

乌贼墨汁黑色素对链脲佐菌素诱导的糖尿病模型小鼠糖脂代谢的调节作用

董 慧, 王春琳, 宋微微*, 母昌考, 李荣华

宁波大学应用海洋生物技术教育部重点实验室 浙江海洋高效健康养殖协同创新中心, 宁波 315211

摘要: 为了研究乌贼墨汁黑色素(Sepia ink melanin, SIM)对糖尿病模型小鼠糖脂代谢的调节作用, 采用腹腔注射链脲佐菌素(STZ)诱导糖尿病小鼠模型, 随机分为4组即正常组, 模型组和乌贼墨汁黑色素组(120, 480 mg/kg), 每组10只, 其中正常组和模型组灌胃等量的生理盐水。实验期间测定小鼠空腹血糖值, 进食、进水量, 体重变化量, 葡萄糖耐受性; 连续给药4周后, 分别检测小鼠空腹血糖(FBG)、糖化血红蛋白(HbA1c)、糖化血清蛋白(GSP)、空腹血清胰岛素(INS)及胰岛素抵抗指数(HOMA-IR), 血脂相关指标。结果表明, 与模型组相比, 乌贼墨汁黑色素组可明显改善糖尿病模型小鼠的糖代谢水平, 促进胰岛素的分泌, 血脂相关指标显著下降, 且作用强度与黑色素浓度呈正相关。综合分析可见, 乌贼墨汁黑色素可以通过控制糖尿病模型小鼠血糖浓度和胰岛素抵抗途径, 抑制血脂代谢异常, 起到改善糖尿病相关指标的作用。

关键词: 黑色素; 糖尿病; 胰岛素抵抗指数; 糖化血红蛋白; 糖化血清蛋白

中图分类号: Q965.1

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.7.005

Regulation Effects of Sepia Ink Melanin on Glucose-Lipid Metabolism in Streptozotocin-induced Diabetic Mice

DONG Hui, WANG Chun-lin, SONG Wei-wei*, MU Chang-kao, LI Rong-hua

Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, School of Marine Science, Ningbo University;

Collaborative Innovation Center for Zhejiang Marine High-efficiency and Healthy Aquaculture, Ningbo University, Ningbo 315211, China

Abstract: In this study, the effects of sepia ink melanin (SIM) on glucose-lipid metabolism in diabetics mice induced by streptozotocin were investigated. Mice were randomly divided into 4 groups [normal group, model group, melanin (120, 480 mg/kg) groups] with 10 mice in each group. Animals were gavaged with SIM or equal volume saline. After 4 weeks, a series of index were measured including glycated hemoglobin (HbA1c), glycosylated serum protein (GSP), fasting blood glucose, food intake, water intake, oral glucose tolerance test, serum insulin and insulin resistance index. The results showed that SIM significantly alleviated the level of glucose-lipid metabolism, and promoted the secretion of insulin in diabetic mice. In conclusion, sepia melanin ink (SIM) can ameliorate the symptom of diabetic mice through controlling blood sugar concentration, promoting the secretion of insulin and regulating glucose-lipid metabolism disorder.

Key words: melanin; diabetes; insulin resistance index; HbA1c; GSP

乌贼 (*Cuttlefish*) 俗称墨鱼, 属于软体动物门 (*Phylum Mollusca*)、头足纲 (*Class Cephalopode*)、乌贼目 (*Sepioidea Naef*) 的海洋动物^[1]。乌贼具有较高的营养价值, 起初, 仅乌贼肉被作为可食部分 (约占 80%), 内脏、皮及墨汁均视为加工废弃物, 不仅造成了资源浪费, 而且严重污染环境; 20 世纪末, 自日

本学者 Takaya Y^[2] 等证实“乌贼墨含有抗肿瘤活性物质”后, 乌贼墨在日本成为了保健品的重要原料之一。目前, 关于乌贼墨的研究已趋成熟, 且研究对象多为墨汁整体或其中的多糖、多肽, 而作为墨汁中含量最多的活性物质—黑色素, 关于它的结构和生理活性研究也逐渐展开。

乌贼墨汁黑色素是由 5:1 比率的 5,6-二羟基吡啶 (DHI) 和 5,6-二羟基吡啶-2 羧酸 (DHICA) 高度交联而成的寡聚体单元组成的直径为 100 ~ 200 μM 的微小颗粒聚集而成^[3]。已有研究表明, 黑色素因其成分中存在 -COOH、-NH₄ 和 -OH, 具有有效的清除

