

藏药美多罗米抗糖尿病药效物质基础研究

罗培¹, 刘圆², 谭正怀³, 张志锋^{2*}

1. 澳门科技大学 中药质量研究国家重点实验室, 中国 澳门

2. 西南民族大学少数民族药物研究所, 四川 成都 610041

3. 四川省中医药科学院, 四川 成都 610041

摘要: 目的 考察藏药美多罗米抗糖尿病药效物质基础。方法 多舌飞蓬 *Erigeron multiradiatus* 为美多罗米原植物之一。利用萃取、大孔树脂柱色谱法对多舌飞蓬的化学成分进行提取分离, 通过体外醛糖还原酶抑制反应探讨其药效部位。制备链脲佐菌素致糖尿病大鼠模型, 将糖尿病大鼠随机分成4组, 模型组(蒸馏水), 依帕司他(10 mg/kg)阳性对照组和多舌飞蓬提取物II低、高剂量(200、400 mg/kg)组, 各组ig相应药物, 每天1次, 连续给药11周。观察大鼠一般状态, 检测体质量、血糖、尿糖、血流动力学及心功能参数等的变化。结果 多舌飞蓬提取物I和提取物II对醛糖还原酶活性均有抑制作用, IC₅₀分别为0.64、0.12 mg/mL。与模型组相比, 提取物II高剂量组大鼠体质量增加, 血糖水平降低, 心率提高, 左心室平均舒张末期压(LEVDP)及最大上升速率(+dp/dt_{max})升高($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。结论 提取物II具有明显的醛糖还原酶抑制活性, 能够改善血流动力学行为, 保护心脏功能, 为美多罗米抗糖尿病药效物质基础。

关键词: 美多罗米; 多舌飞蓬; 总黄酮; 醛糖还原酶; 降血糖

中图分类号: R977.15; R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)14-1962-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.14.018

Study on antidiabetic constituents of Tibetan Medicine Meiduoluomi

LUO Pei¹, LIU Yuan², TAN Zheng-huai³, ZHANG Zhi-feng²

1. State Key Laboratory for Quality Research of Chinese Medicines, Macau University of Science and Technology, Macau, China

2. Ethnic Pharmaceutical Institutes, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China

3. Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041, China

Abstract: Objective To study the antidiabetic constituents of Tibetan Medicine “Meiduoluomi”. **Methods** *Erigeron multiradiatus* (EM) is one of the crude materials. The chemical constituents in EM were extracted and isolated by extraction and macroporous resin column. The inhibitory activities of the extracts against aldose reductase (AR) were evaluated *in vitro* to make sure the active fragments. Diabetic rats induced by streptozotocin were randomly divided into four groups: model (distilled water), positive control (epalrestat 10 mg/kg), EM II low- and high-dosage (200, 400 mg/kg) groups. The rats were ig administered once daily for 11 weeks. The rat normal sign, body weight, urine glucose, blood glucose, hemodynamics, and cardiac function parameters were determined. **Results** Both EM I and EM II showed the inhibitory activities against AR with IC₅₀ values of 0.64 and 0.12 mg/mL, respectively. Compared with diabetic group, body weight, heart rate, left ventricular end diastolic pressure average (LEVDP) and the left ventricular maximum rate of pressure development (+dp/dt_{max}) in EM II group were significantly improved, while blood glucose was decreased ($P < 0.05$, 0.01, 0.001). **Conclusion** EM II demonstrates the obvious inhibitory activity on AR, and could improve the hemodynamics and protect heart function, which may be the antidiabetic active constituents of “Meiduoluomi”.

Key words: Meiduoluomi; *Erigeron multiradiatus* (Lindl.) Benth.; total flavonoids; aldose reductase; hypoglycemia

糖尿病发病机制复杂, 血糖控制及防治多器官并发症是目前质量糖尿病药物研发面临的主要问题。醛糖还原酶可能作为多元醇通路的限速酶参与

血糖变化及心血管并发症的发生^[1], 因此开发有效抑制醛糖还原酶活性的天然产物对糖尿病治疗具有较大意义。藏药美多罗米, 最早收载于《晶珠本草》,

收稿日期: 2012-12-16

基金项目: 国家科技支撑计划课题(2012BAI27B07); 澳门特别行政区科学技术发展基金(073/2011/A3)

