

白背三七水提取物对 2 型糖尿病大鼠的降血糖作用及其机制

马正东, 陈 磊, 宋洪涛, 魏文树*

(南京军区福州总医院 药学科, 福建 福州 350025)

摘 要:目的 研究白背三七水提取物对 2 型糖尿病模型大鼠的降血糖作用及其机制。方法 以白背三七水提取物 ig 2 型糖尿病模型大鼠, 观察白背三七水提取物对血糖、血脂和血胰岛素水平及其他相关实验指标的影响。结果 白背三七水提取物可显著降低 2 型糖尿病模型大鼠的血糖, 改善其脂代谢和高胰岛素血症, 增加抗氧化酶活性, 减轻脂质过氧化, 保护血管内皮功能, 促进胰岛 β 细胞的修复。结论 白背三七对实验性 2 型糖尿病有较明显的治疗作用, 其机制可能与增强机体清除活性氧的能力、减轻氧自由基对胰岛 β 细胞的损伤、促进胰岛 β 细胞的修复等作用有关。

关键词:白背三七; 提取物; 2 型糖尿病

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)04-0623-04

白背三七 *Gynura divaricata* (L.) DC. 为菊科菊三七属植物, 其茎、叶性寒, 味咸、微辛, 具有清热、舒筋、止血、祛痰之功; 主治百日咳、风湿痛、骨折、创伤性出血、臃肿疮疖等^[1]。民间素有将白背三七地上部分作为食药两用之品, 广泛用于治疗高血压病、高脂血症及糖尿病等, 故有“神仙草”之称^[2]。白背三七的降糖药理作用已有报道^[3], 本实验采用大鼠 2 型糖尿病模型进一步研究白背三七水提取物的降糖作用及其机制。

1 材料

1.1 动物: SPF 级 SD 大鼠, 雄性, 体质量 150~180 g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 合格证号: SOXK (沪) 2005-0003。

1.2 药物: 白背三七地上部分采自福建省福州市郊区 (2006 年 3 月), 由第二军医大学生药教研室郑汉臣教授鉴定。取干燥药材并制备水提取液浓缩至适当浓度; 依文献方法^[4]测定总黄酮质量浓度, 每克药材含总黄酮 3.5 mg。盐酸二甲双胍为江苏苏中药业集团股份有限公司产品, 批号 070109。格列本脲为上海医药 (集团) 有限公司信宜制药总厂产品, 批号 070501。

1.3 试剂: 链脲佐菌素系 Sigma 产品; 肝糖元测定试剂盒、超氧化物歧化酶 (SOD) 测试盒及丙二醛 (MDA) 测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 胰岛素 (Ins) 放射免疫分析药盒、内皮素 (ET) 放射免疫分析药盒购自北京北方生物技术研究所; 兔抗胰岛素 (rabbit anti-insulin) 多克隆抗体、二步

法免疫组化检测试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.4 仪器: Optium 血糖/血酮仪及配套试纸, 美国雅培公司产品; HDC-2044 低速冷冻离心机, 科大创新股份有限公司中佳分公司产品; GC-1200Y 放射免疫计数器, 中国科学技术大学科技实业总公司中佳光电仪器公司产品; UV-2501PC 紫外-可见分光光度计, 日本岛津公司产品; AU-2700 全自动生化分析仪, Olympus 公司产品。

2 实验方法

2.1 糖尿病动物模型的建立: 本实验采用高糖高脂饲料喂养合并小剂量链脲佐菌素诱导制备 2 型糖尿病大鼠模型^[5-7]。SD 大鼠适应性饲养 1 周后, 随机抽取 8 只作为对照组喂常规饮料, 其余大鼠喂高糖高脂饲料。饲料组成: 10.0% 猪油、20.0% 蔗糖、2.5% 胆固醇、1.0% 胆酸盐、66.5% 常规饲料, 委托福建医科大学实验动物中心制作。喂养 30 d 后禁水 12 h, 然后以 30 mg/kg 剂量 ip 2% 链脲佐菌素溶液制备 2 型糖尿病 (T2DM) 模型, 72 h 后剪尾采血检测血糖, 以血糖超过 16.7 mmol/L 为成功模型纳入实验。

