

基于斑马鱼生物模型评价青钱柳的降糖作用

刘均, 李强, 谭蓉*

(中华全国供销合作总社杭州茶叶研究院, 浙江省茶资源跨界应用技术重点实验室, 浙江杭州 310016)

摘要: 该研究以 5 dpf 斑马鱼为对象, 系统研究了其对葡萄糖 (GLU) 和四氧嘧啶 (ALX) 耐受性的影响, 研究了 GLU 与 ALX 联合建立糖尿病斑马鱼生物模型的可行性和有效性。以此为基础, 研究了斑马鱼对青钱柳 (CP) 的耐受性并指导开展了 CP 的降糖作用评价。结果发现, 以 10 mg/mL GLU 与 3.60 或 7.20 $\mu\text{g/mL}$ ALX 联合诱导 24 h, 可显著增加斑马鱼 GLU 值, 分别增加了 51.52% ($p < 0.05$) 和 68.32% ($p < 0.05$)。经 200、400 和 800 $\mu\text{g/mL}$ 阿卡波糖治疗处理后斑马鱼 GLU 值分别降低了 27.28%、33.69% 和 38.75%, 差异均显著 ($p < 0.05$), 表明以 10 mg/mL GLU 与 3.60 $\mu\text{g/mL}$ ALX 联合孵育 24 h 可以有效建立糖尿病斑马鱼模型。另外, 研究发现, 400 和 800 $\mu\text{g/mL}$ CP 可以显著降低 10 mg/mL GLU 溶液诱导的斑马鱼 GLU 值, 分别降低了 37.59% ($p < 0.05$) 和 38.57% ($p < 0.05$); 200、400 和 800 $\mu\text{g/mL}$ CP 可以显著降低糖尿病斑马鱼 GLU 值, 分别降低了 27.43%、32.75% 和 29.20%, 差异均显著 ($p < 0.05$)。结果表明, 基于正常生理和病理生理的斑马鱼生物模型评价, CP 具有明显的降糖效应, 其在辅助降糖功能饮品开发上具有广阔的应用前景。

关键词: 斑马鱼; 糖尿病; 青钱柳; 降糖作用; 耐受性

文章编号: 1673-9078(2022)05-1-7

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.5.0733

Evaluation of the Hypoglycemic Effects of *Cyclocarya paliurus* Based on a Zebrafish Biological Model

LIU Jun, LI Qiang, TAN Rong*

(Hangzhou Tea Research Institute of China Coop, Zhejiang Key Laboratory of Transboundary Applied Technology for Tea Resources, Hangzhou 310016, China)

Abstract: In this study, 5 dpf zebrafish was used to investigate systematically zebrafish's tolerance to glucose (GLU) and alloxan (ALX). Then, the feasibility and effectiveness of using the combination of GLU and ALX to establish a biological model of diabetic zebrafish were evaluated. On this basis, the tolerance of zebrafish to *Cyclocarya paliurus* (CP) was examined, and the evaluation of the hypoglycemic effect of CP was conducted. The results showed that the induction with the combination of 10 mg/mL GLU and 3.60 or 7.20 $\mu\text{g/mL}$ ALX for 24 h could significantly increase the GLU levels by 51.52% ($p < 0.05$) and 68.32% ($p < 0.05$), respectively. The treatments with 200, 400 and 800 $\mu\text{g/mL}$ acarbose decreased the GLU levels of zebrafish by 27.28% ($p < 0.05$), 33.69% ($p < 0.05$) and 38.75% ($p < 0.05$), respectively, suggesting that the 24 h treatment with the combination of 10 mg/mL GLU and 3.60 $\mu\text{g/mL}$ ALX could effectively establish diabetic zebrafish model. In addition, the research revealed that 400 and 800 $\mu\text{g/mL}$ CP treatments could significantly decrease the GLU levels of 10 mg/mL GLU solution-treated zebrafish by 37.59% ($p < 0.05$) and 38.57% ($p < 0.05$), respectively. The treatments with 200, 400 and 800 $\mu\text{g/mL}$ CP could significantly decrease the GLU levels by 27.43%, 32.75% ($p < 0.05$) and 29.20% ($p < 0.05$), respectively, in diabetic zebrafish. The results showed CP had obvious hypoglycemic effect, based on the evaluation of zebrafish with normal physiology and pathogenetic zebrafish. CP has a broad application prospect in the development of auxiliary hypoglycemic functional drinks.

Key words: zebrafish; diabetes; *Cyclocarya paliurus*; hypoglycemic effects; tolerance

引文格式:

刘均, 李强, 谭蓉. 基于斑马鱼生物模型评价青钱柳的降糖作用[J]. 现代食品科技, 2022, 38(5): 1-7, +164

LIU Jun, LI Qiang, TAN Rong. Evaluation of the hypoglycemic effects of *Cyclocarya paliurus* based on a zebrafish biological model [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(5): 1-7, +164

收稿日期: 2021-07-14

基金项目: 浙江省公益基础研究农业项目 (LGN18C200010)

作者简介: 刘均 (1990-), 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 茶及代用茶资源开发、应用及功能评价, E-mail: hcyljujun888@163.com

通讯作者: 谭蓉 (1982-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 茶及代用茶资源综合利用与开发, E-mail: trfish211@126.com

