

乙醇分级沉淀的樟芝多糖对于小鼠急性肝损伤的保护作用

杨毅, 官俏兵, 张晓玲, 郭丽, 韩晨阳* (嘉兴市第二医院, 浙江 嘉兴 314001)

摘要: 目的 研究不同浓度乙醇沉淀获得的樟芝多糖对于急性肝损伤小鼠的保肝作用。方法 采用不同浓度的乙醇沉淀获得樟芝多糖, 建立 *D*-氨基半乳糖的急性肝损伤小鼠, Elisa 法检测各组血清的谷丙转氨酶(ALT), 谷草转氨酶(AST), 肿瘤坏死因子(TNF- α)、白介素-6(IL-6)、白介素-10(IL-10)的表达以及肝组织中 SOD、CAT、GSH-Px、GSH 的表达, 肝脏 HE 染色检查组织病理, qPCR 检测肝组织中 Bcl-2、Bax、Caspase-3 的 mRNA 的表达。确定樟芝多糖中对于小鼠急性肝损伤有效的部分。结果 樟芝多糖的各浓度的乙醇沉淀物均有一定的保肝作用, 其中 90%乙醇沉淀的多糖对于小鼠模型 ALT、AST 的含量具有显著的降低作用且优于其他组多糖($P<0.05$)。4 种多糖可以显著降低血清中肿瘤坏死因子(TNF- α)、白介素-6(IL-6)、和肝组织中 Bax、Caspase-3mRNA 的表达, 提高白介素-10(IL-10)和肝组织中 SOD、CAT、GSH-Px、GSH 蛋白表达以及 Bcl-2mRNA 的表达($P<0.05$)。且 PW90 多糖效果较好。结论 不同浓度乙醇沉淀的樟芝多糖对于急性肝损伤有着一定的保护作用, 90%乙醇沉淀获得的多糖保肝作用优于其他浓度乙醇沉淀获得的多糖。

关键词: 樟芝多糖; 急性肝损伤; 乙醇沉淀

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2017)11-1530-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.11.006

引用本文: 杨毅, 官俏兵, 张晓玲, 等. 乙醇分级沉淀的樟芝多糖对于小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(11): 1530-1534.

Protective Effect of Polysaccharides from Ethanol Precipitation in *Antrodia Cinnamomea* on Acute Liver Injury in Mice

YANG Yi, GUAN Qiaobing, ZHANG Xiaoling, GUO Li, HAN Chenyang* (The Second Hospital of Jiaxing, Jiaxing 314001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the protective effect of polysaccharides from different concentrations of ethanol on acute liver injury in mice. **METHODS** Polysaccharide was obtained by ethanol precipitation at different concentrations, Establishment of acute liver injury mice induced by *D*-Galactosamine, Elisa method for detection of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase(AST), tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin-6(IL-6), interleukin-10(IL-10) expression in serum and SOD, CAT, GSH-Px, GSH expression in liver. Liver HE staining was used to examine histopathology. The expression of Bcl-2, Bax and Caspase-3 mRNA in liver tissue was detected by qPCR In order to determine the effective part of polysaccharide on acute liver injury in mice. **RESULTS** Each concentration ethanol precipitate of the polysaccharide precipitated of *antrodia camphorata* polysaccharide had hepatoprotective effect. 90% alcohol significantly reduced ALT, AST in mice and the effect was better than the other groups ($P<0.05$). Four kinds of polysaccharides could significantly reduce the expression of tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), in serum and Bax and Caspase-3mRNA in liver tissue, improve the interleukin-10 (IL-10) expression in serum and SOD, CAT, GSH-Px, GSH protein expression, Bcl-2mRNA in liver tissue ($P<0.05$). The effect of PW90 polysaccharide was better. **CONCLUSION** Different concentrations of ethanol precipitation of the polysaccharide has a protective effect on acute liver injury, 90% ethanol precipitated polysaccharide was better than other ethanol concentration.

