

不同炮制温度的人参酸性多糖对糖尿病小鼠抗氧化活性的影响

王明珠¹, 马林¹, 刘振¹, 焦丽丽¹, 刘淑莹^{1,2*}

1. 吉林省人参科学研究院, 长春中医药大学, 吉林 长春 130117

2. 中国科学院长春应用化学研究所, 吉林 长春 130022

摘要: **目的** 探讨不同炮制温度对人参酸性多糖抗氧化活性的影响。**方法** ip 四氧嘧啶 200 mg/kg 建立糖尿病小鼠模型, 按血糖值随机分为 5 组, 即模型组、阳性组、生晒参酸性多糖组、100 °C 红参酸性多糖组、120 °C 红参酸性多糖组, 每组 12 只, 同时取健康小鼠做对照组, 分别 ig 100 mg/kg 的人参酸性多糖, 每天定时给药 1 次, 给药体积为 10 mL/kg 体质量, 阳性组 ig 100 mg/kg 格列美脲, 模型组和对组 ig 等体积的 0.9% 生理盐水。28 d 后分别测定小鼠血清和肝组织中超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、维生素 C (VC) 和维生素 E (VE) 的量。**结果** 3 种人参酸性多糖均可提高 SOD、GSH-Px 活性, 降低 MDA 水平, 且作用效果 120 °C 红参酸性多糖 > 100 °C 红参酸性多糖 > 生晒参酸性多糖, 并且能提高肝组织和血清中 VC 和 VE 的量, 且 120 °C 红参酸性多糖效果最明显。**结论** 不同炮制温度的人参酸性多糖均有抗氧化作用, 在一定范围内, 抗氧化性随炮制温度的升高而增强。

关键词: 炮制温度; 人参; 酸性多糖; 糖尿病; 抗氧化

中图分类号: R282 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2015)01-0044-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2015.01.008

Effect of different processing temperatures on anti-oxidant activity of ginseng acid polysaccharide on diabetic mice

WANG Ming-zhu¹, MA Lin¹, LIU Zhen¹, JIAO Li-li¹, LIU Shu-ying^{1,2}

1. Jilin Ginseng Academy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China

2. Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China

Abstract: Objective To investigate the changes in antioxidant activities of water-soluble ginseng acid polysaccharides from *Panax ginseng* induced by steaming at different temperatures on alloxan-induced diabetic mice. **Methods** Ginseng acid polysaccharides were obtained from white ginseng, red ginseng (steamed ginseng at 100 °C) and steamed ginseng (steamed ginseng at 100 °C) by water extraction and ion-exchange chromatography. Mice were injected intraperitoneally with a single dose of 200 mg/kg body weight, and the mice with blood glucose levels higher than 16.8 mmol/L were used as diabetic mice and were selected for the succeeding experiments. After 28 d administration with ginseng acid polysaccharides, the activities of SOD, GSH-Px, and the content of MDA were determined. **Results** All of the three acid polysaccharides could significantly increase higher activities of SOD, GSH-Px, VC and VE in serum and liver and significantly lower content of MDA as compared with diabetic model group. **Conclusion** After treatment with ginseng acid polysaccharides for 4 weeks, the antioxidant activities in alloxan-induced diabetic mice were improved, and the activities of ginseng acid polysaccharides increased with steam treatment.

Key words: processing temperature; *Panax ginseng* C. A. Meyer; acid polysaccharides; diabetes; antioxidant

糖尿病是危害人类生命健康仅次于心血管疾病和肿瘤的三号杀手, 根据世界卫生组织报告全世界有超过 1.7 亿人患有 2 型糖尿病, 并预测 2030 年世界糖尿病患者将达 3.36 亿^[1]。因此, 寻找一种预防、

有效治疗糖尿病的方法至关重要。研究表明, 糖尿病及其并发症的发生与体内抗氧化机制的失衡有密切关系^[2]。多糖通过提高机体抗氧化酶, 防止脂质过氧化用, 抑制活性氧物质 (ROS) 的产生, 减少