2.2 实验分组与给药: 取糖尿病模型大鼠 40 只随机分为 5 组, 每组 8 只。其中 1 组为模型组, 其余 4 组为给药组, 即二甲双胍 (25 mg/kg) 组, 格列本脲 (2 mg/kg) 组, 白背三七水提取物低、高剂量 (10、20 g/kg) 组。各组大鼠均每日 1 次 ig 给药, 对照组和模型组给予等体积的生理盐水, 连续 30 d。给药

①收稿日期: 2009-06-14

基金项目: 福建省科技计划重点项目 (2008Y0086); 福建省卫生厅中医药科研项目 (wzy0606)

作者简介: 马正东 (一), 男, 中药学硕士, 主要从事中药药理研究。Tel: (0591) 22859972 E-mail: chen1974lei@sina.com

* 通讯作者 魏文树 Tel: (0591) 22859477 E-mail: sohoto@vip.sohu.com

期间对照组给予常规饲料喂养,其余各组动物继续喂以高糖高脂饲料。

2.3 生化指标检测:实验期间分别于 0、10、20、30 d 剪尾取血检测血糖。给药结束后,大鼠 ip 戊巴比妥钠 (45 mg/kg) 进行麻醉,心脏取血 7~10 mL,分离血清,−20 ℃ 冰箱保存待测。采用 AU-2700 型全自动生化分析仪检测血糖、血脂水平,并测定 SOD 和 MDA 水平,放射免疫法检测血清 Ins、血浆 ET。剖取新鲜肝脏,生理盐水冲洗后测定肝糖元水平。检测方法均按试剂盒说明书进行。

2.4 组织病理学检查:采血后处死大鼠,立即切取胰腺组织,将胰腺组织置于 10% 甲醛溶液固定后,常规石蜡包埋进行连续石蜡切片,厚 4 μm 连续取两张邻片进行展片,共展两套切片。分别用于 HE 染色、免疫组化检查。

2.5 统计学分析:实验数据均用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理,各项指标结果 $\bar{x} \pm s$ 表示,显著性检验采用 *t* 检验和方差分析。

3 结果

3.1 白背三七水提取物对 T2DM 模型大鼠血糖的影响:白背三七水提取物具有较好的降血糖作用,与二甲双胍和格列本脲的作用相近,以给药 30 d 作用较为明显,起效较慢。结果见表 1。

表 1 白背三七水提取物对 T2DM 大鼠的降血糖作用 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 8)

Table 1 Hypoglycemic effect of *G. divaricata* water extract on T2DM rats ($\bar{x} \pm s$, *n* = 8)

组别	剂量/ (g · kg ⁻¹)	血糖/(mmol · L ⁻¹)			
		0 d	10 d	20 d	30 d
对照	-	6.1 ± 1.8	6.5 ± 1.7	6.4 ± 1.6	6.4 ± 1.9
模型	-	19.0 ± 2.2 ^{##}	19.8 ± 2.4 ^{##}	20.2 ± 2.2 ^{##}	20.6 ± 1.8 ^{##}
二甲双胍	0.025	19.3 ± 2.0	16.2 ± 2.5 [*]	14.0 ± 2.7 ^{**}	10.8 ± 2.5 ^{**}
格列本脲	0.002	19.3 ± 2.1	16.5 ± 2.2 [*]	14.7 ± 2.4 ^{**}	11.6 ± 2.2 ^{**}
白背三七水提取物	10	19.3 ± 2.9	18.1 ± 2.8	16.5 ± 2.7 [*]	14.5 ± 2.3 ^{**}
	20	19.4 ± 2.6	17.9 ± 3.3	16.0 ± 2.5 [*]	13.0 ± 2.7 ^{**}

