

经培养基优化所得牛樟芝及其功能饮料的护肝和降血糖作用

吴龑坦^{1,2}, 吴晓露², 陈煜沛^{1,2}, 庞海月^{1,2}, 黄立森^{1,2}, 王贵弘^{1,2}, 郭钟达³

(1. 厦门医学院医学技术系, 福建厦门 361023)(2. 天然化妆品福建省高校应用工程技术中心, 福建厦门 361023)
(3. 中华科技大学生物科技系, 台湾台北 11581)

摘要: 本文研究了经培养基优化所得牛樟芝微粉及其功能饮料对乙醇诱导的急性酒精肝损伤小鼠和链脲佐菌素 (STZ) 诱导的糖尿病小鼠的预防保护作用。结果表明: 该牛樟芝微粉能有效降低急性酒精肝损伤小鼠血清中 ALT、AST 和 MDA 水平 ($p < 0.01$), 显著提高 SOD、CAT 和 GSH-Px 活性 ($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$), 发挥抗氧化作用而减轻肝脏损伤; 同时该牛樟芝微粉及其功能饮料均能明显降低糖尿病小鼠的空腹血糖值、糖耐量以及血清中 TG、TC 和 LDL 含量, 提高 HDL 含量 ($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$)。进一步分析能量代谢信号通路, 发现该牛樟芝微粉及其功能饮料可能通过下调肝脏中 AMPK α 和 AKT 磷酸化水平, 进而发挥降血糖和改善血脂代谢的功效。因此, 该经培养基优化所得牛樟芝微粉对小鼠酒精性肝损伤和糖尿病均有明显的预防保护作用, 这可能是通过抗氧化应激、调控机体能量代谢相关因子的表达来实现, 具备开发为解酒护肝降血糖功能饮料的前景。

关键词: 牛樟芝; 功能饮料; 酒精性肝损伤; 糖尿病; 护肝; 降血糖

文章编号: 1673-9078(2018)06-24-31

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.6.004

Hepatoprotective and Hypoglycemic Effects of *Antrodia camphorata* Obtained by Medium Optimization and Its Functional Beverage

WU Hong-tan^{1,2}, WU Xiao-lu², CHEN Yu-pei^{1,2}, PANG Hai-yue^{1,2}, HUANG Li-sen^{1,2}, WANG Gui-hong^{1,2}, GUO Zhong-da³

(1. Department of Medical Technology, Xiamen Medical College, Xiamen 361023, China)(2. Application Technique Engineering Center of Natural Cosmeceuticals, College of Fujian Province, Xiamen 361023, China)(3. Department of Biological Science and Technology, China University of Science and Technology, Taipei 11581, Taiwan)

Abstract: The hepatoprotective and hypoglycemic effects of *Antrodia camphorata* powder obtained by medium optimization and its functional beverage on alcohol-induced acute liver injury mice and streptozotocin (STZ)-induced diabetic mice were investigated in this study. *Antrodia camphorata* powder could significantly reduce the serum levels of ALT, AST, and MDA ($p < 0.01$), and significantly increase the activities of SOD, CAT, and GSH-Px to alleviate the liver injury ($p < 0.05$ or $p < 0.01$). Meanwhile, both the pretreatment of *Antrodia camphorata* powder and its functional beverage could significantly decrease the levels of fasting glucose, glucose tolerance, TG, TC, and LDL significantly, and could increase the level of HDL significantly ($p < 0.05$ or $p < 0.01$). Through investigating the energy metabolic pathways, *Antrodia camphorata* powder and its functional beverage could improve the glucose and lipid metabolism of diabetic by down-regulating the phosphorylation levels of AMPK α and AKT in the liver. Therefore, *Antrodia camphorata* powder had obvious functions to protect against alcohol-induced acute liver injury and STZ-induced hyperglycemia in mice, which might be achieved by anti-oxidative stress and the regulation of energy metabolism related factors, and could be developed as a functional beverage for relieving alcoholism, protecting liver, and reducing blood glucose in the future.

Key words: *Antrodia camphorata*; functional beverage; alcohol-induced liver injury; diabetes; liver protection; hypoglycemic effect

收稿日期: 2018-02-07

基金项目: 厦门市科技计划项目 (3502220161229)

作者简介: 吴龑坦 (1986-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 生物化学与分子生物学

通讯作者: 王贵弘 (1970-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然药物化学与药理学; 郭钟达 (1974-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 微生物学与发酵工程

酒精性肝病是由于长期大量饮酒所导致的肝脏损伤性疾病。研究表明,过度饮酒会增加高血压、高血脂症和冠状动脉硬化的风险,还会引起心脏、肝脏和肠胃等人体重要脏器损伤,造成心脏负担加剧、肝硬化以及胃溃疡等疾患。其中酒精代谢失调所导致的脂毒性、氧化应激和炎症等是酒精性肝病发生的重要原因^[1,2]。调查显示,我国酒精消费人群中过量饮酒的比例高达 49.1%,男性、女性分别为 51.5%和 32.1%,近年来酒精性肝病发病率逐年升高,已成为我国常见的肝脏疾病之一,严重危害人民的健康^[3,4]。

糖尿病是一种以持续高血糖为主要特征,由遗传和环境等多种因素造成的内分泌代谢性疾病,且并发症多,可以造成各种组织、脏器(如眼、肾、心脏、血管和神经等)的长期损害、功能紊乱或衰竭。糖尿病治疗时间长,费用大,已成为世界上继肿瘤和心脑血管疾病后第三位的慢性疾病^[5,6]。据统计,中国是全球糖尿病患者第一大国,2015 年病患人数高达 1.096 亿人,且约有 130 万人死于糖尿病及其并发症。同时据 IDF 预测,如果不加干预,2040 年全球糖尿病患者将达 6.42 亿,糖尿病前期人群 4.81 亿,我国患者数量将上升至 1.54 亿。

