

环糊精葡基转移酶对高血糖小鼠糖耐量和肝糖原影响的研究

张兴芳¹, 王荫榆², 龚广予², 郭本恒², 吴正钧²

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 200090; 2. 光明乳业股份有限公司技术中心, 上海 200072)

摘要: 通过对环糊精葡基转移酶在小白鼠糖尿病模型, 以高(10 mg/kg)、中(1 mg/kg)、低(0.1 mg/kg) 3 个剂量腹腔注射的试验观察, 探讨了环糊精葡基转移酶对小白鼠糖耐量和肝糖原的影响。结果显示: 环糊精葡基转移酶可显著改善高血糖小鼠的糖耐量和增加高血糖小鼠的肝糖原含量, 其作用效果与胰岛素效果相当。

关键词: 环糊精葡基转移酶; 小鼠; 糖耐量; 肝糖原

中图分类号: Q55 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2008)增刊-0107-03

The Effect of Cyclodextrin Glucanotransferase on the Glucose Tolerance and Glycogen Change of Diabetic Rats

ZHANG Xing-fang¹, WANG Yirryu², GONG Guang-yu², GUO Ben-heng², WU Zheng-jun²

(1. College of Food Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 200090, China;

2. Technology Center, Bright Dairy and Food Co, Ltd, Shanghai 200072, China)

Abstract: The objective of this experiment is to investigate the effect of cyclodextrin glucanotransferase on the glucose tolerance and glycogen change in diabetic rats. By adopting diabetic rats model induced by alloxan, the results in the tested rats injected intraperitoneally with dosage of 0.1, 1.0, 10 mg/kg have showed the positive effect, that is, the glucose tolerance of high blood glucose rats is improved and the level of glycogen is raised as well.

Key words: Cyclodextrin glucanotransferase; Rats; Glucose tolerance; Glycogen

糖尿病(Diabetes mellitus)是继肿瘤、心脑血管疾病之后第三大危害人类健康的慢性病, 是一种常见的以高血糖为主要标志的内分泌代谢紊乱性疾病, 在中医上属于“消渴病”的范畴, 其症状是血中的葡萄糖浓度升高, 大量糖从尿中排出, 并出现多饮、多尿、多食、消瘦及头晕、乏力等症状^[1-3]。环糊精葡基转移酶(CGTase)可水解淀粉生成环糊精和寡糖, 工业上主要用来生产环糊精。CGTase 经动物试验证实, 其具有显著的降血糖效果, 为了更深入的探讨其对糖尿病的防治作用, 本研究对 CGTase 的部分药理作用进行了试验。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 药物与试剂 环糊精葡基转移酶根据王媛等^[4]的方法制备, 并用 SDS-PAGE 电泳检测, 结果只

显示 1 条蛋白带, 表明 CGTase 为电泳纯的产品。

四氧嘧啶(Alloxan), 美国 Sigma 公司; 血糖仪及 Roche 活力型血糖试纸, 罗氏诊断产品(上海)有限公司; 胰岛素, 药店; 葡萄糖、萘酮、浓硫酸、三氯乙酸为国产分析纯。

1.1.2 主要仪器 可见分光光度计, 电子天平, 振荡器, 玻璃匀浆器。

1.1.3 试验动物 昆明种小白鼠: SD 系小鼠, 供应商: 上海斯莱克实验动物责任公司, 许可证号: SYXK(沪 2004-0011)。

1.1.4 剂量设计 受试物的高、中、低 3 个剂量组的剂量分别为: 0.1, 1, 10 mg/kg。

1.2 试验方法

1.2.1 CGTase 对高血糖模型小鼠糖耐量的影响 选择健康成年小鼠, 体重 25~30 g, 禁食不禁水 24 h 后, 按照 140 mg/kg 剂量腹腔注射 2% 的四氧嘧啶溶

收稿日期: 2008-09-14

作者简介: 张兴芳(1984-), 女, 山东青州人, 在读硕士, 主要从事食品生物技术方面的研究。

通讯作者: 郭本恒(1963-), 男, 山东潍坊人, 博士, 教授, 主要从事食品生物技术方面的研究。

液^[5]。72 h 后通过尾静脉取血用血糖试纸测定空腹血糖值(测血糖前禁食 4 h),选择空腹血糖值大于 15 mmol/L 小鼠 50 只,随机分为 5 组,即受试物的 3 个剂量组,胰岛素组和模型对照组,再选择 10 只同 1 批的小鼠作为正常对照组。每天腹腔注射一次(空白和模型对照给予生理盐水 90 mg/kg),连续给药 10 d。第 10 天给药 1 h 后,尾静脉取血测血糖(测前禁食不禁水 4 h),并记录为零时血糖值,再腹腔注射 1.11 mol/L 的葡萄糖溶液(10 mL/kg 体重),分别于注射葡萄糖后 0.5,1,和 2 h 再次取血测定血糖值^[6]。

