

一种榆黄蘑菌丝体多糖的结构表征及其降血糖作用

毛美林¹, 邓子言¹, 李万晴¹, 蔡长君¹, 涂康¹, 王誉¹, 张宝翠¹, 朱希强¹, 姜宁^{1,2}, 刘晓鹏^{1,2,*}
(1.湖北民族大学生物与食品工程学院, 湖北恩施 445000; 2.生物资源保护与利用湖北省重点实验室, 湖北恩施 445000)

摘要:为探究榆黄蘑 (*Pleurotus citrinopileatus*) 菌丝体多糖的结构及降血糖作用, 首先从榆黄蘑菌丝体中分离纯化得到水溶性多糖 (water-soluble polysaccharide from *P. citrinopileatus*, PCP-W), 采用采用高效分子排阻色谱、红外光谱等方法表征其结构; 然后建立2型糖尿病小鼠模型, 灌胃PCP-W 8周后, 检测小鼠空腹血糖水平、糖耐量和空腹胰岛素水平, 计算定量胰岛素敏感性检查指数 (quantitative insulin sensitivity check index, QUICKI); 检测小鼠血脂、氧化应激水平和肝脏己糖激酶 (hexokinase, HK)、丙酮酸激酶 (pyruvate kinase, PK) 活力。结果表明, PCP-W分子质量为5 238 Da, 含D-吡喃葡萄糖, 单糖组成为甘露糖、核糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖和岩藻糖, 其物质的量比为0.003:0.010:0.011:0.015:0.001:0.944:0.013:0.001。治疗8周后, PCP-W能显著降低糖尿病小鼠空腹血糖水平, 改善葡萄糖耐受, 升高空腹胰岛素水平, 改善QUICKI ($P < 0.01$); PCP-W能显著改善糖尿病小鼠的血脂代谢和氧化应激水平, 提高PK和HK的活力 ($P < 0.01$)。因此, PCP-W具备开发成降糖药物的潜力。

关键词:榆黄蘑; 菌丝体; 多糖; 结构表征; 降血糖

Structural Characterization and Hypoglycemic Effect of a Polysaccharide from *Pleurotus citrinopileatus* Mycelia

MAO Meilin¹, DENG Ziyang¹, LI Wanqing¹, CAI Changjun¹, TU Kang¹, WANG Yu¹,

ZHANG Baocui¹, ZHU Xiqiang¹, JIANG Ning^{1,2}, LIU Xiaopeng^{1,2,*}

(1. College of Biological and Food Engineering, Hubei Minzu University, Enshi 445000, China;

2. Hubei Key Laboratory of Biological Resources Protection and Utilization, Enshi 445000, China)

Abstract: In this study, the structure of a water-soluble polysaccharide named PCP-W from the *P. citrinopileatus* mycelia was investigated by high performance size exclusion chromatography (HPSEC) and infrared (IR) spectroscopy. To evaluate the *in vivo* hypoglycemic effect of PCP-W, the fasting blood glucose level, glucose tolerance and fasting insulin level in mice with type 2 diabetes were measured after gavage administration of PCP-W for eight weeks, the quantitative insulin sensitivity check index (QUICKI) was calculated, and the levels of serum lipids and oxidative stress and the activities of hepatic hexokinase (HK) and pyruvate kinase (PK) were detected. The results showed that the molecular mass of PCP-W, containing D-glucopyranose units, was 5 238 Da. PCP-W was composed of mannose, ribose, rhamnose, glucuronic acid, galacturonic acid, glucose, galactose and fucose in a molar ratio of 0.003: 0.010: 0.011: 0.015: 0.001: 0.944: 0.013: 0.001. After eight weeks of treatment with PCP-W, the fasting blood glucose level was reduced, the glucose tolerance was improved, the fasting insulin level was increased, and QUICKI was improved in diabetic mice significantly ($P < 0.01$). In addition, lipid metabolism and oxidative stress levels were improved, and the activities of PK and HK were increased ($P < 0.01$). Therefore, PCP-W has the potential to act as a hypoglycemic agent.

Keywords: *Pleurotus citrinopileatus*; mycelia; polysaccharide; structural characterization; hypoglycemic

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220715-178

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2023) 11-0115-09

收稿日期: 2022-07-15

基金项目: 湖北省技术创新专项 (2016AKB058; 2017ABA139; 2017AKB077); 国家自然科学基金地区科学基金项目 (82160713);

湖北产业教授人才项目 (2019029; 2021067); 湖北省高等学校大学生创新创业训练计划项目 (S202110517036)

第一作者简介: 毛美林 (2000—) (ORCID: 0000-0002-4416-7449), 女, 本科, 研究方向为生物制药。E-mail: 1906866324@qq.com

*通信作者简介: 刘晓鹏 (1971—) (ORCID: 0000-0001-5859-1550), 男, 教授, 博士, 研究方向为生物工程。

E-mail: liuxp999@163.com

引文格式:

毛美林, 邓子言, 李万晴, 等. 一种榆黄蘑菌丝体多糖的结构表征及其降血糖作用[J]. 食品科学, 2023, 44(11): 115-123. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220715-178. <http://www.spkx.net.cn>

MAO Meilin, DENG Ziyang, LI Wanqing, et al. Structural characterization and hypoglycemic effect of a polysaccharide from *Pleurotus citrinopileatus* mycelia[J]. Food Science, 2023, 44(11): 115-123. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220715-178. <http://www.spkx.net.cn>

糖尿病是一种常见的慢性代谢性疾病, 通常会导致严重的并发症, 如神经损伤、糖尿病肾病和心血管疾病等^[1]。我国是成人糖尿病患者最多的国家, 2011—2021年, 我国糖尿病患者由9000万例增加至1.4亿例, 增幅达56%, 其中约7283万例患者尚未被确诊, 比例高达51.7%; 另外, 约有1.7亿成人伴有糖耐量受损, 约2700万成人伴有空腹血糖受损; 预测到2045年, 我国糖尿病患者数量将达到1.744亿例^[2], 其中90%以上为2型糖尿病。目前, 许多降糖药物被用于治疗2型糖尿病, 如二甲双胍、磺脲类、格列奈类、 α -糖苷酶抑制剂、噻唑烷二酮类、二肽基肽酶IV、钠-葡萄糖共转运蛋白2、胰高血糖素样肽1受体激动剂、胰岛素, 但这些抗糖尿病药物可能会引起副作用, 如胃肠道反应、低血糖、骨质疏松、心力衰竭、泌尿生殖系统感染等^[3], 因此, 开发新型低毒、高效降糖药物已成为研究热点。

