

## 知母盐制前后化学成分含量及改善2型糖尿病小鼠 胰岛素抵抗作用的差异分析

郑威, 闫丽, 高慧\*

(辽宁中医药大学药学院, 国家中医药管理局炮制原理解析重点实验室,  
辽宁省中药炮制工程技术研究中心, 辽宁大连 116600)

**[摘要]** 目的:通过比较知母盐制前后化学成分的含量变化,以及对2型糖尿病KKAy小鼠胰岛素抵抗的影响,探讨知母盐制后降糖作用增强的炮制原理。方法:采用超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS)测定生知母、盐知母中7种知母皂苷及芒果苷的含量,色谱条件设定为流动相0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~1 min,90%~80%A;1~2 min,80%~78%A;2~5.5 min,78%~70%A;5.5~10.5 min,70%~40%A;10.5~12 min,40%~20%A;12~12.1 min,20%~90%A;12.1~13 min,90%A),流速0.3 mL·min<sup>-1</sup>;质谱条件为电喷雾离子源(ESI),负离子采集模式,采集范围 $m/z$  100~1 200。建立2型糖尿病KKAy小鼠模型,将成模小鼠随机分为模型组、生知母组、盐知母组,另设C57BL/6J小鼠作为空白组,每组9只。各给药组灌胃给予相应药液(7.2 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>),空白组、模型组给灌胃同体积生理盐水,每日1次,连续21 d。每周检测各组小鼠空腹血糖(FBG),于最后1次给药3 h后眼球取血,利用酶联免疫吸附法(ELISA)检测各组小鼠血清中的空腹胰岛素(FINS),瘦素(LEP),糖化血红蛋白(HbA1c),糖化白蛋白(GA)和胰高血糖素样肽-1(GLP-1)水平,计算胰岛敏感指数(ISI)和胰岛素抵抗指数(HOMA-IR);采用实时荧光定量聚合酶链反应法(Real-time PCR)检测各组小鼠肝组织和脂肪组织中磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K),磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEPCK),过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ 共激活因子1(PGC1)mRNA的表达。结果:知母经盐制后,所测的8种化学成分含量均有升高,其中知母皂苷AⅢ,知母皂苷BⅡ,知母皂苷BⅢ,知母皂苷I,知母皂苷I a和芒果苷的含量升高显著,其含量依次增加了43.78%,38.77%,25.84%,28.21%,22.51%,24.04%。生知母、盐知母均能明显降低2型糖尿病小鼠FBG,FINS,HOMA-IR,HbA1c,LEP和GA水平( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),均能明显升高ISI和GLP-1水平( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),均能明显上调肝组织及脂肪组织中PI3K,PGC1 mRNA的表达( $P<0.05$ ),且盐知母作用优于生知母。结论:生知母、盐知母对自发性2型糖尿病KKAy小鼠均有显著的降糖作用,且知母盐制后能够促进机体胰岛素分泌,增加机体对胰岛素的敏感性,使降血糖作用增强,推测知母盐制后多种知母皂苷及芒果苷含量的增加是盐知母降血糖作用增强的物质基础。

**[关键词]** 知母;炮制;化学成分;2型糖尿病小鼠;胰岛素抵抗;降血糖;物质基础

**[中图分类号]** R587.1;R943.1;R28;O657.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)22-0140-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20202150

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200827.0904.002.html>

**[网络出版日期]** 2020-8-27 11:11

### Analysis on Changes of Chemical Composition Contents and Efficacy of Improving Insulin Resistance in Type 2 Diabetic Mice of Anemarrhenae Rhizoma Before and After Processing with Salt-water

ZHENG Wei, YAN Li, GAO Hui\*

(Chinese Materia Medica Processing Engineering and Technology Center of Liaoning Province,  
Key Laboratory of Processing Principle Analysis, National Administration of Traditional Chinese Medicine  
(TCM), School of Pharmacy, Liaoning University of TCM, Dalian 116600, China)

