

知母盐炙前后体外降血糖作用的研究

张 爽, 高 雁, 王晓婷, 孙冬月, 高 慧*

辽宁中医药大学 药学院, 辽宁 大连 116600

摘 要: **目的** 利用 Caco-2 细胞模型比较知母盐炙前后的降血糖作用, 并考察其作用机制, 为盐知母炮制原理的阐明提供依据。**方法** 建立 Caco-2 单层细胞模型, 采用 CCK-8 细胞活力试剂盒检测 5 000、2 500、500、250、50、25、5、2.5、0.5、0.25 $\mu\text{g/mL}$ 生、盐知母水煎液细胞毒性, 来确定药物最大毒性剂量。以蔗糖酶和麦芽糖酶底物, 葡萄糖氧化酶法测定葡萄糖质量浓度, 计算抑制率, 比较其对 Caco-2 单层细胞上蔗糖酶和麦芽糖酶活力的影响。葡萄糖吸收实验测定剩余葡萄糖的质量浓度, 比较生、盐知母对 Caco-2 细胞吸收和转运葡萄糖的影响。**结果** 当生、盐知母质量浓度 $\leq 250 \mu\text{g/mL}$ 时, Caco-2 细胞可进行细胞实验。实验选取了 50、250 $\mu\text{g/mL}$ 两个质量浓度。生、盐知母水煎液 50、250 $\mu\text{g/mL}$ 对蔗糖酶、麦芽糖酶活性均有抑制作用, 且盐知母水煎液对蔗糖酶、麦芽糖酶的抑制作用均优于生知母。生、盐知母水煎液均有降低细胞对葡萄糖吸收的趋势, 且呈现剂量相关性, 但效果不显著。盐知母水煎液对葡萄糖吸收的抑制作用略好于生知母 ($P < 0.05$)。**结论** 盐知母对 Caco-2 细胞的降糖作用优于生知母, 其降糖机制可能主要体现在 α -葡萄糖苷酶上, 而对葡萄糖吸收作用影响较小。

关键词: 生知母; 盐知母; Caco-2 细胞; 蔗糖酶; 麦芽糖酶; 葡萄糖吸收

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2016)12-1883-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2016.12.003

Hypoglycemic effects *in vitro* of *Anemarrhena Rhizoma* before and after processed with salt-water

ZHANG Shuang, GAO Yan, WANG Xiao-ting, SUN Dong-yue, GAO Hui

College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China

Abstract: **Objective** To compare the hypoglycemic effects of *Anemarrhena Rhizoma* before and after processed with salt-water by Caco-2 cell model, and explore its mechanism, so as to provide reference for explain the processing principle of *Anemarrhena Rhizoma*. **Methods** Caco-2 cell models were established. Cytotoxicities of *Anemarrhena Rhizoma* and salt *Anemarrhena Rhizoma* with concentrations of 5 000, 2 500, 500, 250, 50, 25, 5, 2.5, 0.5, and 0.25 $\mu\text{g/mL}$ were determined with CCK-8 cell viability kit, and obtained the maximum toxic dose. The GOP-POD method was used to determine the concentration of sucrose and maltase activity, and to calculate the inhibition rate, and the effects of Caco-2 on the activity of invertase and enzyme in the monolayer cells were compared. Residual glucose were measured by glucose test method, and effects of *Anemarrhena Rhizoma* and salt *Anemarrhena Rhizoma* on glucose transport and uptake in Caco-2 cell were compared. **Results** Caco-2 cell models were selected to used in the flowing tests when they were treated by *Anemarrhena Rhizoma* and salt *Anemarrhena Rhizoma* with concentrations below 250 $\mu\text{g/mL}$. The optimized concentrations of 50 and 250 $\mu\text{g/mL}$ were finally selected. *Anemarrhena Rhizoma* and salt *Anemarrhena Rhizoma* (50 and 250 $\mu\text{g/mL}$) had inhibitory effects on sucrase and maltase activity, and the inhibition of salt *Anemarrhena Rhizoma* were better than those of *Anemarrhena Rhizoma*. *Anemarrhena Rhizoma* and salt *Anemarrhena Rhizoma* had the trend to reduce absorb of glucose, and showed a dose related, but the effects were not significant. Glucose absorptions of salt *Anemarrhena Rhizoma* were slightly stronger than those of *Anemarrhena Rhizoma* ($P < 0.05$). **Conclusion** Hypoglycemic effects of salt *Anemarrhena Rhizoma* on Caco-2 cell are stronger than those of *Anemarrhena Rhizoma*, and mechanism may be mainly reflected according to α -glucosidase, but effect on glucose uptake is small.

