

doi:10.12301/spxb202200677

文章编号:2095-6002(2023)02-0081-11

引用格式:黄钻元,胡梦伟,王瑞,等. 4种杂豆多糖对乙醇诱导小鼠急性胃黏膜损伤的辅助保护作用[J]. 食品科学技术学报, 2023,41(2):81-91.



HUANG Zuanyuan, HU Mengwei, WANG Rui, et al. Protective effects of four legume polysaccharides on ethanol-induced acute gastric mucosal lesions in mice[J]. Journal of Food Science and Technology, 2023,41(2):81-91.

4种杂豆多糖对乙醇诱导小鼠急性胃黏膜损伤的辅助保护作用

黄钻元¹, 胡梦伟¹, 王瑞¹, 罗宸东¹, 宋萧萧^{1,*}, 崔武卫^{1,2}, 殷军艺¹

(1.南昌大学食品科学与技术国家重点实验室/中国-加拿大食品科学与技术联合实验室(南昌)/江西省生物活性多糖重点实验室,南昌 330047;
2.加拿大农业及农业食品部 圭尔夫研究与发展中心,加拿大 安大略 圭尔夫 N1G5C9)

摘要:胃溃疡是因胃黏膜损伤而导致的消化性溃疡疾病,因其化学治疗药物存在各种副作用,寻求更安全有效的天然活性化合物治疗胃溃疡显得至关重要。采用水提醇沉法分别从小黑豆、豇豆、豌豆和鹰嘴豆提取多糖,测定其基本营养组成、单糖组成和分子质量分布,探究4种杂豆多糖对乙醇诱导的小鼠急性胃黏膜损伤的保护作用及其潜在机制。研究表明:小黑豆、豇豆、豌豆和鹰嘴豆多糖的糖含量分别为66.40%、71.79%、67.41%、53.31%,分子质量分布较宽;豇豆、豌豆及鹰嘴豆多糖的单糖组成主要为阿拉伯糖、半乳糖和半乳糖醛酸,属果胶类酸性多糖,而小黑豆多糖主要由半乳糖和甘露糖组成,属中性多糖。小黑豆、豇豆和鹰嘴豆多糖的胃黏膜损伤抑制率分别为37.1%、34.4%和29.8%,均可减轻小鼠胃黏膜损伤状况,其中豇豆多糖可显著抑制白细胞介素6和肿瘤坏死因子 α 表达($P < 0.05$),小黑豆多糖能显著降低胃组织中丙二醛含量及提高总超氧化物歧化酶活性和还原型谷胱甘肽含量($P < 0.05$),二者具有更好的胃黏膜保护效果。研究旨在为利用杂豆多糖开发具有护胃功能的健康食品提供理论参考。

关键词:杂豆;多糖;急性胃黏膜损伤;炎症因子;氧化应激

中图分类号:TS201.4

文献标志码:A

胃溃疡是由胃黏膜损伤引起的消化性溃疡,其特征为周期性和节律性上腹部疼痛,具有难以完全治愈、复发率高并发展为慢性疾病的特点^[1]。胃黏膜损伤的机制较为复杂,普遍认为其与胃黏膜的防御因子和侵袭因子的失衡密切相关^[2]。过量饮酒是诱发胃黏膜损伤的一个关键因素,可造成胃黏膜糜烂、出血、溃疡、穿孔等损伤,其发病机制与胃黏膜上皮细胞凋亡、炎症因子过量表达和氧化应激增加

密切相关^[3]。目前,胃黏膜损伤的治疗主要依赖于合成药物的使用,但长期使用这些药物会产生细菌耐药性并产生多种毒副作用^[4-5]。因此,寻找安全有效的天然活性物质防治胃溃疡已成为研究的热点。

近年来,越来越多的天然产物来源多糖已被证明具有较好的胃黏膜保护作用。在具有胃黏膜保护作用的果胶类酸性多糖中阿拉伯糖(Ara)、半乳糖

收稿日期:2022-06-25

基金项目:国家重点研发计划项目(2018YFE0108300)。

Foundation: National Key Research and Development Program Project of China (2018YFE0108300)。

第一作者:黄钻元,男,硕士研究生,研究方向为营养与食品卫生学。

*通信作者:宋萧萧,女,讲师,博士,主要从事功能性碳水化合物的生理活性及应用方面的研究。

(Gal)和半乳糖醛酸(GalA)较为常见,如仙人掌果皮和果肉多糖^[6]、姜黄多糖^[7]和欧洲李果实多糖^[8]等。此外,由Cipriani等^[9]从大豆粉中提取得到的I型阿拉伯半乳聚糖主要由Ara、Gal、GalA和鼠李糖(Rha)组成,物质的量比为52:41:4:3,具有改善乙醇诱导的大鼠胃溃疡的作用。另外,半乳甘露聚糖是从多类豆科植物种子胚乳中提取出来的中性多糖,具有优异的凝胶性能,且具有抑菌、抗氧化、抗炎和抗癌等生物活性^[10]。Da等^[11]从洋金凤种子中提取得到的半乳甘露聚糖主要由Gal和甘露糖(Man)组成,物质的量比为1.00:2.18,并证明了其对吡啶美辛诱导的小鼠胃溃疡具有预防保护作用。

杂豆是除大豆之外的小宗淀粉质豆类的总称,主要包括豇豆、芸豆、鹰嘴豆、绿豆、小豆、豌豆、蚕豆、小扁豆等。我国杂豆资源丰富,品种繁多,具有高蛋白、高纤维和低脂肪等特点。杂豆中的水溶性多糖是发挥药理作用的主要成分之一,具有免疫调节^[12]、降血糖^[13]和改善肠道菌群^[14]等生物活性。豇豆多糖^[15]、豌豆多糖^[16]和鹰嘴豆多糖^[17]均为果胶类酸性多糖,其单糖组成主要为Ara、Gal和GalA。然而,由Hu等^[18]提取的黑豆种皮多糖主要由Rha、Gal和Man组成,物质的量比为1.00:3.56:6.01,属半乳甘露聚糖。因此,从多糖结构特征方面可以看出,小黑豆、豇豆、豌豆及鹰嘴豆多糖具有一定的防治胃溃疡的潜力,但目前尚未见相关报道。本研究拟通过建立乙醇诱导的小鼠急性胃黏膜损伤模型,测定胃黏膜损伤指数、胃组织病理结构、氧化应激和炎症因子相关生化指标,探究小黑豆、豇豆、豌豆及鹰嘴豆多糖对小鼠胃黏膜的保护作用及其潜在的保护机制,旨在为利用杂豆多糖开发具有护胃功能的健康食品提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

SPF级雄性昆明小鼠,体质量32~38g,浙江维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(浙)2019-0001。饲料、垫料由南昌大学动物科学部提供。黑豆(小黑豆)、豇豆(肾形豆)、豌豆(中豌六号)、鹰嘴豆(卡布里)分别产于山西省朔州市、陕西省榆林市、河北省廊坊市、新疆维吾尔自治区乌什县。JK008树脂,安徽三星科技有限公司;小鼠肿瘤坏死因子 α (TNF- α)ELISA试剂盒、小鼠白

