

金线莲降血糖活性部位的筛选

唐 菲^{1,3}, 张小琼^{1,3}, 徐江涛^{1,3}, 蔡金艳⁴, 张锦文^{2*}, 张勇慧^{1,3}

1. 华中科技大学同济医学院药学院, 湖北 武汉 430030
2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院, 湖北 武汉 430030
3. 湖北省天然药物化学与资源评价重点实验室, 湖北 武汉 430030
4. 广东药学院药学院, 广东 广州 510006

摘要: 目的 筛选金线莲降血糖作用的活性部位。方法 将糖尿病模型大鼠随机分为7组, 另设对照组, 各组给药4周后, 测定大鼠血糖、超氧化物歧化酶(SOD)活性, 观察胰腺组织病变程度。结果 金线莲正丁醇部位能显著降低糖尿病大鼠的血糖, 使糖尿病大鼠血清中 SOD 活性升高, 减轻链脲佐菌素(STZ)对胰岛及胰腺细胞的损伤, 减少细胞凋亡。结论 金线莲的正丁醇部位是其降血糖的主要活性部位, 其降血糖机制可能与提高大鼠抗氧化能力以及减轻胰岛及胰腺细胞损伤, 减少细胞凋亡有关。

关键词: 金线莲; 降血糖; 活性部位筛选; 抗氧化; 胰岛素

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)02- 0340 - 03

Screening on hypoglycemic effective part of *Anoectochilus roxburghii*

TANG Fei^{1,3}, ZHANG Xiao-qiong^{1,3}, XU Jiang-tao^{1,3}, CAI Jin-yan⁴, ZHANG Jin-wen², ZHANG Yong-hui^{1,3}

1. School of Pharmacy of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China
2. Hospital Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China
3. Hubei Key Laboratory of Natural Pharmacochimistry and Resources Evaluation, Wuhan 430030, China
4. School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

Key words: *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.; hypoglycemic effect; activity part screening; anti-oxidantive activity; insulin

金线莲别名金蚕、金线兰、金石松、金线虎头蕉、金线入骨消, 为兰科开唇兰属植物花叶开唇兰 *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. 的干燥全草, 是多年生珍稀中草药^[1]。其民间用药较广, 有清凉解毒、滋阴降火、消炎止痛之功效, 对无名肿痛、发烧、止泻、蛇伤均有显著疗效, 且无不良反应, 使用安全, 多用其治疗糖尿病、高血脂、乙型肝炎等疾病^[2]。有学者对金线莲做过初步研究, 研究表明金线莲全草水煎液具有较好的降血糖作用, 其降血糖作用的有效成分主要存在于金线莲的大极性组分中, 而中等极性、低极性组分无降糖作用^[3]。此外, 关于金线莲的降血糖作用机制还有待深入研究。本课题组为探寻金线莲发挥降血糖作用的主要活性成分, 对金线莲的不同提取物进行降血糖活性筛选, 为进一步从金线莲中分离有效成分提供实验依据。

1 材料

1.1 实验动物

普通级雄性 Wistar 大鼠, 体质量 (170±20) g, 由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。

1.2 药物的提取与分离

金线莲干燥全草 10 kg, 粉碎, 甲醇加热回流提取 6 次, 每次 2 h, 合并提取液, 减压浓缩得总浸膏。总浸膏用蒸馏水混悬, 依次用石油醚、醋酸乙酯、正丁醇萃取, 萃取液和其余水溶液分别浓缩成浸膏, 得石油醚部分 0.29 kg、醋酸乙酯部分 0.20 kg、正丁醇部分 1.0 kg 和水部分 1.50 kg。

1.3 试剂和仪器

链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 购自美国 Sigma 公司, 临用前以 0.1 mol/L 柠檬酸-柠檬酸三钠缓冲液 (pH 4.0~4.5) 溶解, 配制成 8 mg/mL 备

收稿日期: 2010-04-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30400585); 教育部新世纪优秀人才支持计划 (NCET-08-0224); 华中科技大学自主创新基金重点项目 (09514009); 武汉综合性新药研究开发技术大平台新药研究项目 (2009ZX09301-014)

作者简介: 唐 菲 (1985—), 女, 河北唐山人, 硕士研究生, 主要从事天然药物活性成分及中药新药开发研究。

Tel: (027)83657870 E-mail: tangfei985@163.com

*通讯作者 张锦文 Tel: (027)836663232 E-mail: health08@sina.com

用; 阳性药物盐酸二甲双胍原料药(山东力诺科峰制药有限公司)取3 g溶于100 mL纯净水, 配成30 mg/mL备用; 超氧化物歧化酶(SOD)测试盒(南京建成生物工程研究所); FreeStyle Blood Glucose Monitoring System 利舒坦血糖仪及专用试纸。

