

榛蘑多糖对乙醇所致大鼠血管内皮细胞损伤的保护作用

张俊慧, 陈然然, 丛贺, 沈明花*
(延边大学医学院, 吉林 延吉 133002)

摘要: 探究榛蘑多糖对乙醇所致大鼠血管内皮细胞损伤的保护作用。将40只SD大鼠随机分成4组(正常对照组、损伤组、榛蘑多糖低剂量组、榛蘑多糖高剂量组)。除正常对照组外的其余各组均按10 mL/kg m_b 灌胃体积分数40%乙醇诱导血管内皮细胞损伤。榛蘑多糖低、高剂量组分别以100、400 mg/kg m_b 灌胃榛蘑多糖, 其余组以等体积生理盐水代替, 实验共进行4周。使用苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色观察颈动脉组织病理变化; 检测血清甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, T-CHO)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、内皮型一氧化氮合酶、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、一氧化氮(NO)、内皮素1(endothelin 1, ET-1)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)水平。此外, 以600 $\mu\text{mol/mL}$ 乙醇诱导人脐静脉内皮细胞损伤模型, 分析不同剂量(100、400 $\mu\text{g/mL}$)榛蘑多糖对细胞活性氧(reactive oxygen species, ROS)、线粒体跨膜电位、细胞凋亡以及凋亡相关蛋白B淋巴细胞瘤2(B cell lymphoma 2, Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)和Caspase-3表达的影响。结果表明: 榛蘑多糖减轻乙醇所致的血管内膜损伤, 降低T-CHO、TG、LDL-C、iNOS、NO、ET-1和MDA水平, 提高HDL-C和SOD活性; 在体外条件下, 榛蘑多糖降低细胞ROS水平, 抑制乙醇所致的线粒体跨膜电位的下降和细胞凋亡, 并提高Bcl-2/Bax, 下调Cleaved caspase-3表达水平。综上, 榛蘑多糖对乙醇诱导的大鼠血管内膜损伤有保护作用, 机制可能与其降脂、抗氧化和抗凋亡作用有关。

关键词: 榛蘑多糖; 血管内皮细胞损伤; 乙醇; 降脂; 抗氧化

Protective Effects of *Armillaria mellea* Polysaccharides against Ethanol-Induced Vascular Endothelial Cell Injury in Rats

ZHANG Junhui, CHEN Ranran, CONG He, SHEN Minghua*
(Medical College, Yanbian University, Yanji 133002, China)

Abstract: The aim of this study is to evaluate the protective effect of *Armillaria mellea* polysaccharides (AMP) against ethanol-induced vascular endothelial cell injury in rats. Altogether 40 SD rats were randomly divided into 4 groups: normal control, injury, low- and high-dose AMP. The rats from all groups except the normal control group were gavaged with 40% ethanol at 10 mL/kg m_b to induce endothelial cell injury. The rats in the low- and high-dose groups were gavaged with AMP at 100 and 400 mg/kg m_b , respectively, while the remaining groups were given an equal volume of physiological saline. The administration period lasted for 4 weeks. The histopathological changes of carotid arteries were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. Serum triglycerides (TG), total cholesterol (T-CHO), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), endothelial nitric oxide synthase (eNOS), inducible nitric oxide synthase (iNOS), nitric oxide (NO), endothelin 1 (ET-1), superoxide dismutase (SOD), and malondialdehyde (MDA) levels were detected. In addition, the effects of different doses (100 and 400 $\mu\text{g/mL}$) of AMP on the levels of reactive oxygen species (ROS), mitochondrial transmembrane potential, apoptosis, and the expression of apoptosis-associated proteins such as B cell lymphoma 2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), and caspase-3 in human umbilical vein endothelial cell injured by

收稿日期: 2023-08-18

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目(81760031); 吉林省中医药管理局中医药科技项目(2022094)

第一作者简介: 张俊慧(1999—)(ORCID: 0009-0006-3482-1407), 女, 硕士研究生, 研究方向为抗血栓活性。

E-mail: 1877863535@qq.com

*通信作者简介: 沈明花(1970—)(ORCID: 0000-0003-0066-5267), 女, 教授, 博士, 研究方向为食用菌生物活性。

E-mail: 2377388628@qq.com

600 $\mu\text{mol/mL}$ ethanol were investigated. Results: AMP attenuated ethanol-induced endothelial cell injury, decreased T-CHO, TG, LDL-C, iNOS, NO, ET-1, and MDA levels, and increased HDL-C and SOD activity. *In vitro*, AMP reduced cellular ROS levels, inhibited the ethanol-induced decrease in mitochondrial transmembrane potential and apoptosis, increased Bcl-2/Bax ratio and down-regulated the expression of cleaved caspase-3. Conclusion: AMP have a protective effect against ethanol-induced endothelial cell injury in rats, and the mechanism may be related to their lipid-lowering, antioxidant, and anti-apoptotic effects.

