

黔产粗毛淫羊藿与黔岭淫羊藿总黄酮 对2型糖尿病小鼠IR相关因子的影响

卢启振¹, 张静², 王悦云^{1*}, 黄聪¹, 邓炜¹

(1. 贵阳中医学院, 贵阳 550002; 2. 徐州市钟吾卫校 药理教研室, 江苏 徐州 221400)

[摘要] 目的:研究黔产粗毛淫羊藿与黔岭淫羊藿中总黄酮(TFE)对四氧嘧啶(ALX)诱发2型糖尿病模型小鼠胰岛素抵抗(IR)相关因子的影响。方法:雄性小鼠100只,随机取10只为正常组,喂养基础饲料;其余的采用高脂饲料喂养小鼠6周,单次ip 2% ALX(200 mg·kg⁻¹),建立2型糖尿病小鼠模型。将糖尿病模型小鼠随机分为6组,每组10只,分别为模型组,二甲双胍(150 mg·kg⁻¹)组,两种TFE分别按剂量100,50 mg·kg⁻¹分组,ig给药14 d。于末次给药后取血,检测小鼠血清胰岛素(FINS)、C肽水平;检测小鼠空腹血糖(FBG),注射胰岛素(Ins)40 min后血糖(BG);计算胰岛素耐量(ITT),胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)和胰腺指数;观察小鼠胰腺形态学改变。结果:与正常组比较,模型组小鼠血糖升高非常显著($P < 0.01$),空腹血清中C肽,FINS有明显增加($P < 0.05$),胰腺组织损伤极为严重($P < 0.01$),胰腺指数降低非常显著($P < 0.01$)。与模型组相比,两种淫羊藿TFE均能够较明显地改善模型小鼠ITT($P < 0.05$),降低模型小鼠血清C肽、FINS含量及HOMA-IR($P < 0.05$),提高模型小鼠的胰腺指数($P < 0.05$),明显地修复模型小鼠的胰腺组织损伤($P < 0.05$)。两种TFE同剂量组相比,以粗毛淫羊藿TFE作用较为显著($P < 0.05, P < 0.01$)。结论:两种黔产淫羊藿TFE对ALX诱生的2型糖尿病模型小鼠能增加胰岛素敏感性,较明显地改善模型小鼠胰岛素抵抗相关因子,保护受损的胰腺组织。以粗毛淫羊藿TFE作用较为明显,这可能与粗毛淫羊藿TFE中淫羊藿苷(ICA)含量高有较大关系。

[关键词] 粗毛淫羊藿; 黔岭淫羊藿; 淫羊藿总黄酮; 四氧嘧啶; 2型糖尿病; 胰岛素抵抗

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)03-0096-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015030096

Effects of Total Flavonoe of *Epimedium* of Two Species in Guizhou on IR-related Factors in Type 2 Diabetes

LU Qi-zhen¹, ZHANG Jing², WANG Yue-yun^{1*}, HUANG Cong¹, DENG Wei¹ (1. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China; 2. Dept of Pharmacology, Xuzhou Zhongwu Wealth School, Xuzhou 221400, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of total flavonoe of *Epimedium* (TFE) from *Epimedium acuminatum* and *E. leptorrhizum* grown in Guizhou on insulin resistance (IR)-related factors in mice induced by alloxan (ALX). **Method:** Hundred male mice were divided into normal group and model group. The mice in model group were fed with high-fat diet for 6 weeks, then single intraperitoneal injection of 2% ALX solution (200 mg·kg⁻¹) was made to establish type 2 diabetes models. The modeling mice were randomly divided into 6 groups with 10 in each group, including metformin group (150 mg·kg⁻¹), *E. acuminatum* TFE group (100, 50 mg·kg⁻¹), *E. leptorrhizum* TFE group (100, 50 mg·kg⁻¹), respectively, once a day for 14 days. After 14 days, the animals were fasted for 12 hours, and killed. Then the level of serum insulin (FINS) and C peptide was determined. The blood sugar (FBG) and BG after injection of ins 40 min were detected. Insulin tolerance (ITT), insulin resistance index (HOMA-IR) and pancreatic index were calculated. HE staining was used to observe the morphologic changes of pancreas in mice. **Result:** Compared with the normal group, blood sugar of the model group increased significantly ($P < 0.01$), C-peptide and FINS significantly increased ($P < 0.05$), pancreatic

[收稿日期] 20140804(014)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81360624);贵州省中药现代化项目(黔科合ZY字[2013]3007号);贵州省科技厅和贵阳中医学院联合资金项目(黔科合中药字(2010)LKZ7026号);贵州省中医药管理局中药民族药科研项目(QZYY2010-004)