收稿日期: 2016-11-10 接受日期: 2017-03-10

基金项目: 浙江省自然科学基金 (LQ12C19002); 浙江省公益性项目 (ZX2013000403); 宁波大学“水产”重中之重学科开放基金; 宁波市重大农业专项 (201401C1111001); 大学生创新孵化项目 (2016R405096)

* 通信作者 Tel: 86-013567900194; E-mail: songweiwei@nbu.edu.cn

自由基^[4],螯合重金属离子的功能^[5],另外,本实验室前期研究发现,乌贼墨汁黑色素(SIM)能很好地清除D-半乳糖所致的衰老模型小鼠体内积累的过氧化物,有较强的抗氧化作用^[6];降低糖基化模型小鼠体内的AGES及其受体水平,缓解免疫低下模型小鼠炎症反应^[7]。雷敏等^[8]发现鱿鱼墨黑色素能够对实验性高脂血症小鼠脂代谢紊乱起调节作用,王光等^[9]发现组成黑色素的单体成分在长期高糖环境下易失去电子,发生氧化还原反应,有效的拮抗了高糖并发症的侵害,这为黑色素能够调节糖尿病引起一系列氧化性并发症奠定了理论基础。因此,本实验基于先前的研究,首次采用乌贼墨黑色素处理STZ诱导的糖尿病模型小鼠,通过检测处理后的糖尿病模型小鼠的体重,进食、进水量,空腹血糖(FBG),葡萄糖耐受量(OGTT),胰岛素含量(Ins),胰岛素抵抗指数(IR),糖化血红蛋白(HbA1c),糖化血清蛋白(GSP)和血脂代谢指标的影响,评估黑色素调节脂代谢紊乱的效果,也将为最大限度的合理开发这种黑色海洋废弃物资源提供理论依据。

1 材料与仪器

1.1 乌贼墨囊

冰冻乌贼(规格 285.4 ± 75.6 g),购于福建省宁德市公众菜市场,解剖收集墨囊低温保存。

1.2 实验动物

ICR健康雄性小鼠50只,体重 23.9 ± 3.6 g,由浙江省动物中心提供,合格证号:SCXK(浙)2014-0001。

1.3 主要试剂与仪器

链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)(Sigma公司),碱性蛋白酶(solarbio公司),小鼠糖化血红蛋白A1c ELISA检测试剂盒、小鼠糖化血清蛋白GSP ELISA检测试剂盒、小鼠胰岛素(INS) ELISA检测试剂盒(上海雅吉生物科技有限公司);强生稳择易血糖仪及配套血糖试纸[强生(中国)医疗器材有限公司];血液自动生化分析仪(宁波大学附属医院);FreeZone4.5台式冷冻干燥机(Labconco公司);Spectra max190酶标仪(molecular devices公司),UV-2201型紫外可见分光光度计(Shimadzu)。

2 实验方法

2.1 糖尿病小鼠的制备

随机选10只为正常组,其余40只均为模型组。小鼠禁食不禁水12 h,连续两天腹腔注射45 mg/kg

剂量的STZ溶液(用pH4.2的0.1 mol/L柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液在冰浴中新鲜配制),正常组注射等体积的缓冲液。为了防止小鼠休克,在注射链脲佐菌素之前给小鼠灌胃10%的葡萄糖溶液,72 h后对造模小鼠禁食不禁水8 h,剪尾采血测定空腹血糖,以血糖值高于11.1 mmol/L的小鼠为模型建造成功。

2.2 分组及灌胃

选取造模成功的小鼠30只,随机分为糖尿病模型组、乌贼墨汁黑色素低(SIM-L,120 mg/kg)、高剂量组(SIM-H,480 mg/kg),各10只,分笼饲养、暂养1 w后,正常组和模型组灌胃生理盐水,其余2组按预设实验的浓度给予灌胃,灌胃体积为10 mL/kg,连续4 w,期间小鼠自由进食、饮水,同时每日观察小鼠一般行为状态,每周测定1次体重和血糖,期间无小鼠死亡现象,给药结束后测定小鼠12 h的进食、进水量。

