

# 白块菌多糖理化特性分析及对运动疲劳小鼠 肝脏氧化损伤的保护作用

王焕燃<sup>1\*</sup>, 朱轶龙<sup>2</sup>, 孙萍<sup>3</sup>

(1. 郑州工商学院体育学院, 河南郑州 451400)

(2. 河南工程学院体育部, 河南郑州 451191)(3. 河南中医药大学药学院, 河南郑州 450046)

**摘要:** 探究白块菌多糖 (*Tuber panzhihuanense* Polysaccharide, TPP) 的理化特性, 研究其对运动疲劳小鼠肝脏氧化损伤的保护作用。采用超声辅助热水提取粗多糖, 柱层析分离纯化并测定其分子量和单糖组成, 构建小鼠运动疲劳模型, 测定相关生化指标以探究 TPP 对运动疲劳小鼠肝脏的保护作用。结果显示, TPP 分离纯化得到 TPP-A 和 TPP-B 两个主要组分, 其分子质量分别为 23.74 和 46.81 ku, TPP-A 含有甘露糖和葡萄糖, TPP-B 含有甘露糖、葡萄糖和葡萄糖醛酸; 与过度运动模型组 (E-CK) 相比, TPP 组明显减少了小鼠肝细胞中的炎症因子, 降低了血清中谷丙转氨酶、谷草转氨酶水平以及肝组织中活性氧、丙二醛含量 ( $P<0.05$ ), 提高了肝组织中抗氧化酶活性, 其低、中、高剂量组超氧化物歧化酶活性分别升高了 18.15%、39.73%、59.06% ( $P<0.05$ ), 过氧化氢酶活性分别升高了 49.91%、86.40%、127.80% ( $P<0.05$ ), 谷胱甘肽过氧化物酶活性分别升高了 16.00%、24.01%、38.87% ( $P<0.05$ )。研究表明 TPP 具有提高小鼠肝脏组织抗氧化酶活性的作用, 其对运动疲劳小鼠肝脏损伤的保护作用可能与降低细胞的氧化应激水平有关。

**关键词:** 白块菌; 多糖; 理化特性; 运动疲劳; 氧化应激

章编号: 1673-9078(2024)03-56-64

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.3.0365

## *Tuber panzhihuanense* Polysaccharide and Their Protective Effects on Oxidative Damage of Liver in Exercise-fatigue Mice

WANG Huanran<sup>1\*</sup>, ZHU Yilong<sup>2</sup>, SUN Ping<sup>3</sup>

(1.School of Physical Education, Zhengzhou Technology and Business University, Zhengzhou 451400, China)

(2.Department of Physical Education, Henan University of Engineering, Zhengzhou 451191, China)

(3.College of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

**Abstract:** The physicochemical properties of *Tuber panzhihuanense* polysaccharides (TPP) and their protective effects on liver oxidative damage in exercise-fatigue mice were explored. Ultrasound assisted hot water extraction was adopted to extract the crude polysaccharides from *T. panzhihuanense*, while column chromatography was applied to separate and

引文格式:

王焕燃,朱轶龙,孙萍.白块菌多糖理化特性分析及对运动疲劳小鼠肝脏氧化损伤的保护作用[J].现代食品科技,2024,40(3):56-64

WANG Huanran, ZHU Yilong, SUN Ping. *Tuber panzhihuanense* polysaccharide and their protective effects on oxidative damage of liver in exercise-fatigue mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(3): 56-64.

收稿日期: 2023-03-27

基金项目: 河南省科技支撑项目 (192102310172)

作者简介: 王焕燃 (1989-), 男, 硕士, 讲师, 研究方向: 体育教育训练、运动人体科学和运动营养学, E-mail: wang8912182023@163.com

purify them and determine their molecular weights and monosaccharide compositions. Exercise-fatigue mouse models were constructed. Relevant biochemical indicators were measured to explore the protective effects of TPP on the livers of exercise-fatigue mice. The results showed that TPP-A and TPP-B were obtained after separation and purification of TPP. The molecular weight of TPP-A equals 23.74 ku, and it is composed of mannose and glucose. The molecular weight of TPP-B is 46.81 ku, and it consists of mannose, glucose, and glucuronic acid. Comparison of the TPP treatment group and the excessive exercise model group (E-CK) showed that TPP significantly reduced inflammatory factors in mice liver cells, the levels of glutamate-pyruvate transaminase and glutamic oxaloacetic transaminase in serum, and the contents of reactive oxygen species (SOD) and malondialdehyde in liver tissues ( $P<0.05$ ), but significantly increased the activity of antioxidant enzymes in liver tissues. In the low-, medium-, and high-dose TPP groups, the SOD activity increased by 18.15%, 39.73%, and 59.06%, respectively ( $P<0.05$ ), whereas CAT activity increased by 49.91%, 86.40%, and 127.80%, respectively ( $P<0.05$ ). Furthermore, GSH activity increased by 16.00%, 24.01%, and 38.87% in the low-, medium-, and high-dose TPP groups, respectively ( $P<0.05$ ). The results showed that TPP enhances the activity of antioxidant enzymes in mouse liver tissues, and that its protective effects on liver injury in fatigue mice may be related to the reduction in the level of oxidative stress in cells.

**Key words:** *Tuber panzhihuanense*; polysaccharides; physical and chemical properties; exercise fatigue; oxidative stress

运动对机体的影响是双向的,规律性适量运动可以增进健康、提高免疫力,然而过量运动不仅会使机体产生疲劳感,严重时还会伤及组织器官并危及生命。运动性疲劳是机体在一定程度上高强度、持续性过量运动后的一种疲劳状态。研究表明,运动性疲劳会导致机体肝脏组织积累大量的活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS),诱发细胞发生氧化应激反应,引起细胞凋亡,进而导致肝脏功能紊乱<sup>[1,2]</sup>。肝脏作为体内重要的新陈代谢器官,同时也是易受运动疲劳刺激的敏感器官。因此,机体在持续运动过程中,采取一定方式提高体内抗氧化水平是缓解肝脏组织氧化应激损伤的一个重要途径。