Keywords: *Armillaria mellea* polysaccharides; vascular endothelium cell injury; ethanol; lipid-lowering; antioxidant

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230818-120

中图分类号: TS201.4; R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 07-0127-08

引文格式:

张俊慧, 陈然然, 丛贺, 等. 榛蘑多糖对乙醇所致大鼠血管内皮细胞损伤的保护作用[J]. 食品科学, 2024, 45(7): 127-134.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230818-120. <http://www.spkx.net.cn>

ZHANG Junhui, CHEN Ranran, CONG He, et al. Protective effects of *Armillaria mellea* polysaccharides against ethanol-induced vascular endothelial cell injury in rats[J]. Food Science, 2024, 45(7): 127-134. (in Chinese with English abstract)

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230818-120. <http://www.spkx.net.cn>

长期大量饮酒是造成心血管疾病的主要原因之一^[1-2]。长期大量饮酒可引起脂类代谢紊乱, 从而增加心血管疾病的风险^[3]。内皮细胞是血管内膜的主要成分, 是一种天然屏障, 在调节血管张力以及白细胞黏附和血小板聚集过程中起重要作用, 且在心血管系统稳态中发挥关键作用^[4]。因此, 内皮细胞结构、功能的损伤与众多心血管疾病的发生发展密切相关^[5]。乙醇所致的脂类代谢紊乱或其代谢过程中产生的代谢产物可直接作用于血管内皮细胞, 影响其结构或功能。已有研究表明, 大鼠慢性乙醇中毒会引起其脑毛细血管内皮细胞结构改变^[6]。乙醇代谢过程中产生活性氧 (reactive oxygen species, ROS)^[7], 后者引发氧化应激, 最终会引起细胞凋亡^[8]。因此, 调节乙醇所致的脂类代谢紊乱或降低细胞ROS水平对保护血管内皮细胞以及心血管疾病的防治具有重要意义。

榛蘑 (*Armillaria mellea*) 是一种药食用菌, 主要分布于我国内蒙古、黑龙江和吉林等地区, 具有抗氧化、降脂等功效^[9-10]。前期研究表明, 榛蘑多糖具有保护血管内皮的作用^[11-12]。乙醇对血管内膜的损伤与氧化应激和高血脂有关, 而榛蘑多糖具有抗氧化及降脂作用。为探究榛蘑多糖是否对乙醇诱导的血管内膜损伤有保护作用, 本研究以乙醇诱导血管内膜损伤SD大鼠为模型, 分析榛蘑多糖对血管内膜的影响。旨在为榛蘑多糖对乙醇所致大鼠血管内膜损伤的保护作用提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 实验动物、材料与试剂

清洁级SD大鼠40只, 体质量为180~200 g, 雌雄各半, 生产许可证号: SCXK (吉) 2017-0003, 由延边大

学实验动物中心提供。动物实验按照GB/T 35892—2018《实验动物 福利伦理审查指南》执行。

人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 购于上海佛雷堡生物科技发展有限公司。

榛蘑多糖由延边大学医学院生化教研室提供; 总胆固醇 (total cholesterol, T-CHO)、血清甘油三酯 (triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、内皮素1 (endothelin 1, ET-1)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒 南京建成生物工程研究所; NO、内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS)、诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 检测试剂盒 上海研谨生物科技有限公司; 胎牛血清和RPMI-1640培养基 美国Gibco公司; CCK8试剂盒 美国APExBio公司; ROS检测试剂盒 上海碧云天生物技术有限公司; AO/EB双染色试剂盒、JC-1试剂盒 北京索莱宝生物科技有限公司; 藻红蛋白 (phycoerythrin, PE) 偶联Annexin-V凋亡检测试剂盒 美国BD公司; B淋巴细胞瘤2蛋白 (B cell lymphoma 2, Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax)、Caspase-3、 β -actin一抗、辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记羊抗兔免疫球蛋白G (immunoglobulin G, IgG)、HRP标记羊抗鼠IgG 美国Cell Signaling公司。

1.2 仪器与设备

BX53F荧光倒置显微镜 日本Olympus株式会社; RT-2100酶标仪 深圳雷杜生命科学股份有限公司;

c280化学发光成像系统 美国Azure Biosystems公司；
A00-1-1102流式细胞仪 美国Beckman Coulter
公司。

1.3 方法

1.3.1 动物分组及处理

将SD大鼠随机平分为4组，即正常对照组、损伤组、榛蘑多糖低剂量组和榛蘑多糖高剂量组。每日8:00，除正常对照组外其余各组大鼠按10 mL/kg m_b 以体积分数40%乙醇灌胃，正常对照组使用生理盐水代替。每日16:00，榛蘑多糖低、高剂量组分别按100、400 mg/kg m_b 灌胃榛蘑多糖溶液，正常对照组和损伤组均以等体积生理盐水代替。连续灌胃4周后大鼠禁食、禁水24 h。24 h后以乌拉坦麻醉大鼠，取颈动脉，用苏木精-伊红（hematoxylin-eosin, HE）染色，并心脏采血用于血清学指标的检测。

1.3.2 颈动脉形态学观察

将大鼠颈动脉用4%多聚甲醛溶液固定24 h，自来水冲洗，经乙醇梯度脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后切片后进行HE染色，在400倍光学显微镜下观察血管组织的病理变化。

1.3.3 血清学指标检测

常规方法分离血清，按试剂盒说明书进行T-CHO、TG、LDL-C、HDL-C、SOD、MDA、NO、eNOS、iNOS和ET-1水平的检测。

1.3.4 细胞培养及存活率测定

将HUVEC培养于含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基。将HUVEC接种于96孔板，分为对照组、乙醇组、榛蘑多糖低、高剂量组，每组设6个复孔，每孔接种密度为 1×10^5 cells/mL。除对照组外，其余各组分别与终浓度600 $\mu\text{mol/mL}$ 乙醇作用12 h，对照组以RPMI-1640培养基代替。12 h后榛蘑多糖低、高剂量组分别与终质量浓度100、400 $\mu\text{g/mL}$ 的榛蘑多糖作用24 h，对照组和乙醇组以RPMI-1640培养基代替。24 h后每孔加入10 μL CCK8溶液（试剂盒自带）孵育1 h。使用酶标仪在450 nm波长处测定光密度（ $\text{OD}_{450\text{nm}}$ ），细胞存活率按下式计算：

$$\text{细胞存活率}/\% = \frac{\text{处理组}\text{OD}_{450\text{nm}}}{\text{对照组}\text{OD}_{450\text{nm}}} \times 100$$