细胞介素6(IL-6)ELISA试剂盒,江苏酶免实业有限公司;总超氧化物歧化酶活性检测试剂盒(T-SOD)、脂质氧化(MDA)检测试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒,上海碧云天生物技术公司;还原型谷胱甘肽(GSH)测定试剂盒,南京建成生物工程研究所,乙醇为生物级。

1.2 仪器与设备

E2695型高效液相色谱仪,美国Waters公司;Variouskan Flash型全波长多功能酶标仪,Dionex ICS 6000型离子交换色谱仪,美国Thermo Scientific公司;FreeZone型冷冻干燥机,美国Labconco公司;Mettler Toledo XS105型电子分析天平,上海梅特勒-托利多仪器公司;HH-4型数显恒温水浴锅,常州国华电器有限公司;KZ-11型组织破碎仪,武汉塞维尔生物科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 4种杂豆多糖的制备

根据Bai等^[19]的方法,提取杂豆多糖。分别称取小黑豆、豇豆、豌豆、鹰嘴豆干粉1000g,经乙醇浸泡脱脂后,加入10L蒸馏水于95℃水浴下提取2h,离心取上清液。沉淀物重提1次,合并2次上清液,依次加入耐高温 α -淀粉酶、木瓜蛋白酶、糖化酶进行酶解。酶解完成后再于100℃下灭酶15min,以10000r/min转速离心10min,取上清液浓缩。加入4倍浓缩液体积的体积分数为95%乙醇溶液,4℃静置12h,收集沉淀,室温复溶后装入截留分子质量为8000~14000Da透析袋中透析2d,经冷冻干燥后得到4种杂豆粗多糖。冻干后的粗多糖复溶,配制质量浓度为10mg/mL的多糖溶液,加入JK008树脂,静态吸附12h,离心取上清液,浓缩后加入4倍浓缩液体积的体积分数为95%乙醇醇沉,冻干后分别获得小黑豆多糖(*Vigna Mungo* polysaccharide, VMP)、豇豆多糖(*Vigna unguiculata* polysaccharide, VUP)、豌豆多糖(*Pisum sativum* polysaccharide, PSP)、鹰嘴豆多糖(*Cicer arietinum* polysaccharide, CAP)。

1.3.2 4种杂豆多糖的化学成分分析

以葡萄糖为标准品,采用苯酚硫酸法测定4种杂豆多糖中中性糖含量^[20]。以GalA为标准品,采用咔唑-硫酸法测定酸性糖含量^[21]。以牛血清蛋白为标准品,采用考马斯亮蓝法测定蛋白质含量^[22]。以没食子酸为标准品,采用福林酚法测定总酚含量^[23]。水分含量测定参照GB 5009.3—2016^[24]直

接干燥法,灰分含量测定参照 GB 5009.4—2016^[25] 马福炉灼烧法。

1.3.3 4种杂豆多糖的单糖组成分析

根据 Tang 等^[26]的方法,采用高效阴离子交换色谱-脉冲积分安培法(HPAEC-PAD)测定多糖的单糖组成。分别称取 5 mg 的 VMP、VUP、PSP、CAP 于试管中,在冰浴条件下加入 12 mol/L 的浓硫酸 0.5 mL,磁力搅拌 30 min 后加入 2.5 mL 超纯水,100 °C 条件下油浴搅拌水解 2 h。水解液稀释 100 倍后,过 0.22 μm 水系滤膜,采用离子色谱仪进行分析。

标准曲线绘制:精确称取 5 mg 的岩藻糖、Rha、Ara、Gal、葡萄糖(Glc)、木糖(Xyl)、Man、核糖、果糖、GalA 和葡萄糖醛酸(GlcA)共 11 种单糖,制备混合标准品母液,并稀释成 10、8、6、4、2、1、0.5、0.25 μg/mL 质量浓度梯度。进样后根据不同浓度下的单糖峰面积得到各个单糖的标准曲线,进行定性定量分析。

色谱条件:Dionex ICS 6000 型离子交换色谱系统串联脉冲安培检测器,色谱柱为 CarboPac™ PA20 型保护柱与 CarboPac™ PA20 型分析柱;流动相为 250 mmol/L 的 NaOH 溶液、超纯水和 1 mol/L 的 NaOAc 溶液,流速 0.5 mL/min、柱温 30 °C、进样量 10 μL、数据采集时间 50 min。

1.3.4 4种杂豆多糖的分子质量测定

根据 Wang 等^[27]的方法,采用高效凝胶渗透色谱法(HPGPC)测定 4 种杂豆多糖的分子质量(kDa)。多糖样品使用流动相配制成质量浓度为 1 mg/mL 的溶液,经 0.22 μm 水系滤膜后进样检测。色谱条件:安捷伦 1260 型高效液相色谱系统,色谱柱为 Ultrahydrogel™ Linear Column (7.8 mm × 300 mm),流动相为 0.1 mol/L 的 NaCl 溶液,流速 0.6 mL/min、柱温 40 °C,样品的质量浓度为 1 mg/mL,进样量 20 μL。

1.3.5 乙醇诱导小鼠急性胃黏膜损伤模型的建立

将昆明小鼠随机分成正常对照(CON)组、模型(MOD)组、阳性药(OME)组、VMP组、VUP组、PSP组、CAP组,共 7 组,每组 12 只。小鼠适应性喂养一周后,结合团队前期研究^[28-29],VMP、VUP、PSP、CAP 组小鼠每天按体质量分别给予相应杂豆多糖 400 mg/kg,CON 与 MOD 灌胃同等体积的生理盐水,持续灌胃 14 d,OME 连续灌胃 12 d 生理盐水后,灌胃奥美拉唑(20 mg/kg)2 d。实验 15 d 时,各组小鼠严格禁食不禁水 12 h,按相应剂量灌胃受试物,1 h

后除正常组外,其余所有组均按体质量灌胃无水乙醇 10 mL/kg,1 h 后将小鼠处死、剪开腹部、取出胃,并收集其他脏器。具体实验设计流程如图 1。

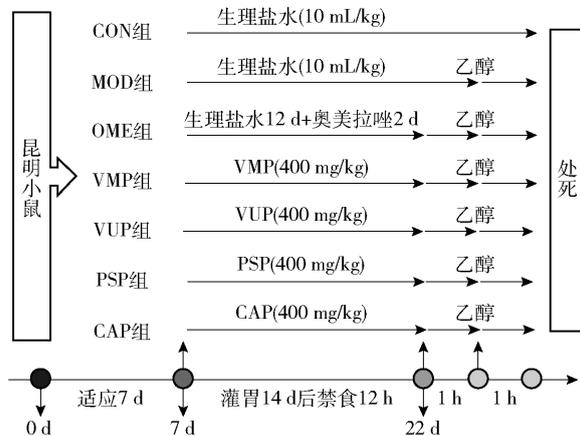


图 1 实验流程设计

Fig. 1 Design of experimental procedures

1.3.6 脏器指数的测定

小鼠处死前称量体质量,处死后收集小鼠脏器(肝脏、肾脏、脾脏、胸腺),用生理盐水清洗,滤纸吸干后分别记录脏器质量,并根据式(1)计算脏器指数^[30]。

$$\text{脏器指数} = \frac{m(\text{脏器})}{m(\text{小鼠})} \quad (1)$$

式(1)中, $m(\text{脏器})$ 为脏器质量,mg; $m(\text{小鼠})$ 为小鼠体质量,g。

1.3.7 胃黏膜损伤表观形态观察

将胃组织沿着胃大弯剪开,经生理盐水清洗,滤纸吸干,胃黏膜拍照后,使用 Image J 图像处理软件测定胃组织腺部总面积及胃黏膜出血面积^[31],胃黏膜损伤指数与胃黏膜损伤抑制率根据式(2)和式(3)计算。