KEY WORDS: *Antrodia Cinnamomea* polysaccharides; acute liver injury; ethanol precipitation

樟芝是台湾独有的一种多孔菌类食用/药用真菌, 其中富含丰富的多糖、三萜、腺苷、氨基酸、蛋白质类物质^[1-4]。与传统的灵芝相比, 樟芝中的多糖和三萜含量远远高于灵芝, 有着很好的研究价值和应用前景。樟芝对于酒精性肝病, 药源性

肝损伤等有着很好的治疗效果, 但是对于其确切的作用成分目前尚未明确, 鉴于樟芝中多糖成分高达 30%以上^[5-6], 为主要的活性成分。本研究基于樟芝多糖有着对抗急性肝损伤的作用这一假说进行研究, 探究其保肝护肝的有效多糖成分, 为该

作者简介: 杨毅, 男, 副主任药师 Tel: 13967351048 E-mail: wasd911@126.com
13736496736 E-mail: 691513770@qq.com

*通信作者: 韩晨阳, 男, 硕士, 药师 Tel:

种天然菌类的药理研究和新药开发提供理论支持。

1 材料

1.1 药物

樟芝粉末(杭州众芝康股份有限公司, 批号: 20160214)已过 50 目筛。对照药物: 联苯双酯(上海信谊天平药业有限公司, 批号: 20151209)。乙醇、三氟乙酸、氯仿(国药试剂股份有限公司, 纯度>99%); 双蒸水(实验室自制)。

1.2 试剂

谷丙转氨酶(ALT)试剂盒、谷草转氨酶(AST)试剂盒、肿瘤坏死因子(TNF- α)试剂盒、白介素-6(IL-6)试剂盒、白介素-10(IL-10)试剂盒(南京建成生物工程研究所, 批号分别为 112341、102145、145212、121147、101124); D-氨基半乳糖(sigma 公司, 批号: 85142); SOD、CAT、GSH-Px、GSH 的 Elisa 试剂盒(凯基生物技术有限公司, 批号依次为 KGT00100-1、KGT017、KGT014、KGT006); cDNA 试剂盒(凯基生物技术有限公司, 批号: KGA1311); 实时定量 PCR 试剂盒/SYBR Green Realtime PCR Master Mix(sinobio, 批号: E090); 总 RNA 提取试剂盒(TRIZol 法)(BioTeKe 公司, 批号: RP2041)。

1.3 动物

清洁级小鼠 70 只, ♀♂各半, 体质量(20 $\pm$ 5)g, 购置于浙江中医药大学动物实验中心[实验动物许可证号: SCXK(浙)2013-0184], 小鼠分笼饲养, 每笼 6 只。动物实验室温度为 20~25 $^{\circ}\text{C}$, 湿度为 (70 $\pm$ 5)%, 依据国家标准啮齿类动物干燥饲料喂养, 大鼠活动自由、摄食自由。

1.4 仪器

7020 全自动生化仪(日立公司); ME-204 电子天平(梅特勒-托里公司)。

2 方法

2.1 樟芝多糖的提取

100 g 樟芝粉末加入 500 mL 双蒸水, 80 $^{\circ}\text{C}$ 回流提取 2 次, 每次 2 h。合并滤液后浓缩至 150 mL, 加入 3 倍体积的乙醇混匀后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下静置 12 h。抽滤获得沉淀。沉淀溶于 100 mL 热水, 采用 Sevag 方法脱蛋白 5 次, 调节乙醇浓度为 90%, 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下静置 12 h, 获得第一部分沉淀记为 PW90, 以此类推分别获得 70%乙醇沉淀多糖记为 PW70、50%乙醇沉淀获得的多糖记为 PW50 和 30%乙醇沉淀获得的多糖记为 PW30 多糖。采用硫

酸-蒽酮法测定总多糖, BCA 法测定总蛋白含量。

2.2 动物的分组

采用 D-氨基半乳糖构建急性肝损伤小鼠, 取清洁级小鼠 70 只, 适应性饲养 1 周, 均给予基础饲料, 饮水、活动自由。1 周后随机分为正常对照组(健康小鼠)、模型组、联苯双酯组、实验组(PW90 组、PW70 组、PW50 组和 PW30 组), 实验组和联苯双酯组小鼠每天灌胃给药 2 次, 其中联苯双酯组给药剂量为(200 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 1 日 2 次, 每次 100 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、PW90 组、PW70 组、PW50 组和 PW30 组给药量均为 200 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 每次 100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (以多糖计), 而模型组 and 对照组小鼠每日给予等剂量的生理盐水灌胃 2 次, 连续 7 d, 末次给药后, 模型组、联苯双酯组和实验组小鼠腹腔注射 1 000 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 D-氨基半乳糖的生理盐水溶液, 正常对照组给予等剂量的生理盐水。

