



## 蒙古黄芪多糖对肥胖大鼠外周血红细胞功能及肝脏HO-1表达的影响

谢仁杰<sup>1\*</sup>, 李嘉颖<sup>1</sup>

1. 谢仁杰, 内蒙古农业大学

1. 李嘉颖, 内蒙古农业大学

\*. 通讯作者: 谢仁杰, 联系邮箱: 3116546024@qq.com

**摘要:** 红细胞在代谢性疾病中发挥的作用尚不明确。本项目旨在研究蒙古黄芪多糖对肥胖大鼠红细胞功能的影响以及对肝脏血红素氧合酶-1(HO-1)表达的影响。方法: 采用水提醇沉法提取蒙古黄芪多糖(mAPS), 分析其单糖组成, 检测mAPS的抗氧化活性。采用高脂饮食喂食构建肥胖大鼠模型, 模型建立后, 灌胃蒙古黄芪多糖(200mg/kg)以及阳性对照药物黄连素(300mg/kg)6周, 检测外周血红细胞的抗氧化能力、抑菌能力、检测肝脏血红素氧合酶-1(HO-1)的表达。结果:mAPS中葡萄糖含量为71.01%, 其单糖组成为葡萄糖(84.86%)、阿拉伯糖(4.49%)、半乳糖(3.92%)和核糖(3.26%)等。蒙古黄芪多糖具有一定的抗氧化能力。肥胖大鼠模型表现出非酒精性脂肪肝特征。蒙古黄芪多糖显著提高了肥胖大鼠红细胞的抑菌能力( $p < 0.05$ ), 提高了肥胖大鼠血清中SOD-2的表达, 提高了肥胖大鼠肝脏中HO-1基因和蛋白水平的表达。结论: 蒙古黄芪多糖能提高肥胖大鼠外周血红细胞的抗氧化能力以及肝脏的抗氧化能力。

**关键词:** 肥胖, 红细胞, 蒙古黄芪多糖, HO-1

近代生活方式和运动不足造成单纯性肥胖者逐渐增多<sup>[1]</sup>。肥胖是由于食物摄入过多或机体内分泌代谢紊乱而导致的病理状态, 主要表现为体内脂肪积聚过多, 体重过度增长, 它是引起糖尿病、高血压等的重要危险因素, 严重影响着人类的健康<sup>[2]</sup>。肥胖往往伴随着机体氧化应激水平的升高, 它通过多种机制诱导体内氧化自由基生成, 导致体内抗氧化防御功能减弱, 引起机体脂质过氧化损伤<sup>[3]</sup>。肥胖与红细胞密切相关, 当机体处于应激状态时, 红细胞膜和其中的血红蛋白极易受到活性氧自由基的攻击发生过氧化反应<sup>[4]</sup>。因此, 我们认为, 肥胖会影响红细胞的抗氧化能力和抑菌能力。

蒙古黄芪多糖(mAPS)是一种具有生物活性的水溶性杂多糖, 它是蒙古黄芪中最重要

2789-925X/© Shuangqing Academic Publishing House Limited All rights reserved.

Article history: Received July 18, 2022 Accepted July 24, 2022 Available online July 26, 2022

To cite this paper: 谢仁杰, 李嘉颖(2022). 蒙古黄芪多糖对肥胖大鼠外周血红细胞功能及肝脏HO-1表达的影响. 临床医学研究与评论, 卷2, 第1期, 6-12.

