



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104784192 A

(43) 申请公布日 2015. 07. 22

(21) 申请号 201510134784. 1

C07H 3/06(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 03. 25

C07H 1/08(2006. 01)

(71) 申请人 中山大学

C08B 37/00(2006. 01)

地址 510275 广东省广州市海珠区新港西路
135 号

(72) 发明人 苏薇薇 李沛波 王永刚 彭维
吴忠

(74) 专利代理机构 广州番禺容大专利代理事务
所(普通合伙) 44326

代理人 刘新年 黄开艳

(51) Int. Cl.

A61K 31/702(2006. 01)

A61K 31/715(2006. 01)

A61P 3/10(2006. 01)

A23L 1/30(2006. 01)

权利要求书1页 说明书9页

(54) 发明名称

蚌肉寡糖在制备降血糖药物中的应用及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及蚌肉寡糖在制备降血糖和防治糖尿病药物或保健食品中的应及其制备方法。所述蚌肉寡糖优选分子量范围为 500-2000 的蚌肉寡糖化合物,其总含量高于 50%。实验证明:蚌肉寡糖可显著抑制四氧嘧啶致糖尿病模型小鼠的血糖水平并提高葡萄糖耐量;蚌肉寡糖对高脂饮食+STZ(链脲佐菌素)诱导的 II 型糖尿病大鼠具有显著降血糖作用,主要表现为改善 II 型糖尿病大鼠的糖耐量异常,抑制血浆 HbA1c 的升高,显著提高肝糖原和肌糖原的含量,加强肝脏糖的利用及抑制肝糖产生,抑制胰高血糖素分泌,增强糖原的储备和降低糖的异生;急性毒性试验研究表明,蚌肉寡糖无毒副作用,安全性高。

1. 蚌肉寡糖在制备降血糖药物中的应用。
2. 蚌肉寡糖在制备防治糖尿病药物或保健食品中的应用。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的应用,其特征在於:所述蚌肉寡糖中寡糖化合物的分子量范围为 500-2000,寡糖总含量高于 50%。
4. 一种蚌肉寡糖的制备方法,其特征在於包括以下步骤:
 - 4.1、蚌肉切碎,按质量比加 6-8 倍量的 95%乙醇回流两次,弃滤液留蚌肉待用;
 - 4.2、待用蚌肉用 8-10 倍量水煎煮,滤过,收集滤液并浓缩至密度 1.2g/ml 以上的浓缩液 A;
 - 4.3、浓缩液 A 加入 95%乙醇使醇浓度达到 50% -60%,静置 12 小时以上,滤过,收集滤液并浓缩至密度为 1.2g/ml 以上的浓缩液 B;
 - 4.4、浓缩液 B 再次加入 95%乙醇使醇浓度达到 80%以上,静置 12 小时以上,滤过,收集固体,以无水乙醇洗涤,50-60℃低温烘干得沉淀物;
 - 4.5、沉淀物溶于适量蒸馏水,离心除去沉淀,层析,以蒸馏水洗脱,洗脱液冷冻干燥,得固体;固体层析分离,以蒸馏水洗脱,收集洗脱液,冷冻干燥;测定分子量,取分子量在 500-2000 之间的寡糖部分,并测定寡糖含量总含量高于 50%为目标产品。

蚌肉寡糖在制备降血糖药物中的应用及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及蚌肉寡糖的新治疗用途及其制备方法。