2.3 检测指标

在上述各组小鼠经过干预的 24 h 后取眼内眦静脉丛取血 0.5 mL, 3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取血清, 按试剂盒操作要求测定谷丙转氨酶(ALT), 谷草转氨酶(AST), 肿瘤坏死因子(TNF- α)、白介素-6(IL-6)、白介素-10(IL-10)。

取右叶肝脏, 以 10%甲醛溶液固定, 石蜡包埋, HE 染色, 做病理组织学检查。

取肝组织 2 份, 每份 100 mg, 用无菌剪刀剪成小块, 其中一份加入 10 倍量的生理盐水, 冰浴匀浆后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\times g$ 离心 20 min, 得到上清液, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存, 待处理完所有样品后按照试剂盒操作检测 SOD、CAT、GSH-Px、GSH 的表达。

第 2 份肝组织加入液氮研磨后, 按照 TRIZol 试剂盒操作, 提取组织中总 RNA, UV 检测总浓度, 定量后按照 AMV First cDNA Synthesis Kit 试剂盒方法进行反转录, 得到的 cRNA 在-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 最后利用 qPCR 检测 Bcl-2、Bax、Caspase-3 mRNA 的表达。每个样本设置 3 个复孔, 计算平均 Ct 值, 设置阴性对照。采用 $2^{-(\Delta\Delta\text{Ct})}$ 计算拷贝数, 并且以 GAPDH 为内参。引物设计见表 1。

2.4 数据处理和统计

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 17.0 进行统计学处理, 组间比较 $P < 0.05$ 视为差异有统计学意义。

表 1 引物设计

Tab. 1 Primer design

基因名称	引物名称	序列(5' -3')
GAPDH	F primer	GGTTGTCTCCTGCGACTTCA
	R primer	TGGTCCAGGTTTCTTACTCC
Bcl-2	F primer	TGTCACAGAGGGGCTACGAGT
	R primer	TCAGGCTGGAAGGAGAAGATG
Bax	F primer	GATGAACTGGACAGCAATATGG
	R primer	GCAAAGTAGAAGAGGGCAACC
Caspase-3	F primer	CTGACTGGAAAGCCGAAACTC
	R primer	CTGCAAAGGGACTGGATGAAC

3 结果

3.1 不同乙醇沉淀的樟芝多糖和糖蛋白含量的结果

通过硫酸-蒽酮法测定樟芝多糖的含量, 结果 PW90, PW70, PW50 和 PW30 的多糖含量分别为 52.8%, 60.5%, 55.7% 和 63.6%。通过 BCA 法测定糖蛋白的含量, 结果 PW90, PW70, PW50 和 PW30 中蛋白含量分别为 21.7, 18.4, 20.8, 26.4 mg·g⁻¹。

3.2 樟芝多糖对于急性肝损伤小鼠血清 ALT 和 AST 的影响

与正常组比较, 模型组 ALT 和 AST 水平明显增高($P<0.01$), 说明急性肝损伤小鼠模型构建成功。与模型组相比, 联苯双酯组、PW90 组、PW70 组、PW50 组和 PW30 组中 ALT 和 AST 水平显著降低($P<0.01$); PW90 组 ALT 和 AST 水平显著低于 PW70 组、PW50 组和 PW30 组($P<0.05$), 而 PW70 组和 PW50 组和 PW30 组之间差异不具有统计学意义。结果见表 2。

表 2 不同乙醇沉淀的樟芝多糖对于小鼠血清 ALT、AST 的影响($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Effects of different ethanol precipitated polysaccharides on serum ALT and AST in mice($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹
正常组	—	75.52±6.24 ³⁾⁴⁾	180.47±24.52 ³⁾⁴⁾
模型组	—	97.52±5.41 ²⁾⁴⁾	245.21±37.85 ²⁾⁴⁾
联苯双酯	100	78.54±11.24 ¹⁾³⁾⁴⁾	205.44±41.22 ²⁾³⁾⁴⁾
PW90	100	82.24±8.13 ²⁾³⁾	213.54±24.57 ²⁾³⁾
PW70	100	90.51±9.43 ²⁾³⁾⁴⁾	221.52±31.52 ²⁾³⁾⁴⁾
PW50	100	91.05±7.61 ²⁾³⁾⁴⁾	223.04±28.41 ²⁾³⁾⁴⁾
PW30	100	89.75±10.24 ²⁾³⁾⁴⁾	219.76±30.11 ²⁾³⁾⁴⁾

