

牛樟芝多糖对 HepG2 细胞酒精性氧化损伤的保护作用

杨彬君¹ 冯彩玲¹ 吴岩斌¹ 易骏² 吴锦忠¹ 吴建国¹

①福建中医药大学药学院 福建 福州 350122

②福建教育学院理科部 福建 福州 350001

摘要: 研究了不同剂量 (100、200 和 400 μg/mL) 的牛樟芝粗多糖 (CP) 和醇提物后的水提物 (WEE) 对酒精诱导的 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用。研究表明: 与模型组比较, 各剂量组的 CP 和 200、400 μg/mL 的 WEE 均能极显著提高 HepG2 细胞的细胞活力。100 μg/mL 的 CP 和 WEE 均能极显著降低细胞培养液的 ALT 水平; 200 和 400 μg/mL 的 CP 和 WEE 均能显著降低细胞培养液的 ALT、AST 水平, 同时提高胞内的 CAT 活力; 200 和 400 μg/mL 的 WEE 及 400 μg/mL CP 能明显提高胞内的 SOD 活力。此外, WEE 各剂量组和 400 μg/mL CP 中的胞内 ROS 水平显著下降。CP 中含有甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、岩藻糖 5 种单糖, 摩尔比为 1:0.1622:6.651:2.646:0.3929。WEE 和 CP 能提高细胞的抗氧化应激能力, 降低胞内 ROS, 对酒精诱导的 HepG2 细胞氧化损伤起到明显的保护作用, 提示多糖是牛樟芝解酒保肝的重要活性成分之一。

关键词: 牛樟芝, 多糖, HepG2 细胞, 酒精性肝损伤, 活性氧, 保护作用

[引用本文] 杨彬君, 冯彩玲, 吴岩斌, 易骏, 吴锦忠, 吴建国, 2021. 牛樟芝多糖对 HepG2 细胞酒精性氧化损伤的保护作用. 菌物学报, 40(6): 1549-1560

Yang BJ, Feng CL, Wu YB, Yi J, Wu JZ, Wu JG, 2021. Protective effect of *Taiwanofungus camphoratus* polysaccharides on alcohol-induced oxidative injury in HepG2 cells. Mycosystema, 40(6): 1549-1560

基金项目: 国家自然科学基金 (81700524); 福建省自然科学基金 (2019J01341)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81700524), and Natural Science Foundation of Fujian Province (2019J01341).

✉ Corresponding author. E-mail: wjg1419@126.com

ORCID: WU JIAN-Guo (0000-0001-6809-7169)

✉ Contributed equally to this work.

Received: 2020-12-04, accepted: 2020-12-29

Protective effect of *Taiwanofungus camphoratus* polysaccharides on alcohol-induced oxidative injury in HepG2 cells

YANG Bin-Jun¹ FENG Cai-Ling¹ WU Yan-Bin¹ YI Jun² WU Jin-Zhong¹
WU Jian-Guo¹

①School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China

②Department of Science, Fujian Institute of Education, Fuzhou, Fujian 350001, China

Abstract: The protective effect of different doses (100, 200 and 400 µg/mL) of water extract after extraction by ethanol (WEE) and crude polysaccharide (CP) from *Taiwanofungus camphoratus* on alcohol-induced HepG2 cell injury was investigated. Compared with the model experimental group, various doses of CP and 200 and 400 µg/mL of WEE could significantly improve cellular viability. 100 µg/mL CP and WEE could significantly reduce the alanine aminotransferase (ALT) level in culture medium. 200 and 400 µg/mL of CP and WEE could notably reduce ALT and aspartate aminotransferase (AST) level in culture medium, and simultaneously improve the intracellular catalase (CAT) activity. 200 and 400 µg/mL WEE and 400 µg/mL CP could remarkably increase the intracellular superoxide dismutase (SOD) activity. Treatment with various doses of WEE and 400 µg/mL of CP conspicuously reduced the intracellular reactive oxygen species (ROS) level. CP was consisted of 5 monosaccharides, including mannose, rhamnose, glucose, galactose and fucose with the molar ratio of 1:0.1622:6.651:2.646:0.3929. Results proved that WEE and CP could increase the cellular response to oxidative stress and reduce the intracellular ROS level to protect HepG2 cell from oxidative injury induced by alcohol prominently, suggesting that CP was one of the main active ingredients responsible for drunkenness-alleviating and liver-protecting effects.

Key words: *Taiwanofungus camphoratus*, polysaccharide, HepG2 cells, alcoholic liver injury, reactive oxygen species, protective effect

肝脏是酒精的主要代谢器官，长期酗酒会导致肝功能紊乱等酒精性肝病，进而演变为酒精性肝炎、肝纤维化，最后甚至形成肝硬化和肝癌（Dugum & Mccullough 2015；Wang *et al.* 2018）。近年来，由于生活水平的不断提高，酒精性肝病逐年递增，已成为继病毒性肝炎之后肝损伤的第二大诱因（Nimanthan & Day 2007）。酒精性肝病的病理

学机制目前尚不十分明确，现认为主要与氧化应激、细胞因子、脂质过氧化、线粒体功能障碍和内质网应激等有关（丁晓东 2012），其中氧化应激在酒精性肝损伤的发生和发展起到重要作用（Chen *et al.* 2020）。目前临床上酒精性肝损伤仍无令人满意的有效药物（Anstee *et al.* 2011）。寻找一种能有效提高肝脏抗氧化应激能力并缓解肝损伤的药物，