2.3 乌贼墨汁黑色素的制备和检测

参考酶法提取黑色素实验^[10],优化本实验室已有的黑色素提纯方案^[11],采用酶解法提纯所得高浓度乌贼墨汁黑色素,主要的工艺流程如下:挤压冲洗乌贼墨囊,获得墨汁,三层纱布过滤、防止混入破碎组织,重复2次离心(8000 rpm,10 min),冷冻干燥得黑色素粗品,用碱性蛋白酶精提黑色素,2%的粗品黑色素和1.5%的碱性蛋白酶在碱性(pH 10.3),温度为50 °C酶解4~5 h,获得的酶解产物离心6次(6000 rpm,10 min),冷冻干燥,获得高纯度乌贼墨汁黑色素(检测黑色素在222.5 nm处有较高的吸光值),4 °C冰箱保存备用。

2.4 血液指标检测

2.4.1 小鼠生理指标测定

每天观察小鼠生长、活动情况,测定小鼠进食和进水量;每周测定一次小鼠体重。

2.4.2 小鼠空腹血糖(FBG)浓度测定

在对小鼠实施灌胃的第0、1、2、3、4 w对小鼠禁食不禁水8 h,断尾尖取血5 μ L,测定小鼠空腹血糖浓度。(注:断尾尖后用酒精棉擦拭进行消毒处理,更换消毒过的笼子和干净垫料,防止感染。)

2.4.3 小鼠葡萄糖耐受性测定

末次给药后,小鼠禁食不禁水8 h,灌胃葡萄糖溶液(浓度为15%),灌胃后分别于0、0.5、2 h取血(同2.4.2方法),测定各时刻血糖值,并按公式计算葡萄糖曲线下面积(Area under curve, AUC) $AUC = 1/4(\text{空腹血糖值} + 2 \times 0.5 \text{ h 血糖值} + 3 \times 1 \text{ h 血糖值}) + 2 \text{ h 血糖值}$ 。

2.4.4 糖化血红蛋白的测定

末次给药后,所有小鼠禁食不禁水 8 h,乙醚麻醉后,眼球取血 500 μL 置于肝素钠抗凝管中,参照小鼠糖化血红蛋白 ELISA 试剂盒方法测定糖化血红蛋白含量。

2.4.5 糖化血清蛋白的测定

参照 2.4.4 取上清。按照小鼠糖化血清蛋白 ELISA 试剂盒检测糖化血清蛋白含量。

2.4.6 血清胰岛素(INS)含量测定及胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)的计算

末次给药后,动物禁食不禁水 8 h,用全自动血糖仪及配套试纸测定小鼠尾静脉血血糖值,同时用全自动生化分析仪测定血清胰岛素,计算胰岛素抵抗指数,公式如下:

胰岛素抵抗指数 = 血清葡萄糖值 (mmol/L) \times 血清胰岛素值 (mIU/L) / 22.5

2.4.7 血脂相关指标测定

同 2.4.4,取上清。采用宁波大学附属医院全自动生化分析仪检测血脂相关指标:甘油三酯(TG)、总

胆固醇(TC)、低密度脂蛋白(LDL-C)的含量。

2.5 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据分析采用 SPSS 软件 13.0 统计处理。组间差异采用单因素方差(One-Way ANOVA)分析,以 $P < 0.05$ 为具有统计学显著差异; $P < 0.01$ 为极显著差异。

3 实验结果

3.1 乌贼墨黑色素对各组小鼠体重变化及灌胃 4 w 后进食、进水量的影响

建模后观察小鼠毛色发黄、笼子垫料潮湿出现“多尿”症状,在实验过程中,每天灌胃一定量的乌贼墨汁黑色素,每周测定各组小鼠体重,计算灌胃前后体重变化量(表 1);连续 4 w 后,测定各组小鼠 12 h 进食、进水量(表 2),与模型组相比,灌胃黑色素的糖尿病小鼠的进食、进水量均有所减少。糖尿病组小鼠的进食、进水量明显高于正常组,且体重减轻,符合糖尿病“三多一少”现象。

