

葫芦茶不同提取物对链脲佐菌素致糖尿病小鼠的影响

李海英¹, 唐爱存¹, 梁丽英¹, 卢秋玉², 张志伟^{3*}

(1. 广西中医药大学第一附属医院, 南宁 530023;

2. 广西壮族自治区人民医院, 南宁 530021; 3. 广西中医药大学附属瑞康医院, 南宁 530011)

[摘要] **目的:** 研究葫芦茶不同提取物对链脲佐菌素(STZ)所致糖尿病小鼠血糖(BG)、血脂及胰岛素(INS)的影响。**方法:** 采用系统溶剂回流提取法对葫芦茶进行提取分离, 分别得到石油醚部位、氯仿部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位、60%乙醇部位, 采用腹腔注射 STZ 150 mg·kg⁻¹ 建立 2 型糖尿病小鼠模型, 将实验小鼠随机分为 8 组: 空白组, 模型组, 二甲双胍组(100 mg·kg⁻¹), 石油醚部位组、氯仿部位组、乙酸乙酯部位组、正丁醇部位组、60%乙醇部位组, 给药剂量均为 200 mg·kg⁻¹, 空白组和模型组给予等剂量的生理盐水, 每天灌胃给药 1 次, 连续灌胃给药 20 d 后, 眼球取血, 采用葡萄糖氧化酶法测定各组小鼠空腹血糖(FBG), 放射免疫法测定空腹胰岛素(FINS), 生化法检测血脂。**结果:** 与模型组比较, 乙酸乙酯部位、正丁醇部位、60%乙醇部位对 STZ 所致 DM 小鼠有显著降低 FBG 的作用($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其中 60%乙醇部位降糖效果最为显著, 降糖率为 23.61%, 能降低胰岛素抵抗指数(IR)及甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C), 显著提高胰岛素敏感指数(ISI)和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 石油醚部位、氯仿部位对 DM 小鼠无明显影响($P > 0.05$)。**结论:** 葫芦茶降血糖有效成分主要存在于正丁醇部位、60%乙醇部位, 能明显降低 STZ 致 DM 小鼠模型的 BG 水平, 改善胰岛素抵抗, 调节脂代谢紊乱的作用。

[关键词] 葫芦茶提取物; 糖尿病; 胰岛素; 血糖; 血脂

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)20-0251-04

Effects of Extracts from *Tadehagi triquetrum* in Diabetic Mice Induced by Streptozotocin

LI Hai-ying¹, TANG Ai-cun¹, LIANG Li-ying¹, LU Qiu-yu², ZHANG Zhi-wei^{3*}

(1. First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medical, Nanning 530023, China;

2. People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China;

3. Affiliated Ruikang Hospital, Guangxi University of Chinese Medical, Nanning 530011, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of extracts from *T. triquetrum* on blood glucose and blood lipid and insulin (INS) in diabetic mice induced by streptozotocin. **Method:** *T. triquetrum* was extracted and separated by reflux extraction with different solvent, petroleum ether fraction, chloroform fraction, ethyl acetate fraction, n-butanol fraction and 60% ethanol fraction were obtained respectively. Type 2 diabete mice models were established by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) 150 mg·kg⁻¹. The experimental mice were randomly divided into eight groups, control group, model group, metformin group (100 mg·kg⁻¹), petroleum ether group, chloroform group, ethyl acetate group, n-butanol group and 60% ethanol group, the dose were 200 mg·kg⁻¹. Control group and model group were given normal saline. After the experimental mice were administrated with drugs for 20 days, the fasting blood glucose was determined by method of glucose oxidase, fasting insulin was determined by the radioimmunoassay, and blood lipid were determined by chemical method. **Result:** Compared to model

[收稿日期] 20120419(016)

[第一作者] 李海英, 主管药师, 从事药理学和药物制剂工作, Tel: 0771-5848763, E-mail: lihaiying@163.com

[通讯作者] * 张志伟, 硕士, 助理研究员, 从事中药药理学研究, Tel: 0771-5865956, E-mail: tangaicun321@126.com

group, ethyl acetate fraction, n-butanol fraction and 60% ethanol fraction could significantly reduce fasting blood glucose level in diabetic mice induced by STZ ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Of all the fractions, 60% ethanol parts had the most significant hypoglycemic effect. hypoglycemic rate was 23.61%. It also decreased insulin resistance index (IR), contents of TG, TC and LDL-C and increased the insulin sensitivity index (ISI) and HDL-C content in the serum significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Chloroform fraction and petroleum ether fraction had no significant effect on diabetic mice ($P > 0.05$). **Conclusion:** The effective constituent of antidiabetics from *Tadehagi triquetrum* are mainly exist in the n-butanol fraction and 60% ethanol fraction, they can significantly reduce fasting blood glucose level in diabetic mice induced by STZ, improve insulin resistance and adjust metabolic disturbance.

