

# 黄芪药渣发酵产物富硒酵母对免疫低下糖尿病大鼠的影响

刘必旺, 许凯霞\*, 郭羽, 王一捷, 李敏, 解冬

(山西中医学院, 太原 030024)

**[摘要]** **目的:**研究黄芪药渣发酵产物富硒(Se)酵母对免疫低下糖尿病大鼠的影响。**方法:**80只SD大鼠,10只留为正常对照组,70只ip链脉佐菌素 $55\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 1次,环磷酰胺 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 3次,造免疫低下糖尿病模型动物,造模成功的动物随机分成5组(每组10只):免疫低下糖尿病模型组、盐酸二甲双胍片 $0.1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 阳性对照组、酵母溶液 $0.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组、黄芪提取液 $5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组、富Se酵母 $0.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组。各组固定饲料,自由饮水。分别给予相应药物ig,持续给药4周;每周称重。给药4周后,腹主动脉取血,分离血清,测定空腹血糖(FBG)、血常规[红细胞(RBC)、血红蛋白(HB)、白细胞(WBC)]、免疫球蛋白(IgG)、白介素-2(IL-2)、胰岛素(INS)水平,并进行胰腺组织形态学观察及胰岛素样生长因子(IGF)的检测。**结果:**模型组FBG与正常组FBG比较有显著性差异( $P < 0.01$ ),模型组INS, WBC, IgG, IL-2与正常组相应指标比较有统计学差异( $P < 0.05$ );富Se酵母组FBG, INS, WBC, IgG, IL-2与模型组相应指标比较有统计学差异( $P < 0.05$ )。富Se酵母组与模型对照组比较其他各项指标也有所改善。**结论:**富Se酵母可以降低FBG和提高INS水平,同时可提高WBC, IgG, IL-2等免疫指标,富Se酵母可使免疫力低下糖尿病模型动物血糖降低,免疫力增强。采用发酵的技术从中药水煎液后的药渣中提取微量元素是一个药材深入开发使用的良好途径。

**[关键词]** 富Se酵母; 糖尿病; 免疫低下; 黄芪; 药渣

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)06-0136-04

**[doi]** 10.11653/syfy2014060136

## Effect of Selenium Yeast (*Astragalus membranaceus* Fermentation Product) on Diabetes Rat with Immune-suppression

LIU Bi-wang, XU Kai-xia\*, GUO Yu, WANG Yi-jie, LI Ming, XIE Dong  
(College of Shanxi Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study effect of selenium (Se) yeast (*Astragalus membranaceus* fermentation product) on diabetes rats with immune-suppression. **Method:** Eighty SD rats, 10 to the normal control group, 70 rats to establish experimental immune-suppression and diabetic rat model and watch Se yeast on the effects of streptozotocin diabetes and cyclophosphamide immunocompromised rat. The successful model of the animal were randomly divided into 5 groups ( $n = 10$  each group): diabetic model with immune-suppression group, oxytetracycline tablets control group ( $0.1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), yeast solution group ( $0.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), *A. membranaceus* extract group ( $5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), Se yeast group ( $0.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Each group fixed feed, free drinking water. Four weeks after the last to give the corresponding drug, abdominal aortic blood, separation of serum, fasting blood glucose (FBG), blood [red blood cell (RBC), hemoglobin (HB), white blood cell (WBC)], immunoglobulin (IgG), interleukin-2 (IL-2), insulin (INS) level, and pancreatic histological observation and insulin like growth factor (IGF) were detected. **Result:** In the model group, FBG were significant difference to normal group FBG ( $P <$

**[收稿日期]** 20130704(001)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81102553);国家“十二五”科技支撑项目(2011BA107B01;2013BA105B08);山西省科技攻关项目(20110313001-2);山西省特色重点学科中医学

**[第一作者]** 刘必旺, 硕士, 讲师, 从事中药制剂及药理学研究, E-mail: LBW3084@sina.com

**[通讯作者]** \* 许凯霞, 博士, 副教授, 从事药理学研究, E-mail: xukaixia@163.com

0.01), model group INS, WBC, IgG, IL-2 were statistically significant difference to normal group corresponding index ( $P < 0.05$ ). Se yeast group FBG, INS, WBC, IgG, IL-2 have statistical difference to the corresponding index in the model group ( $P < 0.05$ ). Se yeast group with compared other indicators have also improved with the model group. **Conclusion:** Se yeast can reduce FBG and increase the level of INS, also can enhance the WBC, IgG, IL-2 and other immune parameters, Se yeast can make the immunity of animal models of diabetes mellitus reduce blood sugar, enhance immunity. Extracted from the dregs of decoction of trace elements is a good way to use the development of a drug by fermentation technology.