收稿日期: 2014-10-14

基金项目: 吉林省科技厅课题 (20130206059YY)

作者简介: 王明珠 (1990—), 女, 硕士, 研究方向为中药有效成分与应用开发研究。Tel: 13174486461 E-mail: wangmingzhu77@163.com

*通信作者 刘淑莹, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事生物质谱研究。E-mail: sylu19@yahoo.com.cn

氧化损伤,或直接与自由基作用,清除自由基,从而恢复胰岛 β 细胞,降低高血糖^[3]。因此研究多糖的抗氧化作用防治糖尿病及其并发症的发生具有临床意义。

人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer 为五加科植物,人参蒸制后干燥者称为红参。在炮制过程中人参的化学成分发生变化,甚至产生新的化学成分,从而导致药理活性也发生变化,增加一些新的活性,为临床疗效提供有效依据^[4]。有文献报道人参多糖具有降血糖作用,为进一步研究人参多糖的降血糖活性并探讨降血糖活性的机制是否与抗氧化作用有关。本实验采用水提醇沉法提取人参粗多糖,采用 DEAE-纤维素对人参粗多糖进一步分离,得到红参酸性多糖和生晒参酸性多糖。研究以四氧嘧啶诱导的糖尿病小鼠为模型,选择若干抗氧化指标,观察 3 种人参酸性多糖对糖尿病小鼠血清和肝脏抗氧化效果,探讨不同炮制温度的人参酸性多糖对糖尿病小鼠抗氧化活性的影响,从而为临床试验提供有效依据。

1 仪器与材料

YXQ-LS-S II 立式压力蒸汽灭菌器(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);DHG-9070A 型电热恒温鼓风干燥器(上海一恒科学仪器有限公司);电热恒温水浴锅(金坛市江南仪器厂);TDZ5WS 多管架自动平衡离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司);DEAE-纤维素柱(青岛碧水寒天生物有限公司);透析袋(截留相对分子质量为 3 500)(上海源叶生物科技有限公司);酶标仪 Multiskan MK3(美国 Thermo 公司);血糖仪(美国强生 ONETouch);FDU-1100 型冷冻干燥机(东京理化器械独资工厂);匀浆机(金坛市华立实验仪器厂)。

四氧嘧啶(批号 705A021)购于 Sigma 公司;格列美脲(批号 A110901)购于山西云鹏制药有限公司;超氧化物歧化酶(SOD)测试盒、丙二醛(MDA)测试盒、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)测试盒、维生素 C(VC)和维生素 E(VE),均购于南京建成生物工程研究所;生理盐水购于四平巨能药业有限公司;实验所用的人参根采自抚松县,5 年生,由长春中医药大学王淑敏教授鉴定为五加科人参属人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer 干燥根。

雄性 ICR 小鼠,体质量为 (20 ± 2) g,由吉林大学基础医学院动物实验中心提供,动物合格证号:SCXK-(吉)2013.0001。动物颗粒饲料购于吉林大

学基础医学院动物实验中心。

2 方法

2.1 不同炮制温度人参酸性多糖的制备

2.1.1 人参根的炮制 将新鲜人参根清洗干净、晾干,置于高压蒸汽灭菌锅中,在 60 min 内程序升温至 100 °C 或 120 °C,蒸制 3 h,取出人参根放入烘干箱内 50 °C 的条件下干燥,约干燥 3 h^[5],得到 100 °C 红参或 120 °C 红参。

2.1.2 人参粗多糖的提取 将生晒参、100 °C 红参和 120 °C 红参粉碎后,分别称取 250 g,用 2.5 L 蒸馏水浸泡过夜,煮沸 3 h,4 层尼龙布过滤,重复 3 次,合并 3 次提取滤液,80 °C 水浴浓缩至 200 mL,3 500 r/min 离心 10 min,弃去沉淀。向上清液加入 4 倍量 80%乙醇,沉淀过夜,3 500 r/min 离心 10 min,收集沉淀。依次用无水乙醇、乙醚洗涤,然后真空干燥过夜,即得人参粗多糖。