$$\text{胃黏膜损伤指数} = \frac{A(\text{出血})}{A(\text{总})} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{胃黏膜损伤抑制率} = \frac{\text{模型组胃黏膜损伤指数} - \text{给药组胃黏膜损伤指数}}{\text{模型组胃黏膜损伤指数}} \times 100\% \quad (3)$$

式(2)中, $A(\text{出血})$ 为胃黏膜出血面积,mm²; $A(\text{总})$ 为对应胃组织黏膜总面积,mm²。

1.3.8 胃组织病理观察

在小鼠胃黏膜损伤同一部位切下约 10 mm × 2 mm 组织,置于质量分数为 10% 的中性福尔马林溶液中固定、脱水、石蜡包埋。将组织蜡块切成厚度

为4 μm 的切片,HE染色后于光学显微镜(200倍)观察胃组织的病理变化。

1.3.9 胃组织氧化应激水平的测定

将胃组织用4 $^{\circ}\text{C}$ 生理盐水冲洗,滤纸吸干后称重,胃组织与PBS按质量比1:9混合,经组织破碎仪研磨破碎,制备成质量分数10%的胃组织匀浆。将均浆液以10 000 r/min的转速在4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心10 min,吸取上清液,进行分装,置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。按照试剂盒说明书检测胃组织匀浆液中T-SOD活力、GSH和MDA含量。

1.3.10 血清中炎性细胞因子的测定

收集小鼠血液,放置2 h室温凝固后,以3 000 r/min的转速离心20 min,取上清,参照试剂盒说明书,测定血清中IL-6和TNF- α 含量。

1.4 数据处理

实验数据以平均值 \pm 标准偏差(mean \pm SD)表示,使用SPSS 25.0统计学软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA)和Duncan多重比较分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性,利用GraphPad Prism 8软件绘图。

2 结果与分析

2.1 4种杂豆多糖的基本理化性质及单糖组成

4种杂豆多糖的基本营养组成如表1。由表1可知,VMP、VUP、PSP、CAP的中性糖与酸性糖质量分数之和分别为66.40%、71.79%、67.41%、53.31%;水分、灰分、蛋白质和总酚质量分数分别为10.99%~13.95%、7.87%~10.41%、4.12%~6.88%、0.50%~0.91%。由于杂豆中含有较多的淀粉、蛋白质和木质素等,且杂质去除有一定难度,导致4种杂豆多糖的纯度不高。

4种杂豆多糖的单糖组成如表2所示。由表2可知,VUP、PSP、CAP主要以Ara、Gal和GalA单糖为主,均属于酸性果胶多糖,与相关报道^[15-17]的研究结果较相似。VMP主要以Rha、Gal和Man为主,与Hu等^[18]报道的黑豆种皮多糖的单糖组成结果较相似,但与Liu等^[32]报道的黑豆全豆多糖含有较少甘露糖的结果不同。由于杂豆的品种和多糖的提取纯化方法具有差异,可能会导致得到的多糖具有不同的单糖组成。

表1 4种杂豆多糖的基本营养组成

Tab.1 Basic nutritional composition of four legume polysaccharides

| 多糖 | w (中性糖) | w (酸性糖) | w (水分) | w (灰分) | w (蛋白质) | w (总酚) |
|-----|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| VMP | 58.42 \pm 1.25 ^a | 7.98 \pm 0.67 ^c | 13.95 \pm 0.56 ^a | 8.03 \pm 0.11 ^b | 6.88 \pm 0.31 ^a | 0.60 \pm 0.05 ^b |
| VUP | 48.27 \pm 0.49 ^b | 23.52 \pm 0.48 ^a | 11.74 \pm 0.31 ^{bc} | 7.89 \pm 0.18 ^b | 6.02 \pm 0.13 ^b | 0.50 \pm 0.02 ^b |
| PSP | 42.44 \pm 2.07 ^c | 24.97 \pm 0.97 ^a | 11.98 \pm 0.35 ^b | 10.41 \pm 0.91 ^a | 4.12 \pm 0.07 ^d | 0.53 \pm 0.11 ^b |
| CAP | 37.74 \pm 0.92 ^d | 15.57 \pm 0.56 ^b | 10.99 \pm 0.34 ^c | 7.87 \pm 0.21 ^b | 5.39 \pm 0.07 ^c | 0.91 \pm 0.01 ^a |

同一列中不同小写字母表示组间数据差异显著($P < 0.05$)。

表2 4种杂豆多糖的单糖组成

Tab.2 Monosaccharide composition of four legume polysaccharides

| 多糖 | w (Rha) | w (Ara) | w (Gal) | w (Glc) | w (Xyl) | w (Man) | w (GalA) | w (GlcA) |
|-----|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| VMP | 8.43 \pm 0.15 ^a | - | 18.32 \pm 0.04 ^b | - | - | 24.41 \pm 0.07 ^a | 2.59 \pm 0.11 ^c | 0.44 \pm 0.03 ^c |
| VUP | - | 22.99 \pm 0.31 ^a | 19.99 \pm 0.25 ^a | 1.08 \pm 0.10 ^a | 3.67 \pm 0.05 ^b | 1.64 \pm 0.08 ^b | 12.27 \pm 0.57 ^a | 1.37 \pm 0.05 ^b |
| PSP | 4.37 \pm 1.12 ^b | 16.08 \pm 0.71 ^b | 9.38 \pm 0.13 ^d | 2.00 \pm 1.51 ^a | 5.78 \pm 0.49 ^a | 0.61 \pm 0.04 ^d | 13.18 \pm 0.06 ^a | 1.34 \pm 0.01 ^b |
| CAP | - | 16.96 \pm 0.61 ^b | 14.38 \pm 0.53 ^c | 2.36 \pm 0.03 ^a | 2.07 \pm 0.34 ^c | 1.04 \pm 0.07 ^c | 7.11 \pm 0.93 ^b | 1.97 \pm 0.07 ^a |