作者简介: 罗培, 女, 四川宜宾人, 药理学博士, 助理教授, 从事天然产物药理活性及作用机制研究。E-mail: pluo@must.edu.mo

*通信作者 张志锋 E-mail: zhangzhf99@gmail.com

用于治疗瘟病时疫等^[2], 多舌飞蓬 *Erigeron multiradiatus* (Lindl.) Benth. 为其原植物之一, 主要分布于我国川西高原地区, 在藏医药中以全草入药。前期研究表明, 黄酮类为其主要活性成分^[3-5]。多舌飞蓬总黄酮作用广泛, 具有抗氧化、抗炎、调节免疫系统功能等作用, 但目前尚未见其抗糖尿病研究的报道。因此本实验采用萃取和大孔树脂柱色谱法对多舌飞蓬进行提取分离, 以醛糖还原酶活性和链脲佐菌素 (STZ) 诱导的大鼠糖尿病模型, 考察多舌飞蓬不同提取物对醛糖还原酶的抑制活性和对大鼠血糖水平、血流动力学及心功能的影响, 探讨多舌飞蓬治疗糖尿病的药效部位, 为研发新的醛糖还原酶抑制剂提供实验依据。

1 材料

1.1 药材与试剂

美多罗米药材, 采自四川省甘孜藏族自治州康定县新都桥, 经张志锋副教授鉴定为多舌飞蓬 *Erigeron multiradiatus* (Lindl.) Benth. 的干燥全草。D141 大孔吸附树脂, 成都晨光化工研究设计院; STZ, 美国 Enzo Life Sciences 公司; 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH), Sigma 公司; *D, L*-甘油醛, ICN Biomedicals 公司; 芦丁 (质量分数 > 98%), 中国药品生物制品检定所, 批号 100080-200707; 依帕司他, 扬子江制药公司, 批号 081201, 规格 50 mg/片。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器

UV-2401 紫外分光亮度计, 日本岛津公司; JPS-III 型血糖检测仪, 北京怡成生物电子技术有限公司; RM-6000 八导生理记录仪, 日本光电工业株式会社。

1.3 动物

雄性 SD 大鼠, 体质量 220~260 g, 10 周龄, SPF 级, 由四川省中医药科学院实验动物中心提供, 生产合格证号: SCXK (川) 2005-19。

2 方法

2.1 提取物制备

提取物 I (EMI): 取多舌飞蓬干燥全草, 粉碎成粗粉, 以 6 倍体积水加热回流 1 h, 提取 3 次, 合并提取液, 减压浓缩、干燥即得, 收率为 20.4%。以芦丁为对照品, 经紫外分光光度法测定总黄酮质量分数为 20.8%。

提取物 II (EM2): 取浓缩前提取物 I, 浓缩至适当浓度, 加置已预处理的 D141 大孔吸附树脂柱,

以 5 倍柱体积水洗脱至基本无色, 再用 4 倍柱体积的 70% 乙醇洗脱, 收集乙醇液, 减压浓缩、干燥即得, 收率为 5.2%。以芦丁为对照品, 经紫外分光光度法测定总黄酮质量分数为 75.2%。

2.2 对醛糖还原酶活性的影响

2.2.1 大鼠晶状体匀浆制备^[6] 取 10 只大鼠晶状体, 加入 pH 6.2 的磷酸缓冲溶液, 匀浆后在 4 °C、10 000 r/min 离心 20 min, 取上清液 -70 °C 冷冻保存。醛糖还原酶匀浆活力为 6.5 U/mg 用于实验。酶活力采用在实验条件下单位时间转化 NADPH 为 NADP⁺ 的量进行计算。

2.2.2 醛糖还原酶活性实验 提取物用 DMSO 溶解, 临用前稀释成一系列不同质量浓度: 提取物 I 0.08~1.6 mg/mL, 提取物 II 0.02~0.4 mg/mL, 阳性对照依帕司他 0.02~0.25 mg/mL。实验温度 25 °C, 酶反应总体积 200 μL: 酶液 20 μL, 0.104 mmol/L NADPH 50 μL, 10 mmol/L *D, L*-甘油醛 50 μL, 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 6.2) 以及不同质量浓度的提取物溶液。加入底物 *D, L*-甘油醛开始反应, 以每分钟 NADPH 340 nm 处吸光度 (*A*) 的下降值表示醛糖还原酶的活性的变化, 每 10 s 测定 1 次, 反应时间 10 min, 计算醛糖还原酶抑制率。

$$\text{醛糖还原酶抑制率} = 1 - (A_2 - A_0) / (A_1 - A_0)$$

其中 A_0 为未加醛糖还原酶、底物和提取物, 即每分钟 NADPH 自然 *A* 的下降值; A_1 为未加提取物, 加入醛糖还原酶、底物, 每分钟 NADPH *A* 的下降值; A_2 为加醛糖还原酶、底物和提取物, 每分钟 NADPH *A* 的下降值