[**Key words**] selenium yeast; diabetes; immune-suppressin; *Astragalus membranaceum*; fermentations

硒(selenium, Se)是人体必需的微量元素之一,是谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的重要活性成分<sup>[1]</sup>。Se缺乏时机体对氧化损伤的敏感性增加,Se对胰岛的氧化损伤有一定的保护作用<sup>[2]</sup>。Se的胰岛素样作用也逐渐得到证实<sup>[3]</sup>。医学也证明,免疫力低下多是缺硒、锌引起的,Se几乎存在于所有免疫器官中,并能刺激免疫球蛋白及抗体的产生,从而增强机体的抗病能力。如果缺少了Se,人体的免疫力会大大降低<sup>[4-5]</sup>。笔者前期研究发现山西省浑源县、应县、繁峙县地区产的黄芪Se含量是其他产区的4~5倍,且黄芪水提取液中Se含量较少,大部分残留在药渣中<sup>[6]</sup>。笔者对黄芪水煎液的药渣进行酵母发酵,对其发酵液进行处理,制得了富Se酵母。本文就是探讨黄芪药渣发酵产物富Se酵母对免疫低下糖尿病大鼠模型的影响。

## 1 材料

**1.1 药物及试剂** 黄芪药材采集于山西省浑源县官儿乡蔡庄村,经山西省药检所药师鉴定为蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao。血糖测定试纸、白介素-2(IL-2)试剂盒(批号20120119)、免疫球蛋白(IgG)试剂盒(批号20111128)、胰岛素(INS)ELISA法试剂盒(批号20120904)均购自于北京北化康泰临床试剂有限公司。链脲佐菌素(streptozotocin, STZ,美国Sigma公司生产,批号expl2/2012),盐酸二甲双胍片(Oxytetracycline Tablets,北京利龄恒泰药业有限公司生产,批号201103),干酵母(安琪酵母股份有限公司生产,批号201204)。注射用环磷酰胺(上海普德药业有限公司生产,批号20120723)。

**1.2 动物** 清洁级SD大鼠,8周龄,体重100~150g,雌雄各半,购自北京康蓝生物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2012-0013。

**1.3 仪器** TM“舒泰”血糖仪(美国雅培公司),粉碎机(HX-200A型),电子天平(型号TH),Almpus全自动生化分析仪(日本)。KT-6180全自动血细胞

分析仪(上海维进康医用电子有限公司)。

## 1.4 药物的制备

**1.4.1 黄芪提取液** 称取黄芪500g,分别加5000mL,2500mL自来水煎煮2次,每次约45min,合并两次滤液,浓缩至500mL,质量浓度为原药材约 $1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

**1.4.2 富Se酵母的制备** 将黄芪水提取后的药渣,加入干酵母20g,蛋白胨25g,营养琼脂45g,无机盐5~6g,由经液体深层发酵后,7d后用自来水对黄芪发酵产物进行提取,特殊方法处理萃取参与发酵的酵母菌,萃取物高温灭菌并干燥,得到富Se酵母,使用AFS-2202a型双道原子荧光光度计测定,Se含量为 $0.138\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。自制富Se酵母中的Se含量明显高于干酵母中Se含量( $0.011\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ),也高于黄芪中的Se含量( $0.033\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )<sup>[6]</sup>。实验前以蒸馏水配成富Se酵母悬液, $0.1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 备用。

