

海蚬多糖的结构及其对 CCl_4 诱导小鼠急性肝损伤的保护作用研究

蒋长兴, 李松林, 熊清平, 聂凌鸿, 陈晓明

(淮阴工学院生命科学与化学工程学院, 江苏淮安 223003)

摘要: 本文首先采用高碘酸氧化、Smith 降解、气相色谱分析、甲基化、气质联用等方法, 对海蚬多糖 (CPS) 纯化组分 (f_2 、 f_3) 结构进行解析, 研究表明, f_2 、 f_3 具有不同的糖链结构, f_2 主链由(1→3)-葡萄糖、(1→4)-葡萄糖构成, 支链为(1→2)-葡萄糖、(1→6)-葡萄糖。 f_3 主链为(1→3)-葡萄糖、(1→3)-半乳糖, 支链为(1→6)-葡萄糖。其次, 采用四氯化碳 (CCl_4) 诱导小鼠肝损伤模型对 CPS 护肝活性进行研究, 结果表明, CPS 组能够显著提高小鼠肝超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性 ($P < 0.05$), 降低小鼠血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 及肝丙二醛 (MDA) 水平 ($P < 0.05$), 表明 CPS 对 CCl_4 诱导的肝损伤小鼠具有保护作用。CPS 的护肝效果可能与其提高小鼠自身抗氧化能力以及抑制脂质过氧化有关。

关键词: 海蚬; 多糖; 结构解析; 护肝作用

文章篇号: 1673-9078(2015)10-24-28

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.10.005

Corbiculidae-derived Polysaccharide Structure and Protection against Carbon Tetrachloride-induced Liver Damage in Mice

JIANG Chang-xing, LI Song-lin, XIONG Qing-ping, NIE Ling-hong, CHEN Xiao-ming

(College of Life Science and Chemical Engineering, Huaiyin Institute of Technology, Huaian 223003, China)

Abstract: The structure of purified components (f_2 and f_3) of *Corbiculidae* polysaccharide (CPS) was studied using periodate oxidation, Smith degradation, gas chromatography (GC), methylation, and GC-mass spectrometry (MS) techniques. The results showed that f_2 and f_3 had different sugar chain structures. The main chain of f_2 was composed of a α -D-(1→3) linked glucose (Glc) and α -D-(1→4) linked Glc, with the branch being composed of α -D-(1→2) linked Glc and α -D-(1→6) linked Glc. The main chain of f_3 contained α -D-(1→3) linked Glc and α -D-(1→3) linked galactose, while the branch contained α -D-(1→6) linked Glc. The hepatoprotective activity of CPS was evaluated using a mouse model of carbon tetrachloride (CCl_4)-induced liver injury. The results showed that oral administration of CPS significantly reduced the elevated serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and liver malondialdehyde (MDA) level ($P < 0.05$) and significantly increased the activities of liver superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) ($P < 0.05$). This suggests that CPS exhibits potent hepatoprotective effects on CCl_4 -induced liver damage in mice, which may be related to the enhancement of antioxidant capacity and inhibition of lipid peroxidation in mice.

Key words: *Corbiculidae*; polysaccharide; structural elucidation; hepatoprotective effect

在正常的新陈代谢过程中, 高等生物自身会产生超氧自由基、羟自由基、过氧化物等氧自由基。这些自由基若不能被及时有效地清除, 就可能与体内不饱和脂肪酸、DNA、蛋白质等生物大分子发生氧化反应, 进而诱发癌症、糖尿病、风湿性关节炎、心血管疾病等^[1, 2]。为了减少自由基诱导产生的氧化损伤, 许多合成的和天然的抗氧化剂被广泛应用于食品工业中, 然

收稿日期: 2015-02-01

基金项目: 江苏省高校自然科学研究项目 (13KJB550004)