牛樟芝(*Antrodia camphorata*)又名牛樟菇,是一种原产于我国台湾的珍稀药用真菌。牛樟芝仅生长在台湾特有百年以上的牛樟树树干腐朽的内壁,或枯死倒伏的牛樟树木材潮湿表面,因其异常珍贵,素有“台湾森林中的红宝石”、“灵芝之王”的美誉。现代研究表明,牛樟芝含有三萜类、多糖类和不饱和脂肪酸等多种生理活性物质,具有抗氧化、抗炎、抑制肿瘤、降糖、护肝和增强免疫力等多种功效^[7-11]。鉴于牛樟木这一宿主的稀缺性,再加上野生牛樟芝生长极其缓慢,造成目前市场上牛樟芝资源严重短缺且价格昂贵,制约了其药用价值的开发和应用,因此急需建立一种高质、量产且培养周期较短的牛樟芝培养方法。目前,较为成功的牛樟芝人工培养方法有椴木栽培和液态发酵,前者以牛樟树椴木为培养基,培养周期长(1~2 年),成本高,生产效率低,难以大规模推广;后者以液体发酵槽进行菌种液体发酵,生产效率高,周期短,易于扩大化培养,但难以取得野生牛樟芝特有的麦角甾烷型三萜类化合物^[12]。针对以上两种方法的不足,本文以 MEA 培养基为基础,建立了一种经培养基优化的牛樟芝固态发酵法,并已取得较好的研究结果。本文对经培养基优化所得牛樟芝微粉的主要功效性成分进行含量分析,以评估其品质;同时通过乙醇诱导的急性酒精肝损伤小鼠模型和链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病小鼠模型,评价该牛樟芝微粉及其功能饮

料护肝、降血糖及改善血脂代谢的功效,论证该牛樟芝固态发酵法的可行性,也为其进一步的研究、应用和推广奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

牛樟芝微粉及其功能饮料,由台湾中华科技大学生物科技系郭钟达副教授提供;C57BL/6 雄性小鼠,体重(20±2)g,SPF 级,由厦门大学实验动物中心提供,生产许可证号:SCXK(闽)-2013-0001;丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、过氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)、胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL)和高密度脂蛋白(HDL)试剂盒均购买自南京建成生物工程研究所;AMPK α 、p-AMPK α (T172)、AKT、p-AKT(S473)和 GAPDH 抗体均购自美国 Cell Signaling Technology 公司;血糖测定试纸和血糖测定仪,德国 Roche 公司;链脲佐菌素(STZ)购自美国 Sigma-Aldrich 公司。其余试剂均为国产化学分析纯。

1.2 仪器与设备

5417R 台式高速冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司;SpectraMax® I3 多功能酶标仪,美国 Molecular Devices 公司;GZX-DH.500-BS-II 电热恒温干燥箱,上海跃进医疗器械有限公司;GNP-9080 隔水式电热恒温培养箱,上海精宏实验设备有限公司;TS-200 脱色摇床,海门市其林贝尔仪器制造有限公司;VE186 转移电泳槽、VE180 微型垂直电泳槽和 EPS600 电泳仪,上海天能科技有限公司;ChemiDoc™ XRS+化学发光成像系统,美国 Bio-Rad 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 牛樟芝微粉的制备

本实验所用培养基以 MEA 培养基为基础,经优化后确定为:葡萄糖 40 g/L,麦芽浸膏 20 g/L,大豆蛋白胨 5 g/L,紫米粉 1 g/L 和琼脂 20 g/L。固态发酵牛樟芝 2 m 后,干燥、粉碎制成牛樟芝微粉。

1.3.2 牛樟芝微粉中多糖含量的测定

采用热水浸提法制备多糖:温度 80 °C,时间 4 h,料液比 40 (mL:g)。离心(8000 r/min, 10 min)后取上清,采用苯酚-硫酸法测定多糖含量^[13]。

1.3.3 牛樟芝微粉中三萜类化合物含量的测定

采用醇提法制备三萜类化合物:75%乙醇,温度

80 ℃, 时间 1.5 h, 料液比 40(mL:g)。离心(4000 r/min, 10 min) 后取上清, 采用香草醛-高氯酸法测定三萜类化合物含量^[13]。

1.3.4 牛樟芝功能饮料的配方

本实验以经培养基优化所得牛樟芝微粉为基本原料, 调配了一款牛樟芝功能饮料, 其配方为: 牛樟芝微粉 10%, 灵芝萃取物 5%, 绿茶萃取物 3%, 综合蔬果酵素 22%, 其余部分为水。

1.3.5 急性酒精肝损伤小鼠模型的建立及分组给药方案

选取 50 只 C57BL/6 雄性小鼠, 体重 (20±2) g, 随机分为 5 组: 空白对照组、模型组、牛樟芝微粉低、中和高剂量组, 每组 10 只。牛樟芝微粉低、中和高剂量组每天分别灌胃给予 0.2、1 和 2 g/kg·bw 牛樟芝微粉悬液, 空白对照组和模型组以等体积生理盐水代替, 连续灌胃 30 d。末次给药后 1 h, 模型组和牛樟芝微粉各剂量组按 12 mL/kg·bw 剂量一次性灌胃给予 60%乙醇, 空白对照组以等体积生理盐水代替, 禁食 12 h 后处死小鼠并取样: 对小鼠进行心脏穿刺取血, 离心 (13500 r/min, 10 min) 制备血清; 同时收集小鼠肝脏组织, 并冻于 -80 ℃冰箱用后续各项指标检测分析。