[Key words] extracts from *Tadehagi triquetrum*; diabetes mellitus; insulin; blood glucose; blood lipid

葫芦茶为豆科植物葫芦茶的枝叶,别名牛虫草、葫芦叶、咸鱼草,是广西壮族常用药材,壮名 *Gohuzluzcaz*。主要分布在广西、广东、海南等地,味微苦、涩、凉,功能清热解毒,利湿退黄,消积杀虫。用于中暑烦渴,感冒发热,咽喉肿痛,肺病咳血,肾炎,黄疸,泄泻,风湿关节痛,小儿疳积,钩虫病等^[1-2]。研究表明葫芦茶主要含黄酮类成分、酚性化合物及三萜类化合物^[3],葫芦茶提取物具有破坏 HBsAg 的作用^[4],同时葫芦茶水提取液对细菌和真菌都有一定的抑制作用,而葫芦茶提取物抗糖尿病的研究未见报道,因此本文用链脲佐菌素 (STZ) 建立 2 型糖尿病小鼠模型,观察了壮药葫芦茶不同提取物对糖尿病小鼠血糖 (BG)、血脂及胰岛素 (INS) 的影响,为进一步研究开发葫芦茶提供实验依据。

1 材料

1.1 药品和试剂 链脲佐菌素 (STZ),美国 Sigma 公司;盐酸二甲双胍片,中美上海施贵宝制药有限公司,批号 1111086;血糖检测试剂盒、甘油三酯测定试剂盒和总胆固醇测定试剂盒,四川迈克科技有限责任公司,批号分别为 0311001,1106121,1108101;胰岛素放射免疫分析药盒,北京北方生物技术研究所,批号 110518;低密度脂蛋白胆固醇试剂盒、高密度脂蛋白胆固醇测定试剂盒,长春汇力生物技术有限公司,批号分别为 2011021,2011024。

1.2 葫芦茶各部位的提取分离 葫芦茶购自广西中医学院第一附属医院药学部,经广西中医学院田辉副教授鉴定为豆科植物葫芦茶 *Tadehagi triquetrum* (L.) Ohashi。将葫芦茶粉碎成粗粉,取干燥粗粉 500 g 用 75% 乙醇冷浸 24 h 后,水浴回流提取 3 次,第 1 次加入 10 倍量的乙醇,回流提取 1.5 h,过滤,药渣继续用 8 倍量乙醇分别进行第 2,3 次回流提取,分别回流提取 1 h,过滤,合并 3 次滤液,水浴浓缩至稠膏。用 95% 乙醇溶解稠膏,与柱

层析硅胶混合拌匀,水浴蒸干,并研细,然后依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇、60% 乙醇回流萃取,分别减压浓缩回收溶剂,得石油醚部位、氯仿部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位、60% 乙醇部位。将各部位提取物浸膏临用时用植物油与水 (7:3) 研磨,超声乳化,制成每毫升相当于原药材 2 g 的混悬液,冷藏备用。

1.3 动物 昆明种小鼠,体重 (20 ± 2) g,雌雄各半,由广西医科大学实验动物中心提供,实验动物许可证号 SCXKG(桂)2003-0003。

2 方法

2.1 DM 模型建立^[5-6] STZ 溶于 0.1 mol·L⁻¹, pH 4.5 的柠檬酸/柠檬酸钠缓冲液中,配制成 150 mg·kg⁻¹,小鼠禁食不禁水 12 h 后,腹腔注射 STZ,正常对照组小鼠腹腔注射等量上述缓冲液,72 h 后小鼠眼球后静脉丛采血 50 μL,于离心机 3 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,分离血清,用葡萄糖试剂盒测定小鼠空腹血糖 (FBG),凡 FBG ≥ 11.1 mmol·L⁻¹ 视为 DM 动物模型。