Key words: *Anemarrhena Rhizoma*; salt *Anemarrhena Rhizoma*; Caco-2 cell; sucrase; maltase; uptake and transport of glucose

收稿日期: 2016-07-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81102810); 辽宁省自然科学基金资助项目 (2013020165)

作者简介: 张 爽 (1990—), 女, 辽宁人, 硕士, 从事中药炮制原理研究。Tel: 13842845591 E-mail: 15041408236@163.com

*通信作者 高 慧 (1974—), 女, 辽宁人, 教授, 博士, 从事中药炮制原理研究。Tel: (0411) 85890146 E-mail: gaohuitcm@163.com

知母是百合科知母属植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bunge 的干燥根茎, 味苦、甘, 寒, 归肺、胃、肾经, 具有清热泻火、滋阴润燥的功效^[1]。历版《中国药典》所收载的知母炮制方法均为盐炙法。本课题组在前期研究中以大鼠空腹血糖值、葡萄糖耐量、糖化血红蛋白为指标, 发现知母盐炙后降血糖作用显著增强, 并且对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用进行比较, 发现盐知母可显著抑制 α -葡萄糖苷酶活性^[2-3]。因此本实验借助 Caco-2 细胞研究生、盐知母对肠道葡萄糖吸收酶系的影响, 在细胞水平上比较其降血糖作用, 为寻找盐知母降血糖作用增强的炮制原理提供参考。

1 仪器与材料

MCO-15AC 型 CO₂ 培养箱 (日本三洋公司); Mettler AE240 型十万分之一分析天平 (瑞士 Mettler 公司); NIB-100 倒置显微镜 (日本奥林巴斯公司); ZHJH-C1112B 超净工作台 (上海智成科学仪器有限公司); Multiskan MK3 酶标仪 (美国赛默飞世尔科技有限公司); TGL-16C 台式离心机 (上海安亭科学仪器厂); Transwell 细胞培养小室 (Millicell 公司, 批号 MCHT24H48); 立式压力蒸汽灭菌器 (上海博讯科学仪器有限公司)。

DMEM 高糖培养基 (批号 1715848)、新生胎牛血清 (批号 1616964)、非必需氨基酸 (MEM NEAA, 批号 1703183)、HBSS 溶液 (批号 1694274)、胰蛋白酶 (Trypsin-EDTA, 批号 1681700)、青链霉素双抗液 (批号 1697548) 均购自 Gibco 公司; Hepes (北京索莱宝科技有限公司, 批号 513C0413); CCK-8 细胞活力试剂盒 (批号 20151214)、葡萄糖测试盒 (批号 20151105147) 均购自南京建成生物工程研究所, 口服葡萄糖 (沈阳市试剂厂, 批号 20140718), 蔗糖 (批号 20140110)、麦芽糖 (批号 20150605) 购自天津科密欧化学试剂有限公司。

Caco-2 人结肠癌细胞购自中国科学院细胞库; 阿卡波糖片 (拜耳医药保健有限公司, 规格 50 mg/片, 批号 BJ21783)、知母购自四川新荷花中药饮片股份有限公司, 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* Bunge 的干燥根茎, 批号 1510038

2 方法

2.1 溶液的制备

盐知母按前期研究确定的盐炙工艺制备^[2]。称取生、盐知母各 10 g, 分别加水 150 mL, 各煎煮 2

次, 1 h/次, 合并煎液, 浓缩, 冷冻干燥, 得生、盐知母冻干粉 3.22、3.25 g。精密称取冻干粉适量, 分别加汉克平衡盐溶液 (HBSS 溶液, pH 7.3) 制备成 5 mg/mL 的母液, 备用。并用 HBSS 溶液分别稀释成 5 000、2 500、500、250、50、25、5、2.5、0.5、0.25 $\mu\text{g/mL}$ 系列质量浓度的溶液。