**[收稿日期]** 20200717(001)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81102810);辽宁省自然科学基金项目(2018010410-30)

**[第一作者]** 郑威,在读硕士,从事中药炮制研究,E-mail:zhengwei\_lzy@126.com

**[通信作者]** \*高慧,博士,教授,从事中药炮制原理研究,Tel:0411-85890151,E-mail:gaohuitcm@163.com

**[Abstract]** **Objective:** By comparing the changing of chemical composition contents and the effects of improving insulin resistance in type 2 diabetic KKAY mice, to explore the processing principle of Anemarrhenae Rhizoma processed with salt-water. **Method:** Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS) was established for determining the contents of seven saponins and mangiferin in raw and salt-processed products of Anemarrhenae Rhizoma. The mobile phase was 0.1% formic acid aqueous solution (A) and acetonitrile (B) for gradient elution (0-1 min, 90%-80%A; 1-2 min, 80%-78%A; 2-5.5 min, 78%-70%A; 5.5-10.5 min, 70%-40%A; 10.5-12 min, 40%-20%A; 12-12.1 min, 20%-90%A; 12.1-13 min, 90%A). The flow rate was set at 0.3 mL·min<sup>-1</sup>. The mass spectrographic analysis employed electrospray ionization (ESI) and negative ion acquisition mode. The acquisition range was *m/z* 100-1 200. The experimental type 2 diabetic KKAY mice were divided into model group, Anemarrhenae Rhizoma group (7.2 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) and Anemarrhenae Rhizoma processed with salt-water group (7.2 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>). C57BL/6J mice were considered as normal group and were given the same volume of saline. There are nine mice in each group, once a day for 21 consecutive days. The fasting blood glucose (FBG) was measured once a week. Three hours after the last administration, the blood samples of mice were collected by drawing eyeballs and were centrifuged to separate serum for further experiment. The fasting insulin (FINS), leptin (LEP), glycated hemoglobin (HbA1c), glycated albumin (GA), glucagon-like peptide-1 (GLP-1) levels in serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The insulin sensitivity index (ISI) and the homeostasis model assessment insulin-resistance (HOMA-IR) were calculated. The expressions of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), phosphoenolpyruvate carboxylkinase (PEPCK) and peroxisome proliferator activated receptor gamma co-activator1 (PGC1) mRNA in hepatic and adipose tissue of mice from each group were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction method (Real-time PCR). **Result:** After being processed with salt-water, the contents of 8 chemical components in Anemarrhenae Rhizoma were increased, among which the contents of timosaponin A III, timosaponin B II, timosaponin B III, anemarrhenasaponin I, anemarrhenasaponin I a, mangiferin were significantly increased, and increased by 43.78%, 38.77%, 25.84%, 28.21%, 22.51%, 24.04%, respectively. Compared with the model group, raw and salt-processed products of Anemarrhenae Rhizoma could significantly decrease the levels of FBG, FINS, HOMA-IR, HbA1c, LEP, GA ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), increase the levels of ISI, GLP-1 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ) in serum of mice with type 2 diabetes, and significantly increase the expression of PI3K and PGC1 mRNA in hepatic and adipose tissue ( $P<0.05$ ). It is worth noting that salt-processed products is better than that of raw products. **Conclusion:** Raw and salt-processed products of Anemarrhenae Rhizoma have obvious hypoglycemic effect. And the hypoglycemic effect of Anemarrhenae Rhizoma can be promoted after being processed with salt-water by promoting insulin secretion and improving insulin resistance. Incremental components are the probably material basis for enhancement of hypoglycemic effect of Anemarrhenae Rhizoma after being processed with salt-water.

**[Key words]** Anemarrhenae Rhizoma; processing; chemical composition; type 2 diabetic mice; insulin resistance; hypoglycemic activity; material basis

知母性寒,味苦、甘,归肺、胃、肾经,具有清热泻火、滋阴润燥之功。盐知母是“盐制入肾”的代表,其盐制后引药下行,专入肾经,增强滋阴降火的作用,其作用与中医关于消渴病的病机“阴津亏损,燥热偏盛”十分吻合<sup>[1]</sup>。

本课题组前期研究发现,知母盐制后知母皂苷A III,知母皂苷B III和芒果苷含量明显增加,同时降糖作用显著增强,能够降低糖尿病大鼠的空腹血糖

(FBG),空腹胰岛素(FINS),胰岛素抵抗指数(HOMA-IR),糖化血红蛋白(HbA1c)等生化指标水平,升高胰岛敏感指数(ISI)水平,具有改善胰岛素抵抗的作用,且盐知母75%乙醇提取物的降糖作用较好<sup>[2-5]</sup>。

在前期研究基础上,本实验拟采用UPLC-MS测定生知母、盐知母的75%乙醇提取物中7种知母皂苷类成分及芒果苷的含量,并建立2型糖尿病

KKAy小鼠模型,观察生知母、盐知母的75%乙醇提取物对2型糖尿病KKAy小鼠胰岛素抵抗的影响,以期对盐知母炮制原理的解析提供实验依据。

## 1 材料

UPLC H-Class Xevo TQD型超高效液相质谱联用仪(美国Waters公司,包括MassLynx 4.0工作站),FA1004B型电子天平(上海精密科学仪器有限公司),Multiskan MK3型酶标仪和StepOne型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国赛默飞世尔科技有限公司),Milli-Q Integral型纯水/超纯水一体化系统(美国Millipore公司),Contour TS型血糖仪(上海健臻医疗科技有限责任公司),FSH-2型可调高速电动匀浆机(江苏金坛市佳美仪器有限公司),SHA-C型台式恒温振荡器(常州国华电器有限公司),L96G型基因扩增仪(杭州朗基科学仪器有限公司)。

