

小分子果胶对 II 型糖尿病模型小鼠的治疗作用及机制研究

吴丽梅¹,程丽艳¹,曹颖¹,屠凌岚¹,颜冬梅¹,高海峰²,于斌²,郑晓亮¹,王孝举^{1*}

¹浙江省医学科学院分子医学中心,杭州 310013;²杭州络通生物科技有限公司,杭州 310052

摘要:为观察 II 型糖尿病模型小鼠连续 10 周经口灌胃给予小分子果胶对小鼠血糖血脂的影响并初步探讨其作用机制。实验选用 db/db 小鼠,随机分为 II 型糖尿病模型对照组和 3 个剂量给药组,以 db/m 小鼠为正常对照组,给药组分别连续 10 周经口灌胃给予等体积的 30、20、13.3 mL/kg 的小分子果胶,正常对照组和模型对照组动物给予等量生理盐水。观察小分子果胶对 II 型糖尿病小鼠体重、血糖血脂、胰岛素及葡萄糖耐量的影响。研究发现 II 型糖尿病模型小鼠连续 10 周经口灌胃给予小分子果胶后,小鼠血糖、血清甘油三酯、胆固醇含量显著降低,且小鼠葡萄糖耐受能力显著提高;但小鼠体重、血清低密度脂蛋白、高密度脂蛋白以及胰岛素无显著影响,小鼠胰岛素耐受能力也无显著影响。研究结果提示,小分子果胶可调节体内糖、脂等代谢过程,对 II 型糖尿病具有一定的治疗作用。

关键词:小分子果胶; II 型糖尿病;降血糖作用

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)Suppl-0133-06

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.S.021

Effect and mechanism of low-molecular-weight citrus pectin on type II diabetic mice

WU Li-mei¹, CHENG Li-yan¹, CAO Ying¹, TU Ling-lan¹, YAN Dong-mei¹,
GAO Hai-feng², YU Bin², ZHENG Xiao-liang¹, WANG Xiao-ju^{1*}

¹Center for Molecular Medicine, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China;

²Hangzhou Joyful Biotechnology Co., Ltd, Hangzhou 310052, China

Abstract: This study was to investigate hypoglycemic effect of low-molecular-weight citrus pectin (LCP) in type II diabetic mice by oral gavage for 10 weeks and to explore its mechanism. The db/db mice were divided into the type II diabetes model group and three dose administration groups, as well as the db/m mice were used as the normal control. The administration groups were given an equal volume of 30, 20, 13.3 mL/kg LCP by oral gavage for 10 weeks, and the control and model group were given the same volume of saline. The body weight, blood glucose, lipids, insulin and glucose tolerance of the mice were measured, and then the effects of LCP on these indicators in type II diabetic mice were analyzed. The blood sugar, serum triglyceride and cholesterol levels were significantly decreased, and the glucose tolerance of mice was significantly increased in the mice with type II diabetes were given LCP for 10 weeks. There was no significant effect on serum low-density lipoprotein, high-density lipoprotein, insulin and insulin tolerance in mice. The results suggest that LCP can regulate the metabolism of blood sugar and lipids and has a potential therapeutic effect on type II diabetes.

Key words: low-molecular-weight citrus pectin (LCP); type II diabetes; hypoglycemic effect

II 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM), 又称非胰岛素依赖性糖尿病, 是胰岛素分泌相对不足或靶细胞对胰岛素敏感性低导致的以血糖升高为特点的慢性代谢性疾病, 可并发或继发高血压、冠心

病、脑卒中等慢性病症。II 型糖尿病是糖尿病的主要发病类型, 约占 90%, 我国糖尿病患者数量已达到 1.4 亿^[1], 且发病率呈不断上升趋势, 已严重威胁到人民健康和社会发展。临床上针对 II 型糖尿病尚无有效的治愈方案, 控制患者血糖水平以及预防并发症是目前治疗的核心策略。目前已上市的大多数合成类降糖药物长期服用都存在不同程度的副作用, 寻找高效低毒的控糖药物, 特别是从天然产物中开

收稿日期:2019-03-27 接受日期:2019-04-22

基金项目:国家自然科学基金(81773626);浙江省自然科学基金(LQY19H160001)