2.2 Caco-2 细胞模型建立^[4-5]

在 5% CO₂、37 °C 条件下, 用正常培养基 (CM 培养基, 含 1% 非必需氨基酸、1% 青链霉素双抗、10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基) 培养 Caco-2 细胞。隔天换培养基, 当细胞长满后进行传代。将处于对数生长期且状态良好的 Caco-2 细胞按 $8 \times 10^4/\text{mL}$ 接种到 Transwell 小室上, 小室内加 200 μL 细胞悬液, 小室外加 1.3 mL CM 培养基。最初 2 d 用 CM 培养基进行培养, 之后用分化培养基 (DM 培养基, 含 2 mmol/L 丁酸且不含血清培养基) 进行培养, 并分别于 1、3、7 d 用细胞电阻仪测定跨膜电阻, 分析 Caco-2 单层细胞的完整性。在生长至第 7 天时测定细胞跨膜电阻 (TEER)。当各孔 TEER > 500 Ω/cm^2 , 说明形成了致密的细胞单层。

2.3 知母水煎液对 Caco-2 细胞活性和增殖的影响

选取对数生长期 Caco-2 细胞, 采用 CCK-8 细胞活力试剂盒检测细胞毒性, 来确定药物最大毒性剂量。将细胞密度调整为 $3 \times 10^4/\text{mL}$, 每孔 100 μL 接种于 96 孔培养板上, 在 CO₂ 培养箱中培养。24 h 后进行分组, 分为实验组和对照组, 每组设 4 个复孔。实验孔每孔加入 5 000、2 500、500、250、50、25、5、2.5、0.5、0.25 $\mu\text{g/mL}$ 生、盐知母水煎液 10 μL , 对照孔加入 10 μL HBSS 溶液。培养 48 h 后, 每孔加入 10 μL CCK-8 试剂后再培养 4 h, 用酶标仪测定 450 nm 处吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率 (IC, $\text{IC} = A_{\text{实验}}/A_{\text{对照}}$)^[6]。将 98% 的 Caco-2 细胞存活所对应的药物浓度 (IC₉₈) 作为最大毒性剂量。

2.4 知母水煎液对 Caco-2 单层细胞上蔗糖酶和麦芽糖酶活力的影响

药物均用含 28 mmol/L 蔗糖或麦芽糖为底物的无菌 HBSS 溶液溶解, 滤过, 使阿卡波糖质量浓度为 250 $\mu\text{g/mL}$, 实验组质量浓度为 50、250 $\mu\text{g/mL}$ (根据 2.3 项下结果选取 50、250 $\mu\text{g/mL}$ 两个质量浓度), 在已形成的 Caco-2 单层细胞的 Transwell 小室上进行。实验前移去小室中的培养液, 用预热的 HBSS 液洗涤 2 次, 每次在 37 °C, 5% CO₂ 条件下培养 20 min, 除去细胞表面附着物。各组 BL 侧均

加入 1.5 mL 空白的无菌 HBSS。对照组 AP 侧加入 0.5 mL 空白的无菌 HBSS；阴性对照组 AP 侧加入 0.5 mL 含蔗糖或麦芽糖底物的无菌 HBSS；阿卡波糖组 AP 侧加入 0.5 mL 阿卡波糖溶液；生、盐知母组 AP 侧均加入不同质量浓度生、盐知母水煎液 0.5 mL。混匀后置于 5% CO₂、37 °C 培养箱中培养 40 min，迅速从 AP、BL 侧吸出反应溶液，以蔗糖酶和麦芽糖酶底物，葡萄糖氧化酶法测定葡萄糖质量浓度，计算抑制率^[7-10]。

$$\text{抑制率} = (C_{\text{阴性对照}} - C_{\text{样品}}) / (C_{\text{阴性对照}} - C_{\text{对照}})$$