斑马鱼 (Zebrafish) 是一种脊椎模式生物, 与人类基因具有高度相似性, 同时具有个体小、发育周期短、实验周期短、费用低、单次产卵数较高、实验用药量小等显著优势, 已成为生命科学研究的新宠, 并广泛用于构建人类的各种疾病和肿瘤模型, 建立药物筛选和治疗的研究平台。利用斑马鱼构建的人类疾病模型, 属于从事在体研究, 可以作为连接非脊椎动物 (细胞等) 和哺乳动物 (大小鼠等) 实验之间的巨大生物学断层, 完善现有药物研发体系。截止目前, 以斑马鱼为对象, 可以成功构建糖尿病^[1,2]、高血脂^[3,4]、高尿酸症^[5,6]、失眠^[7,8]等生物模型, 并可以有效开展靶向药物筛选以及药物安全与毒理评价研究。在糖尿病斑马鱼模型建立方面, 目前主要以斑马鱼成鱼为主, 如采用腹腔注射四氧嘧啶 (Alloxan, ALX) 或链脲佐菌素^[9,10], 或采用 ALX 与高糖溶液联合诱导^[11], 又或者采用过度饲喂法^[12]建立糖尿病模型。Shin 等^[11]以斑马鱼成鱼为对象, 研究不同浓度 ALX (1、2、3、4 mg/mL) 溶液孵育不同时间 (10、20、30 min), 以及研究不同浓度葡萄糖 (GLU, 1%、2%、3%) 溶液孵育不同时间 (30 min, 1、2、3 h) 对血糖的影响, 最终认为先以 3 mg/mL ALX 溶液诱导 30 min, 再用 1% GLU 溶液孵育 30 min, 最后在水溶液中孵育 1 h 可以诱导建立斑马鱼高血糖模型。Zang 等^[12]以 4~6 月龄斑马鱼成鱼为对象, 采用过度饲喂法, 探讨建立 2 型糖尿病斑马鱼生物模型。研究发现, 相比每天喂食 1 次, 采用过度饲喂法每天喂食 6 次的鱼空腹血糖水平显著增加, 并且经腹腔和口服糖耐量试验结果表明过度饲喂法下斑马鱼出现糖耐量受损, 而且经抗糖尿病治疗药物二甲双胍和格列美脲治疗具有降糖效用, 表明以此方式可以建立 2 型糖尿病斑马鱼模型。但是, 目前以斑马鱼幼鱼为对象, 开展糖尿病斑马鱼生物模型构建方面的研究报道还较为鲜见。

青钱柳 (*Cyclocarya paliurus*, CP) 属于胡桃科、青钱柳属植物, 同时也属于古老珍稀树种, 仅存于中国, 科学研究表明 CP 具有显著降血糖的功能特性^[13-15]。因此, 本文以 5 dpf (days post fertilization) 斑马鱼为对象, 采用单糖 GLU 单独或与 ALX 诱导药物联合建立基于正常生理和病理生理的糖代谢异常斑马鱼生物模型, 并以此模型为基础开展 CP 降糖作用评价, 为健康功能饮品开发提供基础理论和基础数据支撑, 同时也为高通量斑马鱼降糖药物筛选及复方产品开发提供多方案参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要仪器及试剂

Multiskan SkyHigh 酶标仪, 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; GLU 检测试剂盒 (GLU 氧化酶法), 南京建成生物工程研究所; 全自动智能型生化 (霉菌) 培养箱, 天津市宏诺仪器有限公司; 3K1S 离心机, 德国 sigma 离心机公司; AL-204 精密电子天平, 梅特勒-托利多国际贸易 (上海) 有限公司; MY-20 手持式高速匀浆机, 上海净信实业发展有限公司; 水浴锅, 上海精宏实验设备有限公司。

GLU (国药集团化学试剂有限公司): 10 mg/mL 溶液制备, 称取 1.00 g GLU 于烧杯中, 加入蒸馏水搅拌溶解并定容至 100 mL 容量瓶中, 冷藏备用。

ALX (CAS 号: 2244-11-3, 纯度≥98.0%): 144 μg/mL ALX 母液制备, 称量 0.0144 g ALX 于烧杯中, 加入蒸馏水搅拌溶解并定容于 100 mL 容量瓶中, 冷藏备用。准确量取 0、1.25、2.50、5.00、10.00、12.50、25.00、50.00 mL 上述 144 μg/mL ALX 母液, 加蒸馏水定容至 50 mL, 分别制成 0、3.60、7.20、14.40、28.80、36.00、72.00 μg/mL 的 ALX 溶液, 用于斑马鱼对 ALX 药物耐受性的影响研究。

青钱柳 (CP, 文成县泉山中药材种植有限公司): 50 mg/mL CP (以生药量计) 贮备液制备, 称取 5 g CP 于烧杯中, 在 80 °C 恒温水浴锅中浸提 3 次, 每次浸提 30 min, 合并滤液并定容至 100 mL 制得 50 mg/mL CP (以生药量计) 储备液, 保存于 4 °C 冷藏备用。准确量取 0、0.025、0.050、0.10、0.20、0.40、0.80、1.00、2.00、4.00、8.00 和 10.00 mL 上述 CP 储备液, 加蒸馏水定容至 50 mL, 分别制成 0、25、50、100、200、400、800、1000、2000、4000、8000、10000 μg/mL 的 CP 溶液, 用于开展斑马鱼对不同浓度 CP 溶液耐受性的影响研究。