Doi: <https://doi.org/10.55375/jcmrr.2022.2.2>

备注: 本文谢仁杰, 李嘉颖为共同第一作者

的天然活性成分，具有多种药理作用<sup>[5]</sup>，包括抗炎、抗氧化、调节免疫力，降血脂和降血糖<sup>[6]</sup>。近些年来，人们越来越关注从不同的中草药中分离出具有生物活性的多糖，探究其在减肥中的作用。例如从杏鲍菇中提取出多糖通过增加脂质的排泄以及改变微生物群，在肥胖小鼠中具有抗肥胖和降低 LDL 胆固醇的作用<sup>[7]</sup>；从灵芝提取多糖可通过改善小鼠的 Nrf-2 / HO-1 信号通路来对抗肝脂肪变性，氧化应激和炎症<sup>[8]</sup>。天然药物中的多糖具有多功能、多位点、无毒性且副作用低的优点，在临床上已被广泛应用。鉴于我们之前发现 mAPS 在高脂饮食大鼠中具有激活 Nrf-2 信号通路改善肝糖脂代谢的作用<sup>[9]</sup>，所以本实验旨在探索 mAPS 对血红细胞及肝脏氧化应激的潜在影响以及如何改善肥胖。

## 1. 材料与方法

### 1.1 肥胖大鼠模型的建立

本研究拟以无特定病原体（SPF）雄性 SD 大鼠 40 只。适应性喂养 1 周后，随机将大鼠平均分成 4 组：空白组（Ctrl）、高糖高脂饮食组（HFD）、高糖高脂饮食+黄芪多（HFD+mAPS）、高糖高脂饮食组+黄连素组（HFD+BER）。Ctrl 组喂食普通维持饲料；剩余三组喂食高脂饲料。四周后各组随机抽取 4 只大鼠，处死，分析血清中的 ALT、AST、HDL 的含量，对肝脏组织染色观察并判断造模是否成功。造模是否成功后按如下方式处理 6 周：(1)Ctrl 组，口服灌胃蒸馏水（2.5 ml）；(2)HFD 组，口服灌胃蒸馏水（2.5 ml）；(3)HFD+mAPS 组，口服灌胃 mAPS（200 mg/kg）；(4)HFD+BER 组，口服灌胃黄连素（300 mg/kg）。实验结束前一天开始禁食 12h，腹腔注射 1%戊巴比妥钠溶液后处死大鼠，采集血液样本、肝脏和结肠组织进行下一步实验。