1.3.6 糖尿病小鼠模型的建立及分组给药方案

选取若干 C57BL/6 雄性小鼠, 体重 (20±2) g, 禁食 12 h 后按照 80 mg/kg·bw 剂量一次性腹腔注射 STZ, 继续喂养 3 d 后, 禁食 12 h, 取小鼠尾静脉血测定其空腹血糖值, 当血糖值≥11.1 mmol/L 时判定建模成功。选取未经处理的小鼠作为空白对照组, 建模成功的小鼠随机分为 4 组: 模型组、牛樟芝微粉低、中和高剂量组, 每组 10 只。牛樟芝微粉低、中和高剂量组每天分别灌胃给予 0.2、1 和 2 g/kg·bw 牛樟芝微粉悬液或其功能饮料, 空白对照组和模型组以等体积生理盐水代替, 连续灌胃 35 d。实验结束后处死小鼠并取样: 对小鼠进行心脏穿刺取血, 离心 (13500 r/min, 10 min) 制备血清; 同时收集小鼠肝脏组织, 并冻于 -80 ℃冰箱用于后续各项指标的检测分析。

1.3.7 糖尿病小鼠降低空腹血糖值实验

给药后第 1、7、14、21、28 和 35 d, 取小鼠尾静脉血测定其空腹血糖值, 每次测定前禁食 12 h, 比较各组小鼠空腹血糖值的变化情况并根据以下公式计算末次血糖下降率:

$$\text{血糖下降率}(\%) = \frac{A - B}{A} \times 100\%$$

注: 式中, A 和 B 分别代表实验前和实验后血糖值。

1.3.8 糖尿病小鼠糖耐量实验

牛樟芝微粉低、中和高剂量组每天分别灌胃给予

0.2、1 和 2 g/kg·bw 牛樟芝微粉悬液或其功能饮料, 空白对照组和模型组以等体积生理盐水代替, 连续灌胃 35 d。灌胃 35 d 后, 各组禁食 12 h, 进行末次给药。在给药 30 min 后按 2 g/kg·bw 剂量灌胃给予葡萄糖, 并测定给予葡萄糖后 0、0.5、1 和 2 h 的血糖值, 观察各组在给予葡萄糖后不同时间点血糖值的变化情况。血糖曲线下面积 (AUC) 根据以下公式计算:

$$\text{AUC}(\text{h} \cdot \text{mmol/L}) = \frac{0.5A + B + C + 0.5D}{2}$$

注: 式中, A、B、C 和 D 分别代表给予葡萄糖后 0、0.5、1 和 2 h 的血糖值。

1.3.9 血清及肝脏相关指标测定

参照试剂盒操作说明检测 ALT、AST、SOD、CAT、GSH-Px、MDA、TC、TG、LDL 和 HDL 活性或含量。

1.3.10 免疫印迹法分析蛋白质表达

从 -80 ℃冰箱中取出小鼠肝脏组织, 按比例加入预冷的裂解液后在冰上充分研磨, 离心 (13500 r/min, 10 min) 收集上清, 测定蛋白质浓度。蛋白质经变形后, 按 30 μg/well 的上样量进行 SDS-PAGE 电泳。用湿转法将蛋白质转印至 PVDF 膜后, 5%BSA 室温封闭 1 h, 加入一抗 (稀释比例为 1:1000) 4 ℃孵育过夜。TBST 缓冲液洗涤 5 次, 每次 3 min, 再加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (稀释比例为 1:5000) 室温孵育 1 h, TBST 缓冲液洗涤 5 次, 每次 3 min。加入适量 ECL 试剂后, PVDF 膜用 ChemiDoc™ XRS+ 化学发光成像系统采集图像, 分析结果。

1.3.11 数据分析

采用 Graph Pad Prism 6 软件进行数据统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 显著性检测采用单因素方差分析, $p < 0.05$ 说明差异有统计学意义; 采用 Photoshop CS6 软件进行图片处理。

2 结果与讨论

2.1 经培养基优化所得牛樟芝功效性成分的含量分析

三萜类和多糖类等化合物是牛樟芝的主要功效性成分^[7]。由表 1 可知, 经 2 m 固态发酵所得牛樟芝中麦角甾烷型和羊毛甾烷型三萜类化合物及多糖类化合物含量均超过台湾牛樟芝产业协会给出的参考标准, 分别提高了 6.1%、24% 和 40%, 表明该经培养基优化后的牛樟芝固态发酵法能产出高质且培养周期较短的牛樟芝。在后续实验中, 牛樟芝经干燥、粉碎后制成牛樟芝微粉, 并通过乙醇诱导的急性酒精肝损伤小鼠

模型和 STZ 诱导的糖尿病小鼠模型对其功效进行评估, 以论证该固态发酵法的可行性。

表 1 经培养基优化所得牛樟芝功效性成分的含量分析

Table 1 Analysis of the functional components of *Antrodia camphorata* obtained by medium optimization

功效性成分	含量	参考标准
麦角甾烷型三萜类化合物 (Antcin A/B/C/H/K, etc.)	297 mg/g	> 280 mg/g
羊毛甾烷型三萜类化合物(Dehydrosulphurenic acid, 15- α -acetyl-dehydrosulphurenic acid, dehydroeburicoic acid, etc.)	62 mg/g	>50 mg/g
多糖类化合物	0.7%	0.5%

2.2 牛樟芝微粉对急性酒精肝损伤小鼠血清中 ALT 和 AST 活性的影响

ALT 和 AST 作为肝细胞标志性酶类, 是诊断肝脏受损伤程度最敏感指标。当肝脏损伤后, 血清中这两种酶的活性会显著升高, 进而反映肝脏受损伤程度^[2]。

表 2 牛樟芝微粉对急性酒精肝损伤小鼠血清中 ALT 和 AST 活性的影响

Table 2 Effects of *Antrodia camphorata* powder on serum activities of ALT and AST in mice with alcohol-induced acute liver injury ($\bar{x}\pm s$, n=10)

