

长柄侧耳胞外多糖PSEPS2-A的分离纯化及降血糖活性

李 灿^{1,2}, 胡 芳¹, 朱瑞娟¹, 陈同强², 邓西贝³, 王淑敏³, 封士兰^{3,*}

(1.兰州大学药学院, 甘肃 兰州 730000; 2.湖南省食品质量监督检验研究院, 湖南 长沙 410111;

3.长春中医药大学药学院, 吉林 长春 130117)

摘要: 研究长柄侧耳胞外多糖分离纯化方法及对糖尿病小鼠的降血糖作用。从长柄侧耳液体发酵液中提取出长柄侧耳胞外多糖, 采用Sevag法除蛋白、H₂O₂脱色素、透析和Sepadex G-200、100柱色谱分离纯化得到一种分子量单一的多糖组分PSEPS2-A, 以凝胶渗透色谱与光散射仪联用技术 (gel permeation chromatography-eighteen angle laser scattering detector, GPC-MALLS) 和元素分析等其他化学分析法考察多糖的理化性质。以四氧嘧啶诱导建立糖尿病小鼠模型, 通过不同剂量PSEPS2-A治疗, 比较治疗前后小鼠体质量及空腹血糖值、糖耐量水平、脏器指数、肝组织肝糖原水平变化。结果表明: PSEPS2-A的分子质量为 6.268×10^5 D, 在0.9% NaCl溶液中为棒状结构的多糖。PSEPS2-A能显著降低糖尿病小鼠空腹血糖值 ($P < 0.05$) 和血糖曲线下面积 ($P < 0.05$), 减缓糖尿病小鼠体质量的负增长; 显著降低肝脏、肾脏脏器指数 ($P < 0.05$), 显著升高肝糖原水平 ($P < 0.05$), 促进肝糖原合成。PSEPS2-A是一种新的长柄侧耳胞外多糖, 在一定剂量下具有调节糖代谢、降低血糖、改善糖尿病症状的作用。

关键词: 长柄侧耳; 胞外多糖; 分离纯化; 糖尿病; 降血糖

Purification and Hypoglycemic Effect of Extracellular Polysaccharide from *Pleurtus spodotecus* Fr.

LI Can^{1,2}, HU Fang¹, ZHU Ruijuan¹, CHEN Tongqiang², DENG Xibei³, WANG Shumin³, FENG Shilan^{3,*}

(1. School of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 2. Hunan Institute of Food Quality Supervision Inspection and Research, Changsha 410111, China; 3. School of Pharmaceutical Sciences, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

Abstract: This study was conceived to investigate the isolation, purification and hypoglycemic effect of extracellular polysaccharides from *Pleurtus spodotecus* Fr. in diabetic mice. A homogeneous extracellular polysaccharide named as PSEPS2-A was extracted from the fermented broth of *Pleurtus spodotecus* Fr.. Then PSEPS2-A was treated with Sevag method, H₂O₂ and purified with Sephadex gel filtration chromatography. GPC-MALLS and other methods were utilized to examine the physical and chemical properties of PSEPS2-A. The absolute molecular weight of PSEPS2-A was 6.268×10^5 D and the structure was rod-like in 0.9% NaCl solution. Diabetic mice induced by Alloxan were subjected to continuous intragastric administration with different doses of PSEPS2-A. The changes in body weight, fasting blood glucose (FBG), glucose tolerance, organ index, and liver glycogen in diabetic mice were determined before and after the treatment. PSEPS2-A could significantly reduce the content of FBG ($P < 0.05$) and the area under curve of blood glucose ($P < 0.05$). The symptom of negative growth of body weights was slowed down and the organ index was decreased in diabetic mice. PSEPS2-A also could significantly promote liver glycogen synthesis and elevate the level of liver glycogen. PSEPS2-A is a new extracellular polysaccharide from *Pleurtus spodotecus* Fr., which plays an important role in regulating glucose metabolism, lowering blood sugar, and improving diabetic symptoms at a certain concentration.

Key words: *Pleurtus spodotecus* Fr.; extracellular polysaccharides; isolation and purification; diabetes; hypoglycemic

中图分类号: TS201.3; Q946.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2015) 07-0183-06

doi:10.7506/spkx1002-6630-201507034

收稿日期: 2014-06-11

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目 (2011BAI05B02); 吉林省科技厅自然科学基金项目 (201205050)

作者简介: 李灿 (1989—), 男, 硕士研究生, 主要从事中药小分子及大分子 (多糖) 化合物提取分离、结构研究。

E-mail: lic2012@lzu.edu.cn

*通信作者: 封士兰 (1957—), 女, 教授, 博士, 主要从事中药小分子及大分子 (多糖) 化合物提取分离、结构研究; 中药止咳、祛痰、降血铅、降血糖等药效研究。E-mail: fengshl@lzu.edu.cn