是防治酒精性肝病的重要手段 (Yi *et al.* 2020)。

牛樟芝 *Taiwanofungus camphoratus* (M. Zang & C.H. Su) Sheng H. Wu *et al.* 又称为牛樟芝、樟生薄孔菌、牛樟菇、红樟芝、樟菇、樟菰、樟窟内菰 (戴玉成和李玉 2011; Wu *et al.* 2012), 生长在台湾本土特有树种牛樟树腐朽心材内壁上的一种真菌 (Geethangili & Tzeng 2011)。牛樟芝在台湾民间用于治疗肝病具有很长的历史, 现代研究表明牛樟芝含有多糖、三萜、甾体、琥珀酸及马来酸衍生物以及泛醌衍生物等多种活性物质, 具有解酒保肝、抗氧化、免疫调节、抗炎、抗肿瘤等作用 (Hu *et al.* 2014; Wu *et al.* 2019)。本文探讨了牛樟芝不同提取物包括醇提物、水提物、醇提后水提物和多糖对酒精诱导的 HepG2 细胞损伤的保护作用, 旨在阐明牛樟芝解酒保肝的活性部位, 为其开发利用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 仪器: MS105DU 万分之一天平, 瑞士 METTLER TOLEDO 公司; SFG-02B 电热恒温鼓风干燥箱, 黄石市恒丰医疗器械有限公司; KQ-300 DE 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; VCX130 超声波细胞粉碎仪, 美国 SONICS 公司; Agilent 1200 高效液相色谱, 美国安捷伦公司; 353040-16029 细胞培养箱, 美国赛默飞公司; SW-CJ-IF 超净工作台, 苏净集团苏州安泰空气技术有限公司; TECAN M200 酶标仪, 瑞士帝肯集团公司; DMIL/DFC295 倒置显微镜, 德国 Leica 公司。

1.1.2 药材和试剂: 牛樟芝由汕头市君研生物科技有限公司提供, 经吴锦忠教授鉴定为多孔菌科、薄孔菌属牛樟芝子实体; 核糖醇 (批

号: K22F8S29663)、岩藻糖 (批号: ASIM7L15555), 上海源叶生物科技有限公司; 阿拉伯糖 (批号: 15011315)、鼠李糖 (批号: 14102217), 上海士锋生物科技有限公司; 葡萄糖 (批号: D0806AS)、甘露糖 (批号: M0425AS), 大连美伦生物技术有限公司; 半乳糖 (批号: 100226-201105), 中国食品药品检定研究院; 色谱级乙腈, 德国默克公司; MEM 培养基、胎牛血清 (FBS)、胰蛋白酶、双抗 (青霉素、链霉素), 美国 Gibco 公司; 磷酸盐缓冲液 (PBS), 新西兰 Hyclone 公司; 活性氧 (ROS) 检测试剂盒, 凯基生物科技发展有限公司; 唑啉酮 (PMP)、二甲基亚砜 (DMSO)、3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 谷丙转氨酶 (ALT) 测定试剂盒、谷草转氨酶 (AST) 测定试剂盒、超氧化物歧化酶 (SOD) 测定试剂盒、过氧化氢酶 (CAT) 测定试剂盒, 南京建成生物工程研究所。

1.2 不同提取物的制备

牛樟芝药材切片干燥, 粉碎后过 40 目筛, 60℃干燥至恒重。牛樟芝粉末 20g 加入 400mL 的 95%乙醇回流提取 3 次, 每次 2h, 滤液浓缩真空干燥即得牛樟芝醇提物 (ethanol extraction, EE), 药渣继续加入 400mL 蒸馏水回流提取 3 次, 每次 2h, 滤液浓缩后真空干燥泵干燥即得牛樟芝醇提后的水提物 (water extract after extraction by ethanol, WEE)。牛樟芝粉末加入 400mL 的蒸馏水回流提取 3 次, 每次 2h, 滤液浓缩真空干燥即得牛樟芝水提物 (water extraction, WE)。牛樟芝水提物加适量水超声溶解, 加入无水乙醇至醇浓度为 80%, 4℃放置 12h, 离心 (3 000r/min, 15min), 沉淀以无水乙醇、丙酮洗涤两次, 除去脂溶性成分、色素等, 离心, 60℃干燥即得牛樟芝粗多糖 (crude

polysaccharide, CP)。以葡萄糖作为标准品,多糖的总糖含量为 $(55.42 \pm 2.13)\%$ (杨彬君等 2019)。

1.3 不同提取物对酒精诱导 HepG2 细胞的保护作用

1.3.1 细胞的培养: HepG2 细胞培养于含 10% FBS, 1% 双抗的 MEM 培养基中, 置于 5% CO₂、37℃ 的培养箱中培养。待细胞铺满 80% 培养瓶时, 采用 1 mL 0.25% 胰酶消化 2 min, 加入培养基终止消化, 吹打, 离心, 以 1:3 的比例传代, 继续培养用于后续实验。

1.3.2 不同浓度酒精和提取物对 HepG2 细胞活力的影响: 取对数生长期的 HepG2 细胞, 调整细胞浓度为 2×10^5 个/mL, 将细胞接种于 96 孔板中, 每孔 100 μ L, 于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h, 弃去培养基, 加入含有不同浓度的酒精和牛樟芝提取物培养基 100 μ L, 酒精终浓度为 2%、4%、5%、5.5%、6%、7% 和 8%。WE、WEE 和 CP 终浓度为 50、100、200、300、400、600 和 800 μ g/mL, EE (以 DMSO 助溶, 含量低于 1%) 终浓度为 25、50、100、200、300 和 400 μ g/mL, 每个浓度设置 6 个平行, 细胞培养箱中培养 12 h, 弃去培养基, 加入 1 mg/mL 的 MTT 溶液 100 μ L, 37℃ 继续培养 4 h 后, 弃去 MTT 溶液, 加入 150 μ L DMSO 溶液, 振荡 60 s, 使甲臞颗粒溶解完全, 使用酶标仪 570 nm 处测定吸光度, 按照下列公式计算相对细胞活力。

$$\text{细胞相对活力}(\%) = \frac{A_{\text{处理组}}}{A_{\text{空白组}}} \times 100\%$$

式中: $A_{\text{处理组}}$ 为不同处理组的平均吸光度值, $A_{\text{空白组}}$ 为空白组的平均吸光度值。

1.3.3 不同提取物对酒精诱导 HepG2 细胞的保护作用: 取对数生长期的 HepG2 细胞, 调整细胞浓度为 2×10^5 个/mL, 将细胞接种于 96 孔板中, 每孔 100 μ L, 于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h, 弃去培养基。将细胞分为

空白组, 模型组, 不同提取物低、中、高剂量组, EE (6.25、12.5 和 25 μ g/mL), WE (75、150 和 300 μ g/mL), WEE 和 CP (100、200 和 400 μ g/mL)。空白组和模型组给予空白培养基, 各给药组给予不同浓度的提取物, 于 37℃、5% CO₂ 中培养 12 h 后, 吸弃各组培养基, 空白组加入空白培养基, 模型组和各不同提取物给药组给予 5.5% 酒精, 继续培养 12 h 后, 按照 1.3.2 方法测定吸光度, 计算相对细胞活力。