-表示未检测到,同一列中不同小写字母表示组间数据差异显著($P < 0.05$)。

2.2 4种杂豆多糖分子质量分布分析

VMP、VUP、PSP和CAP的分子质量分布曲线如图2。由图2可知,4种杂豆多糖具有较宽的分子质量分布范围,在12~18 min内主要有3个洗脱峰,表明其分子质量分布不均一。4种杂豆多糖在低分子质量区域具有一定的相似度,peak 2与peak 3的分子质量分布为32.0~60.9 kDa和

2.9~4.4 kDa。4种杂豆多糖(VMP、VUP、PSP、CAP)的peak 1相差较大,分别为1 181、479、1 555、301 kDa。

2.3 4种杂豆多糖对小鼠体质量和脏器指数的影响

实验进行期间小鼠体质量变化如图3所示。由图3可知,小鼠灌胃相应受试物14 d期间,各组小鼠体质量稳定增长且无明显差异。小鼠灌胃14 d

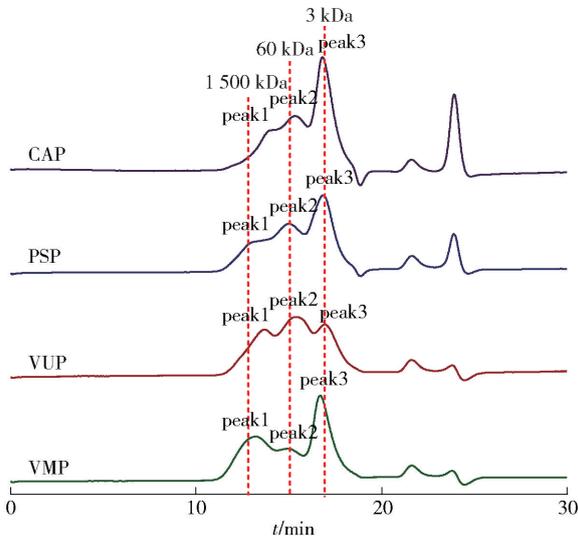


图2 4种杂豆多糖的分子质量分布

Fig. 2 Molecular weight distribution of four legume polysaccharides

后,进行造模,处死并收集脏器。各组小鼠脏器指数如表3。由表3可知,各组小鼠之间肝脏、肾脏、脾脏和胸腺指数均无显著变化。在实验进行期间,小鼠体质量正常、稳定增加,且解剖后各组小鼠

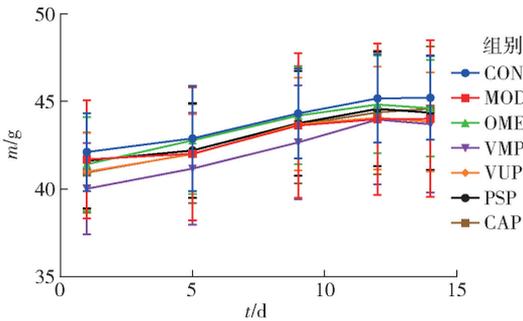


图3 小鼠体质量变化

Fig. 3 Body weight change in mice

表3 各组小鼠脏器指数

Tab. 3 Organ index of mice in each group mg/g

| 组别 | 肝脏指数 | 肾脏指数 | 脾脏指数 | 胸腺指数 |
|-----|---------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| CON | 38.97 ± 0.93 ^a | 13.88 ± 0.83 ^a | 2.26 ± 0.13 ^a | 1.95 ± 0.23 ^a |
| MOD | 40.42 ± 0.98 ^a | 13.89 ± 0.80 ^a | 2.25 ± 0.22 ^a | 2.08 ± 0.14 ^a |
| OME | 41.46 ± 1.12 ^a | 14.31 ± 0.65 ^a | 2.27 ± 0.43 ^a | 1.89 ± 0.12 ^a |
| VMP | 39.96 ± 2.06 ^a | 14.85 ± 1.41 ^a | 2.55 ± 0.32 ^a | 2.09 ± 0.20 ^a |
| VUP | 40.27 ± 1.69 ^a | 14.25 ± 0.49 ^a | 2.55 ± 0.22 ^a | 1.92 ± 0.18 ^a |
| PSP | 41.12 ± 2.69 ^a | 14.66 ± 0.93 ^a | 2.71 ± 0.80 ^a | 2.06 ± 0.33 ^a |
| CAP | 41.00 ± 1.37 ^a | 13.99 ± 0.54 ^a | 2.52 ± 0.25 ^a | 1.94 ± 0.15 ^a |

同一列中不同小写字母表示组间数据差异显著($P < 0.05$)。

的脏器无明显变化,可以初步说明实验室制备的4种杂豆多糖对小鼠无毒副作用。

2.4 4种杂豆多糖对小鼠胃黏膜损伤指数的影响

机体摄入高浓度乙醇后,容易被胃黏膜吸收,引起氧化应激和炎症反应,最终导致胃黏膜出血、溃疡或穿孔^[33]。小鼠胃溃疡的宏观观察结果如图4。由图4可知,正常组的胃黏膜形态色泽正常、未见出血、溃疡等异常现象。MOD组的胃黏膜出现大量出血条带,有明显的糜烂和溃疡,说明乙醇致小鼠急性胃黏膜损伤造模较成功。与MOD组相比,OME组、VMP组、VUP组及CAP组损伤面积明显减小,损伤程度明显减轻,仅出现少量出血条带。然而,PSP组损伤面积虽有所降低,但其胃黏膜仍有明显的出血现象。各实验组胃黏膜损伤指数和胃黏膜损伤抑制率的结果,如图5所示。由图5可知,MOD组的损伤指数最高,损伤情况最严重,而OME组、VMP组、VUP组、CAP组与MOD相比,均能显著减低胃黏膜损伤指数($P < 0.05$)。其中,CAP组与OME组胃黏膜损伤抑制率较接近,而VMP组和VUP组的胃黏膜损伤抑制率分别为37.05%和34.40%,胃黏膜保护效果稍优于OME组。研究表明,阿拉伯半乳聚糖可以通过减少胃酸和胃蛋白酶分泌,增强黏液合成来保护胃组织^[34]。此外,半乳甘露聚糖易分散于水中并形成稳定的高黏度水溶液,在生物医学中可作为凝胶剂、药物释放调节剂和生物黏合剂等^[35-36]。因此,推测4种杂豆多糖预先处理后能在一定程度增强胃内壁保护层,通过保护底层黏膜减轻高浓度乙醇的侵害,从而达到防治胃溃疡的效果。

2.5 4种杂豆多糖对小鼠胃组织病理学的影响

小鼠胃组织病理的变化,能揭示乙醇诱导的胃黏膜损伤程度。胃组织病理学观察结果如图6。由图6可知,CON组小鼠的胃腺体结构完整,平坦光滑,黏膜上皮细胞形态正常,排列规整紧密,未见脱落、坏死和炎症细胞浸润等现象。MOD组小鼠胃组织黏膜层严重损伤,出现明显的腺体结构紊乱、大量上皮细胞脱落及炎症细胞浸润等症状。这种症状与Xu等^[37]的报道相似,说明过量饮酒会对胃黏膜造成严重损伤。然而,在4种杂豆多糖和奥美拉唑的预处理下,小鼠胃黏膜损伤状态有所缓解。其中,VUP组和CAP组胃腺体结构较完整,仅有局部的黏膜充血和炎性细胞浸润。此外,VMP组有局部胃腺体结构紊乱和上皮细胞脱落,PSP组黏膜充血和炎性细胞浸润情况仍较严重。

