

银耳多糖超声辅助低共熔溶剂提取及 对糖尿病小鼠肠道菌群的影响

宋巧英, 赵宝怡, 刘子晴

(安阳工学院 生物与食品工程学院, 河南 安阳 455000)

摘要: 通过单因素实验和正交实验对超声辅助低共熔溶剂 (DES) 提取银耳多糖的工艺进行了优化。考察了银耳多糖的体内、体外降血糖活性; 根据小鼠盲肠内容物高通量测序分析, 评价了银耳多糖对肠道菌群的影响。结果表明, 以 $n(\text{氯化胆碱}):n(\text{尿素})=1:2$ 制备的 DES-1 为提取溶剂, 10 g 银耳粉末在料液比 (g : mL) 1 : 35、DES-1 含水率 (质量分数, 下同) 15%、超声时间 40 min、超声温度 60 °C、超声功率 200 W 的优化提取条件下, 提取液中银耳多糖含量为 24.47 mg/g; 质量浓度 4 g/L 的银耳多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制率为 72.32%; 银耳多糖干预能显著降低糖尿病小鼠的血糖含量, 改善小鼠的糖代谢状态。与模型组相比, 0.1 g/kg 银耳多糖剂量组小鼠血清胰岛素水平降低了 41.2%; 氧化应激测定的谷胱甘肽过氧化物酶和超氧化物歧化酶的酶活分别提高了 31.83% 和 20.72%, 丙二醛含量降低了 39.48%; 免疫指标 α 肿瘤坏死因子、白细胞介素-6、白细胞介素-12 水平分别下降了 43.87%、28.75% 和 44.05%, 白细胞介素-10 水平上升了 208.79%。银耳多糖能显著增加小鼠肠道中脱铁杆菌门、疣孢菌门、放线菌门、拟杆菌门和厚壁菌门等有益菌的数量, 同时减少菌弯曲菌门和变形菌门等有害菌数量; 能提升乳球菌属、链球菌属、乳杆菌属、阿德勒克氏菌属的相对丰度, 同时降低毛螺菌属、拟杆菌属、双歧杆菌属、普雷沃氏菌属和别样棒菌属的相对丰度。

关键词: 银耳多糖; 低共熔溶剂; 糖尿病; 肠道菌群; 中药现代化技术

中图分类号: R284.2; R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2025) 06-1295-11

Ultrasonic assisted extraction of tremella polysaccharide with eutectic solvent and its effect on intestinal flora of diabetic mice

SONG Qiaoying, ZHAO Baoyi, LIU Ziqing

(School of Biology and Food Engineering, Anyang Institute of Technology, Anyang 455000, Henan, China)

Abstract: The extraction process of tremella polysaccharide with ultrasonic-assisted eutectic solvent (DES) was optimized by single factor and orthogonal experiments. The *in vitro* and *in vivo* hypoglycemic activity of tremella polysaccharide was investigated. Based on high-throughput sequencing analysis of mouse cecum contents, the effects of tremella polysaccharide on intestinal flora were evaluated. The results showed that under the optimized extraction conditions of DES-1 prepared with $n(\text{choline chloride}):n(\text{urea})=1:2$ as extraction solvent, tremella powder 10 g, solid-liquid ratio (g : mL) 1 : 35, water content (mass fraction, the same below) of DES-1 15%, ultrasonic time 40 min, ultrasonic temperature 60 °C and ultrasonic power 200 W, the content of tremella polysaccharide in extract was 24.47 mg/g. The inhibitory rate of tremella polysaccharide with a mass concentration of 4 g/L on α -glucosidase was 72.32%. Tremella polysaccharide intervention significantly reduced the content of blood sugar in diabetic mice and improved the state of glucose metabolism in mice. Compared with those of the model group, the serum insulin level of mice in 0.1 g/kg tremella polysaccharide dose group was reduced by 41.2%, the enzyme activity of glutathione peroxidase and superoxide dismutase was increased by 31.83% and 20.72%, respectively, while

the content of malondialdehyde was decreased by 39.48%, the levels of tumor necrosis factor- α , interleukin-6 and interleukin-12 were decreased by 43.87%, 28.75% and 44.05%, respectively, and the levels of interleukin-10 was increased by 208.79%. Tremella polysaccharide significantly increased the number of beneficial bacteria in the intestines of mice, such as *Deferribacterota*, *Verruconicrobia*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* and *Firmicutes*, and reduced the number of harmful bacteria such as *Campilobacterota* and *Proteobacteria*. At the same time, tremella polysaccharide enhanced the relative abundance of *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* and *Adlercreutzia*, and decreased that of *Lachnospiraceae*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Prevotella* and *Allobaculum*.

Key words: tremella polysaccharide; deep eutectic solvents; diabetes; intestinal flora; modernization technology of traditional Chinese medicines

银耳，又名白木耳，是属真菌的子实体，享有“菌中之冠”的美誉。银耳营养成分丰富，含有蛋白质、氨基酸、矿物质、膳食纤维以及具有特殊保健功能^[1]的活性成分——银耳多糖，作为食疗食材，有清热健胃、美容祛斑、减肥等功效^[2]；银耳性味甘平，还具有补肺益气、养阴润燥的药用价值，常用于治疗病后体虚、肺虚久咳、痰中带血、崩漏、大便秘结、高血压病、血管硬化等病症。

许多多糖在医药领域具有广泛的应用价值，如香菇多糖、银耳多糖以及枸杞多糖等，这些植物多糖在进入人体之后，不仅可以抗氧化，还可以调节身体免疫力^[3]。一些多糖对癌细胞具有很强的抑制作用，具有抗肿瘤活性，其通过增强机体的免疫功能来达到杀伤肿瘤细胞的目的。多糖也与影响细胞生化代谢、抑制肿瘤细胞周期和肿瘤组织中的超氧化物歧化酶（SOD）活性有明显的关系。植物多糖还具有延缓衰老的作用^[4]，如金针菇多糖、银耳多糖等可显著降低机体心肌组织的脂褐素的含量，增加脑和肝脏组织的 SOD 酶活力，从而起到延缓机体衰老的作用^[5-6]。因此，植物多糖是一类具有广泛应用前景的生物大分子，在医药、食品等领域具有重要的应用价值。

本文拟利用低共熔溶剂（DES）对银耳多糖进行提取，优化提取工艺，评估银耳多糖体内外降血糖活性及对肠道菌群的影响，以期在银耳在食品加工及药理领域的资源开发奠定理论基础。

1 实验部分

1.1 材料、试剂与仪器

银耳，福建古田；阿卡波糖、 α -葡萄糖苷酶、 Na_2CO_3 、硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷（PNPG），上海源叶生物科技有限公司；氯化胆碱、尿素、柠檬酸、乳酸、1,2-丙二醇、链脲佐菌素（STZ），天津市光复精细化工研究所；血清胰岛素（INS）试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）、SOD、丙二醛

（MDA）、 α 肿瘤坏死因子（TNF- α ）、白细胞介素-6（IL-6）、白细胞介素-10（IL-10）、白细胞介素-12（IL-12）检测试剂盒，南京建成生物工程研究所。

健康雄性昆明小鼠〔7~8周，(20 \pm 2)g〕，中国北京斯贝福生物科技有限公司，动物许可证号（SYXK：2019-0002）。

SS-1002 型超微粉碎机，武义海纳电器有限公司；DM0412 型低速离心机，上海通善生物科技有限公司；T6 型紫外-可见分光光度计，北京普析通用仪器有限责任公司；VGT-1990QTD 型超声波清洗机，广东固特超声股份有限公司；Infinite M200 PRO 型酶标仪，瑞士 TECAN 公司；GA-3 型血糖仪，三诺生物传感股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 DES 的制备

取适量的氯化胆碱作为氢键受体（HBA），分别与不同的氢键供体（HBD）按表 1 混合，于 70 °C 下加热搅拌均匀后备用，制备的 DES 分别记为 DES-1~DES-4。

表 1 不同 DESs 体系的组成
Table 1 The composition of different DESs systems

低共熔溶剂	HBA	HBD	$n(\text{HBA}) : n(\text{HBD})$
DES-1	氯化胆碱	尿素	1 : 2
DES-2		柠檬酸	1 : 1
DES-3		乳酸	1 : 2
DES-4		1,2-丙二醇	1 : 3