*通信作者 Tel:86-571-88215563; E-mail: wangxj@zjams.com.cn

发新药成为一条行之有效的方法。

中药橘络为芸香科植物橘及其栽培变种的果皮内层筋络,性平、味甘苦、无毒。《纲目拾遗》中记载橘络具有通经络滞气、脉胀,驱皮里膜外积痰、活血等功效。小分子果胶(low-molecular-weight citrus pectin, LCP)是一种从柑橘橘络中提取出来的水溶性多糖,其中总糖含量 3.24 mg/mL,总黄酮含量 2.3 mg/mL,半乳糖醛酸含量 1.54 mg/mL。研究发现多种植物多糖对糖尿病具有治疗作用,不仅能够降低血糖水平,且不良反应罕见^[2]。本文观察了连续 10 周经口灌胃给予小分子果胶后对 II 型糖尿病模型小鼠的降血糖、血脂作用,并初步探索作用机制,为其临床应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

小分子果胶由杭州络通生物科技有限公司提供,葡萄糖为成都市科龙化工试剂厂生产,胰岛素注射液购自江苏万邦生化医药股份有限公司,血清甘油三酯检测试剂盒、血清胆固醇检测试剂盒、血清低密度脂蛋白检测试剂盒、血清高密度脂蛋白检测试剂盒均购自上海复星长征科学有限公司,血清胰岛素 ELISA 检测试剂盒购自碧云天生物技术公司。

1.2 动物及饲养条件

db/db 小鼠(SPF 级,雄性,7 周龄),db/m 小鼠(SPF 级,雄性,7 周龄)购自南京大学模式动物研究所,实验动物生产许可证:SCXK(苏)2015-0001。屏障系统饲养室温度 20~25℃,相对湿度 40-70%,中央空调集中通风 10-20 次/h,光照 12 小时暗,12 小时明。实验动物使用许可证:SYXK(浙)2014-0008。

1.3 分组及给药方案

db/db 小鼠适应饲养 1 周,禁食过夜后测定空腹血糖,选择空腹血糖高于 11.1 mmol/L 的动物随机分为 II 型糖尿病模型对照组和 3 个剂量给药组,每组 6 只。以 db/m 小鼠为正常对照组。给药组分别连续 10 周经口灌胃给予等体积的 30、20、13.3 mL/kg 的小分子果胶,正常对照组和模型对照组动物给予等量生理盐水。

1.4 检测指标及时间

每周记录动物体重;尾静脉采血后以拜耳公司血糖仪直接读取首次给药后即时血糖值,给药一周后、给药中期、给药末期血糖值,同时检测相应时间点血清甘油三酯(TG)含量;末次给药后尾静脉采血

检测血清胆固醇(TC)、血清低密度脂蛋白(LDL-C)、血清高密度脂蛋白(HDL-C)、血清胰岛素(insulin)含量;给药末期进行口服葡萄糖耐量试验(OGTT)和胰岛素耐量试验(ITT)。

1.5 血清甘油三酯(TG)含量检测

尾静脉采血,3 000 rpm 离心 10 min 分离血清。血清 TG 检测操作步骤参照试剂盒说明书,具体如下:96 孔板中加入试剂 I 200 μ L/孔。然后加入标准品,浓度分别为 0、6.15、12.3、24.6、49.2、73.8、98.4 μ mol/L。待测孔加入待测血清样品,1.25 μ L/孔或 2.5 μ L/孔,轻轻振荡混匀,37℃ 孵育 5 分钟。各孔中加入试剂 II 50 μ L/孔,轻轻振荡混匀,37℃ 孵育 5 min。测定标准品及待测血清样品 520 nm 吸光度值。各孔设置复孔。根据标准品浓度及吸光度值绘制标准曲线,计算标准曲线直线回归方程,再根据待测血清样品吸光度值在回归方程上计算对应的待测血清样品中 TG 浓度。

1.6 血清胆固醇(TC)含量检测

末次给药后尾静脉采血,3 000 rpm 离心 10 min 分离血清。血清 TC 检测操作步骤参照试剂盒说明书,具体如下:96 孔板中加入试剂 I 200 μ L/孔。然后加入标准品,浓度分别为 0、17.5、35、70、140、210、280 μ mol/L。待测孔加入待测血清样品 2.5 μ L/孔,轻轻振荡混匀,37℃ 孵育 5 分钟。各孔中加入试剂 II 100 μ L/孔,轻轻振荡混匀,37℃ 孵育 5 分钟。测定标准品及待测血清样品 500 nm 吸光度值。各孔设置复孔。根据标准品浓度及吸光度值绘制标准曲线,计算标准曲线直线回归方程,再根据待测血清样品吸光度值在回归方程上计算对应的待测血清样品中 TC 浓度。