知母皂苷A I,知母皂苷A II,知母皂苷B II,知母皂苷B III,知母皂苷I和知母皂苷I a对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号分别为MUST-17022810, MUST-16112415, MUST-17040602, MUST-1702210, MUST-16112412, MUST-16112413,纯度均 $\geq 98\%$ );芒果苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号111607-200402,纯度 $\geq 98\%$ ),知母皂苷A III对照品(自制,纯度 $\geq 98\%$ ),水为超纯水,乙腈、甲醇为质谱纯,其余试剂均为分析纯;空腹胰岛素(FINS),瘦素(LEP),糖化血红蛋白(HbA1c),糖化白蛋白(GA),胰高血糖素样肽-1(GLP-1)酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒(上海朗顿生物技术有限公司,批号分别为BPE20016, BPE20015, BPE20512, BPE28055, BPE20517);总RNA提取试剂盒,TRIzol试剂,Fast SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix(大连美仑生物技术有限公司,批号分别为MB0271, MB0058, MB3353);知母饮片购自四川新荷花中药饮片股份有限公司(批号1611026),经辽宁中医药大学翟延君教授鉴定为百合科植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* 的干燥根茎。

健康SPF级雄性KKAy小鼠27只,11~12周龄,体质量27~32 g;健康SPF级雄性C57BL/6J小鼠9只,11~12周龄,体质量20~25 g,均购自北京华阜康生物科技股份有限公司,合格证号分别为SCXK(京)2014-0004, SCXK(京)2015-0035。本实验所涉及的动物实验已通过辽宁中医药大学动物伦理委员会审查,批准号2018YS-043-01。普通饲料为小鼠全价营养颗粒饲料,KKAy小鼠专用高脂高能量

饲料(含10%猪油,10%葡萄糖,10%蛋黄粉,能量24.25 kJ·g<sup>-1</sup>)。

## 2 方法与结果

**2.1 盐知母饮片制备<sup>[6]</sup>** 按本课题组前期优选的工艺条件进行炮制,即取生知母100 g,加盐水30 mL(含盐3 g)拌匀,闷润2~4 h,至药透汤尽,于150~160 °C炒制8 min,取出,放凉,贮于密闭容器内,置于干燥通风处保存备用。

### 2.2 指标成分的含量测定

**2.2.1 对照品溶液的制备** 分别精密称取知母皂苷A I,知母皂苷A II,知母皂苷A III,知母皂苷B II,知母皂苷B III,知母皂苷I,知母皂苷I a和芒果苷对照品适量,用甲醇稀释并定容,依次得质量浓度分别为0.8, 0.48, 0.384, 0.688, 0.544, 0.368, 0.24, 0.624 g·L<sup>-1</sup>的对照品储备液,用0.22 μm微孔滤膜滤过。精密吸取上述8种对照品储备液适量,加甲醇配制成知母皂苷A I,知母皂苷A II,知母皂苷A III,知母皂苷B II,知母皂苷B III,知母皂苷I,知母皂苷I a和芒果苷质量浓度分别为80, 48, 38.4, 68.8, 54.4, 36.8, 24, 62.4 mg·L<sup>-1</sup>的混合对照品溶液,4 °C保存备用。

**2.2.2 供试品溶液的制备<sup>[7]</sup>** 精密称取生知母、盐知母粉末(过3号筛,下同)各1.0 g,置圆底烧瓶中,加入75%乙醇15 mL,回流提取3次,每次1 h,过滤,合并滤液,减压浓缩成浸膏,分别加甲醇10 mL使溶解,经0.22 μm微孔滤膜滤过,作为供试品溶液,4 °C保存备用。

**2.2.3 检测条件** 色谱条件设定为ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub>色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm),流动相0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)进行梯度洗脱(0~1 min, 90%~80%A; 1~2 min, 80%~78%A; 2~5.5 min, 78%~70%A; 5.5~10.5 min, 70%~40%A; 10.5~12 min, 40%~20%A; 12~12.1 min, 20%~90%A; 12.1~13 min, 90%A),流速0.3 mL·min<sup>-1</sup>,柱温28 °C,进样量2 μL。

质谱条件为选择电喷雾离子源(ESI)和负离子采集模式,毛细管电压2.5 kV,脱溶剂气温度400 °C,脱溶剂气流量600 L·h<sup>-1</sup>,采用多反应监测(MRM)模式采集,采集范围m/z 100~1 200,其他相关质谱参数见表1。供试品溶液和对照品溶液的总离子流图见图1。

**2.2.4 线性关系考察** 分别精密吸取各对照品储备液适量,用甲醇稀释制得系列对照品溶液,按2.2.3项下条件进行测定,以各对照品质量浓度(X)

表1 知母中8种化学成分的质谱检测参数

Table 1 MS detection parameters of eight chemical constituents in Anemarrhenae Rhizoma

成分	<i>m/z</i>	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
知母皂苷 A I	577.22~187.48	60	26
知母皂苷 A II	755.29~403.96	78	38
知母皂苷 A III	739.48~197.54	80	38
知母皂苷 B II	919.41~255.63	88	55
知母皂苷 B III	901.61~117.58	90	48
知母皂苷 I	757.35~265.54	78	40
知母皂苷 I a	771.35~311.65	82	46
芒果苷	421.03~301.05	50	22

表2 生知母、盐知母中8种指标成分的线性关系考察

Table 2 Linear relationship of eight chemical constituents in of Anemarrhenae Rhizoma and its salt-processed products