[第一作者] 卢启振,在读硕士,从事中药药效物质基础研究,Tel:18785122704,E-mail:1218917384@qq.com

[通讯作者] *王悦云,副教授,从事中药资源与药效物质研究,Tel:0851-5924317,E-mail:yueyun_wang@126.com

tissue injury was serious ($P < 0.01$), the pancreas index decreased significantly ($P < 0.01$). Compared with model group, two TFE from *E. acuminatum* all obviously improved ITT ($P < 0.05$), pancreatic index ($P < 0.05$), reduced C-peptide, FINS and HOMA-IR ($P < 0.05$) and obviously alleviated pancreatic tissue injury ($P < 0.05$) in mice induced by ALX. TFE from *E. acuminatum* had more obvious effect ($P < 0.05$, $P < 0.01$).

Conclusion: Two kinds of TFE from *E. acuminatum* have certain effect on the type 2 diabetes mice induced by ALX, and can increase insulin sensitivity, improve IR-related factors on the type 2 diabetes mice, and have a good protective effect on the pancreatic tissue injured. Especially, TFE from *E. acuminatum* has obvious effect. Epimedium's active ingredient on diabetes may has a greater relationship with icariin.

[**Key words**] *Epimedium acuminatum*; *Epimedium leptorrhizum*; total flavonoe of *Epimedium*; alloxan; type 2 diabetes; insulin resistance

黔产粗毛淫羊藿、黔岭淫羊藿为《贵州省中药材、民族药材质量标准》(2003 年版) 记载品种^[1], 产量较大, 是黔地药厂淫羊藿生产原料及饮片配方的品种主要来源。研究发现, 黔产淫羊藿总黄酮(TFE) 中淫羊藿苷(ICA) 含量相差甚远, 粗毛淫羊藿中 ICA 含量较高, 达到甚至超过了《中国药典》(2010 年版) 标准(0.5%), 而黔岭淫羊藿中 ICA 含量较低(小于 0.1%)^[2-3]。本课题组的前期研究发现, 两种 TFE 对动物抗骨质疏松、抗衰老、增强学习记忆、调节免疫功能等方面均有效, 但疗效存在差异^[4-7]。本研究通过观察两种淫羊藿总黄酮(TFE) 对四氧嘧啶(ALX) 诱生型糖尿病模型小鼠的影响, 评价两种淫羊藿对糖尿病的药用价值。

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠, 雄性, 体重(26 ± 4) g, 清洁级, 由重庆实验动物中心提供, 动物合格证号 SCXK(渝)2007-0006。

1.2 药物 淫羊藿药材分别采自贵州贵阳市乌当区, 贵阳市军区后山, 经贵阳中医学院何顺志教授鉴定为粗毛淫羊藿 *Epimedium acuminatum*, 黔岭淫羊藿 *E. leptorrhizum*。照文献[8]方法提取, 两种淫羊藿总黄酮提取物得率分别为 3.43% 和 2.74%; 经 UV 法测定其 TFE 含量(以 ICA 计) 分别为 38.4% 和 11.4%; 分别用生理盐水稀释后供实验用药。盐酸二甲双胍片(贵州天安药业股份有限公司, 批号 20110702)。

1.3 试剂 四氧嘧啶(alloxan, ALX, 美国 Sigma 公司, 批号 20110629), 小鼠胰岛素酶联免疫分析试剂盒(批号 DRE30417), 小鼠 C 肽酶联免疫分析试剂盒(批号 DRE30413), 均为美国 RD 公司进口分装, 普通胰岛素注射液(万邦医药生产, 批号 1202215), 40% 甲醛溶液(重庆茂业化学试剂有限公司, 批号 20100524)。

1.4 仪器 GBC10E 型紫外-可见分光光度计(澳大利亚照生有限公司), LD4-2 型低速离心机(北京医用离心机厂), EIx808IU 型自动酶标读数仪(美国 Bio Tek 公司), ACCU-CHEK Active 型血糖仪(德国罗氏诊断有限公司)。

