

白头翁水提物的抗2型糖尿病作用研究

林 仿^{1,2}, 任跃忠^{1*}

1. 浙江大学医学院附属第二医院 内分泌科, 浙江 杭州 310009

2. 宁波市第一医院 内分泌科, 浙江 宁波 315010

摘要: **目的** 研究白头翁水提物(AEPC)对链脲佐菌素(STZ)诱导大鼠2型糖尿病模型的降血糖作用。**方法** 传统水提法获得AEPC;口服葡萄糖耐量试验(OGTT)初步检测AEPC的降血糖效果;STZ诱导新生大鼠2型糖尿病模型,观察AEPC的降血糖效果,并检测血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、尿素、三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、总蛋白及胰岛素水平。RIN 5F细胞胰岛素释放实验探究AEPC抗糖尿病的作用机制。**结果** OGTT结果显示AEPC具有很好的降血糖效果,并且最优剂量为20 mg/kg;对新生大鼠2型糖尿病模型,20 mg/kg的AEPC处理20 d后表现出明显的降血糖效果,肝糖原水平及其他血清生化指标均恢复正常,与正常大鼠无差异;RIN 5F细胞胰岛素释放实验结果显示AEPC明显促进RIN 5F细胞胰岛素释放。**结论** AEPC具有降血糖的效果,其作用机制与促进胰岛 β 细胞释放胰岛素有关。

关键词: 白头翁;糖尿病;链脲佐菌素;RIN 5F细胞;胰岛素

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)23-3544-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.23.017

Study on antidiabetic effect of aqueous extract from *Pulsatilla chinensis*

LIN Fang^{1,2}, REN Yue-zhong¹

1. Department of Endocrinology, Second Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University. Hangzhou 310009, China

2. Department of Endocrinology, Ningbo First Hospital, Ningbo 315010, China

Abstract: **Objective** To study the blood glucose lowering activity of aqueous extract from *Pulsatilla chinensis* (AEPC) on Streptozocin (STZ)-induced type-2 diabetic rats. **Methods** AEPC was obtained through traditional aqueous extraction procedure; Oral glucose tolerance test was employed for the preliminary study of AEPC's blood glucose lowering activity; For further study, STZ-induced neonatal diabetic rat model was used, and the serum SGPT, SGOT, ALP, serum urea, triglycerides, total cholesterol, HDLC, total protein, and serum insulin were tested; The Kunming rats were used for acute toxicity experiments, with the highest dose of 1 000 mg/kg body weight; Insulin release from RIN 5F cells was performed to study the mechanism of AEPC on antidiabetes effect. **Results** Oral glucose tolerance test showed AEPC could lower the blood sugar, and the optimal activity was observed at a dose of 20 mg/kg body weight; In neonatal STZ-induced type-2 diabetic rats, treatment with 20 mg/kg AEPC for 20 d resulted in significant blood glucose lowering activity, liver glycogen and serum biological parameters back to normal; The acute toxicity results showed that no obvious toxicity was observed even at 1 000 mg/kg dose; At last, AEPC could promote the secretion of insulin from RIN 5F cells. **Conclusion** AEPC shows the anti-diabetes activity on STZ-induced type-2 diabetic rats, which may be the result of its effect on promoting insulin release from pancreatic α -cells.

Key words: *Pulsatilla chinensis* (Bge.) Regel; diabetes; Streptozocin; RIN 5F cells; insulin

白头翁 *Pulsatilla chinensis* (Bge.) Regel 属于毛茛科(Ranunculaceae)银莲花 *Anemone* L. 属多年生草本药用植物。在中国大多数省份如四川、安徽、江苏、湖北、河南、甘肃等均有分布^[1]。白头翁具有抗阴道毛滴虫、抗氧化、抗炎、杀虫、抗肿瘤等功效^[2], 具有很高的药用价值^[3]。实验研究发现其

提取物也表现出多种药理活性, 如白头翁正丁醇提取物对小鼠肝脏的保护作用^[4]及白头翁水溶液的抗炎^[5]、抗心律失常活性^[6]等。但白头翁的抗糖尿病研究还未见报道, 本实验研究白头翁水提物(aqueous extract from *Pulsatilla chinensis*, AEPC)的降血糖活性及其可能作用机制。