成分	回归方程	线性范围/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	<i>r</i>
知母皂苷 A I	$Y=36\ 672.5X+31.891\ 2$	0.005 0~0.800	0.999 2
知母皂苷 A II	$Y=58\ 521.0X+17\ 833.0$	0.003 0~0.480	0.999 8
知母皂苷 A III	$Y=272\ 256.0X+12\ 157.5$	0.002 4~0.384	0.999 8
知母皂苷 B II	$Y=435\ 408.0X+1\ 514.71$	0.004 3~0.688	0.999 5
知母皂苷 B III	$Y=315\ 345.0X+359.815$	0.003 4~0.544	0.999 2
知母皂苷 I	$Y=841\ 050.0X+22\ 285.6$	0.002 3~0.368	0.999 7
知母皂苷 I a	$Y=1\ 846.99X+21.472$	0.001 5~0.240	0.999 9
芒果苷	$Y=9\ 082.41X+4\ 205.51$	0.003 9~0.624	0.999 8

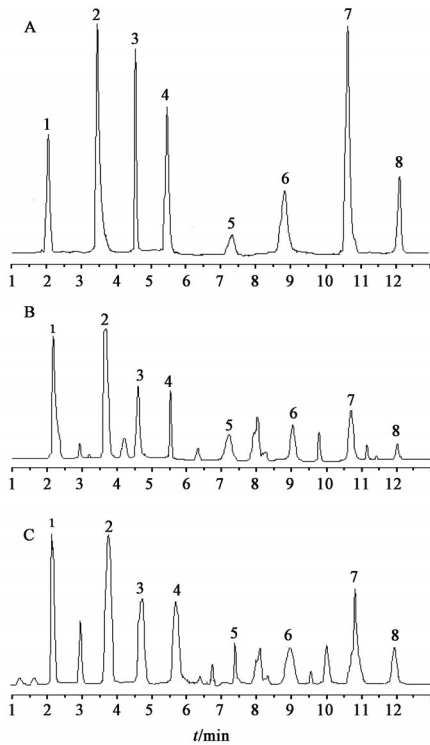


图1 知母盐制前后的UPLC-MS总离子流  
A.混合对照品;B.生知母;C.盐知母;1.芒果苷;2.知母皂苷B II;  
3.知母皂苷B III;4.知母皂苷I;5.知母皂苷A II;6.知母皂苷A I;  
7.知母皂苷A III;8.知母皂苷I a

图1 知母盐制前后的UPLC-MS总离子流

Fig. 1 Total ion current chromatograms of Anemarrhenae Rhizoma and its salt-processed products

为横坐标,峰面积(*Y*)为纵坐标,绘制标准曲线,计算回归方程,结果表明各成分质量浓度在一定范围内与峰面积线性关系良好,见表2。

**2.2.5 方法学考察** 精密吸取2.2.1项下混合对照品溶液适量,按照2.2.3项下条件连续测定6次,结果知母皂苷A I,知母皂苷A II,知母皂苷A III,知母皂苷B II,知母皂苷B III,知母皂苷I,知母皂苷I a和芒果苷峰面积的RSD依次为1.2%,1.5%,

1.1%,1.4%,1.5%,1.3%,1.8%,1.6%,表明仪器精密度良好。

精密吸取2.2.2项下生知母供试品溶液适量,分别于制备后0,2,4,6,8,12,24 h按2.2.3项下条件测定,结果知母皂苷A I,知母皂苷A II,知母皂苷A III,知母皂苷B II,知母皂苷B III,知母皂苷I,知母皂苷I a和芒果苷峰面积的RSD依次为1.5%,1.6%,2.0%,1.5%,1.7%,1.5%,1.7%,1.5%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

精密称取生知母粉末6份,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,按2.2.3项下条件测定,结果知母皂苷A I,知母皂苷A II,知母皂苷A III,知母皂苷B II,知母皂苷B III,知母皂苷I,知母皂苷I a和芒果苷的平均质量分数分别为0.408,0.267,1.300,3.662,2.252,1.468,0.992,3.458  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ,RSD依次为1.1%,1.1%,0.9%,1.3%,1.3%,1.2%,1.0%,0.9%,表明该方法重复性良好。

精密称取6份已知指标成分含量的生知母粉末0.5 g,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,分别精密加入知母皂苷A I ( $0.201\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),知母皂苷A II ( $0.134\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),知母皂苷A III ( $0.641\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),知母皂苷B II ( $1.775\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),知母皂苷B III ( $1.087\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),知母皂苷I ( $0.723\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),知母皂苷I a ( $0.493\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),芒果苷 ( $1.684\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )对照品溶液1 mL,按2.2.3项下条件测定,计算上述8个指标成分的平均加样回收率依次为98.88%,98.77%,99.51%,99.69%,99.26%,100.69%,99.37%,99.47%,RSD分别为1.6%,1.8%,0.9%,0.9%,1.3%,1.0%,1.3%,2.0%,表明该方法准确可靠。

