

绞股蓝叶水提物对糖尿病大鼠降血糖作用研究

王同壮¹, 王 尚¹, 马 朋¹, 姚 玲¹, 王 猛¹, LI Yu-hao², JOHJI Yamahara³, 蒋丽蓉^{4*}, 王建伟^{1*}

1. 重庆医科大学中医药学院, 中医药防治代谢性疾病重庆市重点实验室, 重庆 400016

2. 悉尼健康科学研究所/悉尼中医学院内分泌和代谢小组, 澳大利亚 悉尼 NSW 2000

3. 日本京都药品食品研究所, 日本 京都 602-8136

4. 西南医科大学 组织学与胚胎学教研室, 四川 泸州 646000

摘要:目的 探讨绞股蓝 *Gynostemma pentaphyllum* 叶水提物对链脲佐菌素 (STZ) 诱导的糖尿病大鼠的降血糖作用及其机制。方法 采用 ip STZ 的方法制备糖尿病大鼠模型, 将 21 只造模成功的 SD 雄性大鼠随机分为模型组和绞股蓝叶水提物低、高剂量 (100、500 mg/kg) 组, 另取 7 只正常大鼠作为对照组, 分别于给药 2 周末和 3 周末禁食取血, 检测血浆葡萄糖 (空腹血糖)、三酰甘油 (TG) 的浓度, 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测骨骼肌肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和葡萄糖转运蛋白 4 (GLUT4) mRNA 的表达, Western blotting 检测骨骼肌 GLUT-4 总蛋白表达, 免疫荧光染色观察 GLUT-4 蛋白在骨骼肌肌膜上的表达分布情况。结果 与对照组比较, 模型组大鼠的饮食、饮水量明显增加, 而体质量以及骨骼肌的质量明显下降; 血浆 TG 和空腹血糖以及骨骼肌中 TNF- α mRNA 的表达明显升高, 而骨骼肌 GLUT-4 mRNA、GLUT-4 总蛋白及骨骼肌肌膜上 GLUT-4 蛋白的表达明显降低; 与模型组比较, 高剂量的绞股蓝叶水提物明显降低了 STZ 诱导的糖尿病大鼠的空腹血糖, 逆转了骨骼肌 TNF- α mRNA 和肌膜 GLUT-4 蛋白的表达。结论 绞股蓝叶水提物能够降低 STZ 诱导的糖尿病大鼠的血糖, 其作用机制可能与增加骨骼肌肌膜 GLUT-4 蛋白表达和抑制骨骼肌炎症有关。

关键词: 绞股蓝; 糖尿病; 葡萄糖转运蛋白 4; 肿瘤坏死因子 α ; 三酰甘油

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)10-2828-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.10.025

Study on anti-hyperglycemia effect of aqueous extract from *Gynostemma pentaphyllum* leaves on diabetes rats

WANG Tong-zhuang¹, WANG Shang¹, MA Peng¹, YAO Ling¹, WANG Meng¹, LI Yu-hao², JOHJI Yamahara³, JIANG Li-rong⁴, WANG Jian-wei¹

1. Chongqing Key Laboratory of Prevention and Treatment of Metabolic Diseases, College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

2. Sydney Institute of Health Sciences/Sydney College of Traditional Chinese Medicine Endocrinology and Metabolism Group, Sydney NSW2000, Australia

3. Kyoto Institute of Food and Drug Research, Kyoto 602-8136, Japan

4. Department of histology and embryology, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China

Abstract: Objective The aim of this study was to investigate the anti-hyperglycemia effect and mechanism of aqueous extract from *Gynostemma pentaphyllum* (GP) leaves on STZ-induced diabetic rats. **Methods** Diabetic rat models were established by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ, 50 mg/kg). A total of 21 successful SD male rats were randomly divided into model group (STZ). *G. pentaphyllum* leaves aqueous extract low dose group (GP•H₂O-L, 100 mg/kg) and high dose group (GP•H₂O-H, 500 mg/kg), another seven normal rats were taken as the control group. Blood samples were taken from the 2nd and 3rd weekends to detect plasma glucose and triglyceride concentrations; Real-time PCR was used to detect the expression of TNF- α and GLUT-4 mRNA in

收稿日期: 2019-11-28

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81973653); 国家自然科学基金面上项目 (81673659); 国家自然科学基金面上项目 (81374033); 重庆市科委基础研究与前沿探索一般项目 (cstc2018jcyjAX0176); 重庆市研究生科研创新项目 (CYS18210)