阿卡波糖 (Acarbose, ACA, 拜耳医药保健有限公司): 50 mg/mL ACA (以生药量计) 贮备液制备, 称取 5 g ACA 于烧杯中, 加入蒸馏水搅拌溶解过滤后定容至 100 mL 制得 50 mg/mL ACA (以生药量计) 储备液, 保存于 4 °C 冷藏备用。准确量取 0.20、0.40、0.80 mL 上述 ACA 储备液, 加蒸馏水定容至 50 mL, 分别制成 200、400、800 μg/mL 的 ACA 溶液, 用于开展降糖功效评价研究。三卡因甲磺酸 (CAS 号: 886-86-2), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 磷酸缓冲盐溶液 (pH 7.02), 南京建成生物工程研究所。

1.1.2 实验动物

斑马鱼(3月龄, AB型), 上海费曦生物科技有限公司。斑马鱼胚胎的繁殖以自然交配方式进行。每个产卵盒中按1:1放入公鱼和母鱼, 放入28.5℃恒温培养箱中, 光照设置为14h光照和10h黑暗, 于第二天上午收集胚胎, 去除死卵和粪便, 清洗后换孵育水(60 μg/mL海盐水), 置于28.5℃恒温培养箱中孵育, 每24h换水一次, 去掉卵膜和死卵。实验完成后, 用0.017%三卡因甲磺酸暴露将斑马鱼麻醉处死。

1.2 实验方法

1.2.1 斑马鱼对GLU和ALX的耐受性分析研究

本研究拟以GLU单独或者与ALX联用建立糖代谢异常斑马鱼(幼鱼)模型, 因幼鱼对GLU与ALX的耐药性的影响尚无参考依据, 故开展斑马鱼幼鱼对GLU与ALX耐受性的影响研究, 为下一步建模方案提供基础信息。(1) 斑马鱼幼鱼对GLU耐受性影响: 将5 dpf野生型AB系斑马鱼随机分为6组, 每组3个重复, 每个重复30条, 分别给予0、10、20、40、80、100 mg/mL GLU溶液;(2) 斑马鱼幼鱼对ALX耐受性影响: 将5 dpf野生型AB系斑马鱼随机分为7组, 每组3个重复, 每个重复45条, 分别给予0、3.60、7.20、14.40、28.80、36.00、72.00 μg/mL溶液。培养24h记录死亡数量计算死亡率, 探讨斑马鱼对GLU和ALX耐受性的影响并指导开展糖尿病斑马鱼建模方案研究。

1.2.2 GLU与ALX联合建立糖尿病斑马鱼模型可行性及有效性分析

1.2.2.1 糖尿病斑马鱼建模可行性研究

基于上述斑马鱼对GLU和ALX耐受性的影响结果, 优选10 mg/mL GLU与3.60或7.20 μg/mL药物组合开展糖尿病斑马鱼(幼鱼)建模方案研究。将5 dpf野生型AB系斑马鱼随机分为4组, 分别记为BC1、BC2、MC1、MC2, 每组3个重复, 每个重复20条, 分别给予0 mg/mL GLU+0.00 μg/mL、10 mg/mL GLU+0.00 μg/mL、10 mg/mL GLU+3.60 μg/mL、10 mg/mL GLU+7.20 μg/mL溶液, 每孔加药物8 mL, 培养24h, 取9条用于测定GLU含量, 探究GLU与ALX联合建立糖尿病斑马鱼模型的可行性。

1.2.2.2 糖尿病斑马鱼建模有效性分析

ACA是常见的糖尿病治疗药物, 因此选用ACA干预以评价糖尿病建模方案的有效性。将5 dpf野生型AB系斑马鱼给予10 mg/mL GLU+3.60 μg/mL溶液孵育24h以建立糖尿病模型, 然后随机分为5组, 分别记为MC1、T1、T2、T3, 每组3个重复, 每个重复20条, 分别给予10 mg/mL GLU、10 mg/mL

GLU+200 μg/mL ACA、10 mg/mL GLU+400 μg/mL ACA、10 mg/mL GLU+800 μg/mL ACA溶液, 每孔加药物8 mL。同步设置0 mg/mL GLU孵育48h(孵育24h时换水一次)作为BC1空白对照组。培养结束后, 每个重复取10条用于测定GLU含量, 探究GLU与ALX联合建立糖尿病斑马鱼模型的有效性。

1.2.3 斑马鱼对CP的耐受性分析研究

将5 dpf野生型AB系斑马鱼随机分为12组, 每组3个重复, 每个重复30条, 分别给予0、25、50、100、200、400、800、1000、2000、4000、8000、10000 μg/mL CP溶液(以生药量计), 每孔加药物10 mL, 每24h换水一次, 记录死亡数量, 计算每组死亡率, 优选剂量作为降糖作用评价用剂量浓度。

