

人参 α -淀粉酶抑制肽的降血糖作用

杨雯¹, 邹佳琪¹, 刘胜楠¹, 刘士伟¹, 薛婷芳¹, 孟星坚¹, 于雷¹, 詹晓峰², 毕云枫^{1*}

(1. 吉林农业大学食品科学与工程学院, 吉林长春 130118)

(2. 吉林省宏久生物科技股份有限公司, 吉林通化 135118)

摘要: 通过采用高糖高脂饲料联合腹腔注射链脲佐菌素 (Streptozotocin, STZ) 构建小鼠 2 型糖尿病 (Type 2 Diabetes, T2DM) 模型, 建模成功后连续 4 周给药治疗 T2DM 小鼠, 以小鼠体质量、脏器指数、血糖、血脂、肝脏氧化应激反应、肝脏病理学检验结果作为参考指标, 探究人参 α -淀粉酶抑制肽对 T2DM 小鼠的降糖作用。结果表明, 阿卡波糖阳性组和人参 α -淀粉酶抑制肽各剂量组对小鼠的体重下降情况、高血糖情况均有不同程度的改善作用及调控效果, 所以人参 α -淀粉酶抑制肽各个剂量对 T2DM 小鼠具有降糖的效果。经过 4 周的治疗, 高剂量组血糖从建模后的 15.43 mmol/L 下降至 12.10 mmol/L 与阿卡波糖阳性组血糖从建模后的 15.71 mmol/L 下降至 10.17 mmol/L 结果相近, 且两组的小鼠肝脏损伤较轻, 说明高剂量的人参 α -淀粉酶抑制肽对 2 型糖尿病引发的肝脏损伤可起到明显的防护效果 ($P < 0.01$)。因此, 人参 α -淀粉酶抑制肽具有降血糖的作用和成为辅助治疗 2 型糖尿病产品或保健品的潜力。

关键词: 人参 α -淀粉酶抑制肽; 降血糖; 2 型糖尿病; 链脲佐菌素; 人参

文章编号: 1673-9078(2024)07-24-34

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.7.0397

Hypoglycemic Effects of Ginseng α -Amylase Inhibitory Peptides

YANG Wen¹, ZOU Jiaqi¹, LIU Shengnan¹, LIU Shiwei¹, XUE Tingfang¹, MENG Xingjian¹, YU Lei¹, ZHAN Xiaofeng², BI Yunfeng^{1*}

(1. College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

(2. Jilin Hongjiu Biotechnology Co. Ltd., Tonghua 135118, China)

Abstract: Mouse models of type 2 diabetes mellitus (T2DM) were constructed using a high-sugar and high-fat diet combined with an intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ). After successful modeling, T2DM mice were treated with drugs for four consecutive weeks. The body weight, organ index, blood glucose level, blood lipid level, hepatic oxidative stress response, and pathology test results of the liver were used as reference indicators to investigate the hypoglycemic effects of ginseng α -amylase inhibitory peptides on T2DM mice. The results showed that the acarbose positive group and the ginseng α -amylase inhibitory peptide groups (regardless of the dose) exhibited improvement and regulatory effects of different degrees in the body weight loss and hyperglycemia in mice. Furthermore, the effects were more obvious as the dose increased. Therefore, it was concluded that ginseng α -amylase inhibitory peptides have hypoglycemic effects on T2DM mice

引文格式:

杨雯, 邹佳琪, 刘胜楠, 等. 人参 α -淀粉酶抑制肽的降血糖作用 [J]. 现代食品科技, 2024, 40(7): 24-34.

YANG Wen, ZOU Jiaqi, LIU Shengnan, et al. Hypoglycemic effects of ginseng α -amylase inhibitory peptides [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(7): 24-34.

收稿日期: 2023-04-04

基金项目: 吉林省科技厅重点研发项目 (20210204179YY)

作者简介: 杨雯 (1999-), 女, 硕士, 研究方向: 长白山新资源食品开发, E-mail: yangwen990625@163.com

通讯作者: 毕云枫 (1976-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品酶学、功能性食品开发, E-mail: yunfeng5609@sohu.com

at all doses tested. After four weeks of treatment, the blood glucose level in the high-dose group decreased from 15.43 mmol/L right after modeling to 12.10 mmol/L. Similarly, the level in the acarbose-positive group declined from 15.71 mmol/L after modeling to 10.17 mmol/L. In addition, liver injury in both groups was less severe, indicating that a high dose of ginseng α -amylase inhibitory peptides could provide significant protection against T2DM-induced liver injury ($P < 0.01$). Hence, ginseng α -amylase inhibitory peptides were confirmed to have hypoglycemic effects proving their potential as dietary supplements or supplementary products for the treatment of T2DM.

Key words: ginseng α -amylase inhibitory peptide; hypoglycemic; type 2 diabetes ; streptozotocin; ginseng

人参肽由氨基酸组成, 极易被人体吸收。将人参蛋白用酶水解后, 大部分成为肽, 小部分成为氨基酸, 所以人体可能会以肽或氨基酸的形式吸收人参蛋白^[1,2]。对人参肽的研究, 最早出现于 20 世纪 60 年代, 德国科学家以人参为原料提取出了氨基酸及五个小肽, 并对其活性进行了研究^[3]。20 世纪 80 年代初, 各国学者均从人参中发现了人参肽, 但均未进行更为广泛及深入的探究。直至 20 世纪 90 年代后, 各国研究学者们对人参肽的组成成分、活性作用、结构鉴定等展开了部分研究^[4-8]。然而目前对人参肽的相关研究仍不全面、制备方法未统一且其相关活性及相应机制尚不明确, 因此, 本文将对具有 α -淀粉酶抑制活性的人参肽的降糖作用展开探究。

2 型糖尿病 (Type 2 Diabetes Mellitus, T2DM) 是一种以持续的高血糖为特点的代谢性疾病^[9]。糖尿病患者治疗目的是使其在空腹及餐后状态下将其血糖调节至正常水平, 其机理是通过抑制葡萄糖苷酶和淀粉酶对碳水化合物的水解, 进而延缓葡萄糖被肠道吸收。 α -淀粉酶抑制剂起到抑制人体 α -淀粉酶活性的作用, 通过抑制体内的淀粉水解过程, 达到降低人体血糖水平的目的, 因而 α -淀粉酶抑制剂在控制及治疗糖尿病上具有极大的潜力^[10]。目前, 治疗 2 型糖尿病的药物不胜枚举, 但它们固有的毒副作用是不可逆转的。因此, 从食物源性原料中提取出更为安全、温和、天然的降糖活性成分来调节血糖十分迫切^[11]。研究发现从植物蛋白当中制备出降糖肽, 对于辅助治疗糖尿病具有极大潜力。降糖肽具有活性高、稳定性强、易吸收、副作用少等优点^[12]。Wang 等^[13]利用核桃蛋白水解物治疗通过链脲佐菌素诱导的 T2DM 小鼠, 结果表明, 其能够显著降低小鼠空腹血糖值及血清中血脂水平, 说明核桃降糖肽可有效降低小鼠血糖, 同时兼具降血脂的能力。此外, 动物蛋白水解物同样具有优异的降糖

活性, Kilari 等^[14]研究发现骆驼奶蛋白水解物对糖尿病小鼠具有显著的降糖效果, 可明显增强 SOD 及 CAT 的活性。因此, 从食源性原料中制备出具有降血糖活性的降糖肽已被证实且有据可依, 也正逐步成为人参研究的热门之一^[15]。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人参 α -淀粉酶抑制肽, 主要成分为相对分子量 $< 1\ 000\ u$ 的小分子低聚肽 (质量分数 $> 90\%$), 由吉林省宏久生物科技股份有限公司提供; 阿卡波糖、链脲佐菌素, 上海源叶生物有限公司; 总蛋白定量、血清胰岛素、总胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白、总超氧化物歧化酶、还原型谷胱甘肽、丙二醛、过氧化氢酶等测定试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 生理盐水, 辽宁民康制药有限公司; 柠檬酸, 天津市光复科技发展有限公司; 柠檬酸钠, 北京化工厂; 4 wt.% 多聚甲醛通用型组织固定液, 北京生物科技有限公司; 普通维持饲料, 辽宁长生生物技术股份有限公司; 蔗糖, 大连亿久商贸有限公司; 猪油, 徐州市甜檬匠味香有限公司; 胆固醇、胆酸钠, 广州嘉业食品配料有限公司。