注: 与正常组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ³⁾ $P<0.01$; 与 PW90 组比较, ⁴⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with the normal group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with the model group, ³⁾ $P<0.01$; compared with group PW90, ⁴⁾ $P<0.05$ 。

3.3 樟芝多糖对于急性肝损伤小鼠血清 TNF- α 、IL-6、IL-10 的影响

与正常组比较, 模型组中 TNF- α 、IL-6 水平明显增高, IL-10 水平显著降低($P<0.01$); 与模型组相比, 联苯双酯组、PW90 组、PW70 组、PW50 组和 PW30 组均可以显著降低 TNF- α 、IL-6 水平, 升高 IL-10 的水平($P<0.01$); 并且 PW90 中 TNF- α 、IL-6 水平显著低于 PW70 组、PW50 组和 PW30 组($P<0.05$ 或 $P<0.01$), IL-10 的水平显著高于 PW70 组、PW50 组和 PW30 组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见表 3。

表 3 不同乙醇沉淀的樟芝多糖对于小鼠血清 TNF- α 、IL-6、IL-10 的影响($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Effects of different ethanol precipitated polysaccharides on serum TNF- α , IL-6 and IL-10 in mice with acute liver failure($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	TNF- α /pg·mL ⁻¹	IL-6/pg·mL ⁻¹	IL-10/pg·mL ⁻¹
正常组	—	22.11±11.12 ²⁾⁴⁾	18.21±4.15 ²⁾⁴⁾	38.12±8.13 ²⁾⁴⁾
模型组	—	98.52±21.73 ¹⁾⁴⁾	63.51±7.41 ¹⁾⁴⁾	18.47±7.41 ¹⁾⁴⁾
联苯双酯	100	48.13±14.51 ¹⁾²⁾⁴⁾	27.10±10.21 ¹⁾²⁾⁴⁾	72.63±11.45 ¹⁾²⁾⁴⁾
PW90	100	57.34±12.87 ¹⁾²⁾	34.51±9.21 ¹⁾²⁾	62.47±12.47 ¹⁾²⁾
PW70	100	60.21±13.13 ¹⁾²⁾³⁾	37.15±8.73 ¹⁾²⁾⁴⁾	60.76±10.79 ¹⁾²⁾³⁾
PW50	100	73.12±18.54 ¹⁾²⁾⁴⁾	48.74±10.43 ¹⁾²⁾⁴⁾	47.63±5.41 ¹⁾²⁾⁴⁾
PW30	100	71.12±21.54 ¹⁾²⁾⁴⁾	50.12±9.11 ¹⁾²⁾⁴⁾	50.12±7.15 ¹⁾²⁾⁴⁾

注: 与正常组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.01$; 与 PW90 组比较, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with the normal group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.01$; compared with group PW90, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$ 。

3.4 樟芝多糖对于急性肝损伤小鼠肝脏病理的变化

肝组织 HE 染色进行病理学检查, 正常组的肝脏结构正常, 未见细胞的变形坏死, 而模拟组的病变区域可见肝细胞的水肿和坏死, 联苯双酯组和多糖组的小鼠肝脏病理显示水肿以及坏死的程度明显低于模型组。结果见图 1。

3.5 樟芝多糖对于小鼠肝脏组织 SOD、CAT、GSH-Px、GSH 的表达影响

与对照组相比较, 模型组肝组织中 SOD、CAT、GSH-Px、GSH 的表达显著降低, 而 PW90、PW70、PW50 和 PW30 可以增加 SOD、CAT、GSH-Px、GSH 的表达, 与模型组比较具有显著性差异($P<0.01$), 组间比较发现, PW90 干预后的表达显著高于 PW70、PW50 和 PW30($P<0.01$)。这表

明 *D*-氨基半乳糖可以造成肝组织的氧化性损伤,降低相关抗氧化酶的表达,而樟芝多糖可以显著拮抗这种氧化损伤,提高抗氧化酶的表达水平。结果见表 4。

3.6 樟芝多糖对于肝组织中 Bcl-2、Bax、Caspase-3 mRNA 的表达影响

与正常组相比,模型组小鼠肝组织中 Bcl-2 表达显著降低,而 Bax 和 caspase-3 表达显著增高

($P<0.01$),表明 *D*-氨基半乳糖可以导致肝细胞的凋亡,破坏肝组织。而樟芝多糖干预后, PW90、PW70、PW50、PW30 均可以提高 Bcl-2 表达,降低 Bax 和 caspase-3 表达,且和模型组比较具有显著差异($P<0.05$)。组间比较发现, PW90 组降低 Bax 和 caspase-3 表达的能力优于其他 3 组($P<0.05$),而对于 Bcl-2 表达增高来看, 4 组多糖之间比较无显著性差异。结果见表 5。

