

## 黄连须多糖降血糖活性及结构表征

田谷正男<sup>1</sup>, 周鑫超<sup>1</sup>, 颀若童<sup>1</sup>, 王 誉<sup>1</sup>, 毛美林<sup>1</sup>, 邓子言<sup>1</sup>, 蔡长君<sup>1</sup>, 涂 康<sup>1</sup>, 朱希强<sup>1</sup>, 姜 宁<sup>1,2</sup>, 刘晓鹏<sup>1,2\*</sup>

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:** 目的 探究黄连副产品黄连须多糖 (*Coptidis Radix* fibrous polysaccharides, CRFP) 的降血糖活性和物质基础。方法 研究 CRFP 对糖尿病模型小鼠的作用, 并对其进行分离纯化, 检测纯化产物的纯度和相对分子质量, 分析其结构和单糖组成。结果 给药 8 周后, CRFP 能显著降低糖尿病模型小鼠的血糖 ( $P < 0.01$ ), 加速小鼠的血糖和血脂代谢, 提高空腹胰岛素水平 ( $P < 0.01$ ), 改善血脂紊乱 ( $P < 0.05, 0.01$ ), 提高肝脏己糖激酶 (hexokinase, HK) 和丙酮酸激酶 (pyruvate kinase, PK) 活性 ( $P < 0.01$ ), 改善氧化应激 ( $P < 0.05, 0.01$ )。CRFP 经纯化后得到成分均一的多糖 CRFP-1 和 CRFP-2, 相对分子质量分别为  $24\ 307 \pm 311$  和  $18\ 405 \pm 168$ , CRFP-1 为  $\alpha$ -型多糖, 由 8 种单糖组成; CRFP-2 为  $\beta$ -型多糖, 由 10 种单糖组成。结论 CRFP 具有良好的降血糖活性, 为黄连这一传统中药的深度开发和提高利用价值奠定了基础。

**关键词:** 黄连须; 多糖; 糖尿病; 分离纯化; 结构解析

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)06-1825-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.06.014

## Hypoglycemic activity and structure characterization of *Coptis Rhizoma* fibrous polysaccharides

TIAN Gu-zheng-nan<sup>1</sup>, ZHOU Xin-chao<sup>1</sup>, XIE Ruo-tong<sup>1</sup>, WANG Yu<sup>1</sup>, MAO Mei-ling<sup>1</sup>, DENG Zi-yan<sup>1</sup>, CAI Chang-jun<sup>1</sup>, TU Kang<sup>1</sup>, ZHU Xi-qiang<sup>1</sup>, JIANG Ning<sup>1,2</sup>, LIU Xiao-Peng<sup>1,2</sup>

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: Objective** To explore the hypoglycemic activity and material basis of Huanglian (*Coptis Rhizoma*) fibrous polysaccharides (CRFP), a by-product of *Coptis chinensis*. **Methods** The effect of CRFP on diabetes model mice was studied and CRFP was purified. The purity and relative molecular weight of purified product were detected, and its structure and monosaccharide composition were analyzed. **Results** After eight weeks of administration, CRFP could significantly reduce blood glucose ( $P < 0.01$ ), accelerate blood glucose and lipid metabolism, increase fasting insulin level ( $P < 0.01$ ), improve blood lipid disorder ( $P < 0.05, 0.01$ ), increase liver hexokinase (HK) and pyruvate kinase (PK) activities ( $P < 0.01$ ), and improve oxidative stress ( $P < 0.05, 0.01$ ) in diabetes model mice. After purification, CRFP-1 and CRFP-2 with uniform components were obtained. The relative molecular weight of CRFP-1 and CRFP-2 respectively were ( $24\ 307 \pm 311$ ) and ( $18\ 405 \pm 168$ ), CRFP-1 was  $\alpha$ -type polysaccharide, composed of eight monosaccharides; CRFP-2 was  $\beta$ -type polysaccharide, composed of 10 monosaccharides. **Conclusion** CRFP has good hypoglycemic activity, which lays a foundation for the deep development and improvement of utilization value of *C. chinensis*.

**Key words:** *Coptidis Rhizoma* fibrous; polysaccharides; diabetes mellitus; separation and purification; structural analysis

糖尿病作为代谢紊乱的慢性疾病, 主要由体内胰岛素分泌障碍或胰岛素耐受引起, 糖尿病会引起体内脏器受损, 引发一系列并发症, 甚至导致死亡<sup>[1-2]</sup>。2021 年全世界 20~79 岁糖尿病患者约占 10.5%

收稿日期: 2022-11-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82160713); 湖北省技术创新专项 (2017AKB077, 2016AKB058); 湖北产业教授人才项目 (2019029, 2021067); 湖北民族大学大学生创新创业训练计划项目 (X202210517208)

作者简介: 田谷正男 (1994—), 男, 研究生, 研究方向为天然产物研究。E-mail: 976050052@qq.com

\*通信作者: 刘晓鹏 (1971—), 男, 教授, 博士, 硕士生导师, 研究方向为天然产物研究。Tel: 15671896031 E-mail: liuxp999@163.com

(5.37 亿), 预计 2045 年将达到 12.2% (7.83 亿)<sup>[3]</sup>, 我国是成人糖尿病患者最多的国家, 2021 年达 1.4 亿<sup>[4]</sup>, 其中 90% 以上为 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM)。目前, 已有多种降糖药物被用于临床治疗 T2DM, 如二甲双胍、磺脲类、格列奈类、 $\alpha$ -糖苷酶抑制剂、噻唑烷二酮类、二肽基肽酶 IV (dipeptidyl peptidase IV, DPP-4)、钠-葡萄糖共转运蛋白 2 (sodium-glucose cotransporter 2, SGLT2)、胰高糖素样肽-1 受体激动剂、胰岛素, 但这些降糖药物会引起胃肠道反应、低血糖、骨质疏松、心力衰竭、泌尿生殖系统感染等不良反应<sup>[5]</sup>。研究表明多种植物多糖具有较强的降血糖活性, 且来源广泛、安全性好, 是筛选新型降血糖药物的宝库<sup>[6-7]</sup>。

