

木香降血糖有效部位及有效成分研究

金 清¹, 白晓华², 邓亚飞¹, 李学刚¹, 袁吕江^{1*}

1. 西南大学药学院, 重庆 400716

2. 洛阳理工学院, 河南 洛阳 471000

摘要: 目的 筛选木香中降血糖活性部位及主要成分。方法 制备木香乙醇提取物, 乙醇提取物醋酸乙酯部位、正丁醇部位和水提取部位; 用 HepG2 细胞消耗葡萄糖模型和四氧嘧啶致糖尿病小鼠模型测定各提取物的降血糖活性; 降血糖活性强的醋酸乙酯部位用柱色谱法继续分离、精制, 得 2 个化合物, 经 NMR 等鉴定化合物结构; 并对 2 个化合物进行降血糖活性研究。结果 木香醋酸乙酯部位有较强的降血糖作用, 从木香醋酸乙酯部位中分离得到木香羟内酯和去氢木香内酯, 且两者均可降低四氧嘧啶所致糖尿病小鼠的血糖, 并显示很好的抗氧化作用。结论 木香羟内酯和去氢木香内酯可能是木香的降血糖活性成分, 抑制氧化应激从而减轻胰岛素抵抗可能是其降血糖机制。

关键词: 木香; 木香羟内酯; 去氢木香内酯; 降血糖; 活性成分筛选; 抗氧化; 胰岛素抵抗

中图分类号: R285.5; R977.15 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)07-1371-05

Active hypoglycemic fractions and constituents in roots of *Aucklandia lappa*

JIN Qing¹, BAI Xiao-hua², DENG Ya-fei¹, LI Xue-gang¹, YUAN Lv-jiang¹

1. College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400716, China

2. Luoyang Institute of Science and Technology, Luoyang 471000, China

Abstract: **Objective** To screen the active constituents in hypoglycemic fractions in the roots of *Aucklandia lappa*. **Methods** The ethyl acetate fraction and butyl fraction were prepared by isolating the ethanol extracts in the roots of *A. lappa* using ethyl acetate and butyl alcohol, and the remaining water phase was named as water extract. The hypoglycemic effects of these fractions were first screened in glucose consume test by HepG2 cells, and then confirmed by alloxan-induced diabetic mice. The ethyl acetate fraction with high hypoglycemic activity was further purified using column chromatography, from which two compounds were obtained. They were costunolide and dehydrocostus lactone. Their structures were evaluated by NMR and their hypoglycemic activities were studied. **Results** The ethyl acetate fraction was more hypoglycemic than butyl alcohol fraction and water extract. Costunolide and dehydrocostus lactone purified from ethyl acetate fraction revealed the significant hypoglycemic effect on alloxan-induced diabetic mice and also had anti-oxidative activities. **Conclusion** Costunolide and dehydrocostus lactone isolated from the roots of *A. lappa* exert hypoglycemic activity through the inhibition of oxidative stress, thereby reducing insulin resistance.

Key words: *Aucklandia lappa* Decne.; costunolide; dehydrocostus lactone; hypoglycemic; active constituent screening; anti-oxidant; insulin resistance

木香为菊科植物木香 *Aucklandia lappa* Decne. 的根, 有行气止痛、健脾消食之功效, 主要用于治疗和缓解胸胁、脘腹胀痛、泻痢后重、食积不消、不思饮食等症状^[1]。煨木香实肠止泻, 用于泄泻腹痛。有关木香化学成分研究的报道较多, 主要集中在倍半萜类化合物, 如木香羟内酯和去氢木香内酯等^[2]。有报道称木香水提取物无降血糖作用, 而木香醇提物降血糖作用的研究尚未见报道^[3]。细胞对葡萄糖的消耗常被用来筛选降血糖药物, 本实验采

用 HepG2 细胞消耗葡萄糖模型和四氧嘧啶致糖尿病小鼠模型, 研究木香乙醇提取物, 乙醇提取物醋酸乙酯部位、正丁醇部位和水提取部位的降血糖活性, 为木香应用于治疗糖尿病提供参考。

1 材料

1.1 药材与试剂

木香来自重庆开县木香 GAP 基地, 由西南大学生药学教研室徐晓玉教授鉴定为菊科植物木香 *Aucklandia lappa* Decne. 的干燥根; 木香羟内酯(批