1.7 血清低密度脂蛋白(LDL-C)检测

末次给药后尾静脉采血,3 000 rpm 离心 10 min 分离血清。血清 LDL-C 检测操作步骤参照试剂盒说明书,具体如下:96 孔板中加入试剂 I 50 μ L/孔。然后加入标准品,浓度分别为 0、11、22、44、88、176、352 μ mol/L。待测孔加入待测血清样品 1.5 μ L/孔,轻轻振荡混匀,37℃ 孵育 5 分钟。各孔中加入试剂 II 17 μ L/孔,轻轻振荡混匀,37℃ 孵育 5 分钟。测定标准品及待测血清样品 546 nm 吸光度值。实验设置复孔。根据标准品浓度及吸光度值绘制标准曲线,计算标准曲线直线回归方程,再根据待测血清样品吸光度值在回归方程上计算对应的待测血清样品中 LDL-C 浓度。

1.8 血清高密度脂蛋白(HDL-C)检测

末次给药后尾静脉采血,3 000 rpm 离心 10 min 分离血清。血清 HDL-C 检测操作步骤参照试剂盒说明书,具体如下:96 孔板中加入试剂 I 50 μL /孔。然后加入标准品及待测血清样品 2 μL /孔,标准品浓度为 43.88 $\mu\text{mol/L}$ 。轻轻振荡混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 分钟。各孔中加入试剂 II 17 μL /孔,轻轻振荡混匀,立即测定标准品及待测血清样品 600 nm 吸光度值,1 分钟后再次测定各孔 600 nm 吸光度值。实验设置复孔。根据公式:HDL-C 浓度 (mM) = 样品 ΔA / 标准品 ΔA ,计算待测血清样品中 HDL-C 浓度。

1.9 血清胰岛素(Insulin)检测

末次给药后尾静脉采血,3 000 rpm 离心 10 min 分离血清。血清 Insulin 检测操作步骤参照试剂盒说明书,具体如下:双蒸水稀释标准品,浓度分别取 0、0.17、0.34、0.69、1.38、2.75、5.50 ng/mL。96 孔板中加入系列浓度标准品及待测血清样品 10 μL /孔,各孔立刻加入辣根过氧化物酶标记小鼠 Insulin 抗体 100 μL /孔,透明封板膜封住反应孔,室温孵育 2 小时。洗板 5 次,且最后一次置于厚吸水纸上拍干。各孔加入显色剂 TMB 溶液 100 μL /孔,白色封板膜封住反应孔,室温孵育 10 min,加入终止液测 50 μL /孔,混匀后立即测各孔 450 nm 吸光度值。实验设置空白孔,只加入 TMB 溶液及终止液。各孔均

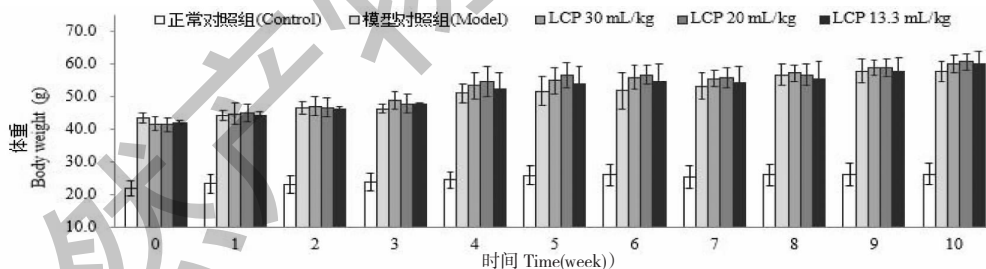


图 1 小分子果胶对 II 型糖尿病小鼠体重的影响

Fig. 1 Effect of LCP on body weight of type II diabetic mice

2.2 小分子果胶对 II 型糖尿病小鼠血糖的影响

II 型糖尿病小鼠连续 10 周经口灌胃给予不同剂量小分子果胶,与模型对照组相比,给予小分子果胶各剂量组小鼠连续给药 2 周后血糖值持续显著下降 ($P < 0.05$),正常对照组 (db/m 小鼠) 血糖始终显著低于模型对照组 ($P < 0.001$) (图 2)。