作者简介: 王同壮 (1990—), 男, 山东临沂人, 硕士研究生, 研究方向为代谢性疾病防治研究。E-mail: 1207177240@qq.com

***通信作者** 王建伟 (1968—), 博士, 教授, 研究方向为中医药防治代谢性疾病基础与应用研究。Tel: 18602326815 E-mail: wangjianwei@cqmu.edu.cn
蒋丽蓉 (1991—), 硕士, 研究方向为中医药防治代谢性疾病。Tel: 17715703190 E-mail: 925647648@qq.com

skeletal muscle; Western blotting was used to detect GLUT-4 total protein in skeletal muscle; The expression of GLUT-4 protein on skeletal muscle sarcolemma was observed by immunofluorescence staining. **Results** The results showed that the food intake and water intake of the STZ group were significantly increased compared with the control group, while the body weight and skeletal muscle weight were obviously decreased; Plasma triglyceride and blood glucose concentrations and the expression of TNF- α mRNA in skeletal muscle were significantly increased, while the expression of GLUT-4 mRNA, GLUT-4 total protein and GLUT-4 protein in skeletal muscle sarcolemma was obviously decreased. Compared with the STZ group, the high-dose aqueous extract of *G. pentaphyllum* leaves significantly reduced the blood glucose of STZ-induced diabetic rats, and reversed the expression of TNF- α mRNA and GLUT-4 protein in skeletal muscle. **Conclusion** The aqueous extract from *G. pentaphyllum* leaves could reduce hyperglycemia in STZ-induced diabetic rats, and its mechanism may be related to increasing the expression of GLUT-4 protein on skeletal muscle sarcolemma and inhibiting skeletal muscle inflammation.

Key words: *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino; diabetes; glucose transporter 4; tumor necrosis factor alpha; triglyceride

糖尿病是一种常见的内分泌代谢性疾病,以高血糖为特点,由胰岛素分泌不足或功能缺陷所引发的糖、脂肪、蛋白质、水和电解质等一系列复杂的代谢紊乱综合征^[1-2]。有数据显示,中国成人糖尿病患者数量高达 1.14 亿,位居世界第一,占全球成人糖尿病患者总数的 1/4 以上^[3]。目前的降糖药物,往往具有不良反应,而中医药多靶点、多环节、多方式的治疗措施在防治糖尿病方面显示出了较好的效果^[4-7]。

绞股蓝为绞股蓝属植物绞股蓝 *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino 的干燥全草,是一种名贵的中药材。现代药理学研究表明,绞股蓝具有多种功效,如调血脂^[8]、降糖^[9]、护肝^[10]等。从化学成分看,绞股蓝中含有绿原酸、黄酮类等多种成分^[11],以绞股蓝叶水提物作为考察对象更能反映出绞股蓝在临床的应用效果。因此,本研究通过建立 SD 雄性大鼠糖尿病模型,探讨绞股蓝叶水提物对糖尿病大鼠的降血糖作用及其机制。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠,40 只,雄性,3 月龄,体重(190 $\pm$ 10)g,重庆医科大学动物实验中心提供,动物生产许可证号 SCXK(渝)2012-0001。大鼠采用分笼饲养方式,置于温度(21 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C,且相对湿度(56 $\pm$ 5)%,12 h 光/暗周期的环境中,大鼠可自由摄食饮水。适应性饲养 1 周后,开始实验。

1.2 药品及试剂

绞股蓝叶水提物(日本京都食品医药研究所馈赠);链脲佐菌素(STZ)购自 Sigma 公司(SO130-1G);三酰甘油(TG)测定试剂盒(批号 2017040017,东瓯诊断产品有限公司);葡萄糖测定试剂盒(批号 20171004147,荣盛生物药业有限公

司);PMSF(批号 13A16B79,博士德生物工程有限公司);RIPA 裂解液(强)(批号 P0013B)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型,批号 P0010S),碧云天生物技术有限公司;大鼠葡萄糖转运蛋白 4(GLUT-4)抗体(批号 10613,比例 1:1 000;美国 Santa Cruz 公司);异氟烷(批号 217180801,瑞沃德生命科技有限公司);Trizol(中国大连塔克拉公司);M-MLV RTase cDNA 合成试剂盒(批号 RR037A,塔克拉公司);SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II(塔克拉公司);山羊血清(批号 AR0009)、DAPI(批号 AR1176),博士德生物工程有限公司;荧光二抗(批号 549A2320,比例 1:100,美国 Abbkine 公司);绿原酸对照品(质量分数 $\geq$ 98%,批号 SC8210, Solarbio 公司);紫云英苷对照品(质量分数 $\geq$ 98%,批号 201511116,索莱宝生物科技有限公司)。

1.3 主要仪器设备

RM2135 石蜡切片机、CM1905 冰冻切片机,德国 IAK 公司;96 孔 PCR 检测仪,美国 Bio-Red 公司;移液枪,德国 Eppendorf 公司;55P-27 低温离心机,HITACHI 公司产品;XQ-6611 -80 $^{\circ}$ C 低温冰箱、PO-9902 37 $^{\circ}$ C 水浴箱、61X-33 酶标仪,日本 SANYO 公司产品;超净水产生系统仪器,美国 Millipore 公司;普通光学显微镜,日本 Olympus 公司产品;HFX-II A 显微摄影装置,日本 Nikon 公司产品;液氮生物容器,成都金凤液氮生物容器有限公司;稳压稳流电泳仪,美国 Bio-Red 公司。