长柄侧耳 (*Pleurtus spodotectus* Fr.) 系伞菌目侧耳科侧耳属食药真菌, 别名灰白侧耳, 主要分布在吉林、云南等地。长柄侧耳不仅营养丰富、肉质肥厚、味道鲜美, 而且含有丰富的蛋白质、多糖、维生素、核苷酸和不饱和脂肪酸, 具有很高的医疗保健作用, 有延年益寿的功效^[1-3]。作为自然界中含量最丰富的大分子聚合物之一, 多糖广泛分布于动植物、真菌和细菌中^[4], 可通过其特异性识别受体^[5]发挥免疫调节、抗肿瘤、抗病毒、抗感染、抗消化性溃疡、抗氧化、抗衰老等多种功效^[6-8]。

目前, 糖尿病的发病率日益增高, 严重危害人类健康, 糖尿病导致的死亡率已在继心血管疾病和癌症之后位列第三^[9]。糖尿病是一种多病因的内分泌代谢紊乱性疾病, 尚无理想的治疗方法。传统磺酰脲类和双胍类降糖药, 久用会产生依赖性和不良反应。近年来, 国内外学者开始从天然产物中筛选降糖类化合物^[10-12], 取得了一些进展。目前研究证实, 真菌多糖有显著的降低血糖、改善糖耐量、增加体内肝糖原的作用^[13-17], 其作用是由调节糖代谢、促进肝糖原的合成、减少肝糖原分解引起的。但是, 目前对于长柄侧耳的研究还停留在长柄侧耳液体发酵技术研究等初步研究^[18-19], 还未见长柄侧耳胞外多糖分离纯化和降血糖活性的相关报道。

本实验从长柄侧耳液体发酵液胞外多糖, 经分级醇沉、Sevag法除蛋白、H₂O₂脱色素和葡聚糖Sepadex柱色谱等步骤分离纯化出一种均一组分PSEPS2-A, 并对其纯度和糖含量进行分析, 考察不同剂量的PSEPS2-A降血糖作用, 并对糖尿病小鼠血糖值、糖耐量和肝糖原水平等糖代谢相关指标进行测定, 为研制降血糖功能性食品或药物的开发提供参考。

1 材料与方 法

1.1 动物、材料与试剂

清洁级昆明种小白鼠, 体质量(20±2)g, 兰州大学动物中心提供。

长柄侧耳由长春中医药大学药学院培养提供。

Sepadex G-200、Sepadex G-100 北京 Biotopped 公司; 葡萄糖标准单糖 中国食品药品检定研究院; 刚果红、牛血清白蛋白、四氧嘧啶 (alloxan) 美国 Sigma 公司; 消渴丸 (批号: R01322) 广州白云山中一药业有限公司; 口服葡萄糖 (批号: 121228) 重庆和平制药有限公司; 95%乙醇、生理盐水 甘肃扶正药业科技股份有限公司; 实验中所用其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

BP211D型和BS224S型电子天平、Multi EA 4000元素分析仪 德国Elementar Analysensysteme公司; UV-1700紫外-可见分光光度计 日本岛津公司; 紫外扫

描仪 (Lambda 25 Uv/Vis spectrometer) 美国Perkin Elmer公司; DHG-9075A型电热恒温鼓风干燥箱 上海一恒科学仪器有限公司; BS-100N自动部分收集器、BT-100N数显恒流泵 上海青浦沪西仪器厂; CR22G II离心机 日本日立公司; Freezone 6PWS型真空冷冻干燥仪 美国Labconco公司; 透析袋 (截留相对分子质量3 500) 美国科技发展公司; Waters 600高效液相色谱仪、Ultrasphere™ 1000、500色谱柱、示差折光检测器 美国Waters公司; Dawn Heleos II型十八角度激光散射仪 美国怀雅特技术公司; 三诺安稳血糖测试仪 长沙三诺生物传感技术股份有限公司; Well scan MK3型酶标仪 芬兰Thermo LabSystems公司。

1.3 方法

1.3.1 多糖的提取与分离纯化^[20-23]

长柄侧耳发酵液参照齐放等^[22]的方法经液体发酵制得; 最终得长柄侧耳发酵液共40 L, 双层纱布过滤, 10 000×g离心10 min, 得到上清液, 60 °C浓缩至5 L。加入95%的乙醇至乙醇终体积分数达到30%, 在4 °C条件下静置过夜, 离心, 去除沉淀, 上清液继续加入95%乙醇至乙醇终体积分数达到50%, 在4 °C条件下静置过夜, 离心, 收集沉淀, 冷冻干燥得长柄侧耳胞外多糖2 (PSEPS2), PSEPS2经Sevag法脱蛋白和H₂O₂除色素后再次以95%乙醇醇沉至50%, 以透析袋流水透析48 h、双蒸水透析24 h, 冷冻干燥。用水溶解后 (控制质量浓度在30 mg/mL左右), 经Sepadex G-200柱 (2.6 cm×70 cm) 分离, 双蒸水0.5 mL/min洗脱, 每管12 min, 收集20 h, 苯酚-硫酸法测定糖含量, 收集主要馏分, 后经Sepadex G-100柱 (2.6 cm×67 cm) 分离, 双蒸水0.5 mL/min洗脱, 收集20 h得到PSEPS2-A分子质量单一的组分。