白块菌(*Tuber panzhihuanense*)盛产于四川攀枝花、凉山州会东地区以及云南等地,多糖是白块菌中最重要的活性物质之一,具有抗肿瘤<sup>[3]</sup>、抗炎<sup>[4]</sup>、抗氧化<sup>[5,6]</sup>、提高免疫力<sup>[7]</sup>、缓解疲劳<sup>[8]</sup>等作用。随着对白块菌活性成分的功效作用研究越来越深入,白块菌多糖在功能性食品、药品等方面的重要性越来越凸出,其抗氧化、抗疲劳的作用成为目前研究的重点。近年来,越来越多的研究发现,大量微生物、植物来源的天然活性产物,如多糖、黄酮、多酚等化合物可通过提高体内抗氧化酶活性来抑制细胞内 ROS、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)等副代谢产物生成,通过缓解细胞的氧化应激损伤来提高机体的运动耐力并延缓疲劳产生<sup>[9]</sup>。Li 等<sup>[10]</sup>研究发现块菌多糖能够维持氧化还原平衡并减少脂质过氧化以保护细胞损伤,国琦等<sup>[11]</sup>研究显

示块菌多糖在体外具有较强清除 ABTS<sup>+</sup> 自由基的能力,马宁<sup>[12]</sup>研究结果表明灌胃块菌多糖后能显著提高小鼠血清中抗氧化酶活性从而提高小鼠的力竭游泳时间,表现出较强的抗疲劳作用。然而,目前对块菌多糖的研究主要集中在多糖结构分析和简单的游泳力竭模型试验上,白块菌多糖对过度运动疲劳小鼠肝脏氧化应激损伤的保护作用还鲜有报道。

因此,本研究在白块菌多糖单因素提取试验基础上结合响应面试验优化多糖的提取工艺,并通过建立小鼠的过度运动疲劳模型,评价白块菌多糖对运动疲劳小鼠肝脏氧化应激损伤的保护作用,为后续白块菌多糖的深度开发利用提供药理活性试验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

新鲜白块菌:由永仁野森达菌业有限公司提供,采集于攀枝花地区;屏障环境 SPF 级小鼠:河南斯克贝斯生物科技股份有限公司提供,生产许可证号:SCXK(豫)2020-0005,体质量(20±2)g,小鼠饲养于河南中医药大学科研实验动物中心,试验批准文号:202205009,室温(24±1)℃,空气相对湿度 55%~65%,小鼠自由饮水和进食,房间 LED 光照 12 h/d,试验严格按照实验动物中心管理条例操作;蛋白定量(BCA)、活性氧(Reactive Oxygen, ROS)、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)、谷丙转氨酶(Alanine Transaminase, ALT)、谷草转氨酶(Aspartate Transaminase, AST)、超氧化物歧化

酶 (Superoxide Dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (Catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathione Peroxidase, GSH) 检测试剂盒: 南京建成生物工程研究所; 乙醇、丙酮、乙醚均为分析纯: 国药集团化学试剂有限公司; 单糖标准品和葡聚糖分子量标准品, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

## 1.2 仪器与设备

1200 高效液相色谱仪 (XDB-C18, 5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm $\times$ 250 mm), Agilent; JY98-IIIIL 型立式超声波细胞破碎仪, 上海标隆品牌, 超声波功率 100~1 200 W; SHA-C 型恒温水浴锅, 常州国华; ZLGJ-10 型多歧管压盖型真空冷冻干燥机, 西安予辉实验仪器有限公司; AXTDL5M 型台式低速大容量冷冻离心机, 盐城市安信实验仪器有限公司; 0224 型小鼠恒温游泳池, 上海继德教学实验器械厂。

## 1.3 方法

### 1.3.1 白块菌冷冻干燥处理

将白块菌清洗干净并切成厚度 1~3 mm 薄片, 晾干表面水分, 放入 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱预冻 24 h, 然后通过真空冷冻干燥, 使得块菌含水质量低于 5%, 粉碎后过 0.5 mm 筛, 粉末备用。

### 1.3.2 多糖提取纯化

参考李美凤<sup>[13]</sup>、邵佩等<sup>[14]</sup>方法。称取 100 g 白块菌粉末样品, 设置超声波功率 195 W, 超声时间 30 min, 提取温度 65  $^{\circ}\text{C}$ 、液料比 40:1 (mL/g), 提取多糖, 经 5 000 r/min 离心 10 min 后收集上清液, 45  $^{\circ}\text{C}$  旋转蒸发浓缩至约 20 mL, 加入 10 mL 氯仿-正丁醇 ( $V_{\text{氯仿}}:V_{\text{正丁醇}}=5:1$ ) 对浓缩液进行脱蛋白处理, 重复多次至无蛋白产生, 吸取上清液加入 4 倍体积无水乙醇, 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱放置 12 h, 5 000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀, 依次经无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤, 风干后加入 200 mL 蒸馏水溶解, 经过 7 000 u 透析 24 h, 透析液旋转蒸发浓缩并冷冻干燥, 制得的粗多糖粉末 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。粉末用 0.01 mol/L 磷酸缓冲液配成溶液, 参考朱家庆等<sup>[15]</sup>方法, 溶液经离子交换纤维素柱层析分离, 收集洗脱液再经葡聚糖凝胶柱层析分离, 分别合并洗脱液, 浓缩并冷冻干燥即得白块菌纯化多糖 (*Tuber panzhihuanense* Polysaccharide, TPP)。

### 1.3.3 TPP理化特性分析

白块菌纯化多糖中多糖含量测定采用苯酚-硫

酸法<sup>[16]</sup>, 糖醛酸和还原糖含量分别采用间羟基联苯法<sup>[17]</sup>和 3,5-二硝基水杨酸比色法测定<sup>[18]</sup>, 采用 BCA 法<sup>[19]</sup>和  $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$  氧化法<sup>[20]</sup>分别测定蛋白质和硫酸根含量。

### 1.3.4 TPP分子量测定

配制 TPP 样品溶液 1 mg/mL 以及不同分子量 ( $4.32\times 10^3$ 、 $1.26\times 10^4$ 、 $6.06\times 10^4$ 、 $1.10\times 10^5$ 、 $2.89\times 10^5$  ku) 的葡聚糖标准品溶液各 1 mg/mL, 采用高效液相色谱测定多糖的分子量<sup>[21]</sup>, 流动相为 0.05 mol/L 的  $\text{NaNO}_3$  水溶液, 柱温 35  $^{\circ}\text{C}$ , 流速 0.8 mL/min, 上样量 15  $\mu\text{L}$ , 检测波长 245 nm。

### 1.3.5 TPP单糖组成测定

参考 Yuan 等<sup>[22]</sup>的方法。分别配制多糖样品溶液和各单糖标准品溶液, 质量浓度均为 5 mg/mL, 经 PMP 衍生后, 过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜, 再配制不同质量浓度 (0.25、0.5、1、2、2.5、5 mg/mL) 的各单糖标准品溶液, 流动相为乙腈-磷酸盐缓冲液 (体积比为 17:83), 柱温 40  $^{\circ}\text{C}$ , 流速 0.8 mL/min, 上样量 10  $\mu\text{L}$ , 检测波长 250 nm。