组别	ALT/(U/L)	AST/(U/L)
空白对照组	92.78 \pm 6.21	103.03 \pm 5.58
模型组	177.14 \pm 10.65**	206.08 \pm 13.63**
牛樟芝微粉低剂量组	163.06 \pm 5.27	197.49 \pm 9.82
牛樟芝微粉中剂量组	138.8 \pm 7.43 ^{###}	158.53 \pm 7.2 ^{###}
牛樟芝微粉高剂量组	117.07 \pm 8.97 ^{###}	130.26 \pm 12.39 ^{###}

注: 与空白对照组比较, ** $p < 0.01$; 与模型组比较, ^{###} $p < 0.01$ 。

由表 2 可知, 与空白对照组相比, 模型组小鼠血清中 ALT 和 AST 活性分别提高了 90.92% ($p < 0.01$) 和 99.83% ($p < 0.01$), 说明急性酒精肝损伤小鼠模型构建成功。与模型组相比, 牛樟芝微粉中剂量组小鼠血清中 ALT 和 AST 活性分别降低了 21.64% ($p < 0.01$) 和 23.07% ($p < 0.01$), 牛樟芝微粉高剂量组小鼠血清中 ALT 和 AST 活性则分别降低 33.91% ($p < 0.01$) 和

表 3 牛樟芝微粉对急性酒精肝损伤小鼠 SOD、CAT、GSH-Px 和 MDA 水平的影响

Table 3 Effects of *Antrodia camphorata* powder on the levels of SOD, CAT, GSH-Px, and MDA in mice with alcohol-induced acute liver injury ($\bar{x}\pm s$, n=10)

组别	SOD/(U/mL)	CAT/(U/mL)	GSH-Px/(U/mg·prot)	MDA/(nmol/mL)
空白对照组	160.42 \pm 7.11	188.21 \pm 5.63	99.59 \pm 6.11	3.78 \pm 0.32
模型组	104.27 \pm 8.46**	129.88 \pm 6.59**	64.5 \pm 8.34**	8.37 \pm 0.48**
牛樟芝微粉低剂量组	140.2 \pm 9.27 ^{###}	146.25 \pm 11.97	88.62 \pm 3.28 ^{###}	7.64 \pm 0.94
牛樟芝微粉中剂量组	132.92 \pm 6.51 ^{###}	162.23 \pm 6.13 ^{###}	83.79 \pm 8.24 [#]	5.97 \pm 0.27 ^{###}
牛樟芝微粉高剂量组	136.85 \pm 4.9 ^{###}	173.15 \pm 7.96 ^{###}	84.18 \pm 6.93 [#]	5.2 \pm 0.82 ^{###}

注: 与空白对照组比较, ** $p < 0.01$; 与模型组比较, [#] $p < 0.05$; ^{###} $p < 0.01$ 。

36.79% ($p < 0.01$), 呈一定量效关系。结果表明, 牛樟芝微粉能改善过量酒精摄入导致小鼠急性肝损伤。

2.3 牛樟芝微粉对急性酒精肝损伤小鼠 SOD、CAT、GSH-Px 和 MDA 水平的影响

人体摄入的酒精绝大部分会在肝脏被分解代谢, 并产生大量的自由基。长期或大量饮酒会导致自由基过量生成, 并对肝脏组织造成氧化性损伤^[1,14]。SOD、CAT 和 GSH-Px 是机体清除自由基, 抵御氧化应激的关键酶类, 其活性大小直接反映了机体清除自由基的能力^[15,16]。而 MDA 则是自由基作用于脂质所生成的脂质过氧化产物, 其含量高低也间接反映了机体受自由基攻击的严重程度^[17]。由表 3 可知, 与空白对照组相比, 模型组小鼠 SOD、CAT 和 GSH-Px 活性分别降低了 35% ($p < 0.01$)、30.99% ($p < 0.01$) 和 35.23% ($p < 0.01$), MDA 含量提高了 121.43% ($p < 0.01$), 说明过量摄入酒精使小鼠肝脏处于严重的氧化应激状态, 细胞抵御氧化性损伤的能力大幅降低。而与模型组相比, 牛樟芝微粉中剂量组小鼠 SOD、CAT 和 GSH-Px 活性分别提高了 27.48% ($p < 0.01$)、24.91% ($p < 0.01$) 和 29.91% ($p < 0.05$), MDA 含量降低了 28.67% ($p < 0.01$), 牛樟芝微粉高剂量组小鼠 SOD、CAT 和 GSH-Px 活性则分别提高 31.25% ($p < 0.01$)、33.32% ($p < 0.01$) 和 30.51% ($p < 0.05$), MDA 含量降低 37.87% ($p < 0.01$), 说明, 该牛樟芝微粉能增强机体的抗氧化能力并改善其氧化应激机制, 而发挥对急性酒精肝损伤小鼠保护作用。

2.4 牛樟芝微粉对糖尿病小鼠空腹血糖值的影响

由表 4 可知, 35 d 给药期间, 模型组小鼠的空腹血糖值较为稳定, 且显著高于空白对照组 ($p<0.01$)。中、高剂量牛樟芝微粉灌胃均可明显降低糖尿病小鼠

的空腹血糖值, 第 14 d 时两组小鼠的空腹血糖值与给药前相比已显著减小 ($p<0.05$ 或 $p<0.01$), 且从第 14 d 开始, 与模型组相比存在显著差异 ($p<0.05$ 或 $p<0.01$), 但牛樟芝微粉低剂量组小鼠的空腹血糖值却无明显变化。此外, 牛樟芝微粉中、高剂量组小鼠末次测定的血糖下降率分别为 25.03% 和 38.24%。以上结果说明, 该牛樟芝微粉具有较好的降血糖作用。