榆黄蘑 (*Pleurotus citrinopileatus*) 又称为金顶侧耳、玉皇蘑, 属担子菌亚门、层菌纲、伞菌目、侧耳科、侧耳属, 是珍贵的药食同源真菌, 含有多种药用成分, 其中多糖是主要的活性成分之一。榆黄蘑多糖具有多种药理活性, 如免疫调节^[4]、抗炎^[5]、抗肿瘤^[6]、抗氧化^[7]等。目前对榆黄蘑子实体研究较多, 与栽培子实体相比, 通过深层发酵获得菌丝体然后从中提取活性成分, 具有占地小、产量高、质量可控等优点。菌丝体活性物质的提取和活性研究已成为药食同源真菌药用成分和活性研究的重要手段。已有研究表明, 榆黄蘑菌丝体多糖具有降血糖作用^[8-9], 但缺乏深入研究。本研究从榆黄蘑菌丝体多糖中分离纯化得到一种新型多糖, 并研究其对链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 诱导的糖尿病模型小鼠的降血糖作用, 旨在对榆黄蘑的进一步开发利用提供理论支撑。

1 材料与amp;方法

1.1 动物、材料与试剂

6周龄C57BL/6雄性小鼠, 体质量(20±2)g, 购自辽宁长生生物技术股份有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK(辽)2020-0001。

榆黄蘑菌丝体, 由本实验室经发酵罐深层发酵所得, 60℃烘干, 粉碎, 过60目筛备用。

高糖高脂饲料(配方: 66.5%(质量分数, 下同)大小鼠维持饲料、10%猪油、20%蔗糖、2.5%胆固醇、1%胆酸钠, 总能量16.473kJ/g) 小黍有泰(北京)生物技术有限公司; 大小鼠维持饲料 辽宁长生生物技术股份有限公司。

Sephadex A-25 DEAE凝胶、Sephacryl S-200凝胶 美国GE Healthcare公司; 右旋糖酐分子标准品 中国食品药品检定研究院; STZ、盐酸二甲双胍、1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, PMP) 国药集团化学试剂有限公司; 葡萄糖、总胆固醇(total cholesterol, TC)、三酰甘油(triacylglycerol, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)、己糖激酶(hexokinase, HK)、丙酮酸激酶(pyruvate kinase, PK)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、二奎啉甲酸(bicinchoninic acid, BAC)蛋白检测试剂盒、小鼠胰岛素酶联免疫吸附检测试剂盒 南京建成生物工程研究所; 其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

Multiskan Sky全波长酶标仪 赛默飞世尔(上海)仪器有限公司; TGL-16G离心机 上海安亭科学仪器厂; Avanti J-30I冷冻高速离心机 德国Beckman公司; 1200高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)仪 美国Agilent公司; RI-101示差折光检测器 日本Showa Denko K.K.公司; 傅里叶变换红外光谱仪 美国Thermo Scientific公司。

1.3 方法

1.3.1 榆黄蘑菌丝体水溶性多糖的制备

根据张宝翠等^[10]的方法提取榆黄蘑菌丝体粗多糖, 60℃烘干。称取500mg干燥的榆黄蘑菌丝体粗多糖溶于30mL蒸馏水中, 10000×g离心15min, 取上清液, 进行DEAE Sephadex A-25离子交换层析, 以蒸馏水洗脱, 流速1mL/min, 分管收集, 4min/管, 每隔5管采用硫酸-萘酚比色法检测多糖质量浓度。以管号为横坐标,

多糖质量浓度为纵坐标, 绘制洗脱曲线, 收集洗脱峰, 冷冻干燥。

将蒸馏水洗脱组分进行Sephacryl S-200凝胶过滤层析, 蒸馏水洗脱, 流速1 mL/min, 分管收集, 硫酸-蒽酮比色法检测多糖质量浓度。以管号为横坐标, 多糖质量浓度为纵坐标, 绘制洗脱曲线, 收集洗脱峰, 冷冻干燥, 所得样品命名为榆黄蘑菇丝体水溶性多糖 (water-soluble polysaccharide from *P. citrinopileatus*, PCP-W)。

1.3.2 PCP-W的结构表征

1.3.2.1 纯度和分子质量的测定

采用高效分子排阻色谱法 (high performance size exclusion chromatography, HPSEC) 检测PCP-W的纯度和分子质量^[11]。将不同分子质量的右旋糖酐标准品 (2 700、5 250、9 750、13 050、36 800 Da) 用蒸馏水配制成1 mg/mL的溶液, 经0.45 μm微孔滤膜过滤后分别注入液相色谱仪20 μL, 流动相为H₂O, 流速1 mL/min, 柱温65 °C, RI-10A示差折光检测器检测, 记录色谱图。以标准品分子质量的对数值为自变量、保留时间为因变量, 计算回归方程。将PCP-W以相同条件进行HPSEC, 根据色谱图计算纯度, 根据保留时间和标准回归方程计算PCP-W分子质量。

1.3.2.2 红外光谱分析

称取PCP-W冻干粉末5 mg, 溴化钾压片, 置于傅里叶变换红外光谱仪上在400~4 000 cm⁻¹区间扫描。

1.3.2.3 单糖组成测定

采用PMP柱前衍生-HPLC法测定^[12]。具体操作如下: 称取PCP-W 10 mg于水解管中, 加入4 mol/L三氟乙酸溶液1 mL, 于120 °C烘箱中水解2 h。然后氮气吹干, 加蒸馏水定容至20 mL。分别称取鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、岩藻糖、半乳糖、半乳糖醛酸、葡萄糖醛酸、核糖标准品各10 mg, 配制成1.0 mg/mL混合标准溶液, 稀释成质量浓度分别为2.5、5.0、12.0、18.0、25.0 μg/mL的溶液。取样品溶液和系列混合标准溶液各0.5 mL, 分别加入1 mL 0.5 mol/L PMP-甲醇溶液以及0.5 mL 0.3 mol/L NaOH溶液, 70 °C水浴60 min, 冷却后依次加入0.5 mL 0.3 mol/L HCl溶液和0.5 mL氯仿, 振荡摇匀后静置20 min, 弃下层, 萃取3次, 取水层过0.45 μm滤膜进行HPLC分析。色谱条件: 色谱柱: SHISEIDO C₁₈柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 0.1 mol/L KH₂PO₄ (pH 6.8) -乙腈 (82:18, V/V); 流速1.0 mL/min; 柱温25 °C; 进样量10 μL, 检测波长245 nm。以单糖质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得到标准曲线方程。根据标准曲线方程, 计算样品中各单糖含量, 最后计算各单糖组份物质的量比。