2.1.3 人参酸性多糖的制备 上述得到的人参粗多糖 20 g 溶于 100 mL 蒸馏水,离心,上 DEAE-纤维素制备柱。先用 3 500 mL 蒸馏水洗脱,得到人参中性多糖;再用 0.5 mol/L 的 NaCl 洗脱,苯酚硫酸跟踪监测洗脱液,收集相应级分,透析除盐,浓缩、冷冻干燥,得到人参酸性多糖,分别为生晒参酸性多糖、100 °C 红参酸性多糖和 120 °C 红参酸性多糖。

2.2 糖尿病小鼠模型的建立^[6-8]

采用健康雄性 ICR 小鼠,体质量为 (20 ± 2) g,禁食 12 h,按 200 mg/kg 剂量给小鼠 ip 四氧嘧啶,72 h 后小鼠断尾采血,测定空腹血糖值,血糖值 ≥ 13 mmol/L 的小鼠即为糖尿病小鼠。

2.3 确定最佳给药剂量

将糖尿病模型小鼠随机分为 4 组,分别为模型组、生晒参酸性多糖组、100 °C 红参酸性多糖组、120 °C 红参酸性多糖组,每组 12 只,置于塑料鼠笼中,每笼 4 只,每组分别 ig 50、100、200 mg/kg 的人参酸性多糖,给药体积为 10 mL/kg 体质量,每天定时给药 1 次,连续 10 d,模型组 ig 等体积 0.9% 生理盐水。末次给药后小鼠禁食 12 h,眼眶采血测血糖值,比较 3 种人参酸性多糖各组给药剂量的降糖率,确定最佳给药剂量。

2.4 实验分组与处理

将糖尿病模型小鼠按血糖值随机分为模型组、阳性组、生晒参酸性多糖组、100 °C 红参酸性多糖组、120 °C 红参酸性多糖组,另取 12 只健康小鼠为对照组。以最佳给药剂量每天 ig 1 次,连续 28 d,

给药体积为 10 mL/kg 体质量, 阳性组 ig 100 mg/kg 格列美脲, 对照组和模型组 ig 等体积 0.9% 生理盐水。实验期间每天定时给药, 每天更换 1 次垫料, 小鼠自由饮水和摄食。

2.5 生化指标检测

小鼠禁食 12 h, 眼眶取血, 血凝后以 3 500 r/min 离心 15 min, 分离血清; 取血后迅速解剖, 取出肝脏称重, 按 10% 加入预冷生理盐水, 4 °C 匀浆, 匀浆液在 3 000 r/min 条件下离心 12 min, 获得上清液。严格按照试剂盒说明书分别测定小鼠血清和肝组织中 SOD 活性、MDA 水平、GSH-Px 活性、VC 和 VE 的量。

2.6 统计学处理

采用统计学软件 SPSS 13.0 对实验数据进行单因素方差分析, 数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。在实验过程中个别组有 1~2 小鼠只死亡, 因此, 在处理数据时选择 10 只小鼠的实验数据进行分析。

3 结果与分析

3.1 确定最佳给药剂量

由表 1 可知, 当给药剂量为 100 mg/kg 时 3 种人参酸性多糖的降糖效果最好, 且作用效果: 120 °C 红参酸性多糖 > 100 °C 红参酸性多糖 > 生晒参酸性多糖, 以 100 mg/kg 为最佳给药剂量。