表 4 牛樟芝微粉对糖尿病小鼠空腹血糖值的影响

Table 4 Effects of *Antrodia camphorata* powder on fasting glucose in diabetic mice ($\bar{x}\pm s$, n=10)

组别	空腹血糖/(mmol/L)						血糖下降率/%
	1 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	
空白对照组	5.23±0.47	5.68±0.71	5.9±0.41	5.6±0.7	5.58±0.33	5.73±0.69	-
模型组	23.61±2.06**	23.15±3.79**	22.6±1.06**	25.7±1.83**	23.18±2.98**	24.98±2.88**	-
牛樟芝微粉低剂量组	22.15±3.14	22.85±1.78	21.20±2.98	23.2±1.59	22.88±2.01	23.08±2.55	10.21±5.46
牛樟芝微粉中剂量组	23.41±1.7	20.35±3.47	19.1±2.34 [#]	21.03±1.59 [#]	19.47±2.36	18.73±3.43 [#]	25.03±13.23
牛樟芝微粉高剂量组	22.6±2.36	18.35±2.32	16.05±3.1 ^{###}	19.58±2.42 ^{###}	16.3±4.34 [#]	15.43±3.12 ^{###}	38.24±12.5

注: 与空白对照组比较, ** $p<0.01$; 与模型组比较, [#] $p<0.05$; ^{###} $p<0.01$ 。

2.5 牛樟芝微粉对糖尿病小鼠糖耐量的影响

AUC 值的大小可反映机体血糖水平的恢复能力, AUC 值越小则恢复能力越强, 表明治疗药物具有较好的降血糖作用。

由表 5 可知, 35 d 给药后, 与模型组相比, 牛樟

芝微粉中、高剂量组小鼠的 AUC 值分别降低了 14.4% ($p<0.05$) 和 27.67% ($p<0.01$), 但牛樟芝微粉低剂量组小鼠的 AUC 值并无明显改变。

糖耐量实验结果表明, 该牛樟芝微粉能有效控制糖尿病小鼠的餐后血糖, 改善其糖耐量, 提高其对葡萄糖的耐受力。

表 5 牛樟芝微粉对糖尿病小鼠糖耐量的影响

Table 5 Effects of *Antrodia camphorata* powder on glucose tolerance in diabetic mice ($\bar{x}\pm s$, n=10)

组别	血糖/(mmol/L)				AUC/(h·mmol/L)
	0 h	0.5 h	1 h	2 h	
空白对照组	5.62±0.6	10.77±0.85	7.54±0.62	6.4±0.65	12.19±0.4
模型组	25.34±1.85**	30.72±2.9**	27.02±13.1**	26.63±2.91**	41.81±3.68**
牛樟芝微粉低剂量组	23.29±1.62	28.74±2.36	25.89±2.1	25.58±1.24	39.39±2.09
牛樟芝微粉中剂量组	19.57±2.81 [#]	26.21±1.7 [#]	24.26±15.8	23.07±1.97	35.79±1.09 [#]
牛樟芝微粉高剂量组	15.26±1.73 ^{###}	23.48±2.88 [#]	20.33±1.96 ^{###}	18.31±2.57 ^{###}	30.24±2.06 ^{###}

注: 与空白对照组比较, ** $p<0.01$; 与模型组比较, [#] $p<0.05$; ^{###} $p<0.01$ 。

2.6 牛樟芝微粉对糖尿病小鼠血清中 TG、TC、LDL 和 HDL 水平的影响

血脂代谢紊乱是糖尿病并发症的一种, 其变化可反映机体脂质代谢的情况。由表 6 可知, 与空白对照组相比, 模型组小鼠血清中 TC、TG 和 LDL 含量分别提高了 97.47% ($p<0.01$)、93.27% ($p<0.01$) 和 175.61% ($p<0.01$), HDL 含量降低了 33.33% ($p<0.01$), 表明体内血脂代谢已出现紊乱

与模型组相比, 牛樟芝微粉中剂量组小鼠血清中 TC、TG 和 LDL 含量分别降低了 11.94% ($p<0.05$)、

20.97% 和 30.53%, HDL 含量提高了 26.83% ($p<0.05$), 牛樟芝微粉高剂量组小鼠血清中 TC、TG 和 LDL 含量则分别降低了 28.36% ($p<0.01$)、25.32% ($p<0.05$) 和 41.15% ($p<0.05$), HDL 含量提高了 25.61% ($p<0.01$), 但低剂量牛樟芝微粉灌胃处理并无明显效果。上述结果说明, 该牛樟芝微粉能在一定程度上改善糖尿病小鼠体内血脂代谢紊乱的情况。

2.7 牛樟芝功能饮料对糖尿病小鼠空腹血糖值、糖耐量和血脂代谢的影响

在验证牛樟芝微粉的药效后, 以其为基本原料调

配了牛樟芝功能饮料,并探讨其对糖尿病小鼠空腹血糖值、糖耐量和血脂代谢的影响。由表 7~9 可知,与牛樟芝微粉一致,该功能饮料能有效改善糖尿病小鼠

的血糖调节能力以及由血糖代谢异常引起的血脂代谢紊乱,发挥对糖尿病小鼠的保护作用。

表 6 牛樟芝微粉对糖尿病小鼠血清中 TG、TC、LDL 和 HDL 水平的影响

Table 6 Effects of *Antrodia camphorata* powder on serum levels of TG, TC, LDL, and HDL in diabetic mice ($\bar{x} \pm s$, n=10)

组别	血脂/(mmol/L)			
	TC	TG	LDL	HDL
空白对照组	1.04±0.12	1.98±0.32	0.82±0.14	1.23±0.06
模型组	2.01±0.16**	3.91±0.34**	2.26±0.49**	0.82±0.07**
牛樟芝微粉低剂量组	1.86±0.18	3.59±0.16	1.99±0.34	0.89±0.06
牛樟芝微粉中剂量组	1.77±0.21 [#]	3.09±0.24	1.57±0.19	1.04±0.07 [#]
牛樟芝微粉高剂量组	1.44±0.26 ^{###}	2.92±0.17 [#]	1.33±0.15 [#]	1.03±0.08 [#]