2.2 分组与给药 将成模小鼠随机分为模型组、二甲双胍组、葫芦茶石油醚部位组、氯仿部位组、乙酸乙酯部位组、正丁醇部位组、60% 乙醇部位组。各组小鼠自由饮水、每日喂 1 次饲料。二甲双胍组用前将药片研碎,用蒸馏水配制成混悬液,给药剂量为 100 mg·kg⁻¹,各部位给药组灌胃相应的混悬药液,给药剂量均为 200 mg·kg⁻¹。空白组和模型组给予等量的生理盐水,每天灌胃给药 1 次,连续灌胃给药 20 d。

2.3 检测指标

2.3.1 一般指标 观察小鼠的精神活动、毛发改变、饮水量、进食量、大小便等一般状态;记录体重变化情况、死亡情况。在实验过程中每 10 d 用电子天平称小鼠体重。

2.3.2 血糖的测定 给药 20 d 后眼球后静脉丛采血,用葡萄糖氧化酶法测定各组 FBG。计算样品血糖含量。

$$\text{降糖率} = \frac{\text{药前空腹血糖} - \text{药后空腹血糖}}{\text{药前空腹血糖}} \times 100\%$$

2.3.3 血清胰岛素测定、胰岛素敏感指数计算 测定 FBG 后,各组小鼠摘眼球采血,待全血凝固,于离心机 $3\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,分离血清,用放射免疫法测定 FINS 水平。计算胰岛素敏感指数 (ISI)。

$$\text{胰岛素敏感指数} = \ln[1 \div (\text{血清空腹胰岛素} \times \text{血清空腹血糖})]$$

$$\text{胰岛素抵抗指数} = \ln[(\text{血清空腹胰岛素} \times \text{血清空腹血糖})/22.5]$$

2.3.4 血脂的测定 在测定 FBG 后,各组小鼠眼静脉采血, $3\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,分离血清,按照试剂盒说明书测定 TG,TC,LDL-C 和 HDL-C。

2.4 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组均数比较采用方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对 DM 小鼠一般状况的影响 造模前小鼠精神状态良好,活动自如,皮毛光滑,饮水量、进食量和大小便正常,垫料较干燥,造模后小鼠精神萎靡,懒动,出现毛发稀疏,易脱落,形体消瘦、多食、多饮和多尿等典型的“三多一少”症状,垫料湿。体重较造模前明显下降。灌胃给药后,与模型组比较,二甲双胍组、乙酸乙酯部位组、正丁醇部位组、60% 乙醇部位组小鼠状态有较明显的改善,精神状态良好,毛发干净有光泽,饮水量、进食量和大小便相对正常,体重也有明显的增长,但石油醚部位组、氯仿部位组的小鼠一般状况没有明显的改善。各部位对 STZ 所致 DM 小鼠体重的影响结果见表 1。

3.2 对 DM 小鼠血糖的影响 与模型组比较,葫芦茶乙酸乙酯部位、正丁醇部位、60% 乙醇部位能显著降低 DM 小鼠的血糖,其中 60% 乙醇部位降糖效果最为显著,降糖率为 23.61%,而石油醚部位和氯仿部位没有明显变化,结果表明主要有效成分集中在正丁醇部位和 60% 乙醇部位。结果见表 2。

3.3 对 DM 小鼠胰岛素的影响 与空白组比较,模型组小鼠的 INS 水平升高,出现 IR,给药后,与模型组比较,二甲双胍组、正丁醇部位组和 60% 乙醇部位组能显著降低 INS 水平,明显提高 ISI,IR 明显下降($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),结果见表 3。