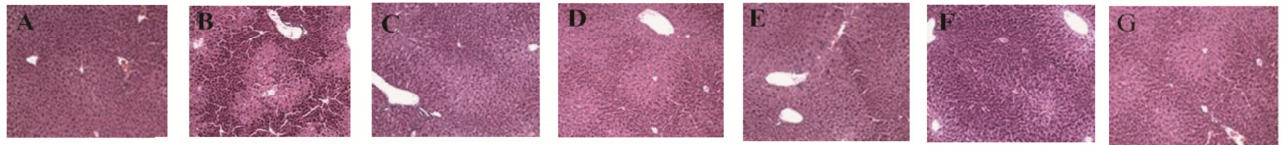


图 1 小鼠肝脏病理图

A-正常组; B-模型组; C-联苯双酯组; D-PW90 组; E-PW70 组; F-PW50 组; G-PW30 组。

Fig. 1 The picture of liver pathology

A-normal group; B-model group; C-bifendate group; D-PW90 group; E-PW70 group; F-PW50 group; G-PW30 group.

表 4 不同乙醇沉淀的樟芝多糖对于肝脏组织 SOD、CAT、GSH-Px、GSH 的表达影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab. 4 Effects of different ethanol precipitated polysaccharides on the expression of SOD, CAT, GSH-Px and GSH in liver tissues($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	SOD/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	CAT/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	GSH-Px/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	GSH/ $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$
正常组	—	75.21 $\pm$ 8.52 ³⁾⁵⁾	35.47 $\pm$ 5.21 ³⁾⁵⁾	195.32 $\pm$ 12.11 ³⁾⁵⁾	40.52 $\pm$ 2.54 ³⁾⁵⁾
模型组	—	40.53 $\pm$ 5.78 ²⁾⁵⁾	20.84 $\pm$ 4.78 ²⁾⁵⁾	114.58 $\pm$ 9.58 ²⁾⁵⁾	20.21 $\pm$ 3.74 ²⁾⁵⁾
联苯双酯	100	71.32 $\pm$ 9.21 ²⁾³⁾⁵⁾	37.51 $\pm$ 5.77 ¹⁾³⁾⁵⁾	213.21 $\pm$ 10.77 ²⁾³⁾⁵⁾	38.64 $\pm$ 4.11 ¹⁾³⁾⁴⁾
PW90	100	65.33 $\pm$ 8.77 ²⁾³⁾	32.85 $\pm$ 3.15 ²⁾³⁾	176.32 $\pm$ 15.21 ²⁾³⁾	36.85 $\pm$ 3.22 ²⁾³⁾
PW70	100	60.88 $\pm$ 6.21 ²⁾³⁾⁵⁾	28.57 $\pm$ 5.41 ²⁾³⁾⁵⁾	153.85 $\pm$ 17.34 ²⁾³⁾⁵⁾	37.03 $\pm$ 5.20 ²⁾³⁾⁵⁾
PW50	100	53.85 $\pm$ 10.11 ²⁾³⁾⁵⁾	27.12 $\pm$ 4.87 ²⁾³⁾⁵⁾	141.58 $\pm$ 15.74 ²⁾³⁾⁵⁾	32.51 $\pm$ 4.85 ²⁾³⁾⁵⁾
PW30	100	47.51 $\pm$ 9.21 ²⁾³⁾⁵⁾	24.25 $\pm$ 4.21 ²⁾³⁾⁵⁾	140.32 $\pm$ 15.36 ²⁾³⁾⁵⁾	30.88 $\pm$ 5.41 ²⁾³⁾⁵⁾

注: 与正常组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ³⁾ $P<0.01$; 与 PW90 组比较, ⁴⁾ $P<0.05$, ⁵⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with the normal group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with the model group, ³⁾ $P<0.01$; compared with group PW90, ⁴⁾ $P<0.05$, ⁵⁾ $P<0.01$.