### 1.3.6 小鼠分组及运动疲劳方案设计

表 1 小鼠运动疲劳方案

Table 1 Exercise training protocol for mice

周数	持续游泳时间/(min/d)	负重比例/%
1	30	0
2	40	1
3	50	2
4	60	3
5	力竭	4
6	力竭	5

选取 5 周龄 SPF 级屏障小鼠, 进行一周适应性喂养, 第 2 周将小鼠按体重随机分为 5 组, 安静对照组 (Q-CK)、过度运动模型组 (E-CK)、低剂量多糖运动组 (TPP-L)、中剂量多糖运动组 (TPP-M)、高剂量多糖运动组 (TPP-H), 每组 10 只。其中 Q-CK 不进行任何干预, E-CK 只进行运动干预, 每天定时灌胃无菌生理盐水; TPP-L、TPP-M、TPP-H 组均进行运动干预, 同时分别灌胃 50、100、200 mg/kg 多糖溶液, 灌胃体积均为 0.1 mL/10 g。灌胃 60 min 后对小鼠进行游泳干预, 持续干预 6 周。游泳水温 ( $28\pm 2$ )  $^{\circ}\text{C}$ , 根据游泳运动方案在小鼠尾根系不同体质量比的铅丝, 游泳结束后吹干小鼠毛发后放入鼠笼继续饲养, 周一至周六上午 10 点

开始游泳运动, 周日休息, 具体运动方案见下表 1。小鼠运动试验操作规程严格按照动物伦理使用委员会提供的指导方案执行。

### 1.3.7 肝脏指数测定

最后一次力竭游泳结束后, 吹干小鼠毛发并休息 60 min, 称取各小鼠体质量, 腹腔注射 10% 水合氯醛 (4 mL/kg) 麻醉, 采用无菌注射器经心脏抽取 1 mL 血液, 4 ℃ 离心取上清液 (血清)。之后将小鼠进行解剖, 取肝脏组织, 无菌预冷 PBS 清洗 3 遍, 再用无菌滤纸吸干表面水分, 称重, 计算小鼠肝脏指数。

$$A = \frac{M_0}{M_1} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

$A$ —小鼠肝脏指数, %;

$M_0$ —小鼠肝脏质量, g;

$M_1$ —小鼠体质量, g。

### 1.3.8 肝脏组织切片

参考曹智<sup>[23]</sup>的方法进行肝脏切片并染色制片, 取肝脏组织右叶面, 在体积分数为 10% 甲醛溶液中固定 36 h, 通过梯度浓度乙醇脱水, 石蜡包埋后切片 5  $\mu\text{m}$ , 分别经苏木精染液、伊红染液及体积分数为 1% 的盐酸和 70%、80%、95%、100% (体积分数) 乙醇分化液处理后显微镜观察。

### 1.3.9 血清谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 水平检测

采用试剂盒并按照说明书具体要求对血清中 ALT、AST 活性水平进行检测。

### 1.3.10 肝脏氧化应激指标检测

准确称取各小鼠肝脏组织 0.5 g, 分别加入 4.5 mL 预冷生理盐水, 电动研磨制备匀浆, 5 000 r/min 低温离心, 取上清液, 采用试剂盒 BCA 法测定蛋白含量, 随后使用试剂盒测定 ROS、MDA 含量和 SOD、CAT、GSH 活性。

## 1.4 数据处理

数据全部采用 SPSS 22.0 分析处理, 组间数据采用  $t$  检验, 并经单因素方差分析,  $P < 0.05$  表示差异显著,  $P < 0.01$  表示差异极显著, GraphPad Prism 8.0 绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 TPP 的分离纯化

超声辅助热水提取多糖, 除蛋白后得到白块菌粗多糖 18.65 g, 得率为 18.65%。图 1 为粗多糖的

分离纯化图, 可知, 粗多糖经纤维素柱分离后得到两个主要组分 TPP-A 和 TPP-B, TPP-A 为蒸馏水洗脱所得, 为中性多糖, 冻干后质量为 6.13 g, 占比 32.87%, TPP-B 为 0.1 mol/L 的 NaCl 溶液洗脱所得, 研究表明 NaCl 溶液洗脱下来的多糖绝大部分为酸性多糖<sup>[24]</sup>, 冻干后质量为 5.06 g, 占比 27.13%。TPP-A 和 TPP-B 再分别经葡聚糖凝胶柱分离, 冻干后分别得到 0.98 g 和 0.72 g, 纯化后总多糖为 1.70 g, 多糖纯化效率为 9.11%。

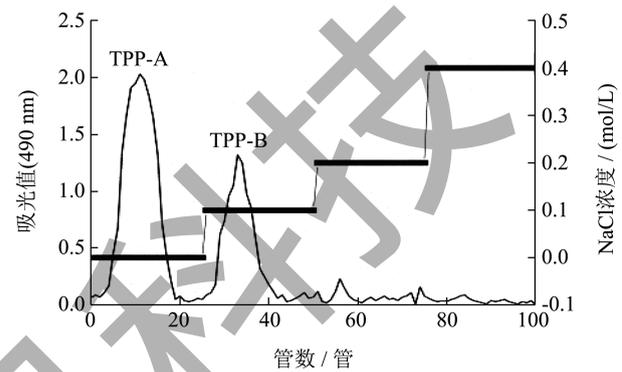


图 1 TPP 洗脱曲线

Fig.1 Elution curve of polysaccharide from *Tuber panzhuanense* polysaccharide

### 2.2 TPP 化学物质含量分析

表 2 TPP 化学物质含量

Table 2 Chemical content of *Tuber panzhuanense* polysaccharide

组分	标准曲线	$R^2$	TPP-A 含量/%	TPP-B 含量/%
多糖	$y=0.8634x-0.0015$	0.9986	93.58	85.72
糖醛酸	$y=18.6725x-0.078$	0.9975	0	6.56
还原糖	$y=1.774x-0.0224$	0.9992	2.25	2.14
蛋白质	$y=3.562x+0.0218$	0.9967	1.37	1.56
硫酸根	$y=1.1716x-0.0683$	0.9995	0	2.11

分别对 TPP-A 和 TPP-B 进行化学组分分析, 结果见表 2, TPP-A 和 TPP-B 中均含有较高浓度的多糖和少量的还原糖以及蛋白质, 其中 TPP-A 为水溶性中性多糖, 不含糖醛酸, 且并未检测出硫酸根。TPP-A 中多糖含量明显高于 TPP-B, 而 TPP-B 中糖醛酸含量明显高于 TPP-A, 另外只在 TPP-B 中检测出少量硫酸根, 研究表明含有糖醛酸和硫酸根的多糖一般为酸性多糖<sup>[25]</sup>, 可见 TPP-B 为酸性多糖, 这与多糖纯化后的结果一致。经过纯化处理后得到的 TPP-A 和 TPP-B 均含有微量蛋白质, 其原因可能是