1.3.5 细胞ROS水平测定

将HUVEC以 3×10^5 cells/孔的密度接种于6孔板，实验分组及处理同1.3.4节。将4组细胞以不同方式处理后，弃上清液，用磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline, PBS）洗涤2次。加入1 mL按照1 000:1用无血清培养基稀释的2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯（2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA）荧光探针，其终浓度为10 $\mu\text{mol/L}$ ，在37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中避光孵育30 min。后弃上清液，使用PBS洗涤。每孔加入1 mL RPMI-1640，在480 nm激发波长下观察并拍照，分析细胞的荧光强度，该值代表细胞ROS水平。

ydrofluorescein diacetate, DCFH-DA) 荧光探针，其终浓度为10 $\mu\text{mol/L}$ ，在37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中避光孵育30 min。后弃上清液，使用PBS洗涤。每孔加入1 mL RPMI-1640，在480 nm激发波长下观察并拍照，分析细胞的荧光强度，该值代表细胞ROS水平。

1.3.6 JC-1染色法观察线粒体跨膜电位水平

将HUVEC以 3×10^5 cells/孔的密度接种于24孔板，实验分组及处理同1.3.4节。将4组细胞以不同方式处理后，弃上清液，用PBS洗涤后分别加入250 μL 无血清培养基和JC-1染色工作液，37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中避光孵育30 min。30 min后弃上清液，用JC-1染色缓冲液洗涤。加无血清培养基500 μL ，在515、585 nm激发波长下观察并拍照，计算585、515 nm波长处的荧光强度比值，该值代表线粒体跨膜电位水平。

1.3.7 AO/EB染色法观察细胞凋亡

将HUVEC接种于6孔板爬片，细胞分组及处理同1.3.4节。按说明书加入AO/EB工作液，在室温放置5 min。封片后在荧光显微镜下观察拍照。

1.3.8 流式细胞术检测细胞凋亡

将HUVEC接种于6孔板，细胞分组及处理同1.3.4节。小心收集细胞培养液到离心管中备用，每孔加入0.5 mL胰酶置于培养箱中消化细胞，至细胞可以被轻轻吹打下来时，加入收集的细胞培养液，吹打下所有贴壁细胞，再次收集到离心管内，1 000 $\times g$ 离心3 min，沉淀细胞，小心吸除上清。用预冷PBS洗涤细胞2次，然后以 1×10^6 cells/mL将细胞重悬于Annexin V结合缓冲液中。取100 μL 细胞悬液，加入PE标记的Annexin V和7-氨基放线菌素D（7-aminoactinomycin D, 7-AAD）各5 μL ，室温下避光孵育15 min。加入400 μL Annexin V结合缓冲液，使用流式细胞仪检测凋亡率。

1.3.9 蛋白免疫印迹法检测Bax、Bcl-2和Cleaved caspase-3的表达水平

将HUVEC接种于培养皿，实验分组及处理方法同1.3.4节。收集各组细胞后用PBS洗涤并用RIPA缓冲液裂解细胞，提取蛋白质。用BCA法进行蛋白定量后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转膜，用5 g/100 mL脱脂乳粉将聚偏氟乙烯膜室温封闭2 h，加入相应的一抗，于4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。用TBST缓冲液洗涤后加入二抗，室温孵育1 h。最后进行冲洗、显影。

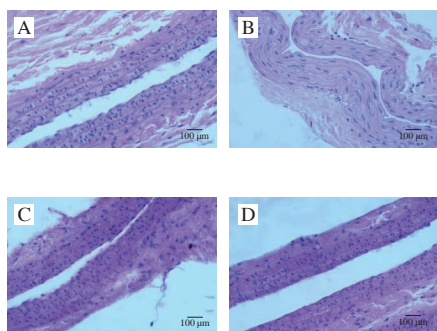
1.4 数据处理

实验数据用平均值 \pm 标准差表示，使用SPSS 20.0统计学软件对数据进行单因素方差统计分析， $P < 0.05$ 表示差异具有显著意义。使用ImageJ软件进行细胞荧光强度分析，使用Graphpad Prism 9.5.1软件作图。

2 结果与分析

2.1 颈动脉形态学观察结果

由图1可知,正常对照组大鼠颈动脉结构正常,血管内膜结构完整并且内皮细胞连续性良好。经乙醇诱导后损伤组血管明显收缩,管腔变窄,内皮细胞脱落明显。表明所用的乙醇剂量可引起血管内皮的损伤。与损伤组相比,经榛蘑多糖处理后内膜较完整,内皮细胞脱落现象得到明显改善,表明榛蘑多糖有一定的血管内膜保护作用。



A.正常对照组; B.损伤组; C.榛蘑多糖低剂量组; D.榛蘑多糖高剂量组。

图1 大鼠颈动脉HE染色结果(×400)

Fig. 1 Morphological observation of carotid artery in rats (×400)

