

基于Nrf2信号通路探析桑黄多糖对运动疲劳小鼠肝损伤的保护作用

李昆展¹, 王颖¹, 郑佳^{1*}, 刘浩²

(1. 郑州工商学院体育学院, 河南郑州 451450) (2. 郑州大学公共卫生学院, 河南郑州 450001)

摘要: 该研究采用超声波辅助热水浸提桑黄多糖, 通过 Nrf2 信号通路探讨其对运动疲劳小鼠肝损伤的保护作用。结果表明, 桑黄多糖提取率为 7.64%, 纯化效率为 23%。与运动疲劳模型组相比, 桑黄多糖显著降低了小鼠的肝脏系数, 低、中、高浓度组力竭游泳时间分别显著提高了 15.58%、34.69%、53.06%; 相比安静对照组, 模型组肝脏内 SOD、CAT、GSH-Px 活性显著降低, MDA 含量显著升高, 血清炎症因子 (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6) 水平和 ALT、AST 活性均显著升高, 与模型组相比, 低、中、高浓度组肝脏抗氧化酶活性显著升高, MDA 含量显著降低, 其中高浓度组小鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平分别显著降低了 50.54%、50.51%、46.21%, ALT、AST 活性分别显著降低了 33.30%、34.57%。模型组 *Nrf2*、*HO-1*、*NQO1* mRNA 表达水平较安静对照组显著降低, *Keap1* mRNA 表达水平显著升高, 补充多糖后, 低、中、高浓度组 *Nrf2*、*HO-1*、*NQO1* mRNA 表达水平显著升高, *Keap1* mRNA 表达水平显著降低。提示桑黄多糖通过激活肝脏 Nrf2 信号通路, 起到提高运动疲劳小鼠肝脏的抗氧化和降低炎症因子的作用, 从而减轻小鼠的肝损伤。

关键词: Nrf2 信号通路; 桑黄多糖; 运动疲劳; 炎症因子; 肝损伤

文章编号: 1673-9078(2024)06-20-28

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.6.1221

Exploring Protective Effect of *Phellinus linteus* Polysaccharides on Liver Injury in Exercise Fatigue Mice Based on Nrf2 Signaling Pathway

LI Kunzhan¹, WANG Ying¹, ZHENG Jia^{1*}, LIU Hao²

(1. School of Physical Education, Zhengzhou Technology and Business University, Zhengzhou 451450, China)

(2. College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: Ultrasound-assisted hot water extraction was utilized to obtain *Phellinus linteus* polysaccharides (PLPs), and its protective effect on liver injury in exercise-induced fatigue mice was investigated through modulation of the Nrf2 signaling pathway. Results showed a PLP extraction yield of 7.64%, with a purification efficiency of 23%. PLP administration led to a significant reduction in the liver coefficient of mice compared to the exercise-induced fatigue model group. Moreover, it increased swimming endurance times of the low-, medium- and high-dose groups by 15.58%, 34.69% and 53.06%,

引文格式:

李昆展, 王颖, 郑佳, 等. 基于 Nrf2 信号通路探析桑黄多糖对运动疲劳小鼠肝损伤的保护作用[J]. 现代食品科技, 2024, 40(6): 20-28.

LI Kunzhan, WANG Ying, ZHENG Jia, et al. Exploring protective effect of *Phellinus linteus* polysaccharides on liver injury in exercise fatigue mice based on Nrf2 signaling pathway [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(6): 20-28.

收稿日期: 2023-10-13

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81773384)

作者简介: 李昆展 (1991-), 男, 硕士, 讲师, 研究方向: 体育教学, 运动训练, 运动营养学, E-mail: 327212350@qq.com

通讯作者: 郑佳 (1983-), 男, 硕士, 副教授, 研究方向: 体育教育训练学, 运动训练, E-mail: lkzxdsp2023@163.com

respectively. Compared to the sedentary control group, the model group exhibited significantly diminished activities of antioxidative enzymes in the liver, including superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px), alongside increased malondialdehyde (MDA) content; serum inflammatory factors such as tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 beta (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6); and alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST) activities. Conversely, the low-, medium- and high-dose groups demonstrated elevated antioxidant enzymes activity in the liver and reduced MDA content in comparison to the model group. Notably, the high-dose group exhibited significant reductions in serum TNF- α , IL-1 β , and IL-6 levels by 50.54%, 50.51%, and 46.21%, respectively, alongside ALT and AST activities by 33.30% and 34.57%, respectively. Moreover, mRNA expression levels of *Nrf2*, *HO-1*, and *NQO1* were significantly lower in the model group compared to the sedentary group, while *Keap1* mRNA expression was significantly higher. Post-PLP supplementation, mRNA expression levels of *Nrf2*, *HO-1* and *NQO1* significantly increased in the low-, medium- and high-dose groups, while *Keap1* mRNA expression significantly decreased. These findings collectively suggest that PLPs enhance hepatic antioxidant capacity and reduce inflammatory factors in exercise-induced fatigue mice by activating the hepatic Nrf2 signaling pathway, thereby mitigating liver injury.

Key words: Nrf2 signaling pathway; *Phellinus linteus* polysaccharide; exercise fatigue; inflammatory factors; liver injury

运动性疲劳是机体经过高强度或长时间运动后体内出现能量代谢失衡和代谢产物堆积,使得运动能力和耐力水平下降的一种正常生理现象^[1]。研究表明机体在运动疲劳状态下会产生大量的活性氧(ROS)和炎症因子,肝脏作为人体最大的排毒器官也是最脆弱的器官,易受ROS和炎症因子刺激,触发肝细胞的氧化应激和炎症反应,从而导致肝功能紊乱和脏器受损^[2]。因此,通过补充具有抗疲劳功效的保健品或药品,降低细胞ROS和炎症因子水平对改善运动疲劳引起的肝损伤具有重要作用。