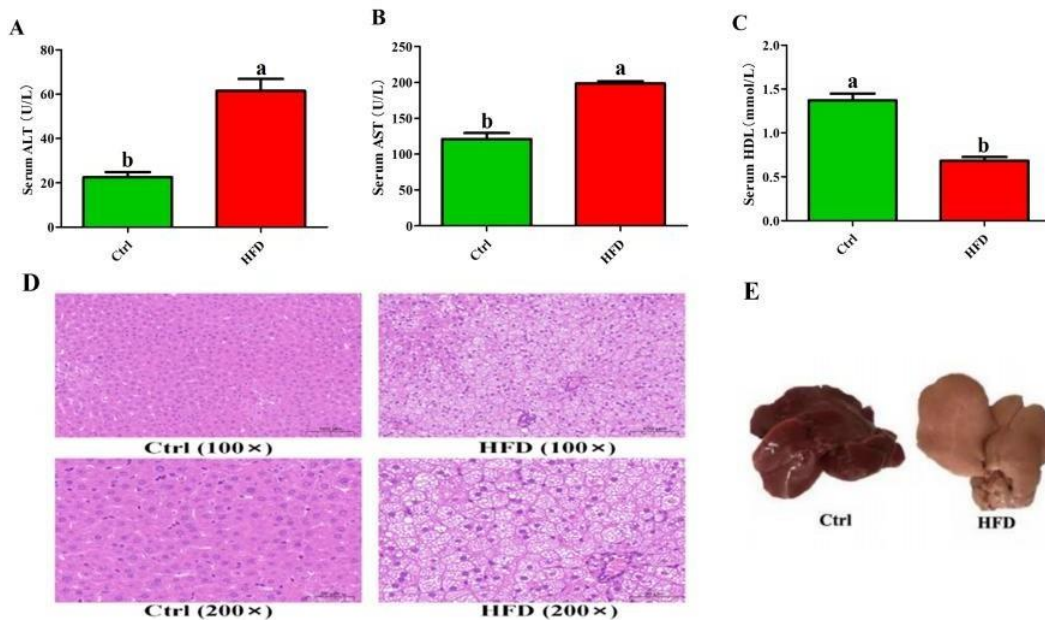


图 1 确定造模成功的血清指标与病理学观察

(A) 血清 ALT；(B) 血清 AST；(C) 血清 HDL；(D) HE 染色；(E) 形态观察

## 1.2 蒙古黄芪多糖的提取

称量 30g 蒙古黄芪粉于末圆底烧瓶中，与蒸馏水以 1:15 (w/v) 的比例混合。于 80℃ 水浴中加热 4h，离心 10min 去除沉淀，随后通过旋转蒸发器浓缩，使用无水乙醇以 50% (v/v) 的最终浓度进行沉淀。将所得沉淀置于 4℃ 冰箱中，24h 后通过离心收集沉淀物，将沉淀物于 60℃ 烘箱中烘干得到粗制蒙古黄芪多糖。测定黄芪多糖的含量、抗氧化能力，分子量以及单糖组成并对黄芪多糖进行紫外光谱分析。

## 1.3 蒙古黄芪多糖抗氧化能力测定

以 NAC 作为阳性对照，设置不同浓度的蒙古黄芪多糖，通过测定样品组吸光度 A1，对照组吸光度 A2，空白组吸光度 A0，采用公式  $D(\%) = [A0 - (A1 - A2) / A0] \times 100\%$  测定羟基自由基清除率，采用公式  $D(\%) = [(A0 - A1) / A0] \times 100\%$  计算 DPPH 自由基和 ABTS 自由基清除率。

## 1.4 红细胞抑菌能力的测定

制备牛肉膏蛋白胨培养基，超净台紫外线灭菌 30min，接种环蘸取菌液（大肠杆菌和金黄色葡萄球菌），平板划线法接种至牛肉膏蛋白胨琼脂平板，倒置后置于 37℃ 恒温培养箱培养 24h 后取出。取滤纸片放入平板表面，每个平板放入 3 个滤纸片，每片滤纸片分别 5μL 加入 0.9% 生理盐水、蒙古黄芪多糖提取物、四环素。在 37℃ 培养箱中培养 12h 进行观察并对抑菌圈大小、横纵各测量一次取平均值。

## 1.5 蒙古黄芪多糖对 HFD 大鼠血清中抗氧化相关因子 SOD-2 和 MDA 的影响

准备试管加好样品，旋涡混匀器混匀，试管口用保鲜薄膜扎紧，刺一小孔，95℃ 水浴（或用锅开盖煮沸）40min，取出后流水冷却，然后 3500-4000r/min，离心 10min，取上清，532nm 处，1cm 光径，蒸馏水调零，比色测各管吸光度值。测出 OD 值之后，根据浓度标准曲线手工计算浓度值。

## 1.6 蒙古黄芪多糖对 HFD 大鼠肝脏 HO-1 基因水平表达的影响

用 TRizol 试剂盒提取肝脏组织的总 RNA，测量 RNA 浓度并立即按照反转录试剂盒说明书进行反转录得到 cDNA，避免 RNA 降解。设计目的基因 HO-1 和内参基因 actin 的引物序列(表 1)，实时荧光定量 PCR 仪检测 HO-1 基因的 mRNA 表达。

表 1 引物序列

Gene	Forward	Reverse
HO-1	5'-ACATTGAGCTGTTTGAGGAGC	5'-CTGAGTGTGAGGACCCATCG
Actin	5'-CGCGAGTACAACCTTCTTGC	5'-ATACCCACCATCACACCCTGG