多糖纯化未彻底或者均含有少量的糖蛋白<sup>[26]</sup>。

### 2.3 TPP分子质量分布

从图2分子质量分布图可以看出, TPP-A 只出现了一个相对较窄的峰, TPP-B 则出现了2个峰, 表明 TPP-A 中组分较单一, TPP-B 中还含有多个组分。从表3可知, TPP-A 分子质量为23.74 ku, TPP-B 分子质量为46.81 ku, 可知酸性多糖 TPP-B 的分子质量明显高于中性多糖 TPP-A, 而 TPP-A 的分散指数明显低于 TPP-B, 表明 TPP-A 的分子质量分布比 TPP-B 较窄, 这与其分子质量分布图结果一致。这一结果与陈兵兵<sup>[26]</sup>、周文君等<sup>[27]</sup>研究结果相似, 其结果均表明酸性多糖分子质量明显高于中性多糖, 且分子量分散指数越低多糖越均一。

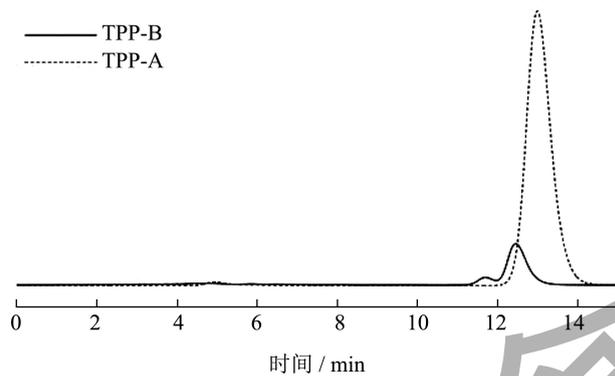


图2 TPP 分子质量分布图

Fig.2 Molecular weight distribution of *Tuber panzhihuanense* polysaccharide

表3 TPP分子质量参数

Table 3 Molecular mass parameters of *Tuber panzhihuanense* polysaccharides

组分	保留时间/min	分子质量参数		分散指数
		重均分子量/ku	数均分子量/ku	
TPP-A	12.52	23.74	20.85	1.14
TPP-B	13.14	46.81	32.79	1.43

### 2.4 TPP的单糖组成分析

TPP-A、TPP-B 的单糖组成见图3, 可知, TPP-A 由甘露糖和葡萄糖组成, 摩尔比为1:4.68, TPP-B 由甘露糖、葡萄糖和葡萄糖醛酸组成, 摩尔比为1:0.23:0.89, 这与 TPP 的化学组成分析结果一致, 可见白块菌多糖主要由葡萄糖、甘露糖和葡萄糖醛酸组成, 其中 TPP-A 中葡萄糖占比最大, TPP-B 中葡萄糖占比最小。鲁斌等<sup>[28]</sup>研究结果显示,

梨园块菌多糖主要由葡萄糖、甘露糖、半乳糖组成, 其中葡萄糖占比达到90%以上; 魏鑫悦等<sup>[29]</sup>研究发现黑块菌多糖由葡萄糖、甘露糖、鼠李糖和半乳糖组成, 葡萄糖占比最大; 赖婷<sup>[30]</sup>同样发现块菌多糖主要由葡萄糖和甘露糖组成, 葡萄糖占比达到88.94%。这些学者的研究结果均表明块菌多糖的单糖组成中葡萄糖占比最大, 但本研究结果分离出的两种多糖组分, 其葡萄糖占比不一, 与前人研究结果出现了较大差异, 这主要是其他学者的研究集中在整体多糖上, 未对纯化的不同多糖组分进行单独分析, 而本研究是将分离纯化得到的不同多糖组分分别进行单糖组成分析, 因此, 结果存在一定差异。

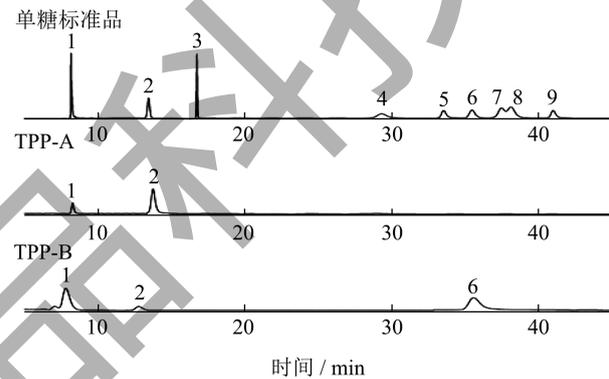


图3 TPP 的单糖组成

Fig.3 Monosaccharide composition of *Tuber panzhihuanense* polysaccharide

注: 1. 甘露糖; 2. 葡萄糖; 3. 鼠李糖; 4. 核糖; 5. 阿拉伯糖; 6. 葡萄糖醛酸; 7. 半乳糖; 8. 木糖; 9. 岩藻糖。

### 2.5 TPP对运动疲劳小鼠肝脏指数的影响

6周后小鼠的体质量变化和肝脏质量、肝脏指数见表4, 从表中可知, 小鼠经过6周的饲养和游泳运动后, Q-CK 小鼠质量显著高于其他组, 说明连续的游泳运动能显著降低小鼠质量 ( $P < 0.05$ ), 运动组 E-CK、TPP-L、TPP-M、TPP-H 的小鼠质量相互间均不存在显著差异 ( $P > 0.05$ ), 可见, TPP 对小鼠的生长发育没有促进或抑制作用。观察发现 E-CK、TPP-L、TPP-M、TPP-H 的小鼠肝脏质量和肝脏指数相互间均存在显著差异 ( $P < 0.05$ )。与 Q-CK 相比, E-CK 小鼠肝脏质量和肝脏指数分别增加了 27.69% 和 40.19% ( $P < 0.05$ ); 与 E-CK 相比, TPP-L、TPP-M、TPP-H 的小鼠肝脏质量和肝脏指数分别降低了 8.43%、14.06%、21.29% ( $P < 0.05$ ) 和 6.65%、12.63%、20.99% ( $P < 0.05$ ), 说明白块菌多糖可显著

降低过度运动导致的小鼠肝脏质量和肝脏系数,结果表明白块菌多糖具有改善小鼠肝脏肿大和肝充血作用,且随着白块菌多糖剂量的增大,改善作用越显著。较多的研究表明,多糖对小鼠肝脏损伤的改善作用显著,吴韬<sup>[31]</sup>、刘兴琴等<sup>[32]</sup>研究运动诱导小鼠肝脏损伤时,分别发现桑黄多糖和西归粗多糖均能显著改善小鼠的脏器指数,缓解肝脏损伤。