与对照组比较: ^{##} *P* < 0.01

与模型组比较: ^{*} *P* < 0.05 ^{**} *P* < 0.01

^{##} *P* < 0.01 vs control group

^{*} *P* < 0.05 ^{**} *P* < 0.01 vs model group

3.2 白背三七水提取物对 T2DM 模型大鼠血脂、血清胰岛素、肝糖元的影响:结果显示白背三七水提取物、二甲双胍和格列本脲对改善糖尿病脂质代谢紊乱有较好作用,且有一定的量效关系。对 T2DM 大鼠高胰岛素血症有较好的改善作用,对肝糖原有一定的升高作用。结果见表 2。

3.3 白背三七水提取物对 T2DM 模型大鼠血中

SOD 活性和 MDA 水平的影响:白背三七水提取物能使大鼠血清 SOD 活力较明显升高,MDA 水平明显下降,且有明显的量效关系,作用优于二甲双胍和格列本脲组,表明白背三七能增强糖尿病大鼠活性氧清除机制,有较强的减轻氧自由基损伤、抑制脂质过氧化的作用,结果见表 3。

表 2 白背三七水提取物对 T2DM 大鼠血脂、血清胰岛素、肝糖元的影响 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 8)

Table 2 Effect of *G. divaricata* water extract on lipids, serum insulin, and liver glucogen in T2DM rats ($\bar{x} \pm s$, *n* = 8)

组别	剂量/ (g · kg ⁻¹)	TC/ (mmol · L ⁻¹)	TC/ (mmol · L ⁻¹)	血清胰岛素/ (μIU · mL ⁻¹)	肝糖原/ (mg · g ⁻¹)
对照	-	1.72 ± 0.16	1.25 ± 0.12	19.08 ± 2.10	35.68 ± 5.35
模型	-	3.04 ± 0.14 ^{##}	3.16 ± 0.20 ^{##}	36.00 ± 4.23 ^{##}	21.07 ± 2.45 ^{##}
二甲双胍	0.025	2.22 ± 0.25 [*]	2.06 ± 0.15 [*]	24.76 ± 3.46 [*]	31.21 ± 2.90 [*]
格列本脲	0.002	2.25 ± 0.21 [*]	2.14 ± 0.18 [*]	28.54 ± 3.39 [*]	25.00 ± 2.03 [*]
白背三七	10	2.83 ± 0.23	2.78 ± 0.17 [*]	25.13 ± 2.86 [*]	21.09 ± 2.46
水提取物	20	2.65 ± 0.11 [*]	2.41 ± 0.16 ^{**} △△	28.04 ± 3.65 [*]	25.49 ± 3.13 [*] △

与对照组比较: ^{##} *P* < 0.01

与模型组比较: ^{*} *P* < 0.05 ^{**} *P* < 0.01

与白背三七水提取物低剂量组比较: △ *P* < 0.05 △△ *P* < 0.01
^{##} *P* < 0.01 vs control group; ^{*} *P* < 0.05 ^{**} *P* < 0.01 vs

model group; △ *P* < 0.05 △△ *P* < 0.01 vs *G. divaricata* water extract low-dose group

表 3 白背三七水提取物对 T2DM 大鼠血中 SOD 活性和 MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 8)

Table 3 Effect of *G. divaricata* water extract on SOD activity and MDA level in serum of T2DM rats ($\bar{x} \pm s$, *n* = 8)

组别	剂量/(g · kg ⁻¹)	SOD (U · mg ⁻¹)	MDA/ (nmol · g ⁻¹)
对照	-	84.26 ± 9.25	42.47 ± 5.42
模型	-	41.84 ± 5.66 ^{##}	82.49 ± 11.15 ^{##}
二甲双胍	0.025	63.36 ± 6.56 [*]	52.43 ± 7.66 [*]
格列本脲	0.002	61.62 ± 4.80 [*]	54.07 ± 10.15 [*]
白背三七水提取物	10	69.59 ± 7.52 [*]	55.87 ± 7.20 [*]
	20	75.42 ± 8.58 ^{**} ▲	47.62 ± 7.36 ^{**} △

与对照组比较: ^{##} *P* < 0.01; 与模型组比较: ^{**} *P* < 0.01;

