数}. \quad (6)$$

表 5 SOD 活性测定中各管所加样品或试剂剂量

Table 5 The dose of sample or reagent added to each tube in the SOD activity assay

mL

试剂	测定管	对照管
小鼠脏器粗酶液	20	0
130 mmol/L 甲硫氨酸	0.12	0.12
0.75 mmol/L NBT	0.12	0.12
0.1 mmol/L EDTA-Na ₂	0.12	0.12
0.02 mmol/L 核黄素	0.12	0.12
蒸馏水	0.1	0.1

1.2.9 GSH-Px 活性测定

参考张中林等^[19]的试验方法,采用 DNTB 法测 GSH-Px 活性. 取 1.2.3 中制得的脏器粗酶液 0.8 mL 置于干净试管中作为样品管,非酶管用同体积的蒸馏水代替,并设置空白管作对照,每组设置两组重复. 按照表 7 所示,向各管中依次加入相应剂量的小鼠脏器粗酶液、1 mmol/L GSH 标准溶液、蒸馏水后,在 37 ℃ 水浴中预温 5 min;加入相应剂量的 H₂O₂ 溶液后,在 37 ℃ 水浴中预温 3 min;加入相应剂量的偏磷酸沉淀液,在 3 500 r/min 的条件下离心 10 min,取上清液. 加入表 7 所示剂量的上清液、蒸馏水、偏磷酸沉淀液、Na₂HPO₄ 和 DNTB 显色剂,充分混合均匀后静置,准确反应 1 min 后,测定各管在 423 nm 处的吸光度. GSH-Px 活性计算公式为:

$$\text{GSH-Px 活力 (mg prot/mL)} = \frac{(\text{非酶管 OD 值} - \text{样品管 OD 值}) \times \text{样品测定前稀释倍数} \times A^*}{1 \text{ min} \times \text{蛋白质浓度}}, \quad (7)$$

式中, $A^* = \frac{\text{GSH 标准浓度}}{\text{GSH 标准光密度}}$.

表 6 CAT 活性测定中各管所加样品或试剂剂量

Table 6 The dose of sample or reagent added to each tube in the CAT activity assay mL

试剂	测定管	对照管
小鼠脏器粗酶液	0.2	0
磷酸缓冲液 (pH=7.8)	1.5	1.7
蒸馏水	1.0	1.0
H ₂ O ₂ 溶液	0.3	0.3

表 7 GSH-Px 活性测定中各管所加样品或试剂剂量

Table 7 The dose of sample or reagent added to each tube in the GSH-Px activity assay mL

试剂	样品管	非酶管	空白管
小鼠脏器粗酶液	0.8	0	0
1 mmol/L GSH 标准溶液	0.8	0.8	0
蒸馏水	0	0.8	0
H ₂ O ₂	0.4	0.4	0
偏磷酸沉淀液	4	4	0
上清液	4.0	4.0	0
蒸馏水	0	0	0.8
偏磷酸沉淀液	0	0	3.2
Na ₂ HPO ₄	5.0	5.0	5.0
DNTB 显色剂	1.0	1.0	1.0

1.3 数据统计分析

每个实验做两组重复,根据所得数据计算平均值和标准差,利用数据分析软件 (SPSS) 测定样本间的统计学差异,结果以 $\bar{X} \pm SD$ 表示.

2 结果与分析

2.1 红须腹菌酸多糖及其羧甲基酸多糖对免疫抑制型小鼠脏器指数的影响

脏器指数是指受试动物脏器重量与其体重的比值,在一定程度上能够反映机体的免疫情况. 从表 8 可知,经 CY 造模后,小鼠肾脏、心脏、肝脏中模型组的脏器指数较空白对照组明显偏低,且呈显著性差异 ($P < 0.01$),表明造模成功. 与模型组相比,RPRR-S 和 CM-RPRR-S 低/高剂量组肾脏指数分别上升了 9.77%、15% 和 14.66%、20.93%;心脏指数分别上升了 10.64%、14.89% 和 17%、19.14%,其中,CM-RPRR-S-H 组差异显著 ($P < 0.01$);肝脏指数分别上升了 8.4%、10.69% 和 11.96%、21.12%,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$). 随着多糖浓度增加,RPRR-S 和 CM-RPRR-S 各剂量组肾脏、心脏、肝脏指数也不断增加,呈剂量依赖关系. 在 100 mg/kg 多糖浓度下,CM-RPRR-S-H 组肾脏、心脏、肝脏指数上升最为显著,趋近于阳性对照组水平 ($P < 0.05$).