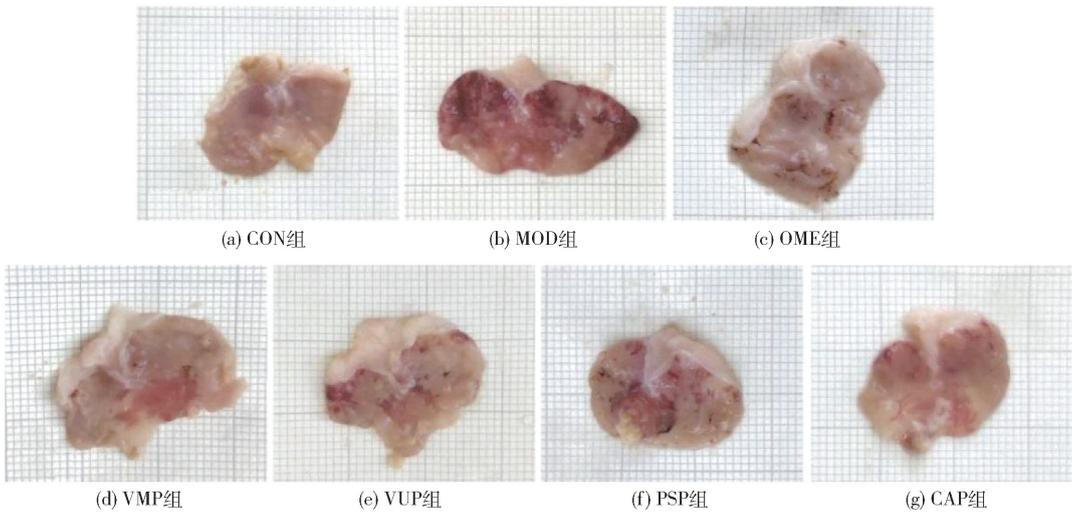
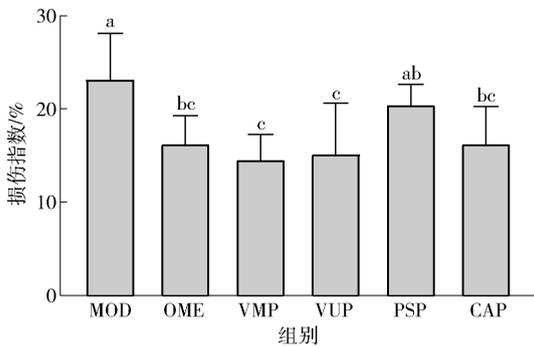


图4 小鼠胃溃疡的宏观观察

Fig. 4 Macroscopic observation of gastric lesions in mice



不同小写字母表示组间数据差异显著($P < 0.05$)。

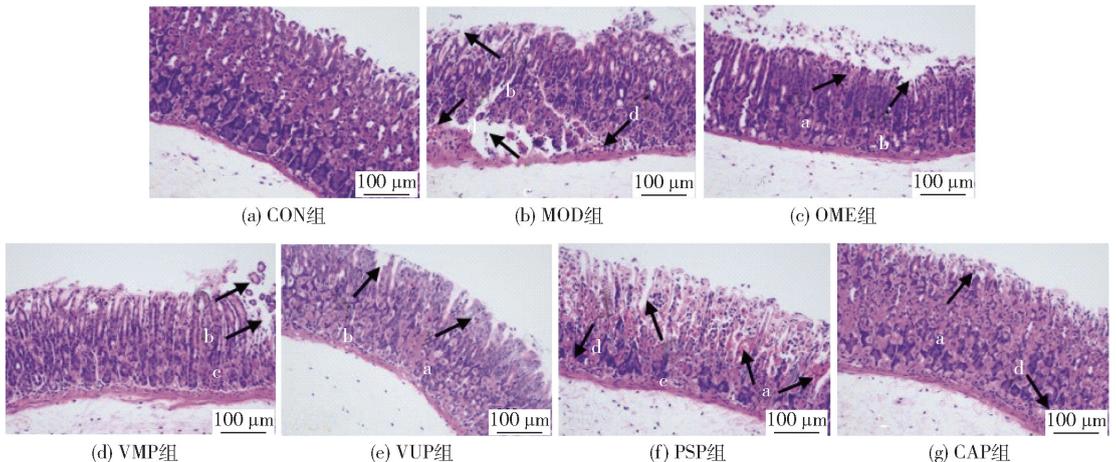
图5 胃黏膜损伤指数

Fig. 5 Gastric mucosal injury index in mice

2.6 4种杂豆多糖对小鼠血清炎症因子水平的影响

IL-6 和 TNF- α 作为具有多种功能的细胞因

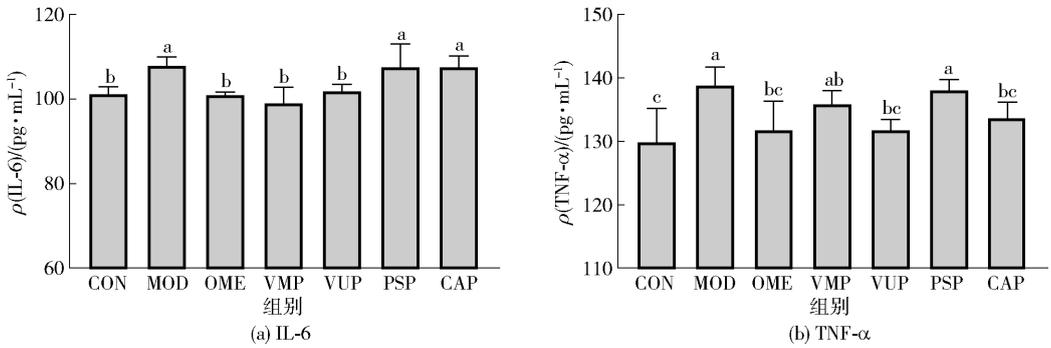
子,在机体应激反应和免疫调节中发挥重要作用,是敏感反映机体炎症水平和损伤程度的重要指标^[38]。4种杂豆多糖对急性酒精性胃黏膜损伤小鼠血清中炎症因子水平的影响如图7。由图7可知,MOD组小鼠血清中炎症细胞因子IL-6和TNF- α 含量显著增加($P < 0.05$)。预先灌胃4种杂豆多糖能不同程度地缓解乙醇摄入导致的血清IL-6和TNF- α 水平增加,其中VUP组的效果最明显,其次为VMP组。研究结果与急性酒精性胃溃疡模型中用铁棍山药多糖^[39]和白芨多糖^[40]处理后获得的结果相似,说明天然产物多糖均具有不同程度的抗炎作用。多糖结构特征与其抗炎特性有着紧密联系,如果胶类多糖主要由GalA、Gal和Ara单糖组成,可通过直接靶向宿主免疫细胞或通过激活微生物群来调节宿主免疫



a 为胃黏膜充血, b 为上皮细胞脱落, c 为腺体结构紊乱, d 为炎症细胞浸润。

图6 胃组织病理学观察

Fig. 6 Histopathological observation of stomach in mice



不同小写字母表示组间数据差异显著 ($P < 0.05$)。

图7 4种杂豆多糖对小鼠血清中炎症因子水平的影响

Fig. 7 Effect of four legume polysaccharides on levels of inflammatory factors in serum from mice