与白背三七水提取物低剂量组比较: △ *P* < 0.05

与二甲双胍和格列本脲组比较: ▲ *P* < 0.05

^{##} *P* < 0.01 vs control group

^{**} *P* < 0.01 vs model group

△ *P* < 0.05 vs *G. divaricata* water extract low-dose group

▲ *P* < 0.05 vs metformin and glibenclamide group

3.4 白背三七水提取物对 T2DM 模型大鼠血管内皮功能的影响:结果显示白背三七水提取物低、高剂量组血清 NO 水平明显高于模型组,血浆 ET 水平明显低于模型组 (*P* < 0.01),表明其可能对糖尿病大鼠的血管内皮功能具有一定的保护作用;二甲双

胍和格列本脲也有相似的作用,结果见表 4。

表 4 白背三七水提取物对 T2DM 大鼠血清 NO 水平和血浆 ET 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Table 4 Effect of *G. divaricata* water extract on NO level of serum and ET level of plasma in T2DM rats ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组 别	剂量/ (g · kg ⁻¹)	NO/ (μmol · L ⁻¹)	ET/ (pg · mL ⁻¹)
对照	-	84.26±9.25	223.25±48.22
模型	-	41.84±5.66 [#]	362.28±60.57 [#]
二甲双胍	0.025	63.36±6.56 [*]	233.44±50.84 [*]
格列本脲	0.002	61.62±4.80 [*]	257.35±49.81 [*]
白背三七水提取物	10	69.59±7.52 [*]	311.08±36.71 [*]
	20	75.42±8.58 [*]	240.59±45.46 [*] △

与对照组比较: [#] $P<0.01$

与模型组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$

与白背三七水提取物低剂量组比较: △ $P<0.05$

[#] $P<0.01$ vs control group

^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs model group

△ $P<0.05$ vs *G. divaricata* water extract low-dose group

3.5 白背三七水提取物对 T2DM 大鼠胰岛病理组织学的影响

3.5.1 HE 染色结果: 对照组胰岛数目较多, 轮廓规则, 胰岛内细胞排列整齐, 胞浆饱满, 细胞界限清楚。模型组胰岛数目较少, 胰岛内形态欠规则, 细胞排列紊乱, 颜色深, 中央部位 β 细胞数量减少, 胰岛细胞空泡变性, 细胞间质和细胞间界限不清晰。二甲双胍组和白背三七低剂量组可见胰岛体积小, 数目减少, 颜色浅, 中央部位 β 细胞数量减少, 细胞间质和细胞间界限不清晰。格列本脲组和白背三七高剂量组可见胰岛体积小, 数目减少, 颜色浅, 中央部位 β 细胞数量减少, 胰岛细胞无空泡变性, 细胞间质和细胞间界较清晰 (图 1)。结果提示白背三七能减轻 T2DM 胰岛 β 细胞的损害。

3.5.2 免疫组化染色结果: 免疫组化染色后胰岛 β

细胞为棕褐色的免疫反应阳性, 多位于胰岛中央, 占据胰岛的绝大部分, 排列紧密, 细胞界限较清楚, 多数呈圆形或椭圆形, 免疫反应阳性物质分布于细胞质内; 胰岛素分泌颗粒呈颗粒状, 细胞质内分泌颗粒丰富, 界限较清楚, 着色深; 未经染色的核呈空泡状, 呈圆形或椭圆形, 居中。模型组呈免疫阳性反应的 β 细胞数目明显减少, 着色浅, 细胞结构不规则, 分泌颗粒模糊不清。各药物处理组与 T2DM 模型组比较, 免疫反应阳性细胞数量相对较多, 细胞轮廓较清楚, 胞质内分泌颗粒较多, 着色较深, 但细胞间仍有较大的空白区域。其中白背三七高剂量组较低剂量组改善作用更为明显, 与对照组相比较为接近 (图 2)。结果表明白背三七组能减轻 β 细胞损害或促进其修复。