作者简介: 蒋长兴 (1975-), 男, 博士, 副教授, 主要从事天然产物化学、天然产物活性评价与利用等方面的研究

而, 某些人工合成的抗氧化剂 (如丁基羟基茴香醚、叔丁基对苯二酚) 会引起肝脏损伤并具有致癌性^[3]。因此, 有必要开发天然的抗氧化剂来保护人体免受自由基的损伤并延缓相关疾病的发生。近年来, 越来越多的研究表明, 动物源多糖具有较强的抗氧化活性, 可以作为新的具有潜力的抗氧化剂。

海蚬俗称蛤蜊, 属软体动物门, 为我国主要的水产贝类, 在海洋水产业中具有重要地位。海蚬肉质鲜美, 营养丰富, 富含氨基酸、多糖以及矿物质元素等。传统医学证实, 海蚬软体组织水浸提物对发炎、哮喘、口腔溃疡等病症疗效较佳^[4-5]。海蚬水提物的生理功效

可能与其所含多糖类物质有关。本文作者先前报道了海蛰多糖(CPS)的提取与纯化,得到三个组分(f_1 、 f_2 、 f_3),研究了CPS及其纯化组分体外抗氧化活性,发现CPS具有较强的还原力、金属离子螯合能力与脂质过氧化抑制活性^[6]。为了更全面研究CPS的抗氧化活性,本文采用小鼠 CCl_4 急性肝损伤模型,考察CPS对超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶、血清丙氨酸氨基转移酶、天门冬氨酸氨基转移酶以及丙二醛等小鼠生理生化指标的影响,研究CPS的体内抗氧化活性。由于 f_2 、 f_3 较 f_1 具有较强的体外抗氧化活性^[6],本文采用高碘酸氧化、Smith降解、GC、红外光谱、甲基化、气质联用等方法,对 f_2 、 f_3 基本结构进行解析,为进一步探讨 f_2 、 f_3 的结构-功效关系提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 原料

海蛰,鲜活,购于当地水产品批发市场。

1.2 动物

小白鼠(SPF级、8周龄、体重 20 ± 2 g),雄性昆明种,购于中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心(北京)(实验动物生产许可证号: D01-3023)。实验用动物全价配合饲料购于南京江浦实验动物饲料厂。小鼠饮用纯净水购于杭州娃哈哈集团公司。

1.3 试剂

蛋白质、MDA、SOD、GSH-Px、ALT、AST等指标测试试剂盒购于南京建成生物工程研究所。氯仿、丁醇、碘甲烷、国产 CCl_4 、甲醇等为分析纯试剂。

1.4 仪器

ECOM-F6124半自动生化分析仪(德国Eppendorf公司);低温高速离心机(上海安亭科学仪器厂);UV-2450紫外可见分光光度计(日本岛津公司)。

1.5 方法

1.5.1 样品制备

海蛰粗多糖及其纯化组分的制备采用已报道的方法^[6],获得纯化组分 f_2 、 f_3 在CPS含量中分别为24.9%、16.3%。

1.5.2 高碘酸氧化、Smith降解及GC分析

多糖纯化组分结构解析方法采用高碘酸氧化、Smith降解及气相色谱分析,参照Qiao等^[7]报道的方法进行。

1.5.3 甲基化反应及GC-MS分析

多糖样品甲基化及GC-MS分析,参照Liu等^[8]、Ciucanu等^[9]、Wack等^[10]报道的方法。采用GC(Varian CP3800型)-MS(Varian Saturn2200型)联用仪、DB-5MS石英毛细管柱($30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.25 \mu\text{m}$)对部分甲基化的糖醇乙酸酯进行GC-MS分析。具体条件如下:程序升温,初温 80°C ,保持1 min,以 $8^\circ\text{C}/\text{min}$ 升至 210°C ,保持1 min,再以 $20^\circ\text{C}/\text{min}$ 升至 260°C ,保持1 min。 N_2 作载气,进样口温度 250°C ,分流比1:50,柱流速 $1.0 \text{ mL}/\text{min}$ 。电子电离源(EI源) 70 eV ,倍增器电压 350 V ,灯丝电流 $250 \mu\text{A}$,接口温度 260°C ,离子源温度 180°C ,质荷比(m/z)扫描范围30~450,扫描速率 $2.5 \text{ can}/\text{sec}$ 。