1.3.4 WEE 和 CP 对酒精诱导的 HepG2 细胞各生化指标的影响: 取对数生长期的细胞, 调整细胞浓度为 4×10^5 个/mL, 将细胞接种于培养瓶中, 每瓶 5 mL, 于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h, 弃去培养基, PBS 清洗, WEE 和 CP 按照 1.3.3 给药方式进行处理, 于 1 500 r/min 离心 3 min 收集细胞培养基上清液待测。细胞用 PBS 清洗两次, 0.25% 胰酶消化细胞, 取 PBS 500 μ L 收集细胞, 细胞超声破碎仪破碎细胞 (功率 130 W, 3 s/次, 间隔 5 s, 持续 2 min)。参照 ALT、AST 试剂盒方法测定细胞培养液 ALT、AST 水平, 参照 SOD、CAT 试剂盒方法测定胞内 SOD、CAT 活性, 采用考马斯亮蓝法测定细胞内总蛋白含量。

1.3.5 WEE 和 CP 对胞内 ROS 含量的影响: 活性氧采用荧光探针 DCFH-DA 进行检测。取对数生长期的细胞, 以 2×10^5 /mL 接种于 96 孔板中, 每孔 100 μ L, 于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h, 弃培养基, PBS 清洗, 将细胞分为空白组、模型组、WEE 和 CP (100、200 和 400 μ g/mL) 处理组, 按照 1.3.3 给药方式进行处理, 弃培养基后, 加入 10 μ mol/L 的 DCFH-DA 荧光探针溶液 100 μ L, 于 37℃ 培养箱中孵育 20 min, 无血清的培养基洗涤 3 次, 每孔加入 PBS 100 μ L, 酶标仪检测荧光强度, 设置激发波长 488 nm, 发射波长 525 nm, 实验结果以给药组与空白组的平均荧光强度比

表示。

1.4 HPLC 柱前衍生生化法检测 CP 的单糖组成

1.4.1 多糖的水解及 PMP 衍生化：精密称取牛樟芝多糖 10mg 于具塞试管中，加入 2mL 的 2mol/L 三氟乙酸，密封，于 110℃水解 2h，取出冷却至室温，3mol/L 氢氧化钠中和至 pH 为 7.0，蒸馏水定容至 5mL，进行 PMP 衍生化。精密称量葡萄糖 5.88mg、半乳糖 1.85mg、鼠李糖 1.36mg、甘露糖 1.55mg、阿拉伯糖 1.35mg、岩藻糖 1.18mg，10%甲醇定容至 5mL，混匀，即得标准品混合溶液，取 200μL 标准品混合溶液，加入 0.3mol/L 氢氧化钠 200μL，0.5mol/L PMP 200μL，混匀后于 70℃水浴 100min，取出冷却 10min，加入 200μL 0.3mol/L 盐酸和 200μL 蒸馏水，吹打混匀后，加入 1mL 氯仿萃取，弃去氯仿层，重复 3 次，上清液用 0.22μm 滤头过滤待测。CP 水解液取 200μL，按上述“加入 0.3mol/L 氢氧化钠 200μL”起操作，制备多糖样品的供试溶液（秦亚东等 2015）。

1.4.2 HPLC 色谱条件：CP 经水解衍生化后采用以下色谱条件进行分析：色谱柱为 YMC-Pack-ODS-A C18（250nm×4.6mm×5μm），柱温 30℃，检测波长 250nm，流速 1mL/min，流动相乙腈-0.1mol/L 醋酸铵，洗脱程序见表 1。

表 1 色谱洗脱程序

Table 1 The chromatographic elution procedure

时间 Time (min)	乙腈 Acetonitrile (%)	0.1mol/L 醋酸铵 0.1mol/L spiritus mindereri (%)
0	17	83
20	19	81
70	19	81

1.4.3 线性关系考察：各单体标准品称量混合，配成的标准单糖混合溶液按照 1.4.1 的方法进行衍生化处理后进行 HPLC 分析，以峰面

积和进样量建立回归方程。

1.4.4 方法学考察：标准单糖混合溶液进行衍生化后，连续进样 6 针，计算其相对标准偏差 RSD，测得精密度。CP 平行 6 份进行水解和衍生化后 HPLC 测定，计算各单糖含量的 RSD 值，测得重复性。CP 经水解衍生化后于 2、4、6、8、10、12、24h 分别进样，通过峰面积计算 RSD 值，测得稳定性。称取 6 份 CP，每份 10mg，加入单糖标准品适量水解并衍生化，计算各单糖的加样回收率。

1.5 统计分析

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS21.0 统计软件对实验数据进行统计分析。采用单因素方差分析（ONE-WAY ANOVA）检验进行组间比较， $P < 0.05$ 表示差异显著， $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 不同牛樟芝提取物的得率

牛樟芝不同提取物的得率分别为：EE[(35.47±0.15)%]、WE[(11.74±0.01)%]、WEE[(5.08±0.04)%]和 CP[(3.02±0.09)%]。EE 的得率最高，表明牛樟芝醇溶性小分子含量相对较高；直接对牛樟芝进行水提，WE 得率为 11.74%，经过醇提后再水提，水提物的得率下降为 5.08%。CP 含量为 3.02%，表明牛樟芝中多糖等生物大分子化合物含量相对较低。

2.2 不同浓度的酒精和牛樟芝提取物对 HepG2 细胞的影响

随着酒精浓度的增大，细胞活力逐渐降低，酒精浓度≥5%对细胞增殖出现明显的抑制作用；5.5%酒精对细胞增殖具有明显的抑制作用，抑制率达到 36.65%；6%酒精抑制率高达 78.11%，与空白组比较具有极显著差异（图 1）。构建细胞氧化应激模型，应当选择细胞活力在 50%–70%之间的浓度作为造模浓度，细胞存活率过高则损伤不明显，