1.3.2 多糖的理化性质测定

对PSEPS2-A进行外观及溶解性、碘-碘化钾反应、Molish试剂反应、茚三酮反应等^[24]分析, 多糖中碳 (C)、氢 (H)、氮 (N)、硫 (S) 采用元素分析仪进行分析。

PSEPS2-A总糖质量分数的测定用苯酚-硫酸法, 以葡萄糖为标准单糖; 蛋白质含量测定用Bradford法^[23], 以牛血清白蛋白为标准蛋白, 全波长紫外扫描检测多糖是否含有核酸和蛋白质。采用高效凝胶色谱 (high performance liquid chromatography-gel permeation chromatography, HPLC-GPC) 示差折光检测器联用方法对PSEPS2-A进行均一性鉴定, 色谱柱为凝胶渗透色谱柱Ultrasphere™ 1000、500串联, 体积流量0.8 mL/min, 柱温30 °C, 示差折光检测器温度为35 °C, 流动相为蒸馏水。

1.3.3 分子质量、分子构象及分子质量分布^[23]

采用凝胶渗透色谱与光散射仪联用技术 (GPC-

eighteen angle laser scattering detector, GPC-MALLS) 测定其分子质量、分子构象及相对分子质量分布, 流动相为质量分数0.9% NaCl与质量分数0.02% NaN₃的混合溶液。色谱柱为凝胶渗透色谱柱Ultrahydrogel™ 1000、500 串联, 体积流量0.8 mL/min, 柱温30 °C, 示差折光检测器温度为35 °C。

1.3.4 刚果红反应

刚果红可与具有三螺旋构象的多糖形成复合物, 复合物的 λ_{\max} 与刚果红相比发生红移, 因此根据所研究多糖的水溶液与刚果红形成配合物的 λ_{\max} 的变化情况, 可判断出所研究多糖是否具有螺旋结构^[24]。取5 mg PSEPS2-A 样品, 加入2 mL蒸馏水和2 mL 80 $\mu\text{mol/L}$ 刚果红溶液, 逐渐加入4.0 mol/L NaOH, 使溶液中的NaOH终浓度分别为0.00、0.10、0.15、0.20、0.30、0.40、0.50、1.00 mol/L。混匀, 室温放置30 min 后, 用紫外-可见分光光度计于200~700 nm波长范围内扫描各溶液的最大吸收波长。另外按照上述方法配制不同NaOH浓度的刚果红溶液, 作为对照。以NaOH溶液浓度为横坐标, λ_{\max} 为纵坐标作图。

1.3.5 糖尿病小鼠模型构建及实验设计

取健康昆明种雄性小鼠80只, 适应性饲养1周后, 禁食(不禁水)12 h, 尾静脉注射四氧嘧啶80 mg/kg, 间隔24 h后腹腔注射四氧嘧啶80 mg/kg。为了避免药物在成模前引起的动物低血糖相及其可能对小鼠造成的应激性损害, 每次注射给药后2.5~5 h, 灌胃质量分数为50%葡萄糖, 0.5 mL/只。末次给药72 h后, 禁食(不禁水)10 h, 断尾取血, 测空腹血糖值(fasting blood-glucose, FBG)。FBG>11.1 mmol/L, 并出现多饮、多食、多尿者, 判定为建模成功。

将建模成功的60只小鼠随机分为糖尿病模型组、阳性对照组(消渴丸)、PSEPS2-A低剂量组、PSEPS2-A中剂量组、PSEPS2-A高剂量组, 每组12只, 编号。另随机抽取12只没有注射四氧嘧啶的小鼠作为空白对照组。阳性对照组(消渴丸1 g/kg)、PSEPS2-A低剂量组(0.086 4 mg/kg)、PSEPS2-A中剂量组(0.172 8 mg/kg)、PSEPS2-A高剂量组(0.259 2 mg/kg)^[25]按体质量灌胃给药, 糖尿病模型组和空白对照组灌胃给予生理盐水0.1 mL/10 g。每天灌胃给药1次, 连续15 d。

1.3.6 指标检测

观察小鼠饮食、饮水、尿量、体质量(分别在小鼠造模前、造模成功后、给药第5、10、15天称量小鼠的体质量)、精神状态、毛色等状况。

血糖测定: 用血糖仪测定第5、10、15天禁食3 h、灌胃5 h后的血糖值; 糖耐量^[26]测定: 在第15天断尾采血后给药1次, 并在给药后0.5 h给予葡萄糖2.0 g/kg灌胃, 于灌胃葡萄糖后0.5、2 h断尾采血测血糖值(0 h的血糖值