1.2.4 CP对基于正常生理和病理生理的斑马鱼模型的降糖作用研究

1.2.4.1 CP对高糖诱导正常斑马鱼模型降糖作用的影响

根据斑马鱼对CP的耐受性分析结果, 按照CP的10%~25% LC₅₀推荐可用于降糖作用评估的剂量浓度并对剂量浓度略作调整, 下限调整为200 μg/mL, 并按照倍数关系设置400和800 μg/mL作为梯度设计开展CP降糖作用研究。将5 dpf野生型AB系斑马鱼随机分为5组, 分别记为BC1、BC2、T1、T2、T3, 每组3个重复, 每个重复20条, 分别给予0 mg/mL GLU+0 μg/mL CP、10 mg/mL GLU+0 μg/mL CP、10 mg/mL GLU+200 μg/mL CP、10 mg/mL GLU+400 μg/mL CP、10 mg/mL GLU+800 μg/mL CP溶液, 每孔加药物8 mL, 培养24h, 取10条用于测定GLU含量, 探究CP对高糖诱导斑马鱼模型降糖作用的影响。

1.2.4.2 CP处理对胰岛损伤糖尿病斑马鱼模型降糖作用的影响

将5 dpf野生型AB系斑马鱼, 给予10 mg/mL GLU+3.60 μg/mL联合孵育24h以诱导建立糖尿病模型, 然后随机分成分为5组, 分别记为MC1、T1、T2、T3、T4, 每组3个重复, 每个重复20条, 分别给予10 mg/mL GLU、10 mg/mL GLU+200 μg/mL CP、10 mg/mL GLU+400 μg/mL CP、10 mg/mL GLU+800 μg/mL CP、10 mg/mL GLU+400 μg/mL ACA孵育24h, 每孔加药8 mL。同步设置0 mg/mL GLU、10 mg/mL GLU孵育48h(孵育24h时换水一次)作为空白对照组, 分别记为BC1和BC2。培养结束后, 每个重复取10条鱼用于测定GLU含量, 探究CP处理对糖尿病斑马鱼模型降糖作用的影响。

1.3 检测方法

GLU 含量检测按如下步骤进行：取 0.1 mL PBS 缓冲液于装鱼的 1.5 mL 离心管中，采用高速手持式匀浆机匀浆直至鱼体组织裂解充分，然后于 4 °C 下以 2500 r/min 离心 10 min，结束后取上清样 2.5 μL 采用 GLU 检测试剂盒（GLU 氧化酶法）测定 GLU 浓度，其测定程序和方法按照试剂盒说明书规定的步骤进行。

1.4 统计分析

所有试验数据经 Excel 2016 处理后，用 Graphpad Prism 6.0 绘图，并用 SPSS Statistics 17.0 进行单因素方差分析（One-way ANOVA），所有数据均以平均值±标准差呈现，差异显著性采用 Duncan 分析并将进行多重比较， $p < 0.05$ 表示组间差异显著。在药物耐受性分析方面，利用 SPSS 17.0 软件中 PROBIT 程序计算其半数致死浓度（Median lethal concentration, LC_{50} ）。

2 结果与讨论

2.1 斑马鱼对 GLU 和 ALX 的耐受性分析

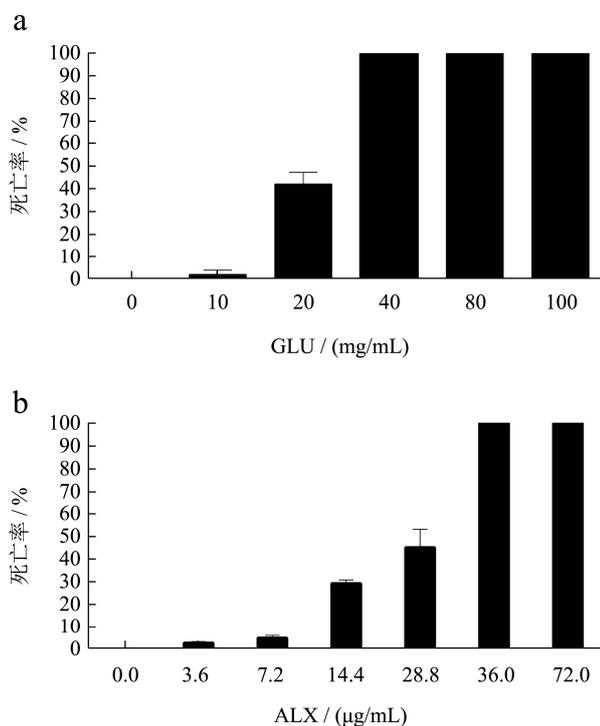


图 1 不同葡萄糖 (a) 和四氧嘧啶 (b) 浓度对斑马鱼死亡率的影响

Fig.1 Effects of different concentrations of glucose (a) and alloxan (b) on the lethality rate of zebrafish

不同浓度 GLU 和 ALX 对斑马鱼死亡率的影响见图 1。从图 1 中可以看出，斑马鱼幼鱼对高浓度 GLU 和 ALX 具有不耐受性，当 GLU 浓度大于等于 40

mg/mL 或 ALX 浓度大于等于 36.00 μg/mL 时死亡率达到 100%。10 mg/mL GLU 处理组死亡率为 2.22%，3.60 和 7.20 μg/mL ALX 处理组死亡率分别为 2.22% 和 4.44%。研究表明，为成功构建基于正常生理和病理生理的糖代谢异常斑马鱼模型，GLU 宜选用剂量浓度为 10 mg/mL，ALX 的宜选用剂量浓度 3.60 和 7.20 μg/mL。

