

铁棍/佛手山药粗多糖的抗糖尿病作用效果比较

蔡羽¹, 植飞^{1,2}, 陈运中^{1*}, 刘思敏¹, 颜春潮¹, 万未希¹, 余雅茹¹, 曾珉¹

(1. 湖北中医药大学药学院, 湖北省中药保健食品工程技术研究中心, 湖北武汉 430065)

(2. 武汉轻工大学生物与制药工程学院, 湖北武汉 430023)

摘要: 该研究为比较铁棍山药粗多糖和佛手山药粗多糖的抗糖尿病作用效果, 测定两种山药粗多糖对 DPPH、PTIO 自由基的清除作用, 对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用和降血糖降血脂作用。建立 2 型糖尿病模型大鼠, 选用二甲双胍作为阳性对照药物。两种山药粗多糖对 DPPH 自由基清除作用的 EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)各为 35.38、16.19 ($p<0.01$), 对 PTIO 自由基清除作用的 EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)各为 7869.17、8335.78 ($p<0.01$), 对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用 (18.85%、15.73%) 无显著差异 ($p>0.05$)。与模型组相比, 铁棍山药粗多糖组的 FBG、TC 与 LDL-C 水平各降低 24.38%、28.44%、44.68% ($p<0.05$, $p<0.01$), 肝糖原含量升高 21.83% ($p<0.05$), CAT 与 GSH-Px 水平各升高 363.36%、43.67% ($p<0.01$); 佛手山药粗多糖组的 FBG、TG、TC 与 LDL-C 水平各下降 25.62%、28.52%、22.79%、44.73% ($p<0.05$, $p<0.01$), SOD 与 CAT 水平各提升 7.22%和 69.76% ($p<0.05$)。结果表明, 两种粗多糖的抗糖尿病作用机制不同。铁棍山药粗多糖在清除 PTIO 自由基、减少肝糖原分解、增强 CAT 和 GSH-Px 活性方面更具优势, 而佛手山药粗多糖则在清除 DPPH 自由基、降低 TG 的含量、增强 SOD 与 CAT 活性方面作用更佳。

关键词: 山药; 粗多糖; 抗氧化活性; α -葡萄糖苷酶; 2 型糖尿病

文章编号: 1673-9078(2022)04-10-18

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.4.0519

Comparison of the Anti-diabetic Effects of the Crude Polysaccharides from Iron Stick Yam and Bergamot Yam

CAI Yu¹, ZHI Fei^{1,2}, CHEN Yunzhong^{1*}, LIU Simin¹, YAN Chunchao¹, WAN Weixi¹, SHE Yaru¹, ZENG Min¹

(1. College of Pharmacy, Hubei Research Center of Chinese Materia Medica Dietary Supplement Engineering and Technology, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

(2. School of Biological and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

Abstract: In order to compare the antidiabetic effects of the crude polysaccharides of iron stick yam and bergamot yam, the scavenging effects of the two kinds of crude polysaccharides on DPPH and PTIO free radicals, the inhibitory effects on α -glucosidase, and the hypoglycemic and hypolipidemic effects were determined. Type 2 diabetes model rats were established, and metformin was used as the positive control drug. The EC_{50} values ($\mu\text{g/mL}$) of the two kinds of crude polysaccharides were 35.38 and 16.19 for DPPH radical scavenging ($p<0.01$), and 7869.17 and 8335.78 for PTIO radical scavenging ($p<0.01$), respectively, with the inhibition of α -glucosidase (18.85% and 15.73%, respectively) being insignificantly different ($p>0.05$). Compared with the model group, the iron stick yam group had decreased FBG, TC and LDL-C levels (by 24.38%, 28.44% and 44.68%, respectively; $p<0.05$, $p<0.01$), increased liver glycogen content (by 21.83%; $p<0.05$), and increased CAT and GSH-Px levels (by 363.36% and 43.67%, respectively; $p<0.01$). The bergamot yam group had decreased FBG, TG, TC and LDL-C levels (by 25.62%, 28.52%, 22.79% and 44.73%, respectively; $p<0.05$, $p<0.01$), and increased SOD and CAT levels (by 7.22% and 69.76%, respectively; $p<0.05$). The results indicated that the two crude polysaccharides had different antidiabetic mechanisms. The crude

引文格式:

蔡羽,植飞,陈运中,等.铁棍/佛手山药粗多糖的抗糖尿病作用效果比较[J].现代食品科技,2022,38(4):10-18,+215

CAI Yu, ZHI Fei, CHEN Yunzhong, et al. Comparison of the anti-diabetic effects of the crude polysaccharides from iron stick yam and bergamot yam [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(4): 10-18, +215

收稿日期: 2021-05-17

基金项目: 湖北省教育厅科学研究计划项目 (B2020094)

作者简介: 蔡羽 (1987-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 中药复方及物质基础, E-mail: yuca2018@hbtcm.edu.cn

通讯作者: 陈运中 (1962-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 中药复方及物质基础, E-mail: chyzhucm@126.com

polysaccharide from iron stick yam exhibited more advantages in scavenging PTIO radicals, reducing hepatic glycogenolysis, and enhancing CAT and GSH-Px activities, whilst the crude polysaccharide from bergamot yam was more effective in scavenging DPPH radicals, reducing TG content, and enhancing SOD and CAT activities.

Key words: yam; crude polysaccharides; antioxidant activity; α -glucosidase; type II diabetes

2型糖尿病 (Type 2 diabetes, T2DM) 是一种代谢综合症, 目前 T2DM 患者大约占糖尿病患者总人数的 90%^[1], 且比例不断上升。因此, 找到治疗 T2DM 患者的特效药刻不容缓。

目前治疗 T2DM 的药物主要有磺酰脲类、二肽基肽酶IV抑制剂、内酯类、 α -葡萄糖苷酶抑制剂、噻唑烷二酮类、双胍类、胰高血糖素样肽-1、受体激动剂和钠-葡萄糖协同转运蛋白 2 抑制剂等。但这些药物的靶点和通路比较单一, 长期使用会产生不良反应。例如, 长期服用噻唑烷二酮类药物会导致骨折、膀胱癌, 尤其是对于心血管的损害比较严重^[2], 故有些国家禁止使用此类药物。而常用于治疗胰岛素抵抗的双胍类药物会导致胃肠道反应, 同时不耐受双胍类药物的患者不宜使用胰岛素敏化剂治疗。因此, 有必要开发出来自于天然且能够维持等效、副作用较小的抗糖尿病药物^[3]。