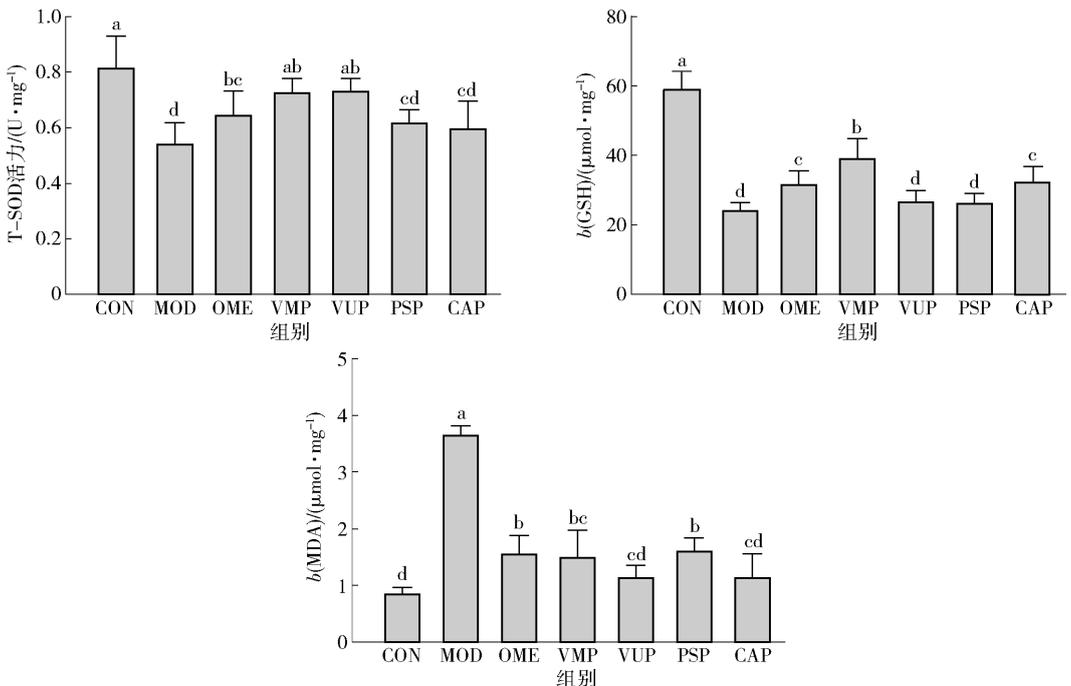
力,是一种新型且无毒的抗炎天然产物^[41],具有抗胃炎^[42-43]作用。此外,有研究表明,来源于凤凰木种子中的半乳甘露聚糖可发挥抗炎作用,促进小鼠切除皮肤伤口的组织修复^[44]。

本研究结果显示,在豇豆、豌豆和鹰嘴豆的果胶类多糖中,VUP可显著降低小鼠血清中IL-6和TNF- α 水平,其效果与奥美拉唑相当。另外,以Gal和Man为主的VMP也可降低IL-6和TNF- α 水平,进而发挥胃黏膜保护作用。不同杂豆多糖的组成和结构相当复杂,具有多种抗炎机制,但多糖的精

细结构表征及其抗炎活性的构效关系有待进一步的探究。

2.7 4种杂豆多糖对小鼠胃组织氧化应激的影响

研究表明,乙醇致胃溃疡的机制与细胞内的氧化还原体系失衡密切相关。4种杂豆多糖对急性酒精性胃黏膜损伤小鼠胃组织氧化应激标志物的影响,如图8。由图8可知,乙醇致小鼠胃黏膜损伤后,胃组织中T-SOD活性和GSH含量显著降低,而MDA含量显著升高($P < 0.05$)。然而,灌胃4种杂豆多糖进行预处理后,均能显著降低小鼠胃组织中



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图8 4种杂豆多糖对小鼠胃组织氧化应激标志物的影响

Fig. 8 Effect of four legume polysaccharides on oxidative stress in gastric tissues from mice

的MDA含量($P < 0.05$)。其中,VMP组还能显著增加胃组织中T-SOD活力和GSH含量,VUP组与CAP组分别能显著增加胃组织中T-SOD活力和GSH含量。

SOD和GSH分别为体内抗氧化防御系统中重要的酶类和非酶类抗氧化物,二者在维持机体的氧化还原平衡中发挥重要作用^[45]。MDA作为脂质氧化的终产物,是评估氧化应激引起胃组织损伤的可靠指标^[46]。在CAP的不同纯化组分之间的抗氧化活性研究中,叶梓芑^[47]的研究发现,Gal单糖含量较高的鹰嘴豆皮多糖组分具有更强的体外抗氧化活性,并能显著提高小鼠肝脏中T-SOD活力并降低MDA含量。Solomon等^[48]的研究也表明,抗氧化能力较强的蓝羽扇豆多糖组分含有大量的Gal单糖,且具有激活巨噬细胞的免疫调节作用。本研究结果表明,VMP组对胃黏膜的保护效果最好,而VUP组、CAP组次之,PSP组效果较差,这可能与PSP组含有较少Gal单糖有关。

3 结 论

本研究从小黑豆、豇豆、豌豆及鹰嘴豆中提取可溶性非淀粉多糖。单糖组成检测结果表明:VUP组、PSP组、CAP组主要由Ala、Gal和GalA单糖组成,属果胶类酸性多糖;VMP组的单糖组成主要为Man和Gal,属中性多糖。4种杂豆多糖对小鼠胃黏膜保护实验结果发现,灌胃乙醇后小鼠胃黏膜出现大面积的出血和溃疡;预先给予4种杂豆多糖可以明显改善胃溃疡的损伤情况,其中VMP组、VUP组的效果更明显。杂豆多糖潜在的作用机制与抑制炎症细胞因子IL-6和TNF- α 的表达及提高胃组织抗氧化能力有关。因此,不同结构特征的杂豆多糖,在不同程度上保护胃黏膜,但多糖精细结构和抗溃疡活性之间的构效关系有待进一步研究。本研究旨在为杂豆来源多糖作为保护胃黏膜健康食品或食品辅料的开发与应用提供理论依据,为杂豆资源的多元化开发和高附加值利用提供参考。

参考文献:

[1] ZHOU J, WANG G, HAN R, et al. Glycopeptides from *Paecilomyces sinensis* ameliorate ethanol-induced gastric ulcers via anti-inflammation and the miR-9-5p-MEK/ERK

signaling pathway [J]. Food and Function, 2021, 12(17): 7664-7675.