2 方法

2.1 绞股蓝叶水提物成分测定^[12-13]

2.1.1 色谱条件 色谱条件 1:以 Hypersil ODS2(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)为色谱柱,乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相,线性梯度洗脱:0~40 min,

5%~8%乙腈; 40~45 min, 8%~40%乙腈, 体积流量 1.0 mL/min, 进样量 10 μ L, 检测波长 327 nm, 柱温 30 $^{\circ}$ C。色谱条件 2: 以 Hypersil ODS2 (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) 为色谱柱, 甲醇-0.1%磷酸水溶液 (40:60) 为流动相, 体积流量 1 mL/min, 进样量 10 μ L, 检测波长 347 nm, 柱温 30 $^{\circ}$ C。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取绿原酸和紫云英苷对照品适量, 甲醇溶解, 转入量瓶中定容, 摇匀, 分别得到绿原酸 0.11 mg/mL 对照品溶液和紫云英苷 0.017 mg/mL 对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取绞股蓝叶水提物粉末适量, 精密称定, 置 1 mL 量瓶中, 加入甲醇, 超声溶解, 稀释至刻度, 摇匀后滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.4 线性关系考察 精密吸取绿原酸和紫云英苷对照品溶液适量, 甲醇稀释成梯度质量浓度的对照品储备液。吸取不同质量浓度梯度对照品溶液各 10 μ L, 分别进样, 按照“2.1.1”项下的色谱条件 1 与色谱条件 2 测定峰面积, 以进样量为横坐标 (X)、峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归。

2.2 动物模型的制备及处理

40 只大鼠适应性喂养 1 周, 禁食 5 h, 随机选取其中 33 只, 一次性 iv STZ (50 mg/kg), 连续 sc 胰岛素 (5 U/kg) 2 周, 制备糖尿病大鼠模型; 另外 7 只大鼠 iv 柠檬酸缓冲液, 连续 sc 生理盐水 2 周,

作为对照组。2 周后检测血糖, 筛选糖尿病模型成功大鼠^[14-15], 造模成功大鼠共 21 只, 并将其随机分为 3 组: 模型组和绞股蓝叶水提物低剂量组 (100 mg/kg)、高剂量组 (500 mg/kg, 此剂量与绞股蓝人体临床常用量相当), 每组 7 只。各给药组给予用 5%阿拉伯胶溶液混悬的绞股蓝叶水提物, 模型组和对照组给予 5%阿拉伯胶; 每日上午定时 ig 给药, 连续 3 周。以上各组大鼠自由饮食、饮水, 每 2 天记录饮食、饮水量, 每 3 天记录大鼠体质量。于实验第 3 周末处死大鼠, 取腓肠肌组织并称定质量, 一部分固定于 4%多聚甲醛; 一部分置于液氮中速冻, -80 $^{\circ}$ C 保存。

2.3 生化指标检测

分别在实验起始和第 2、3 周末, 对大鼠禁食 6 h, 使用异氟烷麻醉后, 于眼眶后静脉丛取血, 4 $^{\circ}$ C、3 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 根据试剂盒检测空腹血糖和血浆中 TG 水平。

2.4 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测

根据制造商的说明书, 用 Trizol 试剂从红色腓肠肌中提取总 RNA。利用 M-MLV RTase cDNA 合成试剂盒逆转录成 cDNA, 根据 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 试剂盒进行 qRT-PCR 测定。对每个样本的 mRNA 表达进行重复分析, 并用 β -actin mRNA 进行标准化。引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 相关 mRNA 引物序列

Table 1 Primer sequences for Real-time PCR assays

基因	上游引物 (5'→3')	下游引物 (5'→3')
β -actin	ACGGTCAGGTCATCACTATCG	GGCATAGAGGTCTTTACGGATG
TNF- α	ATGGGCTCCCTCTCATCAGTTC	CTCCTCCGCTTGGTGGTTTG
GLUT-4	AGCCAGCCTACGCCACCATAG	TCGCCAGCTCGCTCTACTAAG

2.5 Western blotting 检测

取 80 mg 腓肠肌组织加入 RIPA 裂解液和 PMSF 的混合液中, 研磨匀浆, 离心取上清, 用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白质量浓度, 取 25 μ g 蛋白样品, 进行 13% SDS-PAGE (8%分离胶, 5%浓缩胶) 电泳分离, 用 250 mA 恒流电压进行电转, 用 5%脱脂牛奶常温封闭 80 min, 然后在摇床上用一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育 16 h, TBST 洗膜 10 min $\times$ 4 次后, 摇床上室温二抗结合 80 min, 再次用 TBST 洗膜 10 min $\times$ 4 次, 最后加入 ECL 显色液曝光显影。用 Image J 软件进行分析, 测定条带的吸光度值, 所得目的条带的吸光度值与相应的内参 β -actin 蛋白条带的