1.2.2 CGTase 对高血糖模型小鼠肝糖原的影响 建模、分组、给药治疗同 1.2.1。第 10 天给药 1 h 后,处死小鼠,取肝脏,测定肝糖原。肝糖原的测定方法如下^[7]:

1.2.2.1 蒽酮试剂的配制 称取蒽酮试剂 40 mg,放入 20 mL 的浓硫酸中,迅速搅拌溶解后,立即使用(现配现用)。

1.2.2.2 三氯醋酸溶液的配制 快速称取三氯醋酸 5 g,用少量的蒸馏水溶解,移入 100 mL 容量瓶中,定容,配成 5% 的三氯醋酸溶液。

1.2.2.3 绘制标准曲线 精确吸取 100 mg/mL 糖原标准溶液 0.00,0.05,0.10,0.20,0.30,0.40,0.60,0.80 mL 于带塞试管中,用蒸馏水补足到 1 mL。然

后快速加入 4.00 mL 蒽酮试剂,迅速浸于冰水中冷却,待所有试管全部加完,一起浸入沸水浴中,自重新沸腾起计时,准确煮沸 10 min,煮完取出,用自来水冷却。然后,于室温中平衡片刻(10 min),再在 620 nm 波长下,测不同浓度的 OD 值,绘制标准曲线。

1.2.2.4 样品肝糖原含量的测定 准确称取约 100 mg 的肝脏,放入研钵器中,加入 4 mL 5% 的三氯醋酸溶液,制成匀浆,再以 8 000 r/min 离心 10 min,精确吸取上清液 1.0 mL,迅速加入 4 mL 蒽酮试剂,其他条件与 1.2.2.3 中绘制标准曲线的步骤一致,用回归方程计算样品糖元含量,根据所称取的肝脏重量,计算肝糖原含量(mg/g 组织湿重)。

1.3 数据处理

本试验数据均采用平均值±标准方差($\bar{X} \pm SD$)表示,采用 One Way ANOVA 统计分析。

2 结果与分析

2.1 CGTase 对高血糖模型小鼠糖耐量的影响

由表 1 可见,各组动物给予葡萄糖后血糖开始升高,到 0.5 h 达到高峰,其后,血糖开始下降。表 1 和图 1 结果表明,样品组的血糖水平和血糖曲线下面积(AUC, Area under the curve)均显著低于模型对照组,可拮抗血糖的升高,经统计学检验,差异显著。

表 1 CGTase 对高血糖模型小鼠糖耐量的影响

组别 Group	血糖值/(mmol/L) Glucose level			
	0 h	0.5 h	1 h	2 h
空白对照组 Normal control group	6.82 ± 1.19	11.77 ± 2.65	8.78 ± 2.23	7.48 ± 1.39
模型对照组 Model control group	25.85 ± 2.61	32.3 ± 1.71	29.67 ± 3.00	27.56 ± 2.59
样品组 CGTase group				
0.1 mg/kg	15.53 ± 3.50**	23.22 ± 3.60*	19.48 ± 3.63**	16.28 ± 3.13**
1 mg/kg	13.07 ± 2.13**	21.33 ± 3.99**	17.01 ± 3.33**	11.26 ± 4.02**
10 mg/kg	17.25 ± 1.99**	23.28 ± 4.20*	20.77 ± 2.71**	18.45 ± 3.42**
胰岛素组 Insulin group	12.43 ± 5.99**	18.3 ± 3.27**	15.10 ± 1.79**	10.62 ± 2.37**

注:与模型对照组相比较,* .p<0.05,** p<0.01。下同。
Note: Compared with the model group, * .p<0.05,** p<0.01. The same as followed.