1.2.2 银耳多糖的提取

银耳经干燥和超微粉碎机粉碎后，得到银耳粉末。称取 10 g 银耳粉末，按照料液比（g : mL，下同）1 : 30，分别加入 30 mL 含水率（质量分数，下同）20% 的 DES-1~DES-4，于提取温度 70 °C、超声功率 120 W 下超声 30 min，离心取上清液，备用。

将 4 倍体积的无水乙醇加入至上述上清液中醇沉过夜，收集沉淀。将 1 g 沉淀物与 30 mL 蒸馏水混合后，再将 Sevag 试剂（体积比为 4 : 1 的氯仿和

正丁醇)和样品溶液按1:4的体积比混合于分液漏斗中,剧烈振荡后,静置7~8 h,收集上层液体即得银耳多糖溶液。

分别吸取质量浓度为0.1 g/L的葡萄糖标准液0、0.2、0.4、0.6、0.8和1.0 mL于试管中,加蒸馏水补足至1.0 mL,再精确称取1.0 mL体积分数为5%的苯酚和5 mL浓硫酸,并加入到每个试管中,静置15 min,振荡摇匀,采用紫外-可见分光光度计在490 nm处测定溶液的吸光度。以葡萄糖质量浓度(x , g/L)为横坐标、吸光度(y)为纵坐标,绘制出葡萄糖质量浓度-吸光度标准曲线,得到拟合方程为 $y=0.725x+0.005$ ($R^2=0.9993$)。

将银耳多糖溶液稀释一定倍数。取1 mL稀释后的银耳多糖水溶液,后续方法同上。根据葡萄糖质量浓度-吸光度标准曲线和式(1)计算银耳多糖含量:

$$Y = \frac{\rho \times V \times X}{m} \quad (1)$$

式中: Y 为银耳多糖含量,mg/g; ρ 为标准曲线中吸光度对应葡萄糖质量浓度,g/L; V 为多糖水溶液体积,mL; X 为稀释倍数; m 为银耳原料质量,g。

1.3 银耳多糖提取工艺的优化

1.3.1 单因素实验

采用1.2.2节的提取工艺,称取10 g银耳粉末,加入30 mL含水率20%的DES-1,于提取温度70 °C、超声功率120 W下超声30 min,调整料液比(g:mL,下同,1:10、1:20、1:30、1:40、1:50),考察料液比对银耳多糖提取液中银耳多糖含量的影响。

采用1.2.2节的提取工艺,称取10 g银耳粉末,分别加入30 mL含水率(10%、20%、30%、40%、50%)的DES-1,按照料液比1:30,于提取温度70 °C、超声功率120 W下超声30 min,考察DES含水率对银耳多糖提取液中银耳多糖含量的影响。

采用1.2.2节的提取工艺,称取10 g银耳粉末,加入30 mL含水率20%的DES-1,按照料液比1:30,于提取温度70 °C、超声功率120 W下分别超声10、20、30、40、50 min,考察超声时间对银耳多糖提取液中银耳多糖含量的影响。

采用1.2.2节的提取工艺,称取10 g银耳粉末,加入30 mL含水率20%的DES-1,按照料液比1:30,于提取温度70 °C、不同超声功率(100、150、200、250、300 W)下超声30 min,考察超声功率对银耳多糖提取液中银耳多糖含量的影响。

采用1.2.2节的提取工艺,称取10 g银耳粉末,加入30 mL含水率20%的DES-1,按照料液比1:30,超声功率120 W下超声30 min,超声温度(40、

50、60、70、80 °C),考察超声温度对银耳多糖含量的影响。

1.3.2 正交实验

根据单因素的结果,选取料液比(g:mL, A)、DES含水率(B)、超声时间(C)和超声温度(D)为因素,设计四因素四水平的正交实验,以银耳多糖含量为指标,优化银耳多糖提取工艺。

表2 正交实验因素水平表
Table 2 Orthogonal test factor level table

水平	因素			
	料液比/ (g:mL)	DES 含水率/%	超声 时间/min	超声 温度/°C
1	1:25	15	25	55
2	1:30	20	30	60
3	1:35	25	35	65
4	1:40	30	40	70

1.4 银耳多糖活性测试

动物福利和实验程序按照相关法律和《实验动物护理和使用指南》(中国科学技术部,2020)进行。动物保护与使用委员会伦理批准(No. IRM-DWLL-2022250)。实验前,所有昆明小鼠均保持在23~25 °C、相对湿度40%~65%的特定环境,以适应环境。

1.4.1 体外降血糖活性测试

参照文献[7]方法,以阿卡波糖为阳性对照。在试管中将不同质量浓度的银耳多糖溶液(50 μ L, 0.25~4 g/L)分别与 α -葡萄糖苷酶(50 μ L, 0.25 U/mL)充分混匀,37 °C下孵育10 min;再加入PNPG(50 μ L, 5 mmol/L),37 °C下孵育20 min;最后,加入 Na_2CO_3 溶液(100 μ L, 0.2 mol/L)终止反应。采用紫外-可见分光光度计在405 nm处测定各溶液的吸光度。用蒸馏水代替银耳多糖溶液进行空白组吸光度的测定。根据式(2)计算 α -葡萄糖苷酶抑制率(%):

$$\alpha\text{-葡萄糖苷酶抑制率}/\% = (A_1 - A_2)/(A_1 - A_0) \times 100 \quad (2)$$

式中: A_0 、 A_1 、 A_2 分别为空白组、阳性对照组和样品组的吸光度。

1.4.2 体内降血糖活性测试

取60只雄性昆明小鼠,适应性饲养一周后,进行糖尿病模型的建立。具体方法为:随机取10只小鼠作对照组(NG组)。其余50只小鼠采用高糖高脂饲料(脂肪、碳水化合物、蛋白质质量分数分别为40%、42%、18%)喂养2周后,腹腔注射STZ溶液[40 mg/(kg·d),溶解于柠檬酸缓冲液,pH=4.2~4.4]连续2周。当小鼠空腹血糖(FBG) ≥ 16.7 mmol/L时,

认为糖尿病小鼠模型建造成功。

随后, 将 50 只糖尿病小鼠平均分为 5 组: 模型组 (MG, 喂养高糖高脂饲料和 1 mL/kg 柠檬酸缓冲溶液)、阳性对照组 (PG, 喂养高糖高脂饲料和 0.2 g/kg 阿卡波糖)、多糖低剂量组 (H-PG, 喂养高糖高脂饲料和 0.1 g/kg 银耳多糖)、多糖中剂量组 (M-PG, 喂养高糖高脂饲料和 0.2 g/kg 银耳多糖) 和多糖高剂量组 (L-PG, 喂养高糖高脂饲料和 0.3 g/kg 银耳多糖)。在饲养期间, 每 7 d 测定各组小鼠体重和 FBG, 并进行记录。

给药 6 周后测定各组小鼠的糖耐量: 每组小鼠禁食不禁水 12 h, 然后按照各组给药方法给药 1 h 后, 按照 2.0 g/kg 的剂量灌胃葡萄糖溶液。随后, 测定各组小鼠 20、40、60、80、100、120 min 后血糖。腹腔注射质量分数为 2% 的戊巴比妥钠进行麻醉, 眼球取血后, 脊柱脱臼处死小鼠, 并收集各组小鼠盲肠内容物进行肠道菌群研究^[8]。

1.4.3 血清胰岛素含量测定

将 1.4.2 节实验结束后的各组小鼠腹腔注射质量分数为 2% 的戊巴比妥钠进行麻醉, 各组小鼠眼球取血后, 冷冻离心 (4000 r/min, 5 min) 取上清液, 采用胰岛素 ELISA 试剂盒测定小鼠血清胰岛素 (INS) 含量。

1.4.4 氧化应激和免疫指标测定

按照 1.4.3 节的方法取小鼠活血清, 按照相关试剂盒方法测定 GSH-Px 和 SOD 酶及 MDA 含量。并采用免疫试剂盒测定各组小鼠血清中 TNF- α 、IL-6、IL-10 和 IL-12 的含量。

