

中文摘要

疲劳是指运动能力和机体功能暂时下降的一种状态。现代医学表明机体长期处于疲劳状态将引发一系列生理问题和疾病。因此，近年来抗疲劳相关的研究备受关注。目前关于抗疲劳的研究聚焦于通过营养干预缓解疲劳，其中天然活性成分多糖具有良好的抗疲劳、抗氧化作用，可帮助机体迅速恢复疲劳状态下糖类的损耗。黄绿卷毛菇（*Floccularia luteovirens*）异名黄绿蜜环菌（*Armillaria luteovirens*），是一种营养成分丰富，营养价值极高，经济作用极好的一种真菌。

其中黄绿卷毛菇粗多糖具有抗流感、免疫调节、抗氧化和抗肿瘤等功效，但其抗疲劳效果尚不清楚。为了更好的探讨黄绿卷毛菇粗多糖对小鼠抗疲劳的作用，以小鼠为研究对象，建立运动性疲劳小鼠模型，为黄绿卷毛菇粗多糖作为有效成分的抗疲劳药物提供理论依据。

具体为：本研究将 40 只 C57BL/6J 小鼠随机分为 5 组，即空白对照组、模型组、模型组结合药物（低、中、高剂量）给药组。首先建立了小鼠疲劳模型，然后通过观察记录小鼠疲劳转棒实验和强迫游泳实验中小鼠在棒时间及水中静止时间来验证黄绿卷毛菇粗多糖对小鼠的抗疲劳作用。为探究小鼠疲劳运动后体内代谢产物的变化，本研究通过 ELISA 试剂盒检测小鼠血清中乳酸（LA）、肌酸激酶

（CK）、尿素氮（BUN）、丙二醛（MDA）的浓度。本研究还使用 ELISA 试剂盒测定了小鼠体内活性氧（ROS）的浓度及三种抗氧化

酶的活性即超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化氢酶（CAT）、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）。

实验结果显示，给药组小鼠体重及肝脏指数较空白对照组和模型组均有增加。与模型组小鼠相比，给药组小鼠的疲劳转轮时间均显著增加、小鼠强迫游泳的静止时间均明显减少，且均呈剂量依赖关系。小鼠强迫运动后模型组小鼠血清代谢产物乳酸(LA)、肌酸激酶(CK)、尿素氮(BUN)、丙二醛含量(MDA)以及小鼠体内活性氧(ROS)含量较空白对照组相比均有显著性增加，给予黄绿卷毛菇粗多糖后上述各项数值均逐渐降低至正常。模型组小鼠强迫运动后体内超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的浓度均有显著性降低，给药后抗氧化酶活性逐渐增加，高剂量给药后其抗氧化酶活性与空白对照组相比呈显著增高。

综上所述，本研究发现黄绿卷毛菇粗多糖能够改善小鼠疲劳运动后小鼠体内代谢产物BUN、LA、CK、MDA以及ROS的堆积；增加抗氧化酶SOD、CAT、GSH-Px的活性。由此可以提示黄绿卷毛菇粗多糖具有抗疲劳作用。

关键词：

黄绿卷毛菇粗多糖；抗疲劳；氧化应激

Abstract

Fatigue refers to a state in which exercise capacity and body function are temporarily decreased. Modern medicine shows that long-term fatigue will cause a series of physiological problems and diseases. Therefore, research related to fatigue resistance has attracted much attention since this year. At present, the research on anti-fatigue focuses on relieving fatigue through nutritional intervention, in which polysaccharides, a natural active component, have good anti-fatigue and antioxidant effects and can help the collective to quickly restore the loss of sugars under fatigue. *Floccularia luteovirens* is also known as *Armillaria luteo-virens*, is a kind of fungus with rich nutritional composition, high nutritional value and excellent economic effect.

The crude polysaccharide of *Floccularia luteovirens* has anti-influenza, immunomodulatory, antioxidant and antitumor effects, but its anti-fatigue effects are still unclear. In order to better investigate the anti-fatigue effects of crude polysaccharide of *Floccularia luteovirens* on mice, Mice models were as research subjects. Establishing the exercise fatigue mouse model to provide a theoretical basis for the crude polysaccharide of *Floccularia luteovirens* as an effective component of anti-fatigue medicine.