吸光度值的比值即为相应蛋白的相对表达量。

2.6 免疫荧光染色检测

从 4%多聚甲醛固定液中取出合适大小的肌肉组织, 分别用 10%、20%、30%的蔗糖水脱水, 用 OCT 包埋做冰冻切片, 厚度 8 μ m, 晾干, PBS 冲洗 5 min $\times$ 3 次, 然后山羊血清 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h, 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 次日在室温下复温 1 h, PBS 冲洗 5 min $\times$ 3 次, 二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 再次 PBS 冲洗 5 min $\times$ 3 次, DAPI 室温孵育 2 min, PBS 冲洗 5 min $\times$ 3 次, 最后用抗荧光淬灭剂封片, 镜下观察。

2.7 统计学分析

运用 GraphPad Prism 5 软件进行统计学分析, 计

量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组计量资料的比较用单因素方差分析, 两组计量资料的比较用独立样本 t 检验。

3 结果

3.1 绞股蓝叶水提物有效成分测定结果

绞股蓝叶水提物 HPLC 测定的色谱图见图 1, 根据线性关系考察得到回归方程: 绿原酸 $Y=$

$38\ 839 X+381.37$ ($r^2=0.999\ 7$), 紫云英苷 $Y=$
 $1\ 940\ 730.02 X-3\ 309.56$ ($r^2=0.999\ 9$), 绿原酸在 27.5~220.0 ng 线性关系良好, 而紫云英苷在 16.65~249.75 ng 线性关系良好。通过计算含量, 测得样品中绿原酸质量分数为 0.110 6%、紫云英苷质量分数为 0.028 5%。

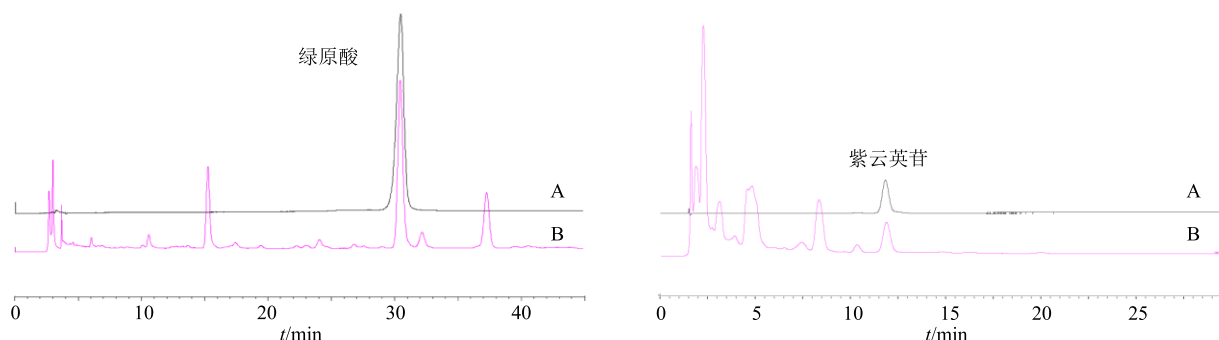


图 1 对照品 (A) 和绞股蓝叶水提物样品 (B) HPLC 色谱图
 Fig. 1 HPLC chart of standard (A) and GP water extract (B)

3.2 大鼠的一般参数

如表 2 所示, 与对照组相比较, 模型组大鼠的饮食量、饮水量明显增加 ($P<0.05$); 与模型组比较, 绞股蓝叶水提物组大鼠饮食量和饮水量差异不显著 ($P>0.05$)。与对照组比较, 模型组大鼠的实验前体质量、实验结束时体质量、腓肠肌质量等参数都明显降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 2 个绞股蓝叶水提物组大鼠的这些参数都呈现下降趋势, 但差异没有统计学意义 ($P<0.05$)。

3.3 大鼠血浆生化指标测定结果

与对照组比较, 模型组大鼠在实验起始及实验第 2、3 周末, 血糖和 TG 水平都明显升高 ($P<0.05$), 表明 STZ 诱导的糖尿病大鼠模型制备成功; 与模型组比较, 用绞股蓝叶水提物干预 3 周后, 高剂量组大鼠的血糖明显降低 ($P<0.05$), 而低剂量组大鼠

的血糖无明显变化 ($P>0.05$); 尽管 2 个药物组大鼠的血浆 TG 水平均有下降的趋势, 但是差异没有统计学意义。表明绞股蓝叶水提物可以降低 STZ 诱导的糖尿病大鼠的血糖, 并且 500 mg/kg 剂量的效果更佳。结果见表 3。