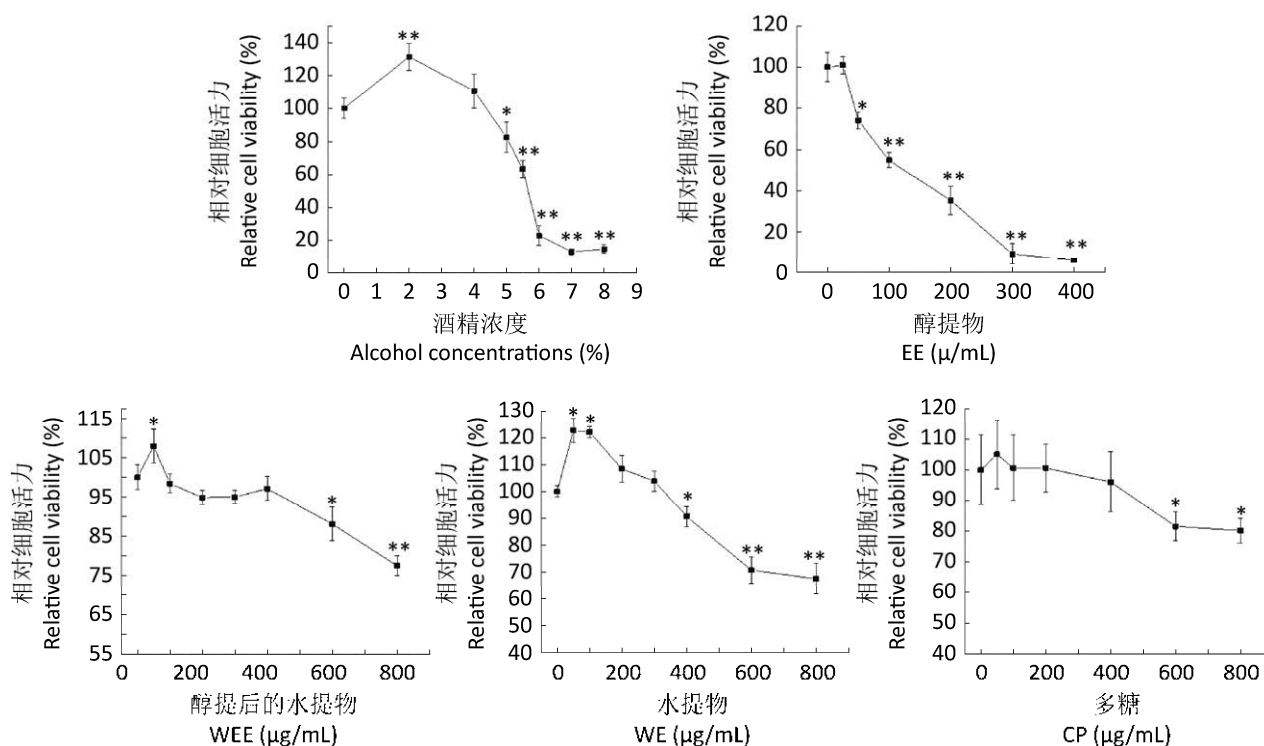


图 1 不同浓度的酒精和牛樟芝提取物对 HepG2 细胞增殖的影响 (n=6, 12h) 与空白组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

Fig. 1 The effects of different concentration of alcohol and extracts from *Taiwanofungus camphoratus* on the proliferation of HepG2 cells (n=6, 12h). * $P<0.05$, ** $P<0.01$, versus control. EE, ethanol extract; WEE, water extract after extraction by ethanol; WE, water extract; CP, crude polysaccharide.

存活率过低则细胞可能发生严重的不可逆损伤,不利于后期实验 (Hu *et al.* 2014)。因此,本实验选择 5.5% 的酒精作用 12h 诱导 HepG2 细胞酒精性氧化损伤。与空白组相比, $EE \leq 5 \mu\text{g/mL}$ 、 $WE \leq 400 \mu\text{g/mL}$ 、 $WEE \leq 300 \mu\text{g/mL}$ 和 $CP \leq 400 \mu\text{g/mL}$ 对细胞增殖无显著的抑制作用,当 EE 浓度 $\geq 50 \mu\text{g/mL}$ 开始对细胞表现出显著的抑制作用, IC_{50} 为 $109.19 \mu\text{g/mL}$,说明 EE 具有较强的细胞毒活性; $50 \mu\text{g/mL}$ WEE 和 50 、 $100 \mu\text{g/mL}$ WE 还表现出明显的促进细胞增殖的作用。而随着提取物浓度的增加,各不同提取物均表现出显著或极显著的细胞增殖抑制作用。因此,各不同提取物的预处理浓度分别为: EE (6.25 、 12.5 和 $25 \mu\text{g/mL}$), WEE (100 、 200 和 $400 \mu\text{g/mL}$), WE (100 、 200

和 $300 \mu\text{g/mL}$) 和 CP (100 、 200 和 $400 \mu\text{g/mL}$)。

2.3 不同浓度的牛樟芝提取物对 HepG2 细胞活力的影响

与空白组比较,模型组细胞活力明显下降。与模型组比较,不同浓度的 EE 和 WE 预处理组细胞活力均无显著性变化;而 200 、 $400 \mu\text{g/mL}$ WEE 和 100 、 200 、 $400 \mu\text{g/mL}$ CP 预处理均能极显著提高细胞活力,对酒精诱导的 HepG2 细胞损伤具有明显的保护作用 (图 2)。本文通过检测 WEE 和 CP 对酒精诱导 HepG2 细胞损伤生化指标的影响,进一步明确其保肝活性。实验结果表明 WEE 和 CP 均表现出明显的细胞酒精性损伤保护作用,提示 CP 是牛樟芝中解酒保肝的重要活性成分之一。