3.4 对 DM 小鼠血脂的影响 与空白组比较,模型

表 1 葫芦茶不同提取物对 DM 小鼠体重的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	体重/g		
		给药前	给药 10 d	给药 20 d
空白	-	19.06 ± 1.26	25.89 ± 1.29 ¹⁾	32.85 ± 1.68 ⁴⁾
模型	-	21.82 ± 1.04	17.56 ± 2.01	14.81 ± 2.13
二甲双胍	100	20.35 ± 0.99	19.72 ± 1.53 ³⁾	18.95 ± 1.82 ⁴⁾
石油醚部位	200	19.46 ± 1.50	17.81 ± 1.42	15.07 ± 2.10
氯仿部位	200	20.58 ± 1.17	18.62 ± 2.03	16.58 ± 1.92
乙酸乙酯部位	200	19.73 ± 1.29	18.43 ± 1.64	17.99 ± 1.32 ³⁾
正丁醇部位	200	21.29 ± 1.42	20.16 ± 1.75 ³⁾	19.38 ± 1.45 ⁴⁾
60% 乙醇部位	200	20.71 ± 1.37	19.75 ± 1.37 ³⁾	19.64 ± 1.58 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

表 2 葫芦茶不同提取物对 DM 小鼠血糖的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	血糖/mmol·L ⁻¹		降糖率 /%
		给药前	给药后	
空白	-	7.82 ± 0.73	7.67 ± 0.81	-
模型	-	21.06 ± 3.14	22.85 ± 3.27 ^{b)}	-
二甲双胍	100	20.94 ± 2.96	16.53 ± 2.38 ²⁾	21.06
石油醚部位	200	21.07 ± 3.27	20.99 ± 3.02	0.38
氯仿部位	200	20.82 ± 2.43	20.01 ± 2.58	3.89
乙酸乙酯部位	200	21.34 ± 3.81	18.25 ± 3.74 ²⁾	14.48
正丁醇部位	200	21.18 ± 3.25	17.86 ± 3.05 ²⁾	15.68
60% 乙醇部位	200	20.97 ± 2.84	16.02 ± 2.77 ²⁾	23.61

组 TG,TC,LDL-C 明显升高,HDL-C 明显降低,有显著性差异($P < 0.01$)表明造模成功。与模型组比较,正丁醇部位组和 60% 乙醇部位组均能降低 TG,TC,LDL-C,升高 HDL-C,结果有显著性差异($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),表明葫芦茶降低 DM 小鼠血脂的有效成分主要集中在正丁醇部位组和 60% 乙醇部位,结果见表 4。

4 讨论

糖尿病(DM)是由多种病因引起的以慢性高血糖为特征的代谢紊乱,伴有因胰岛素分泌作用缺陷引起的糖、脂肪和蛋白质代谢异常。2 型糖尿病以胰岛素抵抗为主,伴胰岛素分泌不足,持续的高血糖不仅引起广泛的周围组织和器官的损害,而且对胰岛 β 细胞亦有损害^[7]。

血糖升高是糖尿病的 1 个重要特征。正常生理状态下,肝脏中脂代谢保持着动态平衡。糖尿病发

表 3 葫芦茶不同提取物对 DM 小鼠胰岛素的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	FINS/ μ U·mL ⁻¹	ISI	IR
空白	-	20.08 ± 3.24	-5.04 ± 0.43	1.92 ± 0.09
模型	-	60.91 ± 5.41 ²⁾	-7.24 ± 0.76 ²⁾	4.13 ± 0.39
二甲双胍	100	38.26 ± 4.39 ⁴⁾	-6.45 ± 0.53 ⁴⁾	3.33 ± 0.27 ⁴⁾
石油醚部位	200	55.83 ± 8.02	-7.06 ± 0.61	3.96 ± 0.34
氯仿部位	200	56.01 ± 7.16	-7.03 ± 0.58	3.91 ± 0.26
乙酸乙酯部位	200	46.27 ± 5.67 ⁴⁾	-6.73 ± 0.49 ³⁾	3.62 ± 0.17 ³⁾
正丁醇部位	200	40.36 ± 4.82 ⁴⁾	-6.59 ± 0.67 ⁴⁾	3.46 ± 0.31 ⁴⁾
60% 乙醇部位	200	36.54 ± 3.97 ⁴⁾	-6.38 ± 0.55 ⁴⁾	3.25 ± 0.24 ⁴⁾