注:与空白对照组比较, ** $p < 0.01$; 与模型组比较, [#] $p < 0.05$; ^{###} $p < 0.01$ 。

表 7 牛樟芝功能饮料对糖尿病小鼠空腹血糖值的影响

Table 7 Effects of *Antrodia camphorata* functional beverage on fasting glucose in diabetic mice ($\bar{x} \pm s$, n=10)

组别	空腹血糖/(mmol/L)						血糖下降率/%
	1 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	
空白对照组	5.12±0.43	5.61±0.74	5.5±0.75	5.48±0.87	5.41±0.87	5.58±1.24	-
模型组	26.03±1.84**	26.72±3.3**	25.64±1.77**	27.27±2.12**	26.72±1.26**	27.09±0.93**	-
牛樟芝功能饮料组	25.56±2.21	22.63±1.92	16.39±4.84 [#]	17.5±2.33 ^{###}	14.85±1.96 ^{###}	17.18±2.25 ^{###}	36.28±8.06

注:与空白对照组比较, ** $p < 0.01$; 与模型组比较, [#] $p < 0.05$; ^{###} $p < 0.01$ 。

表 8 牛樟芝功能饮料对糖尿病小鼠糖耐量的影响

Table 8 Effects of *Antrodia camphorata* functional beverage on glucose tolerance in diabetic mice ($\bar{x} \pm s$, n=10)

组别	血糖/(mmol/L)				AUC/(h·mmol/L)
	0 h	0.5 h	1 h	2 h	
空白对照组	5.41±0.66	10.02±1.15	7.33±0.45	6.41±0.72	12.03±0.66
模型组	26.13±1.51**	31.84±1.87**	31.03±2.21**	27.47±1.31**	47.13±3.07**
牛樟芝功能饮料组	15.95±3.34 ^{###}	30.36±2.57	24.53±1.5 [#]	21.87±1.62 ^{###}	36.66±0.2 ^{###}

注:与空白对照组比较, ** $p < 0.01$; 与模型组比较, [#] $p < 0.05$; ^{###} $p < 0.01$ 。

表 9 牛樟芝功能饮料对糖尿病小鼠血清中 TG、TC、LDL 和 HDL 水平的影响

Table 9 Effects of *Antrodia camphorata* functional beverage on the levels of TG, TC, LDL, and HDL in serum of diabetic mice ($\bar{x} \pm s$, n=10)

组别	血脂/(mmol/L)			
	TC	TG	LDL	HDL
空白对照组	2.01±0.44	1.05±0.12	0.77±0.07	1.16±0.18
模型组	4.22±0.3**	1.51±0.08**	2.04±0.38**	0.75±0.1*
牛樟芝功能饮料组	2.86±0.39 ^{###}	1.21±0.07 ^{###}	1.4±0.15 [#]	0.97±0.09 [#]

注:与空白对照组比较, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; 与模型组比较, [#] $p < 0.05$; ^{###} $p < 0.01$ 。

2.8 牛樟芝微粉及其功能饮料对糖尿病小鼠肝脏中 AMPK 和 AKT 磷酸化水平的影响

AMPK 是动物体内能量代谢的关键调控因素。在肝脏和肌肉中, AMPK 的活化能增强脂肪酸的氧化作用以及对胰岛素的敏感性,抑制甘油三酯和胆固醇的

生成,减少能量代谢^[18,19]。而 AKT 也被报道与葡萄糖代谢以及糖尿病的发生和发展密切相关^[20,21]。从图 1 可知,与空白对照组相比,模型组小鼠肝脏中 AMPK α 和 AKT 磷酸化水平显著降低。而与模型组相比,牛樟芝微粉(高剂量)及其功能饮料灌胃均可使小鼠肝脏中 AMPK α 和 AKT 磷酸化水平基本恢复到正常状态,由此推测,该牛樟芝微粉及其功能饮料可能通过

激活 AMPK α 和 AKT 的方式来发挥降血糖以及改善血脂代谢的作用。

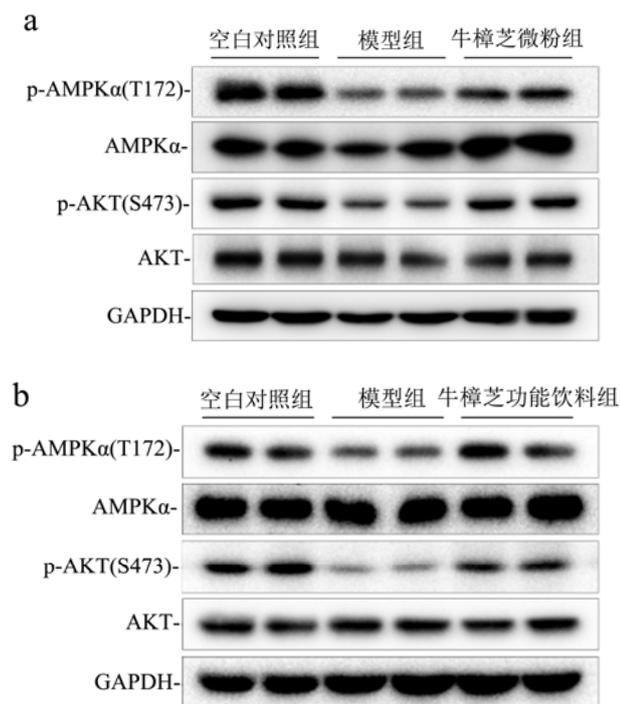


图1 牛樟芝微粉(a)及其功能饮料(b)对糖尿病小鼠肝脏中 AMPK α 和 AKT 磷酸化水平的影响

Fig.1 Effects of *Antrodia camphorata* powder (a) and its functional beverage (b) on the phosphorylation levels of hepatic AMPK α and AKT in diabetic mice