2 方法

2.1 造模及分组给药 雄性小鼠 100 只, 随机取 10 只为正常组, 喂养基础饲料; 其余的给予足量高脂饲料喂养, 自由摄食饮水, 连续 6 周。第 42 天以 200 mg·kg⁻¹ 剂量 1 次性 ip 2% ALX 溶液, 正常组 ip 等容积生理盐水。72 h 后禁食 8 h, 测定小鼠空腹血糖(FBG), 将 FBG ≥ 11.0 mmol·L⁻¹ 的小鼠确定为 II 型糖尿病模型小鼠^[9]。将筛选合格的糖尿病模型小鼠随机分为 6 组, 每组 10 只, 分别为模型组, 阳性药组(二甲双胍 150 mg·kg⁻¹), 简称阳性药组, 粗毛淫羊藿 TFE 高剂量组(100 mg·kg⁻¹), 粗毛淫羊藿 TFE 低剂量组(50 mg·kg⁻¹), 黔岭淫羊藿 TFE 高剂量组(100 mg·kg⁻¹), 黔岭淫羊藿 TFE 低剂量组(50 mg·kg⁻¹)。各给药组每天 ig 给药 1 次, 模型组和空白组每天 ig 等容积生理盐水, 连续给药 14 d。

2.2 对 2 型糖尿病模型小鼠胰岛素耐量(ITT) 的影响 给药 14 d 后, 禁食 12 h 后进行 ITT 实验^[10], 首先尾静脉取血测定小鼠 FBG(0 min); 然后皮下注射胰岛素 0.4 U·kg⁻¹, 40 min 后, 再次尾静脉取血测定血糖, 计算各组 40 min 内血糖下降幅度。

2.3 对 2 型糖尿病模型小鼠血清 C 肽与血清胰岛素(FINS) 的影响 给药 14 d 后, 禁食 12 h, 摘眼球取血, 离心取血清。用酶联免疫法分别测定血清 C 肽、FINS; 计算其胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)^[11]。

2.4 对 2 型糖尿病模型小鼠胰腺指数的影响 给药 14 d 后, 摘取各组小鼠胰腺, PBS 漂洗后, 吸干水分并分别称重, 计算各组小鼠的胰腺指数。

2.5 对 2 型糖尿病模型小鼠的胰腺形态学影响 给

药 14 d 后,取各组小鼠胰腺组织,用 4% 甲醛溶液固定、脱水、包埋、切片、HE 染色,400 倍光镜下观察。以胰腺组织腺泡细胞的变性坏死,炎症细胞浸润,间质水肿,血管反应,纤维增生为评价指标,对胰腺组织损伤程度进行评分(胰腺损伤评分标准:将上述病变组织块占 30% 以下 1 分,占 30% ~ 50% 2 分,占 50% 以上 3 分,累加即胰腺损伤的评分)^[10,12]。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件包统计,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对 2 型糖尿病模型小鼠 ITT 的影响 与正常组比较,模型及各给药组小鼠注射胰岛素前血糖水平均很高,注射胰岛素 40 min 后,仅模型组小鼠血糖高居不下,提示模型小鼠对胰岛素不敏感;而各给药组小鼠血糖迅速下降,差异显著($P < 0.05$)。见表 1。

3.2 对 2 型糖尿病模型小鼠血清 C 肽, FINS, HOMA-IR 的影响 模型组小鼠空腹血清中 C 肽, FINS 与正常组比较有明显增加($P < 0.05$);与模型组相比,各给药组血清 C 肽, FINS 含量均显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),粗毛淫羊藿 TFE 组降低 FINS 含量尤为显

表 2 两种淫羊藿 TFE 对 2 型糖尿病模型小鼠血清 C 肽、FINS 与 HOMA-IR 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ | C 肽/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ | FINS/ $\text{mU} \cdot \text{L}^{-1}$ | HOMA-IR |
|-----------|--------------------------------------|--|---------------------------------------|-----------------------------|
| 正常 | - | 4.37 ± 0.20 ¹⁾ | 3.15 ± 1.41 ¹⁾ | 1.02 ± 0.09 ²⁾ |
| 模型 | - | 4.53 ± 0.04 | 4.41 ± 0.03 | 3.65 ± 1.57 |
| 二甲双胍 | 150 | 3.41 ± 0.09 ²⁾ | 3.08 ± 0.02 ²⁾ | 2.25 ± 0.88 ²⁾ |
| 粗毛淫羊藿 TFE | 100 | 3.42 ± 0.09 ²⁾ | 3.06 ± 0.04 ^{2,3)} | 1.61 ± 0.96 ^{2,4)} |
| | 50 | 3.45 ± 0.07 ²⁾ | 3.23 ± 0.44 ^{1,5)} | 2.61 ± 1.30 ^{1,5)} |
| 黔岭淫羊藿 TFE | 100 | 3.49 ± 0.04 ¹⁾ | 3.34 ± 0.16 ¹⁾ | 3.19 ± 0.86 |
| | 50 | 4.51 ± 0.06 | 4.38 ± 0.04 | 3.84 ± 1.31 |