As follows: In this study, 40 C57BL/6J mice were stochastic divided into 5 groups, that is, blank control group, model group, model group

combined with drug (low, medium, high dose) group. Firstly, the mouse fatigue model was established. Then observing and recording the mice were exposed recording the rotarod time and water rest time in fatigue rotarod experiment and forced swimming experiment. The anti-fatigue effect of crude polysaccharide of *Floccularia luteovirens* on mice was verified. To investigate the changes of metabolites in mice after fatigue exercise, the concentrations of lactate (LA), creatine kinase (CK), urea nitrogen (BUN) and malondialdehyde (MDA) in mice serum were measured by ELISA kits in this study. The concentration of reactive oxygen species (ROS) and the activities of three antioxidant enzymes, namely superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GSH-Px), were also measured in mice in this study.

The experimental results showed that the body weight and liver index of mice in the drug-administered group were increased compared with those in the blank control group and the model group. Compared with the mice in the model group, the mice in the drug administration group showed a significant increase in the fatigue rotation time and a significant decrease in the resting time of forced swimming in mice, and all of them showed a dose-dependent relationship. The serum metabolites lactate (LA), creatine kinase (CK), urea nitrogen (BUN), malondialdehyde (MDA) and reactive oxygen species (ROS) in mice in the model group were significantly increased after forced exercise compared with the blank control group, and

all these values were gradually reduced to normal after the administration of crude polysaccharide of *Floccularia luteovirens*. The concentrations of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in the mice of the model group were significantly decreased after forced exercise, and the antioxidant enzyme activities gradually increased after administration, and the antioxidant enzyme activities were significantly increased after high dose administration compared with the blank control group.

In conclusion, this study demonstrated that the crude polysaccharide of *Floccularia luteovirens* can improve the accumulation of metabolites BUN, LA, CK, MDA and ROS in mice after fatigue exercise; increase the activity of antioxidant enzymes SOD, CAT and GSH-Px. Thus, it can be confirmed that the crude polysaccharide of *Floccularia luteovirens* has anti-fatigue effect.

Keywords :

Crude polysaccharide of *Floccularia luteovirens*; Anti-fatigue;
Oxidative stress

关于学位论文使用授权的声明

本人完全了解有关保留、使用学位论文的规定，同意保留或向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅；本人授权可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文和汇编本学位论文。

（保密论文在解密后应遵守此规定）

论文级别： 硕士 博士

学科专业：免疫学

论文题目：黄绿卷毛菇粗多糖对小鼠抗疲劳作用的研究

作者签名：邵明月

指导教师签名：倪维平

2023年5月28日

目 录

| | |
|--------------------------|----|
| 第一章 研究背景..... | 1 |
| 1.1 疲劳的研究现状..... | 1 |
| 1.1.1 疲劳的概述..... | 1 |
| 1.1.2 疲劳国内外的研究..... | 2 |
| 1.1.3 疲劳的机制研究..... | 3 |
| 1.2 多糖抗疲劳的研究..... | 6 |
| 1.2.1 多糖抗疲劳的研究进展..... | 6 |
| 1.2.2 多糖抗疲劳的意义..... | 7 |
| 1.3 黄绿卷毛菇的研究现状..... | 7 |
| 1.3.1 黄绿卷毛菇的介绍与营养价值..... | 7 |
| 1.3.2 黄绿卷毛菇的功效..... | 8 |
| 1.3.3 黄绿卷毛菇粗多糖的研究意义..... | 8 |
| 1.4 研究的内容和意义..... | 9 |
| 1.4.1 研究的主要内容..... | 9 |
| 1.4.2 研究的意义..... | 9 |
| 第二章 材料与方法..... | 11 |
| 2.1 实验材料..... | 11 |
| 2.1.1 黄绿卷毛菇水提粗多糖的制备..... | 11 |
| 2.1.2 实验动物..... | 11 |
| 2.1.3 实验试剂..... | 11 |
| 2.1.4 实验仪器与设备..... | 12 |
| 2.2 实验方法..... | 13 |
| 2.2.1 试验设计..... | 13 |
| 2.2.2 实验处理..... | 13 |
| 2.2.3 疲惫小鼠模型制备..... | 14 |
| 2.2.4 行为学观察及样本的处理..... | 15 |
| 2.2.5 代谢产物及抗氧化物酶的测试..... | 15 |
| 2.2.6 统计学方法..... | 15 |