1.3.3 PCP-W对2型糖尿病小鼠的治疗作用

1.3.3.1 实验动物分组与2型糖尿病小鼠模型的建立

C57BL/6小鼠60只, 适应环境饲养1周后, 随机分成

6组, 分别为空白组 (Con)、模型组 (Mod)、二甲双胍组 (Met) 以及PCP-W低 (LD)、中 (MD)、高剂量组 (HD), 每组10只。参照文献[13]的方法稍作改进, 建立2型糖尿病小鼠模型; 具体如下: 除空白组外, 其余5组小鼠腹腔注射50 mg/kg STZ溶液, 空白组注射等体积10 mmol/L pH4.5的柠檬酸缓冲液, 连续注射4 d, 3 d后检测小鼠空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG) 浓度, FBG浓度高于11.1 mmol/L为造模成功。

造模成功后, 低、中、高剂量组小鼠分别按剂量50、100、200 mg/kg灌胃PCP-W水溶液, 空白组和模型组小鼠灌胃等体积蒸馏水, 二甲双胍组按剂量200 mg/kg灌胃盐酸二甲双胍溶液, 每天定时灌胃1次, 共给药8周。从注射STZ溶液开始, 空白组饲喂小鼠维持饲料, 其余组小鼠饲喂高糖高脂饲料。

1.3.3.2 小鼠FBG浓度的测定

造模前及造模成功后灌胃期间每周小鼠眼眶静脉丛取血, 取血前小鼠禁食8 h, 自由饮水, 采集血样3 500 r/min离心15 min, 取血清, 按试剂盒说明书操作检测FBG浓度。

1.3.3.3 口服葡萄糖耐量试验

灌胃结束后, 小鼠禁食12 h进行口服葡萄糖耐量试验 (oral glucose tolerance test, OGTT)。各组按2 g/kg灌胃葡萄糖水溶液, 分别于0、30、60、90、120 min眼眶静脉丛取血, 制备血清, 按试剂盒操作说明测定小鼠血糖浓度, 绘制血糖浓度随时间变化曲线, 计算曲线下面积 (area under curve, AUC)^[14]。

1.3.3.4 口服脂肪耐量试验

灌胃结束后, 小鼠禁食8 h进行口服脂肪耐量试验 (oral fat tolerance test, OFTT)。各组按10 mL/kg灌胃橄榄油, 分别于0、1、2、3、4 h眼眶静脉丛取血, 制备血清, 按试剂盒操作说明测定血清TG浓度, 绘制TG浓度随时间变化曲线, 计算AUC^[15]。

1.3.3.5 小鼠空腹胰岛素水平和定量胰岛素敏感性检查指数的计算

灌胃结束后, 小鼠禁食8 h, 摘眼球取血, 血液3 500 r/min离心15 min, 取血清。采用小鼠胰岛素酶联免疫吸附检测试剂盒测定, 应用ELISACalc软件计算小鼠空腹胰岛素 (fast insulin, FINS) 水平, 拟合模型选用logistic曲线 (四参数)。

根据小鼠FBG质量浓度和FINS水平, 按下式计算定量胰岛素敏感性检查指数 (quantitative insulin sensitivity check index, QUICKI)^[16]。

$$\text{QUICKI} = 1 / [\lg (\text{FBG质量浓度} / (\text{mg/dL})) + \lg (\text{FINS水平} / (\mu\text{U/mL}))]$$

1.3.3.6 小鼠血脂指标的测定

根据试剂盒说明书分别测定小鼠血清TG、TC、FFA、LDL-C和LDL-C水平。

1.3.3.7 小鼠血清和肝脏抗氧化指标的测定

根据试剂盒说明书分别测定小鼠血清和肝脏中MDA、CAT、SOD、GSH-Px以及T-AOC水平。肝脏各指标均以蛋白质质量计。

1.3.3.8 小鼠肝脏HK和PK活力的测定

取小鼠肝脏，生理盐水清洗，吸干表面水分，称质量，剪碎，按肝脏质量加入9倍体积生理盐水制备10%匀浆，2 500 r/min离心10 min，取上清液。按试剂盒说明书检测上清液中的HK和PK活力，结果以蛋白质质量计。

1.4 数据处理与分析

所有结果均以平均值±标准误差表示，采用Origin 9.0软件进行单因素方差分析，采用Tukey法进行显著性差异比较， $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 PCP-W的结构表征结果

2.1.1 PCP-W的纯度和分子量

榆黄蘑菇丝体粗多糖的DEAE Sephadex A-25离子交换层析和Sephacryl S-200凝胶过滤层析的洗脱曲线分别如图1、2所示。由图3可知，PCP-W的HPSEC图谱呈单一对称峰，根据色谱图计算得到纯度达99.89%，说明PCP-W为成分均一的多糖。以标准品分子质量的对数值为自变量、保留时间为因变量，得到的回归方程为 $y = -0.829 2x + 13.611$ ， $R^2 = 0.993 2$ ，计算得出PCP-W的分子质量为5 238 Da。

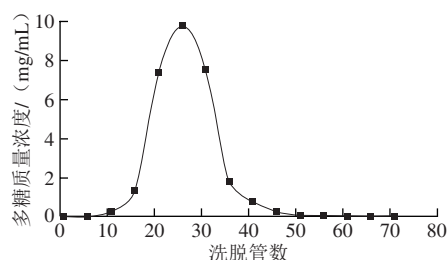


图1 榆黄蘑菇丝体粗多糖的DEAE Sephadex A-25离子交换层析洗脱曲线

Fig. 1 Elution curve of crude polysaccharides from *P. citrinopileatus* mycelia on DEAE Sephadex A-25 ion exchange chromatography

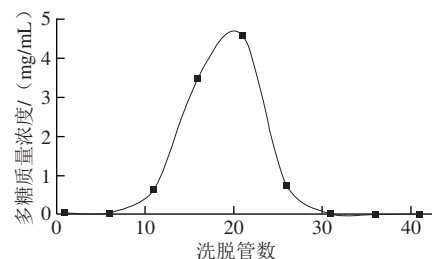


图2 榆黄蘑菇丝体多糖的Sephacryl S-200凝胶过滤层析洗脱曲线

Fig. 2 Elution curve of polysaccharides from *P. citrinopileatus* mycelia on Sephacryl S-200 gel filtration chromatography