采用第15天给葡萄糖前的空腹血糖值), 计算血糖曲线下面积, 比较各组动物血糖值及灌胃葡萄糖后各时间点血糖曲线下面积的变化。

脏器指数测定: 脱白处死小鼠, 取肝脏、肾脏、胸腺和脾脏, 去除脂肪和结缔组织, 称质量, 并以其质量(g)和动物体质量(g)的比值表示小鼠的脏器指数。

肝糖原含量测定(蒽酮法)^[27]: 取小鼠肝脏400 mg, 加质量分数10%三氯乙酸制备组织匀浆, 取10%三氯乙酸肝匀浆液1 mL, 置于10 mL刻度试管中, 加入10 mol/L KOH 1 mL, 置沸水浴煮沸1 h。取出冷却后, 加入0.5 mL冰醋酸中和过量的碱, 加水至10 mL。同时用10 mL容量瓶配制不同质量浓度的葡萄糖标准液(倍比稀释), 以吸光度为纵坐标, 以葡萄糖标准液质量浓度为横坐标绘制标准曲线, 得到回归方程为 $y=1.052 6x+0.030 3$ ($R^2=0.996 9$)。取上述样品溶液和标准溶液各1 mL置于试管中, 移入冰水浴内, 分别加入蒽酮试剂4 mL, 摇匀, 待冷至室温后, 移至沸水浴中, 6 min后取出, 放入冰水浴中冷却。在分光光度计650 nm波长处用空白管调零, 比色测定吸光度。将测得的吸光度代入标准曲线, 得小鼠肝糖原含量。

2 结果与分析

2.1 多糖的分离与纯化结果

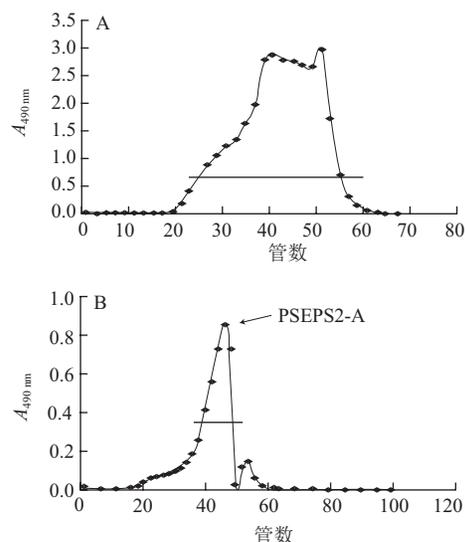


图1 多糖PSEPS2-A经Sephadex G-200 (A) 和Sephadex G-100 (B) 柱层析色谱图

Fig.1 Sephadex G-200 (A) and Sephadex G-100 (B) column chromatography of PSEPS2-A

长柄侧耳发酵液40 L, 经过滤、离心、浓缩至5 L后醇沉得长柄侧耳胞外多糖2 (PSEPS2) 粗多糖60.71 g, 又经除蛋白、脱色素、透析、Sephadex G-200和Sephadex G-100排阻色谱分离纯化得白色絮状长柄

侧耳胞外多糖PSEPS2-A 5.52 g, 得率为0.138 g/L。SephadexG-200和SephadexG-100柱层析色谱洗脱曲线如图1所示, PSEPS2-A经过SephadexG-200时峰型并未完全分离开, 故收集主峰洗脱液浓缩、真空冷冻干燥后继续上SephadexG-100, 得到峰型单一主峰, 表明PSEPS2-A纯化完全, 浓缩主峰洗脱液, 冷冻干燥得纯化好的PSEPS2-A。

2.2 多糖理化性质

PSEPS2-A外观为白色絮状, 无味, 易溶于水, 难溶于甲醇、乙醇、丙酮、乙醚等有机溶剂; 碘-碘化钾反应呈阴性, 说明所得产品中不含淀粉; 茚三酮反应呈阴性, 说明所得产品中不含蛋白质; Molish 反应呈阳性, 说明所得产品中含有糖类物质。PSEPS2-A的总糖质量分数为97.51%, 未检出蛋白质。由图2可知, 全波长扫描在260、280 nm波长处没有吸收峰, 说明不含核酸和蛋白质。元素分析结果显示C、H、S、N的质量分数分别为39.37%、6.40%、1.90%、0.00%, 经计算得O元素的质量分数为52.33%, C、H、O的物质的量比约为1:2:1, 符合多糖的元素及组成比例, N元素含量为0证明PSEPS2-A不含蛋白质。由图3可知, PSEPS2-A经过HPLC-GPC检测, 呈单一对称峰, 根据峰面积归一化法计算质量分数为96.7%, 说明该组分是分子质量单一的多糖。