2.2 GLU 与 ALX 联合建立糖尿病斑马鱼模型

性及有效性分析研究

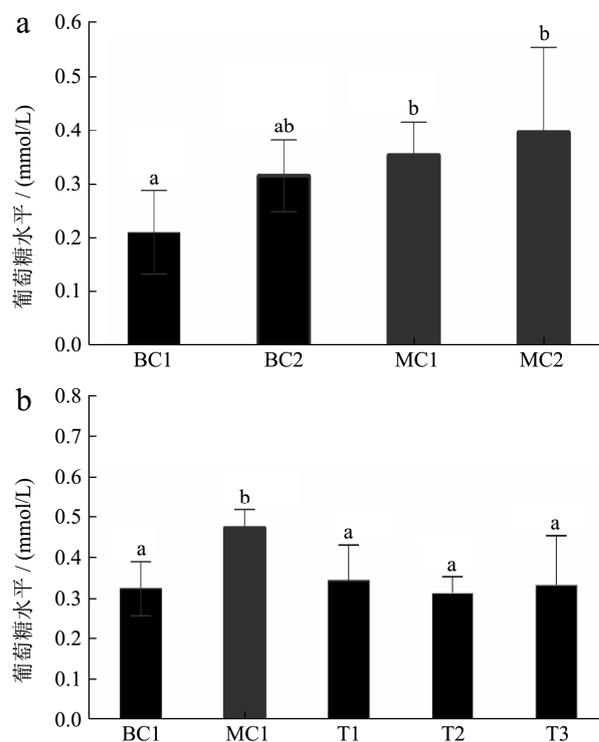


图 2 葡萄糖与四氧嘧啶联合建立糖尿病斑马鱼模型可行性 (a) 和有效性 (b) 分析

Fig.2 Feasibility (a) and effectiveness (b) analysis of glucose and alloxan combined to establish a diabetic zebrafish model

注：柱图上字母不同表示组间差异显著 ($p < 0.05$)，下同。

综合斑马鱼对 GLU 耐受性和 ALX 耐受性特点，选取 10 mg/mL GLU 溶液为糖源，并与 3.60 和 7.20 μg/mL ALX 联合探讨建立糖尿病模型的可行性，结果见图 2a。研究发现，相比 BC1 组，BC2 组斑马鱼组织 GLU 值显著增加，达到 50.19% ($p > 0.05$)，表明以 10 mg/mL GLU 处理可以构建基于生理的糖代谢异常斑马鱼模型。此外，与 BC1 组相比，MC1 和 MC2 组斑马鱼组织 GLU 值显著增加，分别增加了 51.52% 和 68.32%，且差异均显著 ($p < 0.05$)。结果表明，以 10 mg/mL GLU 与 3.60 和 7.20 μg/mL ALX 作为药物联合可以用于构建基于病理的糖尿病斑马鱼模型的预选方

式方法。

基于上述研究, 选用 10 mg/mL GLU 与 3.60 μg/mL 溶液联合建立糖尿病模型并进行模型有效性分析, 结果见图 2b。从图 2b 中可以看出, 与 BC1 组相比, MC1 组斑马鱼 GLU 值显著增加, 达到 46.24% ($p < 0.05$), 再次验证了前期研究结果。与此同时, 从糖尿病治疗药物-ACA 治疗疗效方面看, 相比 MC1 组, T1、T2 和 T3 组斑马鱼 GLU 值显著降低, 分别降低了 27.28%、33.69%和 38.75%, 差异均显著 ($p < 0.05$)。结果显示在该模型下, ACA 降糖效果显著, 表明以此方式诱导建立的糖尿病模型是有效性的。

目前, 以斑马鱼幼鱼为对象构建糖尿病模型还比较鲜见。可查阅对比的是劳乔聪等^[13]的研究, 他们以 4 dpf 斑马鱼为对象, 采用 40 mg/mL 蔗糖作为糖源与 144 μg/mL 联用, 并通过二甲双胍等 4 种常见糖尿病治疗药物进行模型有效性论证, 表示以此方法可以成功并有效建立的糖尿病模型。另外, 劳乔聪^[16]以 4 dpf 斑马鱼对象, 先后在 1.008 mg/mL ALX 与 36 mg/mL GLU 溶液联合下冲击 1 h, 144 μg/mL ALX 与 36 mg/mL GLU 溶液联合下孵育 48 h 可以有效建立斑马鱼糖尿病模型。但与本研究相比, 建模方案有明显差异, 尤其是剂量浓度选用方面差异较大。研究发现随着孵育液中 GLU 剂量浓度的增加致死率明显上升, 可能与试验使用的斑马鱼的品系、养殖体系参数、药物品种品质等不同有关, 其具体的原因还需后续进一步的探索研究。另外, 同采用类似经典的大小鼠糖尿病造模方式相比^[11,12], 本研究以斑马鱼幼鱼为对象构建的糖尿病斑马鱼模型更具有明显的可操作性和便捷性优势, 并且成本更为节约。