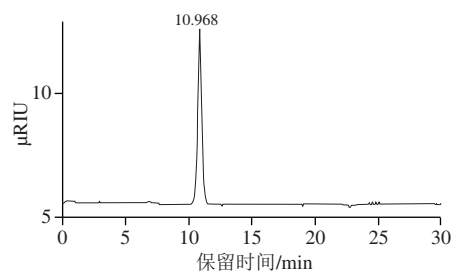


图3 PCP-W的HPSEC图谱

Fig. 3 HPSEC profile of PCP-W

2.1.2 PCP-W的红外光谱分析结果

如图4所示，PCP-W在 $3\ 600 \sim 3\ 200\ \text{cm}^{-1}$ 处出现一个宽峰，与O—H的伸缩振动相关。在 $2\ 922.34\ \text{cm}^{-1}$ 处的峰是糖类C—H伸缩振动， $1\ 400 \sim 1\ 200\ \text{cm}^{-1}$ 处的峰归属于C—H的变角振动，这两组峰均为糖类化合物的特征吸收峰。 $1\ 665 \sim 1\ 635\ \text{cm}^{-1}$ 处的峰为碳水化合物吸收峰， $1\ 250 \sim 950\ \text{cm}^{-1}$ 区间的峰为吡喃环的醚键(C—O—C)和羟基的吸收峰，在 $849.93\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰由 α -端基碳差向异构体的C—H变形振动引起，表明PCP-W的端基碳为 α -构型，在 $761.34\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰是由D-吡喃葡萄糖的对称环伸缩振动所引起^[17-18]。

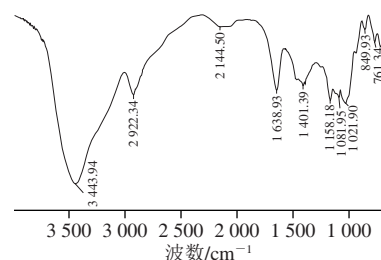


图4 PCP-W的傅里叶变换红外光谱图

Fig. 4 Fourier transform infrared spectrum of PCP-W

2.1.3 PCP-W的单糖组成

由图5、6可知，PCP-W的单糖组成为甘露糖、核糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖和岩藻糖，物质的量比为 $0.003:0.010:0.011:0.015:0.001:0.944:0.013:0.001$ ，由此可见，PCP-W主要由葡萄糖残基组成，其他单糖含量非常低。

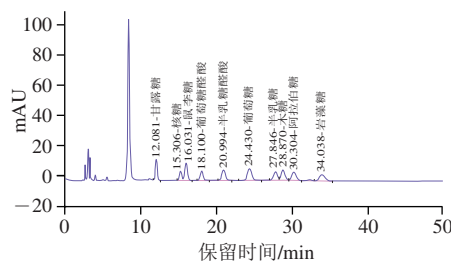


图5 单糖标准品HPLC图谱

Fig. 5 High performance liquid chromatogram of monosaccharide standards

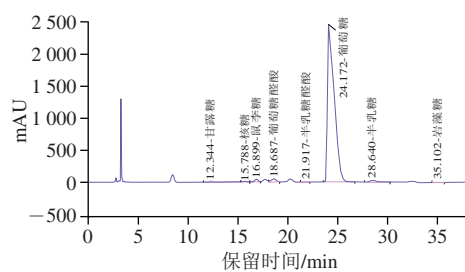


图6 PCP-W单糖组成HPLC图谱

Fig. 6 High performance liquid chromatogram of the monosaccharide composition of PCP-W

张丽萍等^[19-20]从榆黄蘑子实体中分离纯化得到两种多糖PC-3和PC-4, PC-3分子质量为67 000 Da, 由半乳糖和甘露糖组成, PC-4分子质量为189 kDa, 为单一的葡聚糖; Liu Jicheng等^[21]采用快流速DEAE-琼脂糖凝胶和Sephadex G-200柱层析从榆黄蘑子实体中纯化得到一种分子质量为45 kDa的葡聚糖; Minato等^[4]报道了一种从榆黄蘑子实体中分离纯化得到的分子质量为450 kDa的葡聚糖, 结构分析表明该多糖主链含有 β -1,6-吡喃葡萄糖苷残基, 支链含 β -1,3-吡喃葡萄糖苷残基; 周赛静^[22]采用快流速DEAE-琼脂糖凝胶和Sephacryl 300层析得到一种水溶性多糖PCP60W, 其分子质量为 2.74×10^4 Da, 主要由甘露糖、半乳糖和3(4)-O-甲基-己糖组成; Wang Qing等^[23]从榆黄蘑子实体中纯化得到平均分子质量为 7.30×10^5 Da的多糖, 其由阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖和葡萄糖醛酸组成, 物质的量比为0.66:14.59:10.77:1.00:0.69:0.23, 是一种含有 α -型和 β -型糖苷残基的吡喃糖。郝亚利^[9]采用热水浸提、Sephadex G-150柱层析纯化得到榆黄菇菌丝体纯多糖(多糖纯度 $(94.07 \pm 0.28)\%$), 分子质量为 3.221×10^6 Da, 由甘露糖、葡萄糖、半乳糖以物质的量比0.33:1.03:0.21组成。

与上述研究比较, PCP-W的分子质量较小, 各单糖比例不同, 为一种新型榆黄蘑菌丝体多糖, 单糖之间的连接方式还有待进一步研究。分离纯化得到的多糖分子质量小于已报道的榆黄蘑多糖, 可能是由于研究所用榆黄蘑菌种、培养条件和分离纯化技术不同, 且获得小分子质量的活性多糖对临床应用、构效关系和活性单位研究更有意义^[24]。

2.2 PCP-W对糖尿病小鼠的干预作用

2.2.1 PCP-W对糖尿病小鼠FBG的影响

如图7所示, 健康小鼠注射STZ后FBG浓度急剧上升, 经PCP-W干预后, 第2周FBG浓度开始下降, 4周后血糖趋于稳定, 7周后3个干预组FBG浓度与二甲双胍组相当。降低FBG浓度是治疗糖尿病的首要目标。多项研究表明, 多糖具有降血糖功能。Fu Chengyang等^[25]的

研究表明山茱萸(*Fructus Corni*)多糖能显著降低糖尿病大鼠FBG水平; Li Lu等^[26]对糖尿病小鼠给予黑灵芝(*Ganoderma atrum*)多糖4周, 发现干预组小鼠FBG水平显著下降。

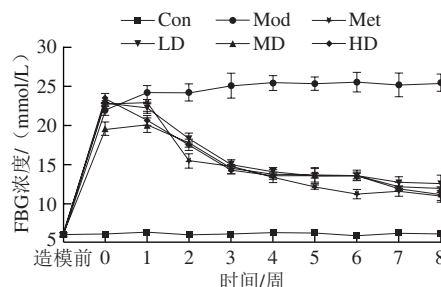


图7 PCP-W对糖尿病小鼠FBG浓度的影响 (n=10)

Fig. 7 Effect of PCP-W on fasting blood glucose content in diabetic mice (n = 10)