1.4.5 肠道菌群测定

将 1.4.2 节各组小鼠盲肠内容物收集在无菌塑料管中并立即用液氮冷冻, 并保存在 -80 °C 下, 立即送至杭州谷禾信息技术有限公司进行肠道菌群的测定^[9]。

1.5 数据处理

每组实验均进行 3 次重复, 结果均以“平均值 \pm 标准差”的形式表示。实验结果均用 SPSS 软件进行处理。

2 结果与讨论

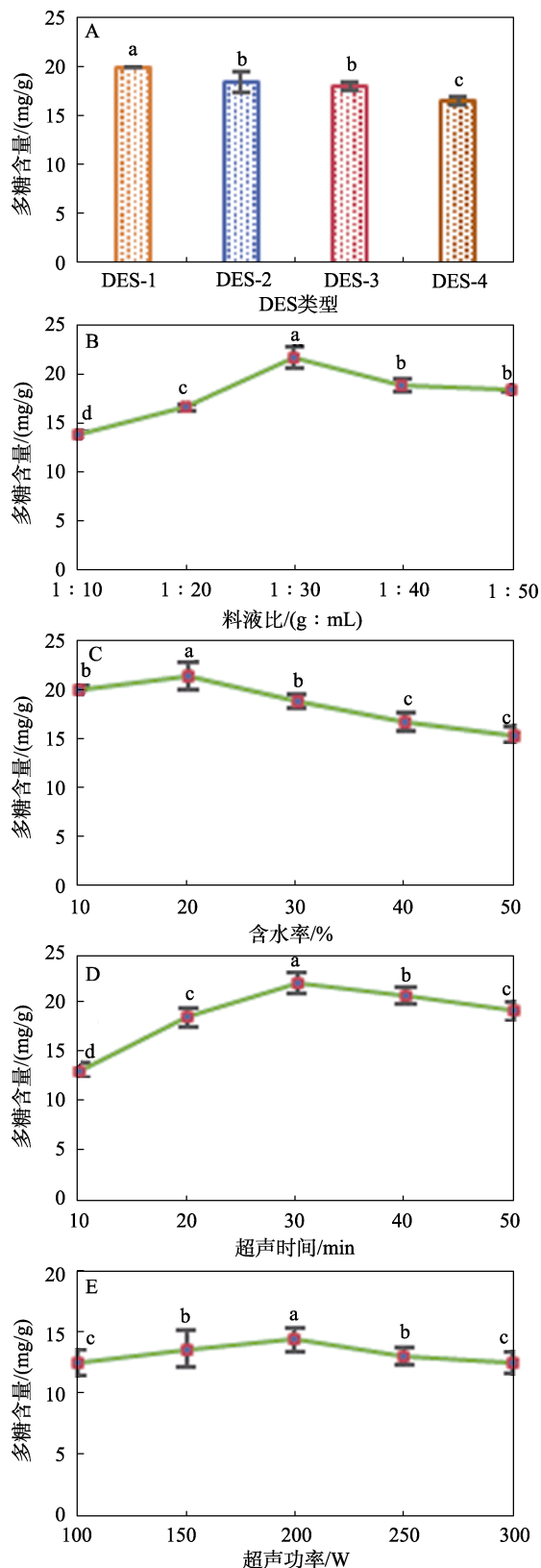
2.1 单因素实验结果

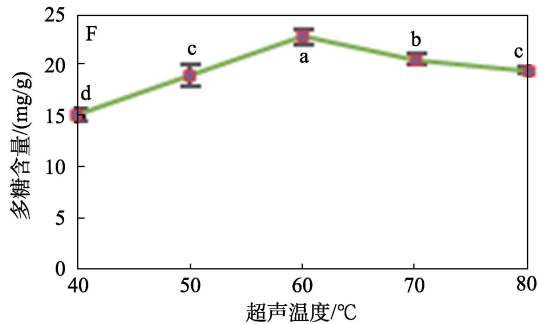
2.1.1 DES 类型的影响

图 1A 为 DES 类型对银耳多糖提取液中银耳多糖含量的影响。

从图 1A 可以看出, 以 DES-1 为提取溶剂时, 银耳多糖提取液中银耳多糖含量最高。这是因为, DES 是由 HBA 和 HBD 组合而成的混合物, 氯化

胆碱和尿素混合形成的 DES-1 会发生强的分子间氢键作用, 能破坏多糖分子之间的相互作用, 使多糖分子更容易从原料中释放出来, 从而提高含量^[10-11]。因此, 选择 DES-1 为提取溶剂进行后续实验。





A—DES 类型; B—料液比 (g : mL); C—DES 含水率; D—超声时间; E—超声功率; F—超声温度; 不同小写字母代表处理间差异显著 ($P < 0.05$), 下同

图 1 不同因素对银耳多糖含量的影响

Fig. 1 Effects of different factors on tremella polysaccharide content

2.1.2 料液比的影响

图 1B 为料液比对银耳多糖提取液中银耳多糖含量的影响。

从图 1B 可以看出, 随着料液比的增大, 银耳多糖含量呈先升高后降低的趋势, 当料液比为 1 : 30 时, 银耳多糖含量最高, 为 21.7 mg/g。这是因为, 当料液比较低时, 提取溶剂较少, 可能导致多糖分子之间的相互作用增强, 溶解不充分, 进而影响银耳多糖提取液中银耳多糖含量。随着料液比的增大, 溶剂量增加, 有利于多糖分子从固态原料中扩散到溶液中, 从而提高银耳多糖提取液中银耳多糖含量。当料液比过小时, 虽然有利于多糖的溶解和扩散, 但提取液中多糖的浓度被稀释, 导致含量下降^[12]。因此, 选择料液比为 1 : 30 进行后续实验。

2.1.3 DES 含水率的影响

图 1C 为 DES 含水率对银耳多糖提取液中银耳多糖含量的影响。

从图 1C 可以看出, 随着 DES 含水率的增加, 银耳多糖含量呈先增后减的趋势。DES 通常具有高黏度, 并且在提取过程中不能与样品充分有效接触, 影响了提取过程中目标组分的溶解, 导致提取时间过长和提取不足等问题。在 DES 中添加水可降低黏度和表面张力, 从而提高多糖提取效率^[13]。当 DES 含水率为 20% 时, 多糖含量最大, 为 21.44 mg/g。当 DES 含水率过高时, 溶液体系中出现其他亲水性混合物, 如蛋白质等, 多糖含量降低。含水率过低时, 溶液体系黏度过大, 多糖沉淀不足。因此, 选择 DES 含水率为 20% 进行后续实验^[14]。

2.1.4 超声时间的影响

图 1D 为超声时间对银耳多糖提取液中银耳多糖含量的影响。

从图 1D 可以看出, 随着超声时间的延长, 提取物中银耳多糖含量呈先增加后减小的趋势。当超

声 30 min 时, 银耳多糖含量最大。这是因为, 超声时间较短时, 银耳中的溶出物较少, 银耳多糖含量较低; 但随着时间的增加, 细胞膜破碎程度增强, 溶出物增多, 银耳多糖含量也增高。然而, 当超声时间延长到一定程度后, 银耳多糖含量呈下降趋势。这是因为, 长时间超声不仅会使银耳中其他杂质溶出, 降低银耳多糖纯度, 还可能破坏银耳多糖的糖链结构, 导致银耳多糖含量下降^[15]。因此, 较适宜的超声时间为 30 min。

2.1.5 超声功率的影响

图 1E 为超声功率对银耳多糖提取液中银耳多糖含量的影响。

从图 1E 可以看出, 随着超声功率的增加, 提取物中银耳多糖含量呈先增加后减小的趋势。当超声功率为 200 W 时, 银耳多糖含量最大。这是因为, 超声功率的增大能有效地破碎细胞壁, 促进银耳多糖的释放和溶解。同时, 超声功率的增加还能提高溶液中的传质效率, 使银耳多糖更容易从细胞内转移到溶液中。然而, 过高的超声功率会产生强烈的冲击波, 从而会破坏多糖的分子结构, 还会使溶液温度升高, 从而加速多糖的降解和转化^[16]。因此, 较适宜的超声功率为 200 W。