综上所述,红须腹菌酸多糖能有效提高 CY 诱导的免疫抑制型小鼠肾脏指数、心脏指数和肝脏指数,在一定程度上保护并恢复萎缩的器官,其保护作用随着多糖浓度的增加而增强,其中,CM-RPRR-S 的生物活性高于 RPRR-S.

表 8 红须腹菌酸多糖及其羧甲基酸多糖对免疫抑制型小鼠脏器指数的影响($\bar{X}\pm SD, n=8$)
Table 8 Effect of RPRR-S and CM-RPRR-S on viscera index in immunosuppressive mice($\bar{X}\pm SD, n=8$)

组别	肾脏指数/%	心脏指数/%	肝脏指数/%
NC	0.927 6±0.16 ^{aA}	0.58±0.12 ^{aA}	4.86±0.23 ^{aA}
Model	0.755 3±0.11 ^{bB}	0.47±0.07 ^{bB}	3.93±0.15 ^{bB}
PC	0.911 1±0.14 ^{abA}	0.56±0.03 ^{aA}	4.69±0.18 ^{abA}
RPRR-S-H	0.868 5±0.09 ^{acdAD}	0.54±0.08 ^{acdAD}	4.35±0.15 ^{acdAD}
RPRR-S-L	0.829 1±0.07 ^A	0.52±0.15 ^{aA}	4.26±0.27 ^{aA}
CM-RPRR-S-H	0.913 4±0.17 ^{aeAE}	0.56±0.04 ^{aeAE}	4.76±0.21 ^{aeAE}
CM-RPRR-S-L	0.866 0±0.13 ^{adAD}	0.55±0.11 ^{adAD}	4.40±0.11 ^{adAD}

注:不同小写字母表示在 5%水平上差异显著($P<0.05$),不同大写字母表示在 1%水平上差异显著($P<0.01$),下同。

2.2 蛋白质含量测定结果

不同组别小鼠的肾脏、心脏和肝脏蛋白质含量如表 9 所示。

表 9 蛋白质含量测定($\bar{X}\pm SD, n=8$)
Table 9 Determination of protein content($\bar{X}\pm SD, n=8$)

组别	肾脏蛋白质含量/(mg prot/mL)	心脏蛋白质含量/(mg prot/mL)	肝脏蛋白质含量/(mg prot/mL)
NC	1.15±0.01 ^{bcB}	1.19±0.01 ^{bb}	1.10±0.01 ^{cdBC}
Model	1.41±0.05 ^{aA}	1.55±0.19 ^{aA}	1.40±0.03 ^{aA}
PC	1.05±0.10 ^{cdB}	1.10±0.04 ^{bcBC}	1.08±0.01 ^{cdBC}
RPRR-S-H	1.01±0.01 ^{deBC}	0.94±0.07 ^{cdCD}	1.06±0.01 ^{dbc}
RPRR-S-L	1.20±0.01 ^{bb}	1.23±0.03 ^{bb}	1.17±0.01 ^{bbc}
CM-RPRR-S-H	0.88±0.04 ^{cd}	0.80±0.05 ^{cd}	0.97±0.05 ^{cdBC}
CM-RPRR-S-L	1.07±0.07 ^{bcBC}	1.13±0.23 ^{bcBC}	1.13±0.13 ^{bcB}