背景技术

[0002] 随着经济的高速发展和工业化进程的加速，人类健康面临非传染性疾病的威胁正日益增加，糖尿病患病率和糖尿病患者数量急剧上升。糖尿病及其并发症给人类健康和社会发展带来了严重的负担。根据国际糖尿病联盟 (International Diabetes Federation, IDF) 统计,2000 年全球有糖尿病患者 1.51 亿,而目前糖尿病患者已达 2.85 亿,按目前的增长速度,估计到 2030 年全球将有近 5 亿人患糖尿病。值得注意的是,糖尿病已不仅仅是发达国家的“富贵病”,包括中国在内的发展中国家也已成为糖尿病的重灾区。由于中国是世界上人口最多的国家,其庞大的人口基数使中国背负着极大的糖尿病负担,糖尿病患者人数占全球糖尿病患者总数的 1/3。2008 年中华医学会糖尿病学分会 (CDS) 组织的糖尿病流行病学调查结果显示,在 20 岁以上的人群中,年龄标化的糖尿病患病率为 9.7%,而糖尿病前期的比例更高达 12.8%,相当于每 4 个成年人中就有 1 个高血糖状态者,更为严重的是我国 60.7% 的糖尿病患者未被诊断而无法及早进行有效的治疗。糖尿病的慢性血管并发症对患者的生命和生活质量威胁极大,给家庭以及患者个人带来了沉重的经济负担。2010 年全世界 11.6% 的医疗卫生费用花费在防治糖尿病上,世界卫生组织估计 2005 年至 2015 年中国由于糖尿病及相关心血管疾病导致的经济损失达 5577 亿美元。而糖尿病复杂的发病过程使人类至今尚未找到根治的方法,这就意味着患者需要终身接受治疗,但遗憾的是,即使是在发达国家,也有约 2/3 的患者得不到有效管理。在发展中国家,糖尿病控制状况更不容乐观,据我国 2003 年、2004 年、2006 年大中城市门诊的调查表明,仅有 1/4 的糖尿病患者糖化血红蛋白 (HbA1c) 达标 (<6.5%)。目前,II 型糖尿病的口服降糖药根据作用效果的不同,可以分为促胰岛素分泌剂 (磺脲类、格列奈类、DPP-4 抑制剂) 和非促胰岛素分泌剂 (双胍类、TZDs、 α -糖苷酶抑制剂)。但由于现有药物存在不良反应多、顺应性较差等问题,因此,开发安全有效、顺应性好、适合长期服用的抗糖尿病药物或保健产品,是全世界医药界研究的重点和热点。

[0003] 蚌肉常作为珍珠蚌取珠后的下脚料,价格十分低廉,利用途径少,除少部分加工成低附加值的饲料外,大部分都被丢弃,经济利用价值极低,而且处理不及时,还会对环境造成污染。现代科学研究表明:蚌肉含有大量糖类成分,该糖类成分不仅具有营养价值,而且具有某些特殊的生物活性和广泛的应用开发前景。2012 年,蚌肉多糖被卫生部批准作为新资源食品,一具有保肝、护肝、美容、养颜、抗衰老功能,多用于保健食品和化妆品领域。目前,常用提取方法所得的蚌肉多糖分子量一般比较大,不易于吸收,且生物活性较弱,限制了蚌肉多糖在临床药物上的应用。

发明内容

[0004] 本发明公开了蚌肉寡糖在制备降血糖药物中的应用,尤其是在制备防治糖尿病药

物或保健食品中的应用。

[0005] 本发明优选的蚌肉寡糖是指分子量范围为 500-2000 的蚌肉寡糖化合物,并要求寡糖总含量高于 50%。

[0006] 本发明通过动物实验发现:蚌肉寡糖可显著抑制四氧嘧啶致糖尿病模型小鼠的血糖水平并提高葡萄糖耐量;蚌肉寡糖对高脂饮食+STZ 诱导的 II 型糖尿病大鼠具有显著降血糖作用,主要表现为改善 II 型糖尿病大鼠的糖耐量异常,抑制血浆 HbA1c 的升高,显著提高肝糖原和肌糖原的含量,加强肝脏糖的利用及抑制肝糖产生,抑制胰高血糖素分泌,增强糖原的储备和降低糖的异生。提示蚌肉寡糖具有很好的抗糖尿病作用。且蚌肉寡糖降血糖作用要明显优于蚌肉多糖。

[0007] SD 大鼠经口给予蚌肉寡糖急性毒性试验结果表明:SD 大鼠单次经口灌胃给予蚌肉寡糖 6g/kg,所有动物在给药后 14 天观察期内未见死亡,一般状况良好,体重及摄食量正常;给药后 14 天时血液学、血凝、血生化等检测均未见异常改变,大体解剖也未见与供试品相关的病理改变。

[0008] 综上所述,蚌肉寡糖具有很好的降血糖及抗糖尿病作用,未见毒副作用,可用于临床中糖尿病的治疗。

具体实施方式

[0009] 下面结合实施例对本发明做进一步的说明。

[0010] 各实施例中所涉及的固体混合物中之固体,液体中之液体,以及液体中之固体的百分比分别是以 wt/wt、vol/vol、wt/vol 计算,除非另有说明。