2.1.6 超声温度的影响

图 1F 为超声温度对银耳多糖提取液中银耳多糖含量的影响。

从图 1F 可以看出, 随着超声温度的增加, 提取物中银耳多糖含量呈先增加后减小的趋势。当超声温度为 60 °C 时, 银耳多糖含量最大, 为 22.79 mg/g。这是因为, 在较低的温度范围内, 温度的升高可增加分子的热运动, 使银耳多糖分子更容易从细胞内转移到溶液中。此外, 温度的升高还可降低溶液的黏度, 提高传质效率, 从而有利于银耳多糖的提取。然而, 当温度超过一定范围后, 过高的温度会导致多糖分子的降解和失活, 从而降低其生物活性和含量^[17]。因此, 较适宜的超声温度为 60 °C。

2.2 正交实验结果

表 3 为正交实验结果。

从表 3 可以看出, 结果中因素 A: $K_3 > K_4 > K_2 > K_1$; 因素 B: $K_1 > K_4 > K_2 > K_3$; 因素 C: $K_4 > K_3 > K_2 > K_1$; 因素 D: $K_2 > K_4 > K_3 > K_1$ 。通过极差可以看出, 所考察的因素对提取物中银耳多糖含量的影响主次依次为: $C > A > B > D$, 即超声时间 > 料液比 > DES 含水率 > 超声温度, 最后确定最佳的提取工艺为: $A_3 B_1 C_4 D_2$, 即料液比 1 : 35、DES 含水率 15%、超声时间 40 min、超声温度 60 °C、超声功率 200 W。因为最优水平不在正交实验表中, 因此进行 3 次平行验证实验来比较, 3 次银耳多糖含量分别为 24.65、24.03、

24.73 mg/g, 平均值 24.47 mg/g, 高于正交实验中的最高多糖含量 ($A_4B_1C_4D_2$ 的 23.58 mg/g)。

表 3 正交实验设计及结果
Table 3 Orthogonal test design and results

序号	因素				银耳多糖含量/ (mg/g)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	19.41
2	1	2	2	2	18.72
3	1	3	3	3	19.20
4	1	4	4	4	19.88
5	2	1	2	3	20.28
6	2	2	1	4	19.87
7	2	3	4	1	20.86
8	2	4	3	2	20.74
9	3	1	3	4	21.45
10	3	2	4	3	22.16
11	3	3	1	2	19.26
12	3	4	2	1	20.96
13	4	1	4	2	23.58
14	4	2	3	1	19.32
15	4	3	2	4	20.23
16	4	4	1	3	19.06
K_1	77.21	85.72	77.60	80.56	
K_2	81.76	80.08	80.20	83.28	
K_3	83.84	79.15	80.72	80.72	
K_4	82.19	80.64	87.48	81.44	
k_1	19.30	21.43	19.40	20.14	
k_2	20.44	20.02	20.30	20.82	
k_3	20.96	19.79	20.18	20.18	
k_4	20.55	20.16	21.87	20.36	
R	1.66	1.64	2.47	0.68	
因素主次	C>A>B>D				
最优水平	$A_3B_1C_4D_2$				

2.3 银耳多糖体外降血糖活性分析

α -葡萄糖苷酶可水解淀粉、蔗糖和麦芽糖等, 释放葡萄糖, 使机体的血糖水平升高。若在糖尿病患者体内, α -葡萄糖苷酶的酶活可异常升高, 导致血糖难以控制^[18]。图 2 为银耳多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制效果。

从图 2 可以看出, 随着银耳多糖质量浓度的升高, 对 α -葡萄糖苷酶抑制率逐渐上升, 但低于同等质量浓度下的阳性对照阿卡波糖。当银耳多糖质量浓度为 4 g/L 时, 对 α -葡萄糖苷酶的抑制率可达到 72.32%, 表明银耳多糖具有降血糖的潜力。

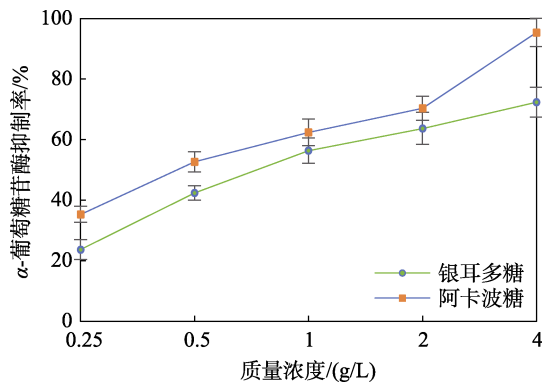


图 2 银耳多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制率
Fig.2 Inhibitory rate of tremella polysaccharide on α -glucosidase

2.4 银耳多糖体内降血糖活性分析

2.4.1 银耳多糖对小鼠体重和 FBG 的影响

图 3 为银耳多糖对小鼠体重和 FBG 的影响。

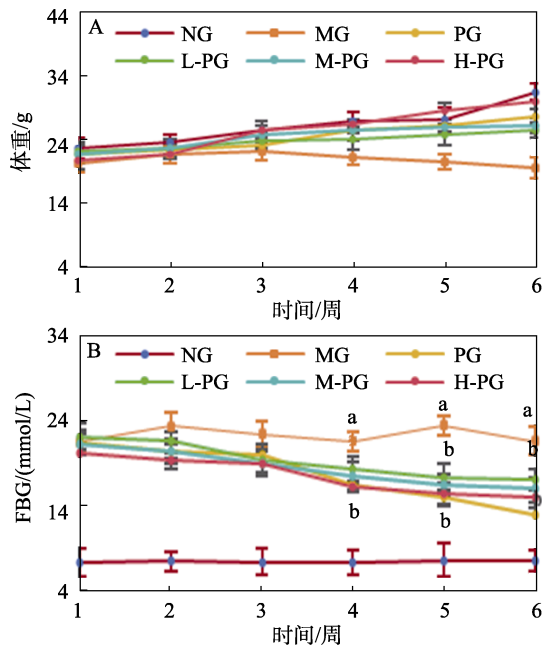


图 3 银耳多糖对小鼠体重和 FBG 的影响
Fig. 3 Effects of tremella polysaccharide on body mass and FBG in mice

从图 3A 可以看出, 在给药前 2 周, 所有组小鼠的体重比较接近。当给药 3 周后, 与 MG 组相比, 其他组小鼠的体重逐渐升高。随着给药时间继续延长, MG 组小鼠体重逐渐下降, H-PG 组与 NG 组小鼠体重逐渐接近, 并大于 PG 组小鼠体重。结果表明, 银耳多糖在一定程度上可提高糖尿病小鼠的体重。

从图 3B 可以看出, 在整个给药期间, NG 组小鼠 FBG 始终保持在 7~8 mmol/L 之间, 表明 NG 组小鼠始终处于正常水平。在给药 1 周后, 除 NG 组, 其他组小鼠 FBG 均高于 NG 组, MG 组小鼠血糖始

终处于最高水平。给药 2 周后, PG 组和样品组小鼠 FBG 都有所下降, 随着给药时间的延长至第 6 周, PG 组和样品组小鼠 FBG 与 MG 组具有显著性差异。结果表明, 银耳多糖具有抑制糖尿病小鼠血糖升高的能力。

2.4.2 银耳多糖对小鼠糖耐量的影响

图 4 为银耳多糖对小鼠糖耐量的影响。

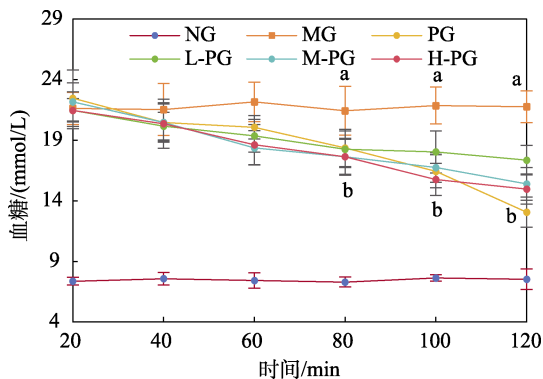


图 4 银耳多糖对小鼠糖耐量的影响

Fig. 4 Effect of tremella polysaccharide on OGTT in mice

从图 4 可以看出, 给予小鼠葡萄糖 20 min 后, 除 NG 组外, 其他组小鼠血糖显著处于较高水平。当灌胃银耳多糖 40 min 后, 样品组小鼠血糖开始下降。当灌胃银耳多糖 80~120 min 后, 测得的样品组血糖值与 MG 组小鼠血糖值之间存在显著性差异 ($P < 0.05$), 与 PG 组结果相当, 无显著性差异 ($P > 0.05$)。结果表明, 银耳多糖可增强糖尿病小鼠的葡萄糖耐受能力。