2.3 小分子果胶对 II 型糖尿病小鼠血清甘油三酯的影响

II 型糖尿病小鼠连续 10 周经口灌胃给予不同

设置复孔。根据标准品浓度及吸光度值绘制标准曲线,计算标准曲线回归方程,再根据待测血清样品吸光度值在回归方程上计算对应的待测血清样品中 Insulin 浓度。

1.10 口服葡萄糖耐量试验(OGTT)

给药末期,动物禁食 12 h,灌胃给予 50% 葡萄糖溶液 2 g/kg,分别于灌胃后 0、30、60、120 min 尾静脉采血,3 000 rpm 离心 10 min 分离血清,血糖仪检测血糖值。

1.11 胰岛素耐量试验(ITT)

给药末期,动物禁食 6 h,检测尾静脉空腹血糖 (0min),腹腔注射胰岛素 0.8 U/kg,分别于注射后 15、30、60、90、120 min 尾静脉采血,3 000 rpm 离心 10 min 分离血清,血糖仪检测血糖值。

1.12 数据统计

所有计量数据均表示为均数 \pm 标准差,采用 SPSS Statistics 17.0 软件进行统计分析,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 认为统计学差异有显著性。

2 实验结果

2.1 小分子果胶对 II 型糖尿病小鼠体重的影响

II 型糖尿病小鼠连续 10 周经口灌胃给予不同剂量小分子果胶,与模型对照组小鼠体重相比无显著差异 ($P > 0.05$),正常对照组 (db/m 小鼠) 体重显著低于模型对照组 ($P < 0.001$) (图 1)。

剂量小分子果胶,与模型对照组相比,给予小分子果胶各剂量组小鼠连续给药 1 周后血清甘油三酯持续显著下降 ($P < 0.05$),正常对照组 (db/m 小鼠) 血清甘油三酯始终显著低于模型对照组 ($P < 0.001$) (图 3)。

2.4 小分子果胶对 II 型糖尿病小鼠血清胆固醇、低密度脂蛋白、高密度脂蛋白、胰岛素的影响

II 型糖尿病小鼠经口灌胃给予不同剂量小分子果胶连续 10 周后,给予高剂量 (30 mL/kg) 和中剂

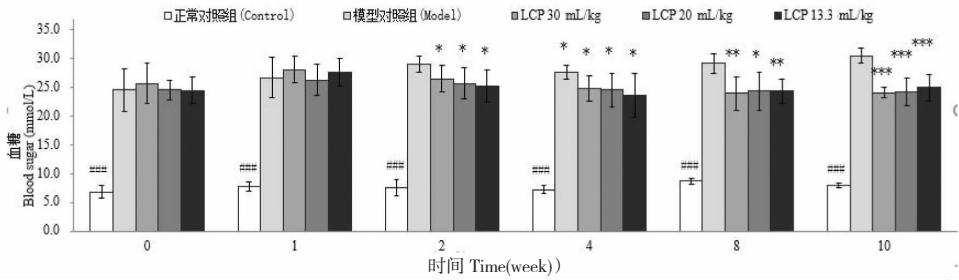


图2 小分子果胶对 II 型糖尿病小鼠血糖的影响

Fig. 2 Effect of LCP on blood sugar in type II diabetic mice

注:与正常对照组比较 #### $P < 0.001$;与模型对照组比较 * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。Note: Compare with control, #### $P < 0.001$; Compare with model * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。

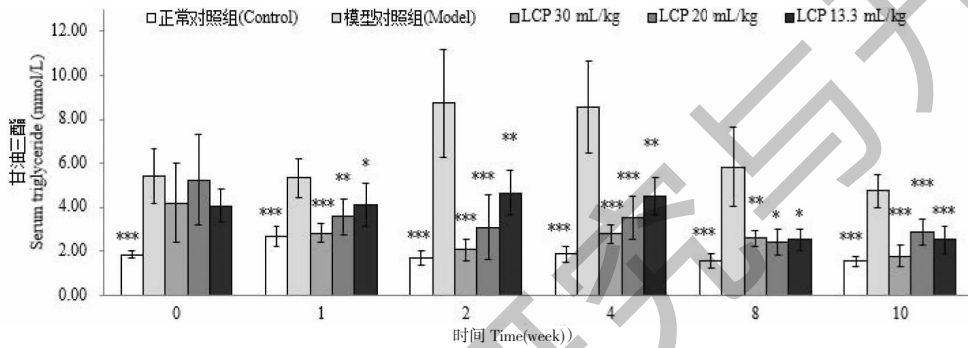


图3 小分子果胶对 II 型糖尿病小鼠血清甘油三酯的影响

Fig. 3 Effect of LCP on serum triglyceride in type II diabetic mice

注:与正常对照组比较 #### $P < 0.001$;与模型对照组比较 * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。Note: Compare with control, #### $P < 0.001$; Compare with model * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。