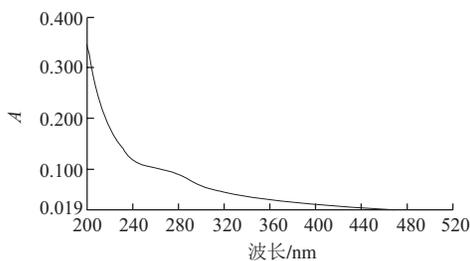


图2 PSEPS2-A全波长扫描图谱
Fig.2 Full wavelength scan of PSEPS2-A

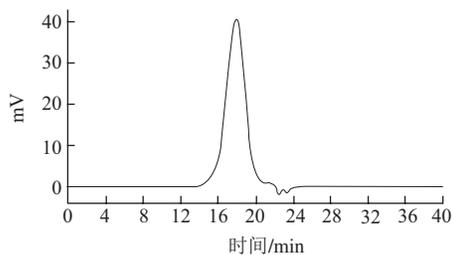


图3 PSEPS2-A的高效液相凝胶色谱图
Fig.3 HPLC-GPC of PSEPS2-A

2.3 多糖分子质量、分子构象及分子质量分布分析

采用示差折光检测器和激光检测器分别记录供试品质量浓度和供试品在不同角度的光散射强度; 比折光指数增量值 (dn/dc) 为0.138, 通过多角度激光散射

仪自带ASTRAV软件计算得到PSEPS2-A的分子质量为 6.268×10^5 D、分布指数 $d = M_w/M_n = 1.014$ (M_w 为重均分子质量, M_n 为数均分子质量)。分布指数接近1.00说明PSEPS2-A分布呈单分散性, 即表明摩尔质量分布范围较集中, 分子大小均一; 以旋转均方根半径对摩尔质量作图 (图4) 得到的斜率为1.03, 说明PSEPS2-A的构象为棒状。

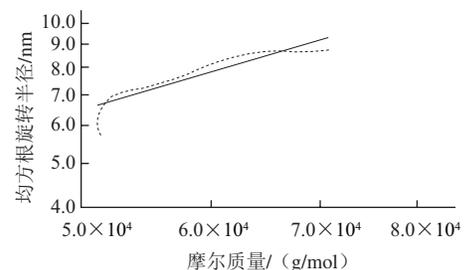


图4 多糖PSEPS2-A均方根旋转半径对摩尔质量图
Fig.4 Root mean square turning radius of PSEPS2-A

2.4 刚果红反应分析

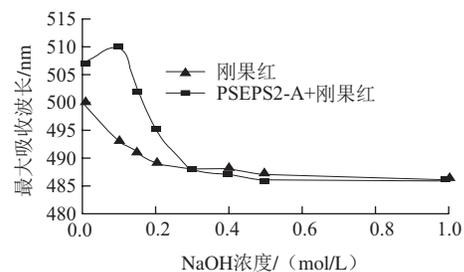


图5 不同碱浓度下刚果红与多糖混合液的波长变化
Fig.5 Absorption wavelength change of Congored-polysaccharide complex in different concentrations of NaOH solutions

由图5可知, 多糖与刚果红作用后在低浓度的NaOH溶液中发生红移, 说明PSEPS2-A存在三螺旋结构; 在高浓度NaOH溶液中没有此现象, 说明多糖结构由于碱浓度的增加将有序结构破坏至无序结构, 因为棒状结构能影响线性分子间氢键的稳定性。

2.5 小鼠基本生活状况观察

造模后小鼠多饮、多食、多尿、体质量减轻, 即“三多一少”症状十分明显, PSEPS2-A 3个剂量组和阳性对照组小鼠随实验进程症状逐渐缓解、反应灵活、毛发平伏有光泽。实验中, 有个别组中有老鼠意外死亡的情况, 可能原因是个体差异和人为操作因素。

2.6 PSEPS2-A对糖尿病小鼠空腹血糖值的影响

由表1可知, 实验期间, 造模后小鼠空腹血糖值显著升高, 与空白对照组比较差异极显著 ($P < 0.01$), 显示造模成功。开始给药后, PSEPS2-A高、中、低剂量组小鼠血糖值逐渐降低, 在给药15 d后明显低于给药前水平 ($P < 0.01$); 在给药15 d后, PSEPS2-A高、中、

低剂量组、阳性对照组与糖尿病模型组比较差异极显著 ($P < 0.01$)；在给药15 d后, PSEPS2-A高、中、低剂量组与阳性对照组比较差异不显著。表明PSEPS2-A具有明显控制糖尿病小鼠空腹血糖值升高、降低其血糖值的作用, 且有与消渴丸相当的作用, 并存在一定的剂量依赖关系。

表1 多糖PSEPS2-A对糖尿病小鼠空腹血糖值的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of PSEPS2-A on blood glucose in alloxan-induced diabetic mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g/kg)	动物 只数	血糖值/(mmol/L)			
			给药前	给药5 d	给药10 d	给药15 d
空白对照组	—	12	4.74±0.89	3.97±0.78	4.44±0.84	4.95±0.95
糖尿病模型组	—	12	18.08±3.79*	18.87±2.99*	17.07±5.96*	17.85±4.22*
PSEPS2-A低剂量组	0.086 4	12	17.66±3.08*	12.89±2.87	9.71±3.13	8.69±1.67**▲
PSEPS2-A中剂量组	0.172 8	10	18.13±2.15*	12.20±2.11	8.72±3.00	7.63±1.89**▲
PSEPS2-A高剂量组	0.259 2	11	17.74±1.72*	10.1±1.84	8.15±1.97	7.11±1.61**▲▲
阳性对照组	1.000 0	11	17.25±2.67*	13.97±3.59	10.22±2.679	8.85±3.59**▲