**2.2.6 样品测定** 分别精密称取生知母、盐知母粉末各3份,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,按2.2.3项下条件测定,计算生知母、盐知母中各指标

成分含量,见表3。结果显示盐知母中8个指标成分的含量均高于生知母,其中知母皂苷A I和知母皂苷A II的含量变化不显著;知母皂苷A III,知母皂苷B II,知母皂苷B III,知母皂苷I,知母皂苷I a和芒果苷的含量均明显升高,其含量依次增加了43.78%, 38.77%, 25.84%, 28.21%, 22.51%, 24.04%。

表3 生知母、盐知母中8个指标成分的含量测定 (n=3)

化学成分	生知母	盐知母
知母皂苷A I	0.401	0.427
知母皂苷A II	0.264	0.271
知母皂苷A III	1.286	1.849
知母皂苷B II	3.544	4.918
知母皂苷B III	2.179	2.742
知母皂苷I	1.450	1.859
知母皂苷I a	0.982	1.203
芒果苷	3.365	4.174

### 2.3 药效学研究

**2.3.1 生知母、盐知母灌胃药液的制备** 分别称取适量生知母、盐知母粉末,置圆底烧瓶中,加15倍75%乙醇回流提取3次,每次1h,过滤,合并滤液,减压浓缩成浸膏,冷冻干燥为粉末,将冻干粉用水

混悬,制备成折合生药质量浓度为0.36 g·mL<sup>-1</sup>的溶液,4℃保存备用。

**2.3.2 数据处理方法** 实验数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,应用SPSS 17.0统计学软件进行数据分析,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行各组间显著性差异比较, $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

**2.3.3 分组与给药**<sup>[8]</sup> KKAY小鼠普通饲料适应性喂养1周,再给予高脂高能量饲料喂养1周,禁食不禁水12h,用血糖仪检测,将FBG > 11.1 mmol·L<sup>-1</sup>视为糖尿病模型造模成功。将成模小鼠随机分为3组(模型组、生知母组、盐知母组),每组9只;C57BL/6J小鼠普通饲料适应性喂养2周,选择FBG在4.4~11.1 mmol·L<sup>-1</sup>者为空白组,共9只。各组小鼠的灌胃体积均设定为20 mL·kg<sup>-1</sup>,各组小鼠连续灌胃给药21d,每日1次,生知母组、盐知母组给药剂量均为7.2 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,空白组、模型组每日灌胃同体积的生理盐水。

**2.3.4 FBG检测** 分别于给药7,14,21d后,禁食不禁水12h,采用尾部针刺取血,用血糖仪测定各组小鼠的FBG,见表4。结果发现与模型组比较,给药7d后,生知母、盐知母组小鼠的FBG显著降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );给药14d和21d后,生知母、盐知母组小鼠的FBG较模型组进一步降低( $P < 0.01$ ),且盐知母作用优于生知母( $P < 0.05$ )。

表4 知母盐制前后对2型糖尿病小鼠FBG的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , n=9)

Table 4 Effect of Anemarrhenae Rhizoma and its salt-processed products on serum FBG levels of type 2 diabetic mice ( $\bar{x} \pm s$ , n=9)

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	FBG/mmol·L <sup>-1</sup>			
		给药前	给药7d	给药14d	给药21d
空白	-	6.20±0.83	5.81±0.68	5.88±0.66	5.71±0.64
模型	-	25.78±2.58 <sup>1)</sup>	26.74±1.86 <sup>1)</sup>	26.93±1.82 <sup>1)</sup>	26.77±1.85 <sup>1)</sup>
生知母	7.2	26.07±2.62	23.17±2.88 <sup>2)</sup>	18.13±2.96 <sup>3)</sup>	17.33±3.44 <sup>3)</sup>
盐知母	7.2	25.74±2.98	21.64±1.67 <sup>3)</sup>	13.63±2.62 <sup>3,4)</sup>	13.94±2.54 <sup>3,4)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup> $P < 0.01$ ;与生知母组比较<sup>4)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>5)</sup> $P < 0.01$ (表5,6同)。

**2.3.5 血清指标检测** 小鼠末次给药后,禁食不禁水3h,摘眼球取血,置于离心管中,不抗凝,室温下静置30min,于3 800 r·min<sup>-1</sup>离心15min(离心半径5.9cm),分离血清,测定血清中FINS,LEP,HbA1c,GA,GLP-1的含量,具体操作按照试剂盒内说明书进行,并分别按公式 $ISI = \ln [1 / (FINS \times FBG)]$ , $HOMA-IR = (FBG \times FINS) / 22.5$ 计算ISI和HOMA-IR<sup>[9-10]</sup>,见表5。结果发现与空白组比较,模型组小鼠的FINS,HOMA-IR,LEP,HbA1c和GA水平显著

