

青钱柳虫草片降血糖、免疫调节实验研究

末次给药后测得小鼠血糖值并计算糖耐量，结果见表 1。

表 1 小鼠血糖和 AUC ($\bar{x}\pm s$)

Table 1 blood glucose and AUC of experimental mice ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	血糖值/(mmol/L)				AUC /(nmol·h/L)
		0 h	0.5 h	1 h	2 h	
空白组	10	3.92±0.40	14.09±1.81	8.89±0.90	5.98±0.69	17.68±1.47
模型组	10	4.04±0.31	21.26±2.20**	15.03±1.17**	6.86±0.95	26.34±2.16**
阳药组	10	3.60±0.46	18.59±1.56**#	11.25±1.22*##	5.85±0.94	21.55±1.83*##
低剂量组	10	4.28±0.67	20.80±2.39**	14.00±2.72**	8.00±1.65	25.97±3.94**
中剂量组	10	3.41±0.64	18.28±2.86**#	11.95±3.49**##	6.89±1.40	22.40±5.50*##
高剂量组	10	3.77±0.63	18.26±2.62**#	12.05±2.09**##	6.70±1.08	22.46±2.81*##

注：*表示与空白组比较；#表示与模型组比较；*或者#表示 P<0.05，**或者##表示

P<0.01。

李东山¹，吕萌¹，谭开祥²，向极钎³，刘卫^{1*}（1.华中科技大学，湖北武汉 430074；2.湖北思慧生物科技有限公司，湖北恩施 445099；3.恩施州农业科学院，湖北恩施 445099）

摘要：目的：研究青钱柳虫草片对链脲佐菌霉素（streptozotocin, STZ）与高脂饲料联合诱导的糖尿病小鼠血糖、抗氧化能力和免疫调节的影响。方法：设置空白组、模型组、阳药组和青钱柳虫草片低、中、高剂量组（0.185 g/kg、0.370 g/kg、0.740 g/kg），连续给药 42 天后测量小鼠糖耐量、抗氧化活力、脾脏指数。结果：与模型组比较，青钱柳虫草片中、高剂量均能显著降低小鼠血糖（P<0.05），高剂量组能显著提升 GSH-Px 活力（P<0.05）；高剂量组能显著提高脾脏指数（P<0.05）。结论：青钱柳虫草片具有降血糖、提高抗氧化活力和增强免疫力的功效。关键词：青钱柳；虫草菌粉；糖尿病小鼠；降血糖；免疫调节

Study of Se-enriched *Cyclocarya paliurus* with Fermented *Cordyceps* powder Tablets in Blood Glucose and Immunity of Diabetic Mice LI Dong-shan¹, LV Meng¹,

TAN Kai-xiang², XIANG Ji-qian³, LIU Wei^{1,*} (1. Huazhong university of science and technology, Wuhan 430074; 2. Hubei Sophia biological technology co., LTD, Enshi 445099; 3. Enshi academy of agricultural sciences, Enshi 445099) Abstract:

Objective: This paper studied the effect of Se-enriched *Cyclocarya paliurus* with fermented *Cordyceps* powder tablets on blood glucose, antioxidant activity and immunity in streptozotocin (STZ) and high fat diet induced diabetic mice.

Method: Normal control, model control, positive control and low, medium and high-dose Se-enriched *Cyclocarya paliurus* with fermented *Cordyceps* powder tablets treatment groups were established. After 42 d of administration, the level of glucose tolerance, antioxidant activity and the spleen index were measured.

Results: Compared with model group, medium-dose and high-dose Se-enriched *Cyclocarya paliurus* with fermented *Cordyceps* powder tablets significantly reduced blood glucose in diabetic mice ($P < 0.05$), High-dose Se-enriched *Cyclocarya paliurus* with fermented *Cordyceps* powder tablets could significantly increase GSH-Px activity ($P < 0.05$); High-dose tablets could significantly increase the spleen index ($P < 0.05$). **Conclusion:** Se-enriched *Cyclocarya paliurus* with fermented *Cordyceps* powder tablets can decrease the blood glucose levels, have antioxidant activities and improve immunity in diabetes mice.