收稿日期: 2011-08-26

作者简介: 金 清, 硕士研究生, 研究方向为中药药理。E-mail: jinqing7777@126.com

*通讯作者 袁吕江 Tel: (021)68251503 E-mail: yuanlujiang@hotmail.com

号 11524-201006)、去氢木香内酯(批号 111525-200907)对照品,购自中国食品药品检定研究院;盐酸二甲双胍片,批号 20100802,湖北午时药业股份有限公司。RPMI 1640 培养基、胎牛血清, Gibco 公司;胰酶、2,7-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)、四氧嘧啶, Sigma 公司;葡萄糖、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)试剂盒,均为南京建成生物工程研究所产品;其他化学试剂均为分析纯。

1.2 仪器

Thermo 6500 型 CO₂ 培养箱; EOS bravo Plus 型全自动生化分析仪; JJ—CJ—2 型洁净工作台; Zeiss xiover40 CFL 倒置显微镜; F4500 型荧光分光光度计, 日本日立公司; LC—6AD 液相色谱系统、LC-Solution 色谱工作站、SPD—M20A 紫外检测器(190~800 nm), 均为日本岛津公司产品。

1.3 动物

昆明种雄性小鼠, SPF 级, 体质量(20±2) g, 购自重庆医科大学实验动物中心, 动物许可证号 SCXK(渝) 20070001。

1.4 细胞

人肝癌细胞株 HepG2, 中国典型培养物保藏中心提供。

2 方法

2.1 木香提取物的制备

木香粉碎, 分别用 10、8、6 倍量 85%乙醇水浴回流 2、1.5、1.5 h, 滤过, 滤液合并、浓缩得 85%乙醇提取物(乙醇提取物)。乙醇提取物用水混悬后, 分别用醋酸乙酯、正丁醇萃取, 得醋酸乙酯部位和正丁醇提取部位及水层残余物(水提取物部位)。

2.2 木香各提取物主要成分测定^[4]

2.2.1 色谱条件 C₁₈ 色谱柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水(65:35); 体积流量 1 mL/min, 检测波长为 225 nm, 进样量 10 μL。

2.2.2 对照品、供试品溶液的制备 取木香内酯对照品、去氢木香内酯对照品适量, 精密称定, 分别加甲醇制成 0.1 mg/mL 对照品溶液。取木香各提取物浸膏, 精密称定, 分别加甲醇制成 1 mg/mL 的溶液, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液即为供试品溶液。

2.3 HepG2 细胞消耗葡萄糖检测^[5]

2.3.1 细胞培养 HepG2 细胞复苏后置于含 10% 灭活小牛血清的 RPMI 1640 培养基中并转入 100 mL

培养瓶中, 在 37 ℃、5% CO₂ 条件下培养。细胞贴壁长满后, 倾去培养基, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 每 3 天按 1:3 的比例传代 1 次, 取对数生长期的细胞用于实验。

2.3.2 分组与给药 将 HepG2 细胞置于含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基中并转入 48 孔板中, 待细胞长至 80%~90% 融合后, 将 RPMI 1640 培养基更换成无血清的培养基。细胞分为对照组、二甲双胍(5 mg/L)阳性对照组及木香醋酸乙酯部位组、正丁醇部位组及水提取部位组、乙醇提取物组, 各提取物质量浓度均分别为 1、5、10 mg/L, 每个质量浓度平行 6 孔。上述各组细胞给药后孵育 24 h, 用葡萄糖临床检测试剂盒检测培养基细胞上清液中葡萄糖的量, 计算 24 h 葡萄糖消耗量。

2.4 对四氧嘧啶致糖尿病小鼠的影响

2.4.1 模型制备 小鼠禁食 12 h 后, 尾 iv 四氧嘧啶 65 mg/kg, 注射后正常饲养 72 h, 禁食 12 h 后取尾静脉血测定小鼠血糖, 血糖值>11 mmol/L 的小鼠作为糖尿病模型小鼠^[6]。

2.4.2 分组与给药 糖尿病模型小鼠随机分为 8 组, 每组 10 只, 给药组分别 ig 给予木香醋酸乙酯部位 400、200、100 mg/kg, 木香正丁醇部位 400、200、100 mg/kg、二甲双胍片 100 mg/kg, 给药体积均为 10 mL/kg, 每日给药 1 次, 连续 16 d。另设正常对照组, 该组与模型组小鼠均给予等体积蒸馏水。第 17 天禁食不禁水 12 h 后, 尾静脉取血测定空腹血糖^[7]。

2.5 醋酸乙酯部位活性成分分离

取木香醋酸乙酯部位浸膏 35 g 进行硅胶柱色谱分离, 石油醚、石油醚-醋酸乙酯(50:1、20:1、10:1、5:1)、醋酸乙酯、丙酮、甲醇快速洗脱, 浓缩, 8 个洗脱组分的量分别为 0.78、11.37、10.74、0.69、3.42、2.71、5.33 g。石油醚-醋酸乙酯(50:1、20:1)洗脱部分有晶体析出, 经重结晶分别得到化合物 1 和 2, 进行 NMR 等鉴定并与相关文献数据比对^[8], 鉴定化合物 1 为去氢木香内酯, 化合物 2 为木香内酯。