2.3 红须腹菌酸多糖及其羧甲基酸多糖对免疫抑制型小鼠脏器 GSH 含量的影响

GSH 作为重要的抗氧化剂之一,是哺乳动物体内含量最丰富的硫代三肽,具有清除体内自由基、抵御细胞内毒素等生理功能^[20]。如图 1 所示,经 CY 造模后,小鼠肾脏、心脏、肝脏中模型组的 GSH 含量较空白对照组明显降低,且呈显著性差异($P<0.01$),表明造模成功。与模型组相比较,小鼠肾脏、心脏、肝脏中 RPRR-S 和 CM-RPRR-S 低/高剂量组 GSH 含量均明显升高,其中,CM-RPRR-S-H 组上升最为显著($P<0.01$),较模型组分别升高了 18.78、15.47、18.61 $\mu\text{mol/g prot}$ (按肾脏、心脏、肝脏顺序比较);RPRR-S-H 组次之($P<0.05$)。在相同剂量下,CM-RPRR-S 效果优于 RPRR-S,伴随多糖浓度的增加,3 种脏器中 RPRR-S 和 CM-RPRR-S 各剂量组的 GSH 含量也不断增加,呈一定的剂量依赖关系,其中,小鼠肾脏、心脏、肝脏中 CM-RPRR-S-H 组 GSH 含量均趋近于阳性对照组水平($P>0.01$)。

综上所述,RPRR-S 能明显提高小鼠肾脏、心脏及肝脏中的 GSH 含量,增强机体的抗氧化性能,在一定程度上对 CY 造成的免疫抑制具有解除作用,其生物效能随着浓度的增加而增强,其中,CM-RPRR-S 的生物活性高于 RPRR-S。

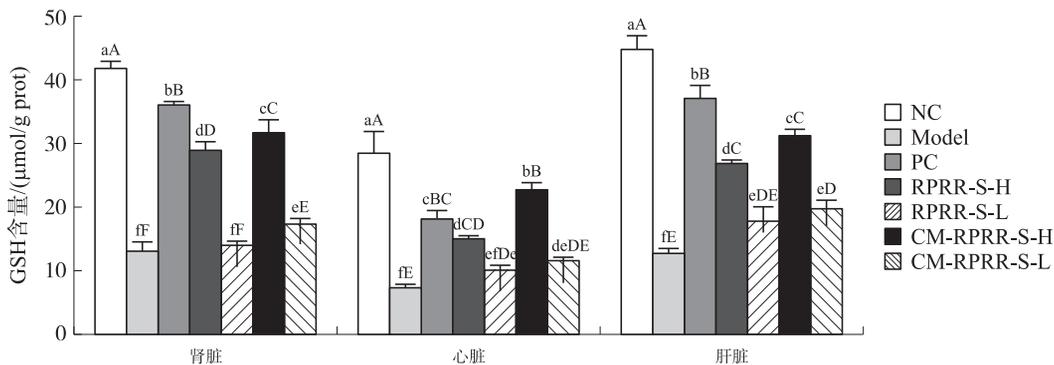


图 1 红须腹菌酸多糖及其羧甲基酸多糖对免疫抑制型小鼠脏器 GSH 含量的影响
Fig. 1 Effect of RPRR-S and CM-RPRR-S on GSH content in immunosuppressive mice

2.4 红须腹菌酸多糖及其羧甲基酸多糖对免疫抑制型小鼠脏器 MDA 含量的影响

MDA 是由自由基攻击多不饱和脂肪酸而产生的,其测定可以作为氧化损伤的生物标志物^[21]。由图 2 可知,经 CY 造模后,其小鼠肾脏、心脏、肝脏中模型组的 MDA 含量较空白对照组明显偏高,且呈显著性差异($P<0.01$),表明造模成功。与模型组相比,小鼠肾脏中 RPRR-S 和 CM-RPRR-S 低/高剂量组的 MDA 含量分别降低了 25%、36%和 35%、53%;心脏中 RPRR-S 和 CM-RPRR-S 低/高剂量组的 MDA 含量分别降低了 38%、47%和 44%、54%;肝脏中 RPRR-S 和 CM-RPRR-S 低/高剂量组中 MDA 含量分别降低了 25%、37%和 38%、56%,差异具有统计学意义($P<0.01$)。伴随着多糖剂量的增加,RPRR-S 和 CM-RPRR-S 各剂量组的 MDA 含量也不断减少,呈剂量依赖关系。在 100 mg/kg 多糖浓度下,CM-RPRR-S 组与 RPRR-S 组在肾脏 MDA 含量上有显著差异($P<0.01$),其中 CM-RPRR-S-H 组中的 MDA 含量趋近于阳性对照组水平($P>0.05$);CM-RPRR-S 组与 RPRR-S 组在心脏 MDA 含量上有显著差异($P<0.05$),且 CM-RPRR-S-H 组中的 MDA 含量接近于阳性对照组水平($P<0.05$);CM-RPRR-S 组与 RPRR-S 组在肝脏 MDA 含量上有显著差异($P<0.01$),且 CM-RPRR-S-H 组中的 MDA 含量接近于阳性对照组水平($P>0.05$)。