**1.4.3 酵母溶液** 称取干酵母20g,加200mL自来水,搅拌均匀,质量浓度为 $0.1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

## 2 方法

**2.1 动物分组及给药** 大鼠80只,自由饮食饮水,自然光照。适应性饲养1周后,其中10只作为正常对照组,其余用于造模。造模动物禁食12h后,以链脲佐菌素(用前以 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬酸盐缓冲液,冰浴新鲜配制,pH4.5, $55\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 1次性ip,连续3d注射用生理盐水配制的环磷酰胺( $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )。稳定3d后尾静脉取血测定血糖,以血糖 $>11.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 者为造模成功的动物。造模成功大鼠随机分为5组(每组10只):免疫低下糖尿病模型组、盐酸二甲双胍片阳性对照组、酵母溶液组、黄芪提取液组、富Se酵母组。各组固定饲料,自由饮水。盐酸二甲双胍片组按 $0.1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ,酵母溶液组按 $0.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 、黄芪提取液组按 $5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 、富Se酵母组按 $0.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 分别ig给予相应药物,持续给药4周;每周称重。各组动物末次给药后,禁食不禁水,腹主动脉取血,分离血

清,备用。并留取胰腺组织,4%多聚甲醛固定后进行形态学观察及胰岛素样生长因子(IGF)的检测。<sup>[7-9]</sup>

### 2.2 观察指标

**2.2.1 一般观察** 记录动物的一般状态、体重、摄食量和饮水量。

**2.2.2 空腹血糖(FBG)** 治疗前后大鼠断尾取血,用血糖仪检测大鼠的FBG。

**2.2.3 红细胞(RBC)、血红蛋白(HB)、白细胞(WBC)测定** 用全自动血液分析仪测定。

**2.2.4 血清IgG,IL-2,INS测定** 按试剂盒说明书测定。

**2.2.5 大鼠胰腺形态学观察** 所有大鼠胰腺组织固定后送至山西中医学院组织学教研室进行常规石蜡包埋、切片、HE染色,光镜下观察形态学改变情况及胰岛素样生长因子(IGF)的检测。

**2.3 数据统计处理** 数据分析采用SPSS 17.0统计软件单因素方差分析,以LSD方法进行多重比较。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 一般观察** 正常组大鼠精神状态良好,皮毛光滑,活动量大,垫料干燥摄食水正常,毛色亮泽,体重明显增加;模型组大鼠出现明显的多饮、多食、多尿、

多汗、毛色枯萎以及发育迟缓、体质量未增加甚至下降;与模型组大鼠比较,各给药组大鼠毛色枯萎表现较轻、垫料较干燥、体重有所增加;正常组大鼠无死亡,模型组死亡率达到50%。

**3.2 对FBG及动物死亡率的影响** 实验4周后,模型组FBG显著高于正常对照组,阳性对照组、黄芪提取液组和富Se酵母组对免疫低下糖尿病大鼠FBG的均有影响,阳性对照组与模型组相比有非常显著性差异( $P < 0.01$ );黄芪提取液组和富Se酵母组与模型组相比有显著性差异( $P < 0.05$ ),见表1。

**3.3 对血常规指标的影响** 模型对照组白细胞(WBC)显著减少,与正常对照组比较有显著性差异( $P < 0.05$ );盐酸二甲双胍片组与模型对照组比较无显著性差异;黄芪提取液组、富Se酵母组与模型对照组比较有显著性差异( $P < 0.05$ ),见表1。

**3.4 对血清中IgG,IL-2,INS的影响** 模型对照组IgG,IL-2,INS显著减少,与正常对照组比较有显著性差异( $P < 0.05$ );黄芪提取液组、富Se酵母组与模型对照组比较有显著性差异( $P < 0.05$ );盐酸二甲双胍片组与模型对照组比较IgG,IL-2无显著性差异血清INS含量有有显著性差异( $P < 0.01$ )。黄芪提取液组与富Se酵母组比较无显著性差异。见表2。

表1 富Se酵母对免疫低下糖尿病大鼠给药前后FBG,血常规及动物死亡率的影响( $\bar{x} \pm s$ )