桑黄(*Phellinus linteus*)是一种珍贵的食药真菌,多糖是桑黄主要的活性物质之一。研究表明桑黄多糖(*Phellinus linteus* Polysaccharide, PLP)具有抗炎^[3]、抗氧化^[4]、抗肿瘤^[5]、提高免疫力^[6]、保肝护肝^[7]、抗疲劳^[8]等作用。研究发现桑黄多糖可以通过激活AMPK/Nrf2信号通路降低肝脏细胞的氧化应激水平,来减轻外源物质诱导的急性肝损伤^[9],桑黄多糖还具有提高肝脏抗氧化酶活性,降低小鼠血清中氨基转移酶活性,对肝脏起到一定的保护作用^[10]。此外,张珈宁等^[11]研究表明桑黄多糖可以上调肝脏内*Nrf2*和*Gsta4*基因表达,降低细胞的氧化应激水平,抑制肝纤维化病变。说明桑黄多糖可以通过抗氧化途径对肝脏起到一定的保护作用,推测其通过激活细胞内Nrf2信号通路提高抗氧化水平,对运动疲劳小鼠肝损伤具有一定保护作用。

核因子E2相关因子2(Nuclear Factor Erythroid-2 Related Factor 2, Nrf2)是调节细胞氧化应激水平的重要转录因子^[12]。在正常情况下,细胞内Nrf2与

Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1(Kelch-like ECH-Associated Protein 1, Keap1)稳定结合在细胞质中,处于无活性状态,当细胞受到外源因子诱导时,Nrf2与Keap1解偶联,被激活后进入细胞核与抗氧化反应原件结合,从而启动抗氧化反应系统,提高下游抗氧化酶基因表达,如血红素氧合酶1(Heme Oxygenase-1, HO-1)、醌氧化还原酶(Quinone Oxidoreductase 1, NQO1)^[13]。Zhang等^[14]研究表明虾青素可以激活Nrf2信号通路提高肝脏抗氧化酶活性,改善小鼠运动疲劳,对肝脏起到保护作用;任东根等^[2]研究表明川麦冬多糖能够激活AMPK/Nrf2/HO-1信号通路,降低肝脏细胞的氧化应激水平,缓解运动疲劳对肝脏造成的氧化损伤。可见,Nrf2信号通路对缓解运动疲劳状态下肝脏的氧化应激损伤起到了重要作用。

目前,关于桑黄多糖对运动疲劳小鼠肝损伤的研究报道还很少,对其缓解肝损伤的研究机制还尚未有报道。鉴于此,本研究通过力竭游泳运动建立小鼠运动疲劳模型,测定肝脏损伤的相关指标,同时基于Nrf2信号通路探析桑黄多糖对改善运动疲劳小鼠肝脏损伤的可能作用机制,为扩大桑黄多糖药理作用及开发运动功能性保健食品提供理论参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

桑黄子实体(品种:沪桑2号, *Phellinus linteus*),浙江海宁宏欣农业生物科技有限公司;SPF级KM

小鼠, 体质量 (22.7 ± 1.4) g, 郑州市惠济区华兴实验动物养殖场, 生产许可证: SCXK(豫)2019-0002; 普通小鼠饲料, 江苏省协同医药生物工程有限公司; Sevag 试剂(氯仿:正丁醇=5:1)、无水乙醇、丙酮、乙醚, 国药集团化学试剂有限公司; 谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)试剂盒, 上海博湖生物科技有限公司; 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素- 1β (IL- 1β)、白细胞介素-6(IL-6) ELISA 试剂盒, 上海继和生物科技有限公司; 丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)测定试剂盒, 南京建成生物工程研究所; RNA 提取试剂盒、反转录试剂, 北京索莱宝科技有限公司; 引物设计, 生物工程(上海)股份有限公司; DEAE 纤维素层析柱、葡聚糖凝胶 G-100, 上海联迈生物工程有限公司; 其他分析试剂均为分析纯。

1.2 仪器

Icycler 实时荧光定量 PCR 仪: 美国 Bio-Rad 公司; Varioskan LUX 多功能酶标仪: 赛默飞世尔科技公司; N-1300V-WB 旋转蒸发仪: 东京理化; FA2004 电子分析天平, 上海舜宇恒平科学仪器有限公司; PF4250 分离纯化系统, 法国 Interchim 公司; JD-XSC 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 桑黄多糖提取和纯化

参考袁满等^[15]的方法, 并进行适当修改。将桑黄子实体 50 °C 烘干, 粉碎过 60 目筛, 称取 50 g 粉末, 加入 1 L 蒸馏水, 放入 90 °C 恒温水浴锅中 1 h, 取出后待温度降至 60 °C 时, 放入超声破碎仪中, 设置温度 60 °C、功率 200 W、超声时间 30 min; 取出后继续置于 90 °C 恒温水浴锅中 2 h。5 000 r/min 离心 10 min, 取上层清液, 滤渣重复操作一次, 最后离心合并上清液, 旋转蒸发浓缩至约 150 mL; 加入 Sevag 试剂 50 mL, 反复震荡多次, 倒入分液漏斗中, 留取上层液体, 继续加入 Sevag 试剂, 重复操作至无明显蛋白产生; 加入等体积的无水乙醇, 4 °C 冰箱过夜, 收集沉淀物, 依次经丙酮、乙醚、无水乙醇冲洗, 蒸馏水溶解沉淀倒入 5 000 u 透析袋中, 4 °C 冰箱中透析 2 d, 截留液旋转蒸发浓缩后, 真空冷冻干燥, 即得桑黄粗多糖。称取 5 g 粗多糖, 加入 20 mL 蒸馏水溶解, 上样到纤维素层析柱, 分别经蒸馏水和 0.1、0.3、0.5 mol/L 氯化钠溶液洗脱, 洗脱流

速 0.8 mL/min, 合并洗脱液, 再经葡聚糖凝胶柱层析分离, 将最后收集到的洗脱液, 加入等体积无水乙醇, 重复上述操作, 最后真空冷冻干燥即得到纯化桑黄多糖(PLP)。