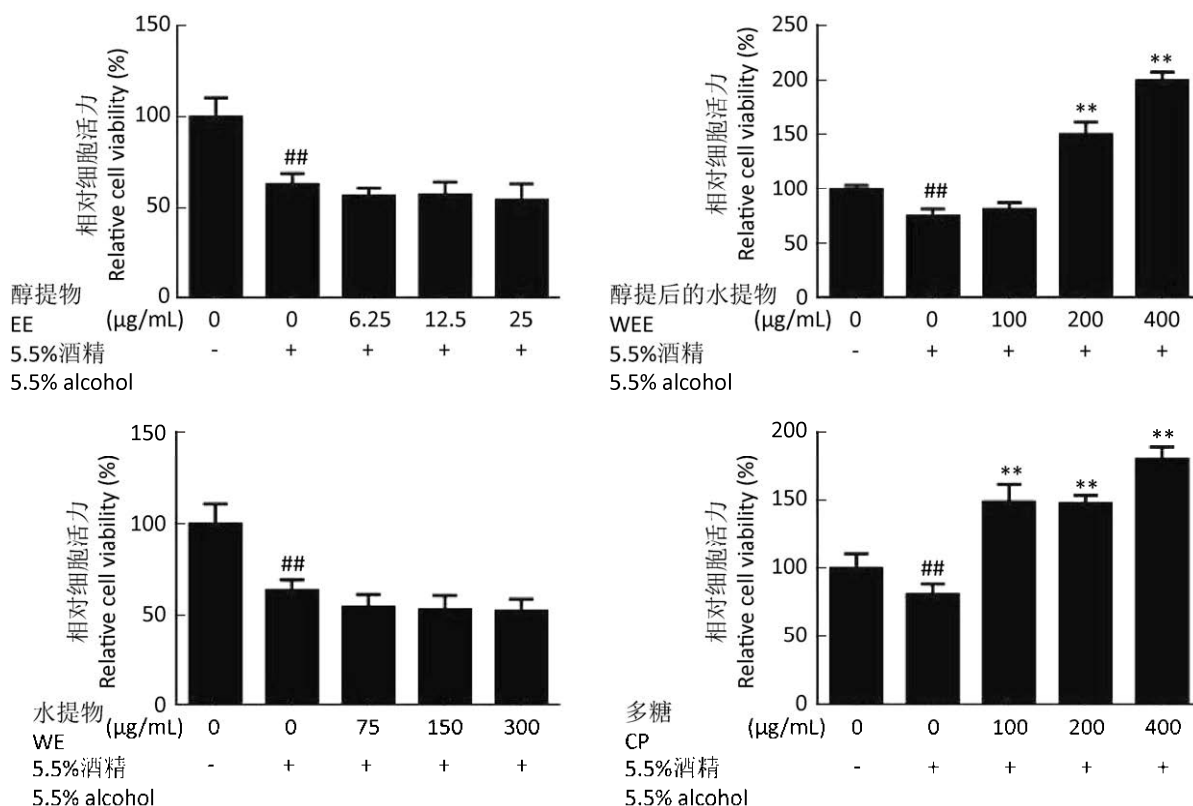


图 2 不同牛樟芝提取物对 5.5%酒精诱导的 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用 (n=6) 与空白组比较, $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$; 与模型组比较, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$

Fig. 2 The protective effects of different extracts from *Taiwanofungus camphoratus* against oxidative injury in HepG2 cell induced by 5.5% alcohol (n=6). $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$, versus control group; $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, versus model group.

2.4 WEE 和 CP 对酒精诱导 HepG2 细胞损伤生化指标的影响

与空白组比较, 模型组的培养基中 ALT、AST 水平极显著升高, 胞内的 SOD 和 CAT 活力极显著下降, 表明 5.5%酒精能对 HepG2 细胞造成明显的损伤。与模型组比较, 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 CP 和 WEE 均能显著降低细胞培养液的 ALT 水平; 预处理浓度增加后发现, 200 和 400 $\mu\text{g/mL}$ 的 CP 和 WEE 均能显著降低细胞培养液的 ALT、AST 水平, 同时提高胞内的 CAT 活力; 200 和 400 $\mu\text{g/mL}$ 的 WEE 及 400 $\mu\text{g/mL}$ CP 能明显提高胞内的 SOD 活力 (表 2)。结果表明 CP 和 WEE 能显著提高细胞的抗氧化应激能力, 改善酒精诱导的细胞氧化性损伤。

2.5 WEE 和 CP 对胞内 ROS 含量的影响

细胞内 ROS 检测采用荧光探针法进行检测, 酶标仪检测荧光强度进行定量分析, 采用 DCFH-DA 作为探针, DCFH-DA 本身没有荧光, 进入细胞内被酯酶水解为 DCFH, DCFH 不能通透细胞膜, 从而使探针被标记在细胞内。若有 ROS 存在, DCFH 被氧化生成无法穿透细胞膜的绿色荧光物质 DCF, 荧光强度与细胞内 ROS 水平成正比, 荧光强度越强则 ROS 水平越高 (Aranda *et al.* 2013)。

与空白组比较, 模型组细胞内 ROS 水平极显著升高 (图 3), 表明酒精能诱导 HepG2 产生氧化应激损伤。与模型组比较, WEE 的各剂量组和 CP 高剂量组均能极显著降低胞

表 2 WEE 和 CP 对 5.5%酒精诱导 HepG2 细胞损伤生化指标的影响

Table 2 The effects of WEE and CP on the biochemical indices of HepG2 cell injure induced by 5.5% alcohol

组别		谷丙转氨酶	谷草转氨酶	超氧化物歧化酶	过氧化氢酶
Group		ALT (U/L)	AST (U/L)	SOD (U/mg)	CAT (U/mg)
空白对照		5.48±0.93	7.55±0.82	199.61±9.69	15.92±0.80
Blank control					
模型		23.11±1.77 ^{###}	10.94±1.51 ^{###}	141.21±5.33 ^{###}	11.52±0.76 ^{###}
Model set					
WEE (μg/mL)	100	12.76±1.09 ^{**}	9.27±1.30	145.03±7.44	12.54±0.69
	200	9.35±0.70 ^{**}	8.36±1.15 [*]	168.27±15.17 [*]	13.24±0.80 [*]
	400	6.40±0.86 ^{**}	8.06±0.91 ^{**}	169.41± 9.61 ^{**}	14.21±0.72 ^{**}
CP (μg/mL)	100	12.39±0.57 ^{**}	10.13±1.06	133.09±7.48	11.95±0.53
	200	11.43±0.92 ^{**}	9.07±0.75 [*]	148.43±2.61	12.07±0.44 [*]
	400	9.70±1.39 ^{**}	7.13±0.84 ^{**}	168.71±11.83 ^{**}	13.24±0.24 ^{**}

注：与空白组比较，[#]*P*<0.05，^{###}*P*<0.01；与模型组比较，^{*}*P*<0.05，^{**}*P*<0.01

Note: [#]*P*<0.05, ^{###}*P*<0.01, versus control group; ^{*}*P*<0.05, ^{**}*P*<0.01, versus model group. ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; SOD, superoxide dismutase; CAT, catalase.