从天然植物中提取的功能性多糖易于获得, 价格合理, 作为临床阶段药物对预防并发症也有不可替代的优势。近年来, 天然植物功能性多糖的提取, 以及筛选出治疗糖尿病的有效多糖技术受到越来越广泛的关注^[4]。山药作为中国的一种传统药食同源植物^[5], 块茎常用于治疗食欲不振、慢性腹泻、哮喘、干咳、尿频、尿失禁和糖尿病^[6]。由于山药品种繁多, 生长条件不同, 其结构和生物活性存在较大差异。大量研究表明, 山药多糖是山药增强免疫力、降血糖的主要活性成分, 并具有药理作用^[7-11]。到目前为止, 中国药典所记载的山药多糖的降血糖活性多是来自于铁棍山药, 对于其他来源山药的降血糖活性报道较少, 关于不同品种山药的降血糖活性比较研究报道更少, 而河南省焦作市温县的“铁棍山药”及湖北省武穴市的“佛手山药”均为国家地理标志物, 且两种山药的功能成分含量十分相近^[12,13], 因此, 可合理地推测, 佛手山药多糖的降血糖活性或与铁棍山药相近。本实验通过两种山药粗多糖在体外对自由基的清除作用和对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用, 以及在体内对大鼠血糖、血脂和抗氧化活性的影响, 来比较两者的抗糖尿病作用机制, 为治疗 T2DM 提供更多的候选药物。

1 材料与方法

1.1 实验材料

50 只 2 月龄无特定病原体 (Specific pathogen Free, SPF) 级雄性 SD 大鼠, 体质量 190 g, 购于湖北省疾病预防控制中心, 实验单位使用许可证号为 SYXK (鄂) 2012-0068, 实验动物生产许可证号为 SCXK (鄂) 2015-0018。在治疗期结束时, 用二氧化碳使大鼠安乐死。实验方案经湖北中医药大学动物实验伦理委员会批准。

铁棍山药粗多糖及佛手山药粗多糖均由实验室自制, 铁棍山药和佛手山药分别收集于河南省焦作温县和湖北省武穴市, 由湖北中医药大学药学院胡志刚老师鉴定, 鉴定结果铁棍山药与佛手山药皆为薯蓣科植物薯蓣 *Dioscorea opposita* 的根茎; 单糖标准品 (鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖), 中国食品药品检定研究院; 链脲佐菌素 (Streptozotocin, STZ), 美国 Sigma 公司; 柠檬酸, 天津永大化学试剂有限公司; 柠檬酸三钠, 中南化工试剂有限公司; 盐酸二甲双胍, 深圳海王药业有限公司; 生理盐水, 河南科伦药业有限公司; 肝素钠、牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin, BSA) 均购自国药集团化学试剂有限公司; 胰岛素酶联免疫试剂盒, 武汉基因美科技有限公司; 甘油三酯 (Triglyceride, TG) 试剂盒、总胆固醇 (Total cholesterol, TC) 试剂盒、高密度脂蛋白胆固醇 (High-density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 试剂盒、低密度脂蛋白胆固醇 (Low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 试剂盒、超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD) 试剂盒、过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathione peroxidase, GSH-Px) 试剂盒、肝糖原测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所; 纯水由 Milli-Q 超纯水一体化机制得。

1.2 仪器与设备

AL104 电子天平, 梅特勒-托利多上海有限公司; CR21G II 冷冻高速离心机, 日本 HITACHI 公司; UV-3200 紫外可见分光光度计, 上海美普达仪器有限公司; Nicoletis10 傅里叶红外光谱仪, 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; XW-80A 涡旋混合仪, 江苏海门其林贝尔仪器有限公司; GZX-9146MBE 电热鼓风干燥箱, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; HH-2 数显恒温水浴锅, 国华电器有限公司; 其余仪器为实

实验室常规仪器。

1.3 实验方法

1.3.1 山药粗多糖的制备

将铁棍山药和佛手山药清洗、去皮并在 121 °C 下蒸 30 min 灭酶。在 60 °C 下干燥并研磨，将山药干粉各 1.80 kg 在 60 °C 下用 80% 乙醇提取 3 次，每次 1 h。然后在 60 °C 下用蒸馏水将残留物萃取 3 次，每次 3 h。将水提取物减压浓缩至 1800 mL，与 95% 乙醇 (1:4, V/V) 混合 24 h，以沉淀多糖化合物。收集沉淀，依次用乙醇、丙酮洗涤，在 60 °C 下真空干燥，得到多糖的粗样品：铁棍山药粗多糖的质量为 108 g，佛手山药粗多糖的质量为 82 g。

1.3.2 山药粗多糖的分离纯化

将以热水萃取法 (60 °C) 制得的粗多糖 4 mg 溶解在 2 mL 的 2 mol/L 三氟乙酸于密封试管，在 110 °C 条件下水解 6 h，完成后蒸发多余的酸，再加入 2 mL 甲醇干燥，重复三次，去除三氯乙酸。取水解物 200 μL 与 50 μL 的 2 mol/L 氢氧化钠混合，再加入 50 μL 0.5 mol/L 的 1-苯基-3-甲基-5-吡啶啉酮 (PMP) 甲醇溶液，充分混合后于 70 °C 水浴中浸泡 30 min。冷却后以 50 μL 的 0.3 mol/L 盐酸中和，用水稀释至 1 mL。然后加入 1 mL 氯仿。经过强烈的摇动和分层，将有机相分离去除^[4]。

上述操作重复三次后，将最终得到的溶液注入 HPLC 进行分析。使用 Silgreen ODS C18 (250×4.6 mm, 5 μm)，30 °C，流动相为 20 mm 醋酸铵-乙腈 (78:22, V/V)，流速为 1.0 mL/min^[14]。

将含有七种单糖 (鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖) 的标准溶液同样进行上述处理。得到结果对比后分析山药多糖的单糖组成。