1.2 仪器设备与工具

BSA2202S 电子天平, 赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司; 安稳血糖测定仪, 三诺生物传感股份有限公司; 酶标仪, 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; Neofuge23R 台式高速冷冻离心机, 上海卢湘仪离心机有限公司。

1.3 实验动物

ICR 小鼠: 雄性, 清洁级, 70 只, 体质量 18~22 g, 成年。由辽宁长生生物技术股份有限公司提供 (动物许可证号: SCXK(辽)2020-0001)。

1.4 实验方法

1.4.1 人参 α -淀粉酶抑制肽的 α -淀粉酶活性抑制率测定

在 0.5 mL PBS 缓冲液加入 10 mg/mL 人参 α -淀粉酶抑制肽液 0.25 mL 和等体积的 1.5 U/mL α -淀粉酶溶液,于 37 °C 下水浴 10 min,再加入 0.5 mL 的 1% 可溶性淀粉溶液;另取 0.25 mL 的 10 mg/mL 人参 α -淀粉酶抑制肽和等体积的 1.5 U/mL α -淀粉酶溶液,加入到 0.5 mL PBS 溶液中,阳性对照以同体积 1.0 mg/mL 阿卡波糖代替,于 37 °C 水浴 10 min 后,再加入 0.5 mL 1 wt.% 可溶性淀粉溶液;充分混匀,反应 5 min 后,加入 1 mL DNS 试剂终止反应,沸水浴 10 min,降至室温后加入 5 mL 蒸馏水,于 540 nm 处测吸光度^[16,17]。公式如下:

$$B=1-\frac{A_3-A_4}{A_1-A_2}\times 100\% \quad (1)$$

式中:

B ——抑制率 (IR), %;

A_1 ——空白管的吸光度 OD_A ;

A_2 ——空白对照管的吸光度 OD_B ;

A_3 ——抑制管的吸光度 OD_C ;

A_4 ——抑制对照管的吸光度 OD_D 。

1.4.2 高糖高脂鼠粮配方

基础鼠粮: 63% (质量分数,下同),蔗糖: 20%,猪油: 15%,胆固醇 1.5%,胆酸钠: 0.5%。

1.4.3 T2DM小鼠建模

链脲佐菌素可对胰岛 β 细胞产生破坏作用,从而诱发机体出现糖尿病^[18]。将 70 只 ICR 雄性小鼠在温度为 (22±2) °C、湿度为 60%±10% 的环境下适应性饲养 7 d,动物房内每天进行 12 h 明暗交替,适应性饲养期间自由饮食,喂养普通饲料。适应期结束后,空白组小鼠继续喂养普通饲料,其余各组喂养高糖高脂饲料,自由饮水。4 周后,对除空白组的所有组进行腹腔注射充分溶解于 0.1 mol/L 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液中的链脲佐菌素 (40 mg/kg·bw),持续 3 d,每次注射后,禁食 2 h,达到构建优质实验模型的目的。链脲佐菌素 (Streptozotocin, STZ) 诱导结束 3 d 后,禁食 12 h,自由饮水,12 h 后,在小鼠尾尖采血,测定各组小鼠的空腹血糖值 (Fasting Blood Glucose, FBG),其中 FBG ≥ 11.1 mmol/L 的小鼠,即为初步造模成功,继续饲养一周,其余空腹血糖值未达标的小鼠再次进行上述诱导操作。直至测定出空腹

血糖值 FBG ≥ 11.1 mmol/L 的小鼠即为造模成功小鼠^[19,20]。提示,高糖高脂饲料辅助腹腔注射高剂量 STZ (100~200 mg/kg·bw),会严重破坏胰岛的功能,使得胰岛素分泌不足,从而引发 1 型糖尿病,因此,若要建立 2 型糖尿病模型,需采用小剂量 STZ (30~40 mg/kg·bw) 进行腹腔注射,因低剂量 STZ 仅会对部分的胰岛 β 细胞造成轻微损伤^[21]。因此,高糖高脂饲料与低剂量 STZ 共同诱导的 2 型糖尿病模型较为合理。高糖高脂饲料需喂养 T2DM 模型组小鼠持续整个实验周期。

1.4.4 分组与剂量

将造模成功后的鼠随机分为 6 组,依次为空白组 (Normal Group, NG),糖尿病模型组 (Diabetes Mellitus, DMG),阿卡波糖阳性组 (Positive Group),人参 α -淀粉酶抑制肽高 (High Dose Group)、中 (Medium Dose Group)、低 (Low Dose Group) 剂量组,按照图 1 剂量每日灌胃给药。

1.4.5 小鼠血糖、体质量及脏器指数测定

1.4.5.1 体质量测定及记录

建模期间及建模成功后,于固定时间间隔下对禁食 12 h 的小鼠进行空腹体质量的测量,观测各组小鼠的身体情况并记录,同时需根据体质量变化情况调整灌胃的剂量。

1.4.5.2 小鼠血糖测定

建模成功后,于固定时间间隔下对小鼠禁食 12 h,翌日对小鼠进行尾静脉采血测定各组小鼠的空腹血糖值,同时做好记录以便获悉各组小鼠血糖变化的趋势。

1.4.5.3 小鼠各脏器指数测定

对所有组小鼠于最后一次灌胃后,进行眼球取血操作,取血后安乐死,解剖后完整的取出其肝脏、肾脏、脾脏,对各脏器进行称重,根据各组小鼠的平均体质量,计算出各脏器的指数^[22],计算公式如下。

$$C=\frac{\bar{m}_1}{M} \quad (2)$$

$$D=\frac{\bar{m}_2}{M} \quad (3)$$

$$E=\frac{\bar{m}_3}{M} \quad (4)$$

式中:

C 、 D 、 E ——分别为脾脏指数 (SI)、肝脏指数 (LI)、肾脏指数 (RI), mg/g;

\bar{m}_1 、 \bar{m}_2 、 \bar{m}_3 ——分别为脾脏、肝脏、肾脏平均质量, mg;