2 方法

2.1 动物模型建立、分组及给药

取雄性 Wistar 大鼠 48 只, 适应性喂养 3 d, 其中 42 只禁食过夜后 ip 50 mg/kg STZ 建立糖尿病模型^[4], 72 h 后测定血糖值, 血糖高于 11.1 mmol/L 大鼠为模型成功大鼠。将 STZ 诱导成功的高血糖模型大鼠随机分成模型组、阳性对照组、石油醚部位给药组、醋酸乙酯部位给药组、正丁醇部位给药组、水部位给药组、总浸膏给药组, 正常大鼠设为对照组, 每组 6 只。

模型建立后第 5 天, 即血糖明显升高时开始 ig 给药, 金线莲各提取部位给药剂量折算成生药剂量均为 4 g/kg, 模型组给予同体积生理盐水, 阳性对照组每日给予 60 mg/kg 盐酸二甲双胍, 对照组常规喂养。连续 4 周, 每日观察记录体质量、饮食、饮水、垫料, 糖尿病模型大鼠呈现典型的多食、多饮、多尿及体质量减轻的“三多一少”症状。隔日检测尿糖水平, 每 3 天检测血糖值。

表 1 金线莲不同提取部位对大鼠血糖和血清 SOD 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Effects of different extract fractions from dry herb of *A. roxburghii* on blood glucose and SOD activity in serum of diabetic rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	血糖值/(mmol·L ⁻¹)		SOD 活性/(U·mL ⁻¹)
		给药前	给药后	
对照	—	6.80 ± 1.30	7.20 ± 1.00**	109.32 ± 11.05*
模型	—	23.37 ± 5.23	27.43 ± 0.63	38.70 ± 11.47
二甲双胍	0.06	26.97 ± 1.44	11.76 ± 4.99**	109.38 ± 2.30*
石油醚部位	4	27.63 ± 0.21	23.67 ± 4.69	99.80 ± 17.03*
醋酸乙酯部位	4	25.13 ± 2.52	23.85 ± 3.20*	96.5 ± 1.90*
正丁醇部位	4	24.73 ± 2.87	8.55 ± 0.92**	127.45 ± 12.30*
水部位	4	25.53 ± 4.32	24.02 ± 3.65	104.39 ± 28.04*
总浸膏	4	25.15 ± 3.75	23.80 ± 3.40*	125.83 ± 16.71*

与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group

3.3 HE 染色结果

模型组胰岛体积缩小, 细胞数目减少, 细胞皱缩, 可见空泡变性, 胰岛周围胰腺腺泡细胞结构局灶性破坏, 轮廓不清, 炎症反应均不明显。各给药组胰岛可见不同程度的组织损伤, 其中正丁醇组胰岛及胰腺腺泡损伤有所减轻, 见图 1。

2.2 SOD 活性测定

实验 4 周后, 乙醚-氯仿(2:1)麻醉大鼠, 仰卧固定, 剪去心脏部位的被毛, 用 75 % 酒精消毒皮肤, 心脏取血, 2 000 r/min 离心, 吸取上层血清, 按试剂盒说明操作测定 SOD 的活性。

2.3 胰岛及胰腺的病理检查

剪开大鼠腹腔, 取胰腺, 用 10% 福尔马林浸泡, 固定、染色、镜检, HE 染色观察病理组织学变化, TUNEL 技术观察胰岛及胰腺细胞凋亡情况。

2.4 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行组间 t 检验。

3 结果

3.1 对大鼠血糖的影响

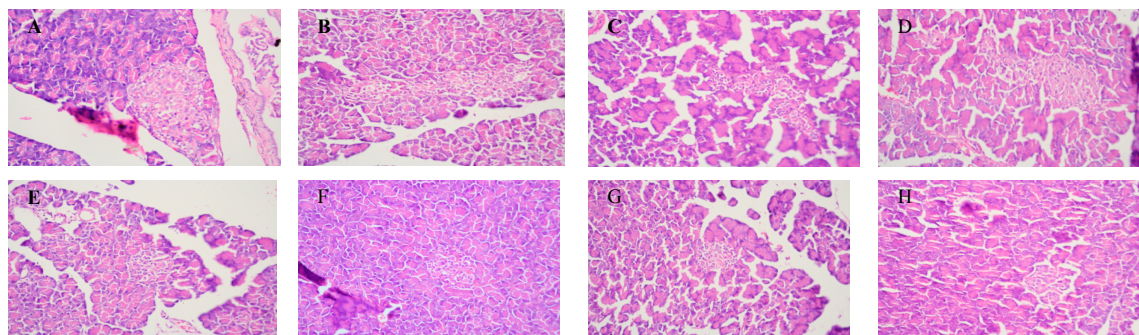
给药前, 模型组大鼠血糖与对照组相比明显升高, 表明糖尿病模型建立成功。给药 4 周后, 对照组、阳性对照组、正丁醇组与模型组相比差异非常显著 ($P<0.01$), 醋酸乙酯组和总浸膏组血糖比模型组降低, 差异显著 ($P<0.05$), 结果见表 1。