## 1.7 蒙古黄芪多糖对 HFD 大鼠肝脏 HO-1 蛋白水平表达的影响

提取大鼠肝脏组织总蛋白，用 BCA 试剂盒测定其蛋白浓度。在 10% SDS-PAGE 中通过电泳分离蛋白质，然后使用 Bio-Rad 半干转系统将分离的蛋白质转至 PVDF 膜上，5% 脱脂奶粉封闭 4h，一抗 4℃ 孵育

过夜, TBST 洗涤 5 次, 二抗室温孵育 2 h 后, TBST 洗涤 5 次。使 Licor-Odyssey 双色红外成像系统对条带进行扫描和分析。

## 1.8 数据统计学分析

实验数据采用 SPSS 软件进行单因素方差分析, 组间统计学差异采用 Duncan 多重比较检验进行验证。 $p < 0.05$  被认为有显著差异, 用小写字母表示。

## 2. 结果分析

### 2.1 蒙古黄芪分离纯化、单糖组成分析以及紫外光谱分析

mAPS 含多种成分, 包括葡萄糖、蛋白质、黄酮、熊果酸和皂苷等。通过比色分析确定葡萄糖含量在 mAPS 的化学成分中占主导地位(71.01%), 而其他几种成分仅以微量存在。然后对 mAPS 进行水解, 水解产物进行 HPLC 分析单糖组成, 主要由葡萄糖(84.86%)、阿拉伯糖(4.49%)、半乳糖(3.92%)和核糖(3.26%)等组成(图 2A 和 B), 这表明葡萄糖是主要的单糖类型。图 1C 的紫外光谱图显示, mAPS 提取样品在 260nm 和 280nm 处无核酸和蛋白质的特征吸收峰, 且与标准黄芪多糖的紫外图谱一致。

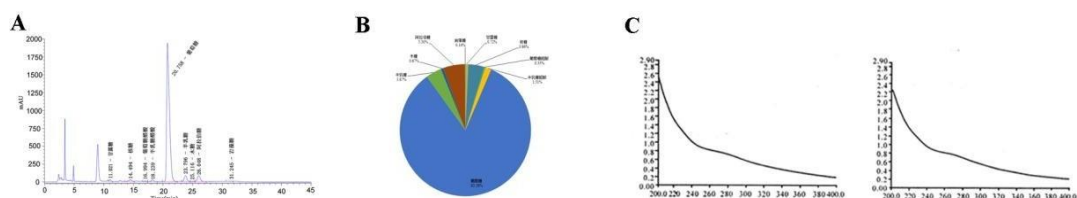


图 2 (A) 黄芪多糖的单糖组成 (HPLC) (B) 多糖含量 (C) 黄芪多糖标准和提取样品紫外谱图

### 2.2 mAPS 抗氧化能力的测定

由图 3A 可知在实验设置的 mAPS 0.1-4 g/L 浓度范围内, -OH 的清除率随着多糖浓度的上升而增高。当 mAPS 浓度达到 4 g/L 时, -OH 的清除率达到最高 57.94%, 随着浓度的增加, 多糖对 -OH 的清除率趋于稳定, 可得 mAPS 对 DPPH 具有一定的清除作用。DPPH 自由基清除率的折线走势与 -OH 一致(图 3B)。由图 3C 可得当 mAPS 浓度达到 5 g/L ABTS 自由基清除率高达 88.45% 之后趋于稳定。这些结果说明 mAPS 可清除 -OH、DPPH 和 ABTS, 具有良好的体外抗氧化活性。