收稿日期: 2015-04-20

作者简介: 林 仿(1980—), 女, 浙江舟山人, 硕士研究生, 研究方向为内分泌以及代谢性疾病。

*通信作者 任跃忠, 主任医师。E-mail: renyuezhong@163.com

1 材料

1.1 药材、药品与试剂

白头翁(根部)药材购自北京同仁堂药店,经浙江大学生命科学院傅承新教授鉴定为白头翁 *Pulsatilla chinensis* (Bge.) Regel; 链脲佐菌素(STZ, 批号 79C-0027)、格列本脲(批号 024K0701)、尿素、三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、总蛋白检测试剂盒均购自 Sigma 公司; 胰岛素检测试剂盒(Crystal Chem 公司)。大小鼠繁殖饲料(北京华阜康生物科技有限公司); 聚山梨酯 80(上海索莱宝生物科技有限公司); 葡萄糖溶液(天津新郑股份有限公司)。

1.2 仪器

罗氏 GC 型血糖检测仪(ROCHE 公司); 分光光度计(上海美析仪器有限公司); 酶标仪(上海永创医疗器械有限公司)。

1.3 实验动物

Wistar 大鼠, 11~12 周龄, 动物合格证号 SCXK(京)-2009-0004, 购自北京华阜康生物科技有限公司。新生大鼠为雌雄大鼠性成熟后, 配种生育所得。大鼠均在统一的环境中喂养, 喂以大鼠繁殖饲料, 饲养间配以 12 h 光照/12 h 黑暗循环, 温度控制为 23~25 °C, 湿度为 45%~55%。所有动物实验操作步骤均在国家动物实验标准(GB/T 27416-2014)的指导下完成。

1.4 细胞

RIN 5F 细胞购自美国菌种保藏中心(ATCC)。由含 10%胎牛血清的 RPIM 1640 培养基培养, 内含 100 U/mL 青霉素、100 µg/mL 链霉素。培养条件为 37 °C、5% CO₂、95%湿度。

2 方法

2.1 AEPC 的制备

取白头翁药材 500 g, 每次加入 2 L 的双蒸水, 在烧杯中浸泡 30 min 后, 反复煎煮 3 次, 每次 20 min。收集煎煮所得药液, 浓缩得水提物浸膏, 用含 1%聚山梨酯-80 的水溶解成生药浓度为 1 g/mL 的 AEPC 储备液(经 HPLC 检测, 主要含有白头翁皂苷、白头翁素、小檗碱、药根碱、巴马汀、秦皮甲素和秦皮乙素, 质量分数均在 1%以上), 4 °C 保存备用。

2.2 口服葡萄糖耐量试验(OGTT)

OGTT 参照文献方法^[7]中的实验步骤进行。取 30 只雄性 Wistar 大鼠(11~12 周龄), 空腹 24 h, 随机分成 5 组, 对照组, 阳性药组, AEPC 低、中、

高剂量组, 每组 6 只。对照组 ig 1% 聚山梨酯-80 的水溶液 1 mL; AEPC 低、中、高剂量组分别 ig 10、20、40 mg/kg AEPC; 阳性药组 ig 0.5 mg/kg 格列本脲。给药 30 min 后, 所有大鼠均 ig 60% 葡萄糖溶液(3 g/kg)。分别在给糖前 1 min 及给糖后 30、90、150 min 尾静脉采血 1 次, 立即通过血糖检测仪检测血糖水平。

2.3 对 2 型糖尿病大鼠模型的作用

2.3.1 新生大鼠 2 型糖尿病模型的制备 具体操作参考文献方法^[8-10], 5 日龄的新生 Wistar 大鼠按体质量 ip 80 mg/kg 的 STZ(溶于 0.1 mol/L 的柠檬酸缓冲液, pH 值为 4.5) 后放回母鼠身边继续饲养。10 周后, 空腹 12 h 尾静脉取血, 血糖检测仪检测血糖值。

2.3.2 分组给药、血糖检测及样本采集 模型制备后, 选取体质量为 175~185 g, 空腹血糖值在 12.7~13.4 mmol/L 的雄性大鼠 18 只, 随机分为 3 组, 模型组、AEPC(20 mg/kg) 组、阳性药(格列本脲, 0.5 mg/kg) 组, 每组 6 只, 选取 6 只正常大鼠作为对照组。对照组、模型组每天 ig 1 mL 1% 聚山梨酯-80 的水溶液, AEPC 组、阳性药组均为 ig 给药, 连续给药 20 d。于第 1 天给药前 5 min、第 5、10、15、20 天给药后 1 h, 尾静脉采集空腹 12 h 血样, 检测血糖值。在第 20 天测量体质量以后, 大鼠通过 CO₂ 麻醉, 眼球取血, 收集血样进行血清生化指标分析, 收集肝组织, 称量肝质量, 进行肝糖原分析, 最后大鼠麻醉处死。血样盛于离心管中, 静置 37 °C 环境中促其凝固, 待血液凝固后, 3 000 r/min 离心 10 min, 分离血清。