黄连为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎<sup>[8]</sup>, 多项研究表明, 黄连多糖具有降血糖、抗氧化、调血脂等活性<sup>[9-11]</sup>。但药用黄连生长周期为 3~4 年, 而收获时大量的黄连须被废弃, 课题组前期研究表明, 黄连须富含多糖, 且具有较强的体外抗氧化活性<sup>[12]</sup>。本研究以黄连须多糖 (*Coptidis Rhizoma fibrous polysaccharides*, CRFP) 为对象, 研究 CRFP 对糖尿病模型小鼠的作用, 明确其降血糖活性, 从中分离纯化出 2 种成分均一的多糖, 并解析其结构, 为提高黄连的利用率, 将黄连须变废为宝提供了实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

SPF 级雄性 ICR 小鼠, 体质量 18~22 g, 6 周龄, 购自辽宁长生生物技术股份有限公司, 实验动物许可证号 SCXK (辽) 2020-0001。动物于温度 (24±2) °C、12 h 光暗交替的环境中适应性饲养 1 周, 自由进食饮水。动物实验经湖北民族大学实验动物伦理审查委员会批准, 批准号为 (2021) 131。

### 1.2 药品与试剂

CRFP 为本实验室提取并制备<sup>[12]</sup>; 右旋糖酐分子量标准品 (批号 10237229) 购自中国食品药品检定研究院; 标准品鼠李糖 (批号 O12A10K95105, 质量分数>98%)、阿拉伯糖 (批号 K28J12B135956, 质量分数>98%)、甘露糖 (批号 TS08J12G137083, 质量分数>98%)、岩藻糖 (批号 X16N8Y48166, 质量分数>98%)、半乳糖 (批号 MFCD00151230, 质量分数>99%)、半乳糖醛酸 (批号 3962101, 质量分数>97%)、葡萄糖醛酸 (批号 R09J11H115178, 质量分数>98%)、核糖 (批号 B21897, 质量分数>

98%) 购自上海源叶生物科技有限公司; 标准品木糖 (批号 D17N9S74410, 质量分数>99%) 购自 TMstandard; 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, PMP, 批号 C11370802, 质量分数>99%) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 三氟乙酸 (批号 H2123035)、乙腈 (批号 0114220806)、盐酸二甲双胍 (批号 D16GS171362)、氯化钠 (批号 20190919)、无水乙醇 (批号 20211014)、硫酸 (批号 20210517)、蒽酮 (批号 20210220)、氯仿 (批号 20210514)、磷酸二氢钾 (批号 20180223) 购自国药集团化学试剂有限公司; 链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ, 批号 20210316) 购自北京索莱宝科技有限公司; 柠檬酸钠 (批号 20201006) 购自天津博迪化工股份有限公司; 甲醇 (批号 20180605) 购自武汉市中天化工有限责任公司; 盐酸 (批号 2022110902) 购自成都市科隆化学品有限公司; 葡萄糖检测试剂盒 (批号 20201029)、总胆固醇 (total cholesterol, TC) 检测试剂盒 (批号 20210708)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 检测试剂盒 (批号 20210703)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 检测试剂盒 (批号 20210703)、三酰甘油 (triacylglycerol, TG) 检测试剂盒 (批号 20210430)、游离脂肪酸 (free fatty acid, FFA) 检测试剂盒 (批号 20210728)、己糖激酶 (hexokinase, HK) 检测试剂盒 (批号 20210726)、丙酮酸激酶 (pyruvate kinase, PK) 检测试剂盒 (批号 20220822)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 检测试剂盒 (批号 20220827)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 检测试剂盒 (批号 20211105)、总抗氧化能力 (total antioxidant capacity, T-AOC) 检测试剂盒 (批号 20180508)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒 (批号 20180302)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 检测试剂盒 (批号 20190731)、胰岛素检测试剂盒 (批号 20210728) 购自南京建成生物工程研究所; 其余试剂均为分析纯。

### 1.3 仪器

P680A 型液相色谱 (戴安中国有限公司); RI-101 型示差折光检测器 (日本 Showa Denko K.K. 公司); Nicolet iS5 型傅里叶红外光谱仪、Multiskan FC 全波长酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); HH-8 型数显恒温水浴锅 (常州智博仪器制造有限公

司); 752型紫外可见分光光度计(上海菁华科技有限公司); SPX-250B-Z型生化培养箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂)。

## 2 方法

### 2.1 CRFP对糖尿病模型小鼠的影响

**2.1.1 动物分组、造模和给药** ICR小鼠随机分为对照组(10只)、模型组、二甲双胍(200 mg/kg)组和CRFP低、中、高剂量(100、200、400 mg/kg)组各13只。模型组和各给药组连续4 d ip STZ(50 mg/kg), 对照组 ip 等体积的柠檬酸缓冲液, 除对照组外其余各组给予高脂饲料喂养。检测小鼠空腹血糖, 选取空腹血糖 $\geq 11.1$  mmol/L<sup>[13]</sup>的10只小鼠进行后续实验。造模成功后, 各给药组 ig 相应药物, 对照组和模型组 ig 等体积的蒸馏水, 1次/d, 连续8周。

**2.1.2 生理生化指标检测** 治疗期间, 各组小鼠每周眼眶静脉丛取血, 检测空腹血糖。取血前小鼠禁食8 h, 自由饮水, 取血后3500 r/min离心15 min, 取血清, 按照试剂盒说明书操作, 检测血糖含量。

治疗结束后, 小鼠禁食8 h, 进行口服葡萄糖耐量试验(oral glucose tolerance test, OGTT)。各组小鼠 ig 葡萄糖(2 g/kg), 分别于0、0.5、1、1.5、2 h眼眶静脉丛取血, 测定血糖, 绘出血糖变化曲线, 计算曲线下面积(area under curve, AUC)<sup>[14]</sup>。