3.2 对 SOD 活性的影响

与模型组相比所有给药组大鼠血清 SOD 活性均有显著升高 ($P<0.05$), 表明金线莲和阳性药物均能增强糖尿病大鼠的抗氧化能力, 其降血糖作用可能与抗氧化作用相关, 见表 1。

3.4 胰腺及胰岛细胞凋亡情况

凋亡细胞的细胞核呈棕色, 其他细胞核呈蓝色。各组均呈现一定程度细胞凋亡, 其中模型组胰岛可见大量棕黄色细胞核, 多数为凋亡 β 细胞, 阳性组、石油醚组、正丁醇组细胞凋亡程度相对较轻, 其他给药组胰岛 β 细胞和腺泡细胞大量凋亡, 见图 2。



A-对照组 B-模型组 C-阳性对照组 D-石油醚组 E-醋酸乙酯组 F-正丁醇组 G-水部位组 H-总浸膏组, 图 2 同
A-control group B-model group C-positive control group D-petroleum ether group E-ethyl acetate group
F-*n*-butyl alcohol group G-water group H-total extract group, Fig. 2 is same

图 1 各组大鼠胰腺组织病理切片 HE 染色图

Fig. 1 Pathological slices of pancreatic tissues in every group of rats after HE stained

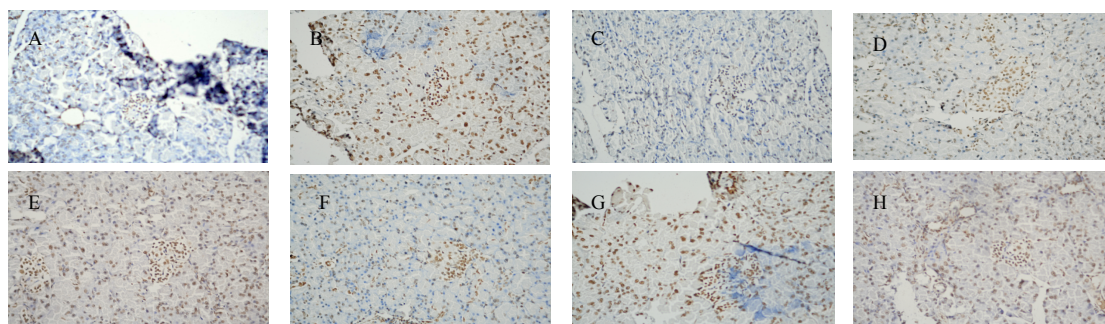


图 2 各组大鼠胰腺组织病理切片 TUNEL 染色图

Fig. 2 Pathological slices of pancreatic tissues in every group of rats after TUNEL stained

4 讨论

在同等剂量(按生药计算)条件下,金线莲各提取部位对糖尿病大鼠的降血糖实验发现,正丁醇部位呈现明显的血糖逆转作用,其改善血糖作用不仅优于总膏组和其他极性部位,甚至优于阳性药盐酸二甲双胍,提示正丁醇部位中某些极性较大成分对 STZ 诱导的糖尿病大鼠具有较好的防治作用,且在萃取分离的过程中成功实现了物质分离与活性分离平行的效果,可能排除了某些拮抗物质对降血糖作用的影响。有文献报道^[5]从金线莲大极性提取部位中得到大量金线莲糖苷成分,推测其为该植物降血糖主要活性成分。

金线莲各给药组和阳性对照组的 SOD 活性均明显高于模型对照组,表明该高血糖模型的发生和发展机制可能与抗氧化作用有密切的相关性。在活性追踪过程中将对降血糖的活性成分及抗氧化方面进行降血糖机制的进一步研究。

STZ 含有亚硝基,能通过释放 NO 和增加自由基损伤胰岛 β 细胞或诱导 β 细胞凋亡,HE 染色和 TUNEL 技术检查胰腺组织病理切片实验结果表明,STZ 诱导的糖尿病模型的发生和发展与胰岛 β 细胞的损伤或凋亡程度有一定的相关性。

参考文献

- [1] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编 [M]. 下册. 北京: 人民卫生出版社, 1992.
- [2] 福建中医药研究所. 福建药物志 [M]. 第二册. 福州: 福建科技出版社, 1982.
- [3] 陈卓, 黄自强. 金线莲及其提取物降血糖实验研究 [J]. 福建医科大学学报, 2000, 34(4): 350-351.
- [4] 周巧霞, 张经硕, 茅彩萍, 等. XGY 对糖尿病小鼠的降血糖作用及其机制研究 [J]. 苏州大学学报: 医学版, 2006, 26(4): 575-578.
- [5] Du X M, Su N Y, Takashi T, et al. Higher yielding isolation of kinsenoside in *Anoectochilus* and its anti-hyperliposis effect [J]. *Biol Pharm Bull*, 2001, 24(1): 65-69.