2.2 榛蘑多糖对乙醇诱导大鼠血脂水平的影响

血清T-CHO、TG、LDL-C和HDL-C水平可以反映机体脂类代谢水平^[13]。大量饮酒可引起脂类代谢紊乱^[14],而血脂异常是内皮受损的诱因^[15]。由表1可知,与正常对照组相比,经乙醇处理后大鼠血清T-CHO、TG、LDL-C水平极显著升高($P<0.01$),HDL-C水平极显著降低($P<0.01$),表明乙醇引起脂类代谢的紊乱并进一步影响血管内膜的结构及功能。用不同剂量的榛蘑多糖干预后可逆转上述指标的变化,说明榛蘑多糖具有一定的降脂作用。研究表明,榛蘑多糖通过降低血脂改善糖尿病及其并发症的发生^[16],与本研究中榛蘑多糖的降脂作用相符。

表1 榛蘑多糖对乙醇诱导大鼠血清T-CHO、TG、LDL-C和HDL-C浓度的影响

组别	T-CHO浓度	TG浓度	LDL-C浓度	HDL-C浓度
正常对照组	1.85±0.22	0.42±0.11	0.11±0.02	5.31±0.91
损伤组	4.00±0.95**	0.65±0.02**	0.40±0.14**	1.23±0.25**
榛蘑多糖低剂量组	3.10±1.32	0.56±0.07 [#]	0.17±0.05 ^{##}	3.63±0.79 ^{##}
榛蘑多糖高剂量组	2.01±0.38 ^{##}	0.41±0.07 ^{##}	0.16±0.04 ^{##}	3.57±0.98 ^{##}

注:与正常对照组相比,**.差异极显著($P<0.01$);与损伤组相比,#.差异显著($P<0.05$),##.差异极显著($P<0.01$)。表2~3同。

2.3 榛蘑多糖对乙醇诱导大鼠血清eNOS、iNOS及NO水平的影响

研究表明,乙醇及其代谢过程中产生的ROS可以激活NOS。此外,乙醇对精氨酸酶的抑制作用促进L-精氨酸转变成NO^[17]。由表2可知,损伤组大鼠iNOS和NO水平极显著高于正常对照组($P<0.01$),这可能与乙醇所致的氧化应激有关。有研究表明,乙醇上调iNOS,促进主动脉环收缩^[18],这与本研究结果相符。经榛蘑多糖干预后,与损伤组相比,高剂量组iNOS和NO水平极显著降低($P<0.01$),而各组之间eNOS水平无显著差异。在生理条件下,eNOS催化NO生成,调节血管舒张及血小板聚集^[19]。在氧化应激、炎症等刺激下iNOS被激活,产生大量NO,继发产生过氧亚硝基阴离子(ONOO⁻),引起细胞损伤^[20-21]。因此,降低iNOS活性对氧化应激所致细胞损伤具有一定积极意义。本研究结果表明,乙醇诱导后iNOS水平显著增高,产生过量NO,后者氧化产生的产物直接损伤血管内膜。而经榛蘑多糖干预后,抑制乙醇所致的iNOS活性升高,以及NO过度生成,从而保护内皮细胞,这与本研究的HE染色结果相符。

表2 榛蘑多糖对乙醇诱导大鼠血清eNOS、iNOS及NO水平的影响
Table 2 Effects of *Armillaria mellea* polysaccharides on the levels of eNOS, iNOS and NO in serum of ethanol-induced rats

组别	eNOS质量浓度/(pg/mL)	iNOS活力/(U/mL)	NO浓度/(μmol/L)
正常对照组	6.1±1.3	5.1±1.3	1.7±0.3
损伤组	9.2±3.1	16.2±3.1**	3.7±0.7**
榛蘑多糖低剂量组	9.7±3.2	9.4±1.4 ^{##}	3.4±0.5
榛蘑多糖高剂量组	6.3±1.1	5.9±0.9 ^{##}	1.9±0.8 ^{##}

2.4 榛蘑多糖对乙醇诱导大鼠血清ET-1、SOD和MDA水平的影响

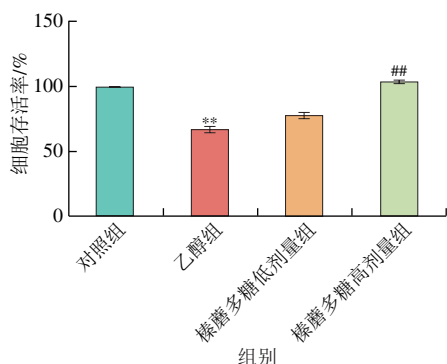
ET-1是一种血管收缩物质,主要由内皮细胞产生和释放,可作为检测内皮功能障碍的指标^[22]。SOD作为重要的抗氧化酶,可以清除体内的超氧阴离子^[23]。MDA是一种脂质过氧化产物,可以间接反映细胞受自由基攻击的程度。乙醇的代谢过程中产生ROS^[7],而过量ROS可引起细胞氧化损伤。因此,提高机体的抗氧化水平对乙醇所致的细胞氧化损伤有保护作用。由表3可知,与正常对照组相比,乙醇处理后ET-1和MDA水平极显著升高,而SOD活性极显著下降($P<0.01$)。然而,与损伤组相比,经榛蘑多糖干预后,高剂量组大鼠血清ET-1和MDA水平显著降低,SOD活性显著升高($P<0.05$)。结果表明,榛蘑多糖通过提高抗氧化酶活性抑制氧化损伤,从而保护血管内膜,与本研究中血管内膜病理改变结果相符。