表 1 灌胃乌贼墨黑色素 4 w 小鼠体重及体重变化量的测定 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 The measure of body weight and body weight change in mice every week ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg · d)	0 w (g)	1 w (g)	2 w (g)	3 w (g)	4 w (g)	变化量 Body weight change (g)
正常组 Normal	-	36.8 \pm 1.6	38.0 \pm 1.5	39.9 \pm 1.5	41.5 \pm 1.8	43.5 \pm 1.2	6.7 \pm 1.4 **
模型组 Model	-	36.2 \pm 1.2	35.9 \pm 1.3	34.7 \pm 1.4	35.0 \pm 1.8	32.2 \pm 2.6	-4.0 \pm 1.6
黑色素低 SIM-L	120	37.0 \pm 1.3	37.1 \pm 2.0	37.2 \pm 1.7	37.0 \pm 1.5	37.5 \pm 1.4	0.4 \pm 0.4 **
黑色素高 SIM-H	480	35.7 \pm 1.4	36.2 \pm 1.6	37.0 \pm 1.4	37.7 \pm 1.6	38.0 \pm 1.9	2.3 \pm 0.6 **

注:与模型组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus Model group.

表 2 给药 4 w 后,乌贼墨黑色素对各组小鼠 12 h 进食、进水量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of Sepia ink melanin on food intake, water intake in mice after 4 weeks ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg · d)	12 h 进食量 Food intake (g)	12 h 进水量 Water intake (mL)
正常组 Normal	-	6.93 \pm 0.32 **	6.23 \pm 0.21 **
模型组 Model	-	12.77 \pm 0.25 ^{##}	16.37 \pm 0.60 ^{##}
黑色素低 SIM-L	120	8.67 \pm 0.70 **	14.93 \pm 0.71 **
黑色素高 SIM-H	480	7.07 \pm 0.99 **	12.87 \pm 0.75 **

注:与模型组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与正常组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus Model group; [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$ versus Normal group.

3.2 乌贼墨黑色素对空腹血糖的影响

表 3 显示在灌胃黑色素之前,模型组空腹血糖浓度和正常组相比明显升高 ($P < 0.01$);在灌胃 1 w 后,高剂量组空腹血糖和模型组相比下降 8.75% ($P < 0.05$);灌胃 2、3、4 w 后,高剂量组空腹血糖与模型组相比分别下降了 14.8%、23.9%、22.4% ($P <$

0.01);黑色素低剂量组前三周与模型组相比,虽然都有下降,但差异不显著,灌胃 4 w 后,相比模型组下降 8.23% ($P < 0.05$)。由此可见,乌贼墨汁黑色素高剂量组对糖尿病小鼠短期的血糖水平具有良好的控制作用,但不能使小鼠的空腹血糖恢复至正常水平。

表3 乌贼墨黑色素对糖尿病模型小鼠空腹血糖值(FBG)的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 3 Effects of Sepia ink melanin on FBG in diabetic mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg · d)	空腹血糖 FBG (mmol/L)				
		0 w	1 w	2 w	3 w	4 w
正常组 Normal	-	5.8 ± 0.59 ^{**}	6.8 ± 0.37 ^{**}	7.1 ± 0.39 ^{**}	7.2 ± 0.98 ^{**}	7.1 ± 0.59 ^{**}
模型组 Model	-	24.2 ± 0.49 ^{##}	24.0 ± 0.88 ^{##}	24.3 ± 1.08 ^{##}	25.5 ± 1.56 ^{##}	25.5 ± 1.32 ^{##}
黑色素低 SIM-L	120mg/kg	24.1 ± 1.08 ^{##}	24.4 ± 1.60	24.1 ± 2.04	23.8 ± 1.92	23.4 ± 1.54 [*]
黑色素高 SIM-H	480mg/kg	25.7 ± 1.69 ^{##}	21.9 ± 2.42 [*]	20.7 ± 2.21 ^{**}	19.4 ± 3.06 ^{**}	17.8 ± 1.84 ^{**}

注:与模型组相比,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与正常组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。

Note: ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ versus Model group; [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$ versus Normal group.

3.3 乌贼墨黑色素对糖尿病小鼠葡萄糖耐量(OGTT)的影响

结果如表4所示,与正常组相比,模型组小鼠在灌胃葡萄糖0.5、1、2 h后显著升高($P < 0.01$),曲线下面积也显著增大($P < 0.01$)。与模型组相比,经

黑色素处理的糖尿病模型小鼠在给予葡萄糖0.5、1、2 h后,血糖浓度都存在先升后降的波动,但升幅和下降趋势均低于模型组($P < 0.01$)。表4显示,随着黑色素浓度的升高,小鼠糖代谢能力也随之升高。