[0011] 实施例 1 蚌肉寡糖的制备

[0012] 将蚌肉剪切碎,加 95%乙醇回流两次,第一次加 8 倍量 95%乙醇,第二次加 6 倍量,每次 1 小时,过滤,滤液弃去,将蚌肉用水煎煮提取两次,每次加 10 倍量水,煎煮 1 小时,滤过,收集滤液并浓缩至密度为 1.2g/ml 以上,加入 95%乙醇使醇浓度达到 50%-60%,静置 12 小时以上,滤过,收集滤液并浓缩至密度为 1.2g/ml 以上,再次加入 95%乙醇使醇浓度达到 80%以上,静置 12 小时以上,滤过,收集固体,以无水乙醇洗涤,50-60℃低温烘干沉淀物。

[0013] 将上述沉淀物溶于适量蒸馏水,离心除去沉淀,上 Sephadex G-75 层析柱,以蒸馏水洗脱,合并洗脱液,冷冻干燥,得固体。再将上述固体上 Sephadex G-15 柱层析分离,以蒸馏水洗脱,收集器收集,硫酸-蒽酮法检测洗脱液含糖量,以吸光值为纵坐标,洗脱时间为横坐标绘制洗脱曲线,根据洗脱快慢分得两部分,分别合并洗脱峰,冷冻干燥。测定分子量,首先洗脱下来分子量在 2500-15000,为蚌肉多糖,采用硫酸-蒽酮法测定多糖含量为 95.4%;后洗脱下来的分子量主要集中在 500-2000 之间,为蚌肉寡糖,采用硫酸-蒽酮法测定寡糖含量为 93.5%。

[0014] 实施例 2 蚌肉寡糖对四氧嘧啶糖尿病小鼠的降血糖作用

[0015] 1、动物

[0016] 昆明种小鼠,SPF 级,雄性,由广东省医学实验动物中心提供,动物合格证号:SYXK(粤)2014-0020。

[0017] 2、实验材料

[0018] 蚌肉寡糖:从蚌科动物三角帆蚌的肉中提取的寡糖,蚌肉寡糖的寡糖类化合物含量高于 93.5%,分子量范围为 500-2000。

[0019] 蚌肉多糖:从蚌科动物三角帆蚌的肉中提取的多糖,蚌肉多糖的多糖类化合物含量高于 95.4%,分子量范围为 2500-15000。

[0020] 3、实验方法

[0021] 取 90 只雄性正常昆明种小鼠,禁食不禁水 24h 后,按体重随机分为 2 组,其中一组 10 只为正常对照组,其余 80 只按 220mg/kg 体重腹腔注射四氧嘧啶造模,72h 后,将小鼠禁食不禁水 10h,然后于小鼠眼眶静脉丛取血测血糖,选择 血糖值在 8.8 ~ 30mmol/L 的 60 只小鼠为造模成功小鼠,按血糖水平随机分为四氧嘧啶模型对照组、蚌肉多糖组、盐酸二甲双胍片组和蚌肉寡糖低、中、高剂量组,每组 10 只。除正常对照组和四氧嘧啶模型对照组灌服等体积蒸馏水外,其余各组动物按 0.2mL/10g 体重灌胃给药,1 次/d,连续 8d。末次给药后,小鼠禁食不禁水 10h,于眼眶静脉丛取血,按血糖测定试剂盒操作测定血糖值。

[0022] 4、结果

[0023] 由表 1、表 2 可见:蚌肉寡糖中、高剂量组均可显著抑制四氧嘧啶致糖尿病模型小鼠的血糖水平、提高葡萄糖耐量,且作用不弱于阳性对照药盐酸二甲双胍;蚌肉寡糖中、高剂量组均可显著抑制血糖水平升高和提高葡萄糖耐量的能力均显著强于蚌肉多糖。

[0024] 表 1 蚌肉寡糖对四氧嘧啶小鼠血糖的影响

[0025]