表 4 TPP对运动疲劳小鼠肝脏指数的影响

Table 4 Effect of TPP on liver index in exercise fatigue mice

组别	小鼠体质量/g		试验后肝脏质量/g	肝脏指数/%
	试验前体质量	试验后体质量		
Q-CK	21.36±0.86 <sup>a</sup>	46.67±3.86 <sup>a</sup>	1.95±0.22 <sup>d</sup>	4.18±0.13 <sup>e</sup>
E-CK	21.87±0.74 <sup>a</sup>	42.53±2.74 <sup>b</sup>	2.49±0.58 <sup>a</sup>	5.86±0.28 <sup>a</sup>
TPP-L	21.24±0.83 <sup>a</sup>	41.86±3.02 <sup>b</sup>	2.28±0.24 <sup>b</sup>	5.47±0.24 <sup>b</sup>
TPP-M	21.66±0.91 <sup>a</sup>	41.93±2.85 <sup>b</sup>	2.14±0.16 <sup>c</sup>	5.12±0.18 <sup>c</sup>
TPP-H	21.58±1.05 <sup>a</sup>	42.37±2.93 <sup>b</sup>	1.96±0.13 <sup>d</sup>	4.63±0.22 <sup>d</sup>

注:同列数字后不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

## 2.6 TPP对运动疲劳小鼠肝脏病变的影响

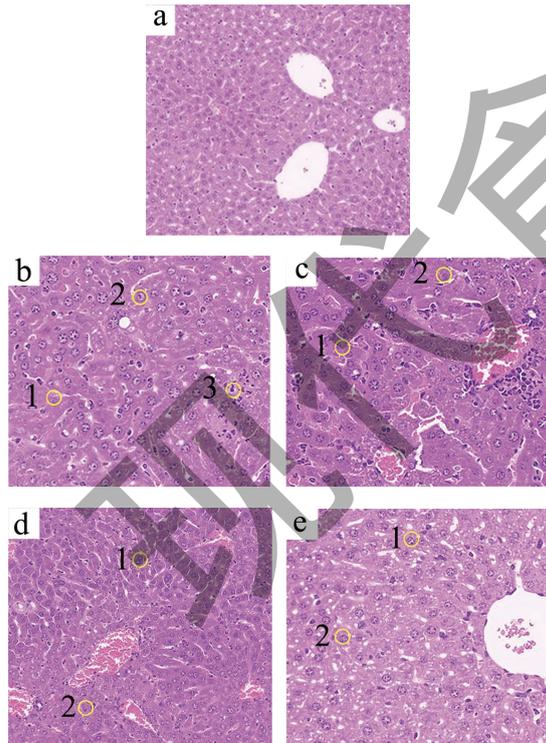


图 4 TPP对运动疲劳小鼠肝脏组织结构的影响

Fig.4 Effect of TPP on liver tissue structure of exercise-induced fatigue mice

注:(a) 安静对照组(Q-CK);(b) 过度运动模型组(E-CK);(c) 低剂量多糖运动组(TPP-L);(d) 中剂量多糖运动组(TPP-M);(e) 高剂量多糖运动组(TPP-H)。

小鼠肝脏组织结构病理变化见图4, Q-CK组小鼠肝细胞清晰可见,细胞结构排列规则整齐,胞间间隙均匀,未见明显的病理变化。Q-CK组肝细胞排列混乱,胞间间隙大,有明显的炎症细胞(b图圆圈1),同时细胞体积出现了明显的肿大,肝细胞核被拥挤到一侧(b图圆圈2),同时出现了大量的脂肪滴(b图圆圈3),说明运动疲劳对小鼠的肝脏组织造成了损伤。与E-CK组相比,TPP-L、TPP-M、TPP-H组小鼠肝脏组织形态结构均出现了明显的改善,TPP-L组小鼠肝细胞间隙减小、炎症浸润变小(c图圆圈1),肝细胞肿胀现象减轻,空泡细胞减少(c图圆圈2);TPP-M组小鼠肝细胞轮廓变得较清晰(d图圆圈1),炎症细胞浸润程度进一步减轻(d图圆圈2);TPP-H组小鼠肝细胞排列变得整齐,细胞核变得清晰可见(e图圆圈1)如,少见细胞坏死,胞间间隙均匀(e图圆圈2),说明补充白块菌多糖可以减轻运动疲劳对小鼠肝脏组织造成的损伤,且多糖剂量越高,对肝脏细胞的保护作用更加明显。

## 2.7 TPP对运动疲劳小鼠血清ALT、AST水平的影响

研究表明,血清中ALT、AST水平能够反映机体肝脏组织的损伤程度,是肝损伤的两个重要标志酶<sup>[33]</sup>,机体在肝脏受到损伤时,会导致肝脏内ALT、AST向血液中渗透,使血清内两种酶水平急剧升高。从图5中可以明显看出,E-CK小鼠血清中两种酶水平最高,Q-CK中最低;与Q-CK相比,E-CK小鼠血清中ALT、AST水平分别极显著升高526.12%、146.29%( $P<0.01$ ),表明过度运动使小鼠的肝脏组织发生了一定程度的损伤,导致ALT、AST释放到血液中;与E-CK相比,TPP-L、TPP-M、TPP-H小鼠血清中ALT、AST水平分别显著降低了8.13%、36.56%、60.13%( $P<0.05$ )和10.51%、26.05%、43.51%( $P<0.05$ ),表明小鼠灌胃白块菌多糖后,在过度运动过程中肝脏组织内ALT、AST向血液渗透受到了一定的抑制。结果表明,白块菌多糖对小鼠肝脏组织具有保护作用,且这种保护作用与白块菌多糖剂量呈现显著的依赖关系。王兰新<sup>[34]</sup>、周玉蕾<sup>[35]</sup>在研究运动疲劳对小鼠血清生化指标时,均发现了疲劳对小鼠肝脏组织会产生一定损伤,使得血清中ALT、AST水平明显升高,在分别添加铁皮石斛多糖和松花粉粗多糖后,不同程度降低了疲劳小鼠血清中ALT、AST水平,说明

补充多糖一定程度上具有缓解疲劳对肝脏造成损伤的作用，但王兰新的研究试验中未设置不同剂量多糖组，周玉蕾的研究试验中则未设置运动模型组，其试验设计方案均与本研究不同，这使得她们的研究结果可能会出现较大误差，同时在两位学者的研究报告中，多糖降低 ALT、AST 水平均明显低于本研究中白块菌多糖的研究结果。由此可见，补充白块菌多糖对疲劳诱导下小鼠肝脏损伤有较好的修复作用。