2.3 斑马鱼对 CP 的耐受性分析

不同 CP 浓度对斑马鱼幼鱼死亡率的影响见图 3。从图 3 中可以看出, 斑马鱼幼鱼对高浓度 CP 溶液具有不耐受性, CP 浓度大于等于 4000 μg/mL 时死亡率为 100%。另外, 从孵育时间上看, 随着孵育时间的延长死亡率不断增加。以 24 h 基准, 采用 SPSS 中 PROBIT 程序回归分析得出斑马鱼幼鱼的 CP 耐受性 (表 1) Probit 模型: $Probit(p) = -1.26667 + 0.00049x$, 按该模型计算得出 CP 的 LC_{50} 为 2582.82 μg/mL, 95%可

信范围为 2166.95~3149.83 μg/mL。因而, 若按照 CP 的 10%~25% LC_{50} 推荐可用于降糖作用评估的剂量浓度为 258.28~645.71 μg/mL。

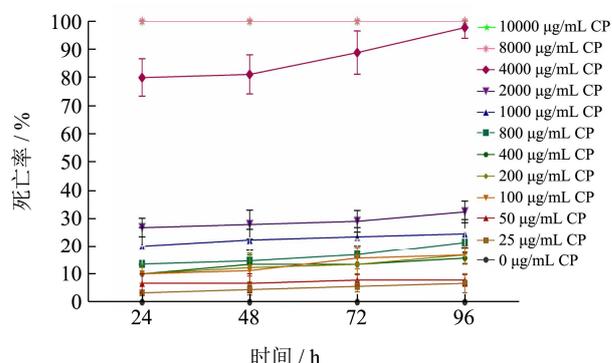


图 3 不同青钱柳浓度及孵育时间对斑马鱼幼鱼死亡率的影响
Fig.3 Effects of different concentrations of *Cyclocarya paliurus* and its incubation time on the lethality rate of zebrafish larvae

2.4 CP 对基于正常生理和病理生理的斑马鱼

模型的降糖作用研究

根据斑马鱼对 CP 耐受性的影响, 按照 CP 的 10%~25% LC_{50} 推荐略作调整, 选用 200、400 和 800 μg/mL 剂量梯度组合开展 CP 降糖作用研究, 其对基于正常生理和病理生理斑马鱼幼鱼 GLU 值的影响见图 4。从图 4a 中可以看出, 相比 BC1 组, BC2 组斑马鱼组织 GLU 值明显增加, 达到 21.70% ($p > 0.05$), 与前期结果一致。另外, 与 BC2 组相比, T1 组对斑马鱼 GLU 含量影响较小, 略微增加了 7.77% ($p > 0.05$), T1 和 T2 组斑马鱼 GLU 值显著降低, 且降低幅度分别达到了 37.59% ($p < 0.05$) 和 38.57% ($p < 0.05$), 表明在正常生理模型下较高浓度的 CP 具有明显的降糖效应。

从图 4b 中可以看出, 相比 BC1 组, 10 mg/mL GLU 诱导 48 h 的 BC2 组斑马鱼 GLU 值显著增加 ($p < 0.05$), MC1 组斑马鱼 GLU 值显著增加 ($p < 0.05$)。相比 MC1 组, T1、T2 和 T3 组斑马鱼 GLU 值显著降低, 分别降低了 27.43%、32.75%和 29.20%, 差异均显著 ($p < 0.05$), 表明在该病理模型下 CP 均表现出了明显的降糖效应 ($p < 0.05$)。

表 1 斑马鱼幼鱼青钱柳耐受性影响的参数估计表

参数	估计	标准误	z	Sig	95%置信区间 (CI)	
					下限	上限
PROBIT 药物浓度	0.00049	0	8.785	0	0	0.001
截距	-1.26667	0.108	-11.765	0	-1.374	-1.159

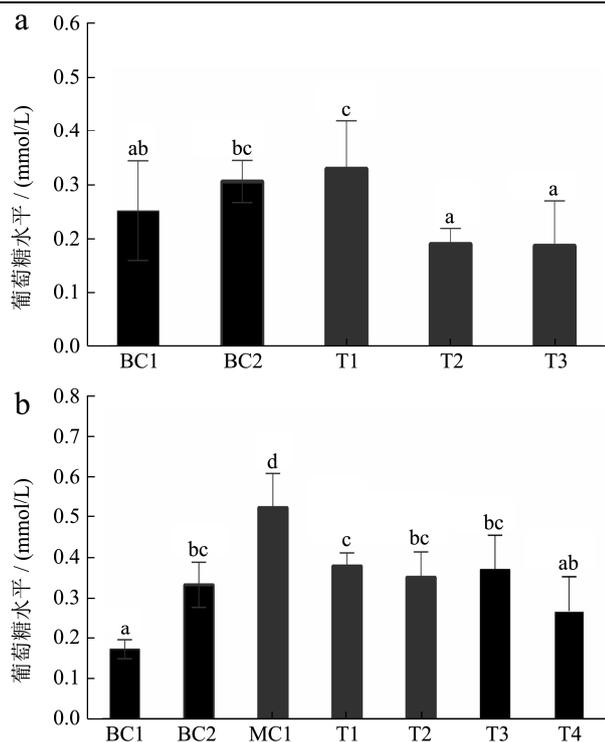


图4 青钱柳对基于正常生理 (a) 和病理生理 (b) 斑马鱼模型降糖作用的影响

Fig.4 Effects of *Cyclocarya paliurus* on lowering the glucose level of normal (a) or diabetic (b) zebrafish larvae