1.5.4 护肝活性测试

1.5.4.1 动物实验设计

取同批次健康昆明种雌性小白鼠进行适应性饲养。7 d后,选择体质健壮、行动自如、规格一致的个体进行分组实验。共设置6组(每组8只小鼠):第I组,正常对照组;第II组,模型对照组;第III组,阳性对照组;第IV组,低剂量组;第V组,中剂量组;第VI组,高剂量组。正常对照组与模型对照组每天灌胃生理盐水($25 \text{ mL}/\text{kg BW}$);阳性对照组每天灌胃保肝药水飞蓟素($100 \text{ mg}/\text{kg BW}$);低剂量、中剂量组、高剂量组每天分别灌胃CPS 100、200与 $400 \text{ mg}/\text{kg BW}$ 。小鼠饲养环境温度 $21 \pm 2^\circ\text{C}$ 、相对湿度50~60%,保持12 h白昼12 h黑夜的昼夜循环。实验期间小鼠定量摄食($250 \text{ g}/\text{kg BW}$ 左右)、自由饮水。所有小鼠连续饲养15天,最后一次给药3 h后,除正常对照组外,所有小鼠腹腔注射 CCl_4 溶液($10 \text{ mL}/\text{kg BW}$, 0.1%大豆油配制)。8 h后,称重小鼠,断头处死,取小鼠血清和肝脏匀浆液,并置于 -20°C 冰箱保存备用。

1.5.4.2 生化指标测定

小鼠生化指标ALT、AST、SOD、GSH-Px、MDA采用商业试剂盒法进行测定。

1.5.5 统计分析

实验结果数据表示为平均值 \pm 标准差(SD),采用单因素方差分析(ANOVA)、Duncan氏多重比较法进行差异显著性分析;所有数据的分析均采用SPSS V11.5进行。

2 结果与讨论

2.1 高碘酸氧化、Smith降解及GC分析

f_2 、 f_3 高碘酸氧化、Smith降解及GC分析结果见表1,对 f_2 来说,1 mol己糖残基消耗0.900 mol高碘

酸, 释放 0.113 mol 甲酸, 表明 f_2 结构中以 1→6 键合的糖基占 11.3%, 以 1→2、1→2,6、1→4 或 1→4,6 键合的吡喃己糖基占 67.4%, 以 1→3 位键合的吡喃己糖基占 21.3%。对于 f_3 来说, 1 mol 己糖残基消耗 0.775 mol 高碘酸, 释放 0.323 mol 甲酸。表明 f_3 的糖链结构中 1→6 键合的糖基占 32.3%, 以 1→2、1→2,6、1→4 或 1→4,6 键合的吡喃己糖基 12.9%, 以 1→3 位键合的吡喃己糖基占 54.8%。

表 1 高碘酸钠消耗量和甲酸生成量

Table 1 Consumption of sodium periodate and production of formic acid in periodate oxidation

| 样品 | f_2 | f_3 |
|----------------------|-------|-------|
| 样品量/mmol | 0.124 | 0.124 |
| 反应时间/h | 48 | 48 |
| 高碘酸消耗量/mmol | 0.112 | 0.096 |
| 高碘酸消耗量/己糖量/(mol/mol) | 0.90 | 0.775 |
| 甲酸生成量/mmol | 0.014 | 0.04 |
| 甲酸生成量/己糖量/(mol/mol) | 0.113 | 0.323 |

2.2 甲基化分析

多糖甲基化程度可采用红外光谱进行判断, 3400 cm^{-1} 附近若无羟基吸收峰则表明甲基化反应已经完全。从图 1 可以看出, f_2 、 f_3 在 3400 cm^{-1} 附近的羟基吸收峰基本上消失, 说明甲基化反应已基本完全, 可用于 GC-MS 分析。 f_2 、 f_3 的 GC-MS 分析结果见图 2 与表 2。