Key word: Se-enriched *Cyclocarya paliurus*; fermented *Cordyceps* powder; diabetic mice; antidiabetic effect; immunomodulatory effect 青钱柳(*Cyclocarya paliurus* (Batal)

Ijinskaja), 为我国特有的单种属植物, 早有古籍记载其枝叶具有清热解毒等功效, 民间多将其制成茶叶饮用。目前已有大量研究表明青钱柳具有降血糖、降血脂等功效^[1-4]。硒是一种人体重要的微量元素。研究表明, 硒具有提高人体抗氧化能力和改善免疫力等功效, 适量补硒对于糖尿病的预防与治疗具有重要意义^[5,8]。有研究表明硒可以与青钱柳多糖结合形成硒多糖, 且具有更好的降血糖作用^[9]。发酵虫草菌粉是通过分离天然虫草菌株, 进行深层发酵得到的。已有文献报导, 发酵虫草菌粉与冬虫夏草具有相同的功效成分, 具有提高免疫力、抗肿瘤等多种功效^[10,11]。我们采用恩施青钱柳提取物复配发酵虫草菌粉、枸杞提取物和茯苓提取物等功效成分制成压片, 旨在用青钱柳提取物复配以虫草菌粉为主的天然药物活性成分能够增强降血糖效果, 并且提高药物服用顺应性。本文主要探讨青钱柳虫草片对糖尿病小鼠血糖、抗氧化和免疫力的影响, 为青钱柳虫草片的开发利用提供实验依据。

1 材料与试剂

1.1 材料

青钱柳叶由湖北恩施思慧生物科技有限公司提供, 75℃蒸馏水提取 2 h 浓缩冷冻干燥得青钱柳提取物。发酵虫草菌粉、枸杞提取物、茯苓提取物购于杭州众芝

康菇生物技术有限公司。青钱柳虫草片规格为 0.6g/片, 根据相关专利设计配方[12], 主要成分为: 青钱柳提取物、发酵虫草菌粉、枸杞提取物、茯苓提取物、辅料。片剂中硒含量为 79.4 μ g/g, 腺苷含量为 895 μ g/g。

1.2 动物

4 周龄, SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 65 只, 由湖北省疾病预防控制中心提供, 许可证号: SCXK(鄂)2015-0018, 实验动物合格证号: 42000600020649。普通维持料及高脂饲料由湖北省疾病预防控制中心提供。

1.3 试剂和仪器

消渴丸(广州白云山中一药业有限公司); 链脲佐菌霉素(阿拉丁试剂); 罗康全活力型血糖试纸(罗氏诊断产品(上海)有限公司); 超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)。血糖仪(罗氏诊断产品(上海)有限公司); 318C 酶标仪(成都华衡仪器有限公司)。

2 方法

2.1 实验分组及给药

参考文献方法[9,13], 小鼠适应性喂养后, 禁食过夜后测定小鼠空腹血糖值, 按照空腹血糖随机分组。设置空白组(灌胃生理盐水)、模型组(灌胃生理盐水)、青钱柳虫草片低、中、高剂量组(给药剂量根据人体推荐剂量换算得到, 分别为 0.185 g/kg、0.370 g/kg、0.740 g/kg), 小鼠给药剂量与人体推荐量换算参照文献方法[14], 阳药组(0.514 g/kg 消渴丸)作为阳性对照。分组后各组小鼠均为 10 只。实验期间, 空白组给普通饲料, 其他各组给高脂饲料喂养。连续给药 42 天。

2.2 高血糖小鼠模型建立

参考文献[13, 15], 小鼠腹腔注射 STZ 溶液(以 0.1mol/L 柠檬酸缓冲盐溶液作为 STZ 溶剂)损伤胰岛细胞, 联合高脂饲料喂养建立高血糖小鼠模型。实验小鼠连续给药 2 周后, 根据小鼠体重腹腔注射 40 mg/kg STZ 溶液, 空白组腹腔注射溶剂。3 d 后, 以同样的步骤重复注射 STZ 溶液。