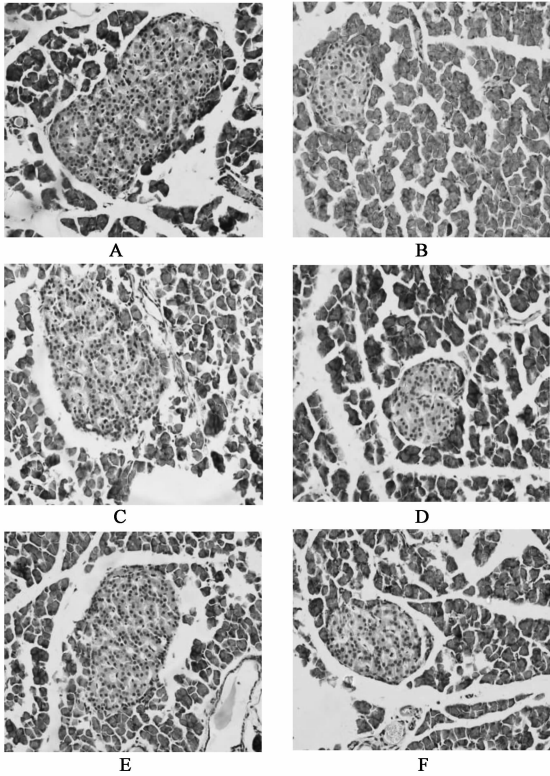
组别	n	剂量 /g·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	FBG/mmol·L <sup>-1</sup>		RBC /10 <sup>12</sup> /L	HB /g·L <sup>-1</sup>	WBC /10 <sup>9</sup> /L	给药后死亡率 /%
			给药前	给药后				
正常对照	10	0	3.7 ± 0.21	3.8 ± 0.33	8.00 ± 0.74	160 ± 15	5.6 ± 0.7	0
模型	5	0	16.5 ± 1.87 <sup>2)</sup>	15.7 ± 1.47 <sup>2)</sup>	6.42 ± 1.33	112 ± 46	2.9 ± 1.4 <sup>1)</sup>	50
盐酸二甲双胍	9	0.1	16.3 ± 1.64 <sup>2)</sup>	6.2 ± 1.53 <sup>4)</sup>	6.95 ± 1.15	124 ± 27	3.3 ± 0.9	10
酵母溶液	6	0.5	17.6 ± 1.54 <sup>2)</sup>	16.2 ± 1.31	8.29 ± 1.54	138 ± 39	3.0 ± 1.1	40
黄芪提取液	9	5	17.0 ± 1.67 <sup>2)</sup>	10.1 ± 1.20 <sup>3)</sup>	8.56 ± 1.21	157 ± 42	5.5 ± 1.3 <sup>3)</sup>	10
富Se酵母	8	0.5	16.9 ± 1.48 <sup>2)</sup>	12.6 ± 1.66 <sup>3)</sup>	9.21 ± 1.34	163 ± 43	6.3 ± 2.3 <sup>3)</sup>	20

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组相比<sup>3)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup> $P < 0.01$ (表2~3同)。

表2 富Se酵母对免疫低下糖尿病大鼠IgG,IL-2,INS的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	剂量 /g·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	IgG /μg·L <sup>-1</sup>	IL-2 /pg·L <sup>-1</sup>	INS /μg·L <sup>-1</sup>
模型	5	0	2.12 ± 0.33 <sup>1)</sup>	82.72 ± 39.36 <sup>1)</sup>	1.26 ± 0.65 <sup>1)</sup>
盐酸二甲双胍	10	0.1	2.07 ± 0.41	92.93 ± 34.66	3.09 ± 0.44 <sup>4)</sup>
酵母溶液	6	0.5	3.29 ± 0.54	93.35 ± 37.13	1.37 ± 0.81
黄芪提取液	9	5	6.56 ± 0.21 <sup>3)</sup>	136.76 ± 44.33 <sup>3)</sup>	2.56 ± 0.66 <sup>3)</sup>
富Se酵母	9	0.5	7.01 ± 0.24 <sup>3)</sup>	130.46 ± 48.16 <sup>3)</sup>	2.01 ± 0.73 <sup>3)</sup>

