

# 红托竹荪多糖抗疲劳和耐缺氧作用研究

叶敏<sup>1,2,3\*</sup>, 文竹<sup>1,3</sup>, 黄家振<sup>1</sup>, 谢阳刚<sup>1</sup>

<sup>1</sup>毕节学院化学化工实验教学中心; <sup>2</sup>贵州工程应用技术学院化学工程天然产物中心;

<sup>3</sup>贵州省应用化学特色重点实验室, 毕节 551700

**摘要:** 考察红托竹荪多糖 (*Dictyophora rubrovalvata* polysaccharide, DRP) 抗疲劳和耐缺氧活性。采用水提醇沉法提取 DRP, 建立小鼠负重游泳模型和耐缺氧模型, 同时灌胃不同剂量的 DRP 溶液, 15 d 后测定小鼠力竭游泳时间、耐缺氧时间以及小鼠力竭游泳后血乳酸 (BLA)、血尿素氮 (BUN)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 和肝糖原、肌糖原含量。实验结果表明 DRP 能延长负重小鼠的游泳时间, 降低疲劳小鼠 BLA、BUN、MDA 含量, 升高 SOD、肝糖原和肌糖原含量, 延长小鼠常压耐缺氧存活时间。

**关键词:** 红托竹荪多糖; 抗疲劳; 耐缺氧; 小鼠

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.3.017

## Effects of *Dictyophora rubrovalvata* Polysaccharide on Anti-fatigue and Hypoxia Endurance in Mice

YE Min<sup>1,2,3\*</sup>, WEN Zhu<sup>1,3</sup>, HUANG Jia-zhen<sup>1</sup>, XIE Yang-gang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Experiment Teaching Center for Chemistry and Chemical Engineering; <sup>2</sup>Natural Products Center of

Chemical Engineering, Guizhou University of Engineering Science; <sup>3</sup>Key Laboratory on Applied Chemistry, Bijie 551700, China

**Abstract:** The aim of this study was to evaluate anti-fatigue and hypoxia endurance effect of *Dictyophora rubrovalvata* polysaccharide (DRP) in mice. DRP was extracted by water extraction and alcohol precipitation. A weight loaded swimming model and a hypoxia model of mice were established. Meanwhile, the mice were given different doses of DRP by oral gavage. After 15 days, their loaded swimming time and hypoxia resistance time were determined, and then blood lactic acid (BLA), blood urea nitrogen (BUN), blood SOD, blood MDA and the contents of hepatic glycogen and muscle glycogen were measured. The experimental results showed that DRP can prolong the loaded swimming time, decrease the contents of BLA, BUN and MDA, increase the contents of SOD, hepatic glycogen and muscle glycogen, prolong hypoxia endurance time.

**Key words:** *Dictyophora rubrovalvata* polysaccharide; anti-fatigue; hypoxia endurance; mice

红托竹荪 (*Dictyophora rubrovalvata* Zang, Ji et Liou) 是一种担子菌, 隶属真菌门 (Eumycota)、担子菌亚门 (Basidiomycotina)、腹菌纲 (Gasteromycetes)、鬼笔目 (Phallales)、鬼笔科 (Phallaceae)、竹荪属 (*Dictyophora*), 是世界上名贵的大型食用菌之一, 野生红托竹荪主要分布在我国贵州中 (西) 部、云南、四川和浙江等省, 多生长于竹林下的腐殖土上<sup>[1]</sup>。近年来的研究发现, 红托竹荪含有丰富的氨基酸、维生素、无机盐和多糖。其中多糖是红托竹荪子实体中重要组成成分之一, 其单糖组成为半乳糖、葡萄糖、

甘露糖和木糖<sup>[2]</sup>。而食用菌生物多糖是一种非特异性免疫增强剂和免疫激活剂, 广泛用于医药和保健食品, 被称为“生物应答调节剂”<sup>[3]</sup>。本课题组前期研究发现, 红托竹荪多糖具有体外抗氧化活性。本实验就红托竹荪多糖 (*Dictyophora rubrovalvata* polysaccharide, DRP) 抗疲劳和耐缺氧作用进行初步研究, 旨在为开发利用红托竹荪资源提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