量(20 mL/kg)的小分子果胶小鼠血清胆固醇含量与模型对照组相比显著下降($P < 0.05$),给予小分子果胶各剂量组小鼠血清低密度脂蛋白、高密度脂蛋白、胰岛素含量与模型对照组相比无显著差异($P > 0.05$),正常对照组(db/m小鼠)血清胆固醇、低密度脂蛋白、高密度脂蛋白、胰岛素显著低于模型对照组($P < 0.001$,图4)。

2.5 小分子果胶对 II 型糖尿病小鼠口服葡萄糖耐量的影响

II 型糖尿病小鼠经口灌胃给予不同剂量小分子果胶连续 10 周后,灌胃给予 50% 葡萄糖溶液 2 g/kg,分别于糖负荷后 0、30、60、120 min 测定血糖值,各组小鼠的血糖值均在糖负荷后的 30 min 达到峰值,其中给予高剂量(30 mL/kg)、中剂量(20 mL/kg)的小分子果胶小鼠血糖值在 120 min 内与模型对照组相比显著下降($P < 0.05$),正常对照组(db/m小鼠)血糖值始终显著低于模型对照组($P < 0.001$,图5)。

2.6 小分子果胶对 II 型糖尿病小鼠胰岛素耐量的影响

II 型糖尿病小鼠经口灌胃给予不同剂量小分子果胶连续 10 周后,腹腔注射胰岛素 0.8 U/kg,分别测定 0、15、30、60、90、120 min 血糖值,各组血糖在 15 min 内无明显降低作用,30 min 后给予高剂量(30 mL/kg)和中剂量(20 mL/kg)的小分子果胶组小鼠实时血糖值与基础血糖值相比下降幅度显示出大于模型对照组下降幅度的趋势,但无统计学显著差异($P > 0.05$,图6)。

3 讨论

II 型糖尿病作为糖尿病的主要发病类型,其发病率高,并发症引发死亡率高。随着生活水平的提高和生活方式的改变,糖尿病的发病率更是逐年上升,预计到 2025 年患病人数可达到 3 亿人^[3]。糖尿病已经成为继心脑血管疾病及恶性肿瘤之后的第三大严重危害人类健康的疾病。糖尿病的病因和发病机制尚未完全阐明,通常认为可能与遗传和环境因素相关。II 型糖尿病的主要症状为高血糖、高胰岛