| | |
|--|----|
| 第三章 实验结果..... | 16 |
| 3.1 黄绿卷毛菇粗多糖对小鼠体重及小鼠肝指数的影响..... | 16 |
| 3.2 黄绿卷毛菇粗多糖对小鼠疲劳模型的影响..... | 17 |
| 3.2.1 黄绿卷毛菇粗多糖对小鼠疲劳转棒实验的影响..... | 17 |
| 3.2.2 黄绿卷毛菇粗多糖对小鼠强迫游泳实验的影响..... | 17 |
| 3.3 黄绿卷毛菇粗多糖对小鼠血清代谢产物乳酸(LA)、肌酸激酶(CK)、血清 尿素氮(BUN)、丙二醛含量(MDA)的影响..... | 18 |
| 3.4 黄绿卷毛菇粗多糖对小鼠体内活性氧(ROS)的影响..... | 21 |
| 3.5 黄绿卷毛菇粗多糖对小鼠体内抗氧化酶含量的影响..... | 22 |
| 3.5.1 黄绿卷毛菇粗多糖对小鼠超氧化物歧化酶(SOD)含量的影响..... | 22 |
| 3.5.2 黄绿卷毛菇粗多糖对小鼠过氧化氢酶(CAT)含量的影响..... | 23 |
| 3.5.3 黄绿卷毛菇粗多糖对小鼠谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)含量的影响 | 23 |
| 第四章 讨论..... | 26 |
| 4.1 黄绿卷毛菇粗多糖对小鼠肝指数的影响..... | 26 |
| 4.2 小鼠运动疲劳模型的选择..... | 26 |
| 4.3 黄绿卷毛菇粗多糖对小鼠血清代谢物含量的影响..... | 27 |
| 4.4 黄绿卷毛菇粗多糖对小鼠体内酶活性的影响..... | 30 |
| 4.5 展望..... | 31 |
| 第五章 结论..... | 33 |
| 参考文献..... | 34 |
| 致 谢..... | 40 |

英文缩略词

| 缩写 | 英文全称 | 中文全称 |
|--------|-----------------------------------|-----------|
| ELISA | Enzyme linked immunosorbent assay | 酶联免疫吸附法 |
| BUN | Blood urea nitrogen | 尿素氮 |
| MDA | Manual data automatic | 丙二醛 |
| LA | Lactic acid | 乳酸 |
| LG | Liver glycogen | 肌糖原 |
| SOD | Super oxidase dimutase | 超氧化物歧化酶 |
| ROS | Reactive oxygen species | 活性氧 |
| GSH-Px | Glutathione peroxidase | 谷胱甘肽过氧化物酶 |
| ALT | Alanine transaminase | 谷丙转氨酶 |
| AST | Aspartate aminotransferase | 谷草转氨酶 |
| ALB | albumin | 白蛋白 |
| CRE | creatinine | 肌酶 |
| CK | Creatine kinase | 肌酸激酶 |
| GLU | glucose | 葡萄糖 |
| OH | Heme oxygenase | 血红素加氧酶 |
| Ga | calcium | 钙 |
| P | Phosphorus | 磷 |
| TBA | Thiobarbituric acid | 硫代巴比妥酸 |

第一章 研究背景

1.1 疲劳的研究现状

1.1.1 疲劳的概述

疲劳是指机体在过度运动、过度劳累后反应给机体的信号，为避免组织受损的生理现象^[1]。随着当今社会竞争的日益激烈，为了适应现阶段的生活节奏，人们的工作，生活压力也不断增大，疲劳症状的发病率也日渐增多^[2]。在当今社会快节奏的影响下，缺乏锻炼、生活不规律、习惯性熬夜和工作压力大等问题越加突显，使疲劳的发生率逐年增高，已经成为人体重大的健康问题之一。

疲劳涉及许多复杂的生理过程，比较明显的症状的是机体在剧烈运动后产生体力不支，也存在比较不易察觉的如脑力能量的过度消耗，精神状态不佳^[3]。疲劳通常会导致记忆力衰退、睡眠质量下降，认知功能障碍；严重时可能会引起生理功能和免疫系统等相关疾病^[4]。根据上述描述的属性，可以将疲劳可以分为心理疲劳、生理性疲劳和病理性疲劳。其中，心理疲劳、生理性疲劳可通过增加睡眠、补充营养、减少体力消耗等自然解除^[5]；而不能自然缓解并消除的，产生了病理性损害则属于病理性疲劳^[6]。

现阶段，机体的疲劳可以通过药物治疗、营养补充和休息等方式缓解^[7]。一旦疲劳得不到良好的缓解那么长期的疲劳将会导致机体衰老、抑郁和癌症等^[8]。很多慢性疾病，如糖尿病、高血压、肾病等等疾病都与疲劳的产生相关^[9]。由此可见，疲劳已成为威胁人类生命健