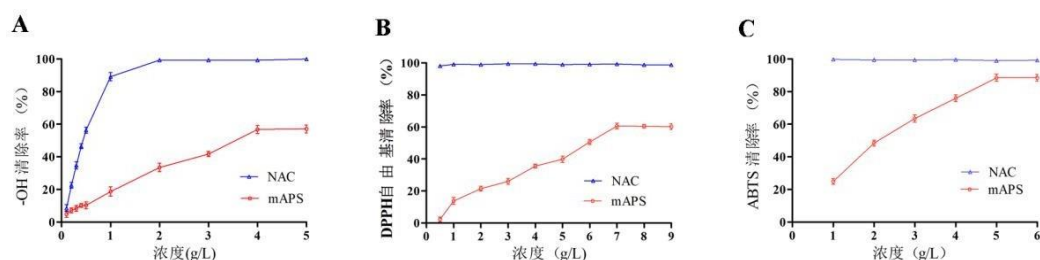


图 3 (A) -OH 清除率 (B) DppH 自由基清除率 (C) ABTS 清除率

### 2.3 mAPS 对红细胞抑菌能力的调节

如图 4 所示, 相较于 Ctrl 组, HFD 模型大鼠红细胞抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌能力较弱, 经过

mAPS 治疗后抑菌能力明显上升，BER 组效果也是如 mAPS 一致 ( $p < 0.05$ )。

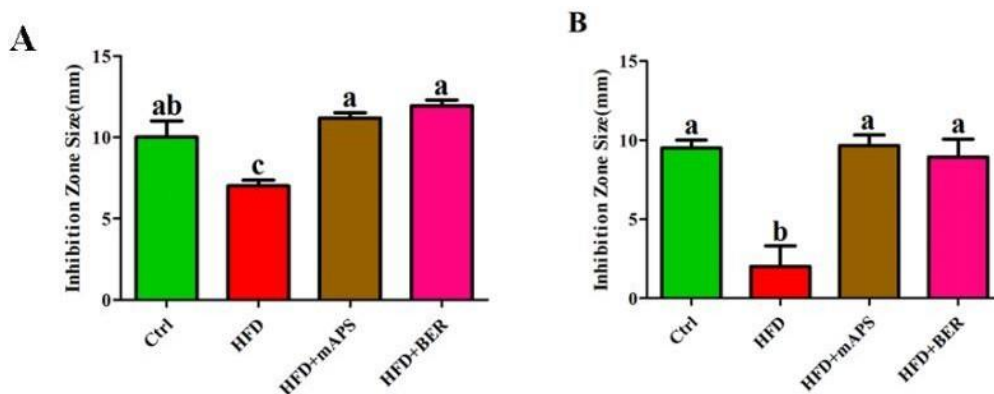


图 4 (A) mAPS 对大肠杆菌抑制能力 (B) mAPS 对金黄色葡萄球菌抑制能力

## 2.4 mAPS对HFD大鼠血清中抗氧化相关因子MDA和SOD 的影响

如图 5A、B 所示，与 Ctrl 组相比，HFD 组 SOD-2 表达水平显著下降，MDA 表达水平显著升高 ( $p < 0.05$ )，经 mAPS 治疗后 SOD-2 表达水平显著增加，MDA 表达水平显著降低 ( $p < 0.05$ )。表明 mAPS 可能通过影响血清中 SOD-2 和 MDA 表达水平来减弱肥胖大鼠中的氧化损伤。

## 2.5 mAPS对HFD大鼠肝脏中HO-1的基因和蛋白水平的的影响

如图 5 C 所示，与 Ctrl 组相比，HFD 组 HO-1 的基因表达显著下降 ( $p < 0.05$ )，而 mAPS 治疗后 HO-1 基因的表达显著增加 ( $p < 0.05$ )，表明 mAPS 可能通过上调 HO-1 表达来减弱 NAFLD 大鼠肝脏中的细胞氧化损伤。与基因水平表达结果一致，与 HFD 组相比，mAPS 治疗可以增加 HO-1 蛋白质水平的表达 ( $p < 0.05$ ) (图 5D)。这些结果表明 mAPS 可能通过上调 HO-1 表达在肝脏中发挥抗氧化活性。