升高,ISI和GLP-1水平显著降低( $P < 0.01$ ),与血糖检测结果一致,进一步证明2型糖尿病KKAY小鼠造模成功;与模型组比较,生知母组、盐知母组小鼠的FINS,HOMA-IR,LEP,HbA1c和GA水平显著降低( $P < 0.01$ ),ISI和GLP-1水平明显升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );与生知母组比较,盐知母组小鼠的ISI,LEP,GA,GLP-1的改善作用更明显( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

**2.3.6 PI3K,PEPCK和PGC1 mRNA表达水平的检测** 取血后,颈椎脱臼法处死小鼠,解剖摘取肝脏、

表5 知母盐制前后对2型糖尿病小鼠血清指标水平的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=9$ )

Table 5 Effect of Anemarrhenae Rhizoma and its salt-processed products on FINS, ISI, HOMA-IR, LEP, HbA1c, GA, GLP-1 levels of type 2 diabetic mice ( $\bar{x}\pm s, n=9$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	FINS /mU·L <sup>-1</sup>	ISI	HOMA-IR	LEP /μg·L <sup>-1</sup>	HbA1c /%	GA /%	GLP-1 /pmol·L <sup>-1</sup>
空白	-	19.23±1.58	-4.71±0.12	4.97±0.58	2.38±0.15	23.61±2.80	20.88±1.06	36.52±3.53
模型	-	68.25±14.06 <sup>1)</sup>	-7.48±0.16 <sup>1)</sup>	81.06±15.31 <sup>1)</sup>	7.20±1.99 <sup>1)</sup>	55.39±4.16 <sup>1)</sup>	50.85±5.18 <sup>1)</sup>	10.24±1.85 <sup>1)</sup>
生知母	7.2	37.07±5.03 <sup>3)</sup>	-6.43±0.25 <sup>2)</sup>	28.60±6.55 <sup>3)</sup>	5.42±0.26 <sup>3)</sup>	38.13±4.03 <sup>3)</sup>	39.32±4.78 <sup>3)</sup>	16.82±4.96 <sup>3)</sup>
盐知母	7.2	35.12±4.42 <sup>3)</sup>	-5.17±0.23 <sup>2,4)</sup>	21.76±5.07 <sup>3)</sup>	3.39±0.07 <sup>3,5)</sup>	37.11±3.20 <sup>3)</sup>	30.26±4.64 <sup>3,4)</sup>	22.88±4.93 <sup>3,4)</sup>

脂肪组织,用预冷的生理盐水清洗,滤纸吸干多余水分,置于液氮中快速冷冻后转移至-80℃冰箱中保存备用。取冻存的组织约30mg,根据总RNA提取试剂盒说明书提取各组小鼠肝组织、脂肪组织中的总RNA。各指标引物序列为<sup>[11]</sup>PI3K:上游5'-CGGCGTGACATGTAGGCTCTCA-3',下游5'-ACGGCCCGCACTGCAAGTTTGCCT-3'(146bp);PEPCK:上游5'-GGGCCGCTGGATGTTCGGAAG-3',下游5'-CCAATCTTGCCAGCGGCGA-3'(132bp);PGC1:上游5'-AGTGGTGTAGCGACCAATCGGA-3',下游5'-AGGACCGCTAGCAAGTTTGCCT-3'(109bp);β-肌动蛋白(β-actin):上游5'-AGGCCAACCGTGAAAAGATG-3',下游5'-TGGCGTGAGGGAGAGCATAG-3'(185bp),各引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。反转录

及Real-time PCR按照试剂盒说明书操作,β-actin,PI3K,PEPCK反应条件设定为95℃预变性10min;95℃变性30s,55℃退火30s,72℃延伸20s(共40个循环)。PGC1反应条件为95℃预变性10min;95℃变性30s,56℃退火30s,72℃延伸20s(共40个循环)。反应总体积25μL。采用2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>相对定量法计算PI3K,PEPCK,PGC1的mRNA相对表达,结果见表6。由表6可知,与空白组相比,模型组小鼠肝组织及脂肪组织中PI3K,PEPCK,PGC1的mRNA表达均显著下调(P<0.01);与模型组相比,生知母组、盐知母组小鼠肝组织及脂肪组织中PI3K,PGC1的mRNA表达明显上调(P<0.05),但PEPCK mRNA的表达则无明显变化;与生知母组相比,盐知母组小鼠肝组织及脂肪组织中PI3K,PGC1的mRNA表达均明显上调(P<0.05),提示盐知母优于生知母。

表6 知母盐制前后对2型糖尿病小鼠肝组织及脂肪组织中PI3K,PEPCK,PGC1 mRNA表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=9$ )