2.3.3 肝糖原及血清生化指标检测 肝糖原水平通过 Carroll 等^[11]描述的方法分析, 血清丙氨酸转氨酶(ALT) 以及天冬氨酸转氨酶(AST) 通过 Reitman 等^[12]的方法检测, 碱性磷酸酶(ALP) 通过 Kind 等^[13]描述的方法检测, 尿素、TG、TC、HDL-C、总蛋白及胰岛素水平均采用试剂盒方法进行检测。

2.4 对体外 RIN 5F 细胞胰岛素释放的影响

RIN 5F 细胞的胰岛素释放量检测参考 Gray 等^[14]的方法。RIN 5F 细胞铺板到 24 孔板上, 待细胞密度达到 1×10⁶/孔开始实验。细胞用 KRB 缓冲液(pH 7.4, 含 115 mmol/L NaCl、4.7 mmol/L KCl、1.28 mmol/L CaCl₂、1.2 mmol/L KH₂PO₄、1.2 mmol/L MgSO₄、24 mmol/L NaHCO₃、10 mmol/L HEPES、1 g/L BSA、1.1 mmol/L 葡萄糖)洗 2 次后, 在 37 °C 孵育 40 min 后, 分别加入 AEPC 使其终质量浓度为

0、5、10、20、40 $\mu\text{g/mL}$ ，加入格列本脲使其终质量浓度为 0、5、10、15、20 $\mu\text{g/mL}$ ，继续孵育 20 min。收集上清，保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。通过试剂盒方法检测胰岛素水平。

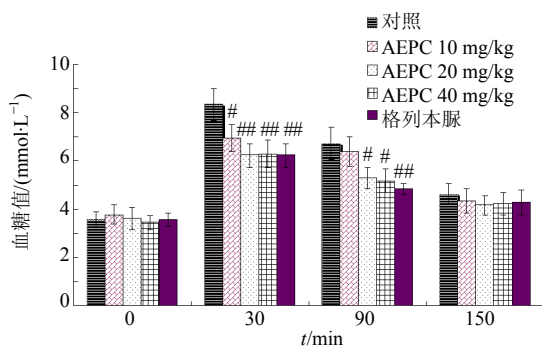
2.5 数据分析

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 19.0 软件进行组间方差分析，组间均数比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 OGTT 结果

10、20、40 mg/kg AEPC 均表现出了降糖效果。10 mg/kg AEPC 在 ig 葡萄糖 30 min 后观测到了轻微的降血糖效果。20、40 mg/kg AEPC 在 30、90 min 后均表现出了明显的降血糖效果。但 40 mg/kg AEPC 相对于 20 mg/kg 的降血糖效果并没有明显增加，不存在明显剂量依赖关系。在后续的实验中选取 20 mg/kg 剂量继续考察。结果见图 1。



与对照组比较：# $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ，下同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group, same as below

图 1 OGTT 检测结果 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Detection results of OGTT ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 1 各组大鼠的体重、肝脏质量和肝糖原水平 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Body weight, liver weight, and liver glycogen values of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	初始体重/g	最终体重/g	肝脏质量/g	肝糖原水平/(mg·g ⁻¹)
对照	—	179 ± 5	230 ± 6	8.2 ± 0.5	39.3 ± 3.9
模型	—	180 ± 6	212 ± 7 [#]	6.7 ± 0.6 [#]	16.7 ± 2.0 [#]
AEPC	20	182 ± 7	233 ± 7*	8.5 ± 0.4*	35.3 ± 5.4*
格列本脲	0.5	177 ± 5	227 ± 5*	8.1 ± 0.4*	38.9 ± 2.3*