M ——小鼠平均体质量, g。

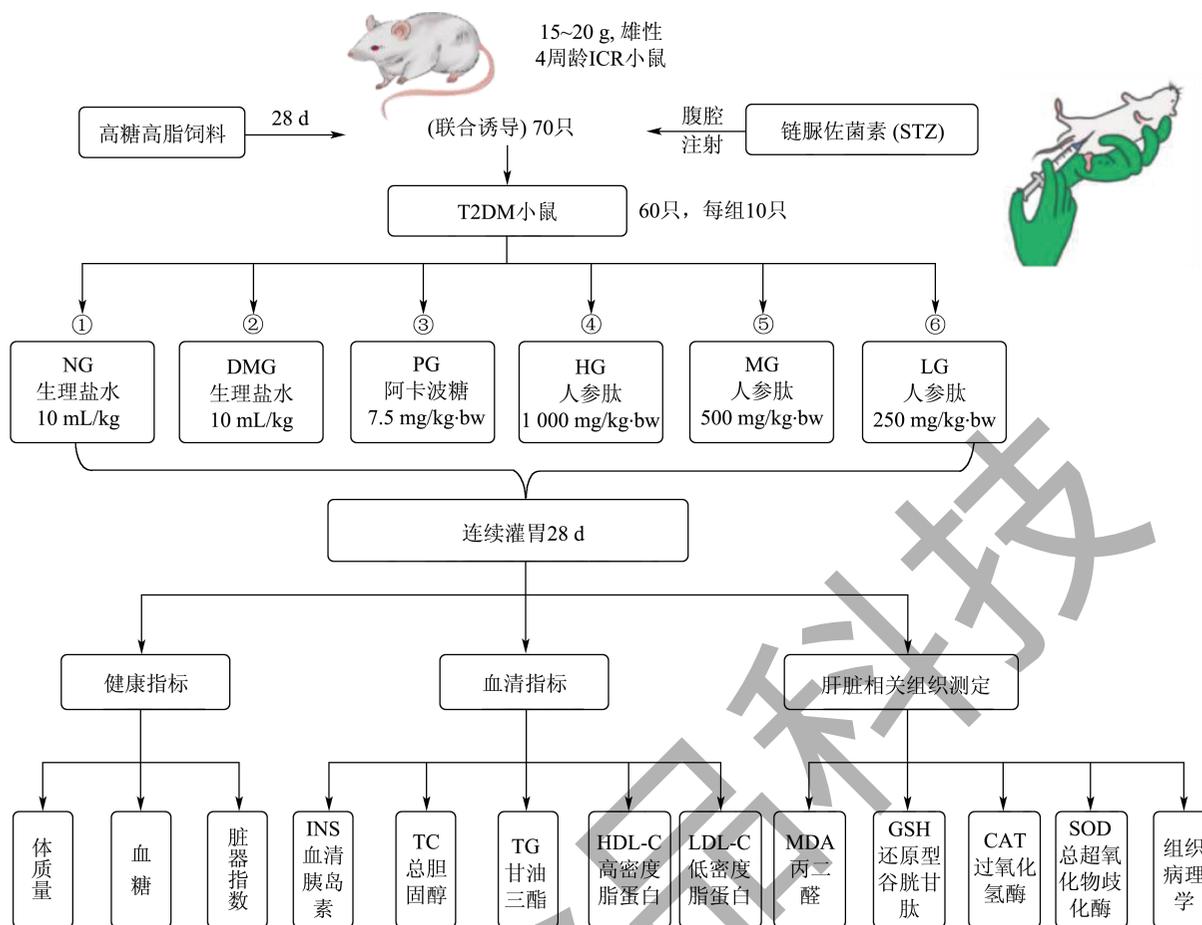


图 1 小鼠给药及分组设计流程图

Fig.1 Flow chart of mice administration and grouping design

注：图中“人参肽”即为“人参 α -淀粉酶抑制肽”。

1.4.6 血清指标测定

小鼠灌胃给药 28 d 后，禁食过夜、自由饮水，对小鼠进行眼球取血，取血量约 1 mL 左右，于室温下静置 25 min，于 4℃ 下 3 000 r/min 离心 10 min，取上清于 -80℃ 保存待用。用于小鼠血清相关指标的测定。

1.4.7 肝脏相关组织测定

小鼠眼球取血后断颈处死，解剖取其肝脏组织，分成两部分，一部分于 -80℃ 保存，用于肝脏氧化应激含量测定，另一部分用于组织病理学分析。制备 10% 肝脏匀浆组织液，用于 SOD、GSH、MDA、CAT 的测定。另一部分肝脏组织取适量后用冰冷的生理盐水清洗后，固定于 4% 的多聚甲醛溶液中，浸泡 24 h 以上，依次进行组织脱水、透明、浸蜡、包埋制成蜡块、石蜡切片脱蜡至水、苏木素染色、伊红染色、脱水封片等操作^[23]，最后进行肝脏组织病理学综合分析。

1.4.8 统计分析

每个实验均进行 3 次平行实验，数据采用“平均值 ± 标准差”的形式，使用 Origin 2021 作图及 SPSS 26.0 数据分析，并通过单因素方差分析和 Tukey 检验对数据进行统计评估，统计学显著性设定 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 。

2 结果与讨论

2.1 人参 α -淀粉酶抑制肽对 α -淀粉酶活性抑制率的测定结果

经计算人参 α -淀粉酶抑制肽对 α -淀粉酶的抑制率的测定结果为 51.82%，由此可知，人参 α -淀粉酶抑制肽对 α -淀粉酶具有较高的抑制活性，综上所述，人参 α -淀粉酶抑制肽具有一定的体外调节血糖活性，但还需进一步对人参 α -淀粉酶抑制肽的体内降糖作用进行探究。

表 1 人参 α -淀粉酶抑制肽对小鼠体质量的影响 (g)Table 1 Effect of ginseng α -amylase inhibitory peptide on body weight in mice ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	建模后体质量	治疗 1 w 体质量	治疗 2 w 体质量	治疗 3 w 体质量	治疗 4 w 体质量
NG	38.82 \pm 0.35	40.09 \pm 0.38	40.67 \pm 0.12	41.66 \pm 0.42	42.88 \pm 0.15
DMG	39.63 \pm 0.62	37.50 \pm 0.65 ^a	36.94 \pm 0.95 ^a	36.51 \pm 1.08 ^a	35.87 \pm 0.69 ^{ac}
PG	39.38 \pm 1.07	39.84 \pm 0.55 ^c	40.48 \pm 0.75 ^c	41.13 \pm 0.67 ^c	41.44 \pm 0.49 ^{bc}
HG	40.34 \pm 0.69	39.13 \pm 0.65 ^d	39.99 \pm 0.06 ^c	40.54 \pm 0.44 ^c	40.59 \pm 0.32 ^{ac}
MG	39.97 \pm 0.27	38.44 \pm 1.13 ^b	37.97 \pm 0.88 ^{acg}	38.53 \pm 0.59 ^{acg}	38.87 \pm 0.68 ^{acg}
LG	38.88 \pm 1.64	38.41 \pm 1.15 ^b	37.17 \pm 0.93 ^{acg}	38.11 \pm 0.92 ^{adcg}	38.41 \pm 0.90 ^{acg}

注: 与 NG 比较, a: $P < 0.01$, b: $P < 0.05$; 与 DMG 比较, c: $P < 0.01$, d: $P < 0.05$; 与 PG 比较, e: $P < 0.01$, f: $P < 0.05$; 与 HG 比较, g: $P < 0.01$, h: $P < 0.05$; 与 MG 比较, i: $P < 0.01$, j: $P < 0.05$ 。

2.2 人参 α -淀粉酶抑制肽对2型糖尿病小鼠的体质量影响

注射链脲佐菌素后大量小鼠出现毛发竖立、眼角出现分泌物、精神萎靡、饮水量增加、体重下降、多尿等症状, 这与小鼠未注射链脲佐菌素前的毛发亮泽、眼神明亮、精神振作、排尿量正常等情况形成鲜明对比, 由此可证明, 经诱导多数小鼠已患有 2 型糖尿病^[24]。继续喂养小鼠一周, 持续观测小鼠状况, 待其稳定后持续灌胃给药治疗, 记录小鼠从建模后至灌胃给药治疗 4 w 的体质量情况, 如表 1 所示。