红托竹荪子实体, 购自贵州省织金县, 经遵义医学院刘云副教授鉴定为红托竹荪 (*Dictyophora rubrovalvata* Zang, Ji et Liou)。

SPF 级 KM 种雄性小鼠 [许可证号: SCXK (军)

收稿日期: 2015-11-12

接受日期: 2016-01-20

基金项目: 贵州省科技厅、毕节市科技局、毕节学院科技联合基金项目 (黔科合 J 字 LKB [2012] 06 号)

\* 通讯作者 Tel: 86-013985893260; E-mail: 28719861@qq.com

2012-0011], 体质量  $24 \pm 3$  g, 购于重庆腾鑫比尔动物实验销售有限公司。

超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒(生产批号 20141203), 丙二醛(MDA)测定试剂盒(生产批号 20141204), 糖原测定试剂盒(生产批号 20141126), 尿素氮(BUN)测定试剂盒(生产批号 20141203), 乳酸(BLA)测定试剂盒(生产批号 20141204)均购于南京建成生物研究所; 其他试剂均为国产分析纯试剂。

GL-20G-C 台式高速离心机(长沙迈佳森仪器设备有限公司), TG16 台式高速离心机(长沙迈佳森仪器设备有限公司), TDZ4-WS 台式低速自动平衡离心机(长沙迈佳森仪器设备有限公司), V-5800 可见分光光度计(上海元析仪器有限公司), SZ-97A 自动三重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 DRP 的提取

红托竹荪, 乙醇(75%)浸泡 48 h 脱脂, 置于 60 °C 烘箱中烘干、粉碎、过 60 目筛。用热水提取, 离心, 上清液减压浓缩, 用 95% 乙醇沉淀, 使醇的终浓度达 80%, 4 °C 静置过夜, 收集沉淀复溶, 酶法脱蛋白, 透析除去小分子杂质, 加无水乙醇沉淀多糖, 离心, 取沉淀于 50 °C 烘干, 即为 DRP<sup>[4]</sup>。

### 1.2.2 实验动物分组<sup>[5]</sup>

将 18 只小鼠随机分为 3 组, 分别为空白对照组, DRP 低剂量组, DRP 高剂量组, 每组 6 只。在实验条件下适应喂养 1 周后开始灌胃。DRP 低、高剂量组分别按每天 100 mg/kg · d、300 mg/kg · d 的溶液灌胃给药, 空白对照组灌服相同体积生理盐水。

### 1.2.3 小鼠负重游泳实验<sup>[6]</sup>

各组小鼠连续灌胃 15 d, 末次灌胃 30 min 后, 给小鼠尾部负重 5% 体重的铅丝, 放入水温 ( $25 \pm 2$ ) °C, 水深 30 cm 的玻璃缸内游泳, 记录小鼠自游泳开始至头部沉入水中 8 s 不能浮出水面的时间, 此

时间即为小鼠力竭游泳时间。

### 1.2.4 常压耐缺氧实验<sup>[7]</sup>

实验动物分组及给药同“1.2.2”。末次给药 30 min 后, 将各组小鼠分别放入盛有 10 g 钠石灰的 250 mL 磨口瓶中, 每瓶 1 只, 瓶口用凡士林密封, 确保其密封性良好。自小鼠放入瓶中开始计时, 以呼吸停止(小鼠胸部不起伏)为指标, 作为小鼠常压耐缺氧存活时间。

### 1.2.5 检测指标

#### 1.2.5.1 小鼠血清 BUN、BLA、MDA 和 SOD 含量的测定<sup>[8]</sup>

小鼠负重游泳至力竭, 休息 15 min 之后, 摘眼球取血, 用南京建成试剂盒测定小鼠血清尿素氮(BUN)、血乳酸(BLA)、丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)含量。