3 结论

3.1 目前,牛樟芝固态发酵的研究和开发还处于初步阶段。固态发酵具有用水少,成本低廉,低能源消耗以及高产等优点。与橡木栽培相比,固态发酵培养周期短且能获得具有接近野生牛樟芝功效的牛樟芝菌丝体,而与液态发酵相比,其在次级代谢产物,尤其是三萜类化合物的产生和累积方面有着明显的优势^[12]。本文建立了一种牛樟芝固态发酵法,并对培养所得牛樟芝的主要功效性成分进行含量分析,结果显示,该牛樟芝富含三萜类和多糖类化合物。此外,该固态发酵法生产成本低,培养周期较短,且对环境友好,故具有潜在的开发和应用前景。

3.2 酒精代谢失调所导致的氧化应激以及炎症等是造成酒精性肝病的重要原因^[1,14]。本文通过乙醇诱导的急性酒精肝损伤小鼠模型,探讨经培养基优化所得牛樟芝微粉的抗氧化及肝保护功效。由实验结果可知,乙醇诱导的急性肝损伤小鼠血清中 ALT 和 AST 活性以及 MDA 含量明显高于空白对照组小鼠,而 SOD、CAT 和 GSH-Px 活性则显著降低,表明模型组小鼠的

肝脏已发生严重的氧化性损伤,而中、高剂量牛樟芝微粉灌胃处理可降低 ALT 和 AST 活性,抑制 MDA 含量增加,同时提高 SOD、CAT 和 GSH-Px 活性,说明通过该固态发酵法所得牛樟芝微粉对过量摄入乙醇所致的小鼠急性肝损伤具有一定的预防保护作用,且是通过增强机体抗氧化能力,缓解氧化性损伤而实现。

3.3 糖尿病主要临床特征是持续性的高血糖状态,如不加以控制会导致多种急、慢性并发症的产生,因此,能否有效控制血糖水平与糖尿病并发症的发生密切相关^[6,22]。此外,血脂代谢紊乱在糖尿病患者中较为常见,具体表现为过高甘油三酯、总胆固醇以及低密度脂蛋白^[23]。STZ 是一种特异性的胰岛 β 细胞毒剂,可选择性破坏小鼠的胰岛 β 细胞,诱发小鼠高血糖,形成实验性糖尿病模型^[24]。从 STZ 诱导糖尿病小鼠的相关实验结果可以看到,中、高剂量牛樟芝微粉及其功能饮料均能有效降低糖尿病小鼠的空腹血糖值和糖耐量,同时抑制血清中 TC、TG 和 LDL 含量升高以及 HDL 含量降低,表明通过该固态发酵法所得牛樟芝微粉及其功能饮料具有辅助降血糖以及改善血脂代谢的功效。进一步的免疫印迹结果显示,该牛樟芝微粉及其功能饮料均能显著上调糖尿病小鼠肝脏中 AMPK α 和 AKT 磷酸化水平,揭示该牛樟芝微粉及其功能饮料可能是通过调控机体能量代谢相关因子的表达进而发挥对糖尿病小鼠保护作用。综上所述,本文建立并验证了一种能产出高质且培养周期较短牛樟芝的固态发酵法,且经该固态发酵法所得牛樟芝微粉具有护肝、降血糖以及改善血脂代谢紊乱功效,其作用机制可能与其能提高机体抗氧化能力、调控能量代谢相关因子的表达有关。同时,本文还为牛樟芝固态发酵研发做一定补充,也为相关功能产品的研发奠定了重要基础。

参考文献

- [1] 张志毕,张媛,于浩飞,等.余甘子提取物对小鼠急性酒精肝损伤的保护作用研究[J].食品工业科技,2017,38(5):350-355
ZHANG Zhi-bi, ZHANG Yuan, YU Hao-fei, et al. Protection and mechanism of extractum *phyllanthus emblica* on acute alcohol-induced liver injury in mice [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(5): 350-355
- [2] 王楠,杜双奎,冯宪超,等.枳椇乳酸菌发酵饮料对小鼠酒精肝损伤的保护作用[J].现代食品科技,2016,32(8):28-41
WANG Nan, DU Shuang-kui, FENG Xian-chao, et al. Protective effect of lactic acid-fermented beverage prepared from the peduncles of *Hovenia dulcis* on alcohol-induced liver damage in mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(8): 28-41