1.3.3 山药粗多糖中总碳水化合物和蛋白质含量的测定

以葡萄糖为标准品，选用苯酚-浓硫酸法估算总糖含量^[15]。在室温下将 1 mL 样品溶液、50 μL 80% 苯酚和 5 mL 浓硫酸充分混匀，5 min 后，于波长 490 nm 处测量吸光度，然后根据葡萄糖的标准曲线进行定量。以 BSA 为标准品，利用 Bradford 方法估算蛋白质的含量^[16]。

1.3.4 山药粗多糖体外抗氧化活性的比较研究

1.3.4.1 清除 DPPH 自由基的能力

用 Gao 等^[17]的研究方法，对山药粗多糖清除 DPPH 自由基的效果进行评估。将粗多糖样品用蒸馏水溶解，配制成 50 mg/mL 的样品溶液，然后分别精

密吸取 0.00、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00 mL 样品溶液于试管中，用蒸馏水补足至 1 mL，加入 1 mL 新制备的 0.10 mmol/L DPPH，震荡摇匀，室温下孵育 30 min，在波长 517 nm 处测量吸光度，0.25 mg/mL 的抗坏血酸 (Vc) 用做阳性对照药。

$$\text{清除率}/\% = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%$$

式中：

A_0 ——无样品溶液时的吸光度；

A_1 ——样品的吸光度。

1.3.4.2 清除 PTIO 自由基的能力

先将山药粗多糖样品用蒸馏水溶解，配制成 50 mg/mL 的样品溶液，然后精密吸取 0.00、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00 mL 样品溶液，用蒸馏水补足至 1 mL，加入 1 mL 新制备的 0.05 mg/mL PTIO，充分混匀，并在 37 °C 下孵育 2 h，随后在波长 557 nm 处测量吸光度，0.25 mg/mL 的 Vc 用做阳性对照药。

$$\text{清除率}/\% = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%$$

式中：

A_0 ——无样品溶液时的吸光度；

A_1 ——样品的吸光度。

1.3.5 山药粗多糖抑制 α -葡萄糖苷酶的活性比较研究

使用李鹏程^[18]的方法，对山药粗多糖抑制 α -葡萄糖苷酶的活性进行测定。将 40 μL 0.10 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH 6.8)、30 μL 1 u/mL 的 α -葡萄糖苷酶溶液 (pH 6.8) 与 30 μL 10 mmol/L 的麦芽糖溶液 (pH 6.8) 混匀，然后精密吸取 40 μL 0.00、0.60、1.30、2.50、5.00、10.00 mg/mL 的样品溶液分别加入其中，并在 37 °C 下孵育 30 min，随后在沸水浴中孵育 5 min 终止反应，冷却至室温，于 5000 r/min 离心 2 min，取 10 μL 上清液用试剂盒测定葡萄糖含量，在波长 505 nm 处测量吸光度，阿卡波糖用做阳性对照药。抑制 α -葡萄糖苷酶的活性计算公式如下：

$$\text{清除率}/\% = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%$$

式中：

A_0 ——无样品溶液时的吸光度；

A_1 ——样品的吸光度。

1.3.6 糖尿病大鼠模型体内降血糖、血脂及抗氧化活性的测定

1.3.6.1 造模方法

大鼠饲养于湖北中医药大学实验动物中心 SPF 级实验动物房，室温 22±2 °C，光/暗周期为 12 h。实验

进行前,所有大鼠均适应性饲养 7 d,实验期间均自由进食、饮水。将大鼠随机分为正常对照组和实验组,正常对照组给予普通饲料,实验组给予高脂饲料(68%的基础饲料,15%的糖,10%的成熟猪油,5%的蛋黄粉,1%的胆固醇和 1%的胆酸钠)。将大鼠饲喂 28 d 后,后续 12 h 禁食(不禁水),实验组大鼠腹腔注射 1% STZ 溶液 40 mg/kg,正常对照组腹腔注射等剂量柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。注射后使大鼠饥饿 3 h,然后给予 3%葡萄糖溶液以防止低血糖。3 d 后,将大鼠禁食(不禁水) 12 h,测量空腹血糖浓度、空腹胰岛素(Fasting serum insulin, FINS)活力。计算胰岛素敏感指数(Insulin sensitivity index, ISI)的公式为:

$$ISI = \ln \left(\frac{1}{FINS \text{ 活力} \times FBG \text{ 浓度}} \right)$$

FBG 超过 11.10 mmol/L 且 ISI 显著降低并保持稳定水平两周的大鼠被认为是成功模型,然后纳入本实验。

1.3.6.2 分组与给药

将造模成功的大鼠随机分为模型组、二甲双胍组、铁棍山药粗多糖组和佛手山药粗多糖组,另取空白鼠设为正常组,每组均为 8 只。二甲双胍组用药剂量为 150 mg/(kg·d),铁棍山药粗多糖组和佛手山药粗多糖组用药剂量为 400 mg/(kg·d),给药体积均为 1 mL/100 g,正常组和模型组给予等体积的 0.90%生理盐水,连续灌胃 6 周。

1.3.6.3 体重和空腹血糖的测定

每两周记录体重并测定血糖浓度。

1.3.6.4 口服葡萄糖耐量试验(Oral glucose tolerance test, OGTT)

给药第 35 d,进行口服葡萄糖耐量试验。大鼠经 12 h 禁食后,将 1 g/kg b.w.葡萄糖灌胃后,分别在 0、30、60、90 min 用血糖仪测定尾静脉血糖含量。

1.3.6.5 检测样品的制备

治疗结束后,大鼠眼球取血,于 4000 r/min、4 °C 离心 10 min 得到血清,分装后于 -20 °C 冷冻备存。

1.3.6.6 肝糖原含量的测定

按肝糖原测定试剂盒方法检测。

1.3.6.7 TG、TC、HDL-C 和 LDL-C 的含量测定

按相应试剂盒方法检测。

1.3.6.8 SOD、CAT 和 GSH-Px 的活性测定

按相应试剂盒方法检测。

1.4 统计分析

处理实验数据选用 IBM SPSS Statistics 19 统计软件。计量资料用均量±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。为了进行多次比较,使用了单向方差分析,并进行了 Tukey 检验;为了比较两组之间的差异,使用了 *t* 检验。当 $p < 0.05$ 时,数值被认为具有统计学意义($p < 0.05$, 差异显著; $p < 0.01$, 差异极显著)。