1.3.2 小鼠运动疲劳模型建立

小鼠适应性饲养 5 d, 通过游泳训练剔除在水中四肢不运动小鼠。选取 50 只小鼠, 根据体重随机分为 5 组, 分别为安静对照组(NEcon)、运动疲劳模型组(Econ)、运动疲劳+低浓度多糖组(E-PLP-L)、运动疲劳+中浓度多糖组(E-PLP-M)、运动疲劳+高浓度多糖组(E-PLP-H), 每组 10 只, 每笼 5 只。桑黄多糖质量浓度参考李英基等^[16]方法, 低、中、高质量浓度分别为 10、25、50 mg/mL。NEcon 不进行运动干预, Econ 进行运动干预, 均灌胃生理盐水; E-PLP-L、E-PLP-M、E-PLP-H, 均进行运动干预, 同时分别灌胃 10、25、50 mg/mL 桑黄多糖溶液。根据小鼠体质量所有组别灌胃体积均为 0.1 mL/10 g。运动组小鼠(Econ、E-PLP-L、E-PLP-M、E-PLP-H)进行游泳训练, 一周训练 6 d, 休息 1 d, 连续训练 5 周, 每周日对全部小鼠进行称重; 上午灌胃结束后休息 1 h, 然后在游泳箱中进行游泳训练, 水温 (30 ± 2) °C, 水深 50 cm。第 1~2 周每天持续游泳训练 30 min, 2~4 周进行负重 5% 铅块, 每天游泳训练 30 min, 第 5 周进行负重 5% 铅块, 每天游泳至力竭, 并记录每只小鼠的力竭游泳时间, 从小鼠放入水中到头部沉入水下 7 s 未浮出水面的时间^[17]。在小鼠游泳训练中, 保持小鼠四肢一直处于运动状态, 整个试验周期中, Econ 组死亡小鼠 2 只, E-PLP-L 组死亡 1 只, 其余小鼠均符合试验要求。

1.3.3 桑黄多糖对小鼠体质量和肝脏指数的影响

在试验开始前、试验期间每周日对全部小鼠进行称重, 同时在最后一次游泳结束, 吹干小鼠毛发, 全部称重后放回笼中休息 16 h, 通过眼球采血, 3 000 r/min 低温离心 5 min 并收集血清, -20 °C 冰箱保存。颈椎脱臼法处死全部小鼠, 用解剖刀取小鼠肝脏, 预冷的生理盐水清洗, 滤纸控干, 称重, 计算肝脏指数。

$$A = \frac{B}{C} \times 100\%$$

式中:

A—肝脏指数, %;

B—肝脏质量, g;

C—小鼠体质量, g。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称	正向引物 (5' → 3')	反向引物 (5' → 3')
<i>Nrf2</i>	CCAGTACCAGCAACGGCAT	TGTTGTGCTTTCAGGGTGGT
<i>Keap1</i>	TTGTTCTGCTGCCTCTTCTGC	GTGGGTGTTGCTGTCACCATG
<i>HO-1</i>	ATGGACTTCCGGTAGGTTCA	GCCCTTGCCAGTAGCTTCA
<i>NQO1</i>	GCCATCATTTGGGCAAGTCC	TCCTTGGAACAAAGGCCGA
β -actin	CATTGCTGACAGGATGCAGAAG	GAGCCACCAATCCACACAGAGT

1.3.4 桑黄多糖对小鼠血清ALT、AST的影响

严格按照试剂盒说明书操作,测定小鼠血清中ALT和AST活性。

1.3.5 桑黄多糖对小鼠血清和肝脏组织中炎症因子水平的影响

称取0.1 g肝脏组织,加入0.9 mL磷酸盐缓冲液(pH值6.8),电动研磨机制成10%匀浆,3 000 r/min离心5 min,取上层清液待测,-80 °C保存。根据ELISA试剂盒说明书,分别测定小鼠血清和肝脏组织中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平。

1.3.6 肝脏组织切片染色

清洗干净的肝脏组织经4 wt.%多聚甲醛固定,体积分数50%、70%、85%、100%乙醇脱水,再石蜡包埋,切成5 μ m薄片,干燥后,60 °C预热30 min,再依次经苏木精染液、伊红染液染色,梯度乙醇脱水,风干后显微镜观察并拍照。

1.3.7 肝脏组织抗氧化酶活性和丙二醛含量测定

取方法1.3.6保存的肝脏组织液,按照试剂盒说明书测定抗氧化酶(SOD、CAT、GSH)活性和MDA含量。

1.3.8 肝脏组织Nrf2信号通路相关基因mRNA的表达水平检测

按照说明书提取肝脏组织RNA,参考任盼红等^[18]的方法,反转录成cDNA,试剂盒三步法进行荧光定量PCR扩增,分别检测*Nrf2*、*Keap1*、*HO-1*、*NQO1* mRNA表达水平,以 β -actin为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对目的基因进行定量分析。详细引物信息见表1。

1.4 数据处理

数据采用软件SPSS 22.0分析,数据使用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间数据比较采用单因素方差分析,组间数据采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著,GraphPad Prism 9.5.1绘图。

2 结果与分析

2.1 桑黄多糖(PLP)的分离纯化

50 g桑黄子实体提取得到粗多糖3.82 g,5 g粗多糖经纤维素柱和葡聚糖凝胶柱层析后得到纯化多糖1.15 g,桑黄多糖的提取得率为7.64%,纯化效率为23%。桑黄多糖经纤维素柱层析得到3个组分,见图1。PLP-1是经蒸馏水洗脱得到,组分占比42.36%,PLP-2经0.1 mol/L NaCl洗脱得到,组分占比48.75%,PLP-3经0.3 mol/L NaCl洗脱得到,组分占比8.89%。