表4 乌贼墨黑色素对STZ致糖尿病小鼠葡萄糖耐量(OGTT)的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 4 The effect of Sepia ink melanin on the oral glucose tolerance test in mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg · d)	血糖值 Blood glucose (mmol/L)				曲线下面积 AUC (h · mmol/L)
		0 h	0.5 h	1 h	2 h	
正常组 Normal	-	5.74 ± 0.29 ^{**}	6.62 ± 0.56 ^{**}	7.59 ± 0.27 ^{**}	6.43 ± 0.48 ^{**}	16.86 ± 1.04 ^{**}
模型组 Model	-	25.5 ± 2.36 ^{##}	31.42 ± 2.41 ^{##}	31.79 ± 1.94 ^{##}	29.03 ± 2.09 ^{##}	74.96 ± 5.34 ^{##}
黑色素低 SIM-L	120	22.73 ± 1.21	24.44 ± 1.19 ^{**}	27.21 ± 2.57 ^{**}	21.98 ± 3.19 ^{**}	60.29 ± 4.57 ^{**}
黑色素高 SIM-H	480	16.27 ± 1.04 ^{**}	20.58 ± 2.20 ^{**}	22.94 ± 1.81 ^{**}	18.55 ± 1.54 ^{**}	50.11 ± 3.85 ^{**}

注:与模型组相比,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与正常组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。

Note: ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ versus Model group; [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$ versus Normal group.

3.4 乌贼墨黑色素对糖尿病小鼠糖化血红蛋白和糖化血清蛋白的影响

灌胃乌贼墨黑色素后,高剂量组小鼠的糖化血红蛋白和糖化血清蛋白含量(表5)分别较模型组降低了24.3% ($P < 0.05$)、47.5% ($P < 0.01$),与正常组相比糖化程度还是相对较高($P < 0.01$);而灌胃

低剂量组的糖化血红蛋白与模型组相比降低($P > 0.05$),糖化血清蛋白与模型组相比下降了13.5% ($P < 0.05$),说明乌贼墨汁黑色素对糖尿病小鼠血液的糖基化水平均具有良好的控制作用,且高剂量组尤其显著,但仍不能达到正常水平。

表5 乌贼墨黑色素对各组小鼠糖化血红蛋白和糖化血清蛋白的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 5 The effect of Sepia ink melanin on glycosylated hemoglobin and glycosylated serum protein in mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg · d)	糖化血红蛋白 HbA1c (mmol/L)	糖化血清蛋白 GSP (mmol/L)
正常组 Normal	-	4.51 ± 1.31 ^{**}	0.77 ± 0.08 ^{**}
模型组 Model	-	9.35 ± 1.22 ^{##}	2.37 ± 0.10 ^{##}
黑色素低 SIM-L	120	8.66 ± 0.99	2.05 ± 0.23 [*]
黑色素高 SIM-H	480	7.08 ± 0.93 [*]	1.24 ± 0.15 ^{**}

注:与模型组相比,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与正常组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。

Note: ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ versus Model group; [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$ versus Normal group.

3.5 乌贼墨黑色素对糖尿病小鼠血清胰岛素含量及胰岛素抵抗指数的影响

表6显示与正常组相比,模型组小鼠空腹血清胰岛素极显著升高($P < 0.01$),胰岛素抵抗指数也

呈现出较大差异($P < 0.01$)。与模型组比较,灌胃黑色素低、高剂量组空腹血清胰岛素均有所增加,其中高剂量组增加了53.46% ($P < 0.01$);胰岛素抵抗指数较模型组相比,黑色素组抵抗水平都有所下降,

且呈现一定的量效关系,结果提示乌贼墨汁黑色素能明显提高糖尿病小鼠受损的胰岛 β 细胞对胰岛素的合成分泌,降低因长期高糖产生的胰岛素抵抗。

表6 乌贼墨黑色素对各组小鼠胰岛素含量和胰岛素抵抗指数的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 6 The effect of Sepia ink melanin on insulin level and insulin resistance index in mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg · d)	胰岛素含量 Insulin (mmol/L)	胰岛素抵抗指数 IR
正常组 Normal	-	7.21 ± 0.66 * *	2.3 ± 0.21 * *
模型组 Model	-	22.16 ± 2.21 ^{##}	27.09 ± 2.71 ^{##}
黑色素低 SIM-L	120	16.87 ± 2.05 *	17.84 ± 2.17 * *
黑色素高 SIM-H	480	14.30 ± 5.08 *	11.08 ± 3.94 * *

注:与模型组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与正常组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus Model group; [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$ versus Normal group.