以提取物质量浓度为横坐标, 抑制率为纵坐标, 绘制抑制曲线, 计算半数抑制浓度 (IC₅₀)。实验开始前醛糖还原酶离心后用 PBS 稀释 100 倍。每个样品 3 个复孔。

2.3 对糖尿病大鼠的影响

2.3.1 糖尿病大鼠模型建立 STZ 临用前于冰浴中以 0.1 mol/L 枸橼酸钠缓冲液配制, 微孔滤膜滤过, 灭菌, ip 给予大鼠 60 mg/kg 1 次, 72 h 后取尾血测定血糖水平, 血糖值 ≥ 16.5 mmol/L 作为糖尿病大鼠成模的标准。

2.3.2 分组及给药 选取对醛糖还原酶抑制活性较强的提取物 II 进行实验。将造模成功的 50 只糖尿病大鼠随机分为 4 组: 模型组 (14 只), 依帕司他 (10 mg/kg) 组、提取物 II 低、高剂量 (200、400 mg/kg) 组 (均 12 只), 另取正常大鼠 10 只作为对照组。各给药组大鼠均 ig 给药, 每天 1 次, 持续 11

周, 对照组和模型组给予等量蒸馏水。

2.3.3 指标观察 造模后大鼠每周测体质量, 调整给药量。于给药第 6、11 周测定 24 h 尿糖和血糖水平。采集 24 h 收集的尿样, 采用专业试纸测定尿糖值。大鼠尾静脉取血, 血糖仪及试纸检测血糖水平。给药 11 周后大鼠 ip 戊巴比妥钠 25 mg/kg 麻醉, 仰位固定, 分离暴露右侧颈总动脉, 结扎远心端, 近心端用动脉夹夹闭, 将压力传感器插入左心室, 连接八导生理记录仪, 检测左心室平均收缩压 (LVSP)、左心室平均舒张末压 (LVEDP)、平均左心室内压最大上升速率 ($+dp/dt_{max}$) 及最大下降速率 ($-dp/dt_{max}$), 并同步记录心率。

2.4 数据统计

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, SPSS17.0 统计分析软件包处理实验数据, 多组间比较采用单因素方差分析和 LSD 法。

3 结果

3.1 提取物 I 和 II 对醛糖还原酶活性的影响

提取物 I 和 II 对醛糖还原酶均有一定的抑制作用, 且随提取物质量浓度的升高, 抑制作用逐渐增强, 表明多舌飞蓬提取物对醛糖还原酶的抑制作用呈质量浓度相关性, 但提取物 I 的抑制作用明显低于提取物 II。提取物 I 和 II 对醛糖还原酶的 IC_{50} 分别为 0.64、0.12 mg/mL, 当提取物 II 质量浓度达 0.2 mg/mL 时, 对醛糖还原酶的抑制率与依帕司他接近。以上结果提示多舌飞蓬中黄酮类成分可能是其抑制醛糖还原酶活性的药效部位。结果见图 1。

3.2 提取物 II 对糖尿病大鼠一般状态和体质量的影响

模型组大鼠一般状态较差, 精神萎靡、反应迟钝、毛竖立且无光泽、动作迟缓、弓背蜷体, 部分大鼠尾部皮肤角化或有溃烂, 并在造模第 3 周开始

有腹胀、腹泻等消化不良症状, 第 9 周 1 只大鼠死亡。依帕司他组及提取物 II 400 mg/kg 组大鼠一般情况较模型组有所改善, 实验过程中无大鼠死亡, 手术中各有 1 只死亡。模型组大鼠的体质量增长速度明显小于对照组。依帕司他组, 提取物 II 200、400 mg/kg 组均可不同程度地增加糖尿病大鼠的体质量, 其中依帕司他组、提取物 II 400 mg/kg 组大鼠体质量均给药后第 5 周开始增加, 与模型组比较差异显著 ($P < 0.01$), 结果见表 1。

3.3 提取物 II 对糖尿病大鼠血糖和尿糖水平的影响

对照组大鼠尿糖均呈阴性, 模型组及给药组大鼠尿糖均呈强阳性。与对照组相比, 模型组大鼠血糖在整个实验期间明显升高 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 依帕司他组给药 11 周后, 大鼠血糖下降明显 ($P < 0.01$); 提取物 II 400 mg/kg 组降血糖作用也较显著 ($P < 0.05$), 而提取物 II 200 mg/kg 组作用不显著。结果见表 2。