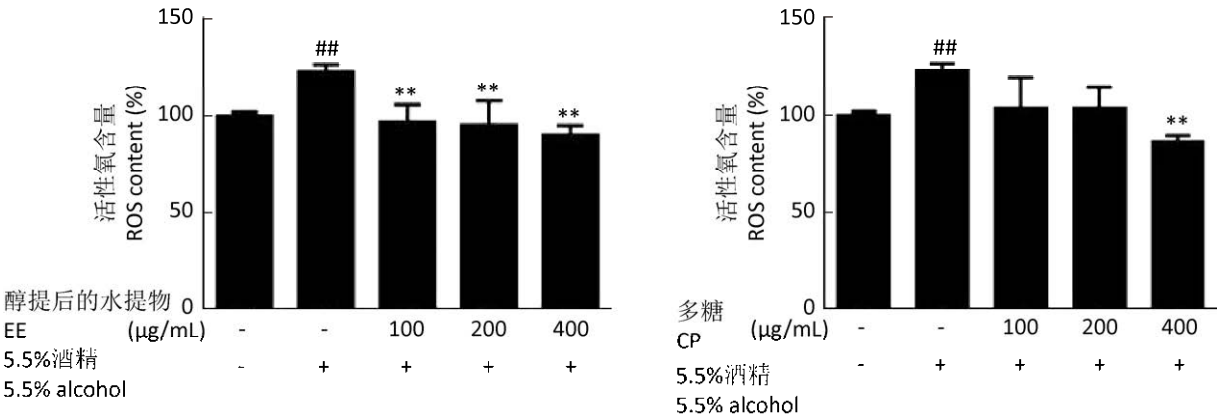


图 3 WEE 和 CP 对酒精诱导的 HepG2 细胞的 ROS 水平升高的影响 (n=6) 与空白组比较，[#]*P*<0.05，^{###}*P*<0.01；与模型组比较，^{*}*P*<0.05，^{**}*P*<0.01

Fig. 3 The effects of WEE and CP on the increase of reactive oxygen species (ROS) level in HepG2 induced by 5.5% alcohol (n=6). [#]*P*<0.05, ^{###}*P*<0.01, versus control group; ^{*}*P*<0.05, ^{**}*P*<0.01, versus model group.

内 ROS 水平。实验结果表明 WEE 和 CP 能提高细胞的抗氧化应激能力，显著提高抗氧化酶的表达，降低胞内 ROS 水平，对 HepG2 细胞发挥保护作用。

2.6 CP 的单糖组成

2.6.1 线性关系考察：各单糖回归方程的相关系数都大于 0.999，说明在线性范围内线性关

系良好（表 3）。

2.6.2 方法学考察：精密度实验结果显示甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、岩藻糖相对标准偏差（RSD，n=6）分别为 0.55%、1.11%、0.41%、0.74%、0.65%，表明仪器精密度良好；重复性结果显示甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、岩藻糖 RSD 值分别为 1.32%、3.4%、

表 3 五种单糖线性方程和线性范围

Table 3 Linear equations and ranges for 5 monosaccharides of *Taiwanofungus camphoratus* polysaccharide

单糖	线性方程	线性范围	相关系数 r
Monosaccharide	Linear equation	Linearity range (μg)	Correlation coefficient r
甘露糖	$y=1\ 651.4x+3.85$	0.31–3.1	1
Mannose			
鼠李糖	$y=1\ 026.5x-0.15$	0.272–2.72	1
Rhamnose			
葡萄糖	$y=1\ 323.6x+207.70$	3.528–17.64	0.9999
Glucose			
半乳糖	$y=1\ 302.4x+64.38$	1.11–5.55	0.9999
Galactose			
岩藻糖	$y=970.08x-24.07$	0.236–2.36	0.9999
Fucose			

1.81%、3.2%、3.54%，表明该方法重复性良好；稳定性结果显示甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、岩藻糖 RSD 值分别为 0.91%、2.8%、0.74%、0.72%、0.52%，表明各单糖衍生物稳定性良好。加样回收率结果显示甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、岩藻糖的平均加样回收率分别为 100.52%、98.40%、

99.30%、98.92%、103.22%。RSD 值分别为 2.98%、2.74%、1.31%、2.45%、1.11%，表明 5 种单糖加样回收率良好。

2.6.3 CP 的单糖组成：牛樟芝单糖主要由甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、岩藻糖组成（图 4、图 5），其摩尔比为 1:0.1622:6.651:2.646:0.3929。因此，以葡萄糖含量最高，

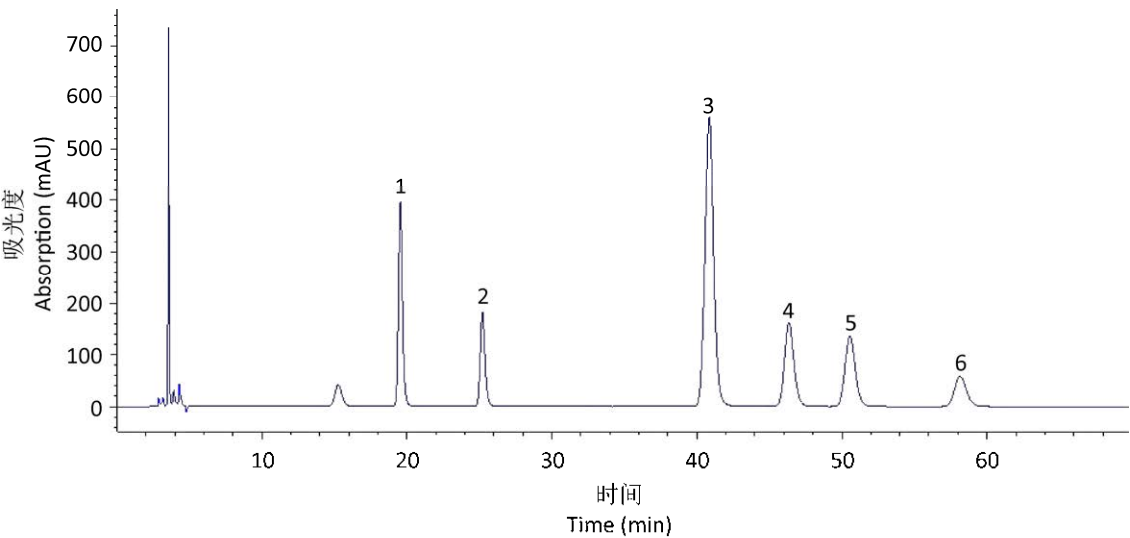


图 4 单糖 PMP 柱前衍生化 HPLC 色谱图 1–6 分别为甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖、岩藻糖

Fig. 4 HPLC chromatogram for PMP precolumn derivatization of monosaccharide. 1–6: Mannose, rhamnose, glucose, galactose, arabinose and fucose, respectively.