4 讨论

本实验结果显示白背三七水提取物对实验性 T2DM 具有较理想的降血糖效应, 起效温和缓慢, 在给药后 10 d 发挥作用, 以实验结束时 (30 d) 降血糖作用最为明显, 作用与二甲双胍和格列本脲相当。同时, 还能改善 T2DM 大鼠脂质代谢紊乱和高胰岛素血症, 增强活性氧清除机制, 减轻病理组织学损害; 其增加 2 型糖尿病大鼠血清 NO 水平, 降低血浆 ET 水平, 提示能改善 T2DM 血管内皮功能, 阻抑糖尿病血管病变。白背三七水提取物的这些作用对防治糖尿病及其慢性并发症的发生、发展可能具有重要意义, 值得进一步研究和开发。

研究表明氧自由基产生增多和抗氧化能力减弱是糖尿病发生糖、脂代谢紊乱的重要机制。糖尿病可由于糖代谢紊乱导致机体葡萄糖自身氧化、蛋白非酶糖化、肾素-血管紧张素系统激活及代谢应激等, 机体活性氧的产生大量增加^[8-9]; 同时, 由于抗氧化酶系发生糖化或氧化, 导致机体自由基清除能

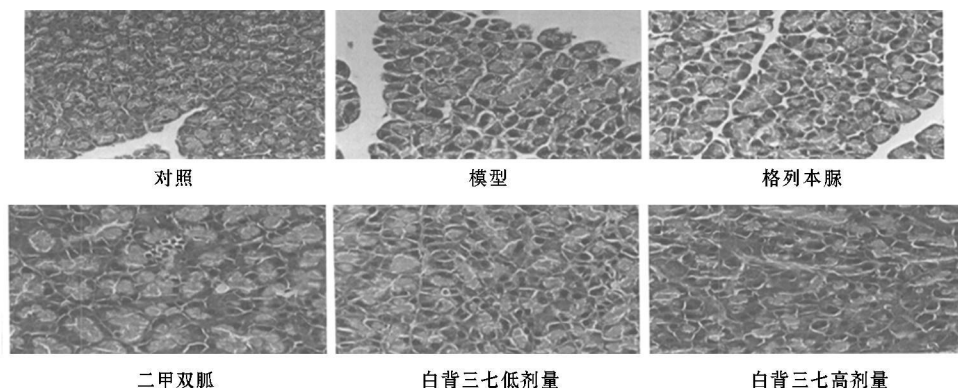


图 1 T2DM 大鼠胰岛 HE 染色结果

Fig. 1 HE Staining results of langerhans islands in T2DM rats

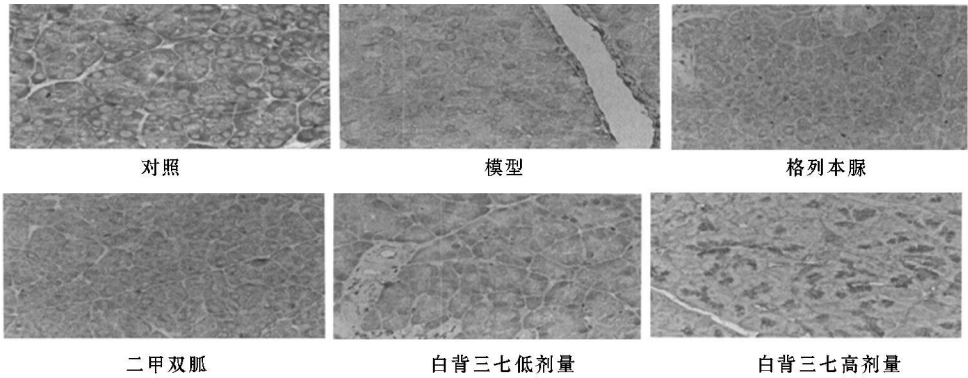


图 2 T2DM 大鼠胰岛免疫组化染色结果

Fig. 2 Immunohistochemistry results of langerhans islands in T2DM rats

力下降,故糖尿病时机体氧化应激水平明显升高,氧自由基产生增多并与 NO 结合,形成有害的 ONOO⁻,引起血管内皮细胞等多方面损害^[10]。成细华等^[11]针对糖代谢及抗氧化应激方面,研究了左归复方对转基因 2 型糖尿病小鼠的干预治疗作用。根据实验结果推测,白背三七水提取物对 T2DM 的作用机制可能与其能改善糖和脂质代谢,增强机体对活性氧的清除能力,减轻氧自由基对胰岛 β 细胞损害有关。胰岛 β 细胞 HE 染色和免疫组化形态学观察的结果也表明,白背三七水提取物组的 β 细胞和胞质内分泌颗粒相对较多,着色较深,且在外分泌部腺泡细胞间可见到单个免疫反应阳性细胞,提示白背三七水提取物除了对胰岛 β 细胞有一定的保护作用,还可能促使胰岛 β 细胞的修复与增生。

参考文献:

[1] 江苏新医学院. 中药大词典 [M]. 上册. 上海:上海人民出版社, 1977.
[2] 冼寒梅,周蓉,刘雯,等. 白子菜不同药用部位挥发油的含量测定及其气相色谱-质谱联用分析 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(4): 858-859.
[3] 胡勇,李维林,林厚文,等. 白背三七地上部分降血糖作

用研究 [J]. 西南林学院学报, 2007, 27(1): 55-58
[4] 王津江,陈磊,宋洪涛,等. 白背三七总黄酮的提取工艺研究 [J]. 中国药师, 2009, 12(2): 146-149
[5] 洪丽莉,许冠荪,申国明,等. 1 SD 大鼠 2 型糖尿病模型的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2005, 15(6): 379-381