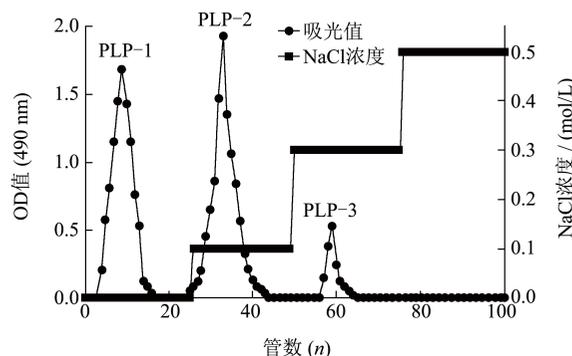


图 1 桑黄多糖分离纯化图

Fig.1 Separation and purification of *Phellinus linteus* polysaccharide

2.2 桑黄多糖对小鼠生长和力竭游泳时间的影响

从表2可知,小鼠体质量在逐渐增加,第7、14、28、35天时,NEcon组小鼠体质量均高于其他组,但各组之间小鼠体质量均不存在显著差异($P > 0.05$),说明运动疲劳对小鼠体质量会产生一定的影响,但差异较小可以忽略,PLP对小鼠体质量不产生影响,对小鼠的生长发育没有促进和抑制作用。从小鼠肝脏指数可以看出,各组间均存在显著差异($P < 0.05$),Econ组肝脏指数最大,说明运动疲劳模型组小鼠肝脏可能出现了充血、增生肥大;在补充低、中、高浓度桑黄多糖后,肝脏指数呈显著降低趋势,说明桑黄多糖改善了小鼠的肝脏结

构。从力竭游泳时间上看,与NEcon相比,Econ组小鼠力竭游泳时间最低,说明长期的运动疲劳降低了小鼠的运动耐力;与Econ组相比,桑黄多糖低、中、高浓度组小鼠力竭游泳时间均显著增加,分别显著提高了15.58%、34.69%、53.06% ($P < 0.05$),说明补充桑黄多糖具有提高小鼠运动耐力的作用。综上结果表明,桑黄多糖不仅改善了运动疲劳小鼠肝脏组织结构,还提高了小鼠运动耐力,且随着多糖浓度的提高,效果越明显。

2.3 桑黄多糖对小鼠肝脏组织抗氧化酶活性和丙二醛含量的影响

从表3可知,与NEcon相比,Econ组小鼠肝脏组织抗氧化酶(SOD、CAT、GSH-Px)活性显著降低 ($P < 0.05$),MDA含量则显著升高 ($P < 0.05$),说明运动疲劳抑制了肝脏组织内抗氧化酶活性,使得细胞处于氧化应激中;与Econ相比,E-PLP-L、

E-PLP-M、E-PLP-H组小鼠肝脏组织中SOD、CAT、GSH-Px活性均出现了显著升高 ($P < 0.05$),MDA含量则出现了显著下降 ($P < 0.05$);与E-PLP-L相比,E-PLP-M、E-PLP-H组SOD、CAT、GSH-Px活性均得到了显著提高 ($P < 0.05$),MDA含量显著降低 ($P < 0.05$);与E-PLP-M相比,E-PLP-H组SOD、CAT、GSH-Px活性进一步显著提高,MDA含量进一步显著降低 ($P < 0.05$);此外,还可以看出,E-PLP-H中SOD活性、MDA含量与NEcon不存在显著差异 ($P > 0.05$),而CAT、GSH-Px活性则显著高于NEcon ($P < 0.05$)。上述结果表明,小鼠在运动疲劳状态下,肝脏组织中抗氧化酶活性受到了明显的抑制,肝脏细胞受到了氧化应激损伤,在补充桑黄多糖后,明显的提高了抗氧化酶活性,缓解了细胞的氧化应激作用,且多糖浓度越高,细胞的氧化应激水平越低,补充50 mg/mL的桑黄多糖,运动疲劳小鼠肝脏氧化应激可以恢复到正常对照组水平。

表2 桑黄多糖对小鼠体质量、肝脏指数和力竭游泳时间的影响

Table 2 Effects of *Phellinus linteuse* polysaccharide on body weight, liver index and exhaustive swimming time in mice

分组	体质量/g					肝脏指数/%	游泳时间/min
	第0天	第7天	第14天	第28天	第35天		
NEcon	23.65 ± 1.65 ^a	30.92 ± 1.87 ^a	36.41 ± 1.93 ^a	42.57 ± 2.20 ^a	45.85 ± 2.53 ^a	4.22 ± 0.09 ^c	17.86 ^b
Econ	23.76 ± 1.75 ^a	28.76 ± 1.67 ^a	34.22 ± 1.84 ^a	38.78 ± 1.82 ^a	43.72 ± 2.04 ^a	5.76 ± 0.15 ^a	12.57 ^c
E-PLP-L	24.04 ± 1.82 ^a	29.54 ± 2.01 ^a	34.54 ± 1.98 ^a	39.24 ± 2.13 ^a	44.25 ± 1.87 ^a	5.53 ± 0.21 ^b	14.78 ^d
E-PLP-M	23.66 ± 1.78 ^a	28.87 ± 1.64 ^a	35.18 ± 2.31 ^a	39.22 ± 2.32 ^a	45.37 ± 2.44 ^a	4.87 ± 0.24 ^c	16.93 ^c
E-PLP-H	23.58 ± 1.24 ^a	29.34 ± 1.83 ^a	34.72 ± 2.11 ^a	38.64 ± 2.45 ^a	43.62 ± 2.58 ^a	4.48 ± 0.17 ^d	19.24 ^a

注:同列数字后不同的小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$),下表同。

表3 桑黄多糖对小鼠肝脏组织MDA含量和SOD、CAT、GSH-Px活性的影响

Table 3 Effect of *Phellinus linteuse* polysaccharide on MDA content and activities of SOD, CAT and GSH-Px in liver of mice

分组	SOD/(U/mg)	CAT/(U/g)	GSH-Px/(μ mol/g)	MDA/(nmol/mg)
NEcon	376.28 ± 14.35 ^a	32.69 ± 2.36 ^b	36.35 ± 3.05 ^b	4.23 ± 0.84 ^d
Econ	183.25 ± 12.58 ^d	16.85 ± 3.24 ^c	19.86 ± 4.12 ^c	10.35 ± 1.36 ^a
E-PLP-L	223.47 ± 13.45 ^c	21.24 ± 4.35 ^d	24.63 ± 3.48 ^d	8.47 ± 0.85 ^b
E-PLP-M	263.48 ± 15.28 ^b	28.63 ± 5.78 ^c	34.82 ± 5.62 ^c	6.82 ± 0.76 ^c
E-PLP-H	382.62 ± 17.62 ^a	35.72 ± 4.23 ^a	42.76 ± 5.84 ^a	4.33 ± 0.73 ^d