- [2] TARNAWSKI A S, AHLUWALIA A, JONES M K. Increased susceptibility of aging gastric mucosa to injury: the mechanisms and clinical implications[J]. World Journal of Gastroenterology, 2014,20(16): 4467-4482.
- [3] KE Y, ZHAN L, LU T, et al. Polysaccharides of *Dendrobium officinale* kimura and migo leaves protect against ethanol-induced gastric mucosal injury via the AMPK/mTOR signaling pathway *in vitro* and *in vivo*[J]. Frontiers in Pharmacology, 2020,11: 526349.
- [4] SHEEN E, TRIADAFILOPOULOS G. Adverse effects of long-term proton pump inhibitor therapy [J]. Digestive Diseases and Sciences, 2011,56(4): 931-950.
- [5] YU M, QIAN J, GUO D, et al. Severe adverse reactions caused by omeprazole: a case report [J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2016,12(2): 1103-1106.
- [6] JOUINI M, ABDELHAMID A, CHAOUCH M A, et al. Physico-chemical characterization and pharmacological activities of polysaccharides from *Opuntia microdasys* var. *rufida* cladodes [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018,107: 1330-1338.
- [7] HARSHA M R, CHANDRA P S, DHARMESH S M. Modified pectic polysaccharide from turmeric (*Curcuma longa*): a potent dietary component against gastric ulcer [J]. Carbohydrate Polymers, 2016,138: 143-155.
- [8] CANTU-JUNGLES T M, MARIA-FERREIRA D, DA S L, et al. Polysaccharides from prunes: gastroprotective activity and structural elucidation of bioactive pectins [J]. Food Chemistry, 2014,146: 492-499.
- [9] CIPRIANI T R, MELLINGER C G, BERTOLINI M L C, et al. Gastroprotective effect of a type I arabinogalactan from soybean meal [J]. Food Chemistry, 2009,115(2): 687-690.
- [10] 范田慧, 孙延平, 乔威杰, 等. 半乳甘露聚糖的提取纯化、结构特征以及应用研究进展 [J]. 化学工程师, 2021,35(5): 46-50.
- FAN T H, SUN Y P, QIAO W J, et al. Progress in extraction, purification, structural characteristics and application of galactomannan [J]. Chemical Engineer, 2021,35(5): 46-50.
- [11] DA C J M F, DA S P P, MATOS V, et al. Galactomannan from the seeds of *Caesalpinia pulcherrima* prevents indomethacin-induced gastrointestinal damage via neutrophil migration [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019,141: 68-75.

- [12] QIN L, CHEN S, XIE L, et al. Mechanisms of RAW264.7 macrophages immunomodulation mediated by polysaccharide from mung bean skin based on RNA-seq analysis [J]. *Food Research International*, 2022, 154: 111017.
- [13] WU G, LIU D, WAN Y, et al. Comparison of hypoglycemic effects of polysaccharides from four legume species [J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 90: 299–304.
- [14] XIE J, SONG Q, YU Q, et al. Dietary polysaccharide from Mung bean [*Vigna radiate* (Linn.) Wilczek] skin modulates gut microbiota and short-chain fatty acids in mice [J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2021, 57(5): 2581–2589.
- [15] 辛玥, 宋萧萧, 王玉箫, 等. 豇豆不同部位多糖结构特征及抗氧化性能比较 [J]. *食品科学*, 2021, 43(16): 61–67.
- XIN Y, SONG X X, WANG Y X, et al. Comparison of structural characteristics and antioxidant properties of polysaccharides from different parts of cowpea [J]. *Food Science*, 2022, 43(16): 61–67.
- [16] NOGUCHI M, HASEGAWA Y, SUZUKI S, et al. Determination of chemical structure of pea pectin by using pectinolytic enzymes [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 231: 115738.
- [17] BAI Y P, ZHOU H M, ZHU K R, et al. Impact of thermally induced wall breakage on the structural properties of water-soluble polysaccharides in chickpeas [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 208: 869–882.
- [18] HU B Y, DENG J C, YANG C Q, et al. Extraction optimization, purification and characterization of polysaccharides from the seed coat of black soybean [J]. *PLoS One*, 2017, 12(12): e190202.
- [19] BAI Z, MENG J, HUANG X, et al. Comparative study on antidiabetic function of six legume crude polysaccharides [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 154: 25–30.
- [20] DUBOIS M, GILLES K A, HAMILTON J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. *Analytical Chemistry*, 1956, 28: 350–356.
- [21] RADHAKRISHNAMURTHY B, BERENSON G S. Effect of temperature and time of heating on the carbazole reaction of uronic acids and acid mucopolysaccharides [J]. *Analytical Chemistry*, 1963, 35(9): 1316–1318.
- [22] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248–254.
- [23] SINGLETON V L, ORTHOFER R, LAMUELA-RAVENTÓS R M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent [J]. *Methods in Enzymology*, 1999, 299: 152–178.
- [24] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品中水分的测定: GB 5009.3—2016 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- National Health and Family Planning Commission of the PRC. National food safety standard determination of moisture in foods: GB 5009.3—2016 [S]. Beijing: China Standards Press, 2016.
- [25] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品中灰分的测定: GB 5009.4—2016 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- National Health and Family Planning Commission of the PRC. National food safety standard determination of ash in foods: GB 5009.4—2016 [S]. Beijing: China Standards Press, 2016.
- [26] TANG W, LIU C, LIU J, et al. Purification of polysaccharide from *Lentinus edodes* water extract by membrane separation and its chemical composition and structure characterization [J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 105: 105851.
- [27] WANG Y, YIN J, ZHANG T, et al. Utilizing relative ordered structure theory to guide polysaccharide purification for structural characterization [J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 115: 106603.
- [28] 王小银. 猴头菇子实体多糖结构特征及其对胃黏膜辅助保护功能 [D]. 南昌: 南昌大学, 2019.
- WANG X Y. Structural feature of polysaccharide from *Hericium erinaceus* fruiting body and its auxiliary protection function on gastric mucosa [D]. Nanchang: Nanchang University, 2019.
- [29] 丁丽婷, 潘世杰, 胡婕伦, 等. 燕麦多糖对小鼠急性胃黏膜损伤的保护作用 [J]. *食品科学*, 2022, 43(9): 150–157.
- DING L T, PAN S J, HU J L, et al. Protective effect of oat polysaccharides against acute gastric mucosal injury in mice [J]. *Food Science*, 2022, 43(9): 150–157.
- [30] DA L B, MARIA-FERREIRA D, DALLAZEN J L, et al. Effectiveness of the polyphenols-rich *Sedum dendroideum*