OGTT结束24 h后, 小鼠禁食8 h, 进行口服脂肪耐量试验(oral fat tolerance test, OFTT)。各组小鼠 ig 橄榄油(10 mL/kg)。分别于0、1、2、3、4 h眼眶静脉丛取血, 按照试剂盒说明书操作, 检测血清TG水平, 绘出血脂变化曲线, 计算AUC<sup>[15]</sup>。

最后, 摘眼球取血, 血液3500 r/min离心15 min取血清, 按照说明书操作, 检测血糖、空腹胰岛素(fasting insulin, FINS)、TC、TG、LDL-C、HDL-C、FFA水平。

取小鼠肝脏, 生理盐水清洗, 称定质量, 剪碎, 加入9倍体积的生理盐水, 制成10%匀浆, 2500 r/min离心10 min, 取上清, 按试剂盒说明书检测匀浆液中HK和PK活性; 按照说明书操作, 测定小鼠血清和肝脏中SOD、CAT、T-AOC、GSH-Px活性及MDA含量。

### 2.2 CRFP的结构表征

**2.2.1 CRFP的分离纯化** 将CRFP粉末溶于20 mmol/L的醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 4.5)中, 进行DEAE纤维素DE-52色谱分离, 醋酸-醋酸钠缓冲液洗脱3个柱体积, 分管收集, 硫酸-蒽酮法<sup>[16]</sup>检测每

管的多糖含量, 合并洗脱峰, 为CRFP-a; 然后用含1 mol/L NaCl的醋酸-醋酸钠缓冲液洗脱3个柱体积, 分管收集, 检测每管的多糖含量, 合并洗脱峰, 为CRFP-b。分别将CRFP-a和CRFP-b醇沉, 60℃烘干。分别将CRFP-a和CRFP-b配制成10 mg/mL的水溶液, 采用Sephacryl S-200凝胶过滤色谱纯化, 蒸馏水洗脱, 体积流量为1 mL/min, 分管收集洗脱液, 检测每管的多糖含量, 合并洗脱峰, 分别命名为CRFP-1和CRFP-2, 冷冻干燥。

**2.2.2 多糖纯度和相对分子质量的检测** 采用高效分子排阻色谱(high performance molecular exclusion chromatography, HPSEC)法<sup>[17]</sup>检测多糖纯度和相对分子质量。Shodex SUGAR KS-805色谱柱(300 mm $\times$ 8 mm); 检测器为示差折光检测器; 流动相为H<sub>2</sub>O; 体积流量1 mL/min; 柱温65℃; 进样量20  $\mu$ L。

将不同相对分子质量(分别为180、2700、5250、9750、13 050、36 800)的右旋糖酐标准品分别配制成2 mg/mL的水溶液, 上样, 以相对分子质量的对数为横坐标, 保留时间为纵坐标, 绘制标准曲线。分别将CRFP-1和CRFP-2水溶液按上述条件进行HPSEC, 根据色谱图分析样品纯度, 根据保留时间计算样品的相对分子质量。

**2.2.3 红外光谱扫描** 分别称取2 mg CRFP-1和CRFP-2, 加入一定量溴化钾充分研磨, 制成溴化钾压片进行傅里叶红外光谱扫描<sup>[18]</sup>, 扫描范围为500~4000 cm<sup>-1</sup>。

**2.2.4 CRFP单糖组成分析** CRFP-1和CRFP-2采用1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, PMP)柱前衍生法<sup>[19]</sup>测定其单糖组成。称取多糖样品10 mg于水解管中, 加入4 mol/L三氟乙酸1 mL, 于120℃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10 mg, 配制成1.0 mg/mL的混合溶液, 稀释成质量浓度分别为2.5、5.0、12.0、18.0、25.0  $\mu$ g/mL的溶液。取样品和标准品溶液0.5 mL, 加1 mL 0.5 mol/L PMP-甲醇溶液以及0.5 mL 0.3 mol/L NaOH溶液, 70℃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, 弃去下层, 萃取3次, 取水层过0.45  $\mu$ m滤膜进行HPLC分析。色谱条件: SHISEIDO C<sub>18</sub>色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m), 流动相为0.1 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH 6.8)-乙腈(82:

18); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25 °C; 进样量 10 μL, 波长 245 nm。以单糖标准品质量浓度为自变量, 峰面积为因变量, 计算标准曲线。根据样品各单糖的峰面积计算单糖含量, 计算物质的量比。

### 2.3 统计学分析

采用 SPSS 26 和 origin 9.0 软件进行数据分析, 以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间多重性比较采用 Tukey 法。

## 3 结果

### 3.1 CRFP 对糖尿病模型小鼠的影响

**3.1.1 CRFP 对糖尿病小鼠血糖、OGTT、OFTT 和 FINS 水平的影响** 如图 1-A 所示, 造模后, 模型组血糖水平呈上升趋势; 经 CRFP 治疗 2 周后血糖逐步下降。如图 1-B 所示, 治疗结束后 ig 葡萄糖, 各给药组血糖随时间的变化趋势一致, 均在 ig 葡萄糖

0.5 h 时达到最大值, 然后逐步下降, 2 h 后恢复。根据各组的血糖变化曲线, 计算各组的 AUC, 与对照组比较, 各给药组的 AUC 均与模型组有显著差异 ( $P < 0.01$ ), 说明 CRFP 能显著加快糖尿病模型小鼠的葡萄糖代谢速度, 从而降低血糖。

