

白藜中性多糖对2型糖尿病小鼠肠道二糖酶的调节作用

刘悦, 杨慧文, 林榆子, 潘静华, 廖程娟, 潘育方*

(广东药科大学药学院, 广东广州 510006)

摘要: 该研究探讨了白藜中性多糖 ATP1-1 对 2 型糖尿病小鼠肠道二糖酶的调节作用。采用高脂饲料联合链脲佐菌素 (STZ) 诱导 2 型糖尿病小鼠模型, 成模小鼠分为模型组、二甲双胍组 [185 mg/(kg·d)]、ATP1-1 高剂量组 [80 mg/(kg·d)] 及低剂量组 [40 mg/(kg·d)], 另设正常组。连续灌胃给药 8 周, 期间测定小鼠空腹血糖值, 葡萄糖、蔗糖及麦芽糖耐量, 末次给药后测定体内、外二糖酶活性及蔗糖酶-异麦芽糖酶复合物 (Sucrase-Isomaltase, SI)、胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 的 mRNA 表达。结果显示, ATP1-1 高、低剂量组的血糖浓度较模型组分别下降 27.06%、19.96% ($p < 0.01$), 葡萄糖、蔗糖、麦芽糖耐量明显改善 ($p < 0.05$)。体内实验表明, 高剂量 ATP1-1 对十二指肠、空肠、回肠的蔗糖酶抑制率分别为 48.29%、75.09%、31.41%; 对麦芽糖酶抑制率分别为 26.23%、18.34%、34.18%; 体外实验可知, ATP1-1 对十二指肠蔗糖酶、麦芽糖酶的半数抑制浓度 IC_{50} 分别为 3 381.00 $\mu\text{g/mL}$ 、226.50 $\mu\text{g/mL}$ 。同时, ATP1-1 还可上调 GLP-1 mRNA 表达、下调 SI mRNA 表达 ($p < 0.01$)。因此, ATP1-1 可抑制 2 型糖尿病小鼠肠二糖酶活性及表达, 促进 GLP-1 表达改善 2 型糖尿病小鼠的高血糖状态。

关键词: 白藜; 中性多糖; 2 型糖尿病; 小肠; 二糖酶

文章编号: 1673-9078(2022)11-37-45

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.11.1442

The Regulatory Effect of Neutral Polysaccharide from *Acanthopanax trifoliatum* (L.) Merr on Intestinal Disaccharidase in Type 2 Diabetic Mice

LIU Yue, YANG Huiwen, LIN Yuzi, PAN Jinghua, LIAO Chengjuan, PAN Yufang*

(School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: This study investigated the regulatory effect of neutral polysaccharide from *Acanthopanax trifoliatum* (L.) Merr (ATP1-1) on intestinal disaccharidase in type 2 diabetic mice. A Type 2 diabetic mouse model was established through the induction by high-fat diet combined with streptozotocin (STZ). All diabetic mice were divided into 4 groups: model group, metformin group [185 mg/(kg·d)], high-dose ATP1-1 group [80 mg/(kg·d)], and low-dose ATP1-1 group [40 mg/(kg·d)]. Normal group was also set separately. The mice were given continuous intragastric administration for 8 weeks, during which Fasting blood glucose (FBG), glucose, sucrose and maltose tolerance were determined. After the last administration, *in vivo* and *in vitro* disaccharidase activities as well as the mRNA expressions of sucrase-isomaltase (SI) and glucagon-like peptide-1 (GLP-1) were evaluated. The results showed that compared with the model group, the FBG of the mice in high-dose ATP1-1 and low-dose ATP1-1 groups decreased by 27.06% and 19.96%, respectively ($p < 0.01$), and the glucose, sucrose and maltose tolerance of the diabetic mice were significantly improved ($p < 0.01$). *In vivo* experiments showed that the inhibition rates of high-dose ATP1-1 on the sucrase of the duodenum, jejunum and ileum were 48.29%, 75.09% and 31.41%, respectively, with the inhibition rates against the corresponding maltases being 26.23%, 18.34%, and 34.18%, respectively. *In vitro* experimental results showed that the IC_{50} of ATP1-1 on the duodenal sucrase and maltase were 3 381.00 $\mu\text{g/mL}$ and 226.50 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Meanwhile, ATP1-1 could up-regulate GLP-1 mRNA expression and down-regulate SI mRNA expression ($p < 0.01$). Therefore, ATP1-1 can inhibit the activity and expression of intestinal disaccharidase, and

引文格式:

刘悦, 杨慧文, 林榆子, 等. 白藜中性多糖对 2 型糖尿病小鼠肠道二糖酶的调节作用[J]. 现代食品科技, 2022, 38(11): 37-45

LIU Yue, YANG Huiwen, LIN Yuzi, et al. The regulatory effect of neutral polysaccharide from *Acanthopanax trifoliatum* (L.) Merr on intestinal disaccharidase in type 2 diabetic mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(11): 37-45

收稿日期: 2021-12-24

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (2017A030313623); 广东省大学生创新创业训练项目 (S202110573028)

作者简介: 刘悦 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 药物研发与转化, E-mail: 1953673963@qq.com

通讯作者: 潘育方 (1966-), 男, 教授, 研究方向: 新药开发及安全性评价, E-mail: p39352011@163.com

promote the expression of GLP-1 to improve the hyperglycemia state of type 2 diabetic mice.

Key words: *Acanthopanax trifoliatum* (L.) Merr; neutral polysaccharide; type 2 diabetes mellitus; small intestine; disaccharidase

2型糖尿病(Type 2 Diabetes Mellitus, T2DM)属于慢性代谢紊乱疾病,患者因肝脏糖脂代谢受损,从而导致胰岛素抵抗和血糖升高^[1]。最新流行病学调查数据显示^[2],截至2020年我国的2型糖尿病患病率已高达11.2%,患病人数位居世界第一。为了应对糖尿病,全球每年的投入超过8270亿美元,其中中国政府每年投入近250亿美元,占医疗总支出的13%,可见我国糖尿病防治工作仍面临巨大挑战。天然植物多糖是由10个以上单糖分子通过糖苷键连接而成的天然高分子聚合物^[3],参与生物体各项生命活动,来源广泛、低毒、副作用小,越来越多的研究表明,天然植物多糖具有良好的降糖效果,探究其在防治糖尿病方面的应用已成为热点。