表3 榛蘑多糖对乙醇诱导大鼠血清ET-1、SOD和MDA水平的影响
Table 3 Effects of *Armillaria mellea* polysaccharides on the levels of ET-1, SOD and MDA in serum of ethanol-induced rats

组别	ET-1质量浓度/ (ng/L)	SOD活力/ (U/mL)	MDA浓度/ (nmol/mL)
正常对照组	19.8±3.4	62.4±2.0	2.5±0.3
损伤组	31.0±2.5**	56.4±3.2**	4.3±0.6**
榛蘑多糖低剂量组	29.4±1.2	56.8±1.5	3.6±0.4 [#]
榛蘑多糖高剂量组	27.5±1.5 [#]	60.0±1.2 [#]	2.6±0.2 [#]

2.5 榛蘑多糖对乙醇诱导HUVEC存活率的影响

由图2可知，在体外实验中，经乙醇处理后细胞存活率显著下降，说明600 μmol/mL乙醇有一定的内皮毒性。榛蘑多糖干预后细胞存活率逐渐提高，高剂量组平均存活率极显著高于乙醇组 ($P < 0.01$)，提示榛蘑多糖可以保护乙醇所致的细胞损伤。



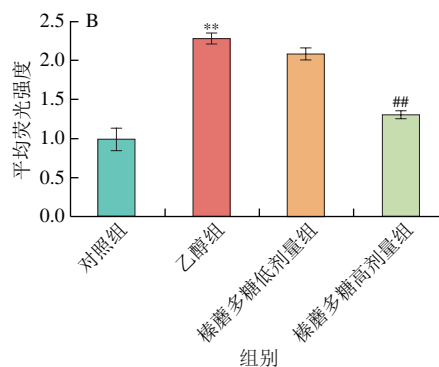
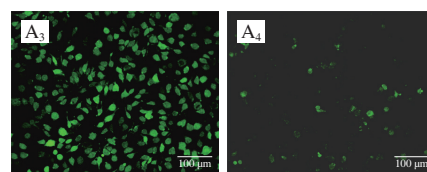
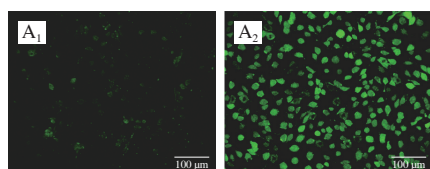
**、与正常对照组相比差异极显著 ($P < 0.01$)；##、与乙醇组相比差异极显著 ($P < 0.01$)。图3~6同。

图2 榛蘑多糖对HUVEC存活率的影响

Fig. 2 Effect of *Armillaria mellea* polysaccharides on HUVEC viability

2.6 榛蘑多糖对乙醇诱导HUVEC ROS水平的影响

DCFH-DA常用于细胞ROS水平的检测^[24]。DCFH-DA在细胞内经酯酶水解生成DCFH，后者被ROS氧化生成具有绿色荧光的2',7'-二氯荧光素，其荧光强度可以反映细胞ROS水平。由图3可知，乙醇作用后细胞ROS水平极显著升高 ($P < 0.01$)，而榛蘑多糖干预后高剂量组ROS水平较乙醇组极显著降低 ($P < 0.01$)。过量ROS可促进不饱和脂肪酸的氧化，导致MDA等脂质过氧化产物增多。榛蘑多糖可能通过提高SOD等抗氧化酶活性，清除自由基，抑制脂质过氧化，从而保护细胞，这与2.4、2.5节得到的结果相符。



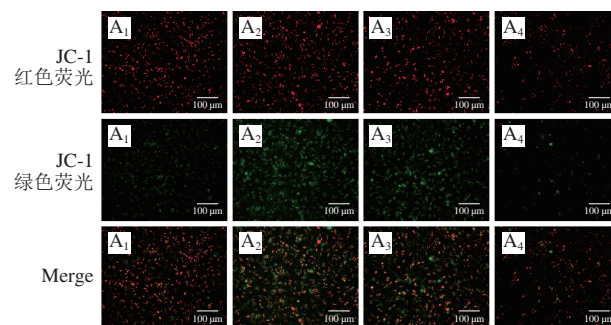
A.细胞荧光强度图；下标1.对照组，下标2.乙醇组，下标3.榛蘑多糖低剂量组，下标4.榛蘑多糖高剂量组，图4~6同；B.平均荧光强度。

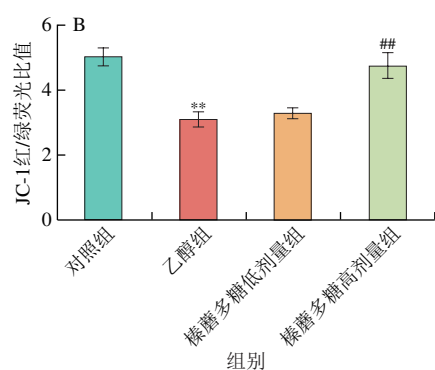
图3 榛蘑多糖对HUVEC ROS水平的影响

Fig. 3 Effect of *Armillaria mellea* polysaccharides on ROS levels in HUVEC

2.7 榛蘑多糖对乙醇诱导HUVEC线粒体跨膜电位的影响

线粒体是细胞进行物质代谢和能量代谢的主要细胞器。线粒体跨膜电位可以反映线粒体功能，其水平的降低是线粒体功能障碍的标志之一^[25]。本研究用JC-1荧光探针检测线粒体跨膜电位水平。当线粒体跨膜电位高时JC-1以聚合体的形式存在，发出红色荧光；而其水平降低时JC-1则以单体形式存在，产生绿色荧光。JC-1红/绿荧光比值可以反映线粒体跨膜电位相对水平。由图4可知，与对照组相比，乙醇组绿色荧光显著增强，JC-1红/绿荧光比值极显著降低 ($P < 0.01$)，说明乙醇引起ROS水平的升高并诱导氧化应激，引起线粒体跨膜电位降低；而与乙醇组相比，榛蘑多糖高剂量组绿色荧光强度减弱，JC-1红/绿荧光比值极显著升高 ($P < 0.01$)，说明榛蘑多糖可以抑制乙醇所致的线粒体跨膜电位降低，这可能与其清除ROS作用有关。