3.2 人参酸性多糖对糖尿病小鼠血清抗氧化酶活力的影响

表 2 人参酸性多糖对糖尿病小鼠血清 SOD、MDA、GSH-PX 的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of ginseng acid polysaccharides on activities of serum SOD, MDA, GSH-PX in diabetic mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	SOD/ (U·mL ⁻¹)	MDA/ (nmol·mL ⁻¹)	GSH-PX/ (U·mL ⁻¹)
对照	109.19 ± 17.49	5.02 ± 1.17	888.42 ± 84.21
模型	92.10 ± 3.62**	8.47 ± 2.43**	700.35 ± 120.7**
格列美脲	105.91 ± 9.92 ^{##}	6.24 ± 1.85 ^{##}	823.16 ± 86.31 ^{##}
生晒参酸性多糖	100.80 ± 6.17* [#]	6.82 ± 1.89* ^{##}	775.44 ± 62.45* ^{##}
100 °C 红参酸性多糖	105.97 ± 10.6 ^{##}	6.21 ± 1.81 ^{##}	800.70 ± 42.81* ^{##}
120 °C 红参酸性多糖	115.42 ± 10.06 ^{##}	5.81 ± 1.22 ^{##}	835.09 ± 171.23 ^{##}

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group

3.3 人参酸性多糖对糖尿病小鼠肝脏抗氧化酶活力的影响

由表 3 可知, 与对照组相比, 模型组小鼠肝脏 SOD、GSH-PX 活性降低 ($P < 0.01$), MDA 水平升高 ($P < 0.01$)。3 种人参酸性多糖连续治疗 28 d 后, 与模型组相比, 3 种人参酸性多糖组小鼠肝脏的 SOD 活性均显著增强 ($P < 0.05$ 、0.01)、GSH-PX

表 1 确定最佳给药剂量($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Determination of optimal dose ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	血糖值/ (mmol·L ⁻¹)	
		给药前	给药后
模型	—	21.3 ± 1.4	20.7 ± 3.7
生晒参酸性多糖	50	18.6 ± 4.4	14.4 ± 3.6**
	100	19.2 ± 2.1	13.1 ± 2.2**
	200	19.4 ± 1.1	13.7 ± 1.8**
100 °C 红参酸性多糖	50	20.2 ± 1.3	14.8 ± 0.8**
	100	19.7 ± 2.3	12.4 ± 2.8**
	200	19.2 ± 4.1	12.8 ± 1.4**
120 °C 红参酸性多糖	50	20.1 ± 3.3	14.2 ± 3.4**
	100	20.6 ± 2.1	11.3 ± 4.3**
	200	19.8 ± 4.1	13.5 ± 3.2**

与模型组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs model group

由表 2 可知, 与对照组相比, 模型组小鼠血清的 SOD、GSH-PX 活性降低 ($P < 0.01$), MDA 水平升高 ($P < 0.01$), 表明四氧嘧啶造模后小鼠抗氧化系统受到损伤。将 3 种人参酸性多糖分别给予糖尿病小鼠后, 与模型组相比, 3 种人参酸性多糖组小鼠血清的 SOD、GSH-PX 活性均显著增强 ($P < 0.05$ 、0.01), MDA 水平降低 ($P < 0.05$ 、0.01), 且作用效果: 120 °C 红参酸性多糖 > 100 °C 红参酸性多糖 > 生晒参酸性多糖。

活性均显著增强 ($P < 0.01$), MDA 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01), 且作用效果: 120 °C 红参酸性多糖 > 100 °C 红参酸性多糖 > 生晒参酸性多糖。

3.4 人参酸性多糖对糖尿病小鼠血清和肝脏 VC、VE 水平的影响

由表 4 可知, 在糖尿病小鼠血清中, 与对照组相比, 模型组小鼠血清 VC 含量降低 ($P < 0.05$),

VE 含量降低 ($P<0.01$), 表明糖尿病小鼠血清中的非酶类抗氧化剂的含量降低。3 种人参酸性多糖治疗 30 d 后, 与模型组相比, VC、VE 含量均不同程度提高, 且 120℃ 效果最显著 ($P<0.05$ 、0.01)。