白筋(*Acanthopanax trifoliatum* (L.) Merr)为五加科五加属攀援状灌木,民间以“筋菜”而著名。筋菜是人们日常生活中喜爱吃的野生蔬菜和营养保健食品,其作为蔬菜用于食疗有着悠久的历史。目前恩平筋菜已被评为“国家农产品地理标志产品”。本课题组在对白筋粗多糖进行分离纯化后,得到均一组分白筋中性多糖ATP1-1,其重均相对分子质量 M_w 为2,310,分布系数 D 为1.02,主要由葡萄糖、鼠李糖、半乳糖、甘露糖组成,摩尔比为5.52:0.63:0.62:0.56^[4]。前期研究发现,ATP1-1具有降糖功效,是一种潜在的降糖保健食品。然而由于较大的分子量和良好的水溶性,天然活性多糖大多口服生物利用度较差^[5,6],ATP1-1也具有类似的特点,因此通过肠道相关靶点发挥降糖作用可能是ATP1-1改善糖尿病的机制之一。肠道上的 α -葡萄糖苷酶是治疗2型糖尿病的一个重要靶点,其活性增加可加速碳水化合物在肠道内的分解,使肠道对糖的吸收加快,最终引起餐后血糖升高^[7,8]。小肠刷状缘上皮细胞上的二糖酶-蔗糖酶、麦芽糖酶皆属于 α -葡萄糖苷酶,研究表明^[9-11],植物多糖多具有较强的二糖酶抑制活性,其可通过抑制该酶使碳水化合物的消化延迟,进而导致小肠分泌细胞碳水化合物浓度增加,小肠分泌细胞中富含胰高血糖素样肽-1(GLP-1),碳水化合物的浓度增加可通过渗透作用进一步刺激GLP-1的分泌,从而促进胰岛素生成和降低胰高血糖素分泌^[12,13]。基于以上,本研究拟探讨ATP1-1对2型糖尿病小鼠肠黏膜上二糖酶的影响,并对肠道上GLP-1的表达进行测定,考察ATP1-1是否通过影响肠道二糖酶进而对机体血糖产生多方面的调节作用,为白筋多糖在开发保健食品方面的应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器与设备

超低温冰箱,中科美菱低温科技有限公司;5418R低温高速离心机,德国Eppendorf公司;FA1004分析天平,上海右一仪器有限公司;数显恒温水浴锅,北京精科华瑞仪器有限公司;Thermo Scientific Multiskan Sky全波长酶标仪,赛默飞(中国)有限公司;JXFSTPRP-24全自动样品快速研磨仪,上海净信实业发展有限公司;Nano-100微量分光光度计,杭州奥盛仪器有限公司;C1000TMThermal cycle PCR、C1000TouchTMThermal cycle 荧光定量PCR仪,美国Bio-Rad公司。

1.1.2 药物与试剂

白筋采购于广东省恩平市,经广东药科大学刘基柱副教授鉴定为五加科植物白筋(*Acanthopanax trifoliatum* (L.) Merr.),标本保存于广东药科大学中药学院标本馆。白筋中性多糖ATP1-1具体提取方法见文献^[4]。

链脲佐菌素,美国Sigma公司;柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH值4.5, vigonob);阿卡波糖,上海麦克林生化科技有限公司;葡萄糖、蔗糖,广东光华科技股份有限公司;麦芽糖,天津市大茂化学试剂厂;蔗糖酶、麦芽糖酶活性测定试剂盒、葡萄糖测定试剂盒、蛋白测定试剂盒,南京建成生物有限公司;磷酸钾缓冲液,北京雷根生物技术有限公司;血糖试纸、血糖仪(安稳型),长沙三诺生物传感技术股份有限公司;PrimeScriptTMRT Reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒、SYBR Green Pro Taq HS 预混型qPCR 试剂盒,武汉艾瑞科生物科技有限公司。

1.1.3 动物及饲料

SPF级C57BL/6雄性小鼠购于广东省医学实验动物中心,(18.0±2.0)g,实验动物生产许可证编号:SCXK(粤)2018-0002。所有动物均饲养于广东药科大学实验动物中心,实验动物使用许可证编号:SYXK(粤)2017-0125。所有方案均通过广东药科大学实验动物中心伦理委员会批准。

基础饲料购自广东省广州市广东药科大学动物实验中心。高脂饲料脂肪质量分数为33.8%,由北京博爱港生物技术有限公司制备。所用配方在文献^[14]的基

础上进行调整(质量分数):基础饲料 58.5%、蔗糖 15%、猪油 10%、酪蛋白 10%、奶粉 5%、胆固醇 1%、胆酸钠 0.05%。

1.2 方法

1.2.1 模型制备

按文献^[15]所述方法采用高脂饲料联合一次大剂量注射链脲佐菌素(Streptozotocin, STZ)诱导 2 型糖尿病小鼠模型。选取 60 只 C57BL/6 雄性小鼠, SPF 环境普通饲料适应性喂养 1 周后,按体重随机分为正常组($n=10$)和造模组($n=50$)。正常组饲喂普通饲料,造模组饲喂高脂饲料。4 周后,小鼠禁食不禁水过夜,造模组腹腔注射 STZ(130 mg/kg, pH 值为 4.5 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液避光冰浴配制,现配现用),于注射后第 7 天、第 10 天将小鼠禁食 6 h,测量其空腹血糖值(FBG),以 $FBG \geq 16.7$ mmol/L 筛选成模小鼠。

1.2.2 给药治疗

将成模小鼠按血糖随机均分为四组:模型组、二甲双胍组(185 mg/(kg·d))、ATP1-1 高剂量组(80 mg/(kg·d))、ATP1-1 低剂量组(40 mg/(kg·d)),另设正常组,给药 8 周,模型组与正常组灌胃等量的生理盐水。实验期间每 7 d 测量并记录小鼠体重、饮食饮水及空腹血糖。给药期间所有成模小鼠均持续以高脂饲料喂养。

1.2.3 口服葡萄糖、蔗糖、麦芽糖耐量试验

1.2.3.1 口服葡萄糖耐量试验(OGTT)