研究发现, 400 和 800 $\mu\text{g/mL}$ CP 可以显著降低 10 mg/mL GLU 诱导的斑马鱼 GLU 值, 以及 200、400 和 800 $\mu\text{g/mL}$ 可以显著降低胰岛损伤型糖尿病斑马鱼 GLU 值, CP 的降糖作用可能与减少 GLU 肠道内吸收, 保护胰腺促进胰岛素分泌^[14], 改善胰岛素敏感性^[15], 增加体内 GLU 的消耗利用^[17-19], 保护并改善肝脏异常代谢^[20,21], 还可能与促进血脂稳定, 增强抗氧化, 保护胰腺等相关^[22-24]。姚骏凯等^[15]研究发现 CP 可以显著降低糖尿病大鼠空腹血糖和胰岛素抵抗指数, 显著增加肝脏磷酸化胰岛素受体底物 1/胰岛素受体底物 1 蛋白比值以及胰岛素受体底物 1 蛋白 mRNA 的表达。姚骏凯等^[14]研究发现 CP 可以降低糖尿病大鼠胰腺可溶性细胞凋亡因子、可溶性细胞凋亡因子配体、活化半胱氨酸蛋白酶 8 含量以及总 c-Jun 氨基端激酶 1 和磷酸化 c-Jun 氨基端激酶 1 的表达量, 表明 CP 降糖效应可能与抑制胰腺 β 细胞凋亡有关。肝脏在糖脂代谢中发挥重要作用。栗静等^[20,21]研究发现 CP 可以通过改善肝脏异常代谢来预防糖尿病^[14,15]。另外, 劳乔聪^[13]等利用斑马鱼模型开展 CP 降糖作用研究时表明 1000 和 2000 $\mu\text{g/mL}$ CP 可以显著降低血糖值, 且降糖效果呈浓度依赖性。因此, 下一步将基于正常生理和病理生理的糖代谢异常模型, 开展 CP 毒理学安全性评价和剂量学估算研究, 尤其是借助斑马鱼幼体

透明和可以进行活体染色的显著优势开展器官毒理损伤作用研究, 靶器官损伤的保护和治疗作用研究, 以及开展复方配伍降糖增效作用研究, 为健康功能食品或饮品开发提供基础理论和基础数据支撑。

3 结论

5 dpf 斑马鱼对高浓度的 GLU、ALX 和 CP 具有不耐受性。相比 0 mg/mL GLU 组, 以 10 mg/mL GLU 与 3.60 或 7.20 $\mu\text{g/mL}$ ALX 联合诱导造模 24 h, 可显著增加斑马鱼 GLU 值, 分别增加了 51.52% ($p < 0.05$) 和 68.32% ($p < 0.05$)。与模型对照组相比, 经 200、400 和 800 $\mu\text{g/mL}$ ACA 治疗评价斑马鱼 GLU 值分别降低了 27.28%、33.69% 和 38.75%, 差异均显著 ($p < 0.05$), 表明以 10 mg/mL GLU 与 3.60 $\mu\text{g/mL}$ ALX 联合孵育 24 h 可以有效建立糖尿病斑马鱼模型。另外, 研究发现, 400 和 800 $\mu\text{g/mL}$ CP 可以显著降低 10 mg/mL GLU 溶液诱导的斑马鱼 GLU 值, 分别降低了 37.59% ($p < 0.05$) 和 38.57% ($p < 0.05$); 200、400 和 800 $\mu\text{g/mL}$ CP 可以显著降低糖尿病斑马鱼 GLU 值, 分别降低了 27.43%、32.75% 和 29.20%, 差异均显著 ($p < 0.05$)。结果表明, 基于正常生理和病理生理的斑马鱼生物模型评价, CP 具有明显的降糖效应, 其在辅助降糖功能饮品开发上具有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] Eunji S. An optimal establishment of an acute hyperglycemia zebrafish model [J]. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2012, 6(42): 2922-2928
- [2] Kinkel M D, Eames S C, Philipson L H, et al. Intraperitoneal injection into adult zebrafish [J]. Journal of Visualized Experiments, 2010, 42(42): e2616
- [3] Zhou J, Xu Y Q, Guo S Y, et al. Rapid analysis of hypolipidemic drugs in a live zebrafish assay [J]. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 2014, 72: 47-52
- [4] 魏华, 岳尚, 陆玲. 刺芹侧耳菌丝体固体发酵多糖在斑马鱼模型上的降血脂活性[J]. 菌物学报, 2019, 37(12): 1771-1779
WEI Hua, YUE Shang, LU Ling. The lipid-lowering effect of *Pleurotus eryngii* mycelium polysaccharides in zebrafish models [J]. Mycosytema, 2019, 37(12): 1771-1779
- [5] Zhang Y, Li Q, Wang F, et al. A zebrafish (*Danio rerio*) model for high-throughput screening food and drugs with uric acid-lowering activity [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2018, 508(2): 494-498
- [6] Marchetti M, Liuzzi A, Fermi B, et al. Catalysis and structure of zebrafish urate oxidase provide insights into the origin of