3.4 各组大鼠腓肠肌 TNF- α mRNA、GLUT-4 mRNA 和 GLUT-4 总蛋白表达测定结果

与对照组比较, 模型组大鼠的腓肠肌 TNF- α mRNA 的表达明显升高, 而 GLUT-4 mRNA 和 GLUT-4 总蛋白的表达明显下降; 与模型组比较, 绞股蓝叶水提物高剂量组大鼠的腓肠肌 TNF- α mRNA 明显降低 ($P<0.05$), 而腓肠肌 GLUT-4 mRNA 及 GLUT-4 总蛋白的表达都没有明显变化 ($P>0.05$), 表明绞股蓝叶水提物可能具有抑制 STZ 诱导的糖尿病大鼠腓肠肌炎症的作用, 结果见图 2。

表 2 各组大鼠的一般参数 ($\bar{x} \pm s, n=7$)

Table 2 General parameters of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=7$)

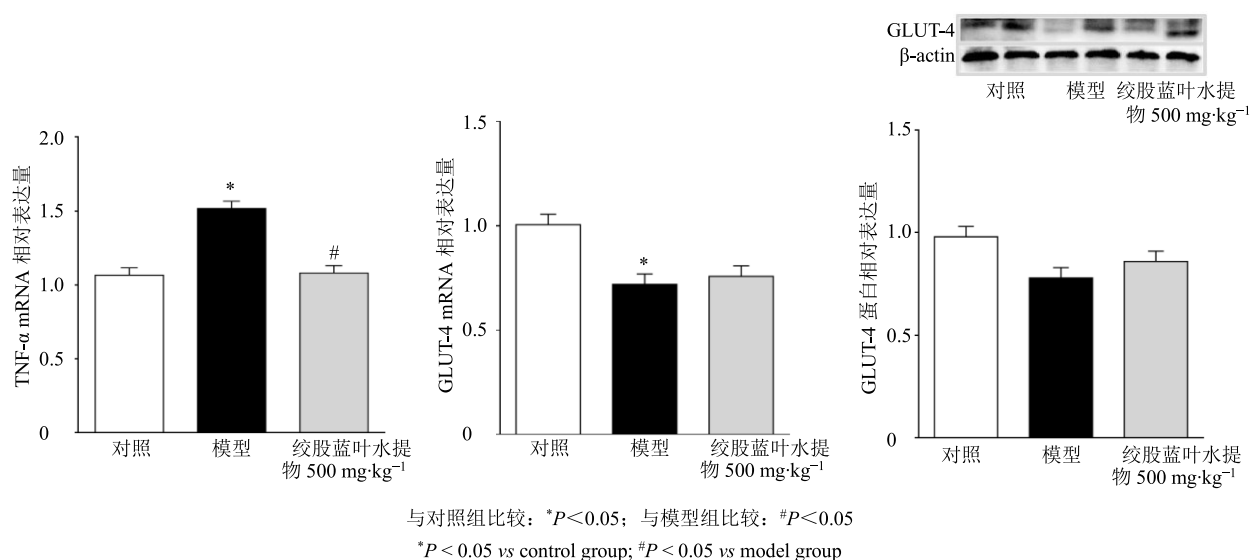
组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	每周每只大 鼠摄食量/g	每周每只大鼠 饮水量/g	体质量/g		腓肠肌质量/g
				实验前	实验结束	
对照	—	23.94±8.01	30.29±8.34	326.25±1.62	387.87±2.38	5.03±0.07
模型	—	40.52±9.09*	180.53±11.16*	273.30±1.53*	247.37±1.90*	2.19±0.04*
绞股蓝叶水提物	100	41.26±8.88	193.46±11.03	273.70±1.49	246.28±1.97	2.19±0.02
	500	39.87±8.65	171.24±11.08	271.01±1.44	244.50±1.89	2.16±0.07

与对照组比较: * $P<0.05$

* $P<0.05$ vs control group

表 3 各组大鼠血浆生化指标测定 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)Table 3 Determination of plasma biochemical parameters in rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