2 结果与讨论

2.1 铁棍山药和佛手山药粗多糖的多糖与蛋白质含量

如表 1 所示,铁棍山药粗多糖和佛手山药粗多糖的主要成分是多糖,多糖含量分别为 61.34%、40.95%,可溶性蛋白含量分别为 4.62%、14.55%。铁棍山药粗多糖中的多糖含量高于佛手山药粗多糖($p < 0.01$),而总蛋白含量低于佛手山药粗多糖($p < 0.01$)。佛手山药与铁棍山药粗多糖中多糖含量较低的原因可能为提取方法尚未完善所致,而多糖确为山药的主要活性成分^[4]。佛手山药与铁棍山药的可溶性蛋白含量差异可能是由于品种不同所致。

表 1 铁棍山药粗多糖和佛手山药粗多糖的多糖与蛋白质含量测定

Table 1 Determination of polysaccharides and protein contents of crude polysaccharides of iron stick yam and bergamot yam

品种	多糖/%	可溶性蛋白/%
铁棍山药	61.34±0.32	4.62±0.37
佛手山药	40.95±0.25 ^a	14.55±0.52 ^a

注:右肩角标表示与铁棍山药组相比具有极显著差异($p < 0.01$)。

2.2 铁棍山药和佛手山药粗多糖中单糖的组成

如表 2 所示,铁棍山药和佛手山药粗多糖中单糖的主要组成为葡萄糖,含量分别为 73.88 mol%、60.79 mol%。其中佛手山药多糖中葡萄糖、半乳糖及半乳糖醛酸的含量显著低于铁棍山药多糖($p < 0.05$),鼠李糖、木糖、阿拉伯糖及葡萄糖醛酸的含量显著高于铁棍山药多糖($p < 0.05$)。有研究提示,阿拉伯糖的长期干预可以有效缓解 T2DM 大鼠的葡萄糖耐量受损^[19],木糖通过再生受损的胰腺和肝脏组织和调节糖异生过程,有效调节血糖水平,从而在体内发挥抗糖尿病作用^[20]。

表2 铁棍山药和佛手山药粗多糖中单糖的组成 (mol%, n=3)

Table 2 Composition of monosaccharides in crude polysaccharides of iron stick yam and bergamot yam (mol%, n=3)

样品	葡萄糖含量	半乳糖含量	鼠李糖	木糖	阿拉伯糖	葡萄糖醛酸	半乳糖醛酸
铁棍山药粗多糖	73.88±2.32	5.06±0.52	10.43±1.38	3.52±0.32	1.57±0.14	2.21±0.21	2.35±0.24
佛手山药粗多糖	60.79±3.52 ^a	3.89±0.21 ^a	16.25±1.74 ^a	8.04±1.57 ^a	3.51±0.62 ^a	5.54±0.31 ^a	1.21±0.14 ^a

注: 结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。右肩角标表示与铁棍山药粗多糖组相比具有显著差异 ($p<0.05$)。

2.3 山药粗多糖的体外抗氧化活性

研究认为, 2 型糖尿病与机体的氧化应激密切相关。细胞内的自由基可分为两类: 活性氧 (ROS) 和活性氮 (RNS)。ROS 主要包括羟基自由基 (HO·)、过氧化物自由基 (O₂·) 和脂质过氧化物自由基 (LOO·), RNS 主要包括一氧化氮 (NO·)。这些 ROS 和 RNS 在体内积累过多会引起氧化应激和各种病理变化^[21]。当氧化应激发生后, 胰岛 β 细胞容易发生损伤及凋亡, 原因是胰岛 β 细胞中超氧化物歧化酶与抗氧化物的含量相对较低, 且对 RNS 和 ROS 具有高敏感性。并且, 氧化应激与糖尿病微血管病变及大血管病变均紧密相关。综上, 2 型糖尿病的发病与氧化应激密切相关, 在糖尿病的早期、进程及并发症的发生中, 氧化应激都为重要原因之一^[22,23]。RNS 和 ROS 都不稳定, 并且难以直接评估。由于 DPPH 自由基的单电子位于 N 原子上, 说明它是 RNS 而不是 ROS。因此, DPPH 只能用于评估 RNS 清除级别, 而不能用于评估 ROS 清除级别。在本实验中, 将 DPPH 与 PTIO 自由基清除法结合使用来全面地评估山药粗多糖的抗氧化活性。

表 3 说明了山药粗多糖对 DPPH 和 PTIO 自由基的清除作用。两种粗多糖的清除能力与 Vc 的清除能力显著不同 ($p<0.01$), 且两者对于 DPPH 自由基的清除作用均强于 PTIO 自由基 ($p<0.01$)。铁棍山药粗多糖对 DPPH 自由基的清除作用弱于佛手山药粗多糖 ($p<0.01$), 而对 PTIO 自由基的清除作用则强于佛手山药粗多糖 ($p<0.01$)。

表 3 铁棍山药粗多糖和佛手山药粗多糖对 DPPH 和 PTIO 自由基的清除作用

Table 3 Scavenging effects of crude polysaccharides of iron stick yam and bergamot yam on DPPH and PTIO free radicals

项目	DPPH· EC ₅₀ /(μ g/mL)	PTIO· EC ₅₀ /(μ g/mL)
Vc	1.71±0.26	5.62±0.35
铁棍山药粗多糖	35.38±0.66 ^I	7869.17±34.13 ^I
佛手山药粗多糖	16.19±0.75 ^{I II}	8335.78±77.36 ^{I II}

注: 罗马数字 I: 与 Vc 组相比具有极显著差异 ($p<0.01$);

罗马数字 II: 与铁棍山药组相比具有极显著差异 ($p<0.01$)。

2.4 山药粗多糖抑制 α -葡萄糖苷酶的活性

α -葡萄糖苷酶存在于人的肠道中, 可催化含有 α -糖苷键的底物产生葡萄糖, 从而促进碳水化合物的吸收和利用^[24]。 α -葡萄糖苷酶的抑制剂可与 α -葡萄糖苷酶结合, 降低其活性, 延迟或抑制消化道中葡萄糖的吸收, 从而控制餐后血糖浓度^[25]。