素血症及胰岛素抵抗,因此控制血糖水平是预防和治疗糖尿病的有效方法。目前对于糖尿病患者的降

糖治疗主要包括饮食控制、合理运动、血糖监测和应用降糖药物等治疗措施。

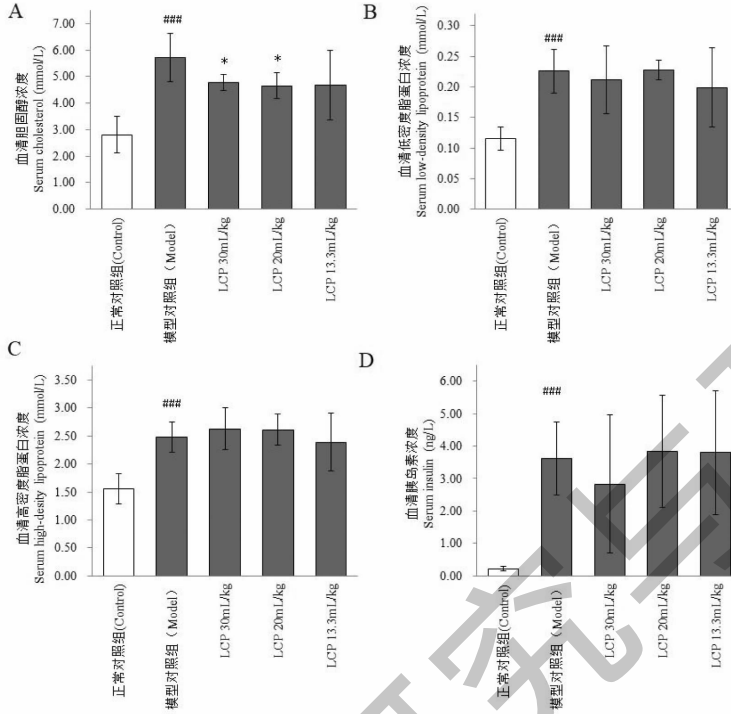


图4 小分子果胶对Ⅱ型糖尿病小鼠血清胆固醇(A)、低密度脂蛋白(B)、高密度脂蛋白(C)、胰岛素(D)的影响

Fig. 4 Effect of LCP on serum cholesterol (A), low density lipoprotein (B), high density lipoprotein (C), insulin (D) in type II diabetic mice

注:与正常对照组比较^{###} $P < 0.001$;与模型对照组比较^{*} $P < 0.05$ 。Note: Compare with control, ^{###} $P < 0.001$; Compare with model ^{*} $P < 0.05$ 。

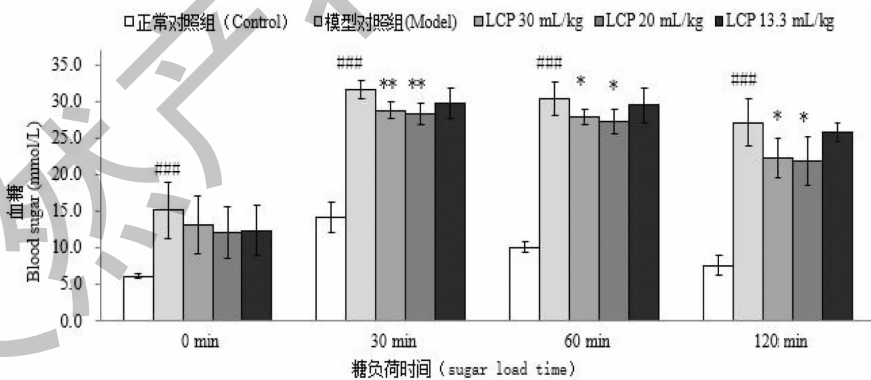


图5 小分子果胶对Ⅱ型糖尿病小鼠口服葡萄糖耐量的影响

Fig. 5 Effect of LCP on oral glucose tolerance in type II diabetic mice

注:与正常对照组比较^{###} $P < 0.001$;与模型对照组比较^{*} $P < 0.05$;^{**} $P < 0.01$ 。Note: Compare with control, ^{###} $P < 0.001$; Compare with model ^{*} $P < 0.05$; ^{**} $P < 0.01$ 。

Ⅱ型糖尿病患者除了血糖的升高,还伴随着血压、血脂等水平的增高以及体重的增加,有研究报道,低分子柑桔果胶粉可显著降低Ⅱ型糖尿病患者

餐后的血糖血脂水平,维持正常的血胆固醇含量^[4,5]。邬晓婧等人通过构建糖尿病小鼠模型,也发现低分子柑桔果胶粉可有效降低糖尿病小鼠的血

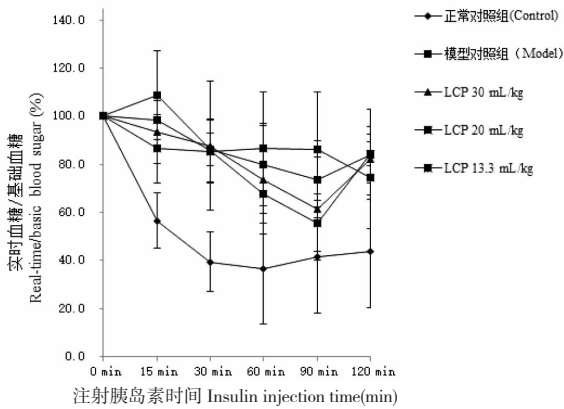


图6 小分子果胶对II型糖尿病小鼠胰岛素耐量的影响

Fig. 6 Effect of LCP on insulin resistance in type II diabetic mice

糖及血脂水平^[6]。本次实验表明,小分子果胶可显著降低先天性II型糖尿病小鼠的血糖、血清甘油三酯和胆固醇含量,且可显著提高小鼠的葡萄糖耐受能力,与文献报道结果一致。有研究发现小分子果胶能够被消化道吸收进入血液循环,通过促进或降低肝脏及其它器官中的糖和脂肪分解/合成酶的活性,降低血糖血脂水平^[7],但目前小分子果胶降低血糖血脂的机制还不是很明确,有待进一步探讨。