由表 1 数据可知, 与 NG 组相比, DMG 组的小鼠体质量从建模后的 39.63 g 下降至 37.50 g, 下降幅度较大, 直至治疗结束体质量仍呈现下降的趋势 ($P < 0.01$), 降至 35.87 g, 下降率高达 10.48%, 说明 DMG 组小鼠糖尿病情况严重, 建模成功; 人参 α -淀粉酶抑制肽治疗组及 PG 组的小鼠体质量均有所下降或是无明显起伏, 随着治疗时间延长, PG 组和人参 α -淀粉酶抑制肽治疗组的小鼠体质量在治疗 4 w 后下降情况得到明显的改善 ($P < 0.01$)。治疗 4 w 后发现, PG 组体质量为 41.44 g, NG 组为 42.88 g, 两组体质量相近, 说明阿卡波糖治疗效果显著 ($P < 0.01$)。人参 α -淀粉酶抑制肽治疗组中, 高剂量组小鼠体质量上升最明显 ($P < 0.01$), 由建模后的 40.34 g 升至 40.59 g 虽说体质量涨幅较小但仍维持稳定且无下降趋势, 并与 PG 组小鼠的体质量最为接近。DMG 组与 NG、PG 及人参 α -淀粉酶抑制肽治疗组相比, 小鼠体质量持续降低 ($P < 0.01$)。何慧等^[25]研究消渴健脾胶囊对 60 名 2 型糖尿病肥胖患者体质量的影响, 结果表明, 2 型糖尿病肥胖患者体质量均有所下降, 其中, 治疗组体质量从治疗前的 84.70 kg 降至治

疗后的 80.03 kg, 明显优于对照组, 这也符合患有糖尿病后体质量减轻的症状。因此与之类比, 无论是患者还是实验动物患有 2 型糖尿病后均会体质量下降, 故本实验建模成功并符合实际, 说明人参 α -淀粉酶抑制肽对体质量的调控确有助益。由此可知, PG 组的阿卡波糖和人参 α -淀粉酶抑制肽治疗组对改善 2 型糖尿病小鼠体质量下降方面具有一定作用。

2.3 人参 α -淀粉酶抑制肽对2型糖尿病小鼠血糖的调节

空腹血糖是诊断 2 型糖尿病的常规指标, 其与血清胰岛素等指标相结合能够体现机体对血糖的调节能力^[26]。每周固定时间对小鼠空腹血糖进行测定, 人参 α -淀粉酶抑制肽对从建模后到治疗 4 w 的 2 型糖尿病小鼠的血糖调节情况如图 2 所示。

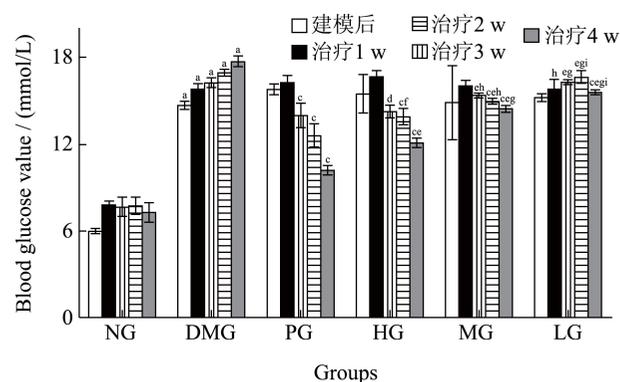


图 2 人参 α -淀粉酶抑制肽对 2 型糖尿病小鼠血糖调节作用
Fig.2 Effect of ginseng α -amylase inhibitory peptide on blood glucose regulation in type 2 diabetic mice ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

注: 与 NG 比较, a: $P < 0.01$, b: $P < 0.05$; 与 DMG 比较, c: $P < 0.01$, d: $P < 0.05$; 与 PG 比较, e: $P < 0.01$, f: $P < 0.05$; 与 HG 比较, g: $P < 0.01$, h: $P < 0.05$; 与 MG 比较, i: $P < 0.01$, j: $P < 0.05$, 下同。

由图2可知, 2型糖尿病小鼠DMG组与NG组相比, 其血糖值由建模后的14.65 mmol/L经过4 w升高至17.70 mmol/L, 呈现不断上升的趋势 ($P < 0.01$), 且未曾出现回落, 由此表明, 建模成功后续数据具有可靠性^[27]。对2型糖尿病小鼠治疗2 w时, 与DMG组相比, PG组表现出明显降糖效果 ($P < 0.01$), 即血糖值从15.71 mmol/L下降至13.95 mmol/L, 2 w内下降率可达12.62%; HG组降糖效果稍有体现 ($P < 0.05$), 即血糖值从15.43 mmol/L下降至14.22 mmol/L, 2 w内下降率为8.51%; 经过3 w的治疗, 与DMG组相比, PG组依旧表现出明显的降低血糖水平的能力 ($P < 0.01$), 血糖下降至12.60 mmol/L。HG组和MG组也体现明显降糖效果 ($P < 0.01$), 血糖分别下降至13.90 mmol/L、14.97 mmol/L, 但LG组未见效果; 经过4 w的治疗, 再次与DMG组相比, PG、HG、MG、LG组均可显著降低小鼠空腹血糖 ($P < 0.01$), 依次降至10.17、12.10、14.44、15.60 mmol/L, 4 w的治疗仍不能使血糖值与NG组的7.27 mmol/L相近, 但已趋近正常血糖值, 说明高和中剂量下的人参 α -淀粉酶抑制肽对降低小鼠空腹血糖水平效果显著, 而低剂量的人参 α -淀粉酶抑制肽随着治疗时间的延长也可体现出降糖作用。马红梅等^[28]通过探讨洋甘菊醇提取物对2型糖尿病模型小鼠血糖的影响, 其结果表明洋甘菊提取物具有较好的降血糖作用且随着剂量的升高降糖作用越强, 高剂量的提取物降糖率可达31.13%, 与本实验对血糖调节的结果相似。综上所述, 人参 α -淀粉酶抑制肽HG、MG组能有效降低小鼠血糖, 且与PG组治疗效果相近, LG组如若延长治疗时间, 也能体现出较好的降糖作用。

2.4 人参 α -淀粉酶抑制肽对2型糖尿病小鼠脏器指数的影响

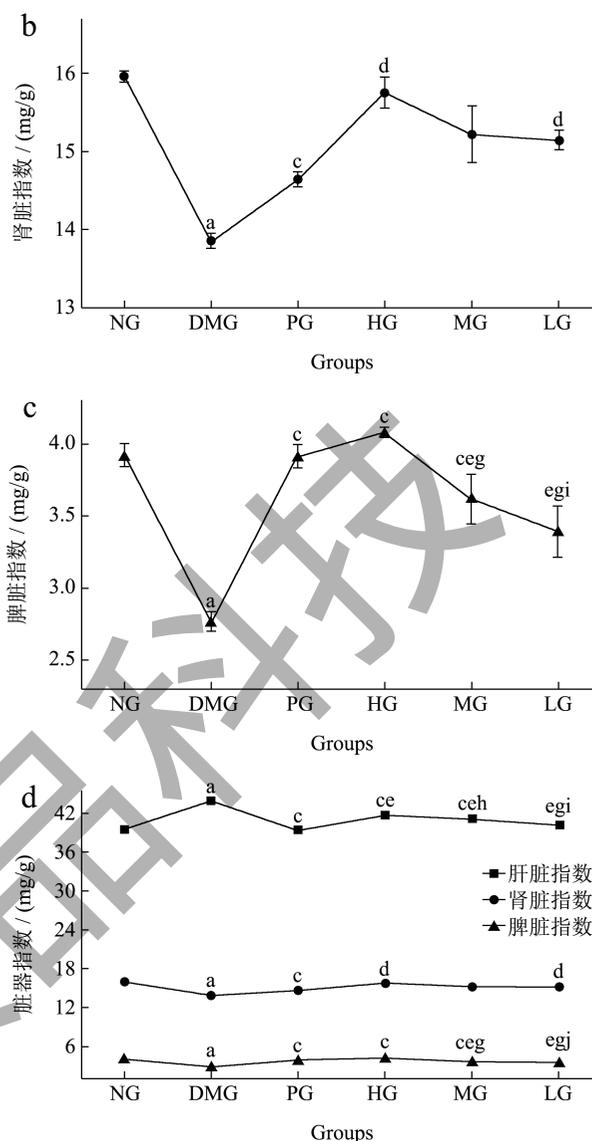
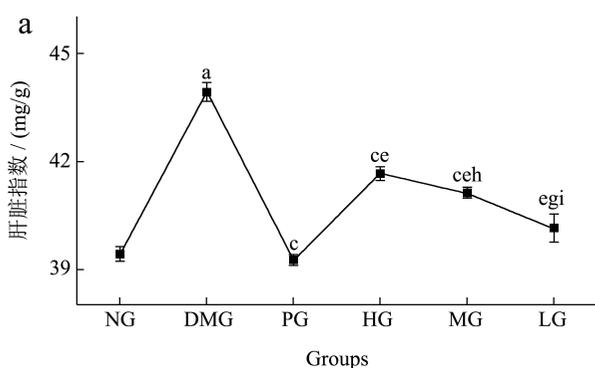