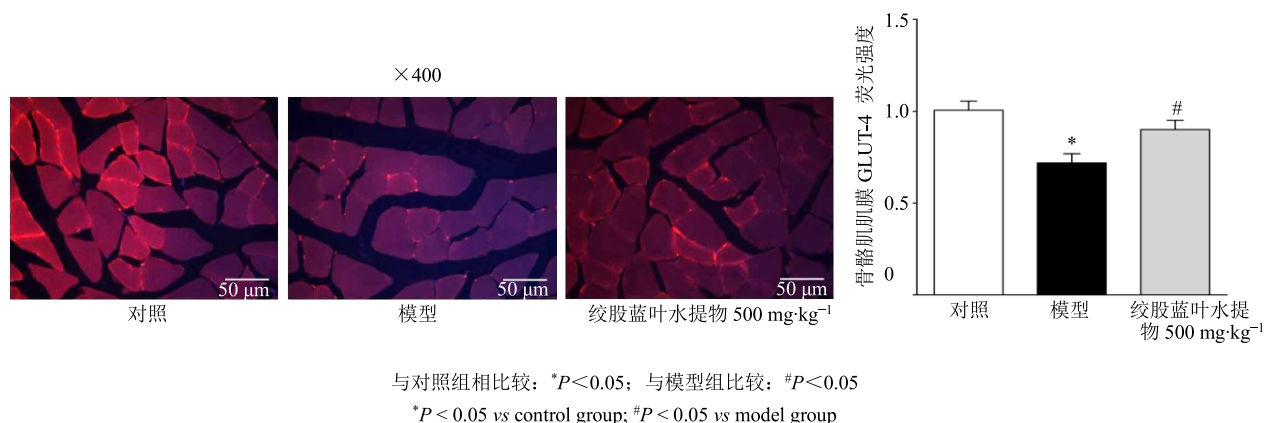
组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	空腹血糖/(mmol·L ⁻¹)			血浆 TG/(mmol·L ⁻¹)		
		实验前	2 周末	3 周末	实验前	2 周末	3 周末
对照	—	8.09 ± 0.11	8.60 ± 0.12	8.09 ± 0.14	1.03 ± 0.02	1.09 ± 0.01	0.97 ± 0.02
模型	—	29.41 ± 0.33*	34.54 ± 0.35*	38.45 ± 0.35*	2.09 ± 0.04*	3.03 ± 0.04*	3.68 ± 0.04*
绞股蓝叶水提取物	100	29.92 ± 0.38	33.60 ± 0.37	35.92 ± 0.37	1.91 ± 0.04	3.80 ± 0.04	4.42 ± 0.03
	500	29.63 ± 0.36	28.26 ± 0.38	33.39 ± 0.35 [#]	1.97 ± 0.03	2.80 ± 0.03	3.39 ± 0.03

与对照组相比: * $P < 0.05$; 与模型组比较: $^{\#}P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs control group; $^{\#}P < 0.05$ vs model group图 2 绞股蓝叶水提取物对糖尿病大鼠腓肠肌 TNF-α 和 GLUT-4 的 mRNA 及 GLUT-4 总蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)Fig. 2 Effects of aqueous extract of *G. pentaphyllum* on expression of TNF-α and GLUT-4 mRNA and GLUT-4 protein expression in muscle of diabetic rats ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

3.5 各组大鼠腓肠肌肌膜 GLUT-4 表达测定结果

大鼠腓肠肌横切面免疫荧光结果可见, GLUT-4 为红色荧光所示、细胞核为蓝色荧光所示。与对照

组比较, 模型组大鼠腓肠肌肌膜 GLUT-4 表达量显著降低; 与模型组比较, 给予绞股蓝叶水提取物处理后, 明显逆转了这一变化, 结果见图 3。

图 3 绞股蓝叶水提取物对糖尿病大鼠腓肠肌肌膜 GLUT-4 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)Fig. 3 Effects of aqueous extract of *G. pentaphyllum* on GLUT-4 protein expression in muscle of diabetic rats ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

4 讨论

糖尿病是一种代谢性疾病,以高血糖为主要特征,往往由胰岛素分泌缺陷或者其生物作用受损导致;严重的高血糖容易出现“三多一少”症状,即多饮、多食、多尿和消瘦的表现。由于其很难治愈,并且缺乏长效、安全、依从性高的治疗方法,使得糖尿病成为主要的慢性病之一,严重威胁着人类的健康^[14]。

目前,STZ 诱导糖尿病模型是国内外常用的糖尿病动物模型^[15]。STZ 注射的给药方式的不同,可以用来制备 1 型或 2 型糖尿病动物模型。其中,1 型糖尿病模型采用一次 iv 或 ip 大剂量 STZ,使胰岛 β 细胞直接被损害,进而导致胰岛素分泌减少而致血糖升高的表现^[16]。本实验选用 SD 雄性大鼠,通过 1 次性 ip 给予大剂量 STZ (50 mg/kg) 的方式,以建立 1 型糖尿病模型。本实验结果表明,与对照组比较,模型组大鼠饮食、饮水、血浆 TG 和血糖均明显升高,体质量明显降低,表明本实验所用方法可成功制备 1 型糖尿病大鼠模型。

由于目前尚无根治糖尿病的方法,且临床化学药副作用的影响,中医药因其独特的优势,引起了人们越来越多的重视。绞股蓝,又被称之为七叶胆,其属于多年生草质藤本植物^[17],是一种分布比较广泛的名贵中药材。有研究显示绞股蓝中含有绞股蓝皂苷、氨基酸、蛋白质、黄酮类、糖类等成分,具有抗衰老、免疫调节、抗肿瘤、脂代谢调节、肾脏和肝脏保护作用等^[18]。有报道称绞股蓝重要的药用成分——绞股蓝复合纤维,可降低实验性糖尿病大鼠的血糖^[19]。诸多临床试验也证实^[20],绞股蓝叶的提取物以及绞股蓝多糖对于 2 型糖尿病和相关并发症有良好的改善效用。本研究结果表明 STZ 诱导的糖尿病大鼠血糖明显升高,给予高剂量绞股蓝叶水提物治疗后,糖尿病大鼠的血糖明显降低,说明绞股蓝叶水提物具有降低糖尿病大鼠血糖的作用。