综上所述,两种多糖均能显著降低小鼠肾脏、心脏以及肝脏中 MDA 含量,避免机体内 MDA 积累,在一定程度上保护机体免受损伤,其保护作用与多糖浓度呈正相关,其中,CM-RPRR-S 生物活性高于 RPRR-S。

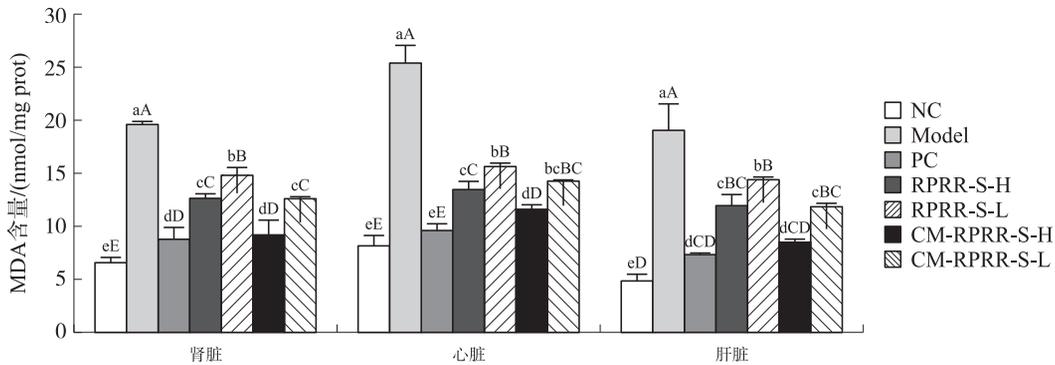


图 2 红须腹菌酸多糖及其羧甲基酸多糖对免疫抑制型小鼠脏器 MDA 含量的影响

Fig. 2 Effect of RPRR-S and CM-RPRR-S on MDA content in immunosuppressive mice

2.5 红须腹菌酸多糖及其羧甲基酸多糖对免疫抑制型小鼠脏器 SOD 活性的影响

SOD 是人体内重要的酶促抗氧化剂之一,能通过催化 O_2^- 转化为 H_2O_2 和 O_2 来防止细胞损伤^[22]。如图 3 所示,经 CY 造模后,3 种脏器中,模型组 SOD 活性较空白对照组均明显偏低,且两组数据之间呈显著性差异($P<0.01$),表示造模成功。由图 3 可知,RPRR-S 和 CM-RPRR-S 各剂量组 3 种脏器中的 SOD 活性较模型组均明显升高($P<0.01$),其中,CM-RPRR-S-H 组上升最为显著($P<0.01$),较模型组分别升高了 52.65、35.76、54.78 U/mg prot(按肾脏、心脏、肝脏顺序比较)。与 RPRR-S 各剂量组相比,3 种脏器中 CM-RPRR-S 各剂量组中 SOD 活性均有所上升。伴随着多糖浓度的增加,RPRR-S 和 CM-RPRR-S 各剂量组 3 种脏器 SOD 活性也不断