如图 1-C 所示, 治疗结束后, 各组小鼠的 TG 水平各异, 这是因为糖尿病小鼠的血脂代谢紊乱, 模型组的 TG 维持在较高水平, 各给药组 TG 水平有所降低, 但下降程度有所不同。ig 橄榄油后, 各组小鼠的 TG 变化趋势相同, 均在 2 h 时达最高值, 随后开始下降。计算各组 TG 的 AUC, 与模型组比较, CRFP 中、高剂量组的 AUC 均显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), CRFP 低剂量组虽然与模型组无显著差异, 但已表现出下降趋势。因此, CRFP 能加速糖

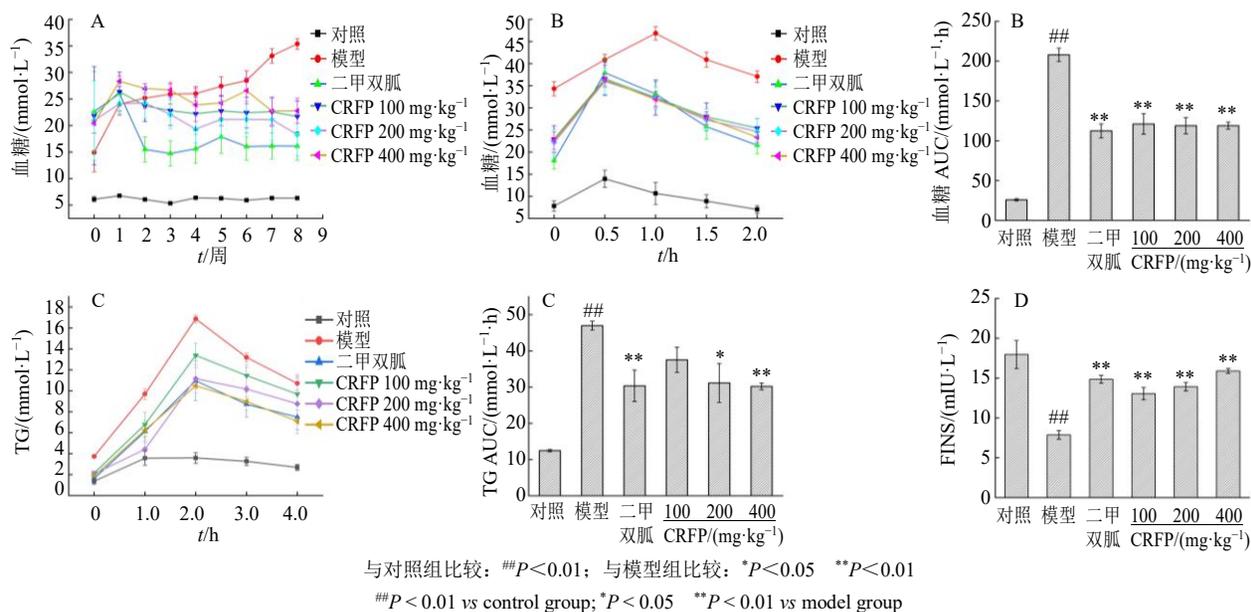


图 1 CRFP 对糖尿病小鼠空腹血糖 (A)、OGTT (B)、OFTT (C) 和 FINS 水平 (D) 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 1 Effect of CRFP on fasting blood glucose (A), OGTT (B), OFTT (C) and FINS (D) levels in diabetic mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

尿病小鼠的脂肪代谢, 具有潜在的改善糖尿病脂肪代谢紊乱功能。如图 1-D 所示, 与对照组比较, 模型组 FINS 水平显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 各给药组 FINS 水平均显著升高 ( $P < 0.01$ ), 且呈剂量相关性。

**3.1.2 CRFP 对糖尿病小鼠肝脏 HK 和 PK 活性的影响** 如表 1 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肝脏 HK 和 PK 活性均显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 各给药组肝脏 HK 活性均显著升高 ( $P < 0.01$ ), 二甲双胍组和 CRFP 中、高剂量组 PK 活性均显著升高 ( $P < 0.01$ ), 且呈剂量相关性。表明 CRFP 能有效提高肝脏 HK 和 PK 活性, 从而达到降低血

表 1 CRFP 对糖尿病小鼠肝脏 HK 和 PK 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Effect of CRFP on HK and PK activities in liver of diabetic mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	HK/(nmol·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> )	PK/(U·g <sup>-1</sup> )
对照	—	2.63 ± 0.12	16.06 ± 0.32
模型	—	1.12 ± 0.03##	6.11 ± 0.40##
二甲双胍	200	2.27 ± 0.23**	11.30 ± 0.56**
CRFP	100	1.63 ± 0.04**	8.43 ± 0.16
	200	1.80 ± 0.06**	9.68 ± 0.21**
	400	2.01 ± 0.05**	11.55 ± 0.70**

与对照组比较: ## $P < 0.01$ ; 与模型组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ , 下表同

## $P < 0.01$  vs control group; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs model group, same as below tables

糖的作用。

**3.1.3 CRFP 对糖尿病小鼠血脂的影响** 如表 2 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠 TC、LDL-C、TG、FFA 水平均显著升高 ( $P < 0.01$ ), HDL-C 水平显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 各给药组 LDL-C、TG、FFA 水平均显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), HDL-C 水平显著升高 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ); 二甲双胍组和 CRFP 中、高剂量组 TC 水平均显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。

**3.1.4 CRFP 对糖尿病小鼠体内抗氧化活性的影响** 如表 3、4 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠血清和

肝脏中 SOD、CAT、T-AOC 和 GSH-Px 活性均显著降低 ( $P < 0.01$ ), MDA 水平显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 各给药组血清和肝脏中 SOD、CAT、T-AOC 和 GSH-Px 活性均显著升高 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), MDA 水平显著降低 ( $P < 0.01$ )。

**3.2 CRFP 的结构表征**

**3.2.1 DE-52 离子交换色谱** 图 2 为 CRFP 经 DE-52 离子交换色谱不同洗脱液的洗脱图谱, CRFP 经 20 mmol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液 (pH 4.5) 和 1 mol/L NaCl 缓冲液洗脱后各自得到单一峰, 分别收集对应主峰