高血糖容易引起微血管炎性反应,炎性细胞可以释放炎性介质,而炎性介质又反过来进一步促进炎性细胞的激活,两者可以互为因果^[21]。有研究表明 TNF- α 是介导炎症反应的关键因子^[22],它主要由单核巨噬细胞分泌,可以促进多种炎性因子的释放^[23],并且能够干扰相关的胰岛素信号转导过程^[24]。与报道相一致的是,本实验中绞股蓝叶水提物明显降低 STZ 诱导的糖尿病大鼠骨骼肌 TNF- α mRNA 水平的表达。表明绞股蓝叶水提物可能具有抑制骨骼肌

炎症的作用。众所周知,胰岛素信号通路与葡萄糖的摄取利用密切相关。骨骼肌组织是机体葡萄糖消耗的主要场所,占全身葡萄糖利用的 75%~80%, GLUT-4 是一种含 509 个氨基酸的糖蛋白,是骨骼肌中的主要葡萄糖运载体^[25-26],葡萄糖的跨膜转运只有利用 GLUT-4 才能得到实现,而细胞膜上参与胰岛素刺激的葡萄糖摄取的 GLUT-4 是肌肉组织中葡萄糖代谢的关键因子之一^[27]。现代研究发现,增加骨骼肌肌膜上 GLUT-4 的表达,对改善机体高血糖症状有重要的意义^[28]。在胰岛素刺激下,肌肉细胞中的 GLUT-4 从细胞内转位至细胞膜上,促进葡萄糖的摄取和代谢^[29]。本实验结果表明,绞股蓝叶水提物对 STZ 诱导的糖尿病大鼠的骨骼肌 GLUT-4 mRNA 水平、总蛋白水平没有影响。推测绞股蓝叶水提物可能是通过影响骨骼肌肌膜 GLUT-4 的转位从而降低 STZ 诱导的糖尿病大鼠的血糖。通过免疫荧光结果显示,绞股蓝叶水提物增加了 STZ 诱导的糖尿病大鼠骨骼肌肌膜 GLUT-4 的表达。由此推测绞股蓝叶水提物改善 STZ 诱导的糖尿病大鼠的血糖,可能与骨骼肌 GLUT-4 转位到肌膜上有关,而对其转录和翻译水平并没有影响。这有待后续进一步研究证实。

绞股蓝叶水提物成分复杂,已知成分包括绿原酸、黄酮、生物碱等,目前尚未发现其质量标准的相关报道。本实验对绞股蓝叶水提物的有效成分进行测定,发现绞股蓝叶水提物中含有一定量的绿原酸 (0.110 6%) 和紫云英苷 (0.028 5%)。研究发现,绿原酸能通过调节 TLR4/NF- κ B 信号发挥抗炎作用^[30];紫云英苷通过抑制 NF- κ B、MAPKs 信号通路的激活,降低下游促炎性细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的表达,发挥抗炎作用^[31]。由此推测绿原酸和紫云英苷是绞股蓝叶水提物抑制炎症作用的重要化学成分。

综上,本研究证明,绞股蓝叶水提取物可以降低 STZ 诱导的糖尿病大鼠的血糖,这可能与其增加骨骼肌肌膜上 GLUT-4 蛋白表达和抑制骨骼肌炎症有关。提示绞股蓝叶水提取物可能在防治糖尿病方面具有广阔的应用开发前景。

参考文献

- [1] 杨小红,王素利,张伟程. 中医药对 2 型糖尿病胰岛 β 细胞功能的早期保护研究进展 [J]. 中医临床杂志, 2010, 22(3): 268-272.
- [2] Xiang F L, Lu X, Strutt B, *et al.* NOX2 deficiency