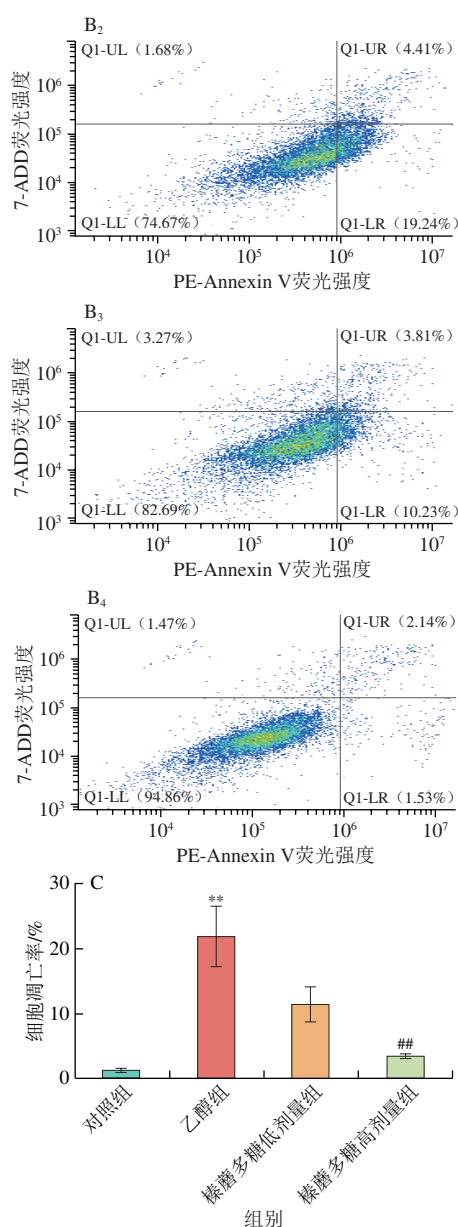
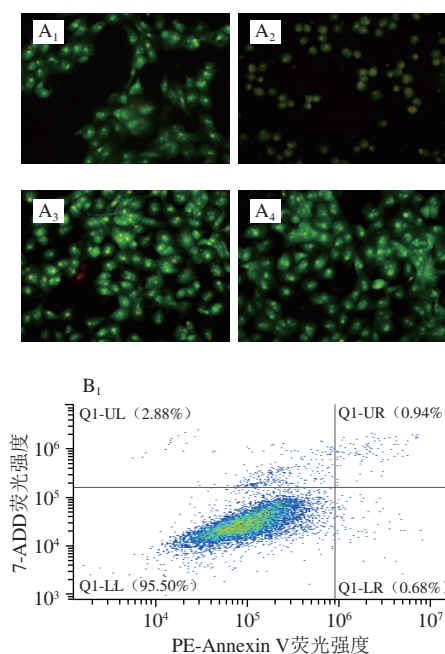
A. JC-1染色细胞荧光强度图; B. JC-1红/绿荧光比值。

图4 榛蘑多糖对HUVEC线粒体跨膜电位的影响

Fig. 4 Effects of *Armillaria mellea* polysaccharides on mitochondrial membrane potential in HUVEC

2.8 榛蘑多糖对乙醇诱导HUVEC凋亡的影响

研究表明,乙醇所致的氧化损伤会引起细胞凋亡^[26]。由图5A可知,正常对照组细胞形态正常,呈梭形,细胞核呈均匀绿色荧光;乙醇组细胞失去正常结构、明显变小变圆,细胞核固缩并呈黄绿色,呈凋亡细胞形态,提示乙醇诱导细胞凋亡。与乙醇组相比,经榛蘑多糖干预后可见凋亡细胞明显减少,细胞形态趋于正常,说明榛蘑多糖可以抑制乙醇所致的细胞凋亡。为进一步观察榛蘑多糖对乙醇所致细胞凋亡的影响,用流式细胞仪检测凋亡率。由图5B~C可知,与对照组相比,乙醇作用后细胞凋亡率极显著增加($P < 0.01$),而榛蘑多糖干预后细胞凋亡减少,榛蘑多糖高剂量组作用尤为显著,与图5A结果相一致。线粒体跨膜电位是观察早期细胞凋亡的重要指标^[27]。榛蘑多糖抑制乙醇所致的线粒体跨膜电位降低,从而可以解释减少细胞凋亡的结果。