表 5 不同乙醇沉淀的樟芝多糖对于肝组织中 Bcl-2、Bax、Caspase-3mRNA 的表达影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab. 5 Effects of different ethanol precipitated polysaccharides on the expression of Bcl-2, Bax and Caspase-3mRNA in liver tissues($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	Bcl-2	Bax	caspase-3
正常组	—	2.15 $\pm$ 0.21 ⁴⁾⁵⁾	0.38 $\pm$ 0.06 ⁴⁾⁵⁾	0.13 $\pm$ 0.06 ⁴⁾
模型组	—	1.03 $\pm$ 0.18 ²⁾⁵⁾	1.25 $\pm$ 0.10 ²⁾⁶⁾	1.14 $\pm$ 0.08 ²⁾⁶⁾
联苯双酯	100	1.86 $\pm$ 0.12 ¹⁾³⁾⁵⁾	0.41 $\pm$ 0.07 ⁴⁾⁵⁾	0.26 $\pm$ 0.10 ¹⁾³⁾⁵⁾
PW90	100	1.63 $\pm$ 0.13 ¹⁾³⁾	0.63 $\pm$ 0.06 ¹⁾³⁾	0.38 $\pm$ 0.07 ¹⁾³⁾
PW70	100	1.60 $\pm$ 0.20 ¹⁾³⁾	0.85 $\pm$ 0.07 ¹⁾³⁾⁵⁾	0.76 $\pm$ 0.08 ¹⁾³⁾⁵⁾
PW50	100	1.65 $\pm$ 0.17 ¹⁾³⁾	0.90 $\pm$ 0.08 ¹⁾³⁾⁵⁾	0.72 $\pm$ 0.06 ¹⁾³⁾⁵⁾
PW30	100	1.57 $\pm$ 0.13 ¹⁾³⁾	0.88 $\pm$ 0.09 ¹⁾³⁾⁵⁾	0.81 $\pm$ 0.08 ¹⁾³⁾⁵⁾

注: 与正常组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$; 与 PW90 组比较, ⁵⁾ $P<0.05$, ⁶⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with the normal group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with the model group, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$; compared with group PW90, ⁵⁾ $P<0.05$, ⁶⁾ $P<0.01$.

4 讨论

肝损伤的患者由于肝代谢功能的减退会导致内毒素的蓄积, 而内毒素的蓄积又可以加重肝损伤引起多种并发症^[7-10], *D*-氨基半乳糖是一种选择

性肝损伤的化学物质, 可以耗竭肝细胞中 UTP, 抑制 RNA 的合成, 促使肥大细胞释放组胺造成炎症损伤, 是目前研究肝损伤病理和药理常用的模型之一。

樟芝作为一种原产于台湾的多孔菌类由于富含大量的多糖,目前是研究的热点,研究表明樟芝多糖可以提高免疫力、抑制癌细胞增殖、改善心血管循环系统等^[11-12],在保肝护肝的研究中,陆震鸣等^[13]发现牛樟芝醇提物可以显著抑制肝损伤标志物天门冬氨酸氨基转移酶和丙氨酸氨基转移酶的水平,还可以降低肝组织中丙二醛浓度,上调 GSH 相关酶^[14]。在动物水平的研究发现,子实体和菌丝体提取物均可以对 CCl₄ 造成的急性肝损伤小鼠起到很好的干预作用,Chiang 等^[15]发现水提物对于 ALT 和 AST 的降低效果最为明显。

本研究主要考察利用乙醇分级沉淀获得的多糖对于急性肝损伤小鼠的保肝作用。通过实验获得了 4 种多糖,在成功构建急性肝损伤小鼠的前提下,利用联苯双酯作为阳性对照药物,在相同剂量的干预下发现 4 种多糖对于急性肝损伤均有着一一定的保护作用,通过肝酶 AST 和 ALT 的表达, PW90 组的多糖效果明显优于其他组,而血清中相关炎症因子的检测中发现,4 种多糖均可以降低炎症因子的表达,并升高 IL-10 的表达,IL-10 是公认的抑制炎症因子^[16],而有研究表明在急性肝损伤中 IL-10 起着重要的调节作用 TNF- α 、IL-6 是重要的炎症因子^[17],它们的表达上调可以促进急性肝损伤,所以亦有指示作用。在肝组织的相关检测发现,樟芝多糖对于抗氧化损伤的相关酶-SOD、CAT、GSH-Px、GSH 表达具有上调作用,而肝组织中细胞凋亡相关因子 Bax、Caspase-3mRNA 具有下调作用,这显示了樟芝多糖可以很好抵抗肝细胞凋亡,拮抗氧化损伤,且 PW90 的效果优于其他 3 种多糖。