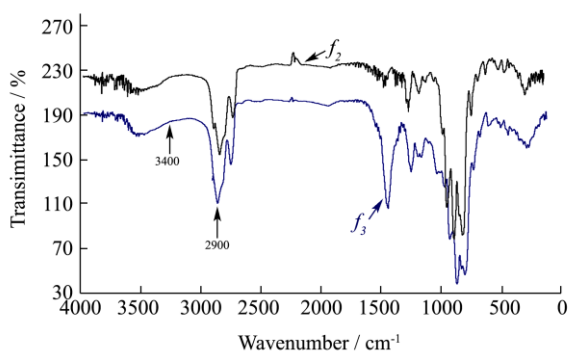


图 1 f_2 与 f_3 甲基化后的傅立叶变换红外光谱图

Fig.1 Fourier transform infrared spectra of f_2 and f_3 after methylation reaction

由图 2a 可以看出, f_2 的 GC 图谱上保留时间为 15.574 min、15.754 min、16.032 min、17.117 min、18.616 min 的 5 个峰, 对应的甲基化糖残基分别为 1,2,5,6-四-O-乙酰基-3,4-二-O-甲基-葡萄糖、1,5-二-O-乙酰基-2,3,4,6-O-四-甲基-葡萄糖、1,3,5-三-O-乙酰基-2,4,6-三-O-甲基-葡萄糖、1,4,5-三-O-乙酰基-2,3,6-三-O-甲基-葡萄糖、1,4,5,6-四-O-乙酰基-2,3-二-O-甲基-葡萄糖,

对应糖基的类型分别为 1→2,6 连接的葡萄糖、末端葡萄糖、1→3 连接的葡萄糖、1→4 连接的葡萄糖、1→4,6 连接的葡萄糖, 各键型摩尔比摩尔比约为 0.7:0.8:2.3:49.5:10.1 (表 2)。

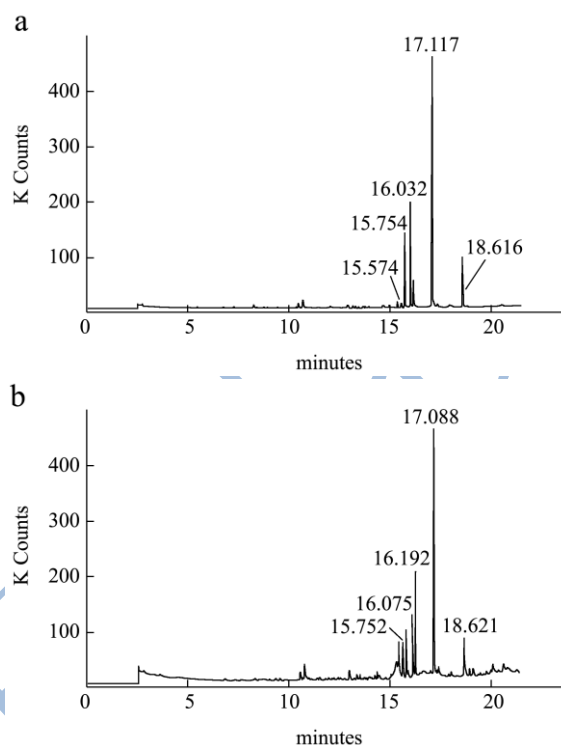


图 2 f_2 与 f_3 甲基化后 GC-MS 总离子流图

Fig.2 Total ion chromatogram of GC-MS of f_2 and f_3 after methylation reaction

由图 2b 可以看出, f_3 的 GC 图谱上保留时间为 15.752 min、16.075 min、16.192 min、17.088 min、18.621 min 的 5 个峰, 对应糖基的类型分别为末端葡萄糖、末端半乳糖、1→3 连接的葡萄糖、1→3 连接的半乳糖、1→3,6 连接的葡萄糖, 各键型摩尔比约为 3.1:1.7:1.2:16.7:3.2 (表 2)。