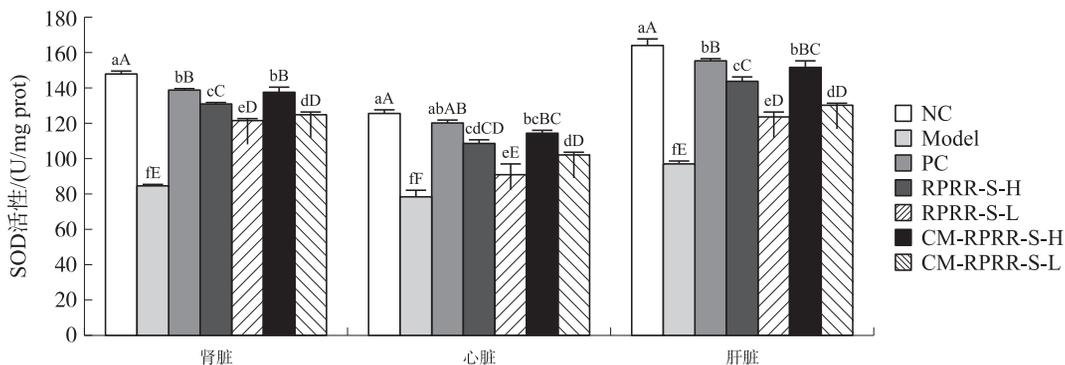


图 3 红须腹菌酸多糖及其羧甲基酸多糖对免疫抑制型小鼠脏器 SOD 活性的影响

Fig. 3 Effect of RPRR-S and CM-RPRR-S on SOD activity in immunosuppressive mice

增加,呈一定的剂量依赖性,其中,3 种脏器中 CM-RPRR-S-H 组的 SOD 活性较阳性对照组水平均无显著性差异($P>0.05$).

综上所述,两种多糖均能显著提高小鼠肾脏、心脏以及肝脏中的 SOD 活性,增强 SOD 清除自由基能力,保护机体细胞免受损伤,其保护作用随着浓度的增加而增强.此外,羧甲基化结构修饰可有效提高多糖的生物活性,使其更好地发挥抗氧化作用.

2.6 红须腹菌酸多糖及其羧甲基酸多糖对免疫抑制型小鼠脏器 CAT 活性的影响

CAT 是一类催化底物发生氧化还原反应的酶,能清除机体内自由基并催化 H_2O_2 ,从而减少机体损伤^[23].由图 4 可知,经 CY 造模后,小鼠肾脏、心脏、肝脏中模型组的 CAT 活性较空白对照组明显偏低,且呈显著性差异($P<0.01$),表明造模成功.与模型组相比,小鼠肾脏中 RPRR-S 和 CM-RPRR-S 低/高剂量组的 CAT 活性分别提升了 36、62.76 和 41.96、66.9 U/mg prot,心脏中 RPRR-S 和 CM-RPRR-S 低/高剂量组的 CAT 活性分别提升了 38.01、60.48 和 43.79、68.77 U/mg prot,肝脏中 RPRR-S 和 CM-RPRR-S 低/高剂量组的 CAT 活性分别提升了 34.17、68.99 和 46.93、71.68 U/mg prot,差异具有统计学意义($P<0.01$).在 100 mg/kg 多糖浓度下,CM-RPRR-S 组与 RPRR-S 组在肾脏 CAT 活性上存在显著差异($P<0.01$),其中,小鼠肾脏、心脏、肝脏中 CM-RPRR-S-H 组中的 CAT 活性接近于阳性对照组水平($P<0.01$).

由图 4 可知,RPRR-S 可有效提高小鼠脏器中的 CAT 活性,增强机体清除自由基的能力,以保护机体免受损伤,且羧甲基化结构修饰可增强 RPRR-S 抗氧化作用.