在糖尿病小鼠肝组织中, 与对照组相比, 模型组小鼠肝组织 VC、VE 含量均降低 ($P<0.01$), 表

明糖尿病小鼠肝组织中的非酶类抗氧化剂的含量降低。与模型组相比, VC、VE 含量均不同程度提高, 且 120℃ 效果最显著 ($P<0.05$ 、0.01)。

结果表明, 3 种人参酸性多糖均能有效提高糖尿病小鼠血清和肝脏中非酶类抗氧化剂的含量, 其中 120℃ 红参酸性多糖抗氧化效果最好。

表 3 人参酸性多糖对糖尿病小鼠肝脏 SOD、MDA、GSH-PX 的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Effect of ginseng acid polysaccharides on activities of hepatic SOD, MDA, GSH-PX in diabetic mice($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	SOD/(U·mg ⁻¹)	MDA/(nmol·mg ⁻¹)	GSH-Px/(U·mg ⁻¹)
对照	276.62±27.76	3.7±0.92	1 049.03±32.71
模型	239.98±16.35**	4.59±1.06**	673.8±95.49**
格列美脲	258.23±4.57***	3.85±0.68 [#]	800.38±72.92***
生晒参酸性多糖	253.6±14.17***	4.0±0.54 [#]	783.89±68.69***
100℃红参酸性多糖	264.38±21.06***	3.91±0.53 [#]	986.67±196.01 [#]
120℃红参酸性多糖	265.48±12.88 [#]	3.7±0.79 [#]	920.92±82.63***

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ 与模型组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$

** $P<0.01$ * $P<0.05$ vs control group ^{##} $P<0.01$ [#] $P<0.05$ vs model group

表 4 人参酸性多糖对糖尿病小鼠血清和肝脏 VC、VE 的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 4 Effect of ginseng acid polysaccharides on activities of serum and hepatic VC, VE in diabetic mice($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	血清		肝组织	
	VC/(μg·mL ⁻¹)	VE/(μg·mL ⁻¹)	VC/(μg·mg ⁻¹)	VE/(μg·g ⁻¹)
对照	14.02±2.46	12.35±3.13	2.09±0.31	21.44±2.03
模型	12.02±0.88*	9.27±2.02**	1.15±0.08**	16.53±6.76**
格列美脲	13.85±0.6 [#]	10.03±1.06**	1.77±0.18***	19.65±1.3 [#]
生晒参酸性多糖	13.92±2.7 [#]	11.29±1.18 [#]	1.75±0.1***	19.06±1.24* [#]
100℃红参酸性多糖	13.71±0.59	11.23±1.19 [#]	1.75±0.44***	19.24±3.17* [#]
120℃红参酸性多糖	13.89±0.56 [#]	11.8±3.03 ^{##}	1.77±0.13***	20.82±0.88 ^{##}

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ 与模型组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$

** $P<0.01$ * $P<0.05$ vs control group ^{##} $P<0.01$ [#] $P<0.05$ vs model group

4 讨论

研究表明: 氧化应激与糖尿病关系密切^[9-10]。氧化应激使体内氧自由基产生过多, 而自由基过多可引发不饱和脂肪酸的链式反应, 产生代谢产物过氧化脂质 (MDA), 导致机体组织和功能损伤, 从而产生明显的氧化应激, 加重糖尿病代谢紊乱^[11]。SOD 能催化超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot-}$) 发生歧化反应, 是机体清除氧自由基的重要酶, 具有调节异常自由基代谢, 提高机体抗氧化能力的作用; MDA 的升高将会导致高血糖症状, 并极有可能引发糖尿病血管的病变, 这也正是糖尿病患者致死致残的主要原因之一^[12]; VC 是一种强抗氧化剂, 其本身被氧化, 而使氧化型谷胱甘肽还原为还原型谷胱甘肽, 发挥抗氧化的作用; VC 能够使双硫键 (-S-S) 还原