- [3] 童垣皓,蒙龙锡宇,赵亚蓉,等.四联活菌制剂 Bornlisy 对小鼠酒精性肝损伤的保护作用研究[J].现代食品科技,2018,34(1):5-12
TONG Yuan-hao, MENGLONG Xi-yu, ZHAO Ya-rong, et al. Protective effect of bornlisy on murine alcoholic-induced liver injury and mechanisms exploring [J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(1): 5-12
- [4] 赵云霞,陶明焯,陈光宇,等.鸡枞菌多糖对急性酒精肝损伤小鼠超微结构病理结构及 ADH2、ALDH2 mRNA 表达的影响[J].食品科学,2015,36(5):195-199
ZHAO Yun-xia, TAO Ming-xuan, CHEN Guang-yu, et al. Effects of polysaccharides from *Termitomyces albuminosus* on pathologic ultrastructure and gene expression of alcoholic liver injury in mice [J]. Food Science, 2015, 36(5): 195-199
- [5] Jayawardena R, Ranasinghe P, Galappaththy P, et al. Effects of zinc supplementation on diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis [J]. Diabetology & Metabolic Syndrome, 2012, 4(1): 1-12
- [6] 党兢兢,王伟,宋小宝,等.新型降血糖中药方剂对 STZ 诱导小鼠糖尿病的影响[J].贵州农业科学,2017,45(9):89-92
DANG Jing-jing, WANG Wei, SONG Xiao-bao, et al. Effects of a new hypoglycemic chinese herbal prescription on STZ induced diabetes mellitus in mice [J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2017, 45(9): 89-92
- [7] 陈体强,方忠王.珍稀药用菌樟芝研究现状与进展[J].食用菌学报,2003,10(4):55-60
CHEN Ti-qiang, FANG Zhong-wang. Current status and advances in the research and development of *Antrodia camphorata* [J]. Acta Edulis Fungi, 2003, 10(4): 55-60
- [8] Shao Y Y, Chen C C, Wang H Y, et al. Chemical constituents of *Antrodia camphorata* submerged whole broth [J]. Natural Product Research, 2008, 22(13): 1151-1157
- [9] Tzeng Y M, Geethangili M, Ling S T, et al. Purification of bioactive compounds from *Antrodia camphorata* and their pharmacological activities [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2009, 108: S23
- [10] Lee Y P, Tsai W C, Ko C J, et al. Anticancer effects of eleven triterpenoids derived from *Antrodia camphorata* [J]. Anticancer Research, 2012, 32(7): 2727-2734
- [11] Ao Z H, Xu Z H, Lu Z M, et al. Niuchangchih (*Antrodia camphorata*) and its potential in treating liver diseases [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2009, 121(2): 194-214
- [12] 夏永军,李炜疆,许赣荣.樟芝固态发酵产品活性代谢产物分析[J].食品与发酵工业,2011,37(8): 86-90
XIA Yong-jun, LI Wei-jiang, XU Gan-rong. Study and analysis on active components of *Antrodia camphorata* by solid state fermentation [J]. Food and Fermentation Industries, 2011, 37(8): 86-90
- [13] 王平,钱忠直.《中国药典》2010 年版编制大纲解读[J].药物分析杂志,2008,2:337-340
WANG Ping, QIAN Zhong-zhi. The readable explanation of the editorial outline of Chinese Pharmacopoeia 2010 edition [J]. Chin J Pharm Anal, 2008, 2: 337-340
- [14] Cederbaum A I, Lu Y, Wu D, et al. Role of oxidative stress in alcohol induce liver injury [J]. Archives of Toxicology, 2009, 83(6): 519-548
- [15] Zhang J K, Sun C D, Yan Y Y, et al. Purification of naringin and neohesperidin from Huyou (*Citrus changshanensis*) fruit and their effects on glucose consumption in human HepG2 cells [J]. Food Chemistry, 2012, 135(3): 1471-1478
- [16] Gupta S C, Siddique H R, Saxena D K, et al. Hazardous effect of organophosphate compound, dichlorvos in transgenic *Drosophila melanogaster* (hsp70-lacZ): induction of hsp70, anti-oxidant enzymes and inhibition of acetylcholinesterase [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2005, 1725(1): 81-92
- [17] Mohammadi M, Yazdanparast R. Methoxy VO-salen complex: In vitro antioxidant activity, cytotoxicity evaluation and protective effect on CCl4-induced oxidative stress in rats [J]. Food and Chemical Toxicology, 2009, 47(4): 716-721
- [18] 葛斌,谢梅林,顾振纶,等.AMPK 作为治疗 II 型糖尿病新靶点的研究进展[J].中国药理学通报,2008,24(5):580-583
GE Bin, XIE Mei-lin, GU Zhen-lun, et al. AMPK acts as a new target for the treatment of type II diabetes [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2008, 24(5): 580-583
- [19] 熊延路,王明星,韩勇,等.AMPK:细胞能量中枢[J].现代生物医学进展,2014,14(31):6190-6196
XIONG Yan-lu, WANG Ming-xing, HAN Yong, et al. AMPK: cellular energy centre [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2014, 14(31): 6190-6196
- [20] 迟毓婧,李晶,管又飞,等.PI3K-AKT 信号传导通路对糖代谢的调控作用[J].中国生物化学与分子生物学报,2010,26(10):879-885
CHI Yu-jing, LI Jing, GUAN You-fei, et al. PI3K/Akt signaling axis in regulation of glucose homeostasis [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2010, 26(10): 879-885
- [21] Gao Y F, Zhang M N, Wu T C, et al. Effects of D-Pinitol on insulin resistance through the PI3K/Akt signaling pathway in Type 2 diabetes mellitus rats [J]. Journal of Agricultural and

- Food Chemistry, 2015, 63(26): 6019-6026
- [22] 杨敏,丁晓雯,秦樱瑞,等.桑叶-苦瓜混合粉对糖尿病小鼠血脂的影响[J].现代食品科技,2017,33(8):12-18
YANG Min, DING Xiao-wen, QIN Ying-ru, et al. Effects of mulberry leaf and balsam pear mixed powder on blood lipid metabolism in diabetic mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(8): 12-18
- [23] 崔珏,李超,苏颖,等.鼠曲草总黄酮对糖尿病小鼠血脂代谢紊乱改善作用的研究[J].食品工业科技,2013, 34(22):324-327
CUI Jue, LI Chao, SU Ying, et al. Study on effect of the total flavonoids from *Gnaphlium affine* D.C.on metabolism of glucose and lipids in diabetic mice [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(22): 324-327
- [24] 韦立顺,许忠新,田河林,等.链脲佐菌素致小鼠糖尿病模型的建立与评价[J].中国实验诊断学,2013,17(5):806-808
WEI Li-shun, XU Zhong-xin, TIAN He-lin, et al. Evaluation and Establishment of Streptozotocin-induced diabetic model in mouse [J]. Chin J Lab Diagn, 2013, 17(5): 806-808