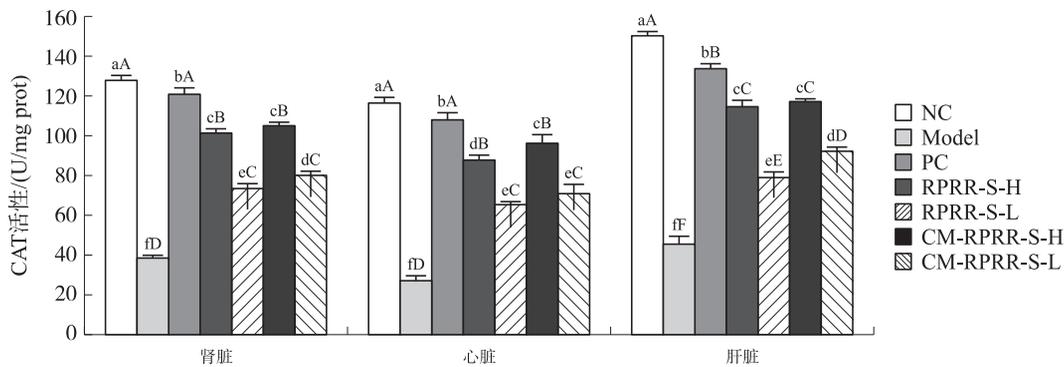


图 4 红须腹菌酸多糖及其羧甲基酸多糖对免疫抑制型小鼠脏器 CAT 活性的影响

Fig. 4 Effect of RPRR-S and CM-RPRR-S on CAT activity in immunosuppressive mice

2.7 红须腹菌酸多糖及其羧甲基酸多糖对免疫抑制型小鼠脏器 GSH-Px 活性的影响

GSH-Px 是抵抗细胞膜过氧化破坏的重要内源性防御系统,可以清除脂质过氧化物,以缓解机体因氧化造成的损伤^[21].如图 5 所示,经 CY 造模后,3 种脏器中模型组 GSH-Px 活性较空白对照组均明显降低,且差异显著($P<0.01$),表明造模成功.同模型组相比较,RPRR-S 和 CM-RPRR-S 各剂量组小鼠肾脏、心脏及肝脏中 GSH-Px 活性均有明显升高,其中 CM-RPRR-S-H 组上升最为显著($P<0.01$),较模型组分别升高了 12.27、10.56、9.33 mg prot/mL(按肾脏、心脏、肝脏顺序比较);RPRR-S-H 组次之($P<0.01$).伴随多糖浓度的增加,RPRR-S 和 CM-RPRR-S 低/高剂量组 3 种脏器中的 GSH-Px 含量也不断增加,呈一定的浓度依

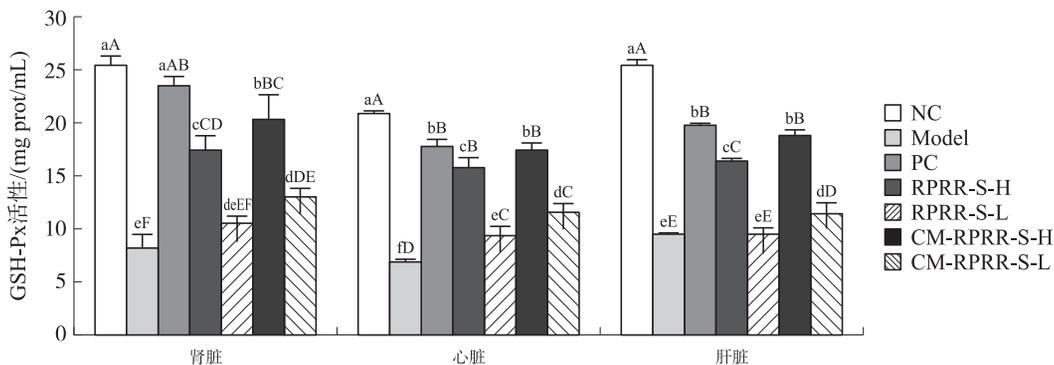


图 5 红须腹菌酸多糖及其羧甲基酸多糖对免疫抑制型小鼠脏器 GSH-Px 活性的影响

Fig. 5 Effect of RPRR-S and CM-RPRR-S on GSH-Px activity in immunosuppressive mice

赖关系. 与 RPRR-S 各剂量组相比,小鼠肾脏、心脏、肝脏 CM-RPRR-S 各剂量组 GSH-Px 活性均有所上升 ($P<0.05$),但较阳性对照组均无明显差异 ($P>0.05$).

综上所述,在多糖的干预下,小鼠肾脏、心脏及肝脏中的 GSH-Px 活性明显提高,增强了其清除自由基等抗氧化性能,且其生物活性随着多糖浓度的增加而增强,其中,CM-RPRR-S 的生物活性高于 RPRR-S.