#### 1.2.5.2 小鼠肝糖原和肌糖原的测定<sup>[9]</sup>

小鼠采血后立即脱颈椎处死, 解剖取出肝脏和后腿肌肉, 按照糖原测定试剂盒的要求对肝脏和肌肉进行处理, 测定肝糖原和肌糖原的含量。

### 1.2.6 统计分析

数据采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析, 组间比较采用 *t* 检验进行比较, 数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 2 实验结果

### 2.1 DRP 对小鼠负重游泳时间和耐缺氧时间的影响

由表 1 可看出, 与空白对照组比较, 灌服 DRP 的低、高剂量组小鼠负重游泳时间均高于空白对照组小鼠, 分别是空白对照组小鼠的 1.87 倍 ( $P < 0.05$ )、3.23 倍 ( $P < 0.01$ )。DRP 低、高剂量组均能延长小鼠常压耐缺氧存活时间, 与对照组比较有极显著性差异 ( $P < 0.01$ )。实验结果显示, DRP 能延长小鼠力竭游泳时间和常压耐缺氧存活时间。

表 1 DRP 对小鼠负重游泳时间和耐缺氧时间的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 1 The effect of DRP on weight loaded-swimming time of mice ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	力竭游泳时间 Loaded swimming time (min)	耐缺氧时间 Hypoxia resistance time (min)
空白对照组 Blank control	-	$8.25 \pm 2.54$	$16.68 \pm 1.47$
DRP 低剂量组 DRP-L	100	$15.42 \pm 3.62^*$	$22.67 \pm 3.28^{**}$
DRP 高剂量组 DRP-H	300	$26.62 \pm 5.30^{**}$	$28.69 \pm 2.81^{**}$

注: 与空白对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

Note: Compared with blank control, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

## 2.2 DRP 对小鼠血清尿素氮、乳酸、MDA 和 SOD 的影响

由表 2 可知,与空白对照组比较,DRP 低、高剂量组小鼠血清 BUN 含量显著降低,差异具有极显著性( $P < 0.01$ );与空白对照组比较,DRP 低、高剂量组小鼠血清 BLA 含量有所降低,低剂量组与对照组

比较,无统计学意义,高剂量组和对照组比较,具有极显著性差异( $P < 0.01$ )。与空白对照组比较,DRP 低、高剂量组小鼠血清 MDA 含量也显著降低,差异具有极显著性( $P < 0.01$ );DRP 低、高剂量组小鼠血清 SOD 活力和对照组比较,有显著性差异( $P < 0.05$ )。

表 2 DRP 对小鼠血清尿素氮、乳酸、MDA 和 SOD 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 2 Effect of DRP on BUN, BLA, SOD and MDA of mice ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	尿素氮 BUN (mmol/L)	乳酸 BLA (mmol/L)	丙二醛 MDA (nmol/mL)	超氧化物歧化酶 SOD (U/mL)
空白对照组 Blank control	-	12.64 ± 1.33	20.70 ± 1.50	6.06 ± 0.87	97.92 ± 12.26
DRP 低剂量组 DRP-L	100	9.19 ± 1.25 **	18.60 ± 1.35	4.25 ± 0.55 **	114.43 ± 9.51 *
DRP 高剂量组 DRP-H	300	6.36 ± 2.90 **	15.23 ± 1.70 **	3.23 ± 0.68 **	127.92 ± 9.71 *

注:与空白对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

Note: Compared with blank control, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

## 2.3 DRP 对小鼠肌糖原和肝糖原的影响

由表 3 可知,DRP 低、高剂量组均能提高小鼠肝糖原和肌糖原含量,且低、高剂量组和对照组比

较,具有极显著性差异( $P < 0.01$ )。实验结果表明,DRP 可提高运动后小鼠肝糖原和肌糖原含量,具有延缓运动导致的肌糖原降低的作用。

表 3 DRP 对小鼠肌糖原和肝糖原的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 3 Effect of DRP on hepatic glycogen and muscle glycogen of mice ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	肌糖原 Muscle glycogen (mg/g)	肝糖原 Liver glycogen (mg/g)
空白对照组 Blank control	-	0.44 ± 0.05	1.54 ± 0.21
DRP 低剂量组 DRP-L	100	0.84 ± 0.07 **	2.70 ± 0.38 **
DRP 高剂量组 DRP-H	300	1.24 ± 0.16 **	4.30 ± 0.53 **

注:与空白对照组比较, \*\*  $P < 0.01$ 。

Note: Compared with blank control, \*\*  $P < 0.01$ .