2.2.2 PCP-W对糖尿病小鼠OGTT的影响

如图8所示, 当口服葡萄糖后, 除模型组外, 其余组小鼠血糖均表现出相同的变化趋势, 即30 min时出现最高峰随后下降, 干预组下降幅度呈剂量依赖性, 模型组则在60 min时出现极大值, 除LD组外, 其余各组均在120 min时血糖浓度降至实验前水平; 比较AUC发现, 与模型组相比, 低、中、高剂量组的AUC均极显著降低 ($P < 0.01$), 并呈剂量依赖性, 中、高剂量组与二甲双胍组相当(图9), 说明榆黄蘑菌丝体多糖能显著加快血液中葡萄糖的代谢, 改善糖尿病小鼠的糖耐量。

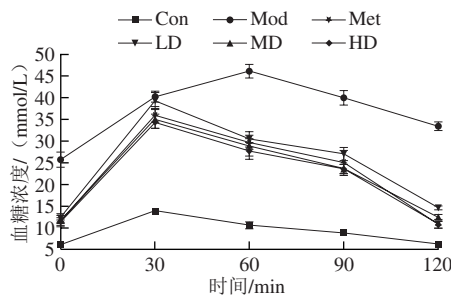
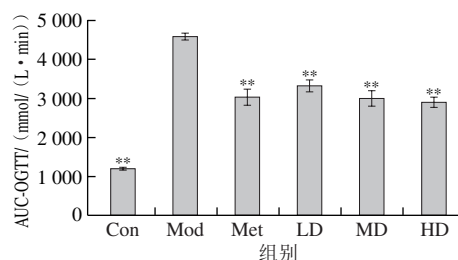


图8 PCP-W对糖尿病小鼠OGTT中血糖浓度的影响 (n=10)

Fig. 8 Effect of PCP-W on blood glucose level of diabetic mice during oral glucose tolerance test (OGTT) (n = 10)



**与模型组比较差异极显著 ($P < 0.01$)。图11~15同。

图9 PCP-W对糖尿病小鼠OGTT中AUC的影响 (n=10)

Fig. 9 Effect of PCP-W on area under curve (AUC) of diabetic mice during OGTT (n = 10)

OGTT是临床诊断糖尿病和糖代谢异常的重要手段,其结果反映机体的葡萄糖代谢速率,是胰岛素敏感的标志之一^[27]。动物实验一般采用OGTT或腹腔注射葡萄糖耐量试验(intraperitoneal glucose tolerance test, IPGTT)。Gao Huashan等^[27]研究金线莲(*Anoectochilus roxburghii*)多糖对2型糖尿病小鼠的IPGTT影响,发现金线莲多糖能改善糖耐量,降低AUC; Yang Yu等^[28]研究表明枸杞(*Lycium barbarum*)多糖能显著减轻肥胖小鼠的高糖应激,降低OGTT的AUC。

2.2.3 PCP-W对糖尿病小鼠OFTT的影响

口服橄榄油后,6组小鼠血清TG浓度随时间变化的趋势一致,均在2 h时达到峰值,其中空白组TG水平始终较低,模型组在各时间段TG水平均为最高,经PCP-W干预后,低、中、高剂量组TG浓度上升的幅度均明显低于模型组(图10);与模型组相比,3个干预组的AUC均显著降低($P<0.01$),并呈剂量依赖性,效果优于二甲双胍组(图11)。

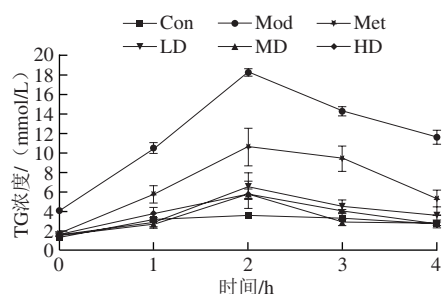


图10 PCP-W对糖尿病小鼠OFTT中TG浓度的影响 ($n=10$)

Fig. 10 Effect of PCP-W on triacylglycerol of diabetic mice during oral fat tolerance test (OFTT) ($n=10$)

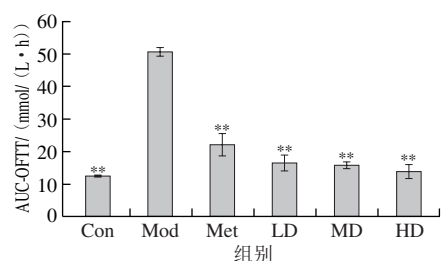


图11 PCP-W对糖尿病小鼠OFTT中AUC的影响 ($n=10$)

Fig. 11 Effect of PCP-W on AUC of diabetes mice during OFTT ($n=10$)

OFTT是通过给予既定口服脂肪量评估机体餐后脂质代谢能力和心脏代谢健康水平^[29]。OFTT的数据可用于获取有关胰腺脂肪酶抑制活性和肠道脂质吸收的信息^[30]。与餐后高血糖症相同,餐后血脂水平在2型糖尿病及其相关并发症的发生过程中也有重要影响。给予PCP-W后,糖尿病小鼠OFTT的AUC显著下降,说明PCP-W能改善糖尿病小鼠的血脂代谢能力。

2.2.4 PCP-W对糖尿病小鼠FINS水平和QUICKI的影响

PCP-W能提高糖尿病小鼠FINS水平,并呈剂量依赖性,中、高剂量组的FINS水平与模型组比较差异极显著($P<0.01$) (图12)。如图13所示,各剂量PCP-W均能极显著改善糖尿病小鼠的QUICKI ($P<0.01$),并呈剂量依赖性。胰岛素是人体内唯一调节血糖浓度的激素。2型糖尿病的主要病因是胰岛素分泌相对不足或胰岛素抵抗,促进机体胰岛素分泌和增强胰岛素敏感是治疗2型糖尿病的重要策略。Wang Dongying等^[31]从金银花(*Lonicera japonica*)花蕾中提取一种多糖,发现该多糖能提高糖尿病大鼠FINS水平,改善胰岛素抵抗; Deng Shifang等^[32]研究发现黄芪多糖能通过促进胰岛β细胞的增殖和胰岛素分泌降低血糖。QUICKI是反映机体对胰岛素敏感程度的指数,QUICKI升高表明机体外周细胞(肝细胞、脂肪细胞和肌细胞)对胰岛素的敏感性增强。PCP-W提高糖尿病小鼠FINS水平和QUICKI,说明榆黄蘑菌丝体多糖可能通过保护胰岛β细胞,促进胰岛素分泌,增加糖尿病小鼠外周细胞对胰岛素的敏感性,从而改善2型糖尿病小鼠的胰岛素抵抗,达到治疗效果。