于给药第 8 周,小鼠禁食不禁水 6 h,测定所有小鼠空腹血糖值作为 0 min 血糖值,随后灌胃给予 2.0 g/kg 葡萄糖,测定 15、30、60、90、150 min 的血糖值,并计算血糖-时间曲线下面积(AUC)评价糖耐量:

$$AUC = \frac{(A+2B+C) \times 0.25 + (C+2D+E) \times 0.5 + (E+F) \times 1.0}{2} \quad (1)$$

式中:

A、B、C、D、E、F——分别代表 0、15、30、60、90、150 min 的血糖值。

1.2.3.2 口服蔗糖耐量试验(OSTT)

于给药第 8 周,小鼠隔夜禁食不禁水 12 h,测定所有小鼠空腹血糖值作为 0 min 血糖值,随后各组小鼠灌胃给药,并于 30 min 后给予 4.0 g/kg 蔗糖溶液,测定 30、60、90、120、150、180 min 的血糖值,并计算血糖-时间曲线下面积 AUC 评价糖耐量:

$$AUC = \frac{(A+2B+2C+2D+2E+2F+G) \times 0.5}{2} \quad (2)$$

式中:

A、B、C、D、E、F、G——分别代表 0、30、60、90、120、150、180 min 的血糖值。

1.2.3.3 口服麦芽糖耐量试验(OMTT)

于给药第 8 周,小鼠隔夜禁食不禁水 12 h,测定所有小鼠空腹血糖值作为 0 min 血糖值,随后各组小鼠灌胃给药,并于 30 min 后给予 3.0 g/kg 麦芽糖溶液,测定 30、60、90、120、180 min 的血糖值,并计算血糖-时间曲线下面积 AUC 评价糖耐量:

$$AUC = \frac{(A+2B+2C+2D+E) \times 0.5 + (E+F) \times 1.0}{2} \quad (3)$$

式中:

A、B、C、D、E、F——分别代表 0、30、60、90、120、180 min 的血糖值。

1.2.4 ATP1-1 对蔗糖酶、麦芽糖酶活性的体内抑制作用

于给药治疗结束后,取小鼠的十二指肠、空肠、回肠各 2 cm,生理盐水冲洗内容物并进行称重。沿中线纵向剪开各肠段,载玻片轻轻刮取肠黏膜,随后用预冷的生理盐水($m:V=1:9$)冲洗至 1.5 mL 离心管中,研磨仪-30℃,60 Hz,60 s,连续匀浆 2 次。匀浆混悬液 4℃,4 000 r/min,离心 10 min,吸取上清。用 Bradford 蛋白试剂盒测定上清液蛋白含量,并根据二糖酶活性试剂盒测定各肠段蔗糖酶、麦芽糖酶的活性情况。以在 37℃ pH 值为 6.0 的条件下,每毫克蛋白组织每分钟水解 1 nmol 蔗糖或麦芽糖定义为 1 个酶活力单位。

1.2.5 ATP1-1 对回肠上 SI、GLP-1 表达的影响

取小鼠回肠测定蔗糖酶-异麦芽糖酶复合物(Sucrase-Isomaltase, SI)和 GLP-1 的 mRNA 表达,采用 Trizol 试剂法提取总 RNA,利用微量分光光度计检测样本核酸的 OD 值,根据 PrimeScriptTM RT Reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒合成 cDNA,反应条件为:42℃,2 min。运用 SYBR 法测定各基因表达情况,实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)反应条件为:95℃预变性 30 s,95℃变性 5 s,60℃退火 30 s,40 个循环。以 β -actin 为内参基因,引物序列见表 1。各目的基因的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法测定。

表 1 引物序列

Table 1 Sequences of the primers

Primer 名称	序列 (5' to 3')
SIF	GCTTCATTCTTACCCGCTCAACATTGT
SIR	TCCAGCATTCCAGTTATAGACCATTC
GLP-1 F	CACAGAACTCTCCTTCACTTCCTTCC
GLP-1 R	TCCCAGCATTCCGAAACTCCATC

1.2.6 ATP1-1 对蔗糖酶、麦芽糖酶活性的体外抑制作用

试验参考文献^[16]并稍加修改,取健康 C57BL/6 小鼠十二指肠,加入 10 倍预冷的磷酸钾缓冲液,研磨仪 -30 °C, 60 Hz, 60 s, 连续匀浆 3 次。匀浆混悬液 4 °C, 2 500 r/min, 离心 15 min, 吸取上清液作为酶溶液。

10 mL 试管中加入缓冲液、各浓度白藜中性多糖溶液 (10 000、7 000、5 000、4 000、3 000、2 000、1 000、400、200、50、10、4 μg/mL) 或阿卡波糖溶液 (400、300、200、100、50、25、10 μg/mL)、蔗糖 56 mmol/L 或麦芽糖 7 mmol/L 各 500 μL, 37 °C 水浴孵育 5 min, 添加 500 μL 酶液, 在 37 °C 水浴下反应 45 min, 最后, 沸水浴 5 min 进行灭酶。以底物水解生成葡萄糖的量反映蔗糖酶和麦芽糖酶的活性。通过不同浓度 ATP1-1 对蔗糖酶或麦芽糖酶的活性抑制率计算半数抑制浓度 (IC₅₀)。抑制率计算公式为:

$$H = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0 - A_3} \right) \times 100\% \quad (4)$$

式中:

H ——抑制率, %;

A_1 ——样品组吸光度;

A_2 ——样品对照组吸光度;

A_0 ——空白组吸光度;

A_3 ——阴性对照组吸光度。

以阿卡波糖代替白藜中性多糖作为阳性对照。样品组: 样品+底物+酶液; 样品对照组: 样品+底物+缓冲液; 空白组: 缓冲液+底物+酶液; 阴性对照组: 缓冲液+底物+缓冲液。

1.3 数据分析

采用 Excel 和 Graphpad prism 6.0 进行统计分析和作表作图, 数据处理后表示为平均值±标准差 ($\bar{X} \pm SD$)。两组数据采用 Dunnet-t 进行比较, 组间多组数据采用 LSD 法进行多重比较。