A. AO/EB染色结果($\times 200$); B.流式细胞术检测结果; C.流式细胞术检测结果统计。

图5 榛蘑多糖对HUVEC凋亡的影响

Fig. 5 Effect of *Armillaria mellea* polysaccharides on apoptosis in HUVEC

2.9 榛蘑多糖对乙醇诱导HUVEC凋亡相关蛋白Bax、Bcl-2、Cleaved caspase-3表达的影响

线粒体凋亡是细胞凋亡的主要途径之一^[28]。Bax、Bcl-2和Caspase-3介导线粒体凋亡途径^[29]。Bax和Bcl-2调控线粒体膜的通透性,调节细胞色素C的释放,进而影响Caspase-3的活化。由图6可知,与对照组相比,乙醇极显著下调Bcl-2表达,极显著上调Bax和Cleaved caspase-3水平($P < 0.01$)。与乙醇组相比,经榛蘑多糖干预后上调Bcl-2表达水平、降低Bax和Cleaved caspase-3表达并降低Bax/Bcl-2。上述结果提示,榛蘑多糖通过调控线粒体凋亡相关蛋白表达,从而抑制细胞凋亡。

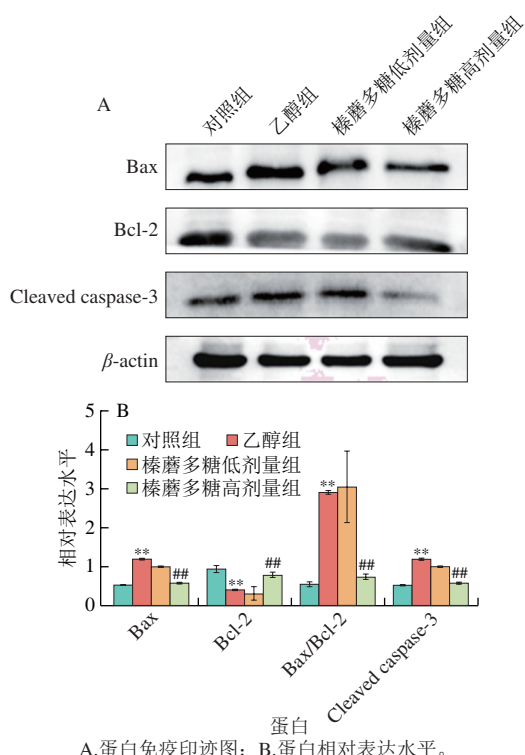


图6 榛蘑多糖对Bax、Bcl-2和Cleaved caspase-3表达的影响

Fig.6 Effects of *Armillaria mellea* polysaccharides on the expression of Bax, Bcl-2 and cleaved caspase-3

3 结论

血管内膜作为直接与乙醇或其代谢产物接触的部位，是乙醇毒性作用的靶点。本研究以体积分数40%乙醇溶液灌胃4周的方法建立大鼠血管内膜损伤模型，分析榛蘑多糖对血管内膜的保护作用。结果表明，乙醇作用后大鼠血管明显收缩、管腔变窄、可见部分内皮细胞脱落，ET-1水平升高，提示乙醇诱导的血管内膜损伤模型建立成功。同时，损伤组大鼠的T-CHO、TG、LDL-C、NO、MDA水平显著升高，表明乙醇引起脂代谢紊乱并引发氧化应激反应，促进脂质过氧化。体外实验结果表明，600 μmol/mL的乙醇降低细胞存活率、提高细胞ROS水平、降低线粒体跨膜电位，从而促进细胞凋亡。Bax、Bcl-2和Caspase-3是介导线粒体凋亡途径的重要蛋白。Bax/Bcl-2的增加促进细胞色素C释放，后者介导凋亡复合体的形成，进而活化Caspase-3，从而促进细胞凋亡。线粒体跨膜电位的下降是线粒体凋亡途径的早期事件。经不同剂量榛蘑多糖干预后减轻了血管内膜的氧化损伤，降低细胞ROS水平、抑制乙醇所致的线粒体跨膜电位下降，从而抑制细胞凋亡，这可能与其下调Bax/Bcl-2、Cleaved caspase-3有关。综上所述，榛蘑多糖对乙醇诱导的大鼠血管内膜损伤有保护作用，其机制可能与其降脂、抗氧化和抗凋亡作用有关，具体作用机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] ROERECKE M. Alcohol's impact on the cardiovascular system[J]. *Nutrients*, 2021, 13(10): 3419. DOI:10.3390/nu13103419.
- [2] 王宁夫. 酒精性心脏病: 不能忽视的心血管病危险[J]. *中华心血管病杂志*, 2018, 46(6): 425-427.
- [3] 崔玮, 崔迪, 欧阳婷, 等. 抑制NOX缓解酒精肝模型小鼠肝细胞损伤及脂代谢紊乱[J]. *中国组织工程研究*, 2022, 26(35): 5589-5595.
- [4] SUN H J, WU Z Y, NIE X W, et al. Role of endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the link between inflammation and hydrogen sulfide[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2019, 10: 1568. DOI:10.3389/fphar.2019.01568.
- [5] WEN F, LIU Y, WANG H Y. Clinical evaluation tool for vascular health-endothelial function and cardiovascular disease management[J]. *Cells*, 2022, 11(21): 3363. DOI:10.3390/cells11213363.
- [6] 赵丽, 关继奎, 陈嘉峰. 酒精中毒大鼠脑血管及细胞损伤相关超微结构改变[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2021, 38(10): 1110-1112. DOI:10.19845/j.cnki.zfysjbjz.2021.0244.
- [7] PARIRA T, FIGUEROA G, GRANADO S, et al. Trichostatin a shows transient protection from chronic alcohol-induced reactive oxygen species (ROS) production in human monocyte-derived dendritic cells[J]. *Journal of Alcoholism and Drug Dependence*, 2018, 6(4): 316. DOI:10.4172/2329-6488.1000316.
- [8] 李芳芳, 丛贺, 沈明花. 榆干离褶伞溶栓酶对酒精损伤血管内皮细胞的保护作用[J]. *食品科学*, 2020, 41(5): 108-114. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190301-010.
- [9] ERBIAI E H, DA SILVA L P, SAIDI R, et al. Chemical composition, bioactive compounds, and antioxidant activity of two wild edible mushrooms *Armillaria mellea* and *Macrolepiota procera* from two countries (Morocco and Portugal)[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(4): 575. DOI:10.3390/biom11040575.
- [10] 柳运波. 蜜环菌液体培养条件优化及降血脂作用的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2015: 23-25.
- [11] 丛贺, 周广亮, 金梅花, 等. 榛蘑多糖对大鼠血管内皮细胞的保护作用[J]. *食品与发酵工业*, 2015, 41(5): 157-159. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.201505028.
- [12] 王玉娇, 丛贺, 沈明花. 榛蘑多糖对三氯化铁所诱导大鼠血栓的抑制作用[J]. *延边大学医学学报*, 2015, 38(3): 171-173.
- [13] LI Q, FANG X J, CHEN H J, et al. Retarding effect of dietary fibers from bamboo shoot (*Phyllostachys edulis*) in hyperlipidemic rats induced by a high-fat diet[J]. *Food and Function*, 2021, 12(10): 4696-4706. DOI:10.1039/d0fo02407d.
- [14] 李芳芳, 张蕊萌, 丛贺, 等. 榆干离褶伞溶栓酶对酒精诱导大鼠肝损伤的保护作用[J]. *食品科学*, 2021, 42(17): 121-126. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200821-288.
- [15] GHOSH A, GAO L, THAKUR A, et al. Role of free fatty acids in endothelial dysfunction[J]. *Journal of Biomedical Science*, 2017, 24(1): 50. DOI:10.1186/s12929-017-0357-5.
- [16] LI X, ZHU J, WANG T, et al. Antidiabetic activity of *Armillaria mellea* polysaccharides: joint ultrasonic and enzyme assisted extraction[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2023, 95: 106370. DOI:10.1016/j.ultsonch.2023.106370.
- [17] YAO F, ABDEL-RAHMAN A A. Tetrahydrobiopterin paradoxically mediates cardiac oxidative stress and mitigates ethanol-evoked cardiac dysfunction in conscious female rats[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2021, 909: 174406. DOI:10.1016/j.ejphar.2021.174406.
- [18] TIRAPELLI C R, FUKADA S Y, YOGI A, et al. Gender-specific vascular effects elicited by chronic ethanol consumption in rats: a role