表4 桑黄多糖对小鼠血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平的影响

Table 4 Effect of *Phellinus linteuse* polysaccharide on serum levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in mice

分组	TNF- α /(pg/mL)	IL-1 β /(pg/mL)	IL-6/(pg/mL)
NEcon	753.14 ± 22.53 ^d	56.27 ± 8.35 ^d	86.75 ± 12.35 ^d
Econ	1 462.85 ± 25.47 ^a	124.73 ± 12.24 ^a	186.82 ± 14.26 ^a
E-PLP-L	1 232.45 ± 23.18 ^b	103.51 ± 9.76 ^b	152.43 ± 13.87 ^b
E-PLP-M	965.78 ± 18.73 ^c	89.65 ± 8.46 ^c	126.84 ± 11.62 ^c
E-PLP-H	723.49 ± 23.65 ^d	61.73 ± 9.38 ^d	92.85 ± 12.16 ^d

2.4 桑黄多糖对小鼠血清炎症因子水平的影响

从表4可知,与NEcon相比,Econ组小鼠血清中炎症因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平分别显著升高了94.23%、121.66%、115.35% ($P < 0.05$),说明运动疲劳状态下,小鼠血清中炎症因子水平会明显上升,小鼠体内出现了严重的炎症反应。与Econ相比,E-PLP-L、E-PLP-M、E-PLP-H组小鼠血清中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平均出现了显著降低 ($P < 0.05$),其中高浓度多糖组E-PLP-H中小鼠血清中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平降低最明显,分别显著降低了50.54%、50.51%、46.21% ($P < 0.05$),另外,与NEcon相比,E-PLP-H组各炎症因子水平不存在显著差异 ($P > 0.05$),说明补充50 mg/mL的桑黄多糖,可以使运动疲劳小鼠血清中炎症因子水平恢复到正常状态。结果表明,桑黄多糖具有改善运动疲劳下小鼠体内的炎症作用,缓解肝脏损伤。

2.5 桑黄多糖对小鼠血清ALT、AST的影响

从表5可知,与NEcon相比,Econ组小鼠血清ALT和AST活性出现了显著增加 ($P < 0.05$),说明运动疲劳使得小鼠血清中ALT和AST含量大幅升高,肝脏结构出现了异常损伤。与Econ相比,E-PLP-L、E-PLP-M、E-PLP-H小鼠血清中ALT活性分别显著降低了15.44%、22.42%、33.30% ($P < 0.05$),AST活性分别显著降低了16.90%、26.73%、34.57% ($P < 0.05$),依次呈现显著降低趋势。另外,可以观察到E-PLP-H与NEcon相比,ALT和AST活性均不存在显著差异 ($P > 0.05$)。上述结果表明,桑黄多糖具有改善运动疲劳小鼠肝功能损伤的作用,且多糖浓度越高改善效果越好,高浓度组小鼠肝功能可以恢复到正常组水平。

表5 桑黄多糖对ALT、AST的影响

Table 5 Effect of *Phellinus linteuse* polysaccharide on ALT and AST

分组	ALT/(U/L)	AST/(U/L)
NEcon	47.58 \pm 6.25 ^d	125.82 \pm 17.32 ^d
Econ	68.14 \pm 9.74 ^a	194.63 \pm 21.35 ^a
E-PLP-L	57.62 \pm 8.14 ^b	161.74 \pm 16.84 ^b
E-PLP-M	52.86 \pm 8.35 ^c	142.61 \pm 14.38 ^c
E-PLP-H	45.45 \pm 5.71 ^d	127.35 \pm 15.72 ^d

2.6 桑黄多糖小鼠肝脏组织结构的影响

从图2可以看出,NEcon组小鼠肝脏细胞索排列整齐,条纹清洗,细胞间隙大小均匀,没有出现

炎症细胞浸润;与NEcon相比,Econ细胞索排列凌乱,细胞大小不一,细胞核被杂乱拥挤,出现了大面积的细胞空泡和炎症细胞浸润;与Econ相比,E-PLP-L、E-PLP-M、E-PLP-H的肝组织病理情况有显著改善,肝小叶结构和细胞核逐渐变得清晰,炎症浸润逐渐减少,细胞排列逐渐变得有规则,其中E-PLP-H的肝细胞大小均匀程度趋于正常水平,胞间间隙和细胞轮廓变得更加规则清晰,细胞炎症浸润得到了显著改善。结果表明,运动疲劳使得小鼠肝脏结构出现了明显病理性变化,补充桑黄多糖后可以显著改善细胞排列,细胞核形态逐渐恢复到正常对照组水平,细胞炎症浸润减少,且多糖浓度越高,肝脏细胞病理结构改善效果越显著。

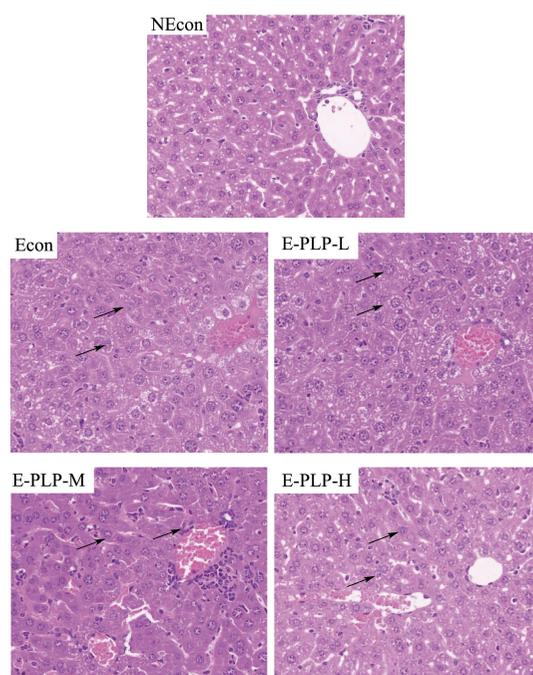


图2 桑黄多糖对运动疲劳小鼠肝脏结构病理形态的影响 (HE, 比例尺 20 μ m)