2 结果与讨论

2.1 ATP1-1 对糖尿病小鼠体重、饮食饮水的影响

“三多一少”症状是观察糖尿病最直观指标。如表 2 所示, 与正常组小鼠相比, 造模成功的小鼠体重下降了 14.70%, 饮食量、饮水量分别增加了 18.89%、224.55%, 具有明显的糖尿病多饮、多食、体重减轻症状。给药 8 周后, 各给药组小鼠与模型组小鼠相比, 体重明显上升 ($p < 0.05$), 饮食饮水量显著下降 ($p < 0.01$), 且 ATP1-1 高、低剂量组与二甲双胍组相比各指标均无显著性差异 ($p > 0.05$), 其中各给药组对小鼠饮水量的改善最为明显, 与模型组相比分别下降了 40.66%、34.15%、37.58%。宿世震等^[17]在研究南瓜多糖对 2 型糖尿病小鼠糖脂代谢的影响中发现, 造模后糖尿病小鼠出现多饮、多食、多尿、体重减轻的现象, 且在给予南瓜多糖治疗后, 以上症状均得到明显改善, 这与本研究的结果相似, 说明 ATP1-1 可使糖尿病小鼠的体重及饮食饮水量趋向于正常小鼠。

表 2 ATP1-1 对糖尿病小鼠的体重、饮食饮水的影响

Table 2 Effects of ATP1-1 on body weight, diet and water intake in diabetic mice

组别	体重/g		饮食/(g/d)		饮水/(mL/d)	
	0 周	8 周	0 周	8 周	0 周	8 周
正常组	27.90±0.89**	28.48±1.08**	3.07±0.18**	2.64±0.34**	3.91±0.44**	4.12±0.53**
模型组	23.80±1.32	22.88±1.79	3.65±0.42	3.82±0.12	12.69±0.50	16.33±0.44
二甲双胍组	24.20±1.24	25.77±1.23**	3.38±0.76	2.85±0.27**	12.99±2.90	10.19±3.18**
ATP1-1 高剂量组	24.03±0.54	25.00±0.55*	3.52±0.42	2.90±0.22**	12.17±1.75	9.69±1.72**
ATP1-1 低剂量组	24.07±0.73	24.93±1.05*	3.89±1.10	3.13±0.30**	12.19±2.38	10.75±0.91**

注: 与模型组比较, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

2.2 ATP1-1 对糖尿病小鼠空腹血糖的影响

连续 8 周监测各组小鼠血糖变化情况, 如图 1 所示, 与正常组相比, 造模后各组小鼠空腹血糖值均明显升高, 表现为高血糖。给药治疗 8 周后, 模型组血糖为 23.65 mmol/L, 与模型组相比, 各给药组血糖均明显下降, 二甲双胍效果最优, 下降了 40.94%, ATP1-1

高、低剂量组血糖浓度分别下降了 27.06%、19.96% ($p < 0.01$)。正常组始终维持在 5.73 mmol/L, 给药治疗后虽未能达到正常水平, 但有明显的改善效果。与化学药物相比, 植物多糖^[18]疗效好、毒副作用小、不良反应少, 其在 2 型糖尿病治疗方面应用的研究日渐增多, 如沙蒿籽多糖、羊栖菜多糖、灵芝多糖、黄秋葵多糖、太子参多糖等^[19-23], 本实验结果表明白藜中

性多糖 ATP1-1 也可以有效降低 2 型糖尿病小鼠空腹血糖值, 具有开发价值。

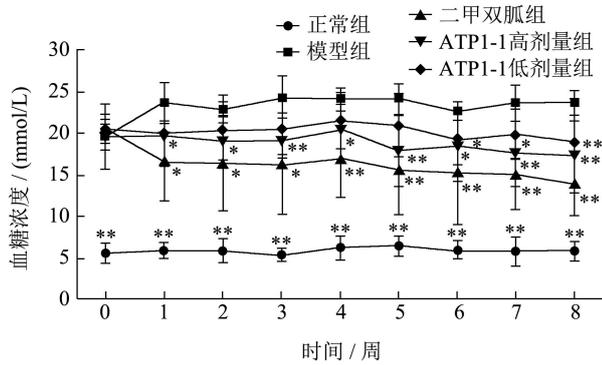


图 1 ATP1-1 对糖尿病小鼠空腹血糖的影响

Fig.1 Effects of ATP1-1 on FBG in diabetic mice

注: 与模型组比较, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; 图 2-6 同。

2.3 ATP1-1 对小鼠糖耐量的调节作用

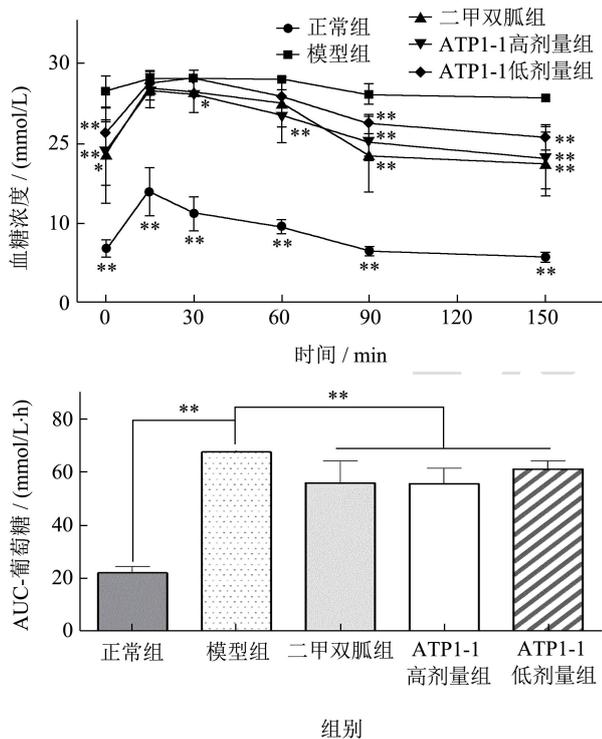


图 2 各组小鼠葡萄糖耐量水平

Fig.2 Oral glucose tolerance of different group mice

为了测定 ATP1-1 对葡萄糖、蔗糖及麦芽糖耐受的影响, 对各组小鼠进行了口服葡萄糖、蔗糖及麦芽糖耐量实验。如图 2 所示, 在 OGTT 试验中, 口服给予葡萄糖 15 min 后各组小鼠血糖达到峰值。30 min 后二甲双胍组与 ATP1-1 高剂量组血糖开始回落, 1 h 后各给药组血糖值明显下降。计算 AUC 可知, 模型组 AUC 约为正常组的 3.08 倍 ($p < 0.01$), 给药治疗后, 与模型组相比各组小鼠 AUC 均明显降低 ($p < 0.01$), 且 ATP1-1 高、低剂量组结果与二甲双胍