Table 6 Effect of Anemarrhenae Rhizoma and its salt-processed products on expressions of PI3K, PEPCK, PGC1 mRNA in hepatic and adipose tissue of T2DM mice ( $\bar{x}\pm s, n=9$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	肝组织			脂肪组织		
		PI3K	PEPCK	PGC1	PI3K	PEPCK	PGC1
空白	-	1.16±0.31	1.12±0.17	1.38±0.25	1.19±0.28	1.14±0.12	1.42±0.18
模型	-	0.52±0.14 <sup>1)</sup>	0.48±0.16 <sup>1)</sup>	0.20±0.09 <sup>1)</sup>	0.62±0.09 <sup>1)</sup>	0.47±0.11 <sup>1)</sup>	0.22±0.02 <sup>1)</sup>
生知母	7.2	0.68±0.11 <sup>2)</sup>	0.46±0.15	0.32±0.26 <sup>2)</sup>	0.71±0.17 <sup>2)</sup>	0.48±0.24	0.41±0.28 <sup>2)</sup>
盐知母	7.2	0.79±0.16 <sup>2,4)</sup>	0.47±0.23	0.49±0.07 <sup>2,4)</sup>	0.82±0.14 <sup>2,4)</sup>	0.50±0.19	0.57±0.29 <sup>2,4)</sup>

### 3 讨论

知母中含有大量皂苷类成分,约占知母根茎的6%,是其主要活性成分<sup>[12]</sup>,本课题组前期采用高效液相色谱法(HPLC)进行知母盐制前后化学成分对比,发现知母皂苷AⅢ,知母皂苷BⅢ和芒果苷是炮制后的增量成分,并对这3种增量成分的降糖作用进行了研究。本实验有针对性地选择知母中活性成分知母皂苷及芒果苷作为指标性成分,采用UPLC-MS测定生知母、盐知母降糖活性部位(75%乙醇提取物)中8个指标成分的含量,结果表明知母

经盐制后知母皂苷AⅢ,知母皂苷BⅡ,知母皂苷BⅢ,知母皂苷I,知母皂苷Ia和芒果苷的含量均明显升高,其含量依次增加了43.78%,38.77%,25.84%,28.21%,22.51%,24.04%。

2型糖尿病是由多种因素导致的代谢性疾病,其主要特征是胰岛素抵抗(IR)与胰岛素分泌不足<sup>[13]</sup>。本课题组前期研究发现生知母有显著的降血糖作用,可增加机体对胰岛素的敏感性,改善IR,且盐知母的作用更显著。本实验在前期研究基础上,继续深入探究生知母、盐知母活性部位降血糖

作用及其对IR的影响。自发性2型糖尿病KKAy小鼠的发病是在遗传易感的基础上,通过高糖高脂饮食饲养而诱发,表现出明显的肥胖、高血糖、胰岛功能不足和IR等症状,与人类2型糖尿病发病原因一致,是一种国际公认的理想2型糖尿病动物模型<sup>[14-15]</sup>。C57BL/6J小鼠与KKAy小鼠具有基因同源性,可作为空白组<sup>[16]</sup>。在前期研究的药效学实验及本研究预实验中均证明高剂量(7.2 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)组的降血糖作用最好,故本实验选择给药组的给药剂量7.2 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>开展知母炮制前后降血糖作用的研究。

目前临床上以FBG, HbA1c, GA作为2型糖尿病诊断和治疗的重要检测指标<sup>[17]</sup>。本文研究结果显示,与空白组相比,模型组小鼠的FBG, HbA1c和GA水平显著升高,表明模型复制成功;而生知母、盐知母均能够显著降低2型糖尿病KKAy小鼠的FBG, HbA1c, GA水平,且盐知母降糖作用更加显著、持久。

LEP是由脂肪细胞分泌的一种肽类激素。有研究表明,LEP抵抗与IR的发生、发展密切相关,LEP抵抗和LEP受体不敏感与IR和胰岛素受体不敏感共同存在<sup>[18]</sup>。GLP-1是一种促胰岛素因子,可以促进胰岛素分泌和餐后胰岛素的释放<sup>[19]</sup>。胰岛素重要的靶器官包括肝脏、脂肪组织和骨骼肌组织等。PI3K在胰岛素信号传递途径中起着关键性作用,与IR的发生密切相关<sup>[20]</sup>。PEPCK是一种脂肪组织脂肪酸再酯化的关键酶。有研究表明,长期高脂饮食会导致机体游离脂肪酸的水平升高,引发IR<sup>[21]</sup>。而PEPCK表达升高,可减少肝脏脂肪酸的含量<sup>[22]</sup>。PGC1是一种重要的能量代谢调控因子,有研究证实,高脂饮食喂养小鼠的PGC1转录和表达均会降低,进而导致2型糖尿病和IR的发生<sup>[23-25]</sup>。

本文研究结果显示,虽然模型组小鼠血清FINS水平高于空白组小鼠,但与空白组比较,血糖仍然明显升高,且HOMA-IR显著升高,血清中LEP水平显著升高,ISI和GLP-1水平显著降低,肝组织及脂肪组织中PI3K, PEPCK, PGC1的mRNA表达均显著下调,表明模型组小鼠出现了典型的IR症状,其中,血清LEP水平的增高又会进一步增加FINS的分泌,加重机体IR。而生知母、盐知母均能够显著降低2型糖尿病KKAy小鼠血清中FINS, HOMA-IR, LEP水平,显著升高ISI和GLP-1的水平,显著上调肝组织及脂肪组织中PI3K, PGC1 mRNA的表达,表明给药后可促进机体分泌胰岛素,且有效缓解机体