3 结论

机体在新陈代谢时会产生大量高活性的自由基,活性自由基对于调节生命功能有积极作用,但过量自由基的积累会诱发不良反应,生成大量过氧化物,对组织器官和机体免疫系统造成损伤,导致机体免疫低下. 因此,提高器官抗氧化和免疫能力极为重要. 相关研究表明^[24],食用菌多糖具有多种生物活性,如抗氧化、抗衰老、免疫调节等,可清除体内多余自由基,增强机体抗氧化性能,提高抵抗力.

本研究以红须腹菌酸多糖(RPRR-S)和羧甲基红须腹菌酸多糖(CM-RPRR-S)为原材料,通过环磷酰胺诱导建立免疫抑制小鼠模型,测定试验小鼠肾脏、心脏、肝脏中的脏器指数、GSH 和 MDA 含量及各种抗氧化酶的活性(CAT、SOD、GSH-Px),研究红须腹菌酸多糖及其羧甲基酸多糖对免疫抑制型小鼠脏器抗氧化作用. 实验中,通过羧甲基取代多糖残基上的羟基,改变多糖的化学结构,不仅可以提高抗氧化性,还可以增强免疫活性^[25-26]. 通过腹腔注射 CY 造模后,同空白组相比,模型组小鼠各器官脏器指数明显偏低 ($P<0.01$);同模型组相比,RPRR-S 和 CM-RPRR-S 低/高剂量组均能明显提高小鼠的肾脏和肝脏指数,而各多糖剂量组中小鼠的心脏指数虽有所上升,但差异不显著 ($P>0.05$),发现 RPRR-S 能提高免疫抑制型小鼠肾脏、心脏以及肝脏指数,在一定程度上保护并恢复机体受损伤的器官,与李永慧^[23]猪苓多糖抗氧化能力研究结果一致. 通过体内抗氧化活性测定结果显示:经多糖饲喂后,RPRR-S 和 CM-RPRR-S 各剂量组 GSH 含量和 SOD、CAT、GSH-Px 活性较模型组均明显升高,而各组 MDA 含量较模型组则均下降 25% 及以上 ($P<0.01$),其中 CM-RPRR-S 低/高剂量组多糖活性均高于 RPRR-S 低/高剂量组. 这可能是 COO^- 的引入使多糖在羧甲基化修饰过程中发生降解的结果^[27],在羧甲基化的过程中水解产生各种多糖衍生产物,这些产物的抗氧化活性基团被充分暴露出来更容易与活性自由基结合,产生较好的清除效果,提高红须腹菌多糖的抗氧化活性^[28]. 以上结果表明,RPRR-S 和 CM-RPRR-S 具有较好的抗氧化活性,可有效提高免疫抑制型小鼠的抗氧化能力,对机体器官起到一定的保护作用.

免疫低下对健康的负面影响不可忽视. 本研究结果表明,RPRR-S 和 CM-RPRR-S 均可增强免疫抑制型小鼠机体抗氧化性能,尤以 CM-RPRR-S 效果更佳,其中高剂量组 CM-RPRR-S 可以达到阳性对照组水平. 该结果为红须腹菌多糖的应用提供了一定的理论依据.

[参考文献] (References)

- [1] BRODIN P, DAVIS M M. Human immune system variation[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2017, 17(1): 21-29.
- [2] 张智. 间充质干细胞对脑死亡大鼠肾脏免疫调节及移植后功能改善的研究[D]. 广州:暨南大学, 2014.
- [3] IANNAONE M, GIOVANNI S, MASANORI I, et al. Platelets mediate cytotoxic T lymphocyte-induced liver damage[J]. *Blood*, 2005, 106(11): 651.
- [4] 李玉, 李泰辉, 杨祝良, 等. 中国大型菌物资源图鉴[J]. 郑州:中原农民出版社, 2015: 702.
- [5] 李娜, 吕爽, 董建国, 等. 常见食用菌营养成分及风味物质分析[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(18): 441-448.
- [6] 周艳, 张聪, 赵丹丹. 食用菌多糖的结构修饰及其修饰后的抗肿瘤活性研究进展[J]. *中国农学通报*, 2020, 36(6): 89-92.
- [7] 张琳, 陈俊华, 王小雪, 等. 南瓜糖蛋白的分离纯化及其糖链结构鉴定[J]. *食品研究与开发*, 2017, 38(16): 61-65.
- [8] AYIMBILA F, KEAWSOMPONG S. Functional composition and antioxidant property of crude polysaccharides from the fruiting bodies of *Lentinus squarrosulus*[J]. *3 Biotech*, 2021, 11(1): 7.
- [9] ZHAO Y M, SONG J H, WANG J, et al. Optimization of cellulase-assisted extraction process and antioxidant activities of polysaccharides from *Tricholoma mongolicum* Imai[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016, 96(13): 4484-4491.
- [10] YU J, JI H Y, LIU C, et al. The structural characteristics of an acid-soluble polysaccharide from *Grifola frondosa* and its antitumor effects on H22-bearing mice [J]. *International Journal of Biological Macromolecules: Structure, Function and*