3.4 提取物 II 对糖尿病大鼠血流动力学及心功能的影响

在给药结束后, 与对照组相比, 模型组大鼠心率减慢, LVSP 轻度下降, 左心室收缩及舒张变化速率绝对值变小, 而 LVEDP ($P < 0.01$)。依帕司他和提取物 II 组能不同程度地改善糖尿病大鼠心率、LVSP、LVEDP、左心室收缩及舒张时间变化率等指标; 其中提取物 II 400 mg/kg 组大鼠心率明显加快, LVEDP 明显降低, 左心室收缩速率明显升高 ($P < 0.05$), 而提取物 II 200 mg/kg 组仅能改善糖尿病大鼠心率和 LVEDP, 对其他心功能指标无明显作用。结果见表 3。

4 讨论

糖尿病并发症与多元醇代谢通路有关, 其可直接导致大血管病变, 如动脉粥样硬化、微血管病变等^[7], 醛糖还原酶为该通路的关键限速酶。醛糖还原酶的特异性较差, 可催化多种醛 (包括醛形式的葡萄糖) 还原为相应的醇。醛糖还原酶抑制剂能有效抑制醛糖还原酶的活性, 预防和延迟糖尿病并发症的发生及发展。然而, 目前所使用的醛糖还原酶抑制剂大部分为化学合成品, 售价高并有一定的副作用。因此, 研发安全和有效的天然醛糖还原酶抑制剂已成为国内治疗糖尿病药物研究领域的热点。有研究表明, 多种中药提取物, 如紫苏、山地蒿、穿心莲等对醛糖还原酶具一定抑制作用^[8-9], 且毒性较低。然而这些提取物通常由于水溶性较差,

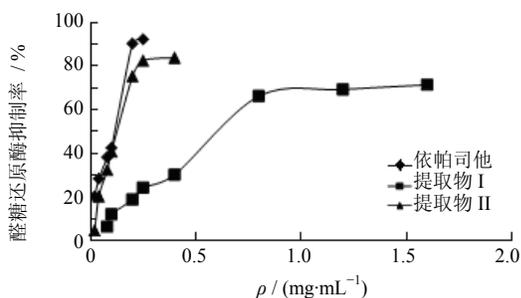


图 1 多舌飞蓬提取物对醛糖还原酶的影响 ($n = 3$)

Fig. 1 Effects of extracts from EM on AR ($n = 3$)

表1 多舌飞蓬提取物II对STZ致糖尿病大鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of EM II on body weight of STZ-induced diabetic rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	动物数 / 只	体质量 / g					
			造模前	给药后1周	给药后2周	给药后3周	给药后4周	给药后5周
对照	—	10	266.0±43.4	301.8±42.2	342.4±54.2	410.2±57.3	445.1±62.3	474.4±66.5
模型	—	13	262.1±19.2	254.8±20.1*	266.5±28.6**	274.3±43.4**	284.3±48.5**	269.6±50.4**
提取物II	200	12	255.2±18.6	250.6±23.4	253.9±35.6	259.8±55.9	274.4±53.5	267.8±61.0
	400	11	260.4±8.7	265.6±16.4	274.4±26.0	283.5±31.2	283.3±33.5 ^{###}	330.9±38.5 ^{###}
依帕司他	10	11	259.2±15.5	253.3±16.2	281.0±28.3	296.2±34.5	310.3±37.3	348.6±45.5 ^{###}

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	动物数 / 只	体质量 / g					
			给药后6周	给药后7周	给药后8周	给药后9周	给药后10周	给药后11周
对照	—	10	502.3±63.7	528.2±71.2	552.2±68.0	564.1±83.4	592.1±84.2	614.3±86.3
模型	—	13	254.0±53.7**	277.7±61.3**	290.3±51.4***	281.4±49.3***	288.2±51.4***	305.7±41.3***
提取物II	200	12	271.4±70.2	266.8±72.9	274.2±81.7	281.2±80.9	298.1±90.3	290.9±117.3
	400	11	384.0±40.6 ^{###}	360.7±43.5 ^{###}	375.0±45.7 ^{###}	382.7±52.3 ^{###}	386.7±54.2 ^{###}	398.8±52.0 ^{###}
依帕司他	10	11	351.2±53.8 ^{###}	343.4±54.2 ^{###}	335.2±53.3 ^{###}	335.7±61.7 ^{###}	376.6±64.2 ^{###}	393.3±58.4 ^{###}

与对照组比较: *P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001; 与模型组比较: ^{###}P<0.01
^{*}P<0.05 ^{**}P<0.01 ^{***}P<0.001 vs control group; ^{###}P<0.01 vs model group