- protects against streptozotocin-induced beta-cell destruction and development of diabetes in mice [J]. *Diabetes*, 2010, 59(10): 2603-2611.
- [3] 杨文英. 中国糖尿病的流行特点及变化趋势 [J]. 中国科学: 生命科学, 2018, 48(8): 812-819.
- [4] 刁玉林, 姜威, 朱婷, 等. 天然植物多糖抗糖尿病研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2011, 38(4): 275-279.
- [5] 姚先梅, 段贤春, 吴健, 等. 太子参多糖对实验性糖尿病大鼠血糖血脂代谢和肾脏病理的影响 [J]. 安徽医药, 2014, 18(1): 23-26.
- [6] 宗阳, 董宏利, 陈婷, 等. 基于网络药理学黄芩-黄连药对治疗 2 型糖尿病作用机制探讨 [J]. 中草药, 2019, 50(4): 888-894.
- [7] 王鹏程, 曹泽戎, 许治良, 等. 以 2 型糖尿病胰岛 β 细胞为靶点的天然产物研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(18): 4502-4510.
- [8] Megalli S, Aktan F, Davies N M, *et al.* Phytopreventative anti-hyperlipidemic effects of *Gynostemma pentaphyllum* in rats [J]. *J Pharm Pharm Sci*, 2005, 8(3): 507-515.
- [9] Megalli S, Davies N M, Roufogalis B D. Anti-hyperlipidemic and hypoglycemic effects of *Gynostemma pentaphyllum* in the Zucker fatty rat [J]. *J Pharm Pharm Sci*, 2006, 9(3): 281-291.
- [10] Chen W C, Hau D M, Chen K T, *et al.* Protective effects of *Gynostemma pentaphyllum* in gamma-irradiated mice [J]. *Am J Chin Med*, 1996, 24(1): 83-92.
- [11] 迟栋. 绞股蓝水提物对束缚水浸应激性胃溃疡模型大鼠的预防作用 [J]. 中国药房, 2017, 28(13): 1773-1776.
- [12] Abdelazim A, Khater S, Ali H, *et al.* *Panax ginseng* improves glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats through 5' adenosine monophosphate kinase up-regulation [J]. *Saud J Biol Sci*, 2019, 26(7): 1436-1441.
- [13] Alkaladi A, Abdelazim A M, Afifi M. Antidiabetic activity of zinc oxide and silver nanoparticles on streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(2): 2015-2023.
- [14] Li W L, Zheng H C, Bukuru J, *et al.* Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus [J]. *J Ethnopharmacol*, 2004, 92(1): 1-21.
- [15] 黄小桃, 李颖仪, 郑侠, 等. 黄皮叶对链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠的作用及机制研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2014, 25(6): 651-656.
- [16] 李季泓, 王密, 林树梅, 等. 菊芋菊糖对链脲佐菌素诱导大鼠 I 型糖尿病治疗作用的研究 [J]. 现代预防医学, 2015, 42(16): 2997-3000.
- [17] Li Y, Lin W, Huang J, *et al.* Anti-cancer effects of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino (Jiao gulan) [J]. *Chin Med*, 2016, doi: 10.1186/s13020-016-0114-9
- [18] 郎志芳, 刘兰涛, 王洪伟, 等. 绞股蓝对糖尿病肾病大鼠免疫功能的影响 [J]. 中国现代药物应用, 2019, 13(7): 235-237.
- [19] 张金金, 许哲远, 陈骞, 等. 绞股蓝多糖对抗疾病的药理学研究进展 [J]. 中国妇幼保健, 2019, 34(7): 1684-1686.
- [20] 周亮, 唐祥彬, 魏源, 等. 运动结合绞股蓝总皂甙对高脂血症大鼠血脂和脂质过氧化水平的影响 [J]. 北京体育大学学报, 2007, 24(10): 205-208.
- [21] Chu A, Foster M, Hancock D, *et al.* TNF- α gene expression is increased following zinc supplementation in type 2 diabetes mellitus [J]. *Genes Nutr*, 2015, 10(1): 1-10.
- [22] 方忆生, 陈少清, 连晓阳, 等. 电针委中穴对腰肌钝挫伤大鼠骨骼肌中 TNF- α 及 IGF-1 表达的影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2016, 31(2): 201-204.
- [23] 李荣科, 李岩. 岷当归对高脂饲料联合链脲佐菌素诱导的 II 型糖尿病小鼠血清 IL-6, IL-22 和 TNF- α 含量的影响 [J]. 甘肃中医药大学学报, 2016, 33(6): 6-9.
- [24] 王剑. 2 型糖尿病大鼠骨骼肌 IRS-1、IL-1 β 、TNF- α 表达及罗格列酮干预的研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2007.
- [25] 杨化冰, 吴勇, 徐丹林, 等. 益气养阴通络方对 2 型糖尿病大鼠骨骼肌、脂肪组织 GLUT-4 蛋白表达的影响 [J]. 光明中医, 2008, 23(7): 891-892.
- [26] 宋春宇, 毕会民. 高脂饮食喂养对大鼠骨骼肌细胞膜 GLUT-4 含量的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20(10): 1866-1870.
- [27] 马建, 马晓静, 杜丽坤, 等. 祛胰抵方对 2 型糖尿病胰岛素抵抗大鼠骨骼肌细胞膜葡萄糖转运蛋白 4 的影响 [J]. 医学研究杂志, 2013, 42(9): 58-60.
- [28] 王冠梁, 李迪, 王琳, 等. 熊果酸通过葡萄糖转运体改善 KKAy 小鼠胰岛素抵抗的机制 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(3): 787-790.
- [29] 唐海双, 王清松, 焦炳华, 等. GLUT4 在胰岛素调控葡萄糖转运中作用 [J]. 生命的化学, 2014, 34(2): 285-290.
- [30] 徐静红, 毛艳菲. 绿原酸对脂多糖诱导的急性肾损伤小鼠的保护作用 [J]. 医药导报, 2019, 38(7): 860-864.
- [31] 李丰阳. 紫云英苷抗 LPS 诱发的小鼠乳腺炎作用及机制研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2014.