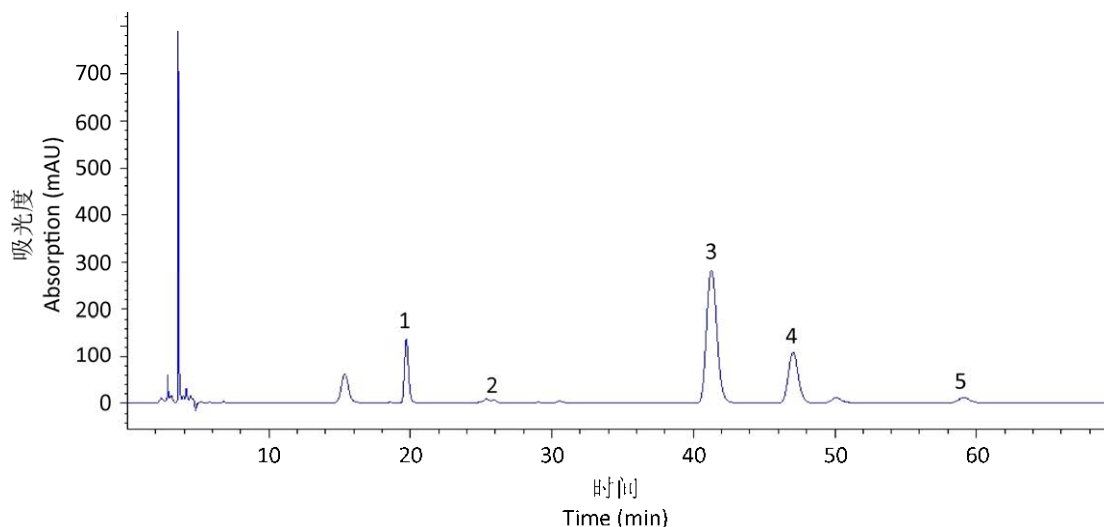


图 5 CP 水解物 PMP 柱前衍化的 HPLC 色谱图 1–5 分别为甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、岩藻糖
Fig. 5 HPLC chromatogram for PMP precolumn derivatization of CP hydrolysate. 1–5: Mannose, rhamnose, glucose, galactose, and fucose, respectively.

其次为半乳糖、甘露糖，与采用 GC 方法检测结果基本一致，但是略有差别，主要与 CP 的衍生化方法和检测手段有关 (Yi *et al.* 2020)。

3 讨论

大量的研究表明，氧化应激是引起酒精性肝损伤的潜在机制，酒精在体内的氧化代谢物如 ROS 和乙醛会降低细胞的抗氧化能力，诱发肝脏的氧化应激，诱导细胞内的脂质、蛋白质、DNA 的氧化损伤，影响细胞的正常功能 (Wu & Cederbaum 2009; Chen *et al.* 2020)。SOD、CAT 是生物体内重要的抗氧化酶，机体中的有害的超氧自由基经 SOD 催化转化为过氧化氢，再由 CAT 催化转化为无害的氧分子和水，共同起到清除 ROS 和抗氧化的作用 (Gerin *et al.* 2016)。因此，提高机体的抗氧化应激，清除胞内过剩的 ROS，对维持细胞的正常功能，改善酒精性肝损伤具有重要意义 (Chuang *et al.* 2016)。

牛樟芝一直被台湾高山族当作一种解酒民间药物，被誉为“森林中的红宝石” (Kuang *et al.* 2020)。现代药理学实验表明牛

樟芝菌丝的一种中性多糖对痤疮丙酸杆菌和脂多糖诱导的 ICR 小鼠肝损伤具有明显的保护作用 (Han *et al.* 2006)；菌丝糖蛋白 antrodan 能抑制氧化应激，对脂多糖诱导的 Sprague-Dawley 大鼠肝损伤起到明显的保护作用 (Ker *et al.* 2014)；另外，牛樟芝的小分子化合物如泛醌 (Zhang *et al.* 2017)、琥珀酸衍生物 (Yi *et al.* 2020) 和三萜 (Wu & Chen 2016) 等也被证实是牛樟芝的保肝的重要活性成分。已有的研究表明牛樟芝浓缩胶囊 (黄褐色粉末状内容物) 对酒精诱导的 ICR 小鼠急性肝损伤具有显著的保护作用 (王瑾等 2014)。牛樟芝子实体水提物对 Wistar 大鼠慢性酒精性肝损伤有明显保护作用 (Huang *et al.* 2010)。但是，牛樟芝子实体多糖对酒精性细胞氧化损伤的保护作用尚未见相关报道。

本研究采用不同的提取方法提取牛樟芝子实体，得到了 4 个不同的提取部位 (EE、WE、WEE 和 CP)，其中 EE 主要含有醇溶性小分子化合物；WE 除了含有小分子化合物外，还有多糖、糖蛋白、蛋白等水溶性等生

物大分子; WEE 和 CP 则主要含有多糖、糖蛋白、蛋白等生物大分子。本文系统地比较了牛樟芝 4 个不同提取部位对酒精诱导 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用, 结果表明 WEE 和 CP 对酒精诱导的细胞损伤具有明显的保护作用, WEE 和 CP 预处理组能显著提高胞内的 SOD、CAT 活力, 降低培养液中 ALT 和 AST 含量, 降低胞内 ROS 水平的升高, 显著改善酒精诱导的细胞氧化应激损伤, 而 EE 和 WE 则无明显的保护作用, 其中 EE 对 HepG2 细胞还表现出极显著的细胞增殖抑制作用。因此, WEE 和 CP 为牛樟芝细胞酒精性氧化损伤保护的活性部位, 提示多糖等生物大分子是牛樟芝解酒保肝的重要活性成分之一。

[REFERENCES]