2.5 知母水煎液对 Caco-2 细胞转运吸收葡萄糖的影响

将药物用含葡萄糖 0.55 mmol/L 的无菌 HBSS 溶液溶解，过 0.22 μm 微孔滤膜。使阿卡波糖溶液质量浓度为 250 μg/mL，同时将生、盐知母水煎液配制成质量浓度分别为 50、250 μg/mL。吸净 Caco-2 单层细胞模型 AP 侧、BL 侧培养液，再用 HBSS 冲洗 3 次，除去细胞表面附着物。同 2.4 项下对细胞进行分组。各实验组、对照组 AP 侧加入 0.5 mL 药物溶液或 HBSS，BL 侧均加入 HBSS 1.5 mL。置 5% CO₂、37 °C 培养箱中培养 40 min，迅速从 AP 侧中吸出反应溶液，葡萄糖吸收实验测定剩余葡萄糖的质量浓度，计算葡萄糖被吸收的量^[10-11]。

2.6 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用 SPSS 19.0 统计软件，各组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA)。

3 结果

3.1 知母水煎液对 Caco-2 细胞活性和增殖的影响

当生、盐知母质量浓度 ≤ 250 μg/mL 时，Caco-2 细胞 IC 值大于 98%，在此浓度范围内可进行细胞实验，结果见表 1。实验选取了 50、250 μg/mL 两个质量浓度。

3.2 知母水煎液对 Caco-2 单层细胞上蔗糖酶和麦芽糖酶活力的影响

生、盐知母水煎液对蔗糖酶、麦芽糖酶活性均有抑制作用，使 AP 侧和 BL 侧游离葡萄糖减少。且盐知母水煎液对蔗糖酶、麦芽糖酶的抑制作用均优于生知母。结果见表 2。

表 1 生、盐知母水煎液对 Caco-2 细胞细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Table 1 Effects of *Anemarrhena Rhizoma* and salt *Anemarrhena Rhizoma* decoction on cell survival rates of Caco-2 cell ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

组别	质量浓度/(μg·mL ⁻¹)	IC/%
生知母	0.25	98.51 ± 2.21
	0.5	98.93 ± 1.54
	2.5	98.51 ± 2.45
	5	98.62 ± 0.37
	25	99.25 ± 2.13
	50	99.73 ± 1.27
	250	99.98 ± 2.07
	500	95.23 ± 1.47
	2 500	89.45 ± 1.53
	5 000	90.22 ± 2.32
盐知母	0.25	98.24 ± 1.37
	0.5	98.42 ± 0.97
	2.5	98.64 ± 1.87
	5	99.43 ± 1.77
	25	98.91 ± 1.49
	50	99.11 ± 2.35
	250	99.87 ± 1.58
	500	95.44 ± 0.58
	2 500	93.53 ± 2.14
	5 000	92.74 ± 0.97

表 2 生、盐知母水煎液对 Caco-2 细胞上蔗糖酶和麦芽糖酶的抑制率 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Table 2 Inhibition of *Anemarrhena Rhizoma* and salt *Anemarrhena Rhizoma* to sucrose and maltase on Caco-2 cell ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

组别	质量浓度/(μg·mL ⁻¹)	以蔗糖计抑制率/%		以麦芽糖计抑制率/%	
		AP 侧	BL 侧	AP 侧	BL 侧
阿卡波糖	250	72.20 ± 2.33	74.37 ± 1.47	77.19 ± 2.87	79.96 ± 1.32
生知母	50	51.56 ± 3.44	58.47 ± 1.37	42.25 ± 2.31	44.38 ± 3.11
	250	55.54 ± 2.67	60.08 ± 3.12	49.99 ± 2.77	49.62 ± 3.31
盐知母	50	54.65 ± 4.23	59.27 ± 0.78	51.94 ± 2.45	53.11 ± 2.12
	250	69.17 ± 3.11	67.26 ± 2.14	64.95 ± 2.37	65.46 ± 0.97

3.3 知母水煎液对 Caco-2 细胞吸收葡萄糖的影响

以葡萄糖为糖原,与对照组比较,阿卡波糖略有此作用 ($P<0.05$),生、盐知母水煎液均有降低细胞对葡萄糖吸收的趋势,且呈现剂量相关性,但效果不显著。盐知母水煎液对葡萄糖吸收的抑制作用略好于生知母 ($P<0.05$)。结果见表3。