Fig.2 Effect of *Phellinus linteuse* polysaccharide on pathological morphology of liver structure in exercise fatigue mice

2.7 桑黄多糖对肝脏组织Nrf2信号通路相关基因mRNA表达水平的影响

由图3可知,与NEcon相比,Econ组小鼠肝脏中Nrf2、HO-1、NQO1的mRNA表达水平显著降低,Keap1的mRNA表达水平则显著升高 ($P < 0.05$),说明运动疲劳抑制了Nrf2信号通路上Nrf2和其下游抗氧化酶相关基因mRNA的表达。与Econ相比,补充低、中、高浓度桑黄多糖的E-PLP-L、E-PLP-M、E-PLP-H组小鼠肝脏中Nrf2、HO-1、NQO1的mRNA表达水平逐渐显著

升高 ($P < 0.05$), *Keap1* mRNA 表达水平则逐渐显著降低 ($P < 0.05$), 说明补充桑黄多糖可以激活小鼠肝脏中 Nrf2 信号通路, 提高下游抗氧化酶 *HO-1*、*NQO1* 的 mRNA 表达, 进而提高肝脏细胞的抗氧化能力, 缓解细胞的氧化应激损伤。

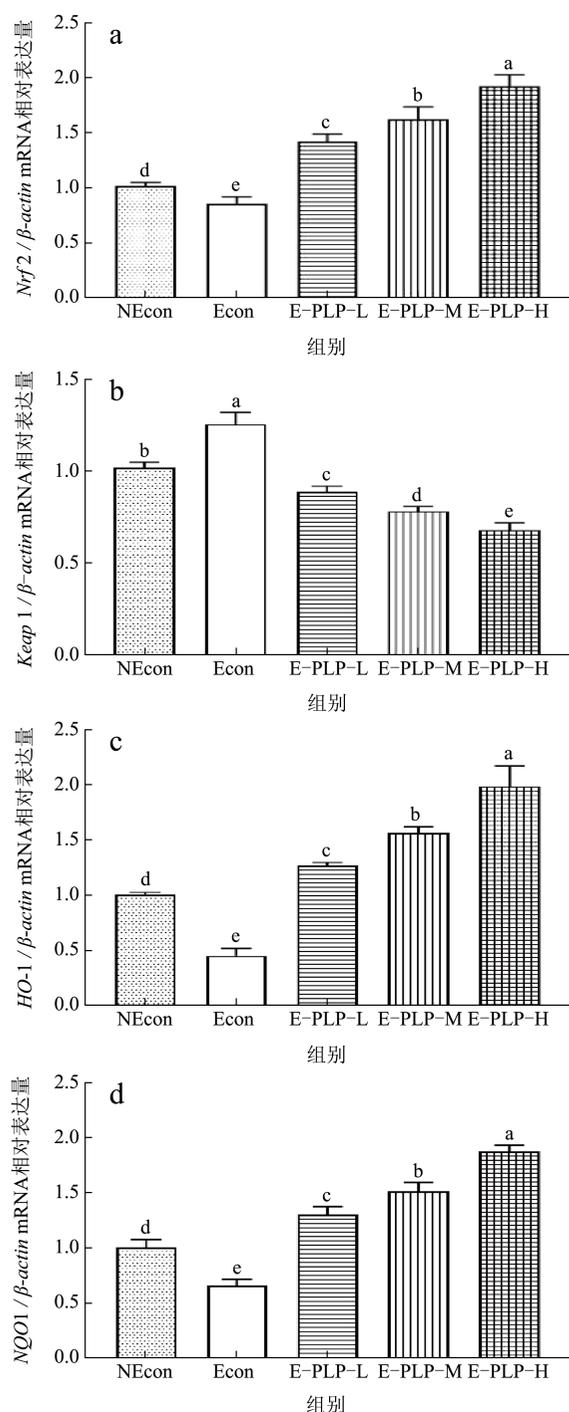


图3 桑黄多糖对运动疲劳小鼠肝脏 *Nrf2*、*Keap1*、*HO-1*、*NQO1* mRNA 表达水平的影响

Fig.3 Effect of *Phellinus linteuse* polysaccharide on the mRNA expression levels of *Nrf2*, *Keap1*, *HO-1*, and *NQO1* in the liver of exercise-induced fatigue mice

注: 柱上不同小写字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$)。

3 讨论

机体在运动疲劳状态下, 体内的糖代谢和脂质代谢机制均会发生变化, 机体的整个代谢过程中, 肝脏起着重要的调控作用^[19]。机体在运动疲劳刺激下, 肝脏线粒体内会产生大量的活性氧 (ROS), ROS 与细胞内抗氧化酶 (SOD、CAT、GSH-Px) 结合, 其清除自由基活性被抑制, 使细胞内氧化和抗氧化失衡。ROS 是诱导细胞发生氧化应激损伤最主要的物质, ROS 可攻击细胞膜上饱和脂肪酸, 发生脂质氧化反应, 产生大量脂质过氧化物丙二醛 (MDA), MDA 进一步会与细胞膜上的跨膜蛋白以及功能蛋白发生交联作用, 增大细胞膜的通透性, 从而使细胞代谢功能紊乱, 肝脏受到损伤^[20]。在本研究中, 运动疲劳模型组小鼠肝脏内 MDA 含量显著升高, SOD、CAT、GSH-Px 活性显著低于安静对照组, 细胞受到严重的氧化应激作用, 在补充桑黄多糖后, 可以显著提高抗氧化酶活性, 降低 MDA 含量, 说明桑黄多糖可以明显改善运动疲劳小鼠肝脏的氧化应激水平, 且浓度越高, 改善效果越显著。张琦等^[21]、权树琳等^[22]分别研究发现松乳菇多糖和灰树花多糖均可以提高运动疲劳小鼠肝脏抗氧化酶活性, 缓解肝脏的氧化应激损伤, 这与本研究中的桑黄多糖具有相似的功效。这些研究结果共同说明从一些不同材料中提取到的多糖对提高小鼠体内抗氧化酶活性均具有较好的作用, 但由于不同多糖其结构存在一定差异, 其表现出的抗氧化酶活性必然存在一定差异, 因此, 本研究后续将会对桑黄多糖理化性质和结构进行表征, 针对性的分析不同结构多糖对提高抗氧化酶活性的差异。