3.3 对 2 型糖尿病模型小鼠胰腺病理损伤修复的影响 与正常组比较,模型组胰腺组织出现较多腺泡萎缩,空泡变性坏死和间质血管充血,评分达到 7.78 分,损伤极为严重,胰腺指数降低非常显著($P < 0.01$)。与模型组相比较各给药组病理损伤显著减轻,评分降低,腺泡细胞变性坏死数量减少,间质充血水肿减轻,胰腺指数明显提高($P < 0.01$),尤以粗毛淫羊藿高剂量组作用最为明显。见图 1,表 3。

4 讨论

长期高脂高糖高热量饮食,可使动物胰岛 β 细胞过度分泌负荷过重而衰竭,并且造成伴随胰岛素抵抗的高脂、高血糖、肥胖等代谢紊乱状态。长期高血脂,

表 1 两种淫羊藿 TFE 对 2 型糖尿病模型小鼠 ITT 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of two species TFE on type 2 diabetic mice's ITT ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ | 血糖/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ | | 下降幅度/% |
|-----------|--------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|--------|
| | | 0 min | 40 min | |
| 正常 | - | 5.54 ± 2.87 ¹⁾ | 2.58 ± 1.70 ²⁾ | 53.43 |
| 模型 | - | 14.99 ± 6.46 | 15.34 ± 7.12 | -0.02 |
| 二甲双胍 | 150 | 12.70 ± 5.75 | 7.01 ± 3.05 ²⁾ | 44.80 |
| 粗毛淫羊藿 TFE | 100 | 12.45 ± 5.58 ³⁾ | 7.46 ± 3.62 ^{1,3)} | 40.08 |
| | 50 | 14.99 ± 6.95 | 7.15 ± 3.72 ^{1,5)} | 52.30 |
| 黔岭淫羊藿 TFE | 100 | 16.13 ± 7.58 | 9.19 ± 5.57 ¹⁾ | 43.03 |
| | 50 | 14.94 ± 6.52 | 7.71 ± 4.31 ¹⁾ | 48.39 |

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与黔岭淫羊藿 TFE 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与黔岭淫羊藿 TFE 50 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组比较⁵⁾ $P < 0.05$,⁶⁾ $P < 0.01$ (表 2 ~ 3 同)。

著($P < 0.01$),而两种 TFE 对 C 肽影响组间无差异。糖尿病模型小鼠 HOMA-IR 显著上升($P < 0.01$);与模型组相比,各给药组 HOMA-IR 均呈现程度不等的降低趋势,其中粗毛淫羊藿高剂量组 HOMA-IR 降低尤其明显($P < 0.01$),表明明显量效依赖关系。见表 2。

可抑制 β 细胞对葡萄糖刺激后的胰岛素分泌,引起胰岛素敏感性降低和糖耐量异常。本研究采用高脂饲料喂养小鼠,在 ALX 诱导作用下 FBG 明显增高。

IR 是指机体外周组织对胰岛素的敏感性和反应性降低,机体须代偿性的分泌胰岛素来满足代谢需求。胰岛素长期超负荷分泌,势必造成胰岛 β 细胞衰竭。IR 患者除了 FBG 升高,往往还表现有 FINS 增加,血清 C 肽含量增加,HOMA-IR 升高等。FINS 和 C 肽均由胰岛分泌,均可反映胰岛功能,其中 C 肽又不受外源性胰岛素的影响,因此血中 C 肽浓度能更好地反映胰岛 β 细胞合成和分泌胰岛素的功能。本研究揭示黔产两种淫羊藿 TFE 在降低血清 C 肽, FINS 和 HOMA-IR 方面,均有作用,以粗毛