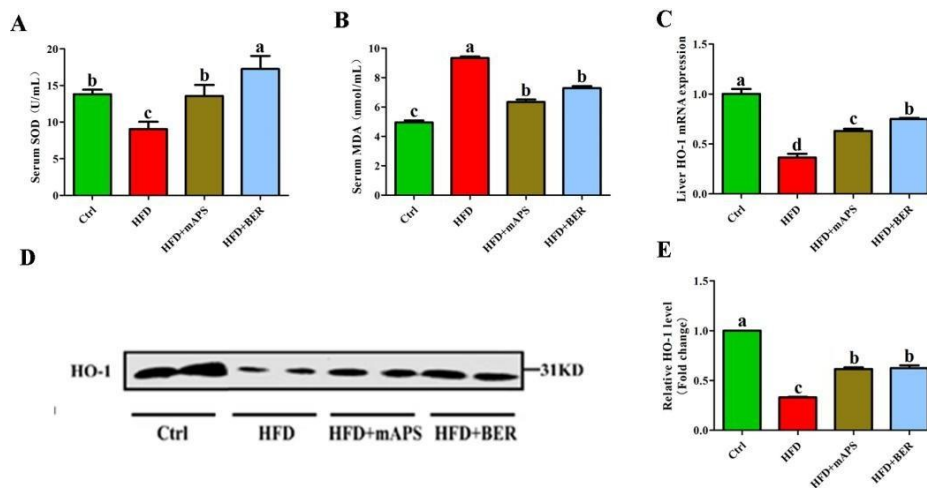


图 5 (A) 肥胖大鼠血清中 SOD-2 的表达量 (B) 肥胖大鼠血清中 MDA 的表达量 (C) 肥胖大鼠肝脏 HO-1 基因水平的表达量 (D) 肥胖大鼠肝脏 HO-1 蛋白水平的表达量 (E) 蛋白光密度值半定量分析

## 3. 讨论

多年来，红细胞一直被描述为惰性旁观者，然而现在的研究表明，来自健康个体的红细胞可以调节免疫细胞活性和成熟，并且这种活性一直与胰岛素抵抗、肥胖和高血压等疾病密切相关<sup>[10]</sup>。氧化应激和慢性炎症几乎总是存在于肥胖中。肥胖中产生的促氧化剂和脂肪细胞因子会改变红细胞功能，降低红细胞抗氧化能力并减少其抑菌能力<sup>[11]</sup>。本次研究中发现 HFD 诱导的肥胖大鼠红细胞对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌抑制能力降低，经过

mAPS 治疗后抑菌能力明显上升。这与文献支持结果一致。

肥胖者体内氧化应激反应增强，有研究表明肥胖患者体内 MDA 与 SOD-2 的活性与体内脂肪含量呈相关性，即体内脂肪含量越高 MDA 值越高，SOD-2 的活性越低<sup>[12]</sup>。与本研究结果一致，高脂肪饮食会导致血清中 SOD-2 含量降低，MDA 含量增加，而 mAPS 治疗会缓解这种变化。另一方面，考虑到核因子红细胞 2 相关因子(Nrf-2)是脂肪质量增加和氧化应激之间的一个常见潜在联系<sup>[13]</sup>，在存在氧化应激的情况下，Keap1 蛋白与 Nrf-2 解离，然后 Nrf-2 离开细胞质进入细胞核，在细胞核里直接或间接调节下游蛋白质，包括 HO-1 和 SOD2 等<sup>[14]</sup>。有研究发现，喂食高脂肪饮食的小鼠，Nrf-2 的水平发生变化，导致下游 HO-1 的 mRNA 和蛋白质水平降低，进而上调高脂肪饮食小鼠肝组织中的产脂基因，这些结果表明调节 Nrf-2/HO-1 的 mRNA 和蛋白质水平，可以增强抗氧化靶基因的表达<sup>[15]</sup>。与该研究结果一致，为了探究抗氧化通路在肥胖大鼠中的变化，我们检测了 HO-1 的基因和蛋白水平。发现在 HFD 组中 HO-1 基因和蛋白水平降低，mAPS 可以提高 HO-1 的表达，进而保护肝脏免受过氧化剂的损伤。