2.6 化合物 1 和 2 对糖尿病小鼠血糖和 SOD、MDA 水平的影响

按“2.4.1”项下方法制备糖尿病模型小鼠, 取模型小鼠 40 只随机分为 4 组, 每组 10 只, 分别为去氢木香内酯组、木香内酯组, 给药剂量均为 25 mg/kg^[9], 二甲双胍片组给药剂量为 100 mg/kg, 各

组小鼠均每天 ig 给药 1 次, 连续给药 20 d; 模型组小鼠 ig 生理盐水; 另取 10 只正常小鼠, ig 给予等体积蒸馏水, 作为对照组。第 18 天糖尿病小鼠禁食不禁水 12 h 后尾静脉取血, 测定空腹血糖值; 第 20 天摘眼球取血, 按试剂盒方法测定血清 SOD、MDA 水平。

2.7 化合物 1 和 2 对高糖处理 HepG2 细胞内活性氧的影响

采用 DCFH-DA 检测细胞内活性氧水平^[10-11]。HepG2 细胞在 24 孔板中用高糖培养基 (含葡萄糖 50 mmol/L、血清 10% 的 RPMI 1640 培养基) 培养 48 h 后, 给药组加入去氢木香内酯、木香炔内酯 (终质量浓度均为 1、5、10、15、20 mg/L) 培养 24 h。收集各组细胞置于含 DCFH-DA 20 μ mol/L 的无血清培养基中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 后取出, 用荧光分光光度计测定 DCF 的平均荧光强度, 激发波长 488 nm, 发射波长 535 nm, 计算抑制率。

抑制率 = (高糖处理细胞荧光值 - 药物处理细胞荧光值) / 高糖处理细胞荧光值

2.8 统计学处理

实验结果采用 SPSS18.0 进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 木香各提取物中主要成分测定

木香乙醇提取物醋酸乙酯部位含木香炔内酯与去氢木香内酯分别为 22.5%、30.2%; 木香正丁醇部位和水提取部位均不含这 2 种化合物; 木香乙醇提取物中含木香炔内酯与去氢木香内酯分别为 3.9% 和 4.4%。

3.2 各提取物对 HepG2 细胞消耗葡萄糖的影响

表 1 结果显示, 木香醋酸乙酯部位组 HepG2 细胞消耗葡萄糖的量随给药质量浓度的增加而增加, 与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$ 、 0.01), 表明该部位明显促进肝癌细胞 HepG2 吸收葡萄糖, 5 mg/L 时的作用略强于同质量浓度的二甲双胍, 10 mg/L 时的作用优于乙醇提取物。木香正丁醇部位 1 mg/L 时 HepG2 细胞消耗葡萄糖的量与模型组无显著差异, 在 10 mg/L 时与模型组相比差异明显 ($P < 0.05$)。木香水提取部位组细胞消耗葡萄糖的量与模型组无显著差异。木香乙醇提取物组明显促进 HepG2 细胞吸收葡萄糖 ($P < 0.05$ 、 0.01), 且随给药质量浓度的增加作用增强, 但作用略弱于相同质量浓度的二甲双胍。由上述结果可知, 木香乙醇提取物及其醋酸乙酯部位、正丁醇部位能较好地促进

表 1 木香各提取物对 HepG2 细胞吸收葡萄糖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of each extract from roots of *A. lappa* on glucose absorption in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	$\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	24 h 葡萄糖消耗量 / ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	组别	$\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	24 h 葡萄糖消耗量 / ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)
对照	—	1.874 3 $\pm$ 0.034 0	水提取部位	1	1.879 9 $\pm$ 0.077 2
醋酸乙酯部位	1	2.642 0 $\pm$ 0.016 9 [▲]		5	1.903 5 $\pm$ 0.018 8
	5	2.972 0 $\pm$ 0.064 6 ^{▲▲}		10	1.891 7 $\pm$ 0.039 7
	10	3.890 9 $\pm$ 0.053 8 ^{▲▲}	乙醇提取物	1	2.568 9 $\pm$ 0.079 7 [▲]
正丁醇部位	1	1.936 7 $\pm$ 0.093 2		5	2.849 6 $\pm$ 0.087 1 ^{▲▲}
	5	2.032 1 $\pm$ 0.020 1		10	3.110 2 $\pm$ 0.037 3 ^{▲▲}
	10	2.344 0 $\pm$ 0.031 6 [▲]	二甲双胍	5	2.883 1 $\pm$ 0.046 9 ^{▲▲}