铁棍山药粗多糖和佛手山药粗多糖在体外对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用如图 1 所示。阿卡波糖和两种山药粗多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用存在显著差异 ($p<0.01$), 铁棍山药粗多糖和佛手山药粗多糖的抑制率分别为 18.85% 和 15.73%。两种多糖在 0.60~10.00 mg/mL 的范围内无显著差异 ($p>0.05$)。

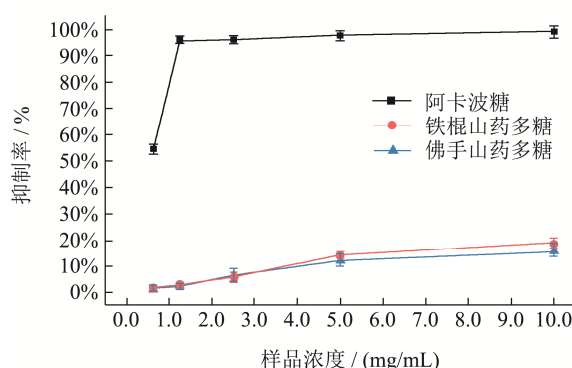


图 1 不同浓度铁棍山药粗多糖和佛手山药粗多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用 (n=3)

Fig.1 Inhibitory effects of crude polysaccharides of iron stick yam and bergamot yam at different concentrations on α -glucosidase (n=3)

2.5 山药粗多糖的体内抗糖尿病作用

2.5.1 糖尿病大鼠模型的建立

正常对照组大鼠强壮、皮毛有光泽、精神状态很好、反应迅速; 而实验组大鼠与正常对照组相比: 瘦弱、皮肤暗沉、气味加重、有“三多”(多饮、多食、多尿) 等典型的糖尿病症状。在腹腔注射 STZ 3 d 后, 正常对照组大鼠体重增加, 但实验组大鼠体重无明显变化。如表 3 所示, 与正常对照组相比, 实验组大鼠的 FBG、FINS 显著增加, 而 ISI 显著降低, 由此说明成功建立了 T2DM 大鼠模型。

表4 建立 T2DM 模型后大鼠的 FBG、FINS 与 ISI 测定

Table 4 Determination of FBG, FINS and ISI contents after establishing the T2DM model

组别	n	FBG/(mmol/L)	FINS/(mU/L)	ISI
正常对照组	8	6.04±0.74	6.20±0.35	-3.62±0.10
实验组	40	18.16±1.92 ^I	10.47±1.25 ^I	-5.24±0.15 ^a

注: 小写字母 a: 与对照组相比具有显著性差异 ($p < 0.05$);

罗马数字 I: 与对照组相比具有极显著性差异 ($p < 0.01$)。

2.5.2 铁棍山药粗多糖和佛手山药粗多糖对 T2DM 大鼠体重的影响

如图 2 所示, 给药结束时, 与正常组相比, 模型组、二甲双胍组、铁棍山药粗多糖组和佛手山药粗多糖组的体重显著降低 ($p < 0.01$), 且这 4 组的体重差异不显著 ($p > 0.05$)。

2.5.3 铁棍山药粗多糖和佛手山药粗多糖对 T2DM 大鼠空腹血糖的影响

如表 5 所示, 给药前, 与正常组相比, 模型组、二甲双胍组、铁棍山药粗多糖组及佛手山药粗多糖组的空腹血糖值均极显著上升 ($p < 0.01$)。给药结束后, 二甲双胍组、铁棍山药粗多糖组和佛手山药粗多糖组空腹血糖较模型组分别下降 49.59%、24.38% 和 25.62%, 有显著差异 ($p < 0.01$, $p < 0.05$), 且二组间无

表 5 铁棍山药粗多糖和佛手山药粗多糖 T2DM 大鼠空腹血糖的影响 (mmol/L)

Table 5 Effects of Tiegun DOTPs and Foshou DOTPs on the FBG of diabetic rats (mmol/L)

组别	0 day	14 days	28 days	42 days
正常组	6.23±0.64	6.12±0.53	5.83±0.34	5.73±0.63
模型组	18.22±1.93 ^I	20.01±2.54 ^I	22.54±2.74 ^I	24.23±2.44 ^I
二甲双胍组	17.65±2.66 ^I	16.23±2.45	13.53±2.12	12.23±2.15 ^{II}
铁棍山药粗多糖组	17.44±2.23 ^I	18.62±2.63	18.13±2.72	18.32±2.23 ^a
佛手山药粗多糖组	17.42±2.35 ^I	18.54±2.55	18.22±2.92	18.02±2.73 ^a

注: 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 小写字母 a: 与模型组相比具有显著性差异 ($p < 0.05$); 罗马数字 I: 与正常组相比具有极显著性差异 ($p < 0.01$); 罗马数字 II: 与模型组相比具有极显著性差异 ($p < 0.01$)。表 6 同。

表 6 铁棍山药粗多糖和佛手山药粗多糖对糖尿病大鼠口服糖耐量的影响 (mmol/L)

Table 6 Effects of Tiegun DOTPs and Foshou DOTPs on the OGTT of T2DM rats (mmol/L)

组别	0 min	30 min	60 min	90 min
正常组	6.13±1.23	11.26±1.54	8.83±1.32	7.23±1.36
模型组	23.34±2.34 ^I	33.12±0.83 ^I	32.54±2.15 ^I	28.23±1.73 ^I
二甲双胍组	13.23±2.73 ^{II}	29.64±1.86 ^{aII}	22.92±2.83 ^{II}	21.45±2.46 ^{II}
铁棍山药粗多糖组	18.43±2.62 ^{aII}	27.34±2.45 ^{aII}	24.46±2.67 ^{II}	20.12±2.13 ^{II}
佛手山药粗多糖组	18.15±2.57 ^{aII}	28.46±1.94 ^{aII}	25.92±2.33 ^{II}	22.72±2.23 ^{II}

2.5.4 铁棍山药粗多糖和佛手山药粗多糖对糖尿病大鼠口服糖耐量的影响

如表 6 所示, 与正常组大鼠相比, 模型组、二甲双胍组、铁棍山药粗多糖组和佛手山药粗多糖组大鼠的血糖值在 0、30、60、90 min 均极显著增加 ($p < 0.01$),