表 2 CRFP 对糖尿病小鼠血脂的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Effect of CRFP on blood lipid in diabetic mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	TC/(mmol·L <sup>-1</sup> )	HDL-C/(mmol·L <sup>-1</sup> )	LDL-C/(mmol·L <sup>-1</sup> )	TG/(mmol·L <sup>-1</sup> )	FFA/(mmol·L <sup>-1</sup> )
对照	—	2.82 ± 0.22	5.22 ± 0.09	0.48 ± 0.02	1.22 ± 0.05	1.48 ± 0.08
模型	—	5.04 ± 0.44 <sup>##</sup>	3.31 ± 0.16 <sup>##</sup>	0.84 ± 0.04 <sup>##</sup>	3.74 ± 0.06 <sup>##</sup>	3.41 ± 0.25 <sup>##</sup>
二甲双胍	200	3.51 ± 0.06 <sup>**</sup>	5.18 ± 0.36 <sup>**</sup>	0.52 ± 0.05 <sup>**</sup>	1.63 ± 0.08 <sup>**</sup>	1.71 ± 0.14 <sup>**</sup>
CRFP	100	4.10 ± 0.21	4.64 ± 0.29 <sup>*</sup>	0.65 ± 0.01 <sup>**</sup>	2.15 ± 0.20 <sup>**</sup>	2.25 ± 0.10 <sup>**</sup>
	200	3.99 ± 0.10 <sup>*</sup>	4.84 ± 0.44 <sup>**</sup>	0.60 ± 0.03 <sup>**</sup>	2.07 ± 0.23 <sup>**</sup>	1.57 ± 0.06 <sup>**</sup>
	400	3.56 ± 0.06 <sup>**</sup>	5.41 ± 0.33 <sup>**</sup>	0.51 ± 0.04 <sup>**</sup>	1.86 ± 0.13 <sup>**</sup>	1.51 ± 0.06 <sup>**</sup>

表 3 CRFP 对糖尿病小鼠血清抗氧化活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 3 Effect of CRFP on antioxidant activities in serum of diabetic mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	SOD/(U·mL <sup>-1</sup> )	CAT/(U·mL <sup>-1</sup> )	T-AOC/(U·mL <sup>-1</sup> )	MDA/(nmol·mL <sup>-1</sup> )	GSH-Px/(U·mL <sup>-1</sup> )
对照	—	203.22 ± 4.01	143.96 ± 6.56	6.00 ± 0.16	2.21 ± 0.30	671.01 ± 17.81
模型	—	144.81 ± 3.48 <sup>##</sup>	68.67 ± 4.18 <sup>##</sup>	3.91 ± 0.27 <sup>##</sup>	6.25 ± 0.34 <sup>##</sup>	452.17 ± 14.26 <sup>##</sup>
二甲双胍	200	190.92 ± 2.92 <sup>**</sup>	130.96 ± 7.80 <sup>**</sup>	5.50 ± 0.20 <sup>**</sup>	3.60 ± 0.15 <sup>**</sup>	636.23 ± 36.46 <sup>**</sup>
CRFP	100	175.60 ± 3.31 <sup>**</sup>	104.29 ± 5.16 <sup>**</sup>	5.74 ± 0.35 <sup>**</sup>	4.62 ± 0.36 <sup>**</sup>	654.04 ± 32.57 <sup>**</sup>
	200	177.74 ± 3.38 <sup>**</sup>	117.86 ± 7.00 <sup>**</sup>	5.43 ± 0.27 <sup>**</sup>	4.26 ± 0.21 <sup>**</sup>	628.99 ± 23.69 <sup>**</sup>
	400	185.43 ± 2.48 <sup>**</sup>	117.83 ± 3.82 <sup>**</sup>	6.08 ± 0.18 <sup>**</sup>	3.78 ± 0.17 <sup>**</sup>	618.48 ± 11.09 <sup>**</sup>

表 4 CRFP 对糖尿病小鼠肝脏抗氧化活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 4 Effect of CRFP on antioxidant activities in liver of diabetic mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	SOD/(U·mg <sup>-1</sup> )	CAT/(U·mg <sup>-1</sup> )	T-AOC/(U·mg <sup>-1</sup> )	MDA/(nmol·mg <sup>-1</sup> )	GSH-Px/(U·mg <sup>-1</sup> )
对照	—	110.82 ± 1.80	278.09 ± 6.62	0.81 ± 0.02	0.49 ± 0.04	991.95 ± 20.01
模型	—	72.98 ± 1.63 <sup>##</sup>	172.63 ± 6.98 <sup>##</sup>	0.48 ± 0.02 <sup>##</sup>	1.51 ± 0.02 <sup>##</sup>	625.52 ± 10.44 <sup>##</sup>
二甲双胍	200	104.43 ± 3.30 <sup>**</sup>	260.07 ± 7.75 <sup>**</sup>	0.78 ± 0.06 <sup>**</sup>	0.80 ± 0.04 <sup>**</sup>	810.19 ± 24.55 <sup>**</sup>
CRFP	100	89.45 ± 3.58 <sup>*</sup>	211.40 ± 14.62 <sup>**</sup>	0.70 ± 0.04 <sup>**</sup>	0.95 ± 0.09 <sup>**</sup>	846.27 ± 53.54 <sup>**</sup>
	200	97.11 ± 5.39 <sup>**</sup>	226.62 ± 13.02 <sup>**</sup>	0.72 ± 0.03 <sup>**</sup>	0.82 ± 0.04 <sup>**</sup>	812.25 ± 20.23 <sup>**</sup>
	400	102.44 ± 5.13 <sup>**</sup>	266.32 ± 18.74 <sup>**</sup>	0.76 ± 0.03 <sup>**</sup>	0.68 ± 0.01 <sup>**</sup>	805.04 ± 17.39 <sup>**</sup>