- infusion on gastric ulcer healing in rats: roles of protective endogenous factors and antioxidant and anti-inflammatory mechanisms[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021,278: 114260.
- [31] ALZOKAKY A A, ABDELKADER E M, EL-DESSOUKI A M, et al. C-phycocyanin protects against ethanol-induced gastric ulcers in rats: role of HMGB1/NLRP3/NF-kappaB pathway[J]. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 2020,127(4): 265 – 277.
- [32] LIU J, WEN X Y, ZHANG X Q, et al. Extraction, characterization and *in vitro* antioxidant activity of polysaccharides from black soybean[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 72: 1182 – 1190.
- [33] GILANI S J, BIN-JUMAH M N, AL-ABBASI F A, et al. Protective effect of fustin against ethanol-activated gastric ulcer via downregulation of biochemical parameters in rats[J]. *ACS Omega*, 2022,7(27): 23245 – 23254.
- [34] KHAN M, KHUNDMIRI S, KHUNDMIRI S R, et al. Fruit-derived polysaccharides and terpenoids: recent update on the gastroprotective effects and mechanisms [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2018,9: 569.
- [35] YADAV H, MAITI S. Research progress in galactomannan-based nanomaterials: synthesis and application[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020,163: 2113 – 2126.
- [36] XU W, LIU Y, ZHANG F, et al. Physicochemical characterization of *Gleditsia triacanthos* galactomannan during deposition and maturation[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 144: 821 – 828.
- [37] XU W F, WANG Y, HUANG H, et al. Octreotide-based therapies effectively protect mice from acute and chronic gastritis[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2022,928: 174976.
- [38] 赵静, 斯望春, 王佩珠, 等. 幽门螺杆菌阳性胃溃疡患者 T 淋巴细胞及相关炎症因子水平[J]. *中华医院感染学杂志*, 2022(7): 1014 – 1017.
- ZHAO J, SI W C, WANG P Z, et al. T lymphocytes and related inflammatory factors in patients with Hp-positive gastric ulcer[J]. *Chinese Journal of Nosocomiology*, 2022(7): 1014 – 1017.
- [39] GUO M, YU H, MENG M, et al. Research on the structural characteristics of a novel Chinese iron yam polysaccharide and its gastroprotection mechanism against ethanol-induced gastric mucosal lesion in a BALB/c mouse model[J]. *Food and Function*, 2020, 11(7): 6054 – 6065.
- [40] 巩子汉, 王强, 段永强, 等. 白芨多糖对胃溃疡大鼠的干预作用及其机制研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2020,36(1): 32 – 35.
- GONG Z H, WANG Q, DUAN Y Q, et al. Study on the intervention effect of *Bletilla striata* polysaccharide on gastric ulcer rats and its mechanism[J]. *The Chinese Journal of Clinical Pharmacology*, 2020,36(1): 32 – 35.
- [41] JIN M, LI M, HUANG R, et al. Structural features and anti-inflammatory properties of pectic polysaccharides: a review[J]. *Trends in Food Science and Technology*, 2021,107: 284 – 298.
- [42] RAJAGOPAL H M, MANJEGOWDA S B, SERKAD C, et al. A modified pectic polysaccharide from turmeric (*Curcuma longa*) with antiulcer effects via anti-secretory, mucoprotective and IL – 10 mediated anti-inflammatory mechanisms [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018,118: 864 – 880.
- [43] NASCIMENTO A M, MARIA-FERREIRA D, DE SOUZA E F, et al. Gastroprotective effect and chemical characterization of a polysaccharide fraction from leaves of *Croton cajucara*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017,95: 153 – 159.
- [44] LIMA I C, CASTRO R R, ADJAFRE B L, et al. Galactomannan of *Delonix regia* seeds modulates cytokine expression and oxidative stress eliciting anti-inflammatory and healing effects in mice cutaneous wound[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022,203: 342 – 349.
- [45] SUN Y, MA N, YI J, et al. Gastroprotective effect and mechanisms of Chinese sumac fruits (*Rhus chinensis* Mill.) on ethanol-induced gastric ulcers in mice[J]. *Food and Function*, 2021,12(24): 12565 – 12579.
- [46] FU Y H, HOU Y D, DUAN Y Z, et al. Gastroprotective effect of an active ingredients group of *Lindera reflexa* Hemsl. on ethanol-induced gastric ulcers in rats: involvement of VEGFR2/ERK and TLR – 2/Myd88 signaling pathway[J]. *International Immunopharmacology*, 2022,107: 108673.
- [47] 叶梓芃. 鹰嘴豆皮多糖的分离纯化、结构鉴定及生物活性研究[D]. 南京:南京农业大学, 2016.
- YE Z P. Studies on extraction, purification, bioactivity and structure of polysaccharides from *Cicer arietinum* Hull [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2016.

[48] SOLOMON R T, MICHAEL P, SUNDAR R K, et al.
Antioxidant activities and characterisation of polysaccha-

rides isolated from the seeds of *Lupinus angustifolius*[J].
Industrial Crops and Products, 2015, 74: 950–956.

Protective Effects of Four Legume Polysaccharides on Ethanol-Induced Acute Gastric Mucosal Lesions in Mice

HUANG Zuanyuan¹, HU Mengwei¹, WANG Rui¹, LUO Chendong¹,
SONG Xiaoxiao^{1,*}, CUI Steve W.^{1,2}, YIN Junyi¹

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology/China-Canada Joint Laboratory of Food Science and Technology (Nanchang)/Key Laboratory of Bioactive Polysaccharides of Jiangxi Province, Nanchang University, Nanchang 330047, China;
2. Guelph Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, Guelph N1G5C9, Canada)

Abstract: Gastric ulcer is a peptic ulcer disease caused by gastric mucosal lesion. Because of its various side effects of chemotherapy drugs, it is very important to seek safer and more effective natural active compounds to treat gastric ulcer. Polysaccharides were extracted from small black soybean, cowpea, pea and chickpea by water extraction and alcohol precipitation. The basic nutritional composition, monosaccharide composition and molecular weight distribution were determined, and the protective effects and potential mechanism of four legume polysaccharides on ethanol-induced acute gastric mucosal lesion in mice were explored. The results showed that the sugar contents of polysaccharides from small black soybean, cowpea, pea and chickpea were 66.40%, 71.79%, 67.41% and 53.31%, respectively, and the molecular weight distribution was wide. The monosaccharide composition of cowpea, pea and chickpea polysaccharides were mainly arabinose, galactose and galacturonic acid, which belonged to pectin acidic polysaccharide, while the small black soybean polysaccharides were mainly composed of galactose and mannose, which belonged to neutral polysaccharide. The inhibition rates of small black soybean, cowpea and chickpea polysaccharides on gastric mucosal lesion were 37.1%, 34.4% and 29.8%, respectively, which could reduce the gastric mucosal lesion in mice. Cowpea polysaccharides could significantly inhibit the expression of interleukin-6 and tumor necrosis factor- α ($P < 0.05$). Small black soybean polysaccharides could significantly reduce the content of malondialdehyde in gastric tissue and increase the activity of total superoxide dismutase and the content of reduced glutathione ($P < 0.05$). Both two polysaccharides had better gastric mucosal protective effect. This study wished to provide a theoretical reference for the development of healthy food with gastric protection function by using legume polysaccharides.

Keywords: legumes; polysaccharides; acute gastric mucosal lesion; inflammatory factor; oxidative stress

(责任编辑:郝一铭)