显著差异 ($p > 0.05$); 与二甲双胍组相比, 铁棍山药粗多糖组及佛手山药粗多糖组无显著差异 ($p > 0.05$)。以上结果表明, 铁棍山药粗多糖与佛手山药粗多糖均能降低 T2DM 大鼠空腹血糖值, 且效果相近。Li 等人^[26]的研究证明, 山药多糖的降血糖作用与 1→3 糖苷键有关, 同时最终消化产物形成短链寡糖, 有利于有益肠道细菌的生长。

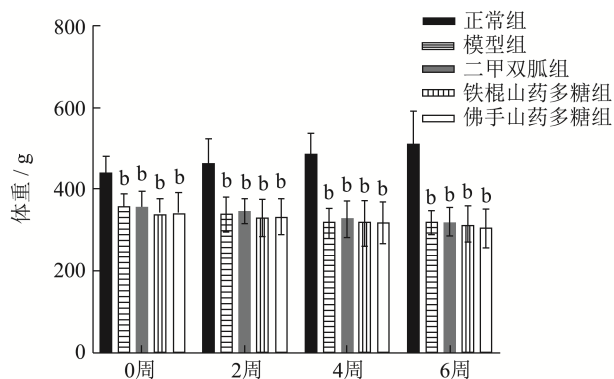


图 2 铁棍山药粗多糖和佛手山药粗多糖对 T2DM 大鼠体重的影响

Fig.2 Effects of crude polysaccharides of iron stick yam and bergamot yam on weight of T2DM rats

注: 图中字母 b 表示与正常组相比, $p < 0.01$ 。

表明糖尿病大鼠出现明显的葡萄糖耐量受损。与模型组大鼠相比, 二甲双胍组、铁棍山药粗多糖组和佛手山药粗多糖组大鼠的血糖值于 30 min 分别下降 10.6%、17.5% 和 14.2%, 有显著差异 ($p < 0.05$); 在 60、90 min 均极显著降低 ($p < 0.01$); 二甲双胍组、铁

棍山药粗多糖组和佛手山药粗多糖组的血糖值无明显差异 ($p>0.05$)。以上结果提示, 两种山药粗多糖均具有改善 T2DM 大鼠糖耐量受损的作用, 且效果与二甲双胍接近。

2.5.5 铁棍山药粗多糖和佛手山药粗多糖对 T2DM 大鼠肝糖原含量的影响

如表 7 所示, 给药结束后, 铁棍山药粗多糖组与二甲双胍组的肝糖原含量较模型组分别上升 21.83%、14.85%, 具有显著差异 ($p<0.05$); 佛手山药粗多糖组肝糖原含量较正常组下降 10.06%, 具有显著差异 ($p<0.05$), 同时较模型组上升 3.71%, 无显著差异 ($p>0.05$)。可认为铁棍山药粗多糖降低 T2DM 大鼠肝糖原分解的能力强于佛手山药粗多糖, 而与二甲双胍接近。

表 7 铁棍山药粗多糖和佛手山药粗多糖对 T2DM 大鼠肝糖原含量的影响

Table 7 Effects of Tiegun DOTPs and Foshou DOTPs on the hepatic glycogen contents in T2DM rats

组别	肝糖原含量/(mg/g)
正常组	4.97±0.98
模型组	4.31±0.11 ^a
二甲双胍组	4.95±1.11 ^b
铁棍山药粗多糖组	5.25±0.36 ^b
佛手山药粗多糖组	4.47±0.36 ^a

注: 结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。小写字母 a: 与正常组相比具有显著差异 ($p<0.05$); 小写字母 b: 与模型组相比具有显著差异 ($p<0.05$)。

2.5.6 铁棍山药粗多糖和佛手山药粗多糖对 T2DM 大鼠 TG、TC、LDL-C 和 HDL-C 的影响

糖尿病患者常伴有脂质代谢异常的症状, 与胰岛素失调有关, 称为“高脂血症”。糖尿病合并高脂血症导致出现并发症的几率增加, 例如中风、冠心病和肢体坏死, 这些是糖尿病患者致残甚至死亡的主要原因。目前, 改善血脂异常是治疗糖尿病和评价疗效的一种

表 8 铁棍山药粗多糖和佛手山药粗多糖对 T2DM 大鼠 SOD、CAT 及 GSH-Px 活力的影响

Table 8 Effects of crude polysaccharides of iron stick yam and bergamot yam on the activities of SOD, CAT and GSH-Px in T2DM rats

组别	SOD 活力/(U/mL)	CAT 活力/(U/mL)	GSH-Px 活力/(U/mL)
正常组	449.33±21.99	13.87±3.42	576.42±13.37
模型组	388.15±20.23 ^I	4.53±1.91 ^I	338.03±84.16 ^I
二甲双胍组	415.57±16.23 ^a	10.94±2.92 ^a	521.89±40.05 ^{II}
铁棍山药粗多糖组	397.05±11.40	20.99±4.22 ^{II}	485.66±38.84 ^{II}
佛手山药粗多糖组	416.16±16.37 ^a	7.69±3.19 ^{a III}	300.94±29.32

注: 结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。小写字母 a: 与模型组相比具有显著差异 ($p<0.05$); 罗马数字 I: 与正常组相比具有极显著差异 ($p<0.01$); 罗马数字 II: 与模型组相比具有极显著差异 ($p<0.01$); 罗马数字 III: 与铁棍山药粗多糖组相比具有极显著差异 ($p<0.01$)。

方法^[27,28]。

如图 3 所示, 模型组大鼠相对于正常组, TG、TC 和 LDL-C 的含量均升高, HDL-C 的含量降低 ($p<0.01$), 表明模型组大鼠血脂异常。治疗 6 周后, 与模型组相比, 铁棍山药粗多糖组的 TG、TC 和 LDL-C 分别降低了 6.31%、28.44%、44.68%, 佛手山药粗多糖组的 TG、TC 和 LDL-C 分别降低了 28.52%、22.79%、44.73%。铁棍山药粗多糖组和佛手山药粗多糖组的 TG 有显著性差异 ($p<0.05$), 而 TC 和 LDL-C 没有显著性差异 ($p>0.05$)。Cheng 等^[29]的研究证明, 山药多糖能够通过降低 LDL-C 及 TC 的水平减少炎症蛋白产物, 提高胰岛素敏感性来改善肥胖诱导的胰岛素抵抗。