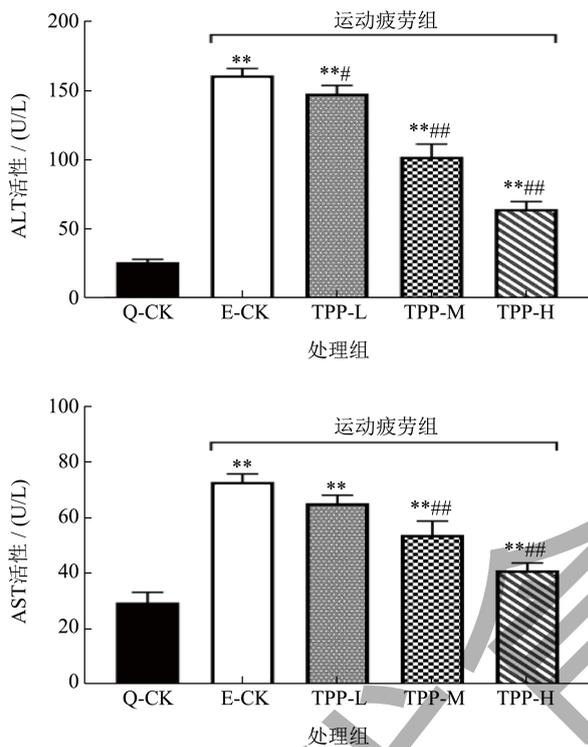


图5 TPP对小鼠血清ALT、AST水平的影响

Fig.5 Effects of *Tuber panzhihuanense* polysaccharide on serum ALT and AST levels in mice

注：与 Q-CK 相比，\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ ；与 E-CK 相比，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。下图同。

### 2.8 TPP对运动疲劳小鼠肝脏ROS、MDA含量的影响

较多学者研究表明，机体在持续性高强度运动或疲劳运动中，体内肝脏、骨骼肌、心肌组织会产生大量的 ROS，当 ROS 大量积累时，则会造成细胞处于氧化应激状态，过多的 ROS 会攻击细胞膜发生膜脂质过氧化，产生大量的 MDA，进一步对机体造成氧化损伤<sup>[36-38]</sup>。图 6 显示，与 Q-CK 相比，E-CK 小鼠肝脏组织中 ROS、MDA 含量分别极显著增加了 150.52%、140.51% ( $P < 0.01$ )，说明过度运动过程

中小鼠肝脏组织产生了大量的 ROS 和 MDA，肝脏组织发生了明显的氧化损伤；与 E-CK 相比，TPP-L、TPP-M、TPP-H 小鼠肝脏组织中 ROS 和 MDA 含量分别显著降低了 15.51%、39.99%、47.13% ( $P < 0.05$ ) 和 21.80%、30.81%、47.59% ( $P < 0.05$ )，可知，小鼠灌胃白块菌多糖后，肝脏组织中 ROS 和 MDA 含量均显著降低，白块菌多糖缓解了肝脏组织的氧化应激水平，保护了细胞免受 ROS 和 MDA 攻击。另外，结果表明，小鼠灌胃的白块菌多糖剂量越高，肝脏组织中 ROS 和 MDA 含量越低。

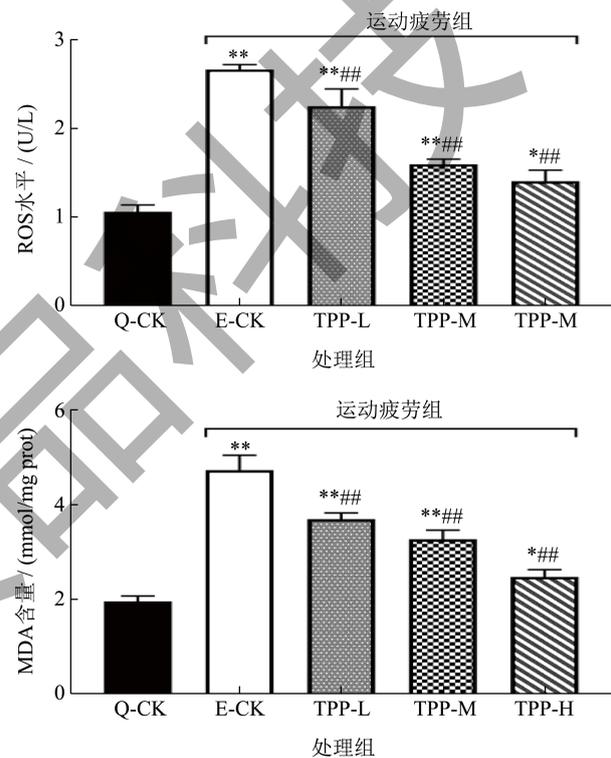


图6 TPP对小鼠肝脏ROS、MDA含量的影响

Fig.6 Effects of *Tuber panzhihuanense* polysaccharide on the contents of ROS and MDA in liver

### 2.9 TPP对运动疲劳小鼠肝脏氧化应激的影响

TPP对过度运动小鼠肝脏组织抗氧化酶(SOD、CAT、GSH)活性的影响见图7，研究表明，机体在过度运动或持续高强度运动后，肝脏组织易发生炎症反应，同时诱发细胞产生氧化应激<sup>[39]</sup>。从图中可知，Q-CK小鼠肝脏组织中SOD、CAT、GSH活性均高于其他组，E-CK小鼠SOD、CAT、GSH活性均最低；与Q-CK相比，E-CK中SOD、CAT、GSH活性分别极显著降低了46.37%、60.57%、33.33% ( $P < 0.01$ )，说明过度疲劳显著降低了小鼠肝脏组织中抗氧化酶活性，造成了肝脏细胞氧化应

激损伤。与 E-CK 相比, TPP-L、TPP-M、TPP-H 中 SOD 活性分别显著升高了 18.15%、39.73%、59.06% ( $P < 0.05$ ), CAT 活性分别显著升高了 49.91%、86.40%、127.80% ( $P < 0.05$ ), GSH 分别显著升高了 16.00%、24.01%、38.87% ( $P < 0.05$ ), 可见, 小鼠在灌胃 TPP 后显著地提高了肝脏组织中抗氧化酶活性, 且随着多糖剂量的提高抗氧化酶活性均显著升高, 但是均难以恢复到正常对照组水平。