组别	动物数 (只)	给药剂量 (mg/kg)	给药前血糖 (mmol/L)	给药后血糖 (mmol/L)
正常对照组	10	-	5.01±1.26	5.12±0.34
四氧嘧啶模型组	10	-	15.31±3.21**	16.53±3.57**
盐酸二甲双胍片组	10	200	15.75±2.41**	9.38±2.51 [#]
蚌肉多糖组	10	40	15.42±1.67**	14.33±3.51
蚌肉寡糖低剂量组	10	20	14.98±3.56**	12.82±6.52
蚌肉寡糖中剂量组	10	40	15.24±5.10**	8.62±2.51 ^{###△}
蚌肉寡糖高剂量组	10	80	15.17±3.21**	7.16±0.99 ^{###△△}

[0026] 注:与正常对照组比较:**P < 0.01;与四氧嘧啶模型组比较:°P < 0.05;##P < 0.01;与蚌肉多糖组比较:△P < 0.05;△△P < 0.01

[0027] 表 2 蚌肉寡糖对四氧嘧啶小鼠葡萄糖耐性的影响

[0028]

组别	动物数 (只)	给药剂量 (mg/kg)	曲线下面积 (mmol·h/L)
正常对照组	10	-	20.3±3.2
四氧嘧啶模型组	10	-	65.2±9.2**
盐酸二甲双胍片组	10	200	41.5±5.3**
蚌肉多糖组	10	40	55.1±7.6
蚌肉寡糖低剂量组	10	20	53.6±4.5
蚌肉寡糖中剂量组	10	40	42.8±6.6 ^{###△}
蚌肉寡糖高剂量组	10	80	35.9±5.8 ^{###△△}

[0029] 注:与正常对照组比较:**P < 0.01;与四氧嘧啶模型组比较:°P < 0.05;##P

< 0.01 ;与蚌肉多糖组比较 : $\Delta P < 0.05$; $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

[0030] 实施例 3 蚌肉寡糖对高脂饮食联合链尿佐菌素致 II 型糖尿病大鼠的降血糖 作用

[0031] 1、动物

[0032] SD 大鼠, SPF 级, 雄性, 体重 180-220g, 由广东省医学实验动物中心提供, 动物合格证号 :SCXK(粤)2014-0020。

[0033] 2、实验材料

[0034] 蚌肉寡糖 :从蚌科动物三角帆蚌的肉中提取的寡糖, 蚌肉寡糖的寡糖类化合物含量高于 93.5%, 分子量范围为 500-2000。

[0035] 蚌肉寡糖 :从蚌科动物三角帆蚌的肉中提取的寡糖, 蚌肉寡糖的寡糖类化合物含量高于 95.4%, 分子量范围为 2500-15000。

[0036] 3、实验方法

[0037] 取健康 SD 大鼠 140 只, 常规饲料适应性喂养 7 天后, 根据体重分为正常对照组和糖尿病组。正常对照组 ($n = 10$) 喂与常规饲料, 糖尿病组 ($n = 130$) 每天喂高脂饲料。高脂饲料喂养 5 周后, 动物禁食不禁水 24h 后, 均尾腹腔注射 30mg/kgBW 链脲佐菌素溶液 (临用前配制)。正常组大鼠仅空腹尾静脉注射相同剂量枸缘酸盐缓冲液。给药 48h 后, 禁食不禁水 12h, 每隔 3h 尾部取血, 用血糖仪测定空腹血糖值, 连续测定 3 次, 空腹血糖值 $\geq 16.7\text{mmol/L}$ 的为造模成功大鼠。饲养期间, 环境的温度为 $23 \sim 25^{\circ}\text{C}$, 相对湿度为 40-70%, 12 小时光照周期。

[0038] 将造模成功的糖尿病鼠按血糖值和体重随机分为糖尿病模型组、阳性药物盐酸二甲双胍片组、蚌肉多糖组、蚌肉寡糖低、中、高剂量组, 每组 10 只, 使各组间血糖和体重无显著差异, 按拟定剂量连续给药, 每天给药一次, 每天称体重一次, 以随时调整灌胃剂量, 连续给药三周。给药期间, 动物摄食、饮水自由。