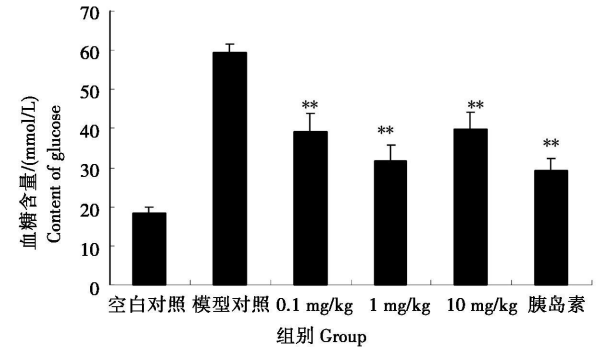


图 1 曲线下面积
Fig. 1 Area under the curve

2.2 CGTase 对高血糖模型小鼠肝糖原的影响 肝糖原含量的标准曲线见图 2。

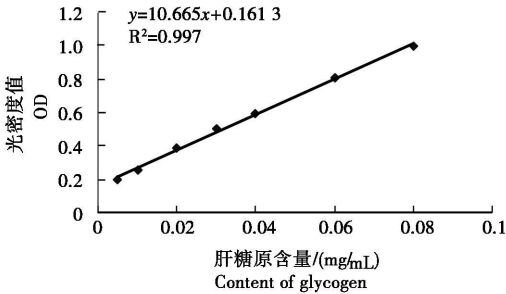


图 2 标准曲线
Fig. 2 Standard curve

根据 1 000C/W(mg/g) 换算,可得出肝糖原的含量(以湿重计),C 为根据标准曲线算出的样品肝糖原含量(mg/mL),W 为所取干组织的重量(mg)。由

表2可知,受试物各组都可极显著增加糖尿病小鼠肝糖原含量,其中中剂量组(1 mg/kg)效果最佳,其治疗效果与胰岛素治疗效果相当。

表2 CGTase 对高血糖模型小鼠肝糖原的影响

Tab.2 Effect of CGTase on glycogen in diabetic rat

组别 Group	动物数/ n Number	肝糖原含量 /(mg/g) Content of glycogen
空白对照组 Nomal control group	6	8.19±1.05
模型对照组 Model control group	6	5.83±0.57
样品组 CGTase group		
0.1 mg/kg	6	9.15±1.21**
1 mg/kg	6	10.58±1.01**
10 mg/kg	6	8.39±0.90**
胰岛素组 Insulin group	6	10.70±1.19**

3 讨论

葡萄糖耐量试验(GTT):正常情况下,在一次性摄入大量葡萄糖后,通过体内的各种调节机制的调节,血糖浓度暂时升高,2 h后恢复到正常水平,这种现象称为“耐糖现象”。当机体糖耐量减低时,血糖水平难以保持这一状态。糖耐量减低时血糖曲线表现为上升后下降缓慢,2 h后仍保持在较高水平。通过葡萄糖耐量试验,可以了解个体对葡萄糖的负荷能力,评估胰岛细胞的功能状态。

本试验的结果显示,环糊精葡基转移酶可显著改善糖尿病小鼠的糖耐量,表明其对外源性葡萄糖导致的血糖升高有拮抗作用。从糖耐量试验结果看,这一方面可能是环糊精葡基转移酶抑制了肠道对葡萄糖的吸收,另一方面可能是环糊精葡基转移酶直接影响了糖代谢,阻止葡萄糖在动物肠道中的吸收。

动物体内与血糖浓度调节有关的最主要器官为肝脏,肝糖原的合成与分解是肝脏所特有的,是体现肝脏功能强弱的一个重要指标,肝糖原的贮存与分解直接影响到肝功能。当肝糖原合成增加时,血糖浓度下降,反之,肝糖原分解增加时,血糖浓度上升。从本试验结果可知,受试物各组都可显著增加糖尿病小鼠肝糖原的含量,说明环糊精葡基转移酶对小鼠的糖代谢过程有明显的保护作用,能有效的调节小鼠体内糖的含量,增加肝糖原的贮存,减少其分解。这也说明环糊精葡基转移酶的降血糖作用是通过增加肝糖原的含量来实现的。

参考文献:

[1] 俞灵莺,李 向. 植物黄酮类抗糖尿病及其并发症的研究进展[J]. 国外医学卫生学分册, 2000, 27(6): 331-335.

[2] 郭芳彬. 蜂胶对糖尿病的疗效与作用机理探析[J]. 养蜂科技, 2004, 5: 32- 34.

[3] Wang D F, Wang C H, Li J, *et al.* Components and activity of polysaccharides from coarse tea[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(1): 507- 510.

[4] 王 媛,王荫榆,郭本恒,等. β -环糊精葡基转移酶的纯化方法及酶学性质的研究[J]. 工业微生物, 2007, 37(6): 7- 11.

[5] Kameswara Rao B, Kesavulu M M, Giri R. *et al.* Antidiabetic and hypolipidemic effects of *Momordica cymbalaria* Hook fruit powder in alloxan diabetic rats[J]. J Ethnophar, 1999, 67: 103- 109.

[6] 王慧铭,项伟岚,潘宏铭,等. 香菇多糖对高血糖大鼠降血糖作用及其机理的研究[J]. 浙江中医学院学报, 2005, 29(5): 68- 70.

[7] 吴珍红,李东山,缪晓青,等. 复方蜂胶制剂对糖尿病小鼠糖耐量和肝糖原的影响研究[J]. 中国蜂业, 2006, 57(6): 5- 7.