2.3 血糖与糖耐量的测定

末次给药后, 尾尖取血测小鼠血糖并计算糖耐量(oral glucose tolerance test, OGTT)。小鼠禁食过夜, 尾尖取血, 测空腹血糖作为 0 h 血糖值。之后按体质量灌胃 2.5 g/kg 的葡萄糖溶液, 测量灌胃葡萄糖溶液后 0.5 h、1 h、2 h 的小鼠血糖, 并计算血糖曲线下面积(area under the curve, AUC)[16]。

2.4 血清指标的测定

糖耐量试验后, 全部老鼠换为普通饲料喂养。2 d 后禁食过夜, 摘眼球取血。全血离心分离血清, 使用试剂盒测定血清中 SOD、GSH-Px 活力。

2.5 免疫器官指数的检测

所有小鼠取血前称取体重, 取血后将小鼠脱臼处死。解剖摘取脾脏称重, 并计算脏器指数[17]。

2.6 数据统计分析

使用 SPSS 19.0 软件统计学分析实验数据，结果以均值±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示，组间多重比较采用 LSD 法。

3 结果与分析

3.1 青钱柳虫草片对糖尿病小鼠糖耐量的影响

末次给药后测得小鼠血糖值并计算糖耐量，结果见表 1。

表 1 小鼠血糖和 AUC ($\bar{x}\pm s$)

Table 1 blood glucose and AUC of experimental mice ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	血糖值/(mmol/L)				AUC (mmol·h/L)
		0 h	0.5 h	1 h	2 h	
空白组	10	3.92±0.40	14.09±1.81	8.89±0.90	5.98±0.69	17.68±1.47
模型组	10	4.04±0.31	21.26±2.20**	15.03±1.17**	6.86±0.95	26.34±2.16**
阳药组	10	3.60±0.46	18.59±1.56**#	11.25±1.22*##	5.85±0.94	21.55±1.83*##
低剂量组	10	4.28±0.67	20.80±2.39**	14.00±2.72**	8.00±1.65	25.97±3.94**
中剂量组	10	3.41±0.64	18.28±2.86**#	11.95±3.49**##	6.89±1.40	22.40±5.50**#
高剂量组	10	3.77±0.63	18.26±2.62**#	12.05±2.09**##	6.70±1.08	22.46±2.81**#

注：*表示与空白组比较；#表示与模型组比较；*或者# 表示 P<0.05，**或者##表示

P<0.01。

由表 1 可知，糖耐量实验中，模型组小鼠 AUC 显著高于空白组 (P<0.01)，证明糖尿病小鼠模型建立成功。相较于模型组，青钱柳虫草片中、高剂量组和阳药组都具有显著降低血糖的效果 (P<0.05)。并且青钱柳虫草片中、高剂量降血糖效果与阳药消渴丸相当。低剂量组有下降趋势，但无显著性差异。 3.2 青钱柳虫草片对小鼠血清中 GSH-Px、SOD 活力的

影响 SOD、GSH-Px 是抗氧化系统中最重要的酶，在机体抗自由基损伤中起重要作用。连续给药 42d 后，测定小鼠血清中 GSH-Px、SOD 活力。结果见图 1。

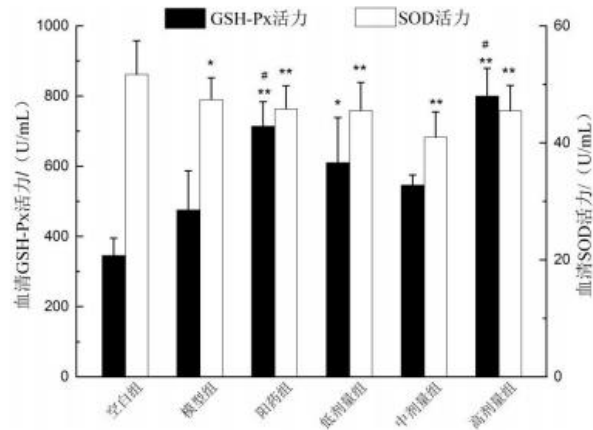


图1 小鼠血清 SOD 和 GSH-Px 活力测定结果比较($\bar{x} \pm s$)