组相比均无明显差异 ($p > 0.05$), 二者相比模型组, AUC 分别降低了 17.67%、9.50%。葡萄糖耐量可反应机体对葡萄糖的耐受能力, 葡萄糖耐量异常提示胰岛素敏感性降低和 β 细胞功能受损, 此为 2 型糖尿病发病的病理生理学基础上的关键决定因素^[24]。AUC 作为反映血糖的一种指标, 其比单点的血糖值更能全面地分析血糖波动的时间和程度, 该值越小, 表明糖耐量改善程度越高, 机体血糖恢复能力强^[25]。本实验结果提示 ATP1-1 可改善 2 型糖尿病小鼠葡萄糖耐量, 且在该实验条件下, 效果与玉米须多糖 (20.05%)^[26]、南瓜多糖 (15.07%~27.97%)^[17] 等类似。

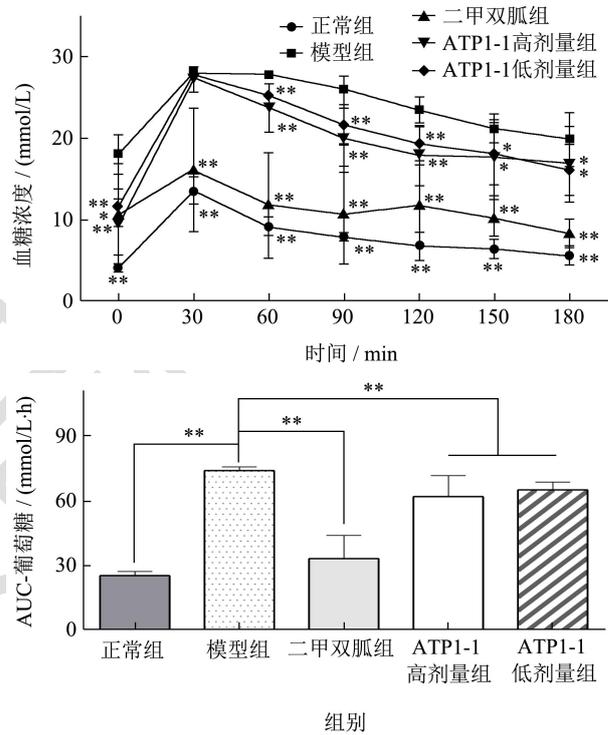


图 3 各组小鼠蔗糖耐量水平

Fig.3 Oral sugar tolerance of different group mice

图 3、图 4 分别为 OSTT、OMTT 试验结果, 口服给予蔗糖或麦芽糖 30 min 后, 各组小鼠血糖值达到峰值, 其后给药组均以大于模型组的幅度下降, AUC 均明显降低 ($p < 0.05$), 尤其对蔗糖耐量效果最为明显 ($p < 0.01$)。高、低剂量 ATP1-1 对蔗糖耐量实验的 AUC 与模型组相比分别下降了 16.19%、12.11%。2 型糖尿病小鼠的蔗糖耐量增高, 意味着机体对高糖饮食中蔗糖的吸收调节能力增强, 从而可抑制高糖饮食引起的循环血糖增高^[27]; 糖尿病小鼠的麦芽糖耐量提高则意味着机体对麦芽糖的耐受力增加, 可减缓麦芽糖的消化和吸收, 改善胰岛素抵抗^[28]。蔗糖、麦芽糖消化吸收下降可降低葡萄糖入血从而降低血糖, ATP1-1 可通过加快餐后血糖下降速率改善蔗糖与麦芽糖耐受, 且呈剂量依赖性, 该作用往往与减缓机体

对二糖的消化, 延迟吸收从而调节肠道上的葡萄糖摄取有关。

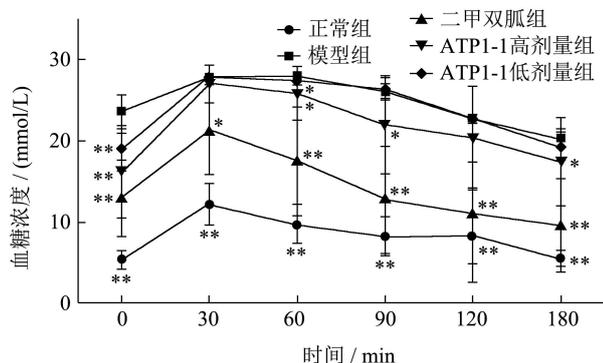


表 3 ATP1-1 对小鼠肠黏膜蔗糖酶、麦芽糖酶活性的影响

Table 3 Effects of ATP1-1 on the activities of invertase and maltase in mouse intestinal mucosa

组别	蔗糖酶活性/(U/mg prot)			麦芽糖酶活性/(U/mg prot)		
	十二指肠	空肠	回肠	十二指肠	空肠	回肠
正常组	9.49±3.64**	4.83±1.74*	15.33±3.84*	54.44±12.43*	14.70±3.1**	70.89±4.53*
模型组	24.66±7.22	11.08±4.65	20.37±3.76	73.97±10.43	31.73±3.05	87.73±14.07
ATP1-1 高剂量组	12.75±4.03**	2.76±0.38**	13.92±0.74**	54.57±6.93**	25.91±4.80*	57.74±14.97**
ATP1-1 低剂量组	14.37±4.6*	4.09±2.63**	14.47±2.82*	60.13±9.11*	26.50±3.94*	62.82±12.55**

注: 与模型组比较, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

2.4 ATP1-1 对 T2DM 小鼠肠道二糖酶活性的影响

从表 3 可知, 糖尿病小鼠各肠段的蔗糖酶活性、麦芽糖酶活性均明显高于正常组 ($p < 0.05$), 给药治疗 8 周后, ATP1-1 高、低剂量组各肠段的蔗糖酶、麦芽糖酶活性被显著抑制 ($p < 0.05$)。其中, 高剂量 ATP1-1 对十二指肠、空肠、回肠的蔗糖酶抑制率分别为 48.29%、75.09%、31.41%; 对麦芽糖酶抑制率分别为 26.23%、18.34%、34.18%。ATP1-1 对蔗糖酶的活性抑制作用在空肠上最为明显 ($p < 0.01$), 对麦芽糖酶的活性抑制作用在回肠上最为明显 ($p < 0.01$), 且回肠上高、低剂量治疗后其二糖酶活性与正常组相比差异无统计学意义 ($p > 0.05$)。