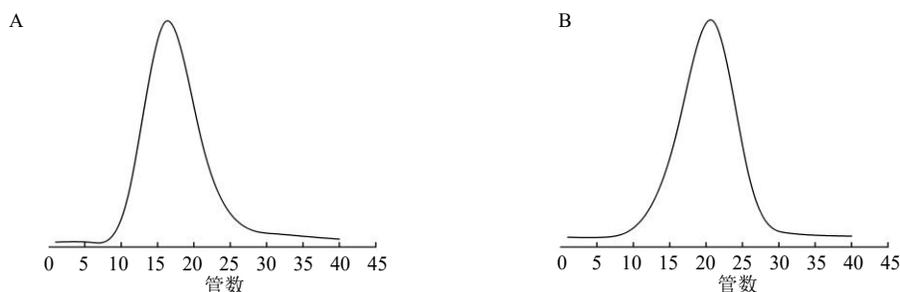


图 2 CRFP DE-52 HAc-NaAc 缓冲液洗脱曲线 (A) 和盐洗脱曲线 (B)

Fig. 2 DE-52 elution curve of CRFP with HAc-NaAc buffer (A) and salt solution (B)

的洗脱液,醇沉,60℃烘干。得到CRFP-a和CRFP-b,离子交换色谱的得率分别为28.25%和53.17%。

**3.2.2 Sephacryl S-200 凝胶过滤色谱** CRFP-a和CRFP-b分别经Sephacryl S-200分子筛进一步纯化后均得到单一洗脱峰(图3),分别收集对应的洗脱液,冷冻干燥,分别命名为CRFP-1和CRFP-2,凝胶过滤色谱的得率分别为82.39%和78.65%。

**3.2.3 CRFP-1和CRFP-2纯度和相对分子质量的**

检测 CRFP-1和CRFP-2经高效液相示差检测均为单一对称峰,质量分数分别为99.86%和99.58%,均为均一组分多糖(图4)。右旋糖酐标准品相对分子质量对数值( $\lg M_p$ )与保留时间( $t_R$ )具有线性关系, $R^2=0.996$ ,线性方程为 $y=-0.5879x+12.531$ 。高效液相检测CRFP-1的 $t_R$ 为 $(9.953\pm 0.006)$ min、CRFP-2的 $t_R$ 为 $(10.024\pm 0.002)$ min,根据线性方程求得所对应的相对分子质量为 $24\,307\pm 311$ 和 $18\,405\pm 168$ 。

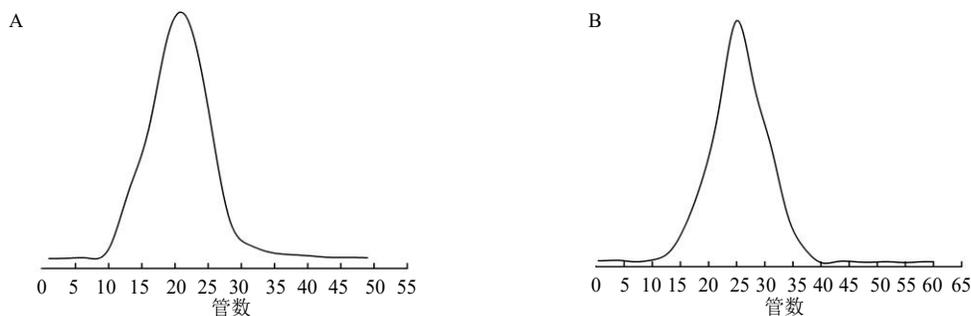


图3 CRFP-a (A) 和 CRFP-b (B) S-200 洗脱曲线

Fig. 3 S-200 elution curve of CRFP-a (A) and CRFP-b (B)

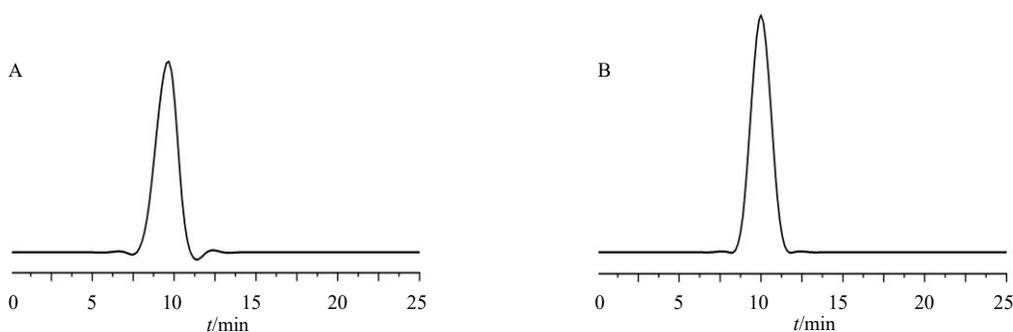


图4 CRFP-1 (A) 和 CRFP-2 (B) 高效液相色谱图

Fig. 4 High performance liquid chromatogram of CRFP-1 (A) and CRFP-2 (B)

**3.2.4 红外光谱扫描** CRFP-1红外光谱扫描结果见图5-A,在 $3383\text{ cm}^{-1}$ 附近处的特征吸收峰为O-H伸缩振动吸收峰;在 $2932\text{ cm}^{-1}$ 附近处为C-H伸缩振动吸收峰;在 $1649\text{ cm}^{-1}$ 附近为-CHO上的C=O伸缩振动吸收峰,是酰胺碳基的特征吸收峰;在 $1376\text{ cm}^{-1}$ 附近为=CH<sub>2</sub>变形吸收峰;在 $1252\text{ cm}^{-1}$ 附近为C-H弯曲振动吸收峰;在 $1041\text{ cm}^{-1}$ 附近为醇羟基-OH变角振动吸收峰,在 $865\text{ cm}^{-1}$ 附近为 $\alpha$ -型糖苷键的特性吸收峰,说明CRFP-1为 $\alpha$ -型多糖。