康的重要疾病之一。

1.1.2 疲劳国内外的研究

疲劳是人体机能和精神状态下降而导致的一种疲倦、竭力的状态，是机体的一种特殊的生理状态反应^[10]。在疲劳的认识发展史中，比较早的可追溯到 19 世纪 90 年代，国外著名的研究学者 Angelo Mosso^[11] 研究了运动中肌肉重复收缩消耗了机体的能量，能量得不到补充，机体的组织与器官的功能出现衰退，由此提出衰老与耗氧量对肌肉疲劳的抵抗力下降有关。

1903 年，Ceubhob^[12] 通过研究得出在剧烈运动过程中，中枢神经系统代谢平衡被破坏，骨骼肌的功能下降，引起中枢疲劳。1914 年，Weber^[13] 在实验中观察得出，不连续的，不剧烈的活动可增加局部肌肉部位的供血量，通过加速血液的流动，清除因运动疲劳产生在血清中的的代谢产物，适当的活动可以缓解疲劳。1924 年，Hill^[14] 研究发现产生运动性疲劳后，细胞内的氢离子浓度会升高，提出其观点即乳酸堆积产生了疲劳；1935 年，Simonson^[15] 认为疲劳是在新陈代谢中，无用的代谢产物在细胞内未及时代谢导致的。同时也探究了疲劳与供给能量耗竭，机体调节能力差都有有一定关系。剧烈或高强度运动可能导致活性氧(ROS)的产生，从而导致氧化应激，这往往会超过身体自身的代偿能力产生疲劳感。

国内的各专家学者关于运动性疲劳产生的机制也从多个角度进行了研究，研究如下：张勇等^[16] 通过研究发现急性运动后线粒体内膜 ATP 活性降低，肌膜线粒体和纤维线粒体内膜流动性的变化影响

肌肉收缩,同时呼吸链酶活性下降对机体产生不良影响。杨东升等^[17]则对运动性疲劳中枢机制有进一步的研究,运动疲劳过后乳酸和葡萄糖的含量降低从而导致脑的代谢速率变低,发出了疲劳的信号。

熊正英等^[18]研究小鼠疲劳运动后,半胱氨酸有降低转氨酶活性和自由基代谢增加的速度,结果表明在疲劳模型中半胱氨酸具有提高抗氧化活性,能够延缓疲劳产生;研究人员在人参皂苷 Re 的实验中^[19],人参皂苷能够降低血清、肝细胞和骨骼肌细胞中MDA含量,减少自由基及脂质过氧化物,具有抗疲劳的作用。张世明等^[20]从传统中医的角度对运动性疲劳做了新的阐述,提出了新颖的诊断方法,采用中医治疗可有效的消除疲劳的症状,同样有学者在中医疲劳说论述中,将运动性疲劳分成机体疲劳、组织疲劳和精神疲劳^[21]。中医治疗疲劳可以采用传统的拔罐、按摩、针灸等,针灸^[22]可以恢复因运动疲劳导致机体损伤,疏通脉络,加速机体代谢,修复线粒体功能紊乱,从体液循环的角度缓解了疲劳。

1.1.3 疲劳的机制研究

疲劳是一个非常复杂的生理现象,是多种因素共同作用产生的结果。随着研究的不断深入,从疲劳的成因来分类,可以分为慢性疲劳,运动性疲劳等。致疲劳的因素之间的关系是复杂的和高度相互依赖的^[23]。距今百余年的研究中,各位学者从多种方向,不同角度广泛的研究疲劳。根据多种研究结果总结出几个具有代表性学说。

1.1.3.1 内环境稳定性失调学说

机体的内环境受机体内水分,体温,渗透压等的影响,在长时间

剧烈的运行下， Ca^{2+} ， K^{+} 分布发生改变，致使线粒体受损，机体内的平衡被打破，工作能力下降，机体产生疲劳感^[24]。

1.1.3.2 代谢产物堆积学说

在运动过程中，肌肉收缩与舒张在供能的同时，会产生一些代谢产物，未能及时清除这些代谢产物，导致了代谢产物在体内大量堆积从而产生疲劳。Simeon P. Cairns 提出^[15]：肌肉或血浆中乳酸/ H^{+} 浓度增加对骨骼肌收缩性能有影响。乳酸的堆积可能诱发全身或部分肌肉酸中毒， H^{+} 与其细胞相互作用，使得快抽搐纤维在运动时较正常 pH 浓度时反应缓慢，持续增加运动产生乳酸，不仅增加疲惫感更有可能造成肌肉损伤。同时生理学家通过研究表明，摄入乳酸钠可以中和体内的 pH，乳酸钠使其产生原位刺激可以延缓疲劳的时间^[25]。