注：—, 不给药；*, 与空白对照组比较差异极显著 ($P < 0.01$)；**, 与糖尿病模型组比较差异极显著 ($P < 0.01$)；▲, 与给药前比较差异显著 ($P < 0.05$)；▲▲, 与给药前比较差异极显著 ($P < 0.01$)。

2.7 PSEPS2-A对糖尿病小鼠糖耐量的影响

表2 多糖PSEPS2-A对糖尿病小鼠糖耐量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of PSEPS2-A on glucose tolerance in alloxan-induced diabetic mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g/kg)	血糖值/(mmol/L)			曲线下面积/ (mmol/L)
		0 h	0.5 h	2 h	
空白对照组	—	4.95±0.95	12.37±1.26	5.12±0.92	17.45±2.28
糖尿病模型组	—	17.85±1.22	28.63±2.23	19.14±2.06	47.45±4.06*
PSEPS2-A低剂量组	0.086 4	8.69±1.67	16.24±1.86	8.41±2.01	24.72±1.87**▲
PSEPS2-A中剂量组	0.172 8	7.63±1.89	14.52±2.07	7.67±1.94	22.18±1.98**▲
PSEPS2-A高剂量组	0.259 2	7.11±1.61**	13.69±1.55**	7.02±1.45**	20.73±2.04**▲
阳性对照组	1.000 0	8.85±3.59	16.13±1.28	7.56±1.17	23.76±3.25

注：*, 与空白对照组比较差异极显著 ($P < 0.01$)；**, 与糖尿病模型组比较差异极显著 ($P < 0.01$)；▲, 与阳性对照组比较差异不显著 ($P > 0.05$)。

由表2可知, 糖尿病模型组小鼠血糖曲线下面积与空白对照组比较极显著升高 ($P < 0.01$)，PSEPS2-A 各剂量组血糖曲线下面积的降低与糖尿病模型组相比有统计学意义 ($P < 0.01$)，且有明显的量效关系, 与阳性对照组比较无统计学差异 ($P > 0.05$)。表明PSEPS2-A具有明显降低糖尿病小鼠血糖曲线下面积的作用, 且有与消渴丸相当的作用, 并存在一定的剂量依赖关系。

2.8 PSEPS2-A对糖尿病小鼠体质量的影响

由图6可知, 小鼠在造模后体质量与空白对照组相比均显著降低 ($P < 0.05$)；实验期间, PSEPS2-A 3个剂量组和阳性对照组小鼠体质量与糖尿病模型组相比均显著回升 ($P < 0.05$)。PSEPS2-A 3个剂量组中, 随着剂量的增加, 小鼠体质量增长明显, 各剂量组在给药后10 d起均高于造模前水平, 并以PSEPS2-A高剂量组体质量增长最