**3.5 对大鼠胰腺的影响** 正常组大鼠胰腺组织免疫组化染色结果显示,细胞浆未见 IGF 阳性表达,部分区域存在微弱表达。模型组大鼠 IGF 阳性表达显著增强。IGF 阳性表达程度与模型组比较,各给药组有明显缓解;各给药组之间 IGF 表达程度无明显差异,见图 1。



A. 正常对照组;B. 免疫低下糖尿病模型组;C. 盐酸二甲双胍片  $0.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  组;D. 酵母溶液  $0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  组;E. 黄芪提取液  $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  组;F. 富 Se 酵母  $0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  组

图 1 各组大鼠胰腺的组织形态学变化 (HE,  $\times 200$ )

## 4 讨论

糖尿病是常见内分泌紊乱疾病,临床上时有出现糖尿病气虚证的患者,气虚证患者临床体现的就是免疫力低下<sup>[10]</sup>。本研究参考国内外文献中有关免疫力低下和糖尿病的大鼠模型<sup>[7-8]</sup>,使用复合的方式制作了免疫力低下糖尿病大鼠模型。国内外孤立研究黄芪和 Se 降血糖和提高免疫力水平的文献非常多,本论文从微量元素 Se 入手,在前期黄芪研究的基础上,从黄芪水提取液后的药渣中经酵母发酵自得富 Se 酵母,使用免疫力低下糖尿病大鼠模型综合考察富 Se 酵母的降血糖、提高免疫力功效非常

具有必要性和可行性。研究显示,富 Se 酵母可以降低 FBG 和提高 INS 水平,同时可提高 WBC, IgG, IL-2 等免疫指标,达到了预期的目的。说明富 Se 酵母其可以使免疫力低下糖尿病模型动物血糖降低,免疫力增强。富 Se 酵母与黄芪提取液在降血糖、提高免疫力功效程度方面的比较还需要继续研究。本研究结果也说明,从微量元素的角度出发,采用发酵技术从中药水煎液后的药渣中提取微量元素是一个药材深入开发使用的良好途径。

## [参考文献]

- [1] 方敏. 甲壳低聚糖硒对 2 型糖尿病大鼠胰岛素指标及胰腺组织的影响[J]. 中国生化药物杂志, 2012, 33(5):615.
- [2] Semir Ozdemir, Murat Ayaz, Belgin Can, et al. Effect of selenite treatment on ultrastructural changes in experimental diabetic rat bones [J]. Biol Trace Elem Res, 2005, 107(2):167.
- [3] 杨雪飞. 微量元素硒与糖尿病的相关性研究进展[J]. 国外医学:医学地理分册, 2013, 34(1):23.
- [4] Mingguang Tan, Liqin Sheng, Yine Qian, et al. Changes of serum selenium in pregnant women with gestational diabetes mellitus [J]. Biol Trace Elem Res, 2001, 83(3):231.
- [5] 查火兵. 亚硒酸钠对糖尿病肾病大鼠肾脏保护作用机制研究[D]. 重庆医科大学, 2009.
- [6] 刘必旺, 李艳彦, 房树标等. AFS-2202a 型双道原子荧光光度计测定道地黄芪中的 Se[J]. 世界中西医结合杂志, 2009, 4(2):98.
- [7] Metin Kilinc, Melih A Guven, Muhsin Ezer, et al. Evaluation of Serum selenium levels in turkish women with gestational diabetes mellitus, glucose intolerants, and normal controls [J]. Biol Trace Elem Res, 2008, 123(1/3):35.
- [8] 孙焕, 陈广, 陆付耳, 等. 介绍几种诱发性糖尿病动物模型[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(2):65.
- [9] 蒋长兴, 蒋顶云, 熊清平, 等. 鸡内金多糖对糖尿病高脂血症大鼠血脂、血糖及细胞免疫功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(20):255.
- [10] 徐天娇, 刘勇, 袁秉祥, 等. 胰岛素与硒联合作用对糖尿病大鼠糖脂代谢及骨骼肌 GLUT4 表达的影响[J]. 西安交通大学学报:医学版, 2011, 32(4):417.

[责任编辑 聂淑琴]