为-SH, 从而提高相关酶的活性, 发挥抗氧化的作用, 清除自由基, 阻止脂类过氧化及某些化学物质的毒害作用, 保护肝脏的解毒能力和细胞的正常代谢; VE 是机体的脂质过氧化阻断剂, 防止细胞内和细胞膜上饱和脂肪酸被氧化和破坏, 保护了细胞膜的完整性; VE 与自由基起反应后, 即转变为生育酚羟基自由基, 此化合物可被 VC、谷胱甘肽、以及辅酶 Q 重新还原为 VE, 重新发挥其氧化作用^[13]。实验结果表明, 3 种人参酸性多糖均能有效提高糖尿病小鼠血清和肝组织中 SOD、GSH-PX 活性, 降低 MDA 水平; 同时, 3 种人参酸性多糖均能在一定程度上提高小鼠体内 VC 和 VE 的量, 从而对机体免受内源性氧自由基的损伤方面起到保护作用, 改善糖尿病小鼠体内的氧化应激水平, 且 120

℃红参酸性多糖作用效果最佳。炮制人参是一个高温高压的过程,在此过程中,人参酸性多糖理化性质可能会发生变化,从而导致人参酸性多糖的抗氧化活性有所不同,但具体原因有待进一步研究。

参考文献

- [1] Kasabri V, Afifi F U, Hamdan I. *In vitro* and *in vivo* acute antihyperglycemic effects of five selected indigenous plants from Jordan used in traditional medicine [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 133(2): 888-896.
- [2] 刘月冉, 耿越. 植物多糖降血糖作用机制研究 [J]. *食品与药品*, 2012, 14(1): 64-67.
- [3] 冉靓, 杨小生, 王伯初, 等. 抗氧化多糖的研究进展 [J]. *时珍国医国药*, 2006, 17(4): 494-496.
- [4] 陈燕. 鲜人参、生晒参和红参的比较研究 [J]. *海峡药学*, 2006, 18(5): 137-139.
- [5] 翟宁, 贺燕, 李玉春, 等. 红参的炮制工艺与高效液相色谱法对比红参与生晒参的研究 [J]. *吉林医药*, 2007, 28(17): 1852-1853.
- [6] 林龙, 叶继丹, 高洁. 孔石莖多糖对糖尿病小鼠抗氧化能力的影响 [J]. *中国酿造*, 2013, 32(3): 91-93.
- [7] 左绍远, 罗华君, 朱振宇. 螺旋藻多糖对糖尿病小鼠抗氧化能力的影响 [J]. *药物生物技术*, 2001, 8(1): 36-38.
- [8] 张俐勤, 戚向阳, 陈维军, 等. 罗汉果皂苷提取物对糖尿病小鼠血糖、血脂及抗氧化作用的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2006, 22(2): 237-240.
- [9] Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications [J]. *Circ Res*, 2010, 107(9): 1058-1070.
- [10] 金昕, 陶枫, 陆灏, 等. 中药抗氧化在糖尿病中应用研究进展 [J]. *上海中医药大学学报*, 2012, 26(4): 110-114.
- [11] 徐先祥, 黄玉香, 夏伦祝, 等. 太子参多糖对糖尿病小鼠抗氧化能力与胰腺病理的影响 [J]. *食品工业科技*, 2012, 33(24): 392-393.
- [12] Zhao, L. Y, Lan, Q. J, Huang, Z. C, *et al*. Antidiabetic effect of a newly identified component of *Opuntia dillenii* polysaccharides [J]. *Phytomedicine*, 2011, 18: 661-668.
- [13] 朱长林, 张文彬, 孙鹏, 等. 维生素C与维生素E的联合免疫调节及抗氧化作用 [J]. *中国临床康复*, 2006, 10(36): 120-122.