综上所述，我们发现蒙古黄芪多糖有很强的抗氧化能力，一方面可以提高高脂饮食诱导的肥胖大鼠外周红细胞的抑菌能力和抗氧化能力；另一方面可以提高高脂饮食诱导的肥胖大鼠肝脏细胞的抗氧化能力，进而改善肥胖大鼠的炎症和氧化损伤。这些发现为 mAPS 的新靶向机制提供了见解，为挖掘预防或治疗肥胖的提供药物科学依据。

## 参考文献:

- [1] Seres I, Bajnok L, Harangi M, et al. Alteration of PON1 activity in adult and childhood obesity and its relation to adipokine levels[J]. *Adv Exp Med Biol.* 2010;660:129-42.
- [2] Ellulu MS. Obesity, cardiovascular disease, and role of vitamin C on inflammation: a review of facts and underlying mechanisms. *Inflammopharmacology*[J]. *Inflammopharmacology.* 2017; 25(3):313-328.
- [3] Murdolo G, piroddi M, Luchetti F, et al. Oxidative stress and lipid peroxidation by-products at the crossroad between adipose organ dysregulation and obesity-linked insulin resistance[J]. *Biochimie.* 2013;95(3):585-94.
- [4] Ziob Ro, Duchnowicz p, Mulik A, et al. Oxidative damages in erythrocytes of patients with metabolic syndrome [J]. *Mol Cell Biochem.* 2013;378(1-2):267-273.
- [5] Xia Y, Yu S, Liang J, et al. Chemical fingerprinting techniques for the differentiation of polysaccharides from genus *Astragalus* [J]. *J pharm Biomed Anal.* 2020;178(4): 112898.
- [6] Zheng Y, Ren W, Zhang L, et al. A Review of the pharmacological Action of *Astragalus* polysaccharide [J]. *Front pharmacol,* 2020, 11(5): 349-364.
- [7] Nakahara D, Nan C, Mori K, et al. Effect of mushroom polysaccharides from *pleurotus eryngii* on obesity and gut microbiota in mice fed a high-fat diet [J]. *Eur J Nutr.* 2020;59(7):3231-3244.
- [8] Li HN, Zhao LL, Zhou DY, et al. *Ganoderma Lucidum* polysaccharides Ameliorates Hepatic Steatosis and Oxidative Stress in db/db Mice via Targeting Nuclear Factor E2 (Erythroid-Derived 2)-Related
- [9] Factor-2/Heme Oxygenase-1 (HO-1) pathway[J]. *Med Sci Monit.* 2020;26:e921905.
- [10] Zhong M, Yan Y, et al. *Astragalus mongholicus* polysaccharides ameliorate hepatic lipid accumulation and inflammation as well as modulate gut microbiota in NAFLD rats[J]. *Food Funct.* 2022,21.
- [11] Karsten E, Herbert BR. The emerging role of red blood cells in cytokine signalling and modulating immune cells[J]. *Blood Rev.* 2020;41:100644.
- [12] Gyawali p, Richards RS, Hughes DL, Tinley P. Erythrocyte aggregation and metabolic syndrome. *Clin Hemorheol Microcirc*[J]. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2014;57(1):73-83.
- [13] Picklo MJ, Long EK, Vomhof-dekreyee. Glutathionyl systems and metabolic dysfunction in obesity[J]. *Nutr Rev.* 2015;73(12) :858-868.
- [14] Annie-Mathew A, prem-Santhosh S, Jayasuriya R, et al. The pivotal role of Nrf2 activators in adipocyte biology [J]. *pharmacol Res.* 2021,173(21):430-437.
- [15] Jayasuriya R, Dhamodharan U, Ali D, et al. Targeting Nrf2/Keap1 signaling pathway by bioactive natural agents: possible therapeutic strategy to combat liver disease [J]. *phytochemistry.* 2021;92(21): 291-298.