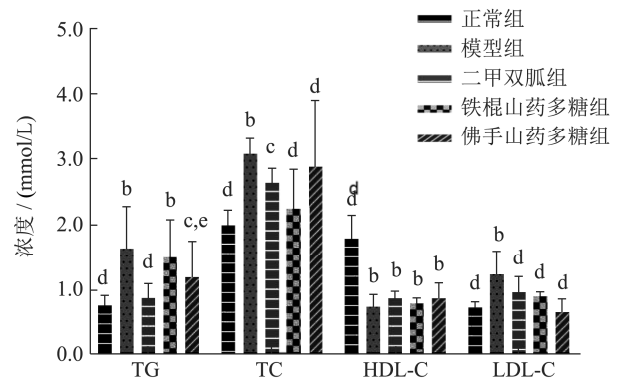


图 3 铁棍山药粗多糖和佛手山药粗多糖对 T2DM 大鼠血脂含量的影响

Fig.3 Effects of crude polysaccharides of iron stick yam and bergamot yam on blood lipid content in T2DM rats

注: b: 与正常组相比, $p<0.01$; c: 与模型组相比, $p<0.05$; d: 与模型组相比, $p<0.01$; e: 与铁棍山药粗多糖组相比, $p<0.05$ 。

2.5.7 铁棍山药粗多糖和佛手山药粗多糖对 T2DM 大鼠氧化应激的影响

多项研究表明, 组织抗氧化剂与糖尿病的病因密切相关^[30,31]。氧化应激和抗氧化防御系统之间的不平衡会导致细胞和组织损伤, 并加速糖尿病并发症的发生^[32-35]。因而氧化应激是各种干预和治疗协同作用的重点, 抗氧化剂对糖尿病及其并发症的治疗有很大作用^[36]。

如表 8 所示, 模型组大鼠较正常组大鼠, SOD、CAT 和 GSH-Px 活力均显著降低($p<0.01$), 表明 T2DM 大鼠的氧化应激反应表现异常。灌胃 6 周后, 与模型组相比, 铁棍山药粗多糖组大鼠的 CAT 活力增加了 363.36%、且 GSH-Px 活力增加了 43.67% ($p<0.01$), 而佛手山药粗多糖组大鼠的 SOD 和 CAT 水平分别增加了 7.22% 和 69.76% ($p<0.05$)。

3 结论

本研究表明, 尽管两种山药粗多糖均可在一定程度上改善二型糖尿病, 但二者发挥作用的具体机制有所不同。主要差别在于铁棍山药粗多糖在清除 PTIO 自由基 ($EC_{50}=7869.17 \mu\text{g/mL}$)、减少肝糖原分解 (21.83%)、增强 CAT (363.36%) 和 GSH-Px (43.67%) 的活性方面更有优势, 而佛手山药粗多糖则在清除 DPPH 自由基 ($EC_{50}=16.19 \mu\text{g/mL}$)、降低 TG 的含量 (28.52%)、增强 SOD (7.22%) 与 CAT (69.76%) 的活性方面发挥更大作用。由于铁棍山药粗多糖和佛手山药粗多糖潜在的抗糖尿病特性以及在整个实验过程中没有表现出明显的副作用, 因此可以合理地假设这两种山药粗多糖可能是临床上预防和治疗糖尿病的很有希望的候选药物。

参考文献

- [1] Amanda S, Butcher R. Sodium-glucose Co-transporter 2 Inhibitors for the Treatment of Type 2 Diabetes: a Review of Clinical Effectiveness, Cost-effectiveness, and Guidelines [M]. Ottawa (ON): Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health, 2019
- [2] Nissen S E, Wolski K, 刘少伟. 罗格列酮对心肌梗死风险和心血管性死亡风险的影响[J]. 世界核心医学期刊文摘(心脏病学分册), 2007, 10: 15-16
Nissen S E, Wolski K, LIU Shaowei. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes [J]. Digest of the World Core Medical Journals (Cardiology), 2007, 10: 15-16
- [3] Kumar A, Ilavarasan R, Jayachandran T, et al. Anti-diabetic activity of *Syzygium cumini* and its isolated compound against streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Journal of Medicinal Plants Research, 2008, 2(9): 246-249
- [4] Zhao C, Xia L, Jing M, et al. The effect of different extraction techniques on property and bioactivity of polysaccharides from *Dioscorea hemslleyi* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 102: 847-856
- [5] Guohua Zhao, Jianquan Kan, Zhixiao Li, et al. Structural features and immunological activity of a polysaccharide from *Dioscorea opposita* Thunb roots [J]. Carbohydrate Polymers, 2005, 61(2): 125-131
- [6] Choi Eun Mi, Koo Sung Ja, Hwang Jae-Kwan. Immune cell stimulating activity of mucopolysaccharide isolated from yam (*Dioscorea batatas*) [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2004, 91(1): 1-6
- [7] 赵国华,李志孝,陈宗道. 山药多糖 RDPS-I 组分的纯化及理化性质的研究[J]. 食品与发酵工业, 2002, 9: 1-4
ZHAO Guohua, LI Zhixiao, CHEN Zongdao. Purification and physicochemical properties of RDPS-I fraction of yam polysaccharide [J]. Food and Fermentation Industries, 2002, 9: 1-4
- [8] FAN Yijun, HE Qinyi, LUO Aoshuang, et al. Characterization and antihyperglycemic activity of a polysaccharide from *Dioscorea opposita* Thunb roots [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(3): 6391-6401
- [9] 郜红利,肖本见,梁文梅. 山药多糖对糖尿病小鼠降血糖作用[J]. 中国公共卫生, 2006, 7: 804-805
GAO Hongli, XIAO Benjian, LIANG Wenmei. Hypoglycemic effect of yam polysaccharide on diabetic mice [J]. Chinese Journal of Public Health, 2006, 7: 804-805
- [10] 朱明磊,唐微,官守涛. 山药多糖对糖尿病小鼠降血糖作用的实验研究[J]. 现代预防医学, 2010, 37(8): 1524-1527
ZHU Minglei, TANG Wei, GUAN Shoutao. Experimental study on the effect of yam polysaccharide on diabetic mice [J]. Modern Preventive Medicine, 2010, 37(8): 1524-1527
- [11] 王瑞娇,马凡怡. 山药多糖的研究进展[J]. 化学研究, 2019, 30(5): 547-550
WANG Ruijiao, MA Fanyi. Current study on the polysaccharides from *Dioscorea opposita* Thunb [J]. Chemical Research, 2019, 30(5): 547-550
- [12] 黄梦甜,胡安阳,张正茂,等. 不同产地山药功能成分的比较[J]. 湖北工程学院学报, 2018, 38(6): 30-34
HUANG Mengtian, HU Anyang, ZHANG Zhengmao, et al. Comparison of functional components of yam from different origins [J]. Journal of Hubei Engineering University, 2018, 38(6): 30-34
- [13] 关倩倩,宗爱珍,祁瑜婷,等. 基于主成分分析的糖尿病专用山药品种筛选[J]. 食品工业科技, 2018, 39(4): 38-43
GUAN Qianqian, ZONG Aizhen, QI Yuting, et al. Cultivars selection of yam for diabetes based on principal component analysis [J]. Science of Technology of Food Industry, 2018, 39(4): 38-43