3.6 乌贼墨黑色素对小鼠血脂相关指标(TC、TG、LDL-C)的影响

与正常组相比,模型组小鼠的血脂相关指标均显著高于正常组,表明STZ诱导的模型小鼠存在脂代谢紊乱(表7)。与模型组小鼠相比,黑色素处理的小鼠的甘油三酯含量显著下降($P < 0.05$; $P <$

0.01),而且低剂量处理组已明显接近正常水平;黑色素处理的小鼠总胆固醇、低密度脂蛋白含量与模型组相比,均显著降低($P < 0.01$),且呈现一定的量效性,由此可推断黑色素有调节STZ模型小鼠脂代谢紊乱的作用。

表7 乌贼墨黑色素对小鼠血脂相关指标的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 7 The effect of Sepia ink melanin on TC, TG and LDL-C in mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg · d)	甘油三酯 TG (mmol/L)	总胆固醇 TC (mmol/L)	低密度脂蛋白 LDL-C (mmol/L)
正常组 Normal	-	1.29 ± 0.15 *	3.38 ± 0.23 * *	0.16 ± 0.02 * *
模型组 Model	-	1.79 ± 0.27 [#]	5.67 ± 1.09 ^{##}	0.32 ± 0.01 ^{##}
黑色素低 SIM-L	120 mg/kg	1.28 ± 0.05 *	2.91 ± 0.19 * *	0.22 ± 0.01 * *
黑色素高 SIM-H	480 mg/kg	1.33 ± 0.13 *	3.69 ± 0.34 * *	0.16 ± 0.04 * *

注:与模型组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与正常组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus Model group; [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$ versus Normal group.

4 讨论与结论

稳定的糖尿病动物模型是开发糖尿病新药的必要条件,本实验中模型组小鼠从建模到实验结束,无论是表现症状、空腹血糖还是末期的葡萄糖耐受性均表现了一致性,这为乌贼墨黑色素调节脂代谢的研究奠定了基础。

研究表明,HbA1c和GSP是血液中葡萄糖与其它蛋白分子N末端发生非酶促反应的产物,它们和FBG都能作为评价糖尿病发病程度的指标。FBG因具瞬时性和波动性特点,只能反应即刻的血糖水平;GSP的半衰期约21d,可反映患者2~3w内的平均血糖水平,即患者短期血糖的改变情况;HbA1c的半衰期长约120d,反映的是患者2个月内平均血糖水平,可作为药物长期控制糖尿病的效果的依据^[12]。本实验从以上3个指标评价黑色素对糖尿

病模型小鼠血糖的控制水平,发现给药4周后黑色素低、高剂量组的FBG、HbA1c和GSP与模型组相比都显著下降,而且呈现量效性。可见乌贼墨汁黑色素无论是短期亦或长时间内,都能对糖尿病模型小鼠的糖代谢异常起到控制作用,且黑色素剂量越高,控制效果愈明显。

糖尿病(Diabetes Mellitus)作为一种慢性代谢疾病,发病机制与胰岛素合成、分泌失调相关,长期高糖会导致碳水化合物、脂肪和蛋白质的代谢紊乱,进而引发各种并发症。研究表明,糖尿病患者长期处于胰岛素抵抗环境下可诱发脂代谢异常,进而又加速糖尿病的发生发展,两者间形成恶性循环,此现象成为“糖脂病”^[13]。本实验糖尿病模型组小鼠具有2型糖尿病的病症,胰岛素受体对胰岛素不敏感,引发外周组织对胰岛素促进葡萄糖的摄取作用发生了抵抗,导致血糖持续升高,血脂指标即TG、TC和

LDL-C 水平也显著升高,已经发展成“糖脂病”病症;给药4周后,黑色素组处理后的糖尿病模型小鼠胰岛素水平及胰岛素抵抗指数都明显下降,TG、TC和LDL-C也在不同程度上有所降低,而且降低水平与黑色素的剂量成正比。由此推断,乌贼墨黑色素可能是通过降低糖尿病模型小鼠胰岛素分泌途径控制体内脂代谢异常的,进而起到了治疗“糖脂病”的效果。