肝脏在受到氧化应激损伤过程中, 炎症因子在其中同样起着重要作用。当机体处于运动疲劳状态下, 体内的代谢组织会发出相应的响应, 诱导细胞释放炎症因子, 进而发生炎症反应, 导致肝脏组织受损。TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 是与肝脏损伤密切相关的典型细胞炎症因子, 可参与机体的免疫及病理反应^[23]。机体在受到外源刺激时, 介导促炎细胞因子应答会被激活, 从而造成肝脏细胞出现炎症症状^[24,25]。本研究中, 运动疲劳模型组小鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 出现了异常升高, 显著高于安静对照组, 说明诱发促炎细胞因子反应被激活, 肝脏组织受到了炎症损伤。此外, 在对小鼠血清中 ALT、AST 活性检测时发现, 运动疲劳模型组小鼠血清中 ALT、AST 活性显著高于安静对

对照组,说明运动疲劳使得小鼠肝脏组织细胞膜通透性增大,ALT、AST向血液中渗透。与此同时,在对肝脏组织切片染色时发现,运动疲劳模型组小鼠肝脏细胞索排列凌乱,出现了大面积的细胞炎症浸润,这些结果更加验证了肝脏组织受到了运动疲劳诱导的氧化和炎症损伤。在给运动疲劳小鼠补充桑黄多糖后,血清中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6因子水平显著降低,ALT、AST活性同样显著降低,且肝脏细胞炎症浸润逐渐减少,观察发现高浓度多糖组小鼠血清中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6因子水平和ALT、AST活性均与安静对照组不存在显著差异。结果表明补充高浓度多糖后可以明显降低运动疲劳小鼠肝脏的炎症反应,起到保肝护肝作用。陈涓慧^[26]发现生姜茎叶多糖具有降低脓毒血症小鼠血清中炎症因子水平,起到早期干预预防肝损伤,赵裕沛等^[27]研究发现葛根多糖具有降低酒精性肝损伤小鼠血清中炎症因子水平,对肝脏起到保护作用,前人的研究和本研究结果均表明多糖对小鼠的肝损伤具有一定的保护作用,不仅可以保护外源物质诱导的肝损伤还可以保护运动疲劳诱导的肝损伤。

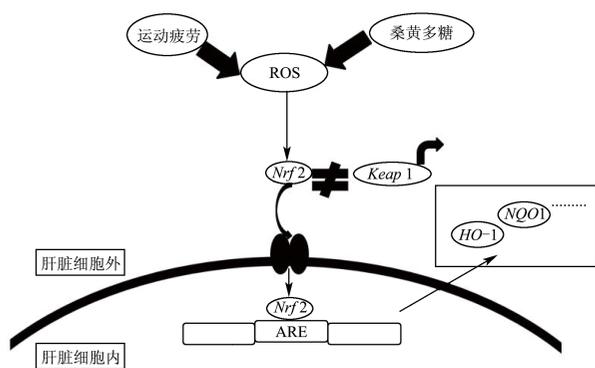


图4 桑黄多糖对运动疲劳小鼠肝损伤的保护作用机制

Fig.4 Protective mechanism of *Phellinus linteuse* polysaccharides on liver injury in exercise fatigue mice

Nrf2 信号通路是参与细胞氧化应激、免疫调节、细胞分化和凋亡最重要的信号转导通路之一^[28]。Nrf2 在肝脏组织中与氧化应激反应和炎症反应紧密联系,在介导肝脏受到氧化应激损伤时发挥重要作用。研究表明提高 Nrf2 的活性,可以激活 Nrf2 信号通路,提高下游抗氧化酶(HO-1、NQO1)高表达,清除过多的 ROS,降低细胞的氧化应激水平,保护肝脏细胞免受氧化损伤^[29]。较多的研究证实,多糖可以激活 Nrf2 信号通路,提高抗氧化酶高表达,不仅提高了小鼠的运动耐力还保护肝脏免受氧化损伤^[30]。本研究中,与安静对照组相比,运动疲

劳模型组小鼠肝脏中 *Nrf2* 基因 mRNA 表达被抑制,其下游 *HO-1*、*NQO1* 的 mRNA 表达水平显著降低,补充桑黄多糖后, *Nrf2*、*HO-1*、*NQO1* 的 mRNA 表达水平均显著提高,且随着多糖浓度的提高,其 mRNA 表达水平随之提高。由此可见,桑黄多糖可通过调控 Nrf2 信号通路来减轻肝脏的氧化应激反应,其可能作用机制见图 4。

4 结论

与运动疲劳模型组相比,桑黄多糖不仅显著降低了小鼠的肝脏系数,还显著提高了小鼠的力竭游泳时间,低、中、高浓度组力竭游泳时间分别显著提高了 15.58%、34.69%、53.06%;此外,桑黄多糖还降低了运动疲劳小鼠体内炎症因子水平,提高了抗氧化酶活性,其中高浓度组小鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平分别显著降低了 50.54%、50.51%、46.21%,ALT、AST 活性分别显著降低了 33.30%、34.57%;同时,桑黄多糖还改善了运动疲劳诱导的小鼠肝损伤。桑黄多糖对小鼠肝损伤的保护作用机制可能是通过激活肝脏内 Nrf2 信号通路,提高下游抗氧化酶基因高表达,减轻细胞的氧化应激和炎症损伤实现的。可见桑黄多糖具有开发成为运动功能饮料和保肝护肝药物的潜力。