图3 人参 α -淀粉酶抑制肽对2型糖尿病小鼠脏器指数的影响

Fig.3 Effect of ginseng α -amylase inhibitory peptide on organ indices in type 2 diabetic mice

各组小鼠断颈处死后, 立即解剖, 取其肝脏、肾脏、脾脏并依次称重记录, 结果如图3所示。

从图3中可以看出, NG组肾脏指数为15.95 mg/g, 脾脏指数为3.92 mg/g, DMG组分别为13.84、2.76 mg/g, 与NG组相比, DMG组小鼠肾脏及脾脏指数均显著下降 ($P < 0.01$); NG组肝脏指数为39.42 mg/g, DMG组为43.93 mg/g, 肝脏指数显著升高 ($P < 0.01$), 其原因可能是在解剖时发现, DMG组小鼠的肾脏和脾脏相比于NG组明显较小且出现了粘连状况, 肝脏体积较大但整体发白、血色较浅, 这说明2型糖尿病小鼠的各个脏器发育情况受到了疾病的影响甚至有所损伤。党雅等^[29]采用

高脂高糖饮食联合腹腔注射链脲佐菌素 (STZ) 建立 2 型糖尿病小鼠模型后探讨蓝莓花青素 (BA) 对 2 型糖尿病小鼠肝肾组织损伤的改善作用, 结果表明模型组小鼠的肝脏、肾脏组织与正常组相比明显肿大, 经治疗后与模型组相比, 蓝莓花青素低、中、高剂量组肝肾脏器指数均明显下降, 高剂量组效果最好, 肝脏、肾脏指数分别下降了 15.38% 和 16.17%。与本实验不同之处在于, 本实验下的肾脏粘连萎缩, 这可能是由于小鼠患病后血糖极度不稳定, 导致肾脏供血不足, 萎缩变小, 而肾脏肿大则可能与长期的高糖高脂饮食有关, 使得肝脏、肾脏负担加重, 导致肝肾肿大, 因此, 即使是相似的建模方法对小鼠的各方面影响依旧是多样的。人参 α -淀粉酶抑制肽各剂量组和 PG 组均不同程度的改善了 2 型糖尿病小鼠的各脏器指数, 与 DMG 组相比, PG 组的肾脏、脾脏指数分别为 14.63、3.91 mg/g 均显著提升, 肝脏指数为 39.25 mg/g 明显下降 ($P < 0.01$); 人参 α -淀粉酶抑制肽 HG 组的脾脏指数为 4.08 mg/g 明显提高, 肝脏指数为 41.64 mg/g 明显下降 ($P < 0.01$), 肾脏指数为 15.75 mg/g 有所提高 ($P < 0.05$); 人参 α -淀粉酶抑制肽 MG、LG 组肝脏指数为 41.12、40.15 mg/g 有所下降 ($P < 0.05$); LG 组肾脏指数为 15.14 mg/g 有所升高 ($P < 0.05$)。综上所述, 人参肽各剂量组可有效降低肝脏指数且提升肾脏、脾脏指数, 因此人参 α -淀粉酶抑制肽可对 2 型糖尿病所造成的各脏器的损伤具有一定的缓解作用。

2.5 人参 α -淀粉酶抑制肽对 2 型糖尿病小鼠血脂相关指标的影响

糖尿病发展过程中经常伴有血脂代谢紊乱的情况^[30], 因此, 糖尿病与高血脂之间有着极强的相关性, 糖脂代谢紊乱时, 极易引发心脑血管疾病。患有 2 型糖尿病时, 常见的血清检查指标里通常总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、低密度脂蛋白 (LDL-C) 会出现高于正常值的情况, 而高密度脂蛋白 (HDL-C) 含量则会低于正常值^[31]。总胆固醇是指血液当中全部脂蛋白囊括的胆固醇的总和。甘油三酯是血脂的其一组成部分, 可为细胞代谢供能, 其指标与高甘油三酯血症、冠心病、动脉粥样硬化等疾病息息相关。低密度脂蛋白一般是指低密度脂蛋白胆固醇, 高密度脂蛋白则是通常指高密度脂蛋白胆固醇^[32]。人参 α -淀粉酶抑制肽对 2 型糖尿病小鼠血脂相关指标的影响如图 4 所示。

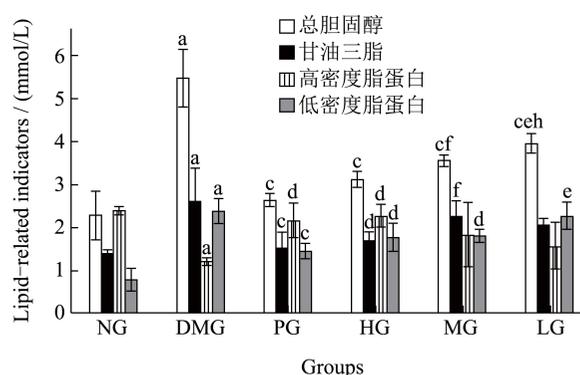


图 4 人参 α -淀粉酶抑制肽对 2 型糖尿病小鼠血脂相关指标的影响

Fig.4 Effect of ginseng α -amylase inhibitory peptide on lipid-related indicators in type 2 diabetic mice

由图 4 可知, NG 组小鼠的血清中 TC、TG 浓度为 2.30、1.40 mmol/L, 与 NG 组相比, DMG 组小鼠这两个指标的浓度为 5.47、2.60 mmol/L 显著性升高 ($P < 0.01$), 以上便表明 DMG 组的患病小鼠存在极其严重的血脂代谢异常的问题, 但当经过 4 w 的治疗后, PG 组和人参 α -淀粉酶抑制肽三个剂量的治疗组的 TC 浓度依次为 2.63、3.10、3.52、3.93 mmol/L, 与 DMG 组相比明显有所降低 ($P < 0.01$), 而对于 TG 浓度, PG 组其浓度为 1.50 mmol/L 表现出明显的治疗优势 ($P < 0.01$), HG 组为 1.70 mmol/L 其治疗效果较好 ($P < 0.05$), 而 MG 和 LG 组在降低血清中甘油三酯上无明显效果。低密度脂蛋白胆固醇是能引起心血管疾病的突出危险因素, 最明显的危害就是极易引发动脉粥样硬化。高密度脂蛋白常被称作“好胆固醇”, 它具有移除胆固醇的“能力”, 极大程度上可规避心肌梗塞、动脉粥样硬化的风险^[33]。由图 4 可见, NG 组小鼠血清中 LDL-C、HDL-C 浓度为 0.77、2.40 mmol/L, 与 NG 组相比, DMG 组糖尿病小鼠血清中 HDL-C 浓度为 1.20 mmol/L 显著降低, 而 LDL-C 浓度为 2.36 mmol/L 显著升高 ($P < 0.01$), 因此糖尿病小鼠的血脂代谢系统紊乱症状较为严重。不过在经过 4 w 的治疗后, 与 DMG 组相比, PG 组和 HG 人参 α -淀粉酶抑制肽治疗组其 HDL-C 浓度依次为 2.17、2.23 mmol/L 均出现较为明显的回升 ($P < 0.05$), PG、HG、MG 组的 LDL-C 浓度分别为 1.44、1.77、1.80 mmol/L 出现不同程度的下降 ($P < 0.05$), 逐步回归正常浓度水平。此结果与王娜等^[34]研究相似, 在相同的建模方法下, 研究青钱柳双瓜袋泡茶 (PDC) 对 2 型糖尿病小鼠血脂的影响, 结果表明经