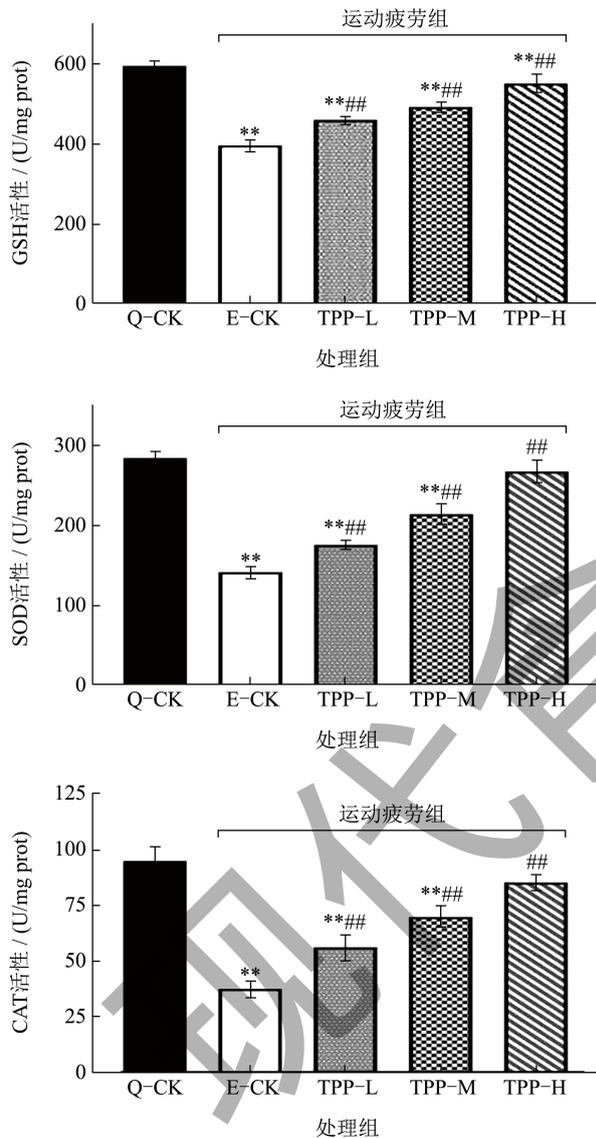


图7 TPP对小鼠肝脏抗氧化酶活性的影响

Fig.7 Effect of *Tuber panzhihuanense* polysaccharide on the activity of antioxidant enzymes in liver

Chang<sup>[40]</sup>、Zhao等<sup>[41]</sup>分别在研究苹果渣多糖和杏鲍菇多糖对小鼠的抗疲劳作用时, 结果均表明多糖可以通过提高小鼠体内抗氧化水平, 降低氧化应激作用来提高抗疲劳能力, 本文结果同样表明补充白块菌多糖可以提高肝脏组织的抗氧化酶活性, 与

前面学者的研究结果一致。另外, 刘兴龙<sup>[42]</sup>、魏芬芬等<sup>[43]</sup>分别在研究黑参多糖和枸杞多糖对运动疲劳小鼠的作用机制时, 均发现两种多糖可能是通过提高体内抗氧化酶活性来保护肝脏组织免受氧化应激损伤, 综上结果进一步证实了白块菌多糖能够明显的改善小鼠肝脏组织氧化应激水平, 起到抗氧化和对肝脏损伤的保护作用。

### 3 结论

本研究通过超声辅助热水提取得到白块菌粗多糖 18.65 g, 通过纤维素柱层析和葡聚糖凝胶柱层析得到纯化多糖 TPP-A 和 TPP-B 两个组分, 纯化后总多糖为 1.70 g, 纯化效率为 9.11%, 其 TPP-A、TPP-B 多糖含量分别为 93.58%、85.72%, 分子质量分别为 23.74 ku 和 46.81 ku; TPP-A 由甘露糖和葡萄糖组成, 摩尔比为 1:4.68, TPP-B 则由甘露糖、葡萄糖和葡萄糖醛酸组成, 摩尔比为 1:0.23:0.89。在小鼠的运动疲劳模型中, TPP 显著降低了运动疲劳小鼠肝脏质量和肝脏系数, 改善了肝脏细胞结构; 与 E-CK 相比, TPP 显著降低了小鼠血清中 ALT、AST 水平, 同时显著降低了肝脏组织中 ROS 和 MDA 含量; 此外, 与 E-CK 相比, 低、中、高剂量组中 SOD 活性分别显著升高了 18.15%、39.73%、59.06% ( $P < 0.05$ ), CAT 活性分别显著升高了 49.91%、86.40%、127.80% ( $P < 0.05$ ), GSH 分别显著升高了 16.00%、24.01%、38.87% ( $P < 0.05$ )。表明 TPP 提高了小鼠肝脏组织的抗氧化作用, 随着多糖剂量的升高其缓解肝脏组织的氧化应激损伤作用效果越显著。研究结果证实了白块菌多糖能够明显改善小鼠肝脏组织氧化应激水平, 起到抗氧化和对肝脏损伤的保护作用, 但对于其具体的作用机制还有待深入研究。该结果为白块菌多糖的功能食品和药品开发提供了一定的理论依据, 为白块菌多糖的产业化应用提供了技术支撑。

### 参考文献

- [1] ULRIKE H, CATRIN H, KRISTINA N, Anti-inflammatory diets and fatigue [J]. *Nutrients*, 2019, 11(10): 2315.
- [2] JYH J W, MENG J S, SHING, L K, et al. Effect of red mold rice on antifatigue and exercise-related changes in lipid peroxidation in endurance exercise [J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2006, 70(2): 247-253.
- [3] ZHAO W, CHAI D D, LI H M, et al. Significance of metal ion supplementation in the fermentation medium on the structure and anti-tumor activity of tuber polysaccharides