2.4.3 银耳多糖对小鼠血清胰岛素的影响

胰岛素水平的高低直接影响小鼠血糖的平衡。若长期摄入高糖食物会导致身体对胰岛素需求的增加, 从而导致胰岛素水平的升高。此外, 若身体对胰岛素的敏感性减弱, 则需要分泌更多的胰岛素来维持血糖稳定, 从而形成高胰岛素血症^[19]。图 5 为银耳多糖对小鼠血清胰岛素的影响。

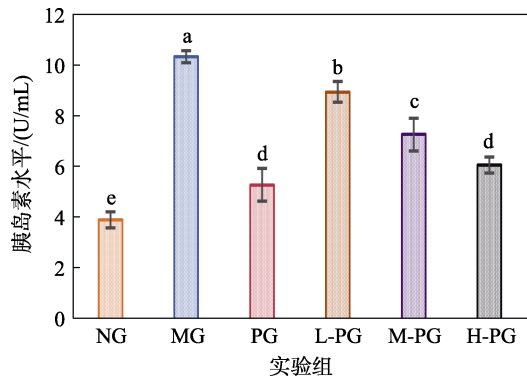


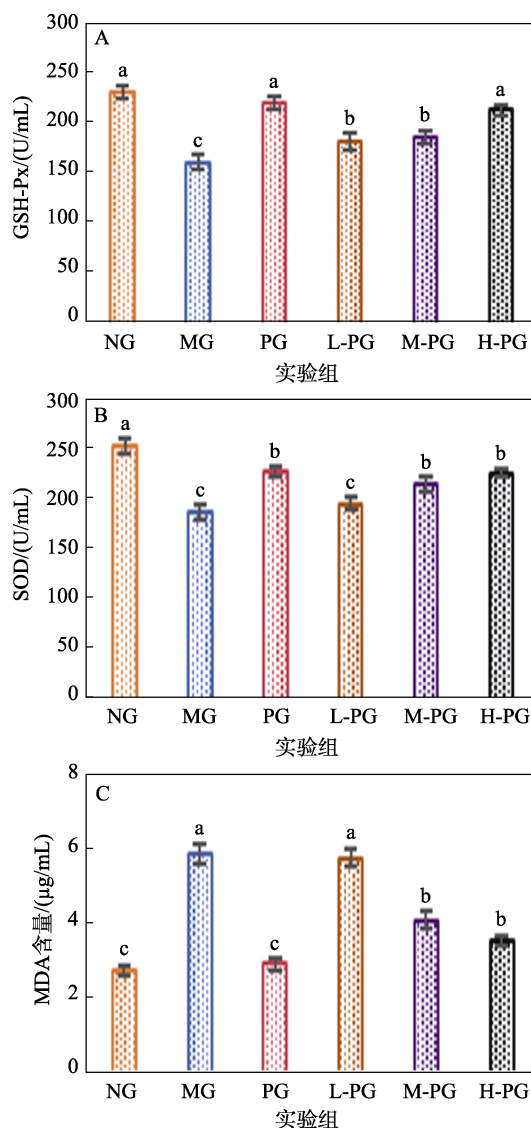
图 5 银耳多糖对小鼠血清胰岛素的影响

Fig. 5 Effect of tremella polysaccharide on serum insulin in mice

从图 5 可以看出, MG 组小鼠血清胰岛素含量最高, 且与其他组呈现显著性差异 ($P < 0.05$), 表明 MG 组小鼠血糖过高, 需要更多的胰岛素维持血糖平衡。在样品组中, 随着银耳多糖剂量的增加, 小鼠血清胰岛素水平逐渐下降, 呈现一定的剂量依赖效应。H-PG 组小鼠血清胰岛素水平 (6.15 U/mL) 比 MG 组 (10.46 U/mL) 降低了 41.2%。且 H-PG 组与 PG 组小鼠血清胰岛素水平之间无显著性差异 ($P > 0.05$), 表明银耳多糖具有维持胰岛素水平、降低糖尿病小鼠血糖的能力。

2.4.4 对小鼠氧化应激的影响

图 6 为银耳多糖对小鼠氧化应激的影响。



A—GSH-Px 酶活; B—SOD 酶活; C—MDA 含量

图 6 银耳多糖对小鼠氧化应激的影响

Fig. 6 Effects of tremella polysaccharide on oxidative stress in mice

从图 6A 和 B 可以看出, MG 组 GSH-Px 和 SOD 的酶活最低, 呈现显著性差异 ($P < 0.05$)。当用银耳

多糖干预后, L-PG、M-PG 和 H-PG 组的 GSH-Px 和 SOD 的酶活逐渐升高, 且随着多糖剂量的增大而升高, 具有剂量依赖效应。同时, H-PG 组小鼠的 GSH-Px 和 SOD 的酶活与 PG 组之间不存在显著性差异 ($P>0.05$), 且与 MG 组相比, 分别提高了 31.83% 和 20.72%。

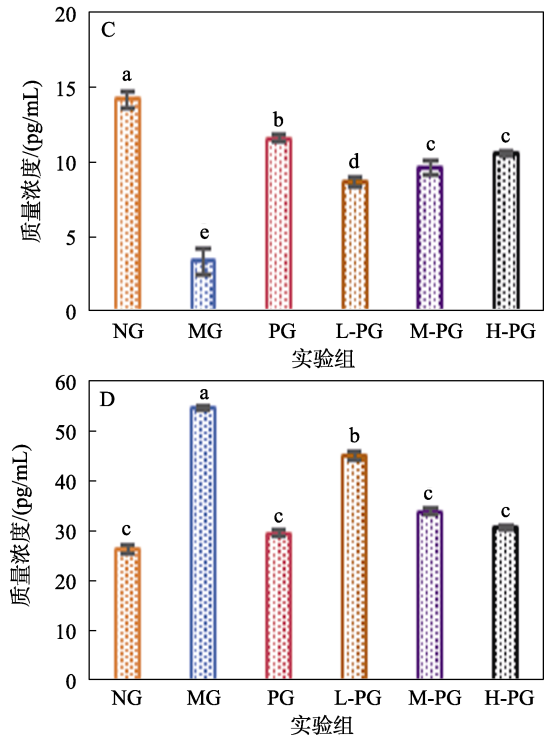
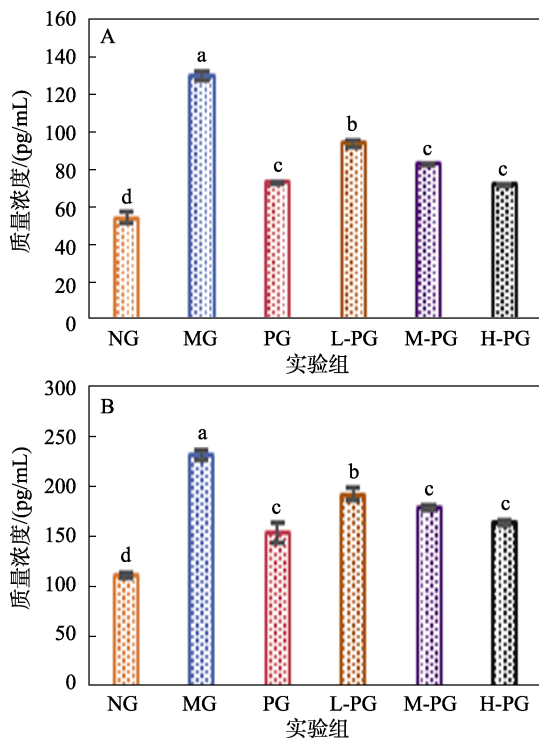
从图 6C 可以看出, MG 组小鼠 MDA 含量最高, 虽然与 L-PG 组不存在显著性差异 ($P>0.05$), 但与 M-PG 和 H-PG 组存在显著性差异 ($P<0.05$)。同时随着多糖剂量的升高, L-PG、M-PG 和 H-PG 组的 MDA 含量逐渐下降, 具有一定的剂量依赖效应。与 MG 组相比, H-PG 组小鼠 MDA 含量降低了 39.48%。