1.1.3.3 能量耗竭学说

疲劳产生是在运动过程中消耗大量的糖，脂肪，蛋白质等物质，并且这些能量物质得不到及时的补充。能量耗竭学说大致可分为几方面：第一：ATP-CP 合成下降，高能磷酸物在剧烈运动后得不到及时的补充，影响 CP 的合成，消耗 CP 越明显，越容易产生运动性疲劳^[26]。第二：糖含量的下降，在长时间运动过程中，糖的有氧供能直接影响能量供应。运动后人体血糖浓度会下降，直观感觉是头晕，头痛，身体松软，疲惫。在补充糖分，提高自身的血糖浓度后，疲劳会有所缓解^[27]。第三：肝对肌糖原的分解使体内重要的能源储备物质下降^[28]，长时间运动致使糖原被分解，能源被消耗，产生运动性疲惫。糖原合成的速度较慢，运动时间越长，糖原的储存量越少，疲劳症状越明显

[29]。

1.1.3.4 保护抑制学说

该学说认为疲劳是大脑对机体的一种自我保护，大脑皮层产生了保护性抑制。在机体疲劳后，大脑细胞中的 γ -氨基丁酸水平有所增加^[30]，促使脑部的工作能力下降，此外伴随着血糖下降，缺氧的状态，机体就会放下工作，缓解不舒服的状态。

1.1.3.5 突变理论

Edwards 在 1982 年提出疲劳是多种因素综合作用引起的。当进行高强度运动后，机体的能量被大量的消耗，产生的乳酸进行堆积，使肌肉兴奋降低，力量下降，当诸多因素累积到一定程度时，机体会自觉产生一个防范意识来抵制，即产生疲劳现象^[31]。

1.1.3.6 自由基学说

自由基是氧化应激引起的一种中间代谢产物的。一般情况自由基的产生速率和清除速率处于平衡，一旦机体做大量的运动时，就破坏了自由基的动态平衡，造成了大量的自由基堆积。很多学者对自由基学说的研究证明了运动会诱发更多的自由基产生，导致机体疲劳。Michael^[32]阐述了氧化剂通过直接或者间接的降低肌原纤维钙敏感性来抑制。实验动物在运动前立即静脉注射乙酰半胱氨酸（NAC）进行预处理，NAC 是一种还原性硫醇供体，支持谷胱甘肽的再合成，具有非特异性抗氧化特性，由此提出使用抗氧化剂治疗疲惫。杨芳芳等^[33]研究发现长时间处于疲劳状态会使氧化应激不断增多，可导致骨骼肌细胞内产生大量的氧自由基，自由基会攻击肌细胞的线粒体膜，提出

了 SOD 活性含量的高低影响机体清除自由基的能力，对运动中的大鼠补充一定剂量的含酚羟基，提高骨骼肌线粒体中的 SOD 的含量，将自由基中超阴离子转化为氧气和 H_2O_2 ，同时 H_2O_2 在酶的作用下分解成水，保护了骨骼肌的氧化损伤。

1.2 多糖抗疲劳的研究

1.2.1 多糖抗疲劳的研究进展

黑木耳多糖抗疲劳活性^[34]的研究和香菇多糖^[35]对离体骨骼肌的疲劳的研究，都采用了脉冲式电流直接刺激离体的蟾蜍腓肠肌作为疲劳模型，结果表明多糖浓度延缓了肌肉疲劳的时间，当浓度增高时，肌肉放松到最大收缩幅度的时间增多，研究表明多糖可以使 SOD 的活力增加，具有抗氧化对骨骼肌的疲劳有延缓作用。

王丽敏^[36]等在楮实多糖对小鼠抗疲劳作用的研究中，深入探讨了楮实多糖对肝糖原的储备关系，疲劳运动后，首先消耗着机体中的葡萄糖，如血糖水平不足，则开始肌糖原分解，一旦大量的消耗肌糖原则对肝组织造成严重的影响。在摄入 20、50、80 mg/(kg-d)剂量的楮实多糖后，减缓了肝糖原的分解，以明显提高小鼠肌糖原和肝糖原的储备量^[37]，加速对 BUN、LA 等代谢废物的清除，延长小鼠的游泳运动时间，提高小鼠的抗疲劳能力。