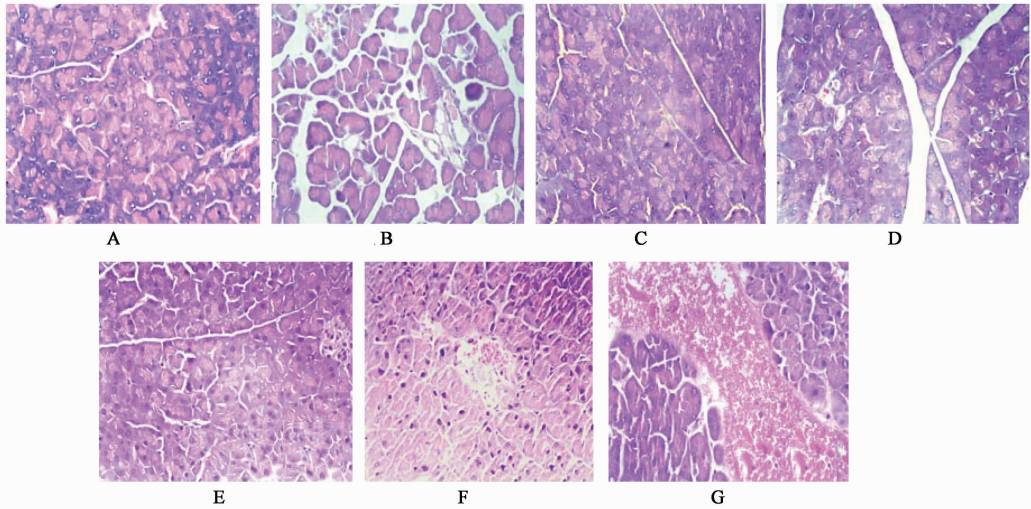


图 1 两种淫羊藿 TFE 对 2 型糖尿病模型小鼠胰腺组织形态学的影响 (HE, ×400)

Fig. 1 Effects of two species TFE on type 2 diabetes mouse model of pancreatic tissue morphology (HE, ×400)

表 3 两种淫羊藿 TFE 对 2 型糖尿病模型小鼠胰腺病理损伤评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effects of two species TFE on type 2 diabetic mice pancreatic pathology injury score ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量 /mg·kg ⁻¹ | 病理损伤 评分/分 | 胰腺指数 /mg·g ⁻¹ |
|-----------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 正常 | - | - | 0.64 ± 0.12 ²⁾ |
| 模型 | - | 7.78 ± 0.39 | 0.28 ± 0.14 |
| 二甲双胍 | 150 | 3.06 ± 0.40 ²⁾ | 0.56 ± 0.11 ²⁾ |
| 粗毛淫羊藿 TFE | 100 | 3.72 ± 0.41 ^{2,3)} | 0.61 ± 0.11 ²⁾ |
| | 50 | 5.07 ± 0.42 ²⁾ | 0.58 ± 0.15 ²⁾ |
| 黔岭淫羊藿 TFE | 100 | 5.83 ± 0.39 ²⁾ | 0.53 ± 0.15 ²⁾ |
| | 50 | 5.40 ± 0.38 ²⁾ | 0.43 ± 0.17 ¹⁾ |

型小鼠的胰岛素抵抗现象为好。病理切片结果与生化指标检测结果一致,亦显示两种淫羊藿 TFE 对 ALX 损伤的胰腺组织的修复作用明显,仍以粗毛淫羊藿 TFE 组,改善修复小鼠胰腺组织变性坏死、血管充血水肿、减轻炎症细胞浸润和保护胰腺组织作用明显。本研究表明黔产淫羊藿 TFE 能够有效地改善 ALX 诱生的 2 型糖尿病小鼠胰岛素抵抗相关指标,尤其以粗毛淫羊藿作用明显,这可能与粗毛淫羊藿 TFE 中 ICA 含量高有较大关系。

[参考文献]

[1] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准[S]. 贵阳:贵州科技出版社,2003:350-351.
[2] 徐文芬,何顺志,黄敏,等. 高效液相色谱法测定贵州产淫羊藿药材不同药用部位中淫羊藿苷的含量[J].

中国实验方剂学杂志,2007,13(5):1-3.
[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:307-308.
[4] 邓炜,郑民强,黄勇其. 黔产 2 种淫羊藿抗小鼠骨质疏松药效对比研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(7):939-941.
[5] 邓炜,郑民强,张静,等. 2 种黔产淫羊藿总黄酮对免疫功能影响的比较研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(4):511-513.
[6] 郑民强,邓炜,黄聪,等. 两种黔产淫羊藿总黄酮对小鼠学习记忆的对比研究[J]. 中药研究与信息,2011,(2):45-48.
[7] 邓炜,郑民强,张静,等. 两种黔产淫羊藿总黄酮对痴呆大鼠学习记忆的影响[J]. 中国药理学通报,2011,27(6):868-871.
[8] 张妙玲,巢峰敬,马麟. 淫羊藿叶总黄酮提取工艺研究[J]. 福建中医学院学报,2009,19(6):30-31.
[9] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2001:1517-1519.
[10] 田爱平,邹晨辉,孙素娟,等. 千金黄连丸加味方对胰岛素抵抗小鼠胰腺的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2009,29(3):242-245.
[11] 王春怡,陈艳芬,李卫民,等. 黄芪葛根汤对糖尿病及胰岛素抵抗小鼠血糖的影响[J]. 时珍国医国药,2011,22(11):2731-2732.
[12] 徐灵源,黎荣,梁韬,等. 葛根总黄酮逆转链脲佐菌素诱导糖尿病小鼠胰腺损伤的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(8):231-234.

[责任编辑 聂淑琴]