CRFP-2红外光谱扫描结果见图5-B,在 $3417\text{ cm}^{-1}$ 附近处的特征吸收峰为O-H伸缩振动吸收峰;在 $2927\text{ cm}^{-1}$ 附近处为C-H伸缩振动吸收峰;在 $1614\text{ cm}^{-1}$ 为-OH弯曲振动吸收峰; $1414\text{ cm}^{-1}$ 为=CH<sub>2</sub>变形吸收峰;在 $1251\text{ cm}^{-1}$ 附近为C-H弯曲振动吸收

峰;在 $1074\text{ cm}^{-1}$ 附近为醇羟基-OH变角振动吸收峰,在 $916\text{ cm}^{-1}$ 附近为 $\beta$ -型糖苷键的特性吸收峰,说明CRFP-2为 $\beta$ -型多糖。

**3.2.5 CRFP-1和CRFP-2单糖组成** 如图6所示,与单糖标准品图谱比较,CRFP-1由8种单糖组成,分别为甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖、岩藻糖,物质的量比为 $0.245:0.071:0.003:0.001:0.122:0.425:0.1235:0.01$ ,其中半乳糖占比最高。CRFP-2由10种单糖组成,分别为甘露糖、核糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖、岩藻糖,物质的量比为 $0.061:0.01:0.083:0.128:0.127:0.038:0.301:0.048:0.112:0.093$ ,其中半乳糖占比最高。

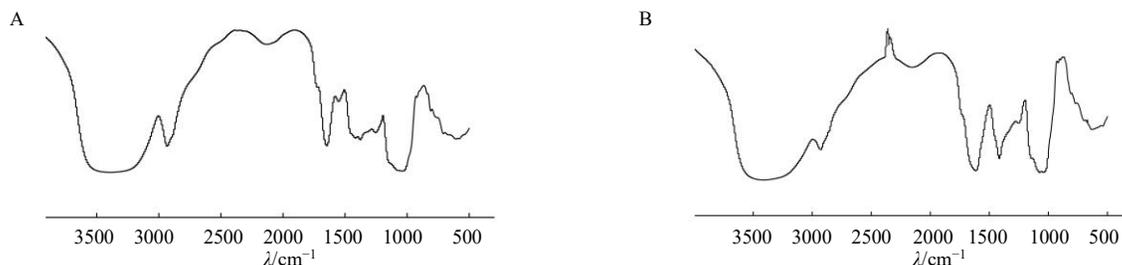


图5 CRFP-1 (A) 和 CRFP-2 (B) 红外扫描图谱

Fig. 5 Infrared scanning spectrum of CRFP-1 (A) and CRFP-2 (B)

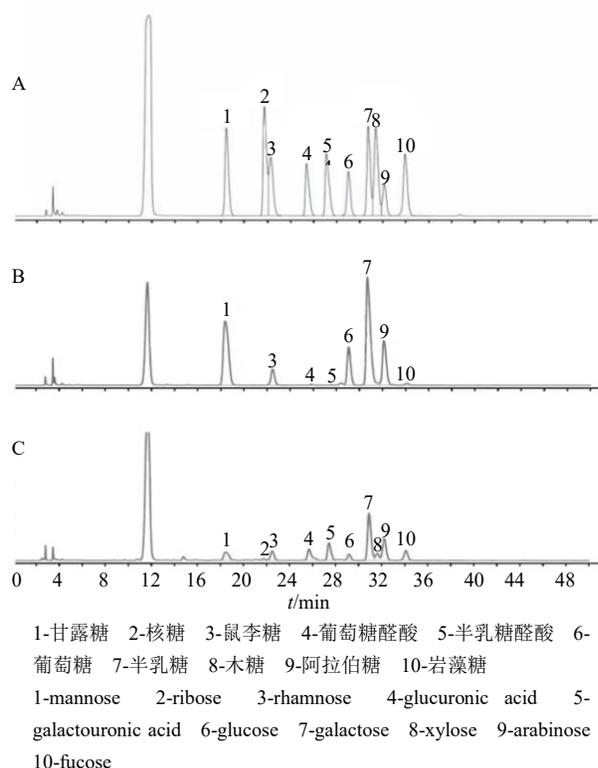


图6 单糖标准品 (A)、CRFP-1 (B) 和 CRFP-2 (C) 图谱  
Fig. 6 Spectrum of monosaccharide standard (A), CRFP-1 (B) and CRFP-2 (C)

#### 4 讨论

课题组前期研究表明, CRFP 得率高于黄连多糖, 且具有较强的体外抗氧化活性<sup>[12]</sup>。黄连多糖的降血糖作用已得到证实<sup>[20-21]</sup>, 但 CRFP 是否具有降血糖作用, 还需研究确认。由于黄连须成本远低于黄连, 所以从黄连须中得到降血糖的多糖具有重大意义。本研究表明 CRFP 能显著降低糖尿病小鼠的空腹血糖水平, 降低 OGTT 的 AUC, 说明加速外周组织(肝、肌肉、脂肪)对葡萄糖的利用、改善胰岛素抵抗是 CRFP 降血糖的机制之一; 提高 FINS, 表明 CRFP 能改善受损胰岛的功能, 促进胰岛素分

泌; HK 和 PK 作为体内糖酵解过程中的关键性的限速酶, 在体内糖代谢过程发挥重要作用, CRFP 提高了糖尿病小鼠肝脏的 HK 和 PK 活性, 说明 CRFP 能通过提高糖代谢中的关键酶活性起到降血糖作用。糖代谢异常会导致血脂代谢紊乱, 引发高脂血症、动脉粥样硬化和心血管疾病等。本研究结果显示, 给予 CRFP 后糖尿病小鼠 OFTT 的 AUC、TG、TC、LDL-C 和 FFA 含量显著降低, HDL-C 水平提高, 说明 CRFP 能改善糖尿病引起的血脂代谢紊乱, 降低由血脂异常引发的糖尿病并发症风险。血糖升高会引起体内氧化应激水平增高, 反之, 氧化应激水平增高又会加剧血糖升高, 所以抗氧化是治疗糖尿病的重要辅助手段。CRFP 能显著提高糖尿病小鼠血清和肝脏中的抗氧化活性, 显示抗氧化活性亦是 CRFP 降血糖的机制之一。