- for inducible nitric oxide synthase[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2008, 153(3): 468-479. DOI:10.1038/sj.bjp.0707589.
- [19] MARÍN M, MOYA C, MÁÑEZ S. Mutual influences between nitric oxide and paraoxonase 1[J]. *Antioxidants*, 2019, 8(12): 619. DOI:10.3390/antiox8120619.
- [20] GLIOZZI M, SCICCHITANO M, BOSCO F, et al. Modulation of nitric oxide synthases by oxidized LDLs: role in vascular inflammation and atherosclerosis development[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(13): 3294. DOI:10.3390/ijms20133294.
- [21] GUO Y Z, WEN J J, HE A, et al. iNOS contributes to heart failure with preserved ejection fraction through mitochondrial dysfunction and Akt S-nitrosylation[J]. *Journal of Advanced Research*, 2023, 43: 175-186. DOI:10.1016/j.jare.2022.03.003.
- [22] SZCZESNY-MALYSIAK E, STOJAK M, CAMPAGNA R, et al. Bardoxolone methyl displays detrimental effects on endothelial bioenergetics, suppresses endothelial ET-1 release, and increases endothelial permeability in human microvascular endothelium[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 2020: 4678252. DOI:10.1155/2020/4678252.
- [23] ROSA A C, CORSI D, CAVI N, et al. Superoxide dismutase administration: a review of proposed human uses[J]. *Molecules*, 2021, 26(7): 1844. DOI:10.3390/molecules26071844.
- [24] MIAZEK K, BETON K, ŚLIWIŃSKA A, et al. The effect of β -carotene, tocopherols and ascorbic acid as anti-oxidant molecules on human and animal *in vitro/in vivo* studies: a review of research design and analytical techniques used[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(8): 1087. DOI:10.3390/biom12081087.
- [25] ZHOU Y S, LONG Q, WU H, et al. Topology-dependent, bifurcated mitochondrial quality control under starvation[J]. *Autophagy*, 2020, 16: 562-574. DOI:10.1080/15548627.2019.1634944.
- [26] FERNÁNDEZ-SOLÀ J. The effects of ethanol on the heart: alcoholic cardiomyopathy[J]. *Nutrients*, 2020, 12(2): 572. DOI:10.3390/nu12020572.
- [27] WANG Y C, WANG Y L, YUE G X, et al. Energy metabolism disturbance in migraine: from a mitochondrial point of view[J]. *Frontiers in Physiology*, 2023, 14: 1133528. DOI:10.3389/fphys.2023.1133528.
- [28] GREEN D R. The mitochondrial pathway of apoptosis: part I: MOMP and beyond[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2022, 14(5): a041038. DOI:10.1101/cshperspect.a041038.
- [29] LI J J, WEN J Y, SUN C X, et al. Phytosphingosine-induced cell apoptosis via a mitochondrially mediated pathway[J]. *Toxicology*, 2022, 482: 153370. DOI:10.1016/j.tox.2022.153370.