[0039] 在动物给药的最后第 3 次, 将大鼠装进代谢笼, 用代谢笼收集 24h 的尿液, 记尿量后量取 5mL 尿液, 3000rpm 离心 10min, 取上清液按试剂盒方法测尿糖和尿蛋白。末次给药后, 动物禁食不禁水 12h, 除空白对照组外, 其余各组均以葡萄糖 2.0g/kgBW, 分别在给予葡萄糖后 0、30、60、90、120min, 所有动物尾部取血, 用血糖测定仪进行测定血糖; 眼眶取血, 依据试剂盒的方法, 测定大鼠血浆中的 HbA1c 和血清中的胰高血糖素样肽 (GLP-1) 和胰高血糖素; 取血后, 脱颈处死动物, 取出肝脏, 用生理盐水漂洗, 按试剂盒的方法测定肝脏中的葡萄糖激酶和磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶; 取后肢肌肉和肝脏, 生理盐水漂洗, 按试剂盒的方法测定肌糖原和肝糖原。

[0040] 4、结果

[0041] (1) 蚌肉寡糖对自发性 II 型糖尿病大鼠的血糖水平及葡萄糖耐量的影响

[0042] 由表 1 可知, 与正常对照组的血糖值相比, 模型组的血糖值和血糖曲下面积显著上升, 说明本模型成功。给药后, 蚌肉寡糖低、中、高剂量组血糖值比模型组显著降低, 并且有剂量关系, 剂量越高, 其血糖值下降量越多, 说明蚌肉寡糖具有显著的降血糖作用; 蚌肉寡糖低、中、高剂量组的血糖曲线面积比模型组的显著降低 ($P < 0.05$), 且有剂量效应关系, 这表明蚌肉寡糖可显著改善 II 型糖尿病大鼠的糖耐量异常, 更能抵抗外源性糖引起的血糖水平增高。此外, 与蚌肉寡糖低、中、高剂量组的给药后血糖值及曲线下面积与蚌肉多糖组比较, 具有统计学差异, 说明蚌肉寡糖在降血糖及改善糖耐量异常方面要优于蚌肉多糖。

[0043] 表 1 蚌肉寡糖对自发性 II 型糖尿病大鼠的血糖水平及葡萄糖耐量的影响 (n = 10)

[0044]

组别	给药剂量 (mg/kg)	给药前血糖 (mmol/L)	给药后血糖 (mmol/L)	曲线下面积
正常对照组	-	5.64±0.54	5.96±1.34	16.83±2.56
模型组	-	25.67±3.55 ^{**}	27.86±3.66 ^{**}	58.91±6.58 ^{**}
盐酸二甲双胍组	140	25.81±2.67 ^{**}	19.63±5.43 [#]	41.20±2.61 ^{##}
盐酸吡格列酮组	2.8	26.73±4.69 ^{**}	17.49±2.59 ^{##}	42.81±2.91 ^{##}
蚌肉多糖组	30	25.98±5.13 ^{**}	24.44±3.29 [#]	51.26±7.42 [#]
蚌肉寡糖低剂量组	15	27.91±6.88 ^{**}	21.03±2.69 ^{##△}	46.26±6.66 ^{##△}
蚌肉寡糖中剂量组	30	25.49±7.87 ^{**}	15.67±5.46 ^{##△△}	38.91±3.52 ^{##△△}
蚌肉寡糖高剂量组	60	26.79±2.53 ^{**}	15.00±1.06 ^{##△△}	35.66±2.81 ^{##△△}

[0045] 注:与正常对照组比较:^{**}P < 0.01;与模型组比较:[#]P < 0.05;^{##}P < 0.01;与蚌肉多糖组比较:[△]P < 0.05;^{△△}P < 0.01。

[0046] (2) 蚌肉寡糖对自发性 II 型糖尿病大鼠的尿蛋白、尿糖、肝糖原和肌糖原的影响

[0047] 由表 2、3 可知,与正常对照组的尿蛋白、尿糖、肝糖原和肌糖原值相比,模型组的尿蛋白和尿糖显著升高,肝糖原和肌糖原显著降低,说明本模型成功。

[0048] 给药后,与模型组比较,蚌肉寡糖低、中、高剂量组尿蛋白、尿糖显著下降,肝糖原和肌糖原升高,提示蚌肉寡糖具有显著降血糖及抑制肾损害的作用。且蚌肉寡糖中、高剂量组的尿蛋白、尿糖、肝糖原和肌糖原水平与蚌肉多糖组比较,差异具有统计学意义,说明蚌肉寡糖对尿蛋白、尿糖、肝糖原和肌糖原的改善优于蚌肉多糖组,这表明蚌肉寡糖可显著改善 II 型糖尿病大鼠的血糖及抑制肾损害的作用,能显著提高肝糖原和肌糖原的含量,抑制肝糖原流失和分解,增加肌糖原的储备。