在人工诱发的糖尿病模型小鼠中,由于机体长期处于高血糖状态下,葡萄糖自身氧化作用增强,在生成烯二醇和二羟基化合物的同时,也会产生大量的ROS;另外也会使体内的蛋白发生糖基化,在糖基化终产物(AGEs)形成过程中也不断产生自由基。在乌贼墨汁黑色素的干预下,使原本被持续高糖环境破坏的抗氧化系统得到了调节,增强了机体清除自由基的能力;降低了体内蛋白糖基化终产物的产生,有效的降低糖尿病模型小鼠血糖水平,这与先前研究即乌贼墨黑色素具有抗氧化及降低糖基化末端终产物功效相一致^[6]。临床研究证明,自由基诱导的脂质过氧化是糖尿病引发高血脂的重要因素,雷敏^[7]等研究发现乌贼墨黑色素能够对人工诱发的高血脂动物模型引发的脂质过氧化物起到清除作用,因此,我们进一步推断乌贼墨黑色素能够调节长期高糖引起的血脂代谢紊乱,与黑色素提高机体内源性抗氧化酶活性,降低机体的脂质过氧化物堆积程度途径相关。

本实验结果显示,乌贼墨黑色素可有效地改善糖尿病小鼠体重、FBG、糖耐量,降低HbA1c、GSP,抑制胰岛素过量分泌,减轻胰岛素抵抗和调节血脂代谢紊乱,且与黑色素浓度呈现一定的量效关系。综上所述,乌贼墨黑色素可以通过长期控制糖尿病模型小鼠血糖浓度和胰岛素抵抗途径,抑制血脂代谢异常,最终起到治疗糖尿病效果的,为黑色素开发成为具有控制血糖和预防并发症等方面的功能性食品提供理论基础。

参考文献

- Du TP(杜铁平),Zhou PG(周培根). Review on the study of Sepia ink. *Food Res Dev*(食品研究与开发),2002,23(6):16-18.
- Takaya Y,Uchisawa H,Matsue H, *et al.* An investigation of the antitumor peptidoglyc; an fraction from squid ink. *Biol Pharm Bull*,1994,17:846-849.
- Derby CD. Cephalopod ink: production, chemistry, functions and applications. *Marine Drugs*,2014,12:2700-2730.
- Liu HZ,Luo P,Chen SH, *et al.* Effects of squid ink on growth performance, antioxidant functions and immunity in growing broiler chickens. *Asian Australasian J Animal Sci*,2011,24:1752-1756.
- Lv L(吕玲),Li HS(李和生),Zheng L(郑丽), *et al.* Sepia melanin; effect on lead remover and on contents of calcium, zinc, copper in mice. *Oceanol Limnol Sin*(海洋与湖沼),2016,47:484-490.
- Zhou YY(周月越),Wang LD(王力东),Du MF(杜美凤), *et al.* Antioxidant effects of melanin from *Sepiellamaindroni* on subacute aged model mice. *Nat Pro Res Dev*(天然产物研究与开发),2015,27:1663-1667.
- Dong H(董慧),Wang LD(王力东),Wang CL(王春琳), *et al.* Immunomodulatory effects of *Sepiellamaindroni* melanin on hypimmune mice. *J Biol*(生物学杂志),2016,33(5):27-30.
- Lei M(雷敏). Studies on the bioactivities of squid ink melanin-Fe. Qingdao: Ocean University of China(中国海洋大学),PhD. 2008.
- Wang G(王光),Liu HZ(刘华忠),Wu JL(吴金龙), *et al.* A study of Sepia ink extract on protection from oxidative damage of cardiac muscle and brain tissue in mice. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学),2010,27(2):95-99.
- Li X(李晓),Li HS(李和生). Technics of melanin extraction from ink of *Sepia esculentahoyale* by enzymatic methods. *Nat Pro Res Dev*(天然产物研究与开发),2010,22:159-162.
- Zhou YY(周月越),Wang CL(王春琳),Mu CK(母昌考), *et al.* Research on the extraction method of the melanin from *Sepiellamaindroni* ink. *J Biol*(生物学杂志),2015,32(2):28-32.
- Shen XJ(沈秀金). The importance of blood glucose, glycosylated serum protein and glycosylated hemoglobin in the monitoring of diabetes. *J PMT*(实用医技杂志),2008,20:3633-3635.
- Lin H(林华),Niu YF(牛艳芬),Wang F(王芳), *et al.* Effects of mangiferin on blood glucose and blood lipids metabolism in alloxan diabetic mice. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*(中药药理与临床),2012,28(6):41-44.