- [14] Wang H, Zhao J, Li D, et al. Comparison of polysaccharides of *Haliotis discus* Hannai and *Volutharpa ampullacea* Perryi by PMP-HPLC-MS(n) analysis upon acid hydrolysis [J]. Carbohydr Res, 2015, 415: 48-53
- [15] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. Analytical Chemistry, 1956, 28(3): 350-356
- [16] Bradford Marion 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(1-2): 248-254
- [17] Jie Gao, Ting Zhang, Zhengyu Jin, et al. Structural characterization, physicochemical properties and antioxidant activity of polysaccharide from *Lilium lancifolium* Thunb [J]. Food Chemistry, 2015, 169: 430-438
- [18] 李鹏程,朴春红,张岚,等.荞麦壳黄酮提取物对 2 型糖尿病大鼠的血糖改善作用及机制[J].食品科学,2017,38(5):244-250
- LI Pengcheng, PU Chunhong, ZHANG Lan, et al. Anti-diabetic effect and mechanism of flavonoids extracted from buckwheat hulls in type 2 diabetic rats [J]. Food Science, 2017, 38(5): 244-250
- [19] Xin W, Yao X, Yin Y, et al. Effect of L-arabinose on glucose and lipid metabolism in type 2 diabetic rats [J]. Journal of Hygiene Research, 2012, 41(2): 260-259
- [20] Kim E, Kim Y S, Kim K M. D-xylose as a sugar complement regulates blood glucose levels by suppressing phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPCK) in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats and by enhancing glucose uptake *in vitro* [J]. Nutrition Research & Practice, 2016, 10(1): 11-18
- [21] Duan Jinyou, Kasper Dennis L. Oxidative depolymerization of polysaccharides by reactive oxygen/nitrogen species [J]. Glycobiology, 2011, 21(4): 401-409
- [22] 韩永明,张六通,邱幸凡.从热毒论糖尿病的病因病机初探[J].光明中医,2010,25:553-556
- HAN Yongming, ZHANG Liutong, QIU Xingfan. A preliminary investigation on the etiology and pathogenesis of diabetes mellitus from heat toxicity [J]. Guangming TCM, 2010, 25: 553-556
- [23] Nazari M, Hajizadeh M R. The regulatory impacts of *Morus alba* leaf extract on some enzymes involved in glucose metabolism pathways in diabetic rat liver [J]. Clin Lab, 2012, 59(5-6): 497-504
- [24] 李培.山药多糖对 α -葡萄糖苷酶抑制作用动力学研究[J].食品与机械,2016,32(7):14-17
- LI Pei. Kinetics of α -glucosidase inhibition by yam polysaccharides [J]. Food and Machinery, 2016, 32(7): 14-17
- [25] 缪子敬,李志万,周学海,等. α -葡萄糖苷酶抑制剂的研究进展[J].广东化工,2019,46(17):96-97,101
- MIU Zijing, LI Zhiwan, ZHOU Xuehai, et al. Research progress of α -glucosidase inhibitors [J]. Guangdong Chemical Industry, 2019, 46(17): 96-97, 101
- [26] Li Q, Li W, Gao Q, et al. Hypoglycemic effect of Chinese yam (*Dioscorea opposita* Rhizoma) polysaccharide in different structure and molecular weight [J]. Journal of Food Science, 2017, 82: 2487-2494
- [27] 蔡德鸿,张桦.2 型糖尿病血脂紊乱治疗指南[J].继续医学教育,2005,11:30-31
- CAI Dehong, ZHANG Hua. Treatment guide on type 2 diabetes with blood lipid disturbance [J]. Continuing Medical Education, 2005, 11: 30-31
- [28] 张水娇.糖尿病患者脂质代谢紊乱的特点及治疗对策[J].北方药学,2014,11(10):181-182
- ZHANG Shuijiao. Characteristics of lipid metabolism disorders in diabetic patients and treatment countermeasures [J]. Journal of North Pharmacy, 2014, 11(10): 181-182
- [29] Cheng Z, Hu M, Tao J, et al. The protective effects of Chinese yam polysaccharide against obesity-induced insulin resistance [J]. Journal of Functional Foods, 2019, 55: 238-247
- [30] Cronin M T, Telser J, Mazur M, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease [J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2007, 39(1): 44-84
- [31] E Nemes-Nagy, T Szocs-Molnár, I Dunca, et al. Effect of a dietary supplement containing blueberry and sea buckthorn concentrate on antioxidant capacity in type 1 diabetic children [J]. Acta Physiologica Hungarica, 2008, 95(4): 383-393
- [32] Du Y, Miller C M, Kern T S. Hyperglycemia increases mitochondrial superoxide in retina and retinal cells [J]. Free Radical Biology & Medicine, 2003, 35(11): 1491-1499
- [33] 谢飞舟,施冬云,肖玲,等.2 型糖尿病葡萄糖应激与抗氧化代偿的变化[J].复旦学报(医学版),2009,36(1):23-27
- XIE Feizhou, SHI Dongyun, XIAO Ling, et al. Compensatory changes of antioxidant capacity in response to glucose stress in type 2 diabetes mellitus [J]. Fudan University Journal of Medical Sciences, 2009, 36(1): 23-27