- produced by submerged culture of tuber melanosporum [J]. Process Biochemistry, 2014, 49(12): 2030-2038.
- [4] EVA T C, DIEGO M, PEDRO M, et al. Screening of bioactive compounds in truffles and evaluation of pressurized liquid extractions (PLE) to obtain fractions with biological activities [J]. Food Research International, 2020, 132(6): 109054.
- [5] 岳金玫,蒲彪,陈安均,等.不同分子质量块菌多糖的体外抗氧化活性[J].食品科学,2013,34(13):127-131.
- [6] 李杨,郭顺星,陈娟.珍稀名贵食药真菌块菌属的化学成分及药理活性研究进展[J].菌物学报,2021,40(4):873-894.
- [7] 赵玲.块菌多糖的制备及其免疫调节活性研究[D].成都:四川农业大学,2013.
- [8] 路欣彤,齐欣,高雪峰,等.辐照处理对桦褐孔菌多糖抗疲劳作用的影响[J].食品工业科技,2022,43(3):351-357.
- [9] ZHONG L, MA N, ZHENG H H, et al. *Tuber indicum* polysaccharide relieves fatigue by regulating gut microbiota in mice [J]. Journal of Functional Foods, 2019, 63(12): 103580.
- [10] LI M F, ZANG X N, ZHANG Y F, et al. Study on the characterization of polysaccharide from *Tuber sinense* and its desensitization effect to  $\beta$ -lactoglobulin *in vivo* [J]. Journal of Functional Foods, 2022, 91(4): 105028.
- [11] 国琦,梁双敏,葛长荣,等.黑松露多糖提取工艺优化及体外抗氧化活性分析[J].现代食品科技,2021,37(12):187-196,308.
- [12] 马宁.块菌(*Tuber indicum*)干燥技术及块菌多糖抗疲劳作用机理研究[D].南京:南京农业大学,2017.
- [13] 李美凤,袁明昊,邹仕赞,等.松露多糖的提取、分离纯化和结构鉴定[J].食品与发酵工业,2020,46(16):196-200.
- [14] 邵佩,庄虎,谢超,等.超声辅助提取红豆多糖及其生物活性研究[J].食品与机械,2021,37(2):173-178.
- [15] 朱家庆,唐婷范,刘新梅,等.葛根多糖纯化工艺及其抗氧化性能研究[J].食品工业科技,2020,41(24):131-136.
- [16] 杨勤,谷文超,周浓,等.苯酚-硫酸法与蒽酮-硫酸法测定地参多糖的比较研究[J].食品科技,2020,45(1):343-350.
- [17] 李亚平,周鸿立.多糖中糖醛酸含量测定方法的研究进展[J].食品研究与开发,2019,49(17):207-211.
- [18] 高文军,李卫红,王喜明,等.3,5-二硝基水杨酸法测定葛薯中还原糖和总糖含量[J].中国药业,2020,29(9):113-116.
- [19] 吴光杰,李玉萍,陈美琴,等.马齿苋多糖蛋白含量测定及脱蛋白方法研究[J].时珍国医国药,2015,26(7):1577-1579.
- [20] 邱文辉.裙带菜中岩藻多糖的制备工艺及其降血糖活性研究[D].杭州:浙江工业大学,2020.
- [21] 顾健,吴伟,沈志冲,等.高效分子排阻色谱法测定滇黄精多糖的分子量[J].中国药业,2021,30(13):72-74.
- [22] YUAN Q, LIN S, FU Y, et al. Effects of extraction methods on the physicochemical characteristics and biological activities of polysaccharides from okra (*Abelmoschus esculentus*) [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 127(4): 178-186.
- [23] 曹智.翅果油联合有氧运动对高脂饮食小鼠的降脂减肥作用[D].太原:山西大学,2019.
- [24] WANG Q Q, LIU S Q, XU L, et al. Purification, characterization and bioactivities of polysaccharides extracted from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) [J]. Molecules, 2023, 28(2): 596.
- [25] ZHANG Q, LU L X, ZHENG Y F, et al. Isolation, purification, and antioxidant activities of polysaccharides from *Choerospondias axillaris* leaves [J]. Molecules, 2022, 27(24): 8881.
- [26] 陈兵兵.葛根多糖的提取分离、理化特性及生物活性研究[D].南京:江苏大学,2016.
- [27] 周文君,池建伟,易阳,等.龙眼、枸杞和红枣多糖的理化性质及其协同益生活性[J].现代食品科技,2021, 37(11): 58-67.
- [28] 鲁斌,张凤明,蔡正达,等.梨园块菌多糖提取工艺优化及其单糖组成分析[J].食品工业科技,2022,43(13):218-224.
- [29] 魏鑫悦,陈克保,关统伟.攀枝花黑松露多糖的抗氧化和降血糖活性[J].现代食品科技,2022,38(3):1-7.
- [30] 赖婷.块菌多糖的提取纯化、结构鉴定及其羧甲基改性研究[D].广州:华南理工大学,2016.
- [31] 吴韬.桑黄多糖联合疲劳运动对大鼠抗氧化能力及免疫功能的影响及机制研究[D].南昌:江西师范大学,2014.
- [32] 刘兴琴,丁济超,李继兴,等.西归粗多糖对运动疲劳小鼠的免疫调节作用[J].食品工业科技,2021,42(5):317-321,327.
- [33] 刘庆普,陈燕,谢彩侠,等.桑叶生物碱对小鼠酒精性肝损伤的保护作用[J].现代食品科技,2022,38(6):1-8.
- [34] 王兰新.铁皮石斛多糖对递增负荷运动小鼠肝脏抗氧化基因表达的影响[D].济南:山东师范大学,2021.
- [35] 周玉蕾.松花粉粗多糖对小鼠抗疲劳作用的研究[D].延边:延边大学,2022.
- [36] XIAO R, WEI Y, ZHANG Y P, et al. Trilobatin, a naturally occurring food additive, ameliorates exhaustive exercise-induced fatigue in mice: involvement of Nrf2/ARE/ferroptosis signaling pathway [J]. Frontiers in Pharmacology, 2022, 13: 913367.
- [37] LIU S W, MENG F N, ZHANG D, et al. *Lonicera caerulea* berry polyphenols extract alleviates exercise fatigue in mice by reducing oxidative stress, inflammation, skeletal muscle cell apoptosis, and by increasing cell proliferation [J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 853225.
- [38] CHEN Y J, BASKARAN R, SHIBU M A, et al. Anti-fatigue and exercise performance improvement effect of *Glossogyne tenuifolia* extract in mice [J]. Nutrients, 2022, 14(5): 1011-1011.
- [39] JOHNSON N A, KEATING S E, GEORGE J, et al. Exercise and the liver: implications for therapy in fatty liver disorders [J]. Semin Liver Dis, 2012, 32(1): 65-79.
- [40] CHANG X N, CHEN X F, GONG P, et al. Anti-oxidant and anti-fatigue properties of apple pomace polysaccharides by acid or alkali extraction [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2021, 57(1): 78-91.
- [41] ZHAO Y Y, CHEN X F, JIA W, et al. Extraction, isolation, characterisation, antioxidant and anti-fatigue activities of *Pleurotus eryngii* polysaccharides [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2020, 55(6): 2492-2508.
- [42] 刘兴龙,赵迎春,陈雪艳,等.黑参多糖抗疲劳作用的分子机制[J].食品科学,2020,41(5):173-179.
- [43] 魏芬芬,王文娟,张波.枸杞多糖缓解小鼠体力疲劳研究[J].食品研究与开发,2020,41(6):48-52.