与对照组比较: [▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$

[▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$ vs control group

HepG2 细胞吸收葡萄糖, 进而对木香醋酸乙酯部位、正丁醇部位进行降血糖活性测定。

3.3 木香醋酸乙酯部位和正丁醇部位对糖尿病小鼠血糖的影响

木香醋酸乙酯部位的降血糖作用随其剂量的增加而增强, 在 400 mg/kg 时小鼠的血糖水平与模型组相比差异显著 ($P < 0.01$)。木香正丁醇部位 100、200、400 mg/kg 3 个剂量的降血糖作用轻微, 糖尿

病小鼠的血糖水平与模型组相比无显著差异。结果见表 2。

3.4 木香炔内酯和去氢木香内酯对糖尿病小鼠血糖及 SOD 和 MDA 水平的影响

与对照组相比, 其他各组小鼠造模后血糖水平明显升高 ($P < 0.01$)。给药 18 d 后, 去氢木香内酯和木香炔内酯组糖尿病小鼠的血糖水平显著降低 ($P < 0.01$), 与二甲双胍的作用相当。去氢木香内酯

表 2 木香醋酸乙酯和正丁醇部位对四氧嘧啶致糖尿病小鼠血糖水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of ethyl acetate and butyl fractions in roots of *A. lappa* on blood glucose levels of alloxan-induced diabetic mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	血糖 / (mmol·L ⁻¹)	
		给药前	给药后
对照	—	3.57 ± 0.21	3.25 ± 1.48
模型	—	17.19 ± 4.54	17.66 ± 3.80
醋酸乙酯部位	100	14.42 ± 5.40	13.92 ± 3.39
	200	15.33 ± 3.41	11.52 ± 4.06*
	400	16.31 ± 3.06	10.75 ± 2.04**
正丁醇部位	100	15.03 ± 5.68	14.93 ± 6.37
	200	17.25 ± 4.81	16.12 ± 5.97
	400	17.44 ± 4.76	15.63 ± 4.90
二甲双胍	100	15.79 ± 5.28	10.61 ± 3.08**

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

表 3 木香桉内酯和去氢木香内酯对糖尿病小鼠血糖水平及 SOD 和 MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effects of costunolide and dehydrocostus lactone on blood glucose level and activities of SOD and MDA in alloxan-induced diabetic mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	血糖 / (mmol·L ⁻¹)		SOD / (U·mg ⁻¹)	MDA / (nmol·mL ⁻¹)
		给药前	给药第 18 天		
对照	—	5.5 ± 1.55	4.9 ± 1.67	178.66 ± 10.15	3.28 ± 0.40
模型	—	24.1 ± 3.33 ^{▲▲}	22.98 ± 3.10	120.14 ± 6.62	6.15 ± 0.31
木香桉内酯	25	22.38 ± 5.06 ^{▲▲}	14.25 ± 3.13**	151.93 ± 12.7**	5.74 ± 0.29*
去氢木香内酯	25	21.65 ± 5.71 ^{▲▲}	15.68 ± 2.90**	145.12 ± 12.46**	5.46 ± 0.53**
二甲双胍	100	21.77 ± 6.25 ^{▲▲}	14.16 ± 5.02**	125.78 ± 13.2*	4.98 ± 0.61**

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

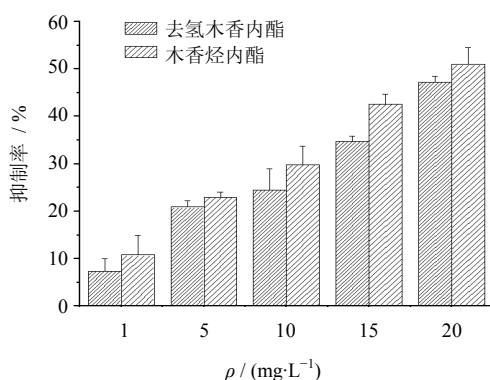


图 1 木香桉内酯和去氢木香内酯对高糖处理 HepG2 细胞产生活性氧的影响

Fig. 1 Effects of costunolide and dehydrocostus lactone on ROS level in high glucose-treated HepG2 cells

和木香桉内酯可显著增强糖尿病小鼠血清 SOD 活性 ($P < 0.01$), 二甲双胍也具有增强 SOD 活性的作用 ($P < 0.05$)。木香桉内酯、去氢木香内酯、二甲双胍均能显著降低糖尿病小鼠血清中 MDA 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结果见表 3。