在证实 CRFP 降血糖活性后, 本研究通过色谱技术对其进行了分离纯化, 得到 2 种成分均一的精多糖 CRFP-1 和 CRFP-2, 并解析了结构。李云<sup>[20]</sup>采用了 4 种不同梯度的 NaCl 溶液作为洗脱液, 得到了 4 种电荷量不同的黄连多糖; 范刚等<sup>[22]</sup>通过柱前衍生法分析了 3 种不同品种黄连单糖组分, 均有 7 种单糖组分, 而本研究的 CRFP-1 和 CRFP-2 分别由 8 种和 10 种单糖组成, 与张亚丽等<sup>[23]</sup>的研究基本一致。研究材料、提取方法和分离纯化技术的不同会导致单糖组成存在差异。至于 CRFP-1 和 CRFP-2 在降血糖中的作用还有待进一步研究。

综上, 本研究从黄连采收过程中废弃的黄连须中提取了 CRFP, 研究该多糖对糖尿病小鼠的作用, 发现 CRFP 通过促进外周组织对葡萄糖的利用、提高胰岛分泌胰岛素能力、加速葡萄糖代谢、改善血脂代谢紊乱和提高氧化应激水平降低血糖, 具有开发成降血糖药物的潜力。为进一步深入研究 CRFP 的结构和组成, 本研究对 CRFP 进行了分离纯化,

得到了成分均一的  $\alpha$ -型 CRFP-1 和  $\beta$ -型 CRFP-2, 相对分子质量分别为  $24\ 307 \pm 311$  和  $18\ 405 \pm 168$ , 均为半乳糖含量最高, 但其他组成各异。CRFP-1 和 CRFP-2 在降血糖中所起的作用还有待进一步研究。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 曾立, 向荣, 张运良, 等. 黄精多糖对糖尿病小鼠的降血糖作用及机制 [J]. 中成药, 2022, 44(9): 2989-2994.
- [2] Zhou Z, Sun B, Yu D S, *et al.* Gut microbiota: An important player in type 2 diabetes mellitus [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 834485.
- [3] Sun H, Saeedi P, Karuranga S, *et al.* IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2022, 183: 109119.
- [4] 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.
- [5] 中国老年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.
- [6] 吴梦琪, 夏玮, 徐志珍, 等. 植物多糖的分离纯化、结构解析及生物活性研究进展 [J]. 化学世界, 2019, 60(11): 737-747.
- [7] 张蕊馨, 张彦华, 周迎春, 等. 中药多糖化学结构及药理作用研究进展 [J]. 黑龙江中医药, 2018, 47(1): 88-89.
- [8] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 1088.
- [9] Cui L J, Liu M, Chang X Y, *et al.* The inhibiting effect of the *Coptis chinensis* polysaccharide on the type II diabetic mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 81: 111-119.
- [10] Jiang S, Wang Y H, Ren D Y, *et al.* Antidiabetic mechanism of *Coptis chinensis* polysaccharide through its antioxidant property involving the JNK pathway [J]. *Pharm Biol*, 2015, 53(7): 1022-1029.
- [11] 盖晓红, 刘素香, 任涛, 等. 黄连的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49(20): 4919-4927.
- [12] 田谷正男, 胡莹, 蒋凤珍, 等. 黄连须多糖水浴提取工艺优化及体外抗氧化活性研究 [J]. 湖北民族大学学报: 自然科学版, 2022, 40(2): 142-149.
- [13] Yuan Y, Zhou J H, Zheng Y F, *et al.* Beneficial effects of polysaccharide-rich extracts from *Apocynum venetum* leaves on hypoglycemic and gut microbiota in type 2 diabetic mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 127: 110182.
- [14] Mbagwu I S, Akah P A, Ajaghaku D L. *Newbouldia laevis* improved glucose and fat homeostasis in a TYPE-2 diabetes mice model [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 251: 112555.
- [15] 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]. *Int J Endocrinol*, 2022, 2022: 8744964.
- [16] 温文娟, 刘珊, 黄远丽. 苯酚硫酸法与蒽酮硫酸法测定香菇多糖含量比较 [J]. 现代食品, 2020(21): 177-179.
- [17] 顾健, 吴伟, 沈志冲, 等. 高效分子排阻色谱法测定滇黄精多糖的分子量 [J]. 中国药业, 2021, 30(13): 72-74.
- [18] 黄俊彬, 丁婕, 朱海媚, 等. 三个不同种源的铁皮石斛多糖比较及其初步的药理活性评价 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(5): 71-78.
- [19] 李婷婷, 王雪吟, 胡丹荔, 等. 柱前衍生法测定桂花多糖中的 6 种单糖的含量 [J]. 食品工业, 2019, 40(4): 323-327.
- [20] 李云. 黄连多糖分离纯化及其对高级糖基化终产物形成的影响 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2015.
- [21] 齐刚, 王继锋, 齐凤军, 等. 黄连多糖联合甘精胰岛素治疗 2 型糖尿病胰岛素抵抗 [J]. 中医学报, 2018, 33(10): 1899-1903.
- [22] 范刚, 唐策, 李艳, 等. 柱前衍生 HPLC 分析黄连多糖的单糖组成 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(11): 74-78.
- [23] 张亚丽, 高简, 苗祥贞, 等. 黄连多糖中单糖组成的 HPLC-MS<sup>n</sup> 法快速识别 [J]. 世界中医药, 2017, 12(11): 2775-2778.

[责任编辑 李亚楠]