以上结果表明, 银耳多糖可减少糖尿病引起的氧化应激。

2.4.5 对小鼠免疫指标的影响

炎症是机体对于损伤、感染等刺激的一种正常反应, 但过度的炎症反应可能导致疾病的发生和恶化。在糖尿病小鼠体内, 多种促炎因子被激活且分泌量增加, 如 TNF- α 、IL-12 和 IL-6 等。这些炎症因子可通过多种途径影响糖尿病的病理进程, 如促进胰岛 β 细胞的凋亡、干扰胰岛素信号传导等^[8]; 而抗炎因子被抑制且减少分泌, 如 IL-10。图 7 为银耳多糖对小鼠免疫指标的影响。

从图 7 可以看出, 与 NG 组小鼠相比, MG 组小鼠血清中 TNF- α 、IL-6 和 IL-12 质量浓度分别升高了 135.17%、103.25% 和 107.63% ($P<0.05$), IL-10 水平降低了 75.77% ($P<0.05$)。



A—TNF- α ; B—IL-6; C—IL-10; D—IL-12

图 7 银耳多糖对小鼠免疫指标的影响

Fig. 7 Effects of tremella polysaccharide on immunity index in mice

H-PG 组与 MG 组相比, TNF- α 、IL-6 和 IL-12 质量浓度分别下降了 43.87%, 28.75% 和 44.05%, 而 IL-10 水平上升了 208.79%。同时, M-PG 组、H-PG 组与 PG 组小鼠之间无显著性差异 ($P>0.05$)。结果表明, 银耳多糖可缓解糖尿病引起的炎症反应。

2.4.6 对小鼠肠道菌群的影响

图 8 为小鼠盲肠内容物高通量测序分析^[20-21]结果。

从图 8A 可以看出, 3 组小鼠的 OTUs 聚类划分可以得到 1247 个 OTUs, PG 组、MG 组和 H-PG 组分别有 153、39 和 95 个特有的 OTUs, 表明 3 组小鼠肠道菌群差异性较大。

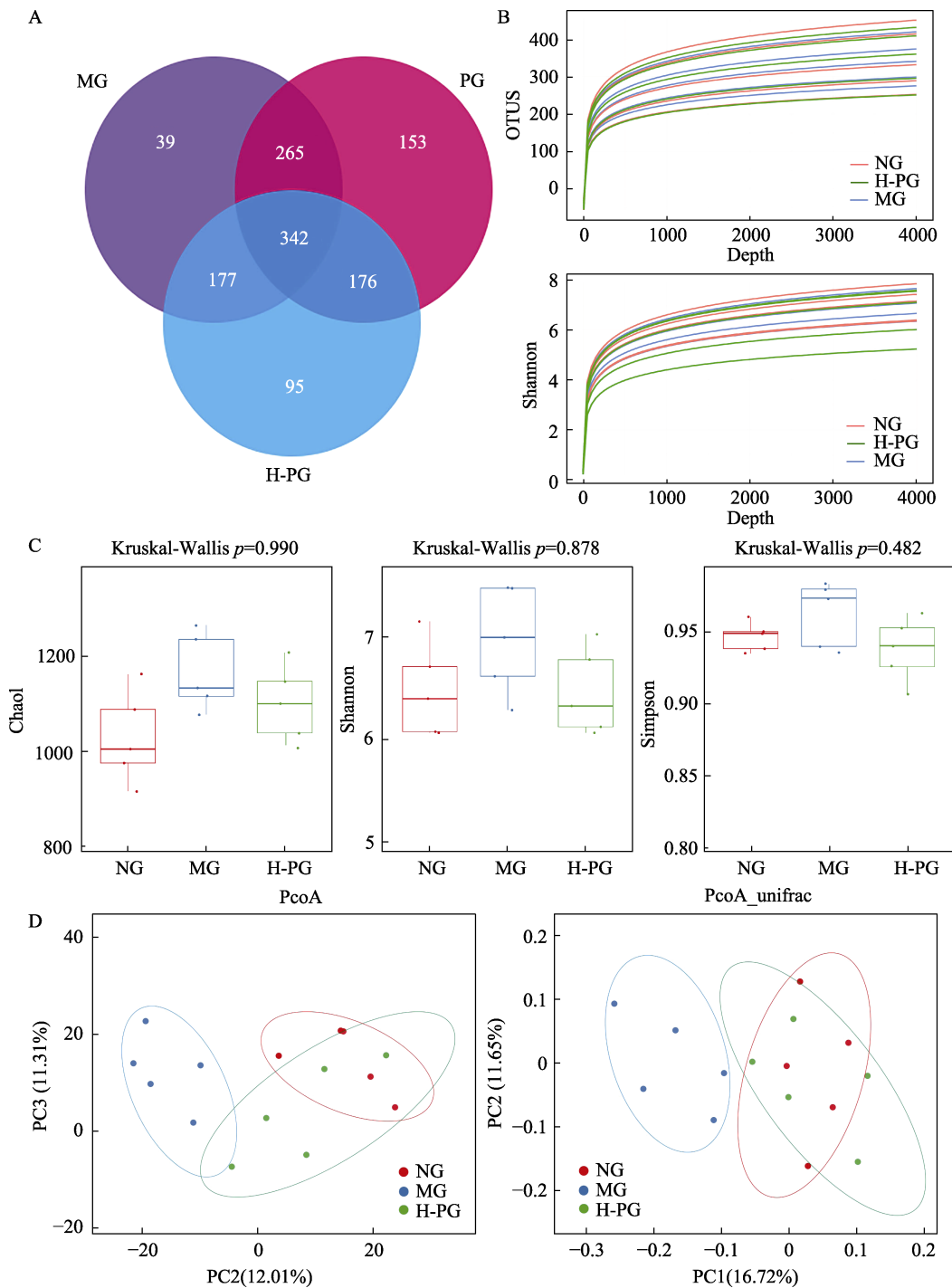
从图 8B 可以看出, OTUS 和 Shannon 曲线最终趋势较为平坦, 表明测序深度已经基本覆盖到样品中所有的物种, 且测序数据量足够大, 可反映样品中绝大多数的微生物物种信息, 可进行后续实验^[22]。

从图 8C 可以看出, MG 组中 Chao1、Shannon 和 Simpson 指数最大, 表明注射 STZ 打破了小鼠肠道菌群丰度和稳态。H-PG 组和 NG 组 Chao1、Shannon 和 Simpson 指数较为接近, 表明银耳多糖在一定程度上恢复了糖尿病小鼠肠道菌群的丰度和多样性^[23-24]。

从图 8D 可以看出, 在主坐标分析 (PcoA) 方面, PC1 和 PC2 分别占菌群总体差异的 16.72% 和 11.65%,

MG 组小鼠肠道菌群与 NG 组和 H-PG 组的分布相差较大, 且 NG 组和 H-PG 组的分布较为接近^[25]。主成分分析 (PCA) 结果表明, PC2 和 PC3 分别占菌群总

体差异的 12.01%和 11.31%, 且 NG 组和 H-PG 组的分布距离较为接近, 表明经银耳多糖治疗后恢复了糖尿病小鼠肠道菌群的平衡。



A—维恩图; B—OTUS 和 Shannon 曲线; C— α 多样性分析; D— β 多样性分析

图 8 小鼠盲肠内容物高通量测序分析结果

Fig. 8 Results of high-throughput sequencing of cecum contents in mice

综上所述, 银耳多糖可改善糖尿病小鼠肠道菌群紊乱, 恢复肠道菌群平衡。

图 9 为小鼠肠道菌群门和属水平的组成分析。

从图 9A 可以看出, 在门水平上, 相对于 MG 组, 银耳多糖加入后的 H-PG 组增加了有益菌脱铁杆菌门

(*Deferribacterota*)、疣孢菌门 (*Verruconicrobia*)、放线菌门 (*Actinobacteria*)、拟杆菌门 (*Bacteroidetes*) 和厚壁菌门 (*Firmicutes*) 的丰度, 降低了有害菌弯曲菌门 (*Campilobacterota*) 和变形菌门 (*Proteobacteria*) 的丰度。有研究表明, 脱铁杆菌