- Anstee QM, Daly AK, Day CP, 2011. Genetics of alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Seminars in Liver Disease*, 31(2): 128-146
- Aranda A, Sequedo L, Tolosa L, Quintas G, Burello E, Castell JV, Gombau L, 2013. Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: a quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells. *Toxicology in vitro*, 27(2): 954-963
- Chen L, Liu L, Abdulla R, Tursun X, Xin X, Aisa HA, 2020. Chemical components and hepatoprotective mechanism of Xwak granule in mice treated with acute alcohol. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2020: 8538474
- Chuang CH, Tsai CC, Lin ES, Huang CS, Lin YY, Lan CC, Huang CC, 2016 Heat-killed *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus johnsonii* reduce liver injury induced by alcohol *in vitro* and *in vivo*. *Molecules*, 21(11): 1456-1466
- Dai YC, Li Y, 2011. Notes on the nomenclature of six important medicinal fungi in China. *Mycosystema*, 30(4): 515-518 (in Chinese)
- Ding XD, 2012. Signaling pathways of liver injury in alcoholic liver disease. *Liver*, 2012(4): 50-52 (in Chinese)
- Dugum M, Mccullough A, 2015. Diagnosis and management of alcoholic liver disease. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, 3(2): 109-116
- Geethangili M, Tzeng YM, 2011. Review of pharmacological effects of *Antrodia camphorata* and its bioactive compounds. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2011: 212641
- Gerin F, Erman H, Erboga M, Sener U, Yilmaz A, Seyhan H, Gurel A, 2016. The effects of ferulic acid against oxidative stress and inflammation in formaldehyde-induced hepatotoxicity. *Inflammation*, 39(4): 1377-1386
- Han HF, Nakamura N, Zuo F, Hirakawa A, Yokozawa T, Hattori M, 2006. Protective effects of a neutral polysaccharide isolated from the mycelium of *Antrodia cinnamomea* on *Propionibacterium acnes* and lipopolysaccharide induced hepatic injury in mice. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 54(4): 496-500
- Hu YD, Lu RQ, Liao XR, Zhang BB, Xu GR, 2014. Enabling the biosynthesis of antroquinonol in submerged fermentation of *Antrodia camphorata*. *Biochemical Engineering Journal*, 91: 157-162
- Huang CH, Chang YY, Liu CW, Kang WY, Lin YL, Chang HC, Chen YC, 2010. Fruiting body of niuchangchih (*Antrodia camphorata*) protects livers against chronic alcohol consumption damage. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 58(6): 3859-3866
- Ker YB, Peng CC, Chang WL, Chyau CC, Peng RY, 2014. Hepatoprotective bioactivity of the glycoprotein, antrodan, isolated from *Antrodia cinnamomea* mycelia. *PLoS One*, 9(4): e93191
- Kuang Y, Li B, Wang Z, Qiao X, Ye M, 2020. Terpenoids from the medicinal mushroom *Antrodia camphorata*: chemistry and medicinal potential. *Natural Product Reports*, 2020:

- 32720965
- Nimantha WDA, Day C, 2007. Genetics of alcoholic liver disease and nonalcoholic fatty liver disease. *Seminars in Liver Disease*, 27(1): 44-54
- Qin YD, Wang RB, Zhou JJ, Li F, Jin X, Yang Q, 2015. Composition analysis of monosaccharides in paeony polysaccharides. *Chinese Medicinal Materials*, 38(11): 2335-2338 (in Chinese)
- Wang J, Xu CQ, Wang G, 2014. Protective effects of enriched capsules of *Antrodia camphorata* on acute alcohol liver injury in mice. *Research and Practice on Chinese Medicines*, 28(5): 44-46 (in Chinese)
- Wang Y, Guan M, Zhao X, Li XL, 2018. Effects of garlic polysaccharide on alcoholic liver fibrosis and intestinal microflora in mice. *Pharmaceutical Biology*, 56(1): 325-332
- Wu D, Cederbaum A, 2009. Oxidative stress and alcoholic liver disease. *Seminars in Liver Disease*, 29(2): 141-154
- Wu F, Zhou LW, Yang ZL, Bau T, Li TH, Dai YC, 2019. Resource diversity of Chinese macrofungi: edible medicinal and poisonous species. *Fungal Diversity*, 98: 1-76
- Wu SH, Kirk PM, Redhead SA, Stalpers JA, Dai YC, Norvell LL, Yang ZL, Ryvarden L, Su CH, Li Y, Zhuang WY, Yao YJ, Chen CJ, Chen LC, Yu ZH, Wang XC, 2012. Resolution of the nomenclature for niu-chang-chih (*Taiwanofungus camphoratus*), an important medicinal polypore. *Taxon*, 61(6): 1305-1310
- Wu YS, Chen SN, 2016. Extracted triterpenes from *Antrodia cinnamomea* reduce the inflammation to promote the wound healing via the STZ inducing hyperglycemiadiabetes mice model. *Frontiers in Pharmacology*, 7: 154
- Yang BJ, Yi J, Gong YT, Wu YB, Wu JZ, Wu JG, 2019. GC-MS analysis of monosaccharide composition and antioxidant activity of polysaccharides from *Antrodia cinnamomea*. *Science and Technology of Food Industry*, 40(12): 85-89 (in Chinese)
- Yi ZW, Xia YJ, Liu XF, Wang GQ, Xiong ZQ, Ai LZ, 2020. Antrodin A from mycelium of *Antrodia camphorata* alleviates acute alcoholic liver injury and modulates intestinal flora dysbiosis in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 254: 112681
- Zhang BB, Hu PF, Huang J, Hu YD, Chen L, Xu GR, 2017. Current advances on the structure, bioactivity, synthesis, and metabolic regulation of novel ubiquinone derivatives in the edible and medicinal mushroom *Antrodia cinnamomea*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 65(48): 10395-10405
- [附中文参考文献]
- 戴玉成, 李玉, 2011. 中国六种重要药用真菌名称的说明. *菌物学报*, 30(4): 515-518
- 丁晓东, 2012. 酒精性肝病肝损伤的信号通路. *肝脏*, 2012(4): 50-52
- 秦亚东, 汪荣斌, 周娟娟, 李飞, 金欣, 杨茜, 2015. 白芍多糖中单糖的组成分析. *中药材*, 38(11): 2335-2338
- 王谨, 徐财泉, 王宫, 2014. 牛樟芝浓缩胶囊对小鼠急性酒精肝损伤的保护作用. *现代中药研究与实践*, 28(5): 44-46
- 杨彬君, 易骏, 龚业滔, 吴岩斌, 吴锦忠, 吴建国, 2019. GC-MS 分析牛樟芝多糖的单糖组成及其抗氧化活性. *食品工业科技*, 40(12): 85-89

(本文责编: 韩丽)