3.5 木香桉内酯与去氢木香内酯对 HepG2 细胞内活性氧的影响

由图 1 可知木香桉内酯和去氢木香内酯可以明显抑制细胞中活性氧产生的量, 随着剂量的增加, 可以显著抑制细胞活性氧的产生, 且木香桉内酯的效果略优于去氢木香内酯, 表明两者对高糖细胞产生的活性氧有较好的抑制作用, 因而可以减弱氧化应激造成的机体损伤。

4 讨论

本研究利用肝细胞消耗葡萄糖模型和四氧嘧啶致糖尿病小鼠模型, 筛选出木香中降血糖活性部位为乙醇提取物的醋酸乙酯部位, 并从中分离出去氢

木香内酯和木香桉内酯。有研究表明, 木香桉内酯对链脲佐菌素诱导的大鼠糖尿病有较好的降血糖作用^[12]。由于去氢木香内酯与木香桉内酯的结构相似, 故推测两者为木香降血糖的有效成分, 本实验结果验证了这 2 个化合物的确有较好的降血糖作用, 并且作用略强于阳性对照药物二甲双胍片, 提示去氢木香内酯和木香桉内酯作为抗糖尿病先导化合物具有广阔的开发前景。糖尿病的发生、发展与自由基的关系是近年来糖尿病研究的热点^[13], 有研究表明胰岛素抵抗是机体在细胞水平上对活性氧产生过多的一种生理性防御机制^[14], 且氧化应激是引起胰岛 β 细胞功能缺陷并加剧其恶化的主要原因^[15]。SOD、MDA 和活性氧是反映体内氧化损伤

的重要指标, 木香烯内酯和去氢木香内酯降血糖机制可能与减少体内活性氧的量, 提高机体抗脂质氧化能力, 增强 SOD 活力, 减轻胰岛素抵抗有关。但这 2 个化合物具体抗糖尿病作用机制有待于进一步的深入研究, 木香中是否还存在其他降血糖有效部位及有效成分也尚需进一步研究确认。

参考文献

- [1] 王绪颖, 贾晓斌, 陈彦. 木香类药材的研究进展 [J]. 中药材, 2010, 33(1): 153.
- [2] 张婷, 王洪庆, 杜冠华, 等. 云木香化学成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(10): 1223.
- [3] 熊曼琪, 张横柳, 朱章志, 等. 黄皮叶、小叶山绿豆、广木香降血糖作用的实验研究 [J]. 广州中医学院学报, 1994, 11(1): 41-44.
- [4] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [5] 朱家颖, 岑晓凤, 陈星, 等. 黄连生物碱降糖活性协同作用研究 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(9): 2282-2284.
- [6] 田冬娜, 吴斐华, 马世超. 风轮菜乙醇提取物的降血糖作用及其机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 11(33): 1313-1316.
- [7] 赵川, 乔卫, 张彦文, 等. 委陵菜抗糖尿病有效部位及有效成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(6): 680-682.
- [8] 杨辉, 谢金伦, 孙汉董. 云木香化学成分研究 I [J]. 云南植物研究, 1997, 19(1): 1-3.
- [9] Eliza J, Daisya P, Ignacimuth S. Antioxidant activity of costunolide and eremanthin isolated from *Costus speciosus* [J]. *Chem Biol Interact*, 2010, 188(3): 467-472.
- [10] 张赛丹, 彭振宇, 刘韶, 等. 甲基莲心碱对 LPC 诱导内皮细胞损伤的保护作用及与 ADMA 的关系 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(21): 2526-2528.
- [11] Karthikeyan C, Kavitha S, Suvro C, *et al.* Apoptosis in HepG2 cells exposed to high glucose [J]. *Toxicol In Vitro*, 2010, 24(2): 387-396.
- [12] James E, Pitchai D, Savarimuthu I, *et al.* Normoglycemic and hypolipidemic effect of costunolide isolated from *Costus speciosus* Sm. in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Chem Biol Interact*, 2009, 179(2/3): 329-334.
- [13] 杨月莲, 梁瑜祯. 氧化应激与 2 型糖尿病 [J]. 医学综述, 2008, 14(3): 429-431.
- [14] Fridlyand L E, Philipson L H. Reactive species and early manifestation of insulin resistance in type 2 diabetes [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2006, 8(2): 136-145.
- [15] Pessler D, Rudich A, Bashan N. Oxidative stress impairs nuclear proteins binding to the insulin responsive element in the GLUT4 promoter [J]. *Diabetologia*, 2001, 44(12): 2156-2164.