小分子果胶能够降低II型糖尿病小鼠的血糖及血脂水平,对于高血糖及其并发的高血脂症都有一

定的治疗作用。我国小分子果胶的原材料柑橘产量丰富,易于获取,这为开发安全有效控糖药物提供了新的思路。

参考文献

- 1 Qian H, Lu RM. Current situation and progress of study on diabetes [J]. Med Recapitulate (医学综述), 2015, 21: 2418-2420.
- 2 Mei YY, Pang SQ, Zheng LX, et al. Hypoglycemic mechanism of Chinese herbal polysaccharides and enlightenment on research of diabetes diet nursing [J]. Chin Evid Nurs (循证护理), 2016, 12: 159-161.
- 3 Zheng L, Xu T. Eyes on the progressive study of diabetes [J]. Chin Bull Life Sci (生命科学), 2012, 7: 606-610.
- 4 Ciriminna R, Chavarria N, et al. Pectin: a new perspective from the biorefinery standpoint [J]. Biofuel Bioprod Bior, 2015, 9: 368-377.
- 5 Chandalia M, Garg A, Lutjohann D, et al. Beneficial effects of high dietary fiber intake in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. N Engl J Med, 2000, 342: 1392-1398.
- 6 Wu XJ, Zhang AZ, Chen JG, et al. Regulating function of low molecular citrus pectin on blood glucose and lipids in diabetic mice [J]. Chin Gen Pract (中国全科医学), 2006, 9: 1685-1686.
- 7 Hu Y, Zhang WL, Zhou ZQ. Biological functions of citrus pectin and its applications in biomedicine [J]. Fruit Sci (果树学报), 2016, 33: 1567-1575.
- 8 Qiu JZ, et al. Subinhibitory concentrations of farrerol reduce α -toxin expression in *Staphylococcus aureus* [J]. FEMS Microbiol Lett, 2011, 315: 129-133.
- 9 Yang ZT, et al. Farrerol regulates antimicrobial peptide expression and reduces *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells [J]. Microb Pathog, 2013, 65(6): 1-6.
- 10 Zhu JF, et al. Binding analysis of farrerol to lysozyme by spectroscopic methods [J]. Spectrochim Acta A, 2007, 68: 354-359.
- 11 Li DJ, et al. Characterization of the interaction between farrerol and bovine serum albumin by fluorescence and circular dichroism [J]. Spectrochim Acta A, 2011, 79: 680-686.
- 12 Jin J, et al. Study on the binding of farrerol to human serum albumin [J]. J Photochem Photobiol A, 2007, 191(1): 59-65.
- 13 Zhang GW, et al. Molecular spectroscopic studies of farrerol interaction with calf thymus DNA [J]. J Agr Food Chem, 2011, 59: 8944-8952.
- 14 Feng YS, et al. Metabolism of farrerol [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 1979, 14: 149-155.
- 15 Lu TT, et al. *In vivo* pharmacokinetic study on farrerol in rats [J]. Drug Eval Res (药物评价研究), 2013, 36(2): 81-84.
- 16 Chen LJ, et al. *In vivo* excretion kinetic study on effective ingredient farrerol of *Rhododendron Dauricum* in rats [J]. China Arch Tradit Chin Med (中华中医药学刊), 2015, 33: 1600-1602.
- 17 PEI G, et al. The content determination of farrerol from *Huperzia crispata* [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2007, 30: 395-396.
- 18 Slade D, et al. Circular dichroism, a powerful tool for the assessment of absolute configuration of flavonoids [J]. Phytochemistry, 2005, 66: 2177-2215.
- 19 Gale C, et al. Two prenylated isoflavanones from *Milletia pervilleana* [J]. Phytochemistry, 1997, 45: 189-192.
- 20 Birch AJ, et al. Flavanones in *Angophora lanceolata* [J]. J Chem Soc, 1960: 20163-2066.

(上接第 176 页)