IR症状,且盐知母对LEP, ISI, GA等指标的改善作用均优于生知母。

综上所述,本文研究表明生知母、盐知母对自发性2型糖尿病KKAy小鼠均有降低FBG,改善IR的作用,且知母盐制后能够促进机体胰岛素分泌,增加机体对胰岛素的敏感性,使其降血糖作用增强,而盐制后增量成分知母皂苷AⅢ,知母皂苷BⅡ,知母皂苷BⅢ,知母皂苷I,知母皂苷I a和芒果苷可能是盐知母降血糖作用增强的物质基础。

#### [参考文献]

- [1] 张永鹏,刘静,李永民. 中医药治疗糖尿病临床证治研究概况[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(22): 277-279.
- [2] 吴莹,宋泽璧,高慧,等. 知母盐制前后降血糖作用及其机制[J]. 中国医院药学杂志, 2014, 34(23): 1977-1980.
- [3] 王晓婷. 盐知母增量成分降糖活性及药代动力学研究[D]. 大连:辽宁中医药大学, 2015.
- [4] 张爽,王晓婷,高雁,等. 盐知母降血糖活性部位对胰岛素抵抗作用的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(21): 2127-2130.
- [5] 王晓婷,闫丽,高慧,等. 知母盐制后增量成分对HepG-2细胞葡萄糖消耗的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(16): 1694-1696.
- [6] 吴莹. 盐知母增强降血糖作用机理研究[D]. 大连:辽宁中医药大学, 2018.
- [7] 闫丽,王晓婷,高慧. 盐知母醇提物对2型糖尿病模型大鼠血糖血脂的影响[J]. 中国药业, 2019, 28(10): 1-3.
- [8] 柳红芳,胡照娟,张艳红,等. 辛开苦降法颗粒剂对KKay2型糖尿病小鼠胰岛素敏感性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(23): 233-237.
- [9] 王磊,秦玖刚,王川. 麦冬提取物对胰岛素抵抗大鼠肝组织miRNA-29a及FOXO3表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(1): 124-129.
- [10] 黄链莎,刘铜华,孙文,等. 桑叶黄酮对糖尿病大鼠血糖水平的影响及机制探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(16): 152-156.
- [11] 张冬梅,娄利霞,吴爱明,等. 芪白合剂对初发2型糖尿病KKAy小鼠胰岛素抵抗及其相关基因mRNA表达的影响[J]. 中西医结合学报, 2012, 10(7): 821-826.
- [12] 刘艳平. 知母皂苷成分的药理活性及作用机制研究进展[J]. 药学实践杂志, 2018, 36(1): 24-29.
- [13] 纪立伟,郭立新. 糖尿病治疗临床药师指导手册[M]. 北京:人民卫生出版社, 2014: 10.

- [14] SUTO J I, MATSUURA S, IMAMURA K, et al. Genetic analysis of non-insulin-dependent diabetes mellitus in KK and KK-Ay mice[J]. *Eur J Endocrinol*, 1998, 139(6):654-661.
- [15] 李娜,张周. 两种自发性2型糖尿病小鼠生物学特性比较[J]. *中国比较医学杂志*, 2011, 21(1):16-22,封2.
- [16] HERBERG L, COLEMAN D L. Laboratory animals exhibiting obesity and diabetes syndromes [J]. *Metabolism*, 1977, 26(1):59-99.
- [17] 中华医学会糖尿病学分会. 中国2型糖尿病防治指南(2017年版)[J]. *中国实用内科杂志*, 2018, 38(4):292-344.
- [18] 李文琪,薛丽香. 瘦素及瘦素抵抗在糖尿病发病中的作用[J]. *中国糖尿病杂志*, 2007, 15(1):58-59.
- [19] NAUCK M A, VARDARLI I, DEACON C F, et al. Secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in type 2 diabetes: what is up, what is down?[J]. *Diabetologia*, 2011, 54(1):10-18.
- [20] ALESSI D R, DOWNES C P. The role of PI3-kinase in insulin action [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1436(1/2):151-164.
- [21] 赵文惠,萧建中,杨文英,等. 脂肪磷酸烯丙醇羧激酶与胰岛素抵抗的发生和逆转的关系[J]. *中华医学杂志*, 2005, 85(43):3074-3078.
- [22] 黄链莎,刘铜华,孙文,等. 桂皮醛对糖尿病小鼠血糖水平的影响及机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(10):95-100.
- [23] 洪涛. 高脂饮食对小鼠PGC-1 $\alpha$ 基因表达的影响及转录调控机制的研究[D]. 衡阳:南华大学, 2011.
- [24] SPIEGELMAN B M. Transcriptional control of energy homeostasis through the PGC1 coactivators [J]. *Novartis Found Symp*, 2007, 286:3-6.
- [25] TZIKA A A, CONSTANTINOU C, BANDYOPADHAYA A, et al. A small volatile bacterial molecule triggers mitochondrial dysfunction in murine skeletal muscle[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9):e74528.

[责任编辑 刘德文]