2005 年 Aiping Chi^[38]研究紫阳绿茶多糖的抗疲劳活性，从紫阳绿茶中分离得到粗多糖，建立负重游泳 4 周试验的疲劳小鼠模型，运动时口服紫阳绿茶多糖，结果显示紫阳绿茶多糖能够降低血清中 BUN、

Bla 水平和 LDH 活性,降低肌肉中 MDA 水平^[39],提示紫阳绿茶多糖可显著改善运动性疲劳,降低力竭运动引起的氧化应激。

1.2.2 多糖抗疲劳的意义

多糖的资源丰富且种类繁多,多存在于植物中,提取工艺成熟,毒副作用小,食用安全。多数的植物粗多糖可提高机体的情绪,增强机体的活力,在抗疲劳等方面起着重要的作用^[40]。如当归、枸杞、黄芪、红景天、五味子等^[41,42,43]也已被证实具有抗疲劳的功能。可见,多糖的抗疲劳方面的应用发展极具潜力。

1.3 黄绿卷毛菇的研究现状

1.3.1 黄绿卷毛菇的介绍与营养价值

黄绿卷毛菇 (*Floccularia luteovirens*) 是蘑菇科卷毛菌,隶属于担子菌亚门,层菌纲,口蘑目,口蘑科,蜜环菌属,又名黄绿蜜环菌。生长于海拔 3000~5300m 的草原或高原草甸植被中^[44],主要分布于我国西藏、青海、四川、甘肃等地。刁治民^[45]对黄绿卷毛菇的形态进行了详细的描述,黄绿卷毛菇新鲜时菇体表现为柠檬黄色至琉璃色,有特殊的菌香气味。菌盖展开呈扁平状,盖缘始终内卷。菌盖表皮裂开形成近环状排列的厚鳞片,盖直径约为 5~12cm;菌柄内实呈圆柱状,长 2.0 cm~8.0 cm,直径 2.0 cm~2.5 cm^[46];孢子在显微镜下观察,形态呈椭圆形,是 4 孢,白色至微黄色,担孢子棒状^[47]。谢红民等^[48]同样对黄绿卷毛菇的形态特征进行了描述,其描述的结果与刁治民的基本相同。中国科学院西北高原生物研究所^[49]在 2014 年利用 8

对 SSR 标记，对来自 23 个地理位置不同居群的 404 个植物进行了分析。通过研究，获得了有价值的群体遗传和结构数据，为未来人工栽培的遗传资源管理奠定了基础。

现研究黄绿卷毛菇营养丰富，通过分析出了有占大比例的蛋白质、粗脂肪、矿物质、粗纤维、无机盐等物质，此外还存在 18 种氨基酸，较多的维生素，其中包括 VB1,VB2,VC^[50,51]。从食品方面，保健方面还是医疗治疗方面^[52] 黄绿卷毛菇极有研究价值。

1.3.2 黄绿卷毛菇的功效

1.3.2.1 抗肿瘤活性作用

李世峰^[53]在食用菌抗氧化和抗肿瘤的活性课题中，结果显示黄绿蜜环菌的水溶粗多糖在摄入后，对有机自由基清除有较好的作用；并且在体外实验中，对人卵巢癌细胞系 8910 有较好的细胞毒作用。在体外实验中表明了黄绿蜜环菌粗多糖具有一定的抗肿瘤活性。

马琳^[54]在活性研究中表明培养体外抗肝癌活性细胞，黄绿蜜环菌子实体水提物成分具有良好的抗肿瘤活性。

1.3.2.2 免疫调节作用

在冯宇章^[55]的研究中探讨了天麻素有良好的抗炎效果，天麻素成分与黄绿卷毛菇提取物中成分类似，摄入后提高了小鼠吞噬指数，促进淋巴细胞增殖，在免疫调节中具有重要意义^[56]。

1.3.3 黄绿卷毛菇粗多糖的研究意义

功能食品是当代食品研究和开发的潮流，发展前景非常乐观。菌类食品以其安全、天然、营养丰富、具有调节生理功能而受到广大消

费者的青睐^[57]。食用菌提取的多糖、矿物质等在调节免疫与血脂及抗疲劳等保健食品中发挥着重要功能。

黄绿卷毛菇味道鲜美，香气浓郁，并且其营养价值十分的高。有效成分中含有丰富的糖类，提取技术成熟，便于人体吸收，在众多粗多糖类免疫性保健食品中也是性价比极高的食品之一。