α -葡萄糖苷酶位于小肠刷状缘膜上皮细胞, 是水解蔗糖、麦芽糖等双糖的关键酶, 是众多经典糖尿病治疗药物的作用靶点, 在糖尿病的治疗中起着重要的作用^[29]。糖尿病患者中 α -糖苷酶活性与正常人相比会异常升高, 抑制肠黏膜刷状缘 α -糖苷酶活性, 可减缓寡糖、双糖水解为单糖的速度, 减缓单糖吸收入血, 从而降低血糖^[8]。蔗糖酶、麦芽糖酶均属于 α -葡萄糖苷酶, 顾舒静等^[30]研究发现, 黄芩苷对大鼠十二指肠、空肠和回肠的蔗糖抑制率分别为 47.2%、14.4% 和 34.8%, 对麦芽糖酶没有抑制作用; 本试验结果表明,

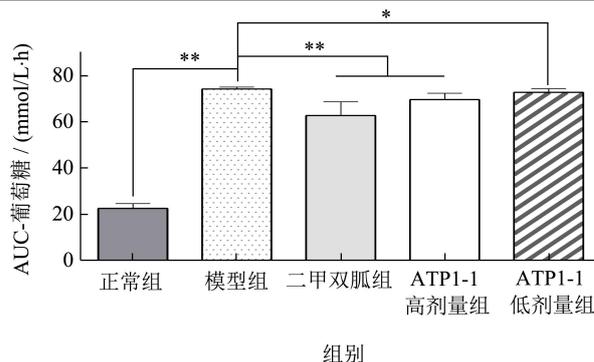


图 4 各组小鼠麦芽糖耐量水平

Fig.4 Oral maltose tolerance of different group mice

ATP1-1 对蔗糖酶、麦芽糖酶活性均有抑制作用, 有助于延缓碳水化合物分解成单糖, 抑制肠道对糖的吸收, 维持血糖在正常水平。

2.5 ATP1-1 对回肠上 GLP-1、SI 表达的影响

如图 5、图 6 所示, 糖尿病小鼠 SI mRNA 表达量明显高于正常小鼠 ($p < 0.01$), GLP-1 mRNA 表达量明显低于正常组 ($p < 0.01$)。给药 8 周后, 与模型组相比, ATP1-1 高、低剂量组 SI 表达分别降低了 64.90%、24.87% ($p < 0.01$); 高剂量组 GLP-1 表达增加了 156.46% ($p < 0.01$), 低剂量组有上升趋势但无统计学意义。SI 存在于小肠绒毛刷状缘的黏膜表面, 伴随着小肠上皮的成熟逐渐形成, 包含了约 60%~80% 的麦芽糖酶活性、所有的蔗糖酶活性以及大部分的异麦芽糖酶活性^[31]。GLP-1 可刺激胰岛素分泌、减少胰高血糖素的分泌、增强 β 细胞的增殖, 抑制胃排空和增加饱腹感来减少对食物的摄入^[32]。糖尿病小鼠中 SI 的表达增加, 刺激了肠黏膜细胞膜的转运系统, 导致小肠内单糖转运升高^[33]。同时, 抑制 α -葡萄糖苷酶活性可导致回肠远端碳水化合物浓度增加, 通过渗透作用, 进一步刺激小肠肠促胰岛素 GLP-1 的分泌增加^[10]。结合本实验结果可见, ATP1-1 可通过下调 SI 表达, 上调 GLP-1 表达, 从而影响肠道糖的吸收和机体糖代谢。

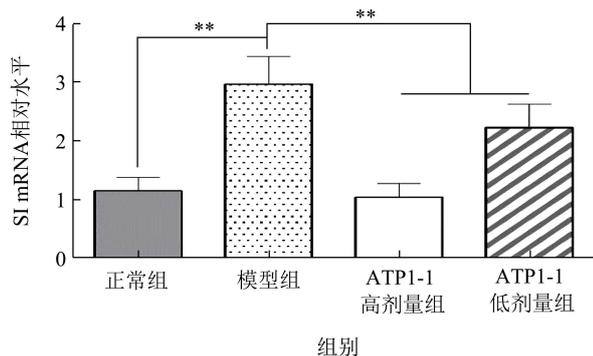


图5 各组小鼠回肠组织 SI mRNA 表达水平

Fig.5 The mRNA expression levels of SI in ileum tissues of different group mice

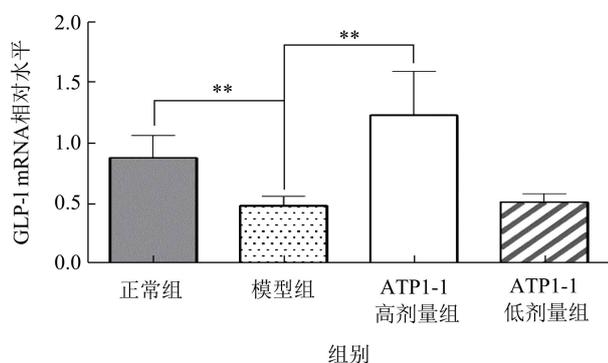


图6 各组小鼠回肠组织 GLP-1 mRNA 表达水平

Fig.6 The mRNA expression levels of GLP-1 in ileum tissues of different group mice