- Interactions, 2020, 158: 1288–1298.
- [11] KHATUA S, CHANDRA S, ACHARYA K. Hot alkali-extracted antioxidative crude polysaccharide from a novel mushroom enhances immune response via TLR-mediated NF- κ B activation; a strategy for full utilization of a neglected tribal food[J]. Journal of Food Biochemistry, 2020, 45(1): e13594.
- [12] 齐丽娟, 宋雁, 王伟, 等. 用环磷酰胺建立小鼠免疫抑制动物模型[J]. 卫生研究, 2010, 39(3): 313–315.
- [13] 杨旭. 灵芝多糖及其水解物对免疫抑制小鼠肠粘膜免疫功能的影响[D]. 西安: 陕西师范大学, 2019.
- [14] 王新宇, 刘振华, 李影丹, 等. 猴头菌浸膏多糖及蛋白质含量测定方法的比较[J]. 黑龙江畜牧兽医(上半月), 2018(11): 219–223.
- [15] 陆文蔚, 闫军, 唐立伟. 保健品中谷胱甘肽的快速测定[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(2): 186–189.
- [16] 张晓文, 姬娜. 通经草黄酮对小鼠体内丙二醛含量影响[J]. 陕西农业科学, 2017, 63(8): 19–20.
- [17] CALLEGARI D M, LIMA A M, FERREIRA BARROS N L, et al. Changes in transcript levels of cassava superoxide dismutase and catalase during interaction with *Phytophthium* sp.[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2021, 114(1): 101629.
- [18] 王芳, 符晨星, 陈家顺, 等. 过氧化氢酶的生物学功能及在动物中的应用[J]. 饲料研究, 2021, 44(5): 126–129.
- [19] 张中林, 郑剑玲, 李岩, 等. DTNB法对食用真菌谷胱甘肽过氧化物酶的检测[J]. 辽宁医学院学报, 2011, 32(2): 117–118.
- [20] 马志英. 还原型谷胱甘肽辅助治疗 COPD 的效果及对血清炎症因子、血浆渗透压的影响[J]. 中外医学研究, 2021, 19(12): 23–25.
- [21] 陆文娟. 干巴菌多糖对小鼠急性酒精肝损伤的保护作用研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2016.
- [22] 魏婧, 徐畅, 李可欣, 等. 超氧化物歧化酶的研究进展与植物抗逆性[J]. 植物生理学报, 2020, 56(12): 2571–2584.
- [23] 李永慧. 猪苓多糖对小鼠免疫功能及抗氧化能力的影响研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2017.
- [24] 金茜, 朱彬, 罗宿星, 等. 食用菌多糖生物活性的研究进展[J]. 遵义师范学院学报, 2010, 12(4): 75–78.
- [25] 许春平, 姚延超, 白家峰, 等. 枸杞多糖的羧甲基化修饰及抗氧化性能[J]. 河南科技大学学报(自然科学版), 2021, 42(3): 85–89.
- [26] 马群. 唐古特白刺多糖提取、修饰及免疫活性研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2018.
- [27] 罗婷. 苹果渣多糖的羧甲基化修饰及其抗氧化活性研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2019.
- [28] 周际松, 汪芷玥, 汤凯, 等. 羧甲基化茯苓多糖的抗氧化性分析[J]. 中国食品添加剂, 2020, 31(7): 120–125.

[责任编辑: 严海琳]