表 2 f_2 与 f_3 甲基化残基的 GC-MS 数据

Table 2 GC-MS data of methylated sugar residues of f_2 and f_3

| 组分 | 甲基化糖残基 | 保留时间 | 摩尔比 | 连接键型 |
|-------|----------------|--------|--------|---------------|
| f_2 | 3,4-二甲基葡萄糖 | 15.574 | 0.702 | →2,6)-Glc-(1→ |
| | 2,3,4,6-四甲基葡萄糖 | 15.754 | 0.863 | Glc-(1→ |
| | 2,4,6-三甲基葡萄糖 | 16.032 | 2.320 | →3)-Glc-(1→ |
| | 2,3,6-三甲基葡萄糖 | 17.117 | 49.536 | →4)-Glc-(1→ |
| | 2,3-二甲基葡萄糖 | 18.616 | 10.131 | →4,6)-Glc-(1→ |
| f_3 | 2,3,4,6-四甲基葡萄糖 | 15.752 | 3.123 | Glc-(1→ |
| | 2,3,4,6-四甲基半乳糖 | 16.075 | 1.667 | Gal-(1→ |
| | 2,4,6-三甲基葡萄糖 | 16.192 | 1.188 | →3)-Glc-(1→ |
| | 2,4,6-三甲基半乳糖 | 17.088 | 16.719 | →3)-Gal-(1→ |
| | 2,4-二甲基葡萄糖 | 18.621 | 3.195 | →3,6)-Glc-(1→ |

2.3 护肝活性研究

2.3.1 CPS 对 CCl₄ 诱导肝损伤小鼠血清 ALT、AST 活性的影响

肝脏中富含各种酶类。ALT 分布于细胞浆内,而 AST 主要分布于细胞浆和线粒体中。当肝脏组织被损伤,破坏或者坏死时,ALT、AST 便会从肝脏细胞中逸出并进入到血液中,导致血清 ALT、AST 活性提高。因此,血清 ALT、AST 活性的升高是肝损伤的重要标志。通过测定血清 ALT、AST 活性可以初步判断 CCl₄ 诱导肝损伤模型的好坏以及药物的护肝效果。各组小鼠血清 ALT、AST 活性的测定结果见表 3。

由表 3 可以看出,与正常对照组相比,模型对照组能够显著提高小鼠血清 ALT、AST 活性 ($P < 0.05$),表明本实验的小鼠 CCl₄ 诱导肝损伤模型建立成功。与模型对照组相比,CPS 能够显著降低小鼠血清 ALT、AST 活性 ($P < 0.05$),并随着 CPS 剂量提高,小鼠血清 ALT、AST 活性逐渐降低。

在 CCl₄ 的肝损伤模型中,CCl₄ 被注射到实验动物体内后,在肝实质细胞中积累,并被肝微粒体细胞色素 P-450 激活生成三氯甲基自由基。三氯甲基自由基与氧分子进一步反应生成毒性更强的三氯甲基过氧自由基。这些自由基既能够与肝细胞内生物大分子发

生共价结合,也可攻击细胞膜上的不饱和脂质,引起脂质过氧化,最终导致肝细胞膜结构与功能的破坏^[11]。CPS 能够显著降低小鼠血清 AST、ALT 活性,表明 CPS 对 CCl₄ 诱导的小鼠肝损伤具有一定保护作用。

2.3.2 CPS 对 CCl₄ 诱导肝损伤小鼠肝 SOD、GSH-Px 活性的影响

较多研究表明,活性氧自由基在各种肝病的发病机理占有极其重要的地位^[12]。肝细胞解毒脱毒过程往往伴随着大量活性氧自由基产生,生成的活性氧自由基反过来会攻击肝细胞中诸如 DNA、蛋白质、不饱和脂类等大分子物质,造成肝细胞膜功能紊乱甚至肝细胞死亡^[13]。超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶等一些抗氧化酶被认为是机体应对活性氧自由基的主要防御体系。超氧化物歧化酶能够将超氧自由基还原成过氧化氢和氧分子,与其它的抗氧化物酶一起组成了氧自由基防御体系。谷胱甘肽过氧化物酶能够将体内的过氧化氢催化还原成水和氧气,从而避免羟自由基的形成^[14]。在 CCl₄ 诱导的小鼠肝损伤模型中,肝超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶等抗氧化酶活性在一定程度上反映了肝脏受自由基破坏以及脂质过氧化的损伤程度。各组小鼠肝 SOD、GSH-Px 活性的测定结果见表 3。