过 4 w 的治疗, 其阳性对照组、PDC 中 / 高剂量组小鼠血清 LDL-C、TG、TC 水平均显著低于模型组, HDL-C 水平高于模型组。综上所述, 人参 α -淀粉酶抑制肽可改善 2 型糖尿病小鼠的血脂代谢紊乱情况, 且治疗效果方面, 高剂量的人参 α -淀粉酶抑制肽与阿卡波糖二者相近。

2.6 人参 α -淀粉酶抑制肽对 2 型糖尿病小鼠血清胰岛素水平 INS 的影响

2 型糖尿病发病是由于胰岛 β 细胞功能缺陷, 从而引起了不同程度的胰岛素 (Insulin, INS) 的缺乏及组织的 INS 抵抗^[35]。

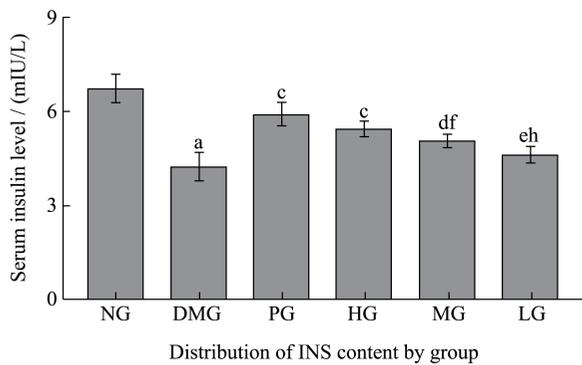


图 5 人参 α -淀粉酶抑制肽对 2 型糖尿病小鼠血清胰岛素水平影响

Fig.5 Effect of ginseng α -amylase inhibitory peptide on serum insulin levels in type 2 diabetic mice

如图 5 展示, NG 组 INS 浓度水平为 6.70 mIU/L, 与 NG 组相比, DMG 组小鼠 INS 水平为 4.20 mIU/L 显著性下降 ($P < 0.01$)。与 DMG 组相比, 各治疗组糖尿病小鼠治疗 4 w 后, PG 组和 HG 组 INS 水平为 5.90、5.47 mIU/L 显著性增加 ($P < 0.01$), 且两组间无显著性差异 ($P > 0.05$), 说明高剂量的人参 α -淀粉酶抑制肽治疗效果与阿卡波糖相近, 均可起到显著提高糖尿病小鼠血清胰岛素水平的效果。MG 组 INS 水平为 5.06 mIU/L, 与 DMG 组相比, 差异较显著 ($P < 0.05$), 说明人参 α -淀粉酶抑制肽中剂量组对提高糖尿病小鼠血清胰岛素水平也略有效果, 而 LG 与之相比则未见明显差异, 与陈文学等^[36]研究人参糖肽 (GPP) 对糖尿病气阴两虚模型大鼠胰岛素抵抗的影响的结果相似, 均是模型组小鼠血清胰岛素含量显著低于正常组, 各治疗组小鼠血清胰岛素浓度均明显高于模型组, 说明此实验结果符合实际情况, 具有一定的理论价值。综上结果表明, 高剂量的人参 α -淀粉酶抑制肽能有效提高糖尿病小鼠血清胰岛素水平, 从而起到降低 2 型糖尿病

小鼠体内血糖浓度的作用, 进而达到治疗小鼠 2 型糖尿病的目的。

2.7 人参 α -淀粉酶抑制肽对 2 型糖尿病小鼠肝脏氧化应激反应的影响

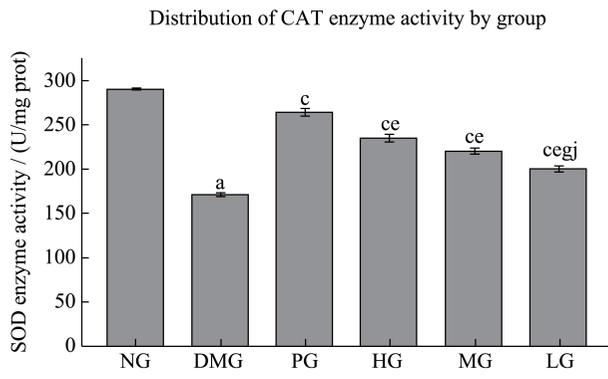
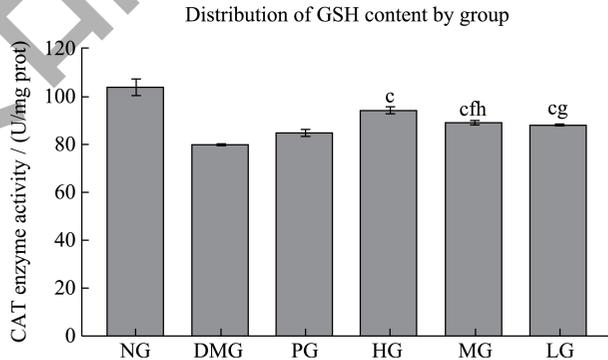
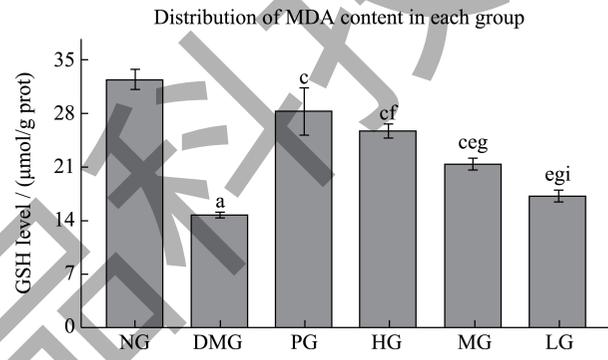
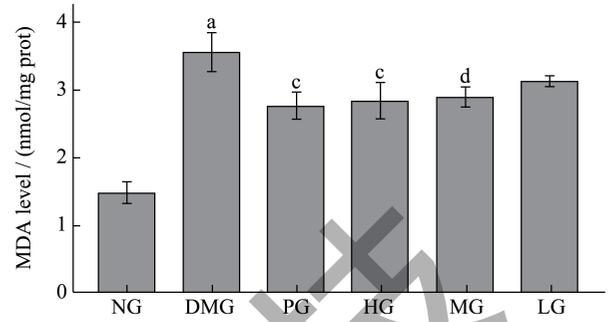


图 6 人参 α -淀粉酶抑制肽对 2 型糖尿病小鼠肝脏氧化应激的调节作用

Fig.6 Modulation of hepatic oxidative stress in type 2 diabetic mice by ginseng α -amylase inhibitory peptide

氧化应激与 2 型糖尿病的发展休戚相关, 研究表明在机体受到某些方面的刺激时, 便会打破体内的动态平衡, 使得机体生理状态紊乱从而发生氧化应激反应, 导致胰岛素分泌紊乱, 从而促使 T2DM 的发展及其各种并发症的出现^[37]。由此, 从降低氧化应激反应着手或许可以成为调节与治疗 T2DM 的突破口。丙二醛 (SOD) 含量的高低可直观体现出机体过氧化物的速度, 其含量是用于观测过氧化损伤的重要指标; 还原型谷胱甘肽 (GSH) 是机体中的一种重要还原剂; 过氧化氢酶 (CAT) 与 T2DM 紧密相关, 当出现糖尿病时, 机体内会出现 H_2O_2 浓度的升高而 H_2O_2 极具损害性便会通过损害特定的细胞, 导致胰岛素分泌变少, 使得糖尿病发生演化及加重; 超氧化物歧化酶 (SOD) 的作用主要是清除体内的氧自由基, 是对抗自由基的第一堵“防火墙”。因此如若 SOD 活性较高, 则对于清除体内多余的自由基大有裨益^[38]。