明显。表明PSEPS2-A具有一定促进糖尿病小鼠体质量恢复的作用, 并存在一定的剂量依赖关系。

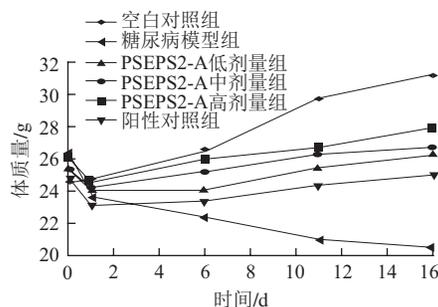


图6 多糖PSEPS2-A对糖尿病小鼠体质量的影响

Fig.6 Effect of PSEPS2-A on body weight in alloxan-induced diabetic mice

2.9 PSEPS2-A对糖尿病小鼠脏器指数的影响

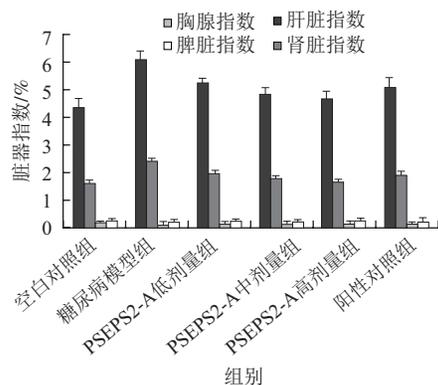


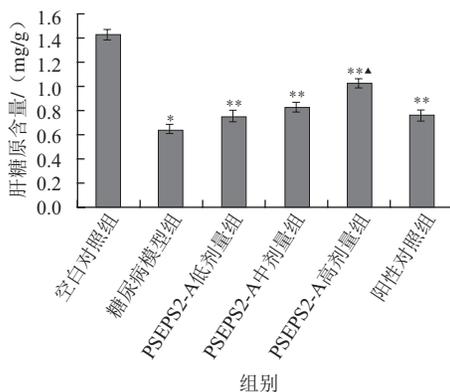
图7 多糖PSEPS2-A对糖尿病小鼠脏器指数的影响

Fig.7 Effect of PSEPS2-A on organ indexes in alloxan-induced diabetic mice

由图7可知, 糖尿病模型组小鼠肝脏指数和肾脏指数与空白对照组比较均显著升高, PSEPS2-A高剂量组与糖尿病模型组对比差异显著 ($P < 0.05$)，与空白对照组对比则无显著性差异 ($P > 0.05$)。各组小鼠脾脏指数和胸腺指数均无显著性差异。表明糖尿病小鼠肝脏指数和肾脏指数均升高, 而PSEPS2-A具有降低脏器指数恢复到正常水平趋势的作用, 但对小鼠免疫器官的作用不是很明显。

2.10 PSEPS2-A对糖尿病小鼠肝糖原水平的影响

由图8可知, 糖尿病模型组小鼠肝糖原含量明显低于空白对照组 ($P < 0.05$)；PSEPS2-A 3个剂量组和阳性对照组小鼠肝糖原水平均显著高于糖尿病模型组 ($P < 0.05$)；与阳性对照组相比, PSEPS2-A中、低剂量组小鼠肝糖原水平略高于阳性对照组, 高剂量组差异显著 ($P < 0.05$)，说明PSEPS2-A促进糖尿病小鼠肝糖原合成作用优于消渴丸, 且存在剂量依赖关系。



*. 与空白对照组比较差异显著 ($P < 0.05$); **. 与糖尿病模型组比较差异显著 ($P < 0.05$); ▲. 与阳性对照组比较差异显著 ($P < 0.05$)。

图8 多糖PSEPS2-A对糖尿病小鼠肝糖原水平的影响

Fig.8 Effect of PSEPS2-A on hepatic glycogen level in alloxan-induced diabetic mice

3 结论

长柄侧耳等侧耳属真菌含有多种氨基酸、维生素、矿物质元素等, 具有较好的食用和药用价值, 是一种极具开发潜力和应用前景的食用菌, 但目前对于长柄侧耳胞外多糖的分离纯化以及生物学活性的研究较少, 本实验利用从长柄侧耳液体发酵培养基中制备的胞外粗多糖, 经过除蛋白、脱色素和Sepadex凝胶柱色谱等一系列分离纯化得到一种均一化多糖PSEPS2-A。

糖尿病性高血糖症主要体现在葡萄糖在血液中的浓度过高带来的血糖升高^[28]。一些证据表明, 胰岛β细胞的主要功能是参与胰岛素的产生和释放, β细胞通过内源性胰岛素的调节, 降低血糖浓度, 从而抑制糖尿病相关的并发症^[29]。四氧嘧啶是一种β细胞毒剂, 可选择性地损伤多种动物的胰岛β细胞, 造成胰岛素分泌的下降, 引起实验性糖尿病^[30]。本研究以四氧嘧啶制备糖尿病小鼠模型, 以消渴丸作为阳性药参照, 研究长柄侧耳胞外多糖PSEPS2-A对实验性糖尿病小鼠血糖的影响。实验结果表明, PSEPS2-A对四氧嘧啶所致胰岛素依赖型糖尿病小鼠血糖升高有显著的抑制作用, 糖耐量实验表明PSEPS2-A能显著提高糖尿病小鼠葡萄糖耐受能力, 能较快地抑制餐后血糖的上升, 这可能是由于PSEPS2-A可以减弱四氧嘧啶对胰岛β细胞的损伤、增加胰岛素的分泌, 从而发挥降糖及改善糖耐量作用所致; 给药组小鼠体质量回升明显, 肝脏指数和肾脏指数均有一定程度的降低, 说明PSEPS2-A可能对糖尿病导致的肝脏、肾脏肿大较好的恢复能力; 给药组的肝糖原水平有明显增高, 表明PSEPS2-A能促进血糖进入肝脏, 使肝糖原合成增加; 以上各项指标存在一定的剂量依赖关系, 而且PSEPS2-A的治疗疗效都要稍好于消渴丸的治疗疗效。

综上所述, 从长柄侧耳液体发酵液中分离纯化出来的长柄侧耳胞外多糖PSEPS2-A具有调节糖代谢、降低血糖、改善糖尿病症状的作用, 且作用机制是多方面综合影响的, 有继续深入研究的价值。

参考文献:

- [1] 李玉. 药用菌生物学[M]. 长春: 吉林科技出版社, 1996: 61-62.
- [2] 汪麟, 李育岳. 20种食用菌的氨基酸含量分析[J]. 食品科学, 1995, 16(4): 10-12.
- [3] 戴玉成, 周丽伟, 杨祝良, 等. 中国食用菌名录[J]. 菌物学报, 2010, 29(1): 1-21.
- [4] 戴慧, 高晓明. 多糖特异性免疫识别的分子机制及其免疫生物学意义[J]. 中国免疫学杂志, 2009, 25(1): 35-39.
- [5] ESTEBAN A, POPP M W, VK V, et al. Fungal recognition is mediated by the association of dectin-1 and galectin-3 in macrophages[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 2011, 108(34): 14270-14275.
- [6] 兰中芬, 张兆林, 程周权, 等. 红芪多糖成分的分析及其小鼠免疫功能与移植性肿瘤的作用[J]. 中国药理学报, 1987, 8(3): 275-277.
- [7] SONG Qinghua, KOBAYASHI T, XIU Limei, et al. Effects of Astragal root and Hedysari root on the murine B and T cell differentiation[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2000, 73(1/2): 111-119.
- [8] 权菊香, 杜贵友. 黄芪与红芪对脑缺血动物保护作用的研究[J]. 中国中药杂志, 1998, 23(6): 51-53.
- [9] 刘颖, 金宏, 许志勤, 等. 南瓜多糖对糖尿病大鼠血糖和血脂的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2006(3): 358-361.
- [10] 金智生, 李应东, 汝亚琴, 等. 红芪多糖对糖尿病大鼠肾组织匀浆NO、NOS及过氧化脂质的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2004, 11(3): 141-144.
- [11] WANG Junzhi, ITO H, SHIMURA K, et al. Enhancing effect of antitumor polysaccharide from *Astragalus* or *Radix hedysarum* on C3 cleavage production of macrophages in mice[J]. Japanese Journal of Pharmacology, 1989, 51(3): 432-434.
- [12] 肖遐, 吴雄, 何纯莲. 百合多糖对I型糖尿病大鼠降血糖作用[J]. 食品科学, 2014, 35(1): 209-231. doi: 10.7506/spkx1002-6630-201401041.
- [13] 陶美华, 章卫民, 潘清灵, 等. 几种药用真菌粗多糖降血糖作用研究[J]. 食用菌学报, 2009, 16(1): 59-62.
- [14] ASLAN M, ORHAN N, ORHAN D D, et al. Hypoglycemic activity and antioxidant potential of some medicinal plants traditionally used in Turkey for diabetes[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2010, 128(2): 384-389.
- [15] CHEN Xiaoming, JIN Jing, TANG Jia, et al. Extraction, purification, characterization and hypoglycemic activity of a polysaccharide isolated from the root of *Ophiopogon japonicus*[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 83(2): 749-754.
- [16] R A M A C H A N D R A N S , R A J A S E K A R A N A , MANISENTHILKUMAR K T. Investigation of hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant activities of aqueous extract of *Terminalia paniculata* bark in diabetic rats[J]. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2012, 2(4): 262-268.
- [17] 毛勇. 深层发酵双孢菇胞外多糖的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2013: 63-66.
- [18] 谢兆莉. 参芪多糖的开发研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2012: 34-36.
- [19] 齐放, 宋启印, 王淑敏. HPLC法测定长柄侧耳中的洛伐他汀含量[J]. 中国食用菌, 2009, 28(6): 39-40.
- [20] DANG Zilong, FENG Demei, FENG Shilan, et al. Structure and antioxidant activity study of sulfated acetamido-polysaccharide from *Radix Hedysari*[J]. Fitoterapia, 2013, 89: 20-32.
- [21] 党子龙, 刘小花, 封士兰, 等. 红芪多糖HPS4-1A的化学结构特征研究及分子构象初步分析[J]. 中草药, 2013, 44(2): 141-146.
- [22] 齐放. 长柄侧耳的菌种选育、发酵工艺及化学成分的研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2010: 33-35.
- [23] 杨涛, 郭龙, 李灿, 等. 红芪多糖HPS1-D的化学结构和抗补体活性研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(1): 7-11.
- [24] 张秀丽, 杨小明, 何娟, 等. 无花果多糖的部分理化性质研究[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(11): 35-38.
- [25] 赵良功, 李晓东, 赵建辉, 等. 4种红旗多糖对实验性糖尿病血糖的影响[J]. 中药材, 2009, 32(10): 1590-1592.
- [26] 陈建国, 步文磊, 王茵, 等. 桑叶多糖降血糖作用及其机制研究[J]. 中草药, 2011, 42(3): 515-520.
- [27] 郭瑞华, 王慧丽, 翟义, 等. 四氧嘧啶糖尿病模型小鼠糖耐量和肝糖原与大豆胰蛋白酶抑制剂的干预[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(24): 4470-4480.
- [28] NATHAN D M, BUSE J B, DAVIDSON M B, et al. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes[J]. Diabetes Care, 2009, 32(1): 193-203.
- [29] DOMINGUEZ-BENDALA J, INVERARDI L, RICORDI C. Regeneration of pancreatic beta-cell mass for the treatment of diabetes[J]. Expert Opinion on Biological Therapy, 2012, 12(6): 731-741.
- [30] 黄进, 罗琼, 李晓莉, 等. 大豆异黄酮的降血糖作用研究[J]. 食品科学, 2004, 25(1): 166-170.