## 3 讨论与结论

疲劳是机体复杂的生理生化过程,一般指运动引起身体与精神状态的下降,伴随着力量下降及生化指标的改变<sup>[7]</sup>。小鼠负重游泳实验是测定小鼠疲劳状况和运动耐力的常用实验方法<sup>[10]</sup>。实验结果表明,红托竹荪多糖能延长小鼠力竭游泳时间。BLA 是无氧酵解的产物,长时间剧烈运动使体内乳酸的累积过多就会影响机体内环境的相对稳定和体内的正常,这是运动性疲劳的一个重要原因,BLA 水平能比较准确的反映机体的疲劳程度<sup>[9]</sup>。BUN 反映蛋白质参与代谢的程度,也是检测运动性疲劳的另一个理想指标<sup>[11]</sup>。实验结果表明,红托竹荪多糖能降低力竭运动后小鼠 BLA 和 BUN 含量。

运动可以引起脂质过氧化反应从而产生自由基,自由基对肌肉细胞造成损害,从而产生疲劳;SOD 是机体清除氧自由基的重要酶,直接反映机体

抗氧化水平;MDA 是自由基引起的脂质过氧化的主要产物之一,MDA 含量可间接表现机体抗氧化能力及清除氧化产物的能力<sup>[12]</sup>。灌胃 DRP 小鼠血清 SOD 活性增强,有助于减少自由基的堆积,从而延缓疲劳;灌胃 DRP 小鼠血清 MDA 含量显著降低,表明 DRP 有助于降低自由基的氧化过程,抵抗机体的疲劳。

研究结果表明运动导致的体力衰竭和肌糖原的耗竭同时发生,随着肌糖原消耗的增加,机体为维持血糖水平,将动用肝糖原而导致肝糖原减少,因此,肌糖原和肝糖原含量是反映疲劳程度的敏感指标<sup>[13]</sup>。实验结果显示,DRP 低、高剂量组小鼠力竭运动后肌糖原和肝糖原显著高于空白对照组。

缺氧是一种紧张性刺激,可引起机体产生各种应激性反应,如脑组织在缺氧缺血时会导致脑组织能量代谢障碍,出现脑组织病理形态和脑机能失调,最终导致机体的脑、心等重要器官缺氧供能不足而

死亡<sup>[14]</sup>。实验结果表明,DRP 能延长小鼠常压耐缺氧存活时间。

综上,DRP 能延长小鼠力竭游泳时间和常压耐缺氧存活时间,提高肝糖原和肌糖原含量,降低力竭运动后血清 BLA、BUN 和 MDA 水平,增强小鼠血清 SOD 活力,具有抗疲劳作用。

#### 参考文献

- 1 Wu Y(吴勇),Jiang SY(姜守忠),Lin CZ(林朝忠). Dictyophora Cultivated & Processing Technology (竹荪栽培与加工技术). Guiyang: Guizhou Science & Technology Publishing House, 1997. 9.
- 2 Lian B(连宾), Yu JP(郁建平). Study on the polysaccharides extraction from mushroom *Dictyophora rubrovalvata* by TLC. *Food Sci*(食品科学), 2004, 25(3): 43-45.
- 3 Sun JX(孙靖轩), Wang YF(王延锋), Wang JH(王金贺), et al. Research advances on polysaccharide extracting technology of Edible fungi. *China Edible Fungi*(中国食用菌), 2012, 31(3): 6-9.
- 4 Zhang WG(张伟刚), Fan QN(范巧宁), Jia LP(贾琳斐), et al. Study on response surface methodology for hot water extraction of polysaccharide from *Dictyophora*. *Sci Technol Food Ind*(食品工业科技), 2013, 34: 269-274.
- 5 Wu Y(吴越), Qu M(曲敏), Tong CQ(佟长青), et al. Study on the effect of polysaccharide from *Hizikia fusiformis* of anti-fatigue of mice. *Sci Technol Food Ind*(食品工业科技), 2013, 34: 350-351.
- 6 Luo X(罗轩), Lin CW(林翠梧), Chen JJ(陈洁晶), et al. *In vivo* anti-fatigue effect of polysaccharides from *Millettia speciosa* Champ. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2014, 26: 324-328.