如图 6 所示, NG 组的 SOD、MDA、GSH、CAT 的指标数值为 290.29、1.47、32.36、103.81 U/mg 与 NG 组相较, DMG 组的 SOD、GSH 两个指标数值分别为 170.48、14.81 $\mu\text{mol/g}$ 表现为显著性下降 ($P < 0.01$), MDA 含量为 3.53 nmol/mg 显著性升高 ($P < 0.01$)。经过 4 w 的治疗后, 治疗组均出现不同程度调节效果。与 DMG 组相比, T2DM 小鼠的 MDA 含量, 伴随着 4 w 的给药治疗, PG、HG 组小鼠的 MDA 含量依次为 2.76、2.84 nmol/mg 明显下降 ($P < 0.01$), MG 组小鼠的 MDA 含量为 2.89 nmol/mg 有所下降 ($P < 0.05$), 且人参 α -淀粉酶抑制肽高、中剂量组与阳性对照组无显著差异 ($P > 0.05$)。人参 α -淀粉酶抑制肽三个剂量组对 MDA 的降低率分别为 19.55%、18.13%、11.30%, 对 GSH 含量的上升率分别是 73.12%、43.82%、16.27%。而与 DMG 组相比, T2DM 小鼠的 CAT 和 SOD 活力经过 4 w 的给药治疗, 人参 α -淀粉酶抑制肽的中、低两个剂量组对 CAT 活力的提升有显著影响 ($P < 0.01$), 结果依次为 89.20、88.05 U/mg。人参 α -淀粉酶抑制肽三个剂量组均对 SOD 活力的提升有显著的效果 ($P < 0.01$), 从 HG~LG 数值依次为 235.22、220.61、201.36 U/mg; 对 CAT 和 SOD 的活力分别增加了 17.13%、11.82%、11.44% 和 37.97%、29.41%、17.52%。因此, 人参 α -淀粉酶抑制肽可降低 T2DM 肝脏中的 MDA 含量, 提高 GSH 的含量及 CAT、SOD 的活力, 从而对 T2DM 小鼠肝脏氧化应激反应起到一定的调节作用, 使其

恢复正常水平。盛清凯通过对从苦瓜中提取出苦瓜降糖多肽 -P 进行分离纯化后研究其对肥胖型 2 型糖尿病大鼠的降糖功能。经过 10 w 的给药治疗, 结果显示苦瓜多肽 -P 可降低 2 型糖尿病模型大鼠肝脏的丙二醛浓度, 增强肝脏超氧化物歧化酶活力, 提高机体总抗氧化能力, 改善糖尿病的相关并发症^[39], 此结果与本实验对肝脏氧化应激反应的调节效果相似。

2.8 人参 α -淀粉酶抑制肽对 2 型糖尿病小鼠肝脏病理学的研究

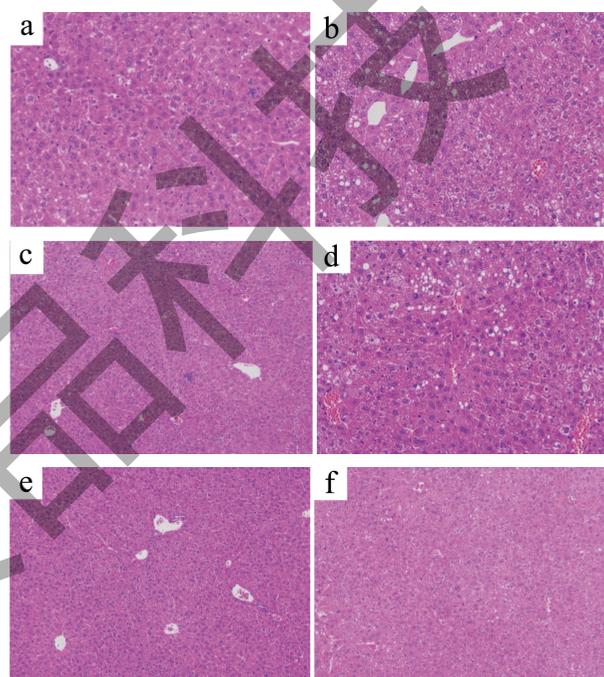


图 7 人参 α -淀粉酶抑制肽对小鼠肝脏组织病理学的影响

Fig.7 Effect of ginseng α -amylase inhibitory peptide on liver histopathology in mice

注: a 为 NG; b 为 DMG; c 为 PG; d 为 LG; e 为 MG; f 为 HG。

如图 7 所示, NG 组小鼠肝脏细胞边缘清晰、肝脏结构清晰、脂滴少、肝细胞呈放射状整齐分布、肝小叶形状正常。但 DMG 组小鼠肝脏组织细胞界线模糊、肝脏结构不清、有大量脂滴、肝细胞萎缩且肝索排列不明、静脉充血明显^[40,41]。以上现象则说明 T2DM 小鼠肝脏组织遭受严重损伤, 与何静等人探讨驼乳对 2 型糖尿病小鼠肝脏损伤的保护作用的各组肝脏情况类似^[42]。经过 4 w 的治疗, PG 组和高剂量组的 T2DM 小鼠肝脏细胞边缘恢复明显界限、肝脏结构变得清晰, 脂滴情况有所减少, 肝细胞数目也有所增加、充血现象有所缓解、肝索排列变得清晰; 中剂量组对以上现象稍有缓解, 而低剂

量组肝脏切片形态区域与 DMG 组无异。综上所述, 人参 α -淀粉酶抑制肽能有效缓解 T2DM 小鼠肝脏的损伤及演化, 对 2 型糖尿病造成肝脏的损伤具有一定的改善作用。

3 结论

通过连续 4 w 对健康小鼠饲喂高糖高脂饲料, 并以腹腔注射链脲佐菌素进行诱导, 从而形成 2 型糖尿病 (T2DM) 模型。建模成功后, 连续 4 w 对 T2DM 小鼠灌胃给药, 研究人参 α -淀粉酶抑制肽不同剂量组对 T2DM 小鼠健康指标、血糖、血脂相关指标及肝脏相关指标的影响。综上所述, 人参 α -淀粉酶抑制肽对 T2DM 小鼠所出现的体重下降, 脏器损伤等症状可起到一定的缓解作用, 并显著降低 T2DM 小鼠的空腹血糖水平同时明显提高其血清胰岛素水平, 进而增强小鼠胰岛素分泌的能力; 对 T2DM 小鼠的血脂代谢紊乱情况亦有所改善; 对肝脏氧化应激反应有一定的调节作用; 由肝脏病理学切片染色结果可知人参 α -淀粉酶抑制肽对 2 型糖尿病所造成的小鼠肝细胞损伤具有一定的减轻作用。因此, 人参 α -淀粉酶抑制肽具有成为辅助治疗 2 型糖尿病产品或保健品的潜力, 其具体作用机制还需进一步深入探究。