表 3 CPS 对肝损伤小鼠 ALT、AST、SOD、GSH-Px、MDA 活性的影响 ($\bar{x} \pm SD$)

Table 3 Effect of CPS on activities of ALT, AST, SOD, GSH-Px, and MDA in liver injury mice

| 组别 | ALT/(Units/L) | AST/(Units/L) | SOD/(U/mg protein) | GSH-Px/(U/mg protein) | MDA/(nmol/mg protein) |
|-----|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| I | 30.45 ± 9.14 ^c | 60.82 ± 13.63 ^d | 796.76 ± 105.98 ^a | 1336.44 ± 252.19 ^a | 0.40 ± 0.07 ^c |
| II | 240.55 ± 44.09 ^a | 245.78 ± 73.22 ^a | 319.40 ± 24.04 ^c | 376.03 ± 38.77 ^e | 1.08 ± 0.16 ^a |
| III | 129.15 ± 60.29 ^d | 63.48 ± 12.27 ^d | 745.82 ± 73.07 ^a | 1145.37 ± 225.87 ^b | 0.58 ± 0.13 ^{bc} |
| IV | 202.32 ± 7.14 ^{ab} | 129.36 ± 16.11 ^b | 315.50 ± 63.14 ^d | 523.43 ± 75.55 ^d | 9.82 ± 0.27 ^a |
| V | 181.17 ± 33.81 ^b | 105.28 ± 23.12 ^c | 398.45 ± 70.18 ^c | 680.95 ± 87.13 ^c | 0.81 ± 0.12 ^{ab} |
| VI | 150.78 ± 22.33 ^c | 79.86 ± 44.23 ^{cd} | 478.62 ± 75.56 ^b | 702.39 ± 111.15 ^c | 0.54 ± 0.15 ^c |

注:同一列中的字母(a-e)代表不同处理之间的差异显著性。不同字母表示两处理之间差异显著($P < 0.05$)。

由表 3 可以看出,CPS 能够显著提高小鼠肝 SOD、GSH-Px 活性 ($P < 0.05$),并随着多糖剂量提高,小鼠肝 SOD、GSH-Px 活性呈上升趋势,表明 CPS 对 CCl₄ 诱导的小鼠肝损伤具有一定的保护作用。另外,CPS 实验组小鼠肝 SOD、GSH-Px 活性低于阳性药物水飞蓟素组,表明 CPS 具有中等强度的肝损伤保护作用。

2.3.3 CPS 对 CCl₄ 诱导肝损伤小鼠肝中 MDA 水平的影响

MDA 是脂质氧化的主要降解产物,可进一步破坏肝细胞的组织结构,甚至导致肝细胞坏死。肝中 MDA 水平可以间接反映自由基对肝组织的破坏程度。

各组小鼠肝 MDA 水平的测定结果见表 3。由表 3 可以看出,CPS 能够显著降低小鼠肝 MDA 水平 ($P < 0.05$)。CPS 高剂量组能够显著降低小鼠肝 MDA 水平,随着多糖剂量提高,小鼠肝 MDA 水平呈下降趋势。表明 CPS 具有提高肝脏抗氧化能力、减少脂质过氧化物生成的作用。

3 结论

采用高碘酸氧化、Smith 降解、GC 分析、甲基化、气质联用等方法,对 CPS 中纯化的两个组分结构进行解析,研究表明, f_2 、 f_3 具有不同的糖链结构, f_2 主链由(1→3)-葡萄糖、(1→4)-葡萄糖构成,支链为(1→2)-