[0049] 表 2 蚌肉寡糖对 II 型糖尿病大鼠的尿蛋白和尿糖的影响 (n = 10)

[0050]

组别	给药剂量 (mg/kg)	尿糖 (mmol/L)	尿蛋白 (mg/L)
正常对照组	-	11.5±3.1	73.4±10.3
模型组	-	46.3±5.7 ^{**}	234.3±28.7 ^{**}
盐酸二甲双胍组	140	34.3±6.8 [#]	168.8±35.2 [#]
盐酸吡格列酮组	2.8	37.9±1.3 [#]	155.4±21.7 ^{##}
蚌肉多糖组	30	41.35±4.9	183.7±42.9
蚌肉寡糖低剂量组	15	36.5±2.8 [#]	198.8±38.7
蚌肉寡糖中剂量组	30	27.9±3.6 ^{##△△}	142.3±13.8 ^{##△△}
蚌肉寡糖高剂量组	60	21.4±2.1 ^{##△△}	132.5±25.7 ^{##△△}

[0051] 注:与正常对照组比较:^{**}P < 0.01;与模型组比较:[#]P < 0.05;^{##}P < 0.01;与蚌肉多糖组比较:[△]P < 0.05;^{△△}P < 0.01。

[0052] 表 3 蚌肉寡糖对 II 型糖尿病大鼠的肌糖原和肝糖原的影响 (n = 10)

[0053]

组别	给药剂量 (mg/kg)	肌糖原(g/mg)	肝糖原(g/mg)
正常对照组	-	2.5±0.3	14.6±2.5
模型组	-	1.1±0.2 ^{**}	4.2±0.2 ^{**}
盐酸二甲双胍组	140	1.9±0.2 ^{##}	6.6±0.3 ^{##}
盐酸吡格列酮组	2.8	2.0±0.1 ^{##}	8.7±1.4 ^{##}
蚌肉多糖组	30	1.7±0.2 [#]	4.9±0.7
蚌肉寡糖低剂量组	15	1.7±0.3 [#]	5.1±0.6
蚌肉寡糖中剂量组	30	2.3±0.4 ^{##△△}	8.2±1.2 ^{##△△}
蚌肉寡糖高剂量组	60	2.4±0.1 ^{##△△△}	12.5±1.7 ^{##△△△}

[0054] 注：与正常对照组比较：^{**}P < 0.01；与模型组比较：[#]P < 0.05；^{##}P < 0.01；与蚌肉多糖组比较：[△]P < 0.05；^{△△}P < 0.01。

[0055] (3) 蚌肉寡糖对自发性 II 型糖尿病大鼠的血浆 HbA1c 的影响

[0056] 由表 4 可知，与正常对照组的血浆 HbA1c 相比，模型组的血浆 HbA1c 显著升高，说明本模型造模成功。与模型组比较，蚌肉寡糖低、中、高剂量组血浆 HbA1c 显著下降，表明蚌肉寡糖可显著抑制血浆 HbA1c 的升高，具有显著控制血糖的作用。与蚌肉多糖组比较，蚌肉寡糖中、高剂量组血浆 HbA1c 显著下降，提示蚌肉寡糖降低 HbA1c 水平要优于蚌肉多糖。

[0057] 表 4 蚌肉寡糖对 II 型糖尿病大鼠的血浆 HbA1c 的影响 (n = 10)

[0058]

组别	给药剂量(mg/kg)	HbA1c(mmol/L)
正常对照组	-	2.53±0.41
模型组	-	13.65±1.34 ^{**}
盐酸二甲双胍组	140	7.56±0.34 ^{##}
盐酸吡格列酮组	2.8	7.14±0.24 ^{##}
蚌肉多糖组	30	11.49±2.91
蚌肉寡糖低剂量组	15	10.77±2.24 [#]
蚌肉寡糖中剂量组	30	6.38±0.85 ^{##△△}
蚌肉寡糖高剂量组	60	6.59±1.43 ^{##△△△}