- 7 Bao LL(鲍蕾蕾), Chen HF(陈海飞), Bian J(卞俊), et al. Effect of compound *Ganoderma lucidum* spore oil soft capsule on antifatigue property and oxygen deficit-tolerance in mice. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2014, 20: 130-133.
- 8 Fu H(符辉), Wu QH(吴奇辉), Wang GL(王广兰), et al. Anti-fatigue effect of Carboxymethyl-pachyman. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2014, 26: 403-406.
- 9 Guo J(郭婕), Yan Y(颜燕), Yao WH(姚文环), et al. Studies of anti-fatigue function of *Dendrobium Candidum* Tea in Mice. *J Strait Pharm*(海峡医药), 2015, 27(5): 19-21.
- 10 Tan W, Yu KQ, Liu YY, et al. Anti-fatigue activity of polysaccharides extract from *Radix Rehmanniae Preparata*. *Int J Biol Macromol*, 2012, 50(1): 59-62.
- 11 Chi AP(池爱平), Kang CZ(康琛喆), Guo HH(郭欢欢), et al. Composition of polysaccharides from *Herba Patriniæ* and their anti-fatigue and anti-hypoxia activities. *Food Sci*(食品科学), 2014, 35: 212-215.
- 12 Wang JH(汪建红), Chen XQ(陈晓琴), Zhang WJ(张蔚佼). Study on biological effect and mechanism of antifatigue of polysaccharide from *Lycium rethenicum* mill. fruit. *Food Sci Technol*(食品科技), 2009, 34: 203-207.
- 13 Li JF(李江峰), Ge WH(葛卫红), Shen XR(沈先荣), et al. Anti-fatigue effects of *Sipunculus nudus* polysaccharide in mice. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2012, 18: 212-215.
- 14 Rao H(饶华), Chen MF(陈明峰), Liu WC(刘文超). Preliminary research of the hypoxic tolerance effect of compound *Rhodiola Mixure* in Mice. *J Jiangxi Univ Tcm*(江西中医药大学学报), 2012, 24(6): 71-73.

(上接第 415 页)

- 8 Xu YM(徐亚明), Fang SD(方圣鼎). Two new diterpene dilactones from *Podocarpus nagi*. *Acta Botan Sin*(植物学报), 1993, 35: 133-137.
- 9 Du HG(杜红光). Study of the primary comparison of quality between *Podocarpus nagi* and *Podocarpus fleuryi* Hickel. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine (广州中医药大学), MSD. 2008.
- 10 Wu HQ(吴惠勤), Wang T(王艇), Su YJ(苏应娟), et al. A study on chemical constituents of essential oil from *Podocarpus nagi* leaves. *J Wuhan Botan Res*(武汉植物学研究), 1996, 14: 287-288.
- 11 Wang T(王甜), Zhao MY(赵明月), Xu XJ(徐秀娟), et

al. Optimization of extraction of flavonoids from *Chrysanthemum morifolium* ramat. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2015, 27: 661-666.

- 12 Yang SM(杨申明), Wang ZJ(王振吉), Wei W(韦薇), et al. Study on the extraction technology of total flavonoids from *Radix Trichosanthis*. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2015, 27: 870-874.
- 13 Wu DQ(吴冬青), An HG(安红钢), Qi YE(齐亚娥), et al. Study on extract method of flavonoids from flowers of nine officinal plants and their ability on scavenging hydroxyl radicals. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2008, 20: 514-517.