[6] 周迎生,高妍,李斌,等. 1 高脂喂养联合链脲佐菌素注射的糖尿病大鼠模型特征 [J]. 中国实验动物学报, 2005, 13(3): 154-159
[7] Talpur N, Echard B, Ingram C, et al. Effects of a novel formulation of essential oils on glucose-insulin metabolism in diabetic and hypertensive rats: a pilot study [J]. Diabetes Obes Metab, 2005, 7(2): 193-199
[8] Antonio C, Roberta A, Roberto D R, et al. Effect of atorvastatin and irbesartan, alone and in combination, on postprandial endothelial dysfunction, oxidative stress, and inflammation in type 2 diabetic patients [J]. Circulation, 2005, 111: 2518-2524
[9] Onozato M I, Tojo A, Goto A, et al. Oxidative stress and nitric oxide synthase in rat diabetic nephropathy: effect of ACEI and ARB [J]. Kidney Int, 2002, 61(1): 186-195
[10] Meigs J B, Hu F B, Rifai N, et al. Biomarkers of endothelial dysfunction and risk of type 2 diabetes mellitus [J]. JAMA, 2004, 291(16): 1978-1984
[11] 成细华,喻荣,吴勇军,等. 左归复方对 MKR 转基因 2 型糖尿病小鼠糖代谢及抗氧化应激的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(11): 1675-1679

(上接第 587 页)

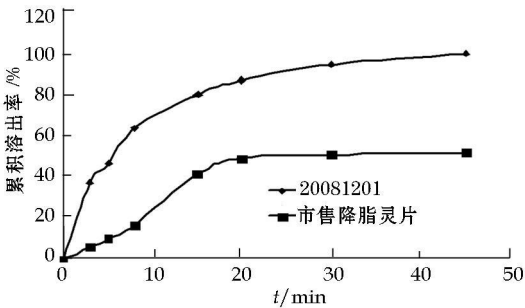


图 2 样品和降脂灵片的溶出度比较

Fig. 2 Comparison of dissolution between sample and Jiangzhiling Tablets

3 讨论

降脂灵分散片以制何首乌中二苯乙烯苷为有效成分。分散片的特征是遇水可迅速崩解形成均匀的混悬液,综合了片剂和液体制剂的优点,大剂量服用方便、吸收快、生物利用度高。但崩解并不等于溶出,所以对降脂灵分散片的溶出度进行了研究,并将其加入质量标准中,从而更好地控制降脂灵分散片的溶出情况。

参考文献:

[1] 中国药典[S]. 二部1 附录U 0 C73-74. 2005