Figure.1 Comparison of serum SOD and GSH-Px activities in mice($\bar{x} \pm s$)

注: *表示与空白组比较; #表示与模型组比较; *或者# 表示 $P < 0.05$, **或者##表示 $P < 0.01$ 。

如图 1 所示，相比于空白组，其他各组 SOD 活力都有一定程度的降低，表明造模后小鼠血清 SOD 活力降低，阳药消渴丸与富硒青钱柳虫草片对 SOD 活力都无明显改善效果。GSH-Px 检测结果中，阳药组和高剂量组 GSH-Px 活力相较于模型组也显著升高 ($P < 0.05$)，且高剂量组效果优于阳药组。同时富硒青钱柳虫草片低剂量组、高剂量组和高剂量组 GSH-Px 活力相较于空白组都有显著升高 ($P < 0.05$)。

3.3 富硒青钱柳虫草片对糖尿病小鼠免疫器官指数的影响

脾脏是动物体内重要的免疫器官,在脾脏中栖居着大量淋巴细胞和其他免疫细胞,脾脏指数在一定程度上能反映小鼠免疫功能的高低^[17]。

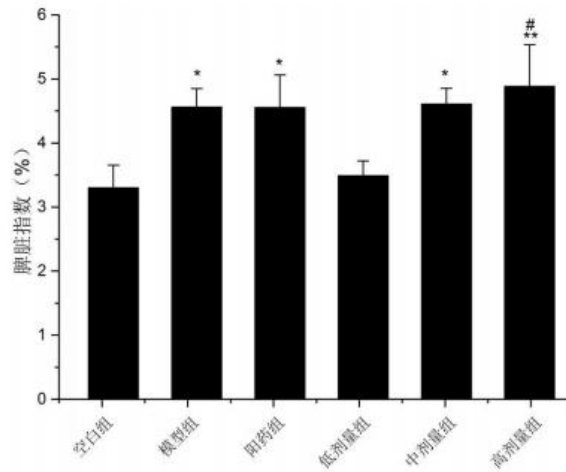


图2 小鼠免疫器官指数测定结果比较($\bar{x} \pm s$)

Figure.2 Comparison of immune organ index in mice($\bar{x} \pm s$)

注: *表示与空白组比较; #表示与模型组比较; *或者# 表示 $P < 0.05$, **或者##表示 $P < 0.01$ 。

如图2 所示, 阳药组、中剂量组和高剂量组脾脏指数相较于空白组脾脏指数显著升高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 且富硒青钱柳虫草片提升糖尿病小鼠脾脏指数具有剂量效应。

4 结果与讨论

糖尿病是一种由多病因引发的慢性内分泌代谢紊乱综合征,糖尿病患者一般伴随有免疫力低下, 并患有各种并发症。本文研制的青钱柳虫草片旨在发挥青钱柳降血糖效果的同时, 结合微量元素硒和虫草菌粉、枸杞和茯苓免疫力调节、抗氧化的作用, 达到更好的降血糖、缓解糖尿病患者并发症的效果。同时, 片剂方便病人服用, 利于提高服药顺应性。本文通过腹腔注射 STZ, 以及长期喂养小鼠高脂饲料诱导建立糖尿病小鼠模型, 连续给药 42 d 对青钱柳虫草片进行功效评价。小鼠糖耐量试验结果, 显示中剂量组、高剂量组具有显著降血糖的效果。表明青钱柳虫草片具有显著的降低糖尿病小鼠血糖的功效。SOD、GSH-Px 是机体内重要的抗氧化酶, 实验结果显示造模后糖尿病小鼠 SOD 活力降低, 但实验结果表明青钱柳虫草