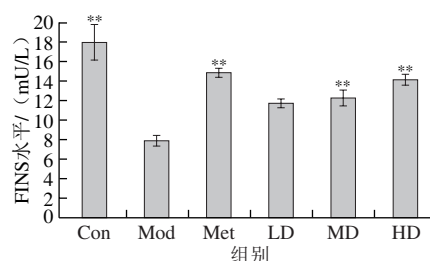


图12 PCP-W对糖尿病小鼠FINS水平的影响 ($n=10$)

Fig. 12 Effect of PCP-W on fast insulin of diabetic mice ($n=10$)

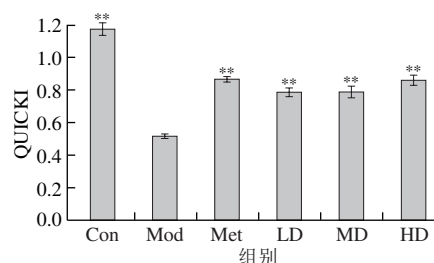


图13 PCP-W对糖尿病小鼠QUICKI的影响 ($n=10$)

Fig. 13 Effect of PCP-W on QUICKI of diabetic mice ($n=10$)

2.2.5 PCP-W对糖尿病模型小鼠血脂的影响

如表1所示,注射STZ后,小鼠的TG、TC、FFA和LDL-C浓度均极显著升高($P<0.01$),HDL-C浓度极显著下降($P<0.01$),说明糖尿病小鼠血脂水平出现异常;口服PCP-W后,小鼠血脂指标得到改善,其中低、中、高剂量组TG、TC、FFA和LDL-C浓度均显著下降($P<0.05$ 、 $P<0.01$),除LDL-C外,TG、TC、

FFA浓度的降低效果均优于二甲双胍；PCP-W能提高糖尿病小鼠的HDL-C浓度，中、高剂量组效果显著 ($P<0.05$ 、 $P<0.01$)。

表1 PCP-W对糖尿病小鼠血脂水平的影响 (n=10)

Table 1 Effect of PCP-W on blood lipids in diabetic mice (n = 10)

指标	Con组	Mod组	Met组	LD组	MD组	HD组
TG浓度/(mmol/L)	1.37±0.09**	4.03±0.06	1.76±0.09**	1.62±0.18**	1.48±0.28**	1.36±0.28**
TC浓度/(mmol/L)	2.82±0.22**	5.04±0.44	3.51±0.06**	4.00±0.07*	3.32±0.09**	3.01±0.05**
FFA浓度/(mmol/L)	1.48±0.08**	3.41±0.25	1.71±0.14**	2.04±0.07**	1.81±0.13**	1.43±0.08**
LDL-C浓度/(mmol/L)	0.48±0.02**	0.84±0.04	0.52±0.05**	0.59±0.08**	0.56±0.05**	0.54±0.02**
HDL-C浓度/(mmol/L)	5.22±0.09**	3.31±0.16	5.18±0.36**	4.08±0.09	4.13±0.15*	4.30±0.10**

注：与模型组比较，*差异显著 ($P<0.05$)，**差异极显著 ($P<0.01$)。表2同。

血糖代谢紊乱常导致血脂代谢异常，继而引发多种并发症，如微血管（视网膜病变、肾病和神经病变）和大血管（缺血性心脏病、外周血管病和脑血管病）并发症^[33]。因此，降低TG、TC、FFA和LDL-C水平和升高HDL-C水平是治疗糖尿病的重要方法之一。胰岛素能促进脂肪的合成，PCP-W能降低糖尿病小鼠TG、TC、FFA和LDL-C水平，升高HDL-C水平，可能与保护β细胞或促进胰岛素分泌有关，具体机制还需进一步探究。

2.2.6 PCP-W对糖尿病小鼠抗氧化指标的影响

如表2所示，无论是血清还是肝脏，模型组MDA水平均极显著高于空白组 ($P<0.01$)，PCP-W干预使小鼠MDA水平得到显著改善 ($P<0.01$)，并呈剂量依赖性；PCP-W能极显著提高糖尿病小鼠血清CAT、SOD和GSH-Px活力 ($P<0.01$)，其中高剂量组CAT活力几乎恢复至健康（空白组）水平，SOD活力甚至高于空白组；肝脏中，除低剂量组外，PCP-W干预后，小鼠CAT活力均得到极显著提高 ($P<0.01$)，而低、中、高剂量均使SOD、GSH-Px活力显著增加 ($P<0.05$ 、 $P<0.01$)；给予低、中、高剂量PCP-W后，血清T-AOC较模型组分别提高了40.15%、49.36%和81.59%，肝脏T-AOC较模型组分别提高了31.25%、43.75%和52.08%。

表2 PCP-W对糖尿病小鼠抗氧化指标的影响 (n=10)

Table 2 Effect of PCP-W on antioxidant indexes of diabetic mice (n = 10)

指标	Con组	Mod组	Met组	LD组	MD组	HD组
MDA浓度/(nmol/mL)	2.21±0.30**	6.25±0.34	3.60±0.30**	4.01±0.30**	3.87±0.30**	3.52±0.30**
CAT活力/(U/mL)	143.96±6.56**	73.59±8.53	126.04±8.72**	114.75±5.57**	134.97±5.42**	139.59±6.90**
血清 SOD活力/(U/mL)	203.22±4.01**	144.81±3.48	190.92±2.92**	242.29±1.48**	258.65±4.94**	250.76±2.70**
GSH-Px活力/(U/mL)	671.01±17.81**	452.17±14.26	636.23±36.46**	605.59±19.33**	614.49±9.43**	641.30±8.96**
T-AOC/(U/mL)	6.00±0.16**	3.91±0.27	5.50±0.20**	5.48±0.23**	5.84±0.16**	7.10±0.21**
MDA含量/(nmol/mg)	0.49±0.04**	1.51±0.02	0.80±0.04**	0.84±0.11**	0.76±0.05**	0.67±0.03**
CAT活力/(U/mg)	278.09±6.62**	172.63±6.98	260.07±7.75**	203.61±7.61	220.39±11.86**	229.51±7.47**
肝脏 SOD活力/(U/mg)	110.82±1.80**	72.98±1.63	104.43±3.34**	99.15±1.96**	103.07±4.12**	107.65±3.15**
GSH-Px活力/(U/mg)	991.95±20.08**	625.52±10.44	810.19±24.55**	770.6±40.83*	827.89±42.19**	821.96±27.87**
T-AOC/(U/mg)	0.81±0.02**	0.48±0.02	0.79±0.06**	0.63±0.02*	0.69±0.03**	0.73±0.02**