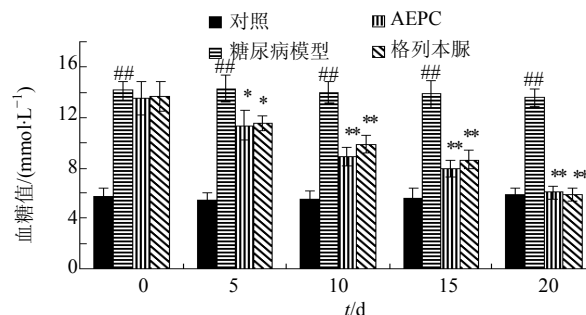
表 2 各组大鼠的血清生化指标 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Serum biochemical parameters of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	ALP/(U·L ⁻¹)	总蛋白/(g·L ⁻¹)	胰岛素/(ng·mL ⁻¹)
对照	—	87.6 ± 8.1	25.6 ± 3.9	9.8 ± 1.9	86.0 ± 9.0	1.43 ± 0.20
模型	—	149.4 ± 10.7 [#]	65.3 ± 6.0 [#]	19.4 ± 2.3 [#]	49.0 ± 5.0 [#]	0.55 ± 0.10 [#]
AEPC	20	92.8 ± 9.9*	26.7 ± 3.9*	10.5 ± 2.4*	77.0 ± 8.0*	1.45 ± 0.30*
格列本脲	0.5	85.0 ± 8.3*	24.9 ± 2.4*	9.9 ± 1.2*	83.0 ± 4.0*	1.25 ± 0.20*

3.2 对 2 型糖尿病模型大鼠血糖的影响

AEPC 20 mg/kg 给药后，观察到了明显的降血糖效果。给药 5 d 后 AEPC 组以及阳性药组均观察到了血糖降低，给药 10 d 和 15 d 后进一步观察到了血糖的降低。20 d 后，给药组的血糖值已经与对照组无明显差别。AEPC 与格列本脲表现出了类似的降血糖效果。结果见图 2。



与模型组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ ，下同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, same as below

图 2 AEPC 对糖尿病大鼠血糖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effect of AEPC on blood glucose of diabetic rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.3 对 2 型糖尿病模型大鼠肝糖原及血清生化指标的影响

与对照组比较，模型组大鼠体重、肝脏质量、以及肝糖原水平均明显下降。AEPC 和阳性药组上述指标与对照组比较均无明显改变，结果见表 1。与对照组比较，模型组 AST、ALT、ALP、尿素、TG、TC 水平上升，HDL-C、总蛋白及血清胰岛素水平下降，AEPC 组和阳性药组的上述指标与对照组比较无明显差异。结果见表 2 和表 3。

表 3 各组大鼠血清尿素和脂质水平 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table3 Serum urea and lipid levels of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	尿素/(g·mL ⁻¹)	TG/(g·mL ⁻¹)	TC/(g·mL ⁻¹)	HDL-C/(g·mL ⁻¹)
对照	—	181±21	985± 92	821±83	554±61
模型	—	364±32 [#]	1 356±111 [#]	1 295±67 [#]	315±32 [#]
AEPC	20	198±23 [*]	1 028±102 [*]	879±90 [*]	512±65 [*]
格列本脲	0.5	231±21 [*]	1 073±123 [*]	850±67 [*]	570±76 [*]

3.4 对体外 RIN 5F 细胞胰岛素释放的影响

10、20、40 μg/mL 的 AEPC 呈剂量依赖性地显著增加了 RIN 5F 细胞的胰岛素释放。而低剂量 5 μg/mL 对 RIN 5F 细胞的胰岛素释放无明显影响。同时，阳性药格列本脲也剂量依赖性地促进了 RIN 5F 细胞的胰岛素释放。说明与格列本脲类似，AEPC 能促进 RIN 5F 细胞的胰岛素释放。结果见图 4。

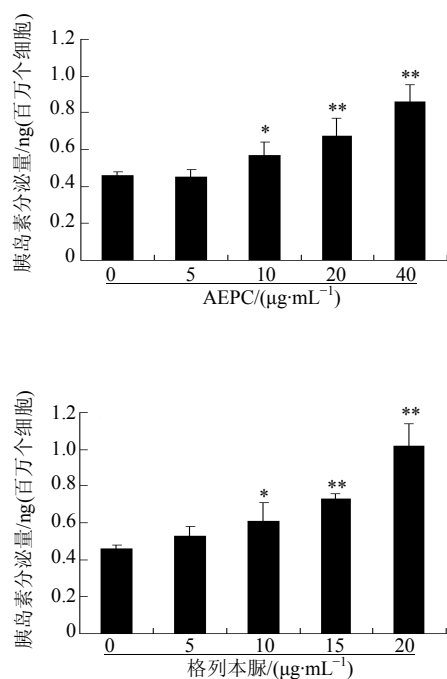


图 4 RIN 5F 细胞胰岛素释放检测结果 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 4 Insulin release from RIN 5F cells *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