[0059] 注：与正常对照组比较：^{**}P < 0.01；与模型组比较：[#]P < 0.05；^{##}P < 0.01；与蚌肉多糖组比较：[△]P < 0.05；^{△△}P < 0.01。

[0060] (4) 蚌肉寡糖对自发性 II 型糖尿病大鼠的葡萄糖激酶 (GCK) 和磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (PCK) 活性的影响

[0061] 由表 5 可知，与正常对照组的 GCK 和 PCK 相比，模型组的 GCK 显著降低、PCK 显著升高，说明本模型造模成功。与模型组比较，蚌肉寡糖中、高剂量组 GCK 显著升高、PCK 显著降低，提示蚌肉寡糖具有显著加强肝脏糖的利用及抑制肝糖产生起到直接降低血糖的作用。与蚌肉多糖组比较，蚌肉寡糖中、高剂量组的 GCK、PCK 水平具有统计学差异，提示蚌肉寡糖在加强肝脏糖的利用及抑制肝糖的产生方面比蚌肉多糖强。

[0062] 表 5 蚌肉寡糖对 II 型糖尿病大鼠的 GCK 和 PCK 的影响 (n = 10)

[0063]

组别	给药剂量(mg/kg)	GCK(U/L)	PCK(ng/ml)
正常对照组	-	64.32±7.64	10.64±1.59
模型组	-	21.59±4.23 ^{**}	21.53±3.66 ^{**}
盐酸二甲双胍组	140	45.36±7.51 ^{##}	18.83±0.94 [#]
盐酸吡格列酮组	2.8	51.38±9.55 ^{##}	19.21±2.51
蚌肉多糖组	30	31.02±9.68 [#]	19.03±4.76
蚌肉寡糖低剂量组	15	29.69±10.29	18.66±5.67
蚌肉寡糖中剂量组	30	42.98±11.28 ^{##△}	15.22±2.31 ^{##△}
蚌肉寡糖高剂量组	60	53.77±12.55 ^{##△△}	12.69±1.57 ^{##△△}

[0064] 注：与正常对照组比较：^{**}P < 0.01；与模型组比较：[#]P < 0.05；^{##}P < 0.01；与蚌肉多糖组比较：[△]P < 0.05；^{△△}P < 0.01。

[0065] (5) 蚌肉寡糖对自发性 II 型糖尿病大鼠胰高血糖素样肽 (GLP-1)、胰高血糖素的影响

[0066] 由表 6 可知，与正常对照组的胰高血糖素样肽 (GLP-1)、胰高血糖素相比，模型组的胰高血糖素样肽 (GLP-1) 显著降低、胰高血糖素显著升高，说明本模型造模成功。

[0067] 给药后，与模型组比较，蚌肉寡糖低、中、高剂量组 GLP-1 显著升高，蚌肉寡糖中、高剂量组胰高血糖素显著降低，提示蚌肉寡糖可有效地刺激胰岛素分泌，抑制胰高血糖素分泌，增强糖原的储备和降低糖的异生，从而使血糖降低。蚌肉寡糖低、中、高剂量组 GLP-1 显著高于蚌肉多糖组；蚌肉寡糖中、高剂量组胰高血糖素显著低于蚌肉多糖组，说明蚌肉寡糖在刺激胰岛素分泌、抑制胰高血糖素分泌、增强糖原的储备和降低糖的异生方面优于蚌肉多糖。

[0068] 表 6 蚌肉寡糖对 II 型糖尿病大鼠胰高血糖素样肽 (GLP-1)、胰高血糖素的影响 (n = 10)

[0069]

组别	给药剂量(mg/kg)	GLP-1 (pmol/L)	胰高血糖素 (pg/ml)
正常对照组	-	41.26±3.68	421.39±51.79
模型组	-	18.27±2.19 ^{**}	886.91±104.37 ^{**}
盐酸二甲双胍组	140	31.56±5.16 ^{##}	699.73±199.87 [#]
盐酸吡格列酮组	2.8	34.06±4.22 ^{##}	704.49±132.69 [#]
蚌肉多糖组	30	18.65±4.95	801.39±203.74
蚌肉寡糖低剂量组	15	23.67±6.21 [△]	749.83±176.42
蚌肉寡糖中剂量组	30	24.19±3.57 ^{##△}	519.86±128.49 ^{##△△}
蚌肉寡糖高剂量组	60	32.89±4.82 ^{##△△}	498.27±98.73 ^{##△△}