表 4 葫芦茶不同提取物对 DM 小鼠血脂的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	TG	TC	LDL-C	HDL-C
空白	-	1.28 ± 0.19	2.86 ± 0.29	1.07 ± 0.11	1.37 ± 0.16
模型	-	2.14 ± 0.26 ²⁾	5.61 ± 0.58 ²⁾	2.29 ± 0.29 ²⁾	0.66 ± 0.08 ²⁾
二甲双胍组	100	1.39 ± 0.15 ⁴⁾	3.06 ± 0.42 ⁴⁾	1.48 ± 0.22 ⁴⁾	1.05 ± 0.12 ⁴⁾
石油醚部位	200	2.09 ± 0.13	5.43 ± 0.61	2.17 ± 0.31	0.71 ± 0.06
氯仿部位	200	2.01 ± 0.11	5.07 ± 0.76	2.08 ± 0.37	0.79 ± 0.04
乙酸乙酯部位	200	1.66 ± 0.18 ³⁾	4.89 ± 0.49 ³⁾	1.83 ± 0.21 ³⁾	0.82 ± 0.11 ³⁾
正丁醇部位	200	1.57 ± 0.20 ⁴⁾	4.06 ± 0.58 ³⁾	1.72 ± 0.29 ⁴⁾	0.91 ± 0.17 ³⁾
60% 乙醇部位	200	1.42 ± 0.09 ⁴⁾	3.72 ± 0.37 ⁴⁾	1.56 ± 0.18 ⁴⁾	1.01 ± 0.13 ⁴⁾

生后,导致体内脂代谢异常,糖异生明显增加,组织蛋白及脂质大量分解,肝脏摄取、转运脂质的能力开始降低,血浆中脂肪和胆固醇堆积,导致高脂血症、酮症酸中毒、高脂蛋白血症等糖尿病并发症的发生^[8]。

IR 与胰岛素介导的血管扩张及内皮功能损害有关,高胰岛素血症能损伤血管内皮细胞功能,改变血液流变性及血细胞对血管壁的黏附,直接影响胰岛素与其受体间的结合而引起 IR^[9],

STZ 是 1 种抗菌素,对实验动物的胰岛 β 细胞具有高度选择性毒性作用,可先损伤 β 细胞及有关细胞器的膜结构,引起酶扩散和酶活性的改变,进而影响 β 细胞功能和结构,引起体内糖脂代谢紊乱^[10]。本研究结果表明,葫芦茶乙酸乙酯部位、正丁醇部位、60% 乙醇部位对 STZ 所致 DM 小鼠有显著降糖、降脂及改善 IR 作用,而石油醚部位和氯仿部位没有明显改善作用,表明葫芦茶降糖的主要有效成分集中在乙酸乙酯部位、正丁醇部位、60% 乙醇部位,有研究证实葫芦茶主要含黄酮类成分和三萜类化合物^[3],根据黄酮类成分和三萜类化合物的理化性质特征和提取分离的方法,可以推断黄酮类成分和三萜类化合物主要富集在正丁醇部位、60% 乙醇部位,本实验结果表明葫芦茶正丁醇部位、60% 乙醇部位降糖效果较好,表明葫芦茶中黄酮苷类和三萜皂苷类化合物有可能是其抗糖尿病的有效成分,但更明确的有效成分及作用机制有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 韦松基,朱华. 常用壮药生药质量标准研究[M]. 南宁:广西民族出版社,2003:399.

[2] 中国科学院中国植物编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1995.

[3] 文东旭,陆敏仪,唐人九,等. 葫芦茶化学成分的研究(II)[J]. 中草药,2000,31(1):3251.

[4] 谢蕾,陈思东,张冠群. 葫芦茶对 HbsAg 破坏的检测报告[J]. 广东医学院学报,1986,2(1):78.

[5] 朱愉. 实验动物的疾病模型. 天津:天津科技翻译出版社,1997,252.

[6] 孙焕,陈广,陆付耳. 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):68.

[7] 刘玥,谢鸣,张业. 2 型糖尿病胰岛素抵抗大鼠模型中医外观表征的变化[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(14):127.

[8] 吕建东,白素芬,张晓鹏,等. 杞元膏加味对 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(5):132.

[9] 王春怡,李卫民,高英. 黄芪葛根汤对 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗及 PPAR- γ mRNA 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(5):152.

[10] Pettepher C C, Iendoux S P, Bohr V A. et al. Repair of alkaliabile rites within the mitochondrial DNA of RINr 38 cells after exposure to the nitrosurea streptozotocin [J]. Biochemistry, 1991,266(5):3113.

[责任编辑 李玉洁]