随着科技的飞速发展和人们生活方式的日益改变，无论是体力劳动还是脑力劳动都会使人们产生疲惫，为了缓解疲劳的生理反应，越来越多的人开始摄取保健食品来缓解疲劳。免疫抗疲劳保健品在日常生活和工作中将会得到越来越广泛的应用，全面使用免疫性抗疲劳保健品的时代已经到来。

1.4 研究的内容和意义

1.4.1 研究的主要内容

建立小鼠疲劳转棒模型和小鼠强迫游泳模型，小鼠疲惫模型经口灌入黄绿卷毛菇粗多糖进行抗疲劳实验，通过测定小鼠转棒疲惫时间和强迫游泳时间，代谢产物含量变化，酶活性变化等结果来研究卷毛菇粗多糖对抗疲劳的作用。

1.4.2 研究的意义

目前，黄绿卷毛菇粗多糖对小鼠的抗疲劳作用鲜有研究。本研究以卷毛菇作为研究对象，验证黄绿卷毛菇粗多糖对小鼠有抗疲劳作用，且观察小鼠的动物模型和分析理化的检测结果，探究黄绿卷毛菇粗多糖对疲劳小鼠的调节方式。并为以黄绿卷毛菇粗多糖作为有效成分的

抗疲劳药物提供理论依据，为黄绿卷毛菇资源的开发提供新的途径。

第二章 材料与amp;方法

2.1 实验材料

2.1.1 黄绿卷毛菇水提粗多糖的制备

提取过程：黄绿卷毛菇子实体，采自青海省海北州祁连。黄绿卷毛菇粗多糖由水浸提法制备得到^[58]。取自然晾干的黄绿卷毛菇子实体，称重约为 500g，粉碎成 1~2cm² 的碎块，加入到 5L 纯水中室温浸泡 4h，随后沸水煮提 2h/次共提取 3 次，四层纱布过滤后，收集滤液，80℃ 浓缩至 4~5L，加入 95%乙醇^[59]至混合液中乙醇浓度达到约 80%，将混合液室温静置过夜，弃上清后离心收集沉淀，沉淀冷冻干燥后得到黄绿卷毛菇粗多糖 HMGWP。

2.1.2 实验动物

SPF 级野生型 C57BL/6J 小鼠（6~8 周龄，20±2g）购自(实验动物使用许可证号：SYXK（吉）2018-001)。鼠粮，垫料均购自长春市亿斯实验动物技术有限公司。动物饲养场所：吉林大学。动物的生活环境参数：温度 22±2℃，相对湿度为 55±5%RH。动物处理程序是在伦理委员会的许可下进行。

2.1.3 实验试剂

表 1：实验试剂

| 试剂 | 厂家 |
|----------|-----|
| 尿素氮（BUN） | 普利莱 |
| 肌酸激酶（CK） | 默克 |

| | |
|---|------------------|
| 乳酸 (LA) | HYCEZMBIO® |
| 活性氧 (ROS) | 齐态生物 |
| 丙二醛 (MDA) | 北京百奥莱博科技有限公 司 |
| 水平以及超氧化物歧化酶 (SOD) | 麦克林 |
| 过氧化氢酶 (CAT) | 麦克林 |
| 谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) | 麦克林 |
| 小鼠超氧化物歧化酶(SOD)ELISA 试 剂盒 | 江莱生物 |
| 小鼠 BUN ELISA 试剂盒 | 仁捷生物 |
| MDA elisa 试剂盒 | 上海优科唯 |
| Mouse Catalase (CAT) ELISA Kit | 优宁维 |
| LA elisa kit | 优宁维 |
| Mouse Creatine Kinase (CK) ELISA Kit | 优宁维 |
| Mouse Catalase (CAT) ELISA Kit | 优宁维 |
| Mouse glutathione peroxidase | 优宁维 |
| GSH-Px ELISA Kit | 优宁维 |
| Mouse reactive oxygen species (ROS) ELISA Kit | Bio-Swamp |

2.1.4 实验仪器与设备

表 2：实验仪器与amp;设备

| 仪器名称 | 生产厂家 |
|-------------|----------------|
| 4℃冰箱 | 美国 Thermo |
| -80 ℃冰箱 | 日本 SANYO |
| 移液器 | 美国 康宁 |
| 高速冷冻离心机 | 美国 Sigma 公司 |
| Milli-Q 净水仪 | 美国密理博公司 |
| 酶标仪 | 美国 Bio-Rad 公司 |
| 天子天平 | 美国 Bio-Rad 公司 |
| 微量移液枪 | 德国 Eppendorf |
| 疲劳转棒仪 | 北京智鼠多宝生物科技有限公司 |