- hyperuricemia in hominoids [J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 1-13
- [7] 何东方,张丽军,刘梅颜. 药物处理对失眠症斑马鱼睡眠的影响以及相关作用机制[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2017, 3(31):75-79,83
- HE Dongfang, ZHANG Lijun, LIU Meiyun. Influence of drug treatment on sleep in zebra fishes with insomnia and relevant mechanism [J]. Chinese Journal of Evidence-Based Cardiovascular Medicine, 2017, 3(31): 75-79, 83
- [8] 彭超宝,王佳伟,徐福平,等. 桂枝甘草龙骨牡蛎汤类方对斑马鱼睡眠行为的影响[J]. 广东医学, 2018, 39(11):1602-1606
- PENG Chaobao, WANG Jiawei, XU Fuping, et al. Effects of Guizhi Gancao Longgu Muli-like decoctions on the sleep behavior of zebrafishes [J]. Guangdong Medical Journal, 2018, 39(11): 1602-1606
- [9] Intine R V, Olsen A S, Sarras M P. A zebrafish model of diabetes mellitus and metabolic memory [J]. Journal of Visualized Experiments, 2013, 72: e50232
- [10] Olsen A S, Sarras M P, Intine R V. Limb regeneration is impaired in an adult zebrafish model of diabetes mellitus [J]. Wound Repair and Regeneration, 2010, 18: 532-542
- [11] Shin E, Hong B N, Kang T H. An optimal establishment of an acute hyperglycemia zebrafish model [J]. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2012, 6(42): 2922-2928
- [12] Zang L, Shimada Y, Nishimura N. Development of a novel zebrafish model for type 2 diabetes mellitus [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 1-11
- [13] 劳乔聪. 斑马鱼糖尿病模型的建立及在评价青钱柳功效中的应用研究[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2018
- LAO Qiacong. Study on validation of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) iljinskaja in reducing glucose level in diabetic zebrafish model [D]. Hangzhou: Zhejiang Agriculture and Forestry University, 2018
- [14] 姚骏凯,王景霞,高学敏,等. 青钱柳叶水提物对 2 型糖尿病大鼠胰腺 β 细胞凋亡的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2018, 41(8):663-669
- YAO Junkai, WANG Jingxia, GAO Xuemin, et al. Effects of *Cyclocarya paliurus* leaves aqueous extract on pancreatic β cell's apoptosis in type 2 diabetic rats [J]. Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2018, 41(8): 663-669
- [15] 姚骏凯,高学敏,李伟,等. 青钱柳对 T2D 胰岛素抵抗大鼠肝脏氧化应激、炎症反应及 FAS/IRS1 的影响[J]. 环球中医药, 2018, 11(10):7-13
- YAO Junkai, GAO Xuemin, LI Wei, et al. Effects of *Cyclocarya paliurus* on hepatic oxidative stress reaction, inflammation and FAS/IRS1 in rats of type 2 diabetes insulin resisting [J]. Global Traditional Chinese Medicine, 2018, 11(10): 7-13
- [16] 劳乔聪,俞航萍,李春启. 斑马鱼糖尿病模型的建立及应用 [C]// 2015 全国老年痴呆与认知障碍相关疾病学术大会. 2015
- LAO Qiacong, YU Hangping, LI Chunqi. Establishment and application of zebrafish diabetes model [C]// 2015 National Alzheimer's Disease and Cognitive Disorders Related Academic Conference. 2015
- [17] 姚骏凯,高学敏,张建军,等. 青钱柳叶对 2 型糖尿病大鼠骨骼肌炎症反应、胰岛素通路蛋白及糖原合成的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2018, 41(11):928-934
- YAO Junkai, GAO Xuemin, ZHANG Jianjun, et al. Influence of Qingqianliuye (leaf of *Cyclocarya paliurus*) on skeletal muscle inflammatory response, insulin pathway proteins and glycogen synthesis in T2DM rats [J]. Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2018, 41(11): 928-934
- [18] 姚骏凯,高学敏,李伟,等. 青钱柳叶对 2 型糖尿病胰岛素抵抗大鼠骨骼肌 INSR/IRS1/PI3K/GLUT4 通路的影响[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(1):86-90
- YAO Junkai, GAO Xuemin, LI Wei, et al. Effects of *Cyclocarya paliurus* leaves on INSR/IRS1/PI3K/GLUT4 pathway in skeletal muscle of type 2 diabetes mellitus insulin resistance rats [J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2019, 34(1): 86-90
- [19] Zhao L C, Wang X, Li J X, et al. Effect of *Cyclocarya paliurus* on hypoglycemic effect in type 2 diabetic mice [J]. Medical Science Monitor International Medical Journal of Experimental & Clinical Research, 2019, 25: 2976-2983
- [20] 栗静. 青钱柳预防糖尿病的作用机制研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2019
- LI JING. Studies on the mechanism of *Cyclocarya paliurus* in the prevention of diabetes [J]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2019
- [21] Li J, Luo M, Luo Z, et al. Transcriptome profiling reveals the anti-diabetic molecular mechanism of *Cyclocarya paliurus* polysaccharides [J]. Journal of Functional Foods, 2019, 55: 1-8