2.6 ATP1-1 对蔗糖酶、麦芽糖酶活性的体外抑制能力

α -葡萄糖苷酶抑制剂可通过延迟碳水化合物的肠道吸收,从而抑制餐后血糖水平的升高^[34]。为了进一步验证 ATP1-1 是否能直接抑制小鼠肠二糖酶,分别以蔗糖、麦芽糖作为底物,研究了 ATP1-1 对小鼠十二指肠匀浆中蔗糖酶、麦芽糖酶活性抑制的影响。所有数据平行测定 3 次,以阿卡波糖为阳性对照,结果如图 7、图 8 所示,根据抑制率-浓度曲线计算半数抑制浓度 IC₅₀, 阿卡波糖和 ATP1-1 对麦芽糖酶的 IC₅₀ 值分别为 42.61 μ g/mL、265.00 μ g/mL,对蔗糖酶的 IC₅₀ 值分别为 2.16 μ g/mL、3 381.00 μ g/mL,提示 ATP1-1 对此两种酶均有直接抑制作用,但抑制能力弱于阿卡波糖。ATP1-1 抑制麦芽糖酶的 IC₅₀ 远小于蔗糖酶,但当 ATP1-1 浓度为 10 mg/mL 时,其对蔗糖酶的抑制率可达 46.80%,远高于对麦芽糖酶的抑制率 15.92%,结果与体内活性抑制率相似,且植物多糖如绿茶多糖^[35]对蔗糖酶的抑制率小于 40%,番石榴叶多

糖^[36]对蔗糖酶、麦芽糖酶的抑制率仅为 29.3%、20.6%,可见 ATP1-1 不仅与上述多糖相似可直接抑制小鼠肠二糖酶活性,还具有较好的抑制效果。

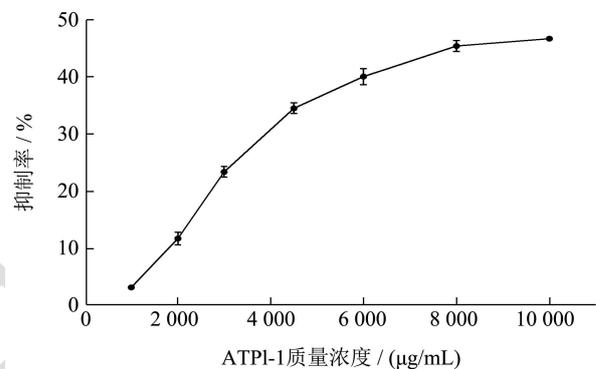
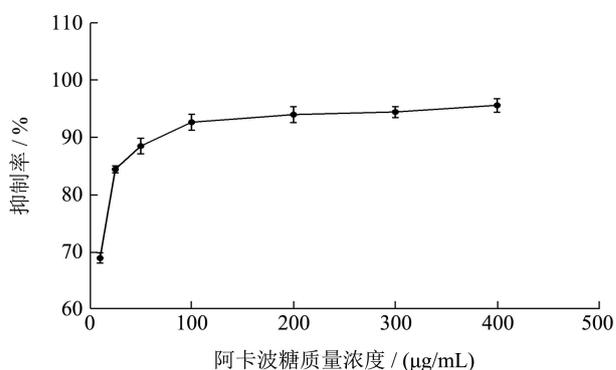


图7 ATP1-1 及阿卡波糖对蔗糖酶的抑制率曲线

Fig.7 Inhibition effects of ATP1-1 and acarbose on sucrose

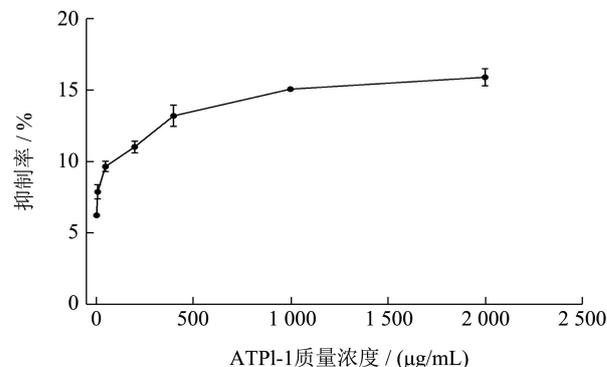
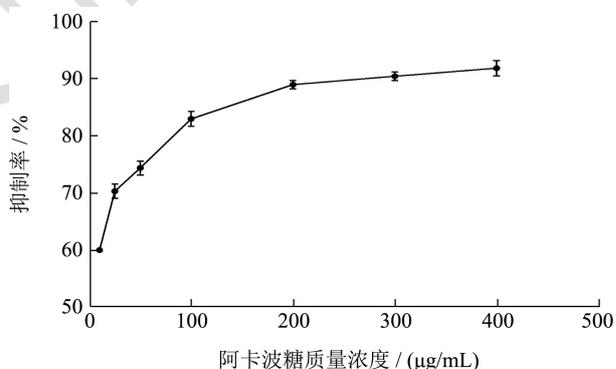


图8 ATP1-1 及阿卡波糖对麦芽糖酶的抑制率曲线

Fig.8 Inhibition effects of ATP1-1 and acarbose on maltase

3 结论

白藜广泛分布于中国中部和南部,具有丰富的营养价值,在民间流行以藜菜作为保健蔬菜,是开发保健性食品的理想原料。研究表明,白藜中性多糖ATP1-1可抑制2型糖尿病小鼠肠道二糖酶活性、下调SI表达,进一步影响GLP-1的表达及肠道上的糖吸收,从而改善2型糖尿病小鼠的高血糖状态。