门 (*Deferribacterota*) 可参与人体内的某些生化反应, 从而维持人体的生态平衡^[26]; 疣孢菌门 (*Verruconicrobia*) 参与体内营养物质的代谢及免疫调节, 从而维持人体健康^[27]; 放线菌门 (*Actinobacteria*) 能够产生乳酸等发酵产物, 从而提高肠道免疫力^[28]; 拟杆菌门 (*Bacteroidetes*) 辅助降解难以消化的碳水化合物, 产生短链脂肪酸, 维持宿主健康^[29]; 厚壁菌门 (*Firmicutes*) 可辅助维持肠道菌群的平衡, 促进肠道通透性正常化, 这对于机体预防肠道疾病、维持肠道健康至关重要^[30]。

从图 9B 可以看出, 在属水平上, 相对于 MG 组, 银耳多糖干预后, 增加了乳球菌属 (*Lactococcus*)、链球菌属 (*Streptococcus*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、阿德勒克氏菌属 (*Adlercreutzia*) 的丰度, 降低了毛螺菌属 (*Lachnospiraceae*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*)、双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*)、普雷沃氏菌属 (*Prevotella*) 和别样棒菌属 (*Allobaculum*) 的丰度。

综上所述, 银耳多糖可增加有益菌相对丰度, 降低有害菌相对丰度, 改善 STZ 引起的糖尿病小鼠肠道菌群失衡。

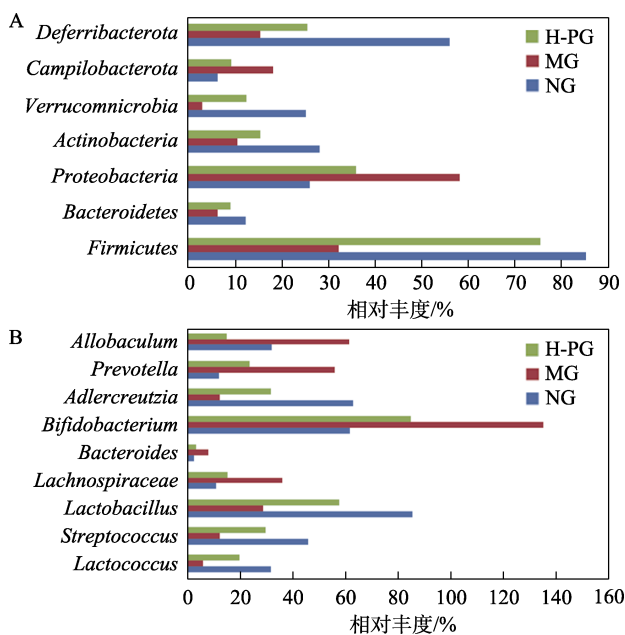


图 9 小鼠肠道菌群门和属水平的组成分析
Fig. 9 Analysis of intestinal flora composition at phylum and genus level in mice

3 结论

采用超声辅助 DES 提取银耳多糖, 通过单因素实验和正交实验优化了提取工艺, 评估了银耳多糖体内外降血糖活性及对肠道菌群的影响, 结论如下:

(1) 以 *n*(氯化胆碱):*n*(尿素)混合形成的 DES-1 为提取溶剂, 在料液比 1:35、DES-1 含水率 15%、

超声时间 40 min、超声温度 60 °C、超声功率 200 W 的优化提取条件下, 银耳多糖提取液中银耳多糖含量为 24.47 mg/g。

(2) 银耳多糖能显著降低糖尿病小鼠的血糖、氧化应激和炎症反应, 提高了小鼠的体重、糖耐量和胰岛素敏感性, 改善小鼠的糖代谢状态。

(3) 银耳多糖能显著增加小鼠肠道中有益菌的数量, 同时降低有害菌的相对丰度, 有助于改善小鼠的肠道环境, 提高肠道健康水平。

本文为银耳多糖在糖尿病治疗中的应用提供了理论依据和实验支持, 具有潜在的临床应用价值。

参考文献:

- [1] LI H, LI Z, PENG L, *et al.* Lycium barbarum polysaccharide protects human keratinocytes against UVB-induced photo-damage[J]. Free Radical Research, 2017, 51(2): 200-210.
- [2] CHEN G (陈岗). Functional characteristics and application of *Tremella polysaccharides*[J]. China Food Additives (中国食品添加剂), 2011(4): 144-148.
- [3] YAO A N (姚安妮), TANG Y (汤燕), LUO D Y (罗大英), *et al.* Analysis and prospect of the correlation between relative molecular weight of polysaccharides and their efficacy in medicinal plant resources[J]. China Journal of Chinese Materia Medica (中国中药杂志), 2024, 49(5): 1186-1195.
- [4] CHEN Y (陈宇), ZHENG Y K (郑彦楷), LI D B (李大彪), *et al.* Effects of plant polysaccharides on endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis, inflammation and oxidative damage of animal cells and their mechanisms[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition (动物营养学报), 2023, 35(12): 7641-7647.
- [5] JIANG X M (姜秀梅), XU X L (徐小磊), YANG C (杨聪), *et al.* Effects of *Flammulina velutifolia* polysaccharide on learning and memory ability of D-galactose aged mice[J]. Journal of Beihua University (Natural Science) (北华大学学报: 自然科学版), 2017, 18(5): 603-605.
- [6] XU X F (徐晓飞), ZHAO M Y (赵明月), ZHONG X W (钟兴伟), *et al.* Ameliorating effect of collagen peptide complex *Tremella polysaccharide* on D-galactose induced aging mice[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology (中国食品学报), 2022, 22(10): 134-142.
- [7] YUAN M Y (原梦瑶), KANG S H (康淑荷), CUI L J (崔璐娟), *et al.* Optimization of ultrasonic extraction process for polysaccharides from *Radix Hedysari* and their antioxidant, whitening, moisture absorption and moisturizing activities[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2025, 42(3): 577-586.
- [8] KONG Y (孔阳), YAN H (闫辉), WANG C Z (王昌利), *et al.* Studies on the hypoglycemic activity and substance basis of *Hovenia acerba* lindl pulp and seed *in vitro* and *in vivo*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology (中国食品学报), 2023, 23(12): 87-96.
- [9] ZENG W Y (曾雯玉), XIAO L (肖乐), LIU J Y (刘峻源), *et al.* Regulation mechanism of glycyrrhiza polysaccharides on intestinal damage and intestinal flora in enterotoxigenic *Escherichia coli*-induced weaning diarrhea piglets[J]. Chinese Journal of Veterinary Science (中国兽医学报), 2024, 44(4): 740-747, 833.
- [10] WU Y H (巫永华), WANG X Y (王解语), HUANG L L (黄莉莉), *et al.* Optimization of ultrasonic-assisted deep eutectic solvent extraction process, biological activities and components of burdock polyphenols[J]. Science and Technology of Food Industry (食品工业科技), 2023, 44(21): 171-179.
- [11] HE J M (何金铭), WANG Z H (汪子皓), LI Y X (李奕萱), *et al.* Optimization process of polysaccharides from *crataegus pinnatifida* by deep eutectic and ultrasonic wave[J/OL]. Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine (辽宁中医药大学学报), 2024, 1-9 [2024-04-29]. <https://link.cnki.net/urlid/21.1543.R.20240428>.