参考文献

- [1] 董佳萍,谢琳琳,王鹤霖,等.金雀异黄酮通过 AMPK/SIRT1/PGC-1 α 信号通路缓解免疫抑制大鼠的疲劳作用[J].食品科学,2023,44(9):82-87.
- [2] 任东根,龚婷,王丽娟,等.川麦冬多糖的结构特征及对过度运动小鼠肝损伤的改善作用[J].食品与发酵工业,2024,50(2):213-223.
- [3] ZHANG L F, YANG J L, LIU W C, et al. A *Phellinus igniarius* polysaccharide/chitosan-arginine hydrogel for promoting diabetic wound healing [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 249: 126014.
- [4] JIN X, CHEN N G, ZHANG T S, et al. *Phellinus igniarius* polysaccharides induced mitochondrial apoptosis of hepatic carcinoma by enhancing reactive oxygen species-mediated AKT/p53 signalling pathways [J]. Natural Product Research, 2023, 7(16): 1-5.
- [5] QU Y D, YANG H X, LI S Y, et al. The involvement of Th1 cell differentiation in the anti-tumor effect of purified polysaccharide from *Sanghuangporus vaninii* in colorectal cancer via multi-omics analysis [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 237: 123927.
- [6] ZHU X Y, GUO R R, SU X Y, et al. Immune-enhancing

- activity of polysaccharides and flavonoids derived from *Phellinus igniarius* YASHI [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2023, 14: 1124607.
- [7] ZHANG J N, QU H Y, ZHANG J M, et al. Polysaccharide from *Phellinus igniarius* alleviates oxidative stress and hepatic fibrosis in *Schistosoma japonicum* infected mice [J]. *Zhongguo Xue Xi Chong Bing Fang Zhi Za Zhi*, 2019, 1(6): 615-621.
- [8] 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, 2015.
- [9] ZHAO L L, ZHENG L W, LI Z, et al. *Phellinus linteus* polysaccharides mediates acetaminophen-induced hepatotoxicity via activating AMPK/Nrf2 signaling pathways [J]. *Aging (Albany NY)*, 2022, 14(17): 6993-7002.
- [10] ZHANG Z F, LV G Y, CHENG J W, et al. Characterization and biological activities of polysaccharides from artificially cultivated *Phellinus baumii* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 129: 861-868.
- [11] 张珈宁, 瞿海燕, 张金梦, 等. 桑黄多糖缓解日本血吸虫感染小鼠氧化应激及肝纤维化的实验研究[J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2019, 31(6): 615-621.
- [12] NING B K, HANG S Q, ZHANG W H, et al. An update on the bridging factors connecting autophagy and Nrf2 antioxidant pathway [J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2023, 11: 1232241.
- [13] OSMAN N K, TATIANA V G. Activation of Nrf2 pathway as a protective mechanism against oxidative stress-induced diseases: Potential of astaxanthin [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2023, 741: 109601.
- [14] ZHANG Z, GAO B H. Mechanism of hyperbaric oxygen combined with astaxanthin mediating Keap1/Nrf2/HO-1 pathway to improve exercise fatigue in mice [J]. *Computational Intelligence and Neuroscience*, 2022, 2022: 6444747.
- [15] 袁满, 付婷伟, 徐晨, 等. 桑黄子实体多糖提取工艺优化及其抗氧化活性[J]. *食品工业*, 2021, 42(11): 103-108.
- [16] 李英基, 裴水廷, 熊鹏. 川赤芝多糖对运动疲劳状态下小鼠心肌组织的保护作用[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(6): 366-375.
- [17] 白海军, 王颖. 发酵法制备芸豆渣可溶性膳食纤维及其抗运动性疲劳作用研究[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(13): 367-372.
- [18] 任盼红, 聂梦俭. 鱼腥草黄酮对运动疲劳大鼠骨骼肌能量代谢的影响[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(11): 302-312.
- [19] 张海博, 顾辰杰, 张瑞婧, 等. 肝脏代谢分区研究进展 [J]. *生理科学进展*, 2022, 53(6): 447-451.
- [20] 何国林, 林曦, 吴仕娇, 等. 基于氧化应激探讨溪黄草总二萜保护肝脏线粒体、抗氧化作用研究[J]. *中药药理与临床*, 2016, 32(6): 121-126.
- [21] 张琦, 史万礼. 松乳菇多糖的液体发酵及对力竭运动大鼠肝组织保护作用[J]. *粮食与油脂*, 2022, 35(4): 150-153.
- [22] 权树琳, 张班, 徐瑞豪, 等. 灰树花子实体多糖的结构特性分析及提高小鼠的运动耐力[J]. *现代食品科技*, 2023, 39(10): 25-34.
- [23] YU X J, WANG Y T, SONG Y F, et al. AP-1 is a regulatory transcription factor of inflammaging in the murine kidney and liver [J]. *Aging Cell*, 2023, 22(7): 13858.
- [24] 胡静芸. 灌服饱和甲烷水对SD大鼠一次性力竭运动后肝脏炎症和氧化应激的影响[D]. 上海: 上海体育学院, 2019.
- [25] 张姣姣, 吐克孜·吾守尔, 黄伟伟, 等. 櫻桃李多酚抗氧化活性及对肥胖小鼠肝脏的保护作用[J]. *现代食品科技*, 2022, 38(10): 40-46.
- [26] 陈清慧. 生姜茎叶多糖的结构解析、体外消化酵解和保肝活性研究[D]. 重庆: 西南大学, 2023.
- [27] 赵裕沛, 朱益敏, 徐小勇, 等. 葛根素抑制自噬改善脂多糖诱导的小鼠肝脏损伤作用研究[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2023, 25(5): 1851-1858.
- [28] ZHANG Y, PAN S G, YI S M, et al. Gentiopicroside ameliorates CCl4-induced liver injury in mice by regulating the PPAR- γ /Nrf2 and NF- κ B/I κ B signaling pathways [J]. *Journal of International Medical Research*, 2023, 51(10): 3000605231204501.
- [29] ZHAI M M, ZHANG C X, CUI J X, et al. Electromagnetic fields ameliorate hepatic lipid accumulation and oxidative stress: potential role of CaMKK β /AMPK/SREBP-1c and Nrf2 pathways [J]. *BioMedical Engineering OnLine*, 2023, 22(1): 51.
- [30] PENG Y F, ZHAO L L, HU K, et al. Anti-fatigue effects of *Lycium barbarum* polysaccharide and effervescent tablets by regulating oxidative stress and energy metabolism in rats [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(18): 10920.