参考文献

- [1] Lei Y, Gong L, Tan F, et al. Vaccarin ameliorates insulin resistance and steatosis by activating the AMPK signaling pathway [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2019, 851(851): 13-24
- [2] Li Y, Teng D, Shi X, et al. Prevalence of diabetes recorded in mainland China using 2018 diagnostic criteria from the American diabetes association: national cross sectional study [J]. *The BMJ*, 2020, 369: m997
- [3] 刘伟帆,朱珍,苏敏璇,等.多糖对酒精性肝损伤干预作用的研究进展[J].*现代食品科技*,2020,36(8):379-393
- [4] 程轩轩,张旭红,杨慧文,等.白藜多糖的分离纯化及抗氧化活性研究[J].*中草药*,2017,48(20):4219-4223
- [5] Wang H S, Tang X, Cheserek M J, et al. Obesity prevention of synthetic polysaccharides in high-fat diet fed C57BL/6 mice [J]. *Journal of Functional Foods*, 2015, 17(17): 563-574
- [6] Zuo T, Zhang N, Zhang Q, et al. Transportation of squid ink polysaccharide SIP through intestinal epithelial cells and its utilization in the gastrointestinal tract [J]. *Journal of Functional Foods*, 2016, 22(22): 408-416
- [7] Lee S, Lin H, Chen C. Acylated flavonol monorhamnosides, α -glucosidase inhibitors, from *Machilus philippinensis* [J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(12): 2347-2353
- [8] 朱振元,刘晓翠,郭蓉,等.蛹虫草多糖对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制研究[J].*现代食品科技*,2014,30(12):55-60
- [9] Rui Z, Xu G, Tao Z, et al. Effects of *Lycium barbarum* polysaccharide on type 2 diabetes mellitus rats by regulating biological rhythms [J]. *Iranian Journal of Basic Medical Science*, 2016, 19(9): 1024-1030
- [10] 于彩云,高兆兰,陈天姿,等.天然产物中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的进展[J].*食品工业科技*,2015,36(22):394-399
- [11] 潘欣萍,邢自力,贾韦国,等.茶多糖降糖活性中心 AN 蛋白组分的制备筛选及体内外降血糖实验研究[J].*中国中药杂志*,2018,43(4):736-742
- [12] Kumar B P, Anu K, Randhir S. Amelioration of diabetes mellitus by modulation of GLP-1 via targeting α -glucosidase using *Acacia tortilis* polysaccharide in streptozotocin-nicotinamide induced diabetes in rats [J]. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, 2020, 11(prepublish)
- [13] Okimura T, Jiang Z D, Liang Y, et al. Suppressive effect of ascophyllan HS on postprandial blood sugar level through the inhibition of α -glucosidase and stimulation of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) secretion [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 125: 1-6
- [14] Liu Y G, Yang L L, Zhang Y, et al. *Dendrobium officinale* polysaccharide ameliorates diabetic hepatic glucose metabolism via glucagon-mediated signaling pathways and modifying liver-glycogen structure [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2020, 248(C): 112308
- [15] 张婷婷,简乐乐,郑志民.谷氨酸钠联合链脲佐菌素诱导2型糖尿病小鼠模型的建立及评价[J].*武警后勤学院学报(医学版)*,2019,28(11):11-14
- [16] Liu L, Yu Y L, Yang J S, et al. Berberine suppresses intestinal disaccharidases with beneficial metabolic effects in diabetic states, evidences from *in vivo* and *in vitro* study [J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2010, 381(4): 371-381
- [17] 宿世震,项东宇.南瓜多糖对2型糖尿病小鼠糖脂代谢影响研究[J].*亚太传统医药*,2017,13(1):15-17
- [18] 苏现义.植物多糖降血糖作用研究进展[J].*食品与药品*, 2014,16(4):311-312
- [19] Li J J, Zhao H B, Hu X Z, et al. Antidiabetic effects of different polysaccharide fractions from *Artemisia sphaerocephala* Krasch seeds in db/db mice [J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 91(91): 1-9
- [20] Li Z R, Jia R B, Wu J, et al. *Sargassum fusiforme* polysaccharide partly replaces acarbose against type 2 diabetes in rats [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 170: 447-458
- [21] Heriansyah T, Nurwidyaningtyas W, Sargowo D, et al. Polysaccharide peptide (PsP) *Ganoderma lucidum*: a potential inducer for vascular repair in type 2 diabetes mellitus model [J]. *Vascular Health and Risk Management*, 2019, 15: 419-427
- [22] Liao Z, Zhang J, Liu B, et al. Polysaccharide from *Okra (Abelmoschus esculentus (L.) Moench)* improves antioxidant capacity via PI3K/AKT pathways and Nrf2 translocation in a type 2 diabetes model [J]. *Molecules*, 2019, 24(10): 1906
- [23] Fang Z, Duan X, Zhao J, et al. Novel polysaccharide H-1-2 from *Pseudostellaria heterophylla* alleviates type 2 diabetes

- mellitus [J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2018, 49(3): 1037-1047
- [24] Utzschneider K M, Younes N, Rasouli N, et al. Shape of the OGTT glucose response curve: relationship with β -cell function and differences by sex, race, and BMI in adults with early type 2 diabetes treated with metformin [J]. BMJ Open Diabetes Research & Care, 2021, 9(1): e002264
- [25] 汤陈鹏,吕峰,刘伊娜.孔石莼多糖对 I 型糖尿病小鼠糖脂代谢及体内抗氧化的干预作用[J].食品工业科技,2020, 41(1):295-300,309
- [26] 胡玉立,丁雷,李梅,等.玉米须多糖对糖尿病大鼠的糖脂代谢及 PGC-1 α 蛋白糖异生信号通路的影响[J].环球中医药, 2021,14(6):1000-1006
- [27] 周克夫,韩伟,张忠英,等.L-阿拉伯糖对高糖高脂喂养小鼠体质量及耐糖量的影响[J].厦门大学学报(自然科学版), 2008,47(6):772-776
- [28] De La Garza A L, Etxeberria U, Lostao M P, et al. *Helichrysum* and grapefruit extracts inhibit carbohydrate digestion and absorption, improving postprandial glucose levels and hyperinsulinemia in rats [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(49): 12012-12019
- [29] 季芳,肖国春,董莉,等.药用植物来源的 α -葡萄糖苷酶抑制剂研究进展[J].中国中药杂志,2010,35(12):1633-1640
- [30] 顾舒静,刘李,刘耀武,等.黄芩苷对小肠二糖酶的抑制作用(英文)[J].中国天然药物,2009,7(2):129-133
- [31] 郭艳芳,龙承星,刘又嘉,等.蔗糖酶-异麦芽糖酶缺乏与腹泻的研究进展[J].世界华人消化杂志,2017,25(15):1345-1351
- [32] Yu Y L, Lu S S, Yu S, et al. Decoction modulates glucagon-like peptide-1 secretion in diabetic rats [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2009, 124(3): 444-449
- [33] 王竹,杨月欣.植物化学物 α -葡萄糖苷酶抑制剂样降血糖作用及其评价方法[J].国外医学:卫生学分册,2008,35(6):355-360
- [34] Shao T L, Yuan P C, Zhu L, et al. Carbon nanoparticles inhibit α -glucosidase activity and induce a hypoglycemic effect in diabetic mice [J]. Molecules, 2019, 24(18): 3257
- [35] 贾亮亮,奚炜,彭官良,等.不同提取工艺对鄂产绿茶多糖体外降糖活性的影响[J].医药导报,2015,34(1):7-10
- [36] 杜阳吉,王三永,李春荣.番石榴叶黄酮与多糖提取及其降血糖活性研究[J].食品研究与开发,2011,32(10):56-59