- 1754.004.
- [12] WANG R P (王润平), LI Y P (李彦萍), LU X B (路小彬), *et al.* Ultrasonic-assisted extraction optimization and dialysis purification of polysaccharides from *Eucommia ulmoides* leaf and corresponding antioxidant activity[J/OL]. *Feed Industry (饲料工业)*, 2024, 1-11 [2024-04-30]. <https://link.cnki.net/urlid/21.1169.S.20240430.0907.002>.
- [13] AMESHO K T, CHENG P C, CHANG K L, *et al.* Microwave-assisted deep eutectic solvents/dimethyl sulfoxide system for efficient valorization of sugar bagasse waste into platform chemicals: Abi refinery approach for circular bioeconomy[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 363: 127969.
- [14] HE X Y (何仙玉), LI R J (李榕基), LI X Y (李小艳), *et al.* *Ganoderma lucidum* polysaccharides extraction by choline chloride/lactic acid/guaiacol ternary deep eutectic solvent and its antioxidant activities[J]. *Science and Technology of Food Industry (食品工业科技)*, 2024, 45(14): 34-41.
- [15] KANG Q (康桥), SUN Y (孙越), LIU M Y (刘梦瑶), *et al.* Optimization of the ultrasonic-assisted extraction process of polysaccharides from the peels of wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn. Var. *Abbraviata* Ser.) and a preliminary study on their antioxidant and hypoglycemic activities[J]. *Science and Technology of Food Industry (食品工业科技)*, 2024, 45(21): 164-173.
- [16] LIU G M (刘根梅), GU C T (古翠婷), MAI H Q (麦汉铨), *et al.* Process optimization and antioxidant activity study of polysaccharide from *Dendrobium officinale* by ultrasonic and enzyme-assisted extraction[J]. *The Food Industry (食品工业)*, 2024, 45(4): 108-113.
- [17] HE N W (何念武), DONG Y S (董玉珊), ZHU S Y (朱姝俣). A study on optimization of extraction process and antioxidant and antibacteria activity of polysaccharides from *Forsythia suspensa*[J]. *Journal of Shangluo University (商洛学院学报)*, 2024, 38(2): 59-65.
- [18] DUANMU C Y (端木传宇), SUN Y (孙洋), ZHANG Y (张瑜), *et al.* Optimization of enzymatic extraction and *in vitro* hypoglycemic activity of blackberry polysaccharides[J/OL]. *Science and Technology of Food Industry (食品工业科技)*, 2024, 45(22): 200-207.
- [19] FANG J Y (方静宇), XIE H L (谢华凌), FENG S M (冯思敏), *et al.* Research progress on the influencing factors and mechanism of *Dendrobium* polysaccharide in ameliorating diabetic symptoms[J]. *Food and Fermentation Industries (食品与发酵工业)*, 2021, 47(3): 237-244.
- [20] SU L, MAO C, WANG X, *et al.* The anti-colitis effect of *Schisandra chinensis* polysaccharide is associated with the regulation of the composition and metabolism of gut microbiota[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2020, 10: 519479
- [21] WEI D N, XIE L S, ZHUANG Z Q, *et al.* Gut microbiota: A new strategy to study the mechanism of electroacupuncture and moxibustion in treating ulcerative colitis[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019(1): 1-16.
- [22] LIU C, DU P, CHENG Y L, *et al.* Study on fecal fermentation characteristics of aloe polysaccharides *in vitro* and their predictive modeling[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 256: 117571.
- [23] ZHANG F F, XIAO Y, PAN L, *et al.* Effects of polysaccharides from *Lyophyllum decastes* (Fr.) Singer on gut microbiota *via in vitro* simulated digestion and fermentation[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1083917.
- [24] REN Y L, SUN Q G, GAO R N, *et al.* Low weight polysaccharide of *Hericium erinaceus* ameliorates colitis *via* inhibiting the NLRP3 inflammasome activation in association with gut microbiota modulation[J]. *Nutrients*, 2023, 15(3): 739.
- [25] PAROLISI S, MONTANARI C, BORGHI E, *et al.* Possible role of tryptophan metabolism along the microbiota-gut-brain axis on cognitive & behavioral aspects in Phenylketonuria[J]. *Pharmacological Research*, 2023, 197: 106952.
- [26] HASHIZUME K, TSUKAHARA T, YAMADA K, *et al.* *Megasphaera elsdenii* JCM1772^T normalizes hyperlactate production in the large intestine of fructooligosaccharide-fed rats by stimulating butyrate production[J]. *The Journal of Nutrition*, 2003, 133(10): 3187-3190.
- [27] XU S Y, AWEYA J J, LI N, *et al.* Microbial catabolism of *Porphyra haitanensis* polysaccharides by human gut microbiota[J]. *Food Chemistry*, 2019, 289: 177-186.
- [28] CORTES-RIOS J, ZARATE A M, FIGUEROA J D, *et al.* Protein quantification by bicinchoninic acid (BCA) assay follows complex kinetics and can be performed at short incubation times[J]. *Analytical Biochemistry*, 2020, 608: 113904.
- [29] WU D T, FU Y, GUO H, *et al.* *In vitro* simulated digestion and fecal fermentation of polysaccharides from loquat leaves: Dynamic changes in physicochemical properties and impacts on human gut microbiota[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 168: 733-742.
- [30] REN Y L, SUN Q G, GAO R N, *et al.* Low weight polysaccharide of *Hericium erinaceus* ameliorates colitis *via* inhibiting the NLRP3 inflammasome activation in association with gut microbiota modulation[J]. *Nutrients*, 2023, 15(3): 739.

(上接第 1278 页)

- [20] CAREY N L, MYERS J J. Blast testing of three types of panels with external strengthening systems[C]//*Dynamic Behavior of Materials*, 2013, 1: 417-424.
- [21] GRUJICIC M, SNIPES J S, RAMASWAMI S, *et al.* Coarse-grained molecular-level analysis of polyurea properties and shock-mitigation potential[J]. *Journal of Materials Engineering and Performance*, 2013, 22: 1964-1981.
- [22] HUANG W B (黄微波), SONG Y L (宋奕龙), MA M L (马明亮), *et al.* Research progress on blast mitigation and shock resistance performance of spray polyurea elastomer[J]. *Engineering Plastics Application (工程塑料应用)*, 2019, 47(1): 148-153.
- [23] PENG X C, WU Y F, WEI Z M. Research progress on the surface modification of carbon fiber[J]. *RSC Advances*, 2024, 14(6): 4043-4064.
- [24] FENG P F, MA L C, WU G S, *et al.* Establishment of multistage gradient modulus intermediate layer between fiber and matrix *via* designing double "rigid-flexible" structure to improve interfacial and mechanical properties of carbon fiber/resin composites[J]. *Composites Science and Technology*, 2020, 200: 108336.
- [25] WANG S J (王淑娟). Research on fabrication and properties of carbon fiber reinforced epoxy composite[D]. Changchun: Jilin University (吉林大学), 2013.
- [26] RANI M, CHOUDHARY P, KRISHNAN V, *et al.* A review on recycling and reuse methods for carbon fiber/glass fiber composites waste from wind turbine blades[J]. *Composites Part B: Engineering*, 2021, 215: 108768.
- [27] XING L Y (邢丽英), FENG Z H (冯志海), BAO J W (包建文), *et al.* Facing opportunity and challenge of carbon fiber and polymer matrix composites industry development[J]. *Acta Materiae Compositae Sinica (复合材料学报)*, 2020, 37(11): 2700-2706.
- [28] PAIVA M C, BERNARDO C A, NARDIN M. Mechanical, surface and interfacial characterisation of pitch and PAN-based carbon fibres[J]. *Carbon*, 2000, 38(9): 1323-1337.
- [29] PARK S J, KIM B J. Roles of acidic functional groups of carbon fiber surfaces in enhancing interfacial adhesion behavior[J]. *Materials Science and Engineering: A*, 2005, 408(1/2): 269-273.
- [30] JIN L (金琳). Effect of surface modification on interfacial properties of carbon fiber/epoxy composites[D]. Changchun: Changchun University of Technology (长春工业大学), 2020.
- [31] SUN Y D (孙亚东), ZHOU Y (周芸), WANG T Y (汪天尧), *et al.* Preparation process, compression and energy absorption properties of steel foams[J]. *Materials Science and Technology (材料科学与工艺)*, 2019, 27(5): 44-51.
- [32] ZANG X W (臧小为). Design and compilation of the data processing program of hopkinson pressure bar[J]. *Instrument Standardization & Metrology (仪器仪表标准化与计量)*, 2018(5): 45-48.