片对糖尿病小鼠 SOD 活力无明显改善效果。GSH-Px 测定结果表明青钱柳虫草片可有效提高糖尿病小鼠 GSH-Px 活力，其中高剂量组效果最为显著。免疫器官脾脏指数实验中，测定结果表明青钱柳虫草片高剂量组具有明显的提高脏器指数的功效，其作用机制还有待深入研究。上述实验结果表明，青钱柳虫草片在降低糖尿病小鼠血糖的同时，具有一定的免疫调节和抗氧化功效。

参考文献

- [1] 苏玉卿, 李佳桐, 李伯林, 等. 青钱柳研究进展[J]. 农技服务, 2016(1):5-7.[2] 黄鑫, 黄敏, 童雪燕, 等. 青钱柳降血糖药效物质基础研究进展[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(23):11005-11005. [3] Wang Q, Jiang C, Fang S, et al. Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antioxidant effects of ethanol and aqueous extracts of *Cyclocarya paliurus* leaves in type 2 diabetic rats[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2013, 150(3): 1119-1127.[4] Xie J, Shen M, Xie M, et al. Ultrasonic-assisted extraction, antimicrobial and antioxidant activities of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja polysaccharides[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 89(1): 177-184.[5] 李晓坤, 闫吉昌, 崔晓莹, 等. 硒多糖的研究与应用进展[J]. 中草药, 2006(07):1122-1124.[6] Kornhauser C, Garcia-Ramirez J R, Wrobel K, et al. Serum selenium and glutathione peroxidase concentrations in type 2 diabetes mellitus patients[J]. *Primary Care Diabetes*, 2008, 2(2):81-85.[7] Zhou J, Huang K, Lei X G. Selenium and diabetes—Evidence from animal studies[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2013, 65: 1548-1556.[8] Asemi Z, Jamilian M, Mesdaghinia E, et al. Effects of selenium supplementation on glucose homeostasis, inflammation, and oxidative stress in gestational diabetes: Randomized, double-blind, placebo-controlled trial[J]. *Nutrition*, 2015, 31(10):1235-1242.
- [9] 张浩, 陈伟鸿, 马方励, 等. 青钱柳多糖对糖尿病模型小鼠血糖、血脂和免疫力的影响[J]. 食品科学, 2016:1-7.
- [10] 陶根金, 向全丹, 余强等. 发酵虫草菌粉对免疫抑制小鼠的免疫调节和抗氧化作用[J]. 南昌大学学报(理科版), 2016(02): 156-160.[11] 许春燕, 李恒, 陆震鸣. 虫草发酵菌粉的活性成分分析[J]. 安徽农业科学, 2015(34):168-169.
- [12] 一种具有降血糖、降血脂、增强免疫力、抗氧化功效的压片糖果及其制备方法和应用: 中国, 201710521759.8[P].2017-07-03.[13] 杨架林, 李果, 刘优萍, 等. 长期高脂饮食加小剂量链脲佐霉素建立人类普通 2 型糖尿病大鼠模型的研究[J]. 中国实验动物学报, 2003(03): 12-15.

- [14] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004(09): 1069-1072.
- [15] 梁海霞, 原海燕, 李焕德, 等. 高脂喂养联合低剂量链脲佐菌素诱导的 2 型糖尿病大鼠模型稳定性观察[J]. 中国药理学通报, 2008(04): 551-555.
- [16] Zhang Y, Ren C, Lu G, et al. Purification, characterization and anti-diabetic activity of a polysaccharide from mulberry leaf[J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2014, 70(3): 687-695.
- [17] 魏炳栋, 陶浩, 于维, 等. 黄芪多糖对氢化可的松氧化应激状态下肉仔鸡生长性能、脏器指数及抗氧化能力的影响[J]. 动物营养学报, 2012(10): 1939-1945.