表2 提取物II对STZ诱导的糖尿病大鼠血糖水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of EM II on levels of serum glucose in STZ-induced diabetic rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	动物数 / 只	血糖 / (mmol·L ⁻¹)		
			给药前	给药6周后	给药11周后
对照	—	10	8.6±1.0	7.2±0.8	6.5±0.6
模型	—	13	24.3±4.2***	27.5±2.2***	23.7±2.2***
提取物II	200	12	27.4±1.2	27.6±0.2	21.6±2.0
	400	11	27.5±1.4	27.2±1.1	18.4±1.3*
依帕司他	10	11	26.8±1.3	27.0±1.6	15.4±1.6 ^{###}

与对照组比较: *P<0.05 ***P<0.001; 与模型组比较: ^{###}P<0.01
^{*}P<0.05 ^{***}P<0.001 vs control group; ^{###}P<0.01 vs model group

表3 多舌飞蓬提取物II对STZ致糖尿病大鼠的血液动力学参数和心功能的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of EM II on hemodynamic parameters and heart function in STZ-induced diabetic rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	动物数 / 只	心率 / min	LVSP / mmHg	LVEDP / mmHg	+dp/dt _{max} / (mmHg·s ⁻¹)	-dp/dt _{max} / (mmHg·s ⁻¹)
模型	—	13	210±23***	126±8***	14±1***	2 253±614***	2 213±652***
提取物II	200	12	302±26 [#]	130±15	10±1 [#]	2 653±407	2 613±335
	400	11	312±33 ^{###}	140±12	9±1 ^{###}	2 900±280 ^{###}	2 800±360
依帕司他	10	11	320±38 ^{###}	134±14	8±1 ^{###}	2 632±331	2 864±324 [#]

与对照组比较: ***P<0.001; 与模型组比较: [#]P<0.05 ^{###}P<0.01
^{***}P<0.001 vs control group; [#]P<0.05 ^{###}P<0.01 vs model group

相对化学药而言对醛糖还原酶的抑制活性较弱,因此临床应用受到一定限制。

本实验采用大孔树脂精制富集多舌飞蓬的总黄酮部位,该提取物在体外明显抑制醛糖还原酶活性,对STZ致糖尿病大鼠具有改善血流动力学行为、保护心功能的作用,有轻微调节血糖作用,但具体效应与相关机制不明,推测可能与其抗高血糖多器官损伤的作用有关。综上,本实验结果提示多舌飞蓬总黄酮是藏药“美多罗米”抗糖尿病的药效物质,可能作为一种新的醛糖还原酶抑制剂,用于开发防治糖尿病及其并发症的药物,因此值得进一步深入研究。

参考文献

- [1] Ramasamy R, Goldberg I J. Aldose reductase and cardiovascular diseases, creating human-like diabetic complications in an experimental model [J]. *Circ Res*, 2010, 14(9): 1449-1458.
- [2] 李波, 赵映梅. 多舌飞蓬化学成分的研究 [J]. *中草药*, 1999, 30(8): 561-562.
- [3] 张志锋, 吴春蕾, 刘圆, 等. 藏药多舌飞蓬不同提取物抗炎镇痛活性及急性毒性研究 [J]. *中草药*, 2009, 40(10): 1612-1614.
- [4] 张浩, 张志锋. 多舌飞蓬的生药学研究 [J]. *中草药*, 2004, 35(3): 321-323.
- [5] Zhang Z, Sun W, Luo P, *et al.* Simultaneous determination of five main active constituents of *Erigeron multiradiatus* by HPLC-DAD-MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 48(3): 980-985.
- [6] Hayman S, Kinoshita J H. Isolation and properties of lens aldose reductase [J]. *J Biol Chem*, 1965, 240: 877-882.
- [7] Frati A C, Hurtado R, Ariza C R, *et al.* Changes in ventricular function in diabetes mellitus. Relation to the duration of the diabetes and its complications [J]. *Arch Inst Cardiol Mex*, 1985, 55(2): 133-139.
- [8] Ha T J, Lee J H, Lee M H, *et al.* Isolation and identification of phenolic compounds from the seeds of *Perilla frutescens* (L.) and their inhibitory activities against alpha-glucosidase and aldose reductase [J]. *Food Chem*, 2012, 135(3): 1397-1403.
- [9] Jung H A, Islam M D, Kwon Y S, *et al.* Extraction and identification of three major aldose reductase inhibitors from *Artemisia montana* [J]. *Food Chem Toxicol*, 2011, 49(2): 376-384.