葡萄糖、(1→6)-葡萄糖。 f_3 主链为(1→3)-葡萄糖、(1→3)-半乳糖,支链为(1→6)-葡萄糖。采用 CCl_4 诱导肝损伤模型小鼠对 CPS 护肝活性进行评价。结果表明,与正常对照组相比,模型对照组能够显著提高小鼠血清 ALT、AST 活性,降低肝 SOD、GSH-Px 活性 ($P<0.05$),说明小鼠 CCl_4 诱导肝损伤模型建立成功。与模型对照组相比,CPS 能够显著提高小鼠肝 SOD、GSH-Px 活性,降低小鼠肝 MDA 水平 ($P<0.05$),表明 CPS 对 CCl_4 诱导的肝损伤小鼠具有保护作用。CPS 的护肝效果可能与 CPS 提高小鼠自身抗氧化能力以及抑制脂质过氧化有关。

参考文献

- [1] Jie Gao, Ting Zhang, Zheng Yu Jin, et al. Structural characterisation, physicochemical properties and antioxidant activity of polysaccharide from *Lilium lancifolium* Thunb [J]. Food Chemistry, 2015, 169 (15): 430-438
- [2] Yanfei Sun, Xingbin Yang, Xinshan Lu, et al. Protective effects of Keemun black tea polysaccharides on acute carbon tetrachloride-caused oxidative hepatotoxicity in mice [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 58(0): 184-192
- [3] Jun Liu, Jian guang Luo, Hong Ye, et al. Production, characterization and antioxidant activities in vitro of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3 [J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 78(2): 275-281
- [4] Min-Cheol Kang, Sung-Myung Kang, Ginnae Ahn, et al. Protective effect of a marine polyphenol, dieckol against carbon tetrachloride-induced acute liver damage in mouse [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2013, 35(3): 517-523
- [5] 胡聪聪.青蛤多糖提取的条件优化及其抗肿瘤活性研究[J].中国民族民间医药,2010,19(10):28-29
HU Cong-cong. Extraction and antioxidant and anticancer activity of polysaccharides from *cyclina sinensis* [J]. Chinese Journal of Ethnomedicine and Ethnopharmacy, 2010, 19(10): 28-29
- [6] 蒋长兴,焦云鹏,熊清平等.海蜇多糖性质及抗氧化活性研究[J].食品与生物技术学报,2013,32(10):1091-1096
IANG Chang-xing, JIAO Yun-peng, XIONG Qing-Ping, et al. Characterization and Antioxidant Activity in Vitro of Polysaccharides from Chinese Venus [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2013, 32(10): 1091-1096
- [7] Qiao D, Liu J, Ke C, et al. Structural characterization of polysaccharides from *Hyriopsis cumingii* [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 82(4): 1184-1190
- [8] Liu Jun, Luo Jianguang, Ye Hong, et al. Medium optimization and structural characterization of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3 [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 79(1): 206-213
- [9] Ionel Ciucanu, Francisc Kerek. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates [J]. Carbohydrate Research, 1984, 131(2): 209-217
- [10] Maren Wack, Wolfgang Blaschek. Determination of the structure and degree of polymerisation of fructans from *Echinacea purpurea* roots [J]. Carbohydrate Research, 2006, 341(9): 1147-1153
- [11] Richard O Recknagel, Eric A Glende Jr, James A Dolak, et al. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity [J]. Pharmacology & therapeutics, 1989, 43(1): 139-154
- [12] Nagata Kiyoshi, Suzuki Hiroyuki, Sakaguchi Shuhei. Common pathogenic mechanism in development progression of liver injury caused by non-alcoholic or alcoholic steatohepatitis [J]. The Journal of Toxicological Sciences, 2007, 32(5): 453-468
- [13] Dan Gan, Liping Ma, Changxing Jiang, et al. Medium optimization and potential hepatoprotective effect of mycelial polysaccharides from *Pholiota dinghuensis* Bi against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice [J]. Food and Chemical Toxicology, 2012, 50(8): 2681-2688
- [14] Hao Yu, Lingli Zheng, Lianhong Yin, et al. Protective effects of the total saponins from *Dioscorea nipponica* Makino against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice through suppression of apoptosis and inflammation [J]. International Immunopharmacology, 2014, 19(2): 233-244