4 讨论

OGTT 结果显示 20 mg/kg 的 AEPC 显示了很好的降血糖效果，而高剂量（40 mg/kg）组的降血糖效果与 20 mg/kg 组比较没有明显增加。所以后续的实验采用 20 mg/kg 给药。本实验建立了非肥胖的新生儿大鼠 2 型糖尿病模型，该模型适用于口服降糖药的药效验证。就代谢特征而言，该模型与人 2 型糖尿病几乎相同，是目前最合适也是最广泛使用的 2 型糖尿病动物模型^[8,10,15]。在糖尿病大鼠上，20

mg/kg 的 AEPC 和 0.5 mg/kg 格列本脲连续给药 20 d 以后，大鼠的血糖值已经与正常大鼠无明显差异，说明了 AEPC 对 2 型糖尿病大鼠具有良好的降血糖效果。此外，AEPC 处理后的大鼠的肝脏质量以及肝糖原水平也与正常大鼠无明显差异，该效果有可能是 AEPC 对脂解作、肝糖分解以及蛋白质水解的调控所引起的。AEPC 处理后使模型大鼠 AST、ALT、ALP、尿素、TG、TC、HDL-C、总蛋白等代谢指标均恢复了正常，说明 AEPC 处理后使大鼠的肝功能等恢复了正常。

相对于模型组，AEPC 处理组大鼠的血清胰岛素水平明显上升，恢复到了与正常大鼠相当的水平。提示 AEPC 有可能促进胰岛素分泌。所以，体外考察了 AEPC 对 RIN 5F 细胞胰岛素分泌的影响，结果显示 AEPC 明显地促进了 RIN 5F 细胞的胰岛素释放。结合 AEPC 对动物模型的降血糖效果，推测 AEPC 的降血糖作用可能是通过促进胰岛 β 细胞分泌胰岛素而实现的。本研究首次报道了 AEPC 在 2 型糖尿病模型上的降血糖效果，为白头翁的药理活性研究提供了新的实验证据，但其具体的机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1980.
- [2] 蔡 鹰, 陆 瑜, 梁秉文, 等. 白头翁体内抗肿瘤作用的实验研究 [J]. 中草药, 1999, 30(12): 929-931.
- [3] 关树光, 於文博, 徐东铭, 等. 白头翁药理作用的研究近况 [J]. 吉林中医药, 2006, 26(3): 60-61.
- [4] 黄 展, 李春丰, 王 晶, 等. 白头翁正丁醇提取物对小鼠肝损伤保护作用 [J]. 黑龙江医药科学, 2014, 2(2): 57-58.
- [5] 胡屹屹, 穆 祥, 胡元亮. 白头翁汤及其主要成分对内皮细胞分泌细胞因 TNF-α, TXB-2 和 6-KETO-PGF_{1α} 的影响 [J]. 吉林农业大学学报, 2014, 3(3): 342-346.
- [6] 马 科, 罗国平, 宋紫霞, 等. 白头翁水煎液对离体蛙心功能的影响及其机制研究 [J]. 西部中医药, 2014, 27(4): 8-10.

- [7] Ajikumar N S, Sabulal B R, Arun K R, *et al.* Promising antidiabetes mellitus activity in rats of β -amyrin palmitate isolated from *Hemidesmus indicus* roots [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 734(1): 77-82.
- [8] Olivier B, Daniele B, Portha B, *et al.* Relation of insulin deficiency to impaired insulin action in NIDDM adult rats given streptozocin as neonates [J]. *Diabetes*, 1989, 38(5): 610-617.
- [9] Verspohl E J. Recommended testing in diabetes research [J]. *Planta Med*, 2002, 68(7): 581-591.
- [10] Arulmozhi D K, Veeranjanyulu A, Bodhankar S L. Neonatal streptozotocin induced rat model of Type-2 diabetes mellitus: A glance [J]. *Indian J Pharmacol*, 2004, 36(4): 217-221.
- [11] Carroll N V, Longly W, Joseph H R. Determination of glycogen in liver and muscle by use of anthrone reagent [J]. *J Biol Chem*, 1956, 220(2): 583-593.
- [12] Reitman S, Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamate oxalo-acetate and glutamate pyruvate transaminase [J]. *Am J Clin Pathol*, 1957, 28(1): 56-63.
- [13] Kind P R, King E J. Estimation of plasma phosphatases by determination of hydrolysed phenol with antipyrine [J]. *J Clin Pathol*, 1954, 70(4): 322-330.
- [14] Gray A M, Flatt P R. Insulin-secreting activity of the traditional antidiabetic plant *Viscum album* [J]. *J Endocrinol*, 1999, 160(3): 409-414.
- [15] Reed M J, Meszaros K, Entes L J, *et al.* A new rat model of type 2 diabetes, the fat-fed, streptozotocin treated rat [J]. *Metabolism*, 2000, 49(11): 1390-1394.