表3 生、盐知母水煎液对 Caco-2 细胞吸收和转运葡萄糖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Table 3 Effects of *Anemarrhena Rhizoma* and salt *Anemarrhena Rhizoma* to glucose uptake and transport on Caco-2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

组别	质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	葡萄糖/($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)
对照	—	5.73 ± 0.74
阿卡波糖	250	$4.98 \pm 0.28^*$
生知母	50	5.64 ± 0.45
	250	5.34 ± 0.17
盐知母	50	5.21 ± 0.27
	250	$4.92 \pm 0.32^*$

与对照组比较: $^*P<0.05$

$^*P<0.05$ vs control group

4 讨论

Caco-2 细胞来源于人的结肠癌细胞,培养时能自发地进行类似人类肠道细胞的分化,具备小肠的微绒毛结构以及多种小肠吸收的特性,表现出与人小肠上皮细胞相似的糖消化吸收和葡萄糖异生相关酶类^[12]。人们饮食结构中主要成分为淀粉,蔗糖酶和麦芽糖酶在淀粉消化成可被吸收的单糖过程中发挥主要作用。故本实验以 Caco-2 细胞为模型,以蔗糖、麦芽糖为底物来研究生、盐知母水煎液对 α -葡萄糖苷酶、葡萄糖吸收活性的影响。同时以葡萄糖为糖原研究生、盐知母水煎液对葡萄糖转运蛋白的影响。

实验结果表明,生、盐知母水煎液可以有效地抑制 Caco-2 细胞单层模型上二糖酶的活力,且盐知母水煎液的抑制活性高于生知母,这与前期研究知母盐炙前后对 α -葡萄糖苷酶作用比较结果相一致。

此外,以葡萄糖为糖原时,生、盐知母水煎液均可降低葡萄糖的吸收作用,但效果不显著。推测盐知母水煎液降糖机制可能主要体现在 α -葡萄糖苷酶上,而对葡萄糖吸收作用影响较小。提示盐知母降血糖作用可能与抑制二糖酶活力,对 α -葡萄糖苷酶产生抑制作用有关。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 212-213.
- [2] 高 慧. 盐知母炮制原理研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2010.
- [3] 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.
- [4] Zhu X G, Yang Q. A new protocol for a short-term Caco-2 monolayer culture system and its evaluation [J]. *Fudan Univ J Med Sci*, 2012, 39(1): 68-73
- [5] Barta C A, Sachs-Barrable K, Feng F, et al. Effects of monoglycerides on P-glycoprotein: modulation of the activity and expression in Caco-2 cell monolayers [J]. *Mol Pharm*, 2008, 5(5): 863-875.
- [6] 徐 钢, 裴启洋, 贾天柱, 等. CCK-8 法检测狗脊不同炮制品对成骨细胞的影响 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(24): 4319-4323.
- [7] 张海凤, 董亚琳, 张 琰, 等. 利用 Caco-2 细胞模型研究五倍子水提物的降糖机制 [J]. 华西药学杂志, 2011, 26(5): 447-450.
- [8] 潘国宇, 王广基, 孙建国, 等. 小檗碱对葡萄糖吸收的抑制作用 [J]. 药学报, 2003, 38(12): 911-914.
- [9] 王明贤, 胡思进. 柿叶黄酮对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(14): 232-234.
- [10] 陈 佩, 党 辉, 张秋香, 等. 两歧双歧杆菌 F-35 对 Caco-2 细胞中 α -葡萄糖苷酶活及葡萄糖转运的影响 [J]. 食品工业科技, 2013, 17(34): 177-184.
- [11] 夏毅伟, 韦莉萍, 谷 豪, 等. 桃胶多糖对 Caco-2 细胞模型吸收葡萄糖的影响 [J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2013, 15(2): 228-232.
- [12] Blais A, Bissonnette P, Berteloot A. Common characteristics for Na^+ -dependent sugar transport in Caco-2 cells and human fetal colon [J]. *J Membr Biol*, 1987, 99(2): 113-125.