[0070] 注：与正常对照组比较：^{**}P < 0.01；与模型组比较：[#]P < 0.05；^{##}P < 0.01；与蚌肉多糖组比较：[△]P < 0.05；^{△△}P < 0.01。

[0071] 实施例 4SD 大鼠经口给予蚌肉寡糖急性毒性试验

[0072] 1、动物

[0073] SD 大鼠，SPF 级，雄性，体重 180-220g，由广东省医学实验动物中心提供，动物合格证号：SCXK(粤)2014-0020。

[0074] 2、实验方法

[0075] 试验设计给药组及空白对照组,每组 12 只动物,雌雄各半。给药组给药剂量为 4g/kg,按可通过灌胃针的最大浓度 200mg/ml、给药容积 20ml/kg 灌胃给药。对照组灌胃给予等体积灭菌注射用水。

[0076] 每日观察并记录大鼠的外观、精神状态、呼吸、皮肤被毛、粪尿、眼、耳、鼻、口腔、生殖器等一般情况及其它中毒表现和死亡情况。每两天测定大鼠体重一次,每周测定大鼠摄食量一次,连续观察 14 天。

[0077] 3、结果

[0078] (1) 一般状况及死亡情况观察

[0079] 给药后直至第 14 天,各动物精神及行为活动状况良好、皮肤被毛清洁、大小便正常,亦未见其他毒性反应症状。观察结束后大体解剖未见脏器明显异常。

[0080] (2) 体重

[0081] 雌、雄大鼠在各时间点体重与灭菌注射用水对照组雌、雄大鼠体重相比,差异无统计学意义 ($P>0.05$),认为蚌肉寡糖经口灌胃给药对大鼠体重无明显影响。详见表 7。

[0082] (3) 摄食量

[0083] 蚌肉寡糖经口灌胃给药对雌、雄鼠平均摄食量无明显影响。详见表 8。

[0084] 4、结论:

[0085] 综上所述,在本实验室条件下,SD 大鼠以最大浓度 200mg/ml,最大体积 20ml/kg 单次经口灌胃 4g/kg 的蚌肉寡糖,14 天观察期内,大鼠未出现死亡,精神及行为活动状况良好、皮肤被毛清洁、大小便正常,体重增长正常,摄食量未见异常。观察结束后大体解剖未见脏器异常。

[0086] 表 7 蚌肉寡糖单次经口灌胃给药对 SD 大鼠体重的影响($\bar{X} \pm SD$)

[0087]

组别	动物数(只)	体重(g)							
		第1天	第3天	第5天	第7天	第9天	第11天	第13天	第15天
1	6	135.24±2.36	156.72±3.28	190.38±2.65	201.57±5.27	216.77±4.28	240.68±6.49	253.28±6.72	270.74±6.38
2	6	136.89±3.09	154.29±2.87	188.73±3.27	199.02±4.66	219.82±5.26	241.26±5.22	258.39±5.71	274.73±5.37
3	6	132.97±3.68	149.60±2.15	156.88±3.62	170.92±5.63	180.36±4.63	189.02±7.59	196.38±3.25	205.78±7.26
4	6	130.62±4.27	152.09±3.68	158.50±4.71	168.59±6.25	178.79±6.80	188.27±5.02	194.79±5.21	2066.31±5.62

[0088] 1 组为:雄性空白对照组;2 组为蚌肉寡糖给药组;3 组为雌性空白对照组;4 组为蚌肉寡糖给药组

[0089] 表 8 蚌肉寡糖单次经口灌胃给药对 SD 大鼠平均摄食量的影响

[0090]

组别	动物数 (只)	摄食量 (g)		
		1 天	7 天	15 天
雄性				
空白对照组	6	27.8	32.1	28.7
蚌肉寡糖给药组	6	26.2	31.8	29.9
雌性				
空白对照组	6	21.8	22.7	22.0
蚌肉寡糖给药组	6	20.9	21.8	22.1