氧化应激是糖尿病发生的主要原因之一，过量的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 会损伤DNA、蛋白质、脂质和其他生物分子，导致糖尿病的发生^[34]。同时，在长期高血糖环境中，代谢紊乱影响许多抗氧化酶的活性和表达，从而导致自由基在组织细胞中积聚，并对线粒体和内质网等细胞器造成损害，细胞的生理功能受到干扰^[35]。因此，抑制或逆转自由基对组织和细胞的损伤可以调节和改善氧化应激状态，对糖尿病的防治起到积极作用。PCP-W能提高抗氧化酶活性，降低血清和肝脏中的ROS水平，有利于减轻胰岛β细胞、肝细胞、脂肪细胞和肌细胞等的ROS损伤，加速糖代谢和增强胰岛素敏感。

2.2.7 PCP-W对糖尿病小鼠肝脏HK和PK活力的影响

如图14、15所示，与模型组相比，PCP-W能极显著提高糖尿病小鼠肝脏HK和PK活力 ($P<0.01$)，并呈剂量依赖性。胰岛素抵抗通常导致葡萄糖利用率降低和肝脏糖酵解酶表达下调，如HK和PK。HK是糖酵解过程中的第一个关键酶，也是葡萄糖糖原形成过程中的第一个限速酶。PK是糖酵解过程中的另一个关键酶，可以催化磷酸烯醇丙酮酸转化为丙酮酸^[36]。提高糖酵解关键酶的活性有助于葡萄糖的利用。Cao Changliang等^[37]研究结果表明，苍白马尾藻 (*Sargassum pallidum*) 多糖能提高HK和PK活力，通过促进葡萄糖的利用降低血糖。本研究结果显示，PCP-W能显著增强HK和PK活力，说明PCP-W在葡萄糖代谢中具有积极作用。

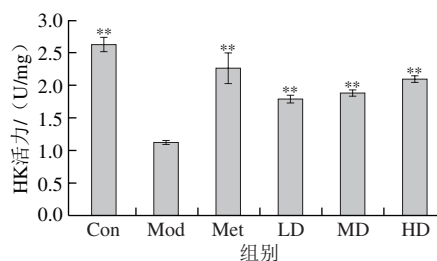


图14 PCP-W对糖尿病小鼠HK活力的影响 (n=10)

Fig. 14 Effect of PCP-W on HK activity in diabetic mice (n = 10)

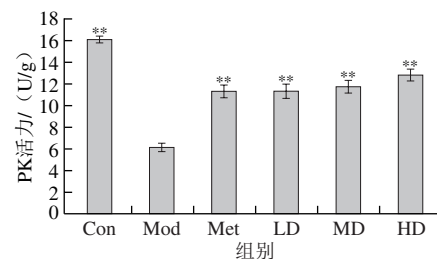


图15 PCP-W对糖尿病小鼠PK活力的影响 (n=10)

Fig. 15 Effect of PCP-W on PK activity in diabetic mice (n = 10)

3 结论

本研究分离纯化得到一种新型榆黄蘑菌丝体多糖PCP-W, 分子质量为5 238 Da, 主要由葡萄糖残基组成。PCP-W能降低糖尿病小鼠的血糖、血脂水平, 提高FINS水平和抗氧化能力, 增强葡萄糖代谢途径中关键性酶HK和PK活力, 具有开发成为降血糖药物的潜力。糖尿病严重危害人类健康, 现有药物副作用较多。药食同源食用菌多糖具有来源广、活性强和毒性低等优点, 越来越受到关注。从食用菌菌丝体中提取具有降血糖活性的多糖, 克服了子实体生产占地大、生产周期长、质量不稳定等缺点, 具有广阔的应用前景, 为降血糖药物的研究开发提供了新思路。

参考文献:

- MARCIANO L, CAMERINI A L, SCHULZ P J. The role of health literacy in diabetes knowledge, self-care, and glycemic control: a meta-analysis[J]. *Journal of General Internal Medicine*, 2019, 34(6): 1007-1017. DOI:10.1007/s11606-019-04832-y.
- 郭立新. 2021年糖尿病领域年度重大进展回顾[J]. *中华糖尿病杂志*, 2022, 14(1):1-8.
- 中国老年2型糖尿病防治临床指南编写组, 中国老年医学学会老年内分泌代谢分会, 中国老年保健医学研究会老年内分泌与代谢分会, 等. 中国老年2型糖尿病防治临床指南(2022年版)[J]. *中华内科杂志*, 2022, 61(1): 12-50. DOI:10.3760/cma.j.cn112138-20211027-00751.
- MINATO K I, LAAN L C, OHARA A, et al. *Pleurotus citrinopileatus* polysaccharide induces activation of human dendritic cells through multiple pathways[J]. *International Immunopharmacology*, 2016, 40: 156-163. DOI:10.1016/j.intimp.2016.08.034.
- MINATO K I, LAAN L C, VAN DIE I, et al. *Pleurotus citrinopileatus* polysaccharide stimulates anti-inflammatory properties during monocyte-to-macrophage differentiation[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 122: 705-712. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2018.10.157.
- YANG Ying, WU Hao. Immunomodulatory function and anti-tumor mechanism of natural polysaccharides: a review[J]. *Frontiers in Immunology*, 2023, 14: 1147641. DOI:10.3389/fimmu.2023.1147641.
- 石莹, 王再明, 潘玲玲, 等. 榆黄蘑多糖的提取及其抗氧化活性研究[J]. *林业科技*, 2015, 40(3): 34-36.
- HU Shuhui, WANG J C, LIEN J L, et al. Antihyperglycemic effect of polysaccharide from fermented broth of *Pleurotus citrinopileatus*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 70(1): 107-113. DOI:10.1007/s00253-005-0043-5.
- 郝亚利. 榆黄菇菌多糖的提取、结构表征及降血糖活性研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2020: 30-46. DOI:10.27359/d.cnki.gtqgu.2020.000421.
- 张宝翠, 朱玉昌, 王应玲, 等. 榆黄蘑菌丝体多糖提取工艺研究[J]. *湖北民族大学学报(自然科学版)*, 2020, 38(2): 138-141; 146. DOI:10.13501/j.cnki.42-1908/n.2020.06.005.
- 张俊霞. 连钱草多糖分离纯化、结构分析及生物活性初探[D]. 恩施: 湖北民族学院, 2017: 31.
- 张小梅, 刘素莲, 张锐锐, 等. 黄花倒水莲多糖的纯化、表征与体外抗氧化活性研究[J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(14): 51-56. DOI:10.3969/j.issn.1005-6521.2019.14.009.
- YUAN Yuan, ZHOU Jinhui, ZHENG Yanfen, et al. Beneficial effects of polysaccharide-rich extracts from *Apocynum venetum* leaves on hypoglycemic and gut microbiota in type 2 diabetic mice[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 127: 110182. DOI:10.1016/j.biopha.2020.110182.
- XU Tanye, LI Guodao, WANG Xiaobo, et al. *Inonotus obliquus* polysaccharide ameliorates serum profiling in STZ-induced diabetic mice model[J]. *BiomedcentralChemistry*, 2021, 15(1): 64. DOI:10.1186/s13065-021-00789-4.
- MBAGWU I S, AKAH P A, AJAGHAKU D L. *Newbouldia laevis* improved glucose and fat homeostasis in a TYPE-2 diabetes mice model[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2020, 251: 112555. DOI:10.1016/j.jep.2020.112555.
- LATTIBEAUDIERE K G, ALEXANDER-LINDO R L. Oleic acid and succinic acid synergistically mitigate symptoms of type 2 diabetes in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *International Journal of Endocrinology*, 2022, 2022: 8744964. DOI:10.1155/2022/8744964.
- FAN Yijun, HE Qinyi, LUO Aoshuang, et al. Characterization and antihyperglycemic activity of a polysaccharide from *Dioscorea opposita* Thunb roots[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(3): 6391-401. DOI:10.3390/ijms16036391.
- WU Jianjun, CHEN Miaomiao, SHI Songsan, et al. Hypoglycemic effect and mechanism of a pectic polysaccharide with hexenuronic acid from the fruits of *Ficus pumila* L. in C57BL/KsJ *db/db* mice[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 178: 209-220. DOI:10.1016/j.carbpol.2017.09.050.
- 张丽萍, 李森, 黄丽萍. 金顶侧耳酸提水溶性多糖的研究: PC-3的分离、纯化与结构确定[J]. *真菌学报*, 1993(2): 158-162. DOI:10.13346/j.mycosystema.1993.02.013.
- 张丽萍, 苗春艳, 许丽艳, 等. 金顶侧耳多糖PC-4的结构确定与抗肿瘤活性的研究[J]. *真菌学报*, 1995(1): 69-74. DOI:10.13346/j.mycosystema.1995.01.012.
- LIU Jicheng, SUN Yongxu, YU Haitao, et al. Purification and identification of one glucan from golden oyster mushroom (*Pleurotus citrinopileatus* (Fr.) Singer)[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 87(1): 348-352. DOI:10.1016/j.carbpol.2011.07.059.
- 周赛静. 榆黄蘑子实体多糖的分离纯化、结构鉴定和生物活性研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2013: 49.
- WANG Qing, NIU Lulu, LIU Huiping, et al. Structural characterization of a novel polysaccharide from *Pleurotus citrinopileatus* and its antitumor activity on H22 tumor-bearing mice[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 168: 251-260. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2020.12.053.
- ZHU Rui, ZHANG Xian, LIU Wei, et al. Preparation and immunomodulating activities of a library of low-molecular-weight α -glucans[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 111: 744-52. DOI:10.1016/j.carbpol.2014.04.106.
- FU Chengyang, REN Li, LIU Wenjuan, et al. Structural characteristics of a hypoglycemic polysaccharide from *Fructus corni*[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 506: 108358. DOI:10.1016/j.carres.2021.108358.
- LI Lu, LI Ruicheng, SONG Yehao, et al. Effects of a *Ganoderma atrum* polysaccharide against pancreatic damage in streptozotocin-induced diabetic mice[J]. *Food & Function*, 2019, 10(11): 7227-7238. DOI:10.1039/c9fo01990a.
- GAO Huashan, DING Lingling, LIU Rui, et al. Characterization of *Anoectochilus roxburghii* polysaccharide and its therapeutic effect on type 2 diabetic mice[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 179: 259-269. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2021.02.217.

- [28] YANG Yu, CHANG Yifan, WU Yi, et al. A homogeneous polysaccharide from *Lycium barbarum*: structural characterizations, anti-obesity effects and impacts on gut microbiota[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 183: 2074-2087. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2021.05.209.
- [29] O'DOHERTY A F, SATHYAPALAN T, RIGBYA S, et al. The repeatability of the abbreviated (4-h) oral fat tolerance test and influence of prior acute aerobic exercise[J]. European Journal of Nutrition, 2018, 57(1): 309-318. DOI:10.1007/s00394-016-1320-z.
- [30] OCHIAI M. Evaluating the appropriate oral lipid tolerance test model for investigating plasma triglyceride elevation in mice[J]. PLoS ONE, 2020, 15(10): e0235875. DOI:10.1371/journal.pone.0235875.
- [31] WANG Dongying, ZHAO Xiangmei, LIU Yulan. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of a polysaccharide from flower buds of *Lonicera japonica* in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. International Journal Biological Macromolecules, 2017, 102: 396-404. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2017.04.056.
- [32] DENG Shifang, YANG Lei, MA Ke, et al. *Astragalus* polysaccharide improve the proliferation and insulin secretion of mouse pancreatic β cells induced by high glucose and palmitic acid partially through promoting miR-136-5p and miR-149-5p expression[J]. Bioengineered, 2021, 12(2): 9872-9884. DOI:10.1080/21655979.2021.1996314.
- [33] ZHANG Qianping, OLATUNJI O J, CHEN Hongxia, et al. Evaluation of the anti-diabetic activity of polysaccharide from *Cordyceps cicadae* in experimental diabetic rats[J]. Chemistry & Biodiversity, 2018, 15(8): e1800219. DOI:10.1002/cbdv.201800219.
- [34] WANG Zichao, JIA Shutong, CUI Jingwen, et al. Antioxidant activity of a polysaccharide produced by *Chaetomium globosum* CGMCC 6882[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 141: 955-960. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2019.09.069
- [35] CAO Xiangyu, XIA Ying, LIU Dan, et al. Inhibitory effects of *Lentinus edodes* mycelia polysaccharide on α -glucosidase, glycation activity and high glucose-induced cell damage[J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 246: 116659. DOI:10.1016/j.carbpol.2020.116659.
- [36] JIANG Ning, ZHANG Shuangjian, ZHU Jing, et al. Hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant effects of peptides from red deer antlers in streptozotocin-induced diabetic mice[J]. Tohoku Journal of Experimental Medicine, 2015, 236(1): 71-79. DOI:10.1620/tjem.236.71.
- [37] CAO Changliang, ZHANG Bin, LI Chao, et al. Structure and *in vitro* hypoglycemic activity of a homogenous polysaccharide purified from *Sargassum pallidum*[J]. Food & Function, 2019, 10(5): 2828-2838. DOI:10.1039/c8fo02525h.