综上:樟芝多糖对于进行肝损伤的保护作用是确切的,不同乙醇沉淀获得的多糖保肝作用是有差异的,PW90 显著优于 PW70、PW50 和 PW30,但是多糖中确切的构成还有待进一步研究。

REFERENCES

- [1] LU M C, EL-SHAZLY M, WU T Y, et al. Recent research and development of *Antrodia Cinnamomea* [J]. Pharmacol Ther, 2013, 139(2): 124-156.
- [2] 张东柱. 台湾特有珍贵药用真菌牛樟芝[J]. 食药菌, 2011, 19(1): 33-34.
- [3] DU Y C, WU T Y, CHANG F R, et al. Chemical profiling of the cytotoxic triterpenoid-concentrating fraction and characterization of ergostane stereo-isomer ingredients from *Antrodia camphorata* [J]. J Pharm Biomed Anal, 2012(58): 182-192.
- [4] WANG L P, LU X L, ZHAO Z J. Overview of *Antrodia camphorata* research[J]. Pharmacy Today(今日药), 2017, 27(2): 140-144.
- [5] YANG C M, ZHOU Y J, WANG R J, et al. Anti-angiogenic effects and mechanisms of polysaccharides from *Antrodia cinnamomea* with different molecular weights [J]. J Ethnopharmacol, 2009, 123(3): 407-412.
- [6] FA K N, YANG C M, CHEN P C, et al. Anti-metastatic effects of antrodan, the *Antrodia Cinnamomea* mycelia glycoprotein, in lung carcinoma cells [J]. Int J Biol Macromol, 2015(74): 476-482.
- [7] 何萍, 黄仁彬, 林军, 等. 乙肝转阴散对小鼠四氯化碳急性肝损伤的保护作用[J]. 广西医科大学学报, 2006, 23(5): 732-733.
- [8] LI C Q, LIU L L, ZHU Y T, et al. Protective effects of Qingganpaiduyin against hepatic immune injury induced by concanavalin A in mice [J]. World Chin J Dig(世界华人消化杂志), 2005, 13(11): 1283-1286.
- [9] HONG Y P, PANG X J. Protective effect of Jiejiu oral liquid on acute liver injury in mice [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药), 2017, 34(3): 352-357.
- [10] YUWEN L X, LIANG P, YUAN Y H, et al. One case of patient with drug-induced liver injury by tumor chemotherapy [J]. Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志), 2016, 35(9): 680-682.
- [11] KER Y B, PENG C C, CHANG W L, et al. Hepatoprotective bioactivity of the glycoprotein, antrodan, isolated from *Antrodia Cinnamomea* mycelia [J]. PLoS One, 2014, 9(4): e93191.
- [12] TSAI M C, SONG T Y, SHIH P H, et al. Antioxidant properties of water-soluble polysaccharides from *Antrodia Cinnamomea* in submerged culture [J]. Food Chem, 2007, 104(3): 1115-1122.
- [13] LU Z M, TAO W Y, XU H Y, et al. Further studies on the hepatoprotective effect of *Antrodia camphorata* in submerged culture on ethanol-induced acute liver injury in rats [J]. Nat Prod Res, 2011, 25(7): 684-695.
- [14] GOKILA V M, KUMAR K J, LIAO J W, et al. Antcin C from *Antrodia Cinnamomea* protects liver cells against free radical-induced oxidative stress and apoptosis *in vitro* and *in vivo* through Nrf2-dependent mechanism [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013(2013): 296082.
- [15] CHIANG C C, CHIANG B H. Processing characteristics of submerged fermentation of *Antrodia Cinnamomea* in airlift bioreactor [J]. Biochem Eng J, 2013(73): 65-71.
- [16] CHIU C H, PENG C C, KER Y B, et al. Physicochemical characteristics and anti-inflammatory activities of antrodan, a novel glycoprotein isolated from *Antrodia Cinnamomea* mycelia [J]. Molecules, 2013, 19(1): 22-40.
- [17] WU M D, CHENG M J, YECH Y J, et al. Inhibitory effects of maleimide derivatives from the mycelia of the fungus *Antrodia cinnamomea* BCRC 36799 on nitric oxide production in lipopolysaccharide (LPS) activated RAW264.7 macrophages [J]. Chem Biodivers, 2013, 10(3): 434-441.

收稿日期: 2017-04-06

(本文责编: 李艳芳)