参考文献

- [1] 李红艳,张江华,张惠,等.人参总蛋白的酶解及氨基酸含量测定[J].中国现代中药,2016,18(1):72-75,81.
- [2] KIM H, KIM H W, YU K W, et al. Polysaccharides fractionated from enzyme digests of Korean red ginseng water extracts enhance the immunostimulatory activity [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 121: 913-920.
- [3] GSTIRNER F, VOGT H J. On peptides in white Korean ginseng [J]. Arch Pharm Ber Dtsch Pharm Ges, 1966, 299(11): 936-944.
- [4] ANDO T, MURAOKA T, YAMASAKI N, et al. Preparation of anti-lipolytic substance from Panax ginseng [J]. Planta Medica, 1980, 38(1): 18-23.
- [5] 魏俊杰,李平亚,曾向东,等.生晒参多肽的提取分离[J].白求恩医科大学学报,1990,5:436-438.
- [6] 朱苗力,余平,张华.人参多肽最低构象能计算分析[J].吉首大学学报(自然科学版),1992,2:20-24.
- [7] KAJIWARA H, HEMMINGS A M, SUZUKI M. Analysis of metal binding activities of pentadecapeptide from panax ginseng [C]// Peptide Chemistry: Symposium on Peptide Chemistry, 1996.
- [8] 滕宇,邱芳萍,严铭铭,等.人参多肽的分离纯化[J].长春工业大学学报(自然科学版),2005,3:181-183.
- [9] 刘晶,黄文娟,卢军,等.基于2型糖尿病小鼠模型探索生品黑豆、淡豆豉对二肽基肽酶-4活性的影响[J].世界中医药,2023,18(1):70-74,80.
- [10] 刘恩泽,张琦,王秋菊,等.谷物蛋白类 α -淀粉酶抑制剂及其功能特性的研究进展[J].食品研究与开发,2023,44(4): 215-224.
- [11] LI Y, ZHANG W, ZHAO R, et al. Advances in oral peptide drug nanoparticles for diabetes mellitus treatment[J]. Bioactive Materials, 2022, 15: 392-408.
- [12] 张廷新,李富强,张楠,等.降糖肽的制备、生物学效应及其构效关系研究进展[J].食品工业科技,2022,43(8):433-442.
- [13] WANG J, DU K, FANG L, et al. Evaluation of the antidiabetic activity of hydrolyzed peptides derived from Juglans mandshurica Maxim. fruits in insulin-resistant HepG2 cells and type 2 diabetic mice [J]. Journal of Food Biochemistry, 2018, 42(3): e12518.
- [14] KILARI B P, MUDGIL P, AZIMULLAH S, et al. Effect of camel milk protein hydrolysates against hyperglycemia, hyperlipidemia, and associated oxidative stress in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats [J]. Journal of Dairy Science, 2021, 104(2): 1304-1317.
- [15] 王逸,鲍勇刚,贾韦国,等.人参蛋白研究进展[J].中草药,2013,44(19):2782-2786.
- [16] 马二兰,林莹,涂连,等.芋头球蛋白的提取纯化及其对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制活性研究[J].食品工业科技,2021,42(14):25-32.
- [17] 叶凯,李小强,周金虎,等.响应面法酶解藜麦蛋白制备 α -淀粉酶抑制肽的工艺研究[J].中国调味品,2019,44(12): 6-11.
- [18] LV L, ZHANG D, SUN B, et al. Apocynum leaf extract inhibits the progress of atherosclerosis in rats via the AMPK/mTOR pathway [J]. Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences, 2017, 72(1): 41-48.
- [19] 朱小花.香蕉粉对II型糖尿病胰岛素抵抗的改善作用及其机制研究[D].广州:华南农业大学,2016.
- [20] 杨兵.拐枣多糖的分离纯化和结构解析及其降血糖活性研究[D].重庆:西南大学,2020.
- [21] 曾顺,熊悦,买文菊,等.链脲佐菌素诱导2型糖尿病大鼠年龄和剂量的相关性[J].西部医学,2021,33(5):665-669.
- [22] 王祖哲,马普,左爱华,等.刺参低聚肽对糖尿病小鼠降血糖作用的研究[J].食品研究与开发,2019,40(8):85-90.
- [23] YAN X, YANG C, LIN G, et al. Antidiabetic potential of green seaweed enteromorpha prolifera flavonoids regulating insulin signaling pathway and gut microbiota in type 2 diabetic mice [J]. Journal of Food Science, 2019, 84(1): 165-173.

- [24] CHEN P, ZHANG Q, DANG H, et al. Antidiabetic effect of lactobacillus casei CCFM0412 on mice with type 2 diabetes induced by a high-fat diet and streptozotocin [J]. *Nutrition*, 2014, 30(9): 1061-1068.
- [25] 何慧,王丽芳,马丹,等.消渴健脾胶囊对2型糖尿病肥胖患者体重,血清瘦素的影响[J].*新疆中医药*,2020,38(4):8-10.
- [26] 刘迪迪,邱军强,张华,等.红松松仁提取物对糖尿病小鼠的降血糖活性[J].*中国食品学报*,2019,19(7):20-28.
- [27] CHEN Y, LIU D, WANG D, et al. Hypoglycemic activity and gut microbiota regulation of a novel polysaccharide from grifola frondosa in type 2 diabetic mice [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2019, 126: 295-302.
- [28] 马红梅,王莹,兰卫.洋甘菊提取物对2型糖尿病小鼠血糖的影响及其抗氧化作用研究[J].*上海中医药杂志*,2020, 54(8):77-82.
- [29] 党娅,尤丽,杨彬彦.蓝莓花青素对2型糖尿病小鼠肝、肾损伤的改善作用[J].*食品工业科技*,2022,43(20):387-394.
- [30] 左婕,费焯,李佳慧,等.苦荞活性肽P3对链脉佐菌素诱导的糖尿病小鼠的改善作用研究[J].*食品研究与开发*, 2022,43(15):48-54.
- [31] 付王威,吴睿婷,万敏,等.白扁豆非淀粉多糖对II型糖尿病大鼠的降血糖降血脂作用[J].*现代食品科技*,2021, 37(8):1-7,35.
- [32] SANTOS H O, EARNEST C P, TINSLEY G M, et al. Small dense low-density lipoprotein-cholesterol (sdLDL-C): Analysis, effects on cardiovascular endpoints and dietary strategies [J]. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 2020, 63(4): 503-509.
- [33] HOSEINI A, NAMAZI G, FARROKHIAN A, et al. The effects of resveratrol on metabolic status in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary heart disease [J]. *Food & Function*, 2019, 10(9): 6042-6051.
- [34] 王娜,林彩霞,徐李玲,等.青钱柳双瓜袋泡茶对2型糖尿病小鼠血糖、血脂与肝肾功能的影响及机制研究[J].*广西医科大学学报*,2019,36(12):1889-1894.
- [35] 庞国明,吕志刚,叶乃菁,等.现代中药复方治疗糖尿病及其并发症相关机制研究进展[J].*江西中医药*,2020,51(5): 70-73.
- [36] 陈文学,杨铭,于德伟,杨明.人参糖肽对糖尿病气阴两虚证大鼠降血糖作用及其机制研究[J].*中国药理学杂志*, 2014,49(21):1903-1907.
- [37] 陈雪.电针对糖尿病大鼠多器官的SOD、MDA、CAT的影响[D].成都:成都体育学院,2022.
- [38] YANG H, YANG T, HENG C, et al. Quercetin improves nonalcoholic fatty liver by ameliorating inflammation, oxidative stress, and lipid metabolism in db/db mice [J]. *Phytotherapy Research*, 2019, 33(12): 3140-3152.
- [39] 盛清凯.苦瓜降糖多肽-P的分离纯化及降糖机理研究[D].无锡:江南大学,2005.
- [40] XU J, NAN L, WANG J, et al. Effect of metformin on the expression of SIRT1 and UCP2 in rat liver of type 2 diabetes mellitus and nonalcoholic fatty liver [J]. *Journal of Central South University. Medical Sciences*, 2013, 38(9): 882-887.
- [41] 张廷新,李富强,张楠,等.降糖肽的制备、生物学效应及其构效关系研究进展[J].*食品工业科技*,2022,43(8):433-442.
- [42] 何静,高婉婷,海勒,等.驼乳对2型糖尿病小鼠肝脏损伤的保护作用[J].*中国食品学报*,2019,19(7):36-41.