2.2 实验方法

2.2.1 试验设计

小鼠适应性喂养 5 天后选取 40 只雄性小鼠，采用简单随机法将小鼠随机分为 5 组（n=8 只/组）。

第一组：空白对照（Intact）

第二组：模型组（Vehicle）

第三组：模型组（Vehicle）+ HMGWP 50 mg/kg

第四组：模型组（Vehicle）+ HMGWP 100 mg/kg

第五组：模型组（Vehicle）+ HMGWP 200 mg/kg

2.2.2 实验处理

第 1 天和第 30 天上午 8:30, 使用电子天平测量体重记录各组小鼠体重, 以第一天记录的小鼠体重计算黄绿卷毛菇粗多糖 (HMGWP) 的剂量进行灌胃, 每日 9:00 给药, 低剂量组、中剂量组和高剂量组分别给予 HMGWP 剂量 50 mg/kg, HMGWP 100 mg/kg 和 HMGWP 200 mg/kg; 空白对照 (Intact) 和模型组 (Vehicle) 给与等量的蒸馏水, 连续造模 30 天。

2.2.3 疲惫小鼠模型制备

2.2.3.1 小鼠疲劳转棒实验模型

在给药第 22 天, 分别对模型组和给药组的小鼠进行转棒独立训练。旋转转棒训练分 3 次进行: 首先将小鼠放在转棒上, 在 1min 内提高转棒的速度, 从 0 转加速到 15 转, 训练小鼠 10 min。休息 0.5h 后进行第二次适应实验。第二次的训练与第一次训练一致, 不同的是提高了转速, 转速在 1min 内从 0 转升高至 18 转, 训练小鼠 10 min。第三次实验在第二次实验完成后 1h 进行, 与第二次实验条件保持一致。给药第 25 天, 进行正式的疲劳转棒实验。实验装置为 4 个独立转台装置, 每个装置有 4 个测试位, 每组分 2 次完成测试。与预实验一致, 将每只小鼠置于固定棒上, 在 1 min 内将转棒的速度升至 18 转, 记录小鼠因疲劳而跌落装置的时间, 当小鼠在 30min 内跌落 3 次判定为疲劳。空白组不参与此研究。

2.2.3.2 强迫游泳实验模型

强制游泳时间(FST)定义为从老鼠被扔进水里到精疲力竭的时间跨度。小鼠被单独放入装有 10 cm 水的玻璃缸(高 25 cm, 直径 10 cm)

中，温度为 23-25℃，持续 10 min^[6]。当老鼠停止挣扎，在水中静止不动，只做微小的运动使头部露出水面时，就可以定义为静止不动^[60,61]。在第 26-29 日进行强迫游泳训练，在小鼠给药第 30 天，灌胃半小时后，对小鼠进行强迫游泳实验。静止的时间由训练有素的实验者手动记录，不考虑实验条件。在实验结束时，将老鼠从水中取出，用纸巾擦干，然后放回它们的笼子里。容器里的水在每次实验结束后都要更换，空白组不做强迫游泳实验。

2.2.4 行为学观察及样本的处理

每组 8 只小鼠进行强迫游泳实验后，休息 30min 后腹腔注射戊巴比妥钠进行麻醉。用抗凝的毛细血管采取眼眶静脉丛采血，置于血浆分离管中，静置 30min，之后于 4℃ 3000rpm 离心 15min，收集上清，用于生化检测。并迅速颈部脱臼处死小鼠，解剖取肝脏，取小鼠肝脏大叶肝脏称重，小鼠肝脏指数(%)=小鼠肝脏质量(g)/小鼠体质量(g)×100%^[30]。

2.2.5 代谢产物及抗氧化物酶的测试

按照 ELISA 试剂盒说明书操作步骤使用血液上清检测 BUN、CK、LA、ROS、MDA、SOD、CAT 和 GSH-Px 水平，在酶标仪上 450 nm 波长处检测吸光度值并根据标准曲线计算浓度。

2.2.6 统计学方法

所有实验结果以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示，采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计学分析。组间比较采用单因素方差分析，结合 Dunnett's T3 检验， $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/435143002103011113>