

网络出版时间:2012-05-22 16:32

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120522.1632.012.html>

芜根粗总皂苷对糖尿病小鼠的降血糖作用

刘 浩¹, 蒋思萍², 杨玲玲¹, 陈志娟¹, 包善飞¹,
徐爱国², 卜海涛², 高 平¹

(1 四川大学 生命科学学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 四川 成都 610064;

2 西藏自治区高原生物研究所, 西藏 拉萨 850001)

【摘 要】 【目的】研究芜根粗总皂苷(ST)对四氧嘧啶所致糖尿病小鼠血糖的影响。【方法】以体积分数 70% 乙醇加热提取芜根,并分别以石油醚和正丁醇萃取,得到芜根 ST,测定正丁醇萃取相中总皂苷的含量;给昆明小鼠尾静脉注射 85 mg/kg 四氧嘧啶,建立糖尿病小鼠模型;用剂量为 500 和 1 000 mg/kg 的 ST 对糖尿病小鼠灌胃 7 d 后,测定初始空腹血糖和最终空腹血糖,并在试验结束时处死小鼠,取胸腺、肝脏、脾脏和肾脏组织称质量计算脏器指数,分析 ST 对糖尿病小鼠口服耐糖量(OGTT)的改善情况。【结果】正丁醇萃取物中总皂苷的质量分数为(31.5±1.7)%(以薯蓣皂苷元计);ST 500 和 1 000 mg/kg 灌胃组糖尿病模型小鼠在连续给药 7 d 后,小鼠血糖显著降低($P<0.05$),并且其脏器指数得到了明显改善;500 mg/kg 剂量的 ST 可以显著提高糖尿病模型小鼠的耐糖量。【结论】芜根粗总皂苷可显著降低四氧嘧啶致糖尿病小鼠的血糖。

【关键词】 芜根;粗总皂苷;降糖作用;耐糖量;脏器指数

【中图分类号】 S853.74

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2012)06-0023-05

Hypoglycemic effect of crude saponins of turnip (*Brassica rapa* L.) on diabetic mice

LIU Hao¹, JIANG Si-ping², YANG Ling-ling¹, CHEN Zhi-juan¹,
BAO Shan-fei¹, XU Ai-guo², BU Hai-tao², GAO Ping¹

(1 College of Life Sciences, Key Laboratory of Bio-Resources and Eco-Environment, Ministry of Education

Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610065, China; 2 Tibet Plateau Institute of Biology, Lhasa, Tibet 850001, China)

Abstract: 【Objective】The research was conducted to investigate the hypoglycemic effect of crude saponins of turnip (*Brassica rapa* L.) root (ST) on alloxan-induced diabetic mice. 【Method】The ST was prepared by extracting Tibet turnip root with 70% ethanol; water with heat, and then the extractive sequentially fractionated by petroleum ether and n-butanol. The n-butanol fraction is the crude saponins of turnip root. Diosgenin was used as a standard to measure the content of saponins in the n-butanol fraction. The diabetic mice were induced by injecting 85 mg/kg b. w. to tail vein. After the initial blood glucose was measured, ST (500 and 1 000 mg/kg) was orally administrated to diabetic mice for 7 days. At the end of the experiment, fast blood glucose level was measured, and liver, kidney, spleen and thymus samples of mice were taken and weighed to calculate the tissue index. We also tested the ameliorating effect of ST to OGTT. 【Result】There are (31.5±1.7)% (m/m) total saponins in the n-butanol fraction. ST (500 and 1 000

* [收稿日期] 2012-02-29

[基金项目] 西藏自治区科技厅重点项目(2005016)

[作者简介] 刘 浩(1987—),男,陕西杨凌人,在读硕士,主要从事天然产物研究。E-mail:lhhot150@163.com

[通信作者] 高 平(1963—),女,贵州清镇人,教授,博士,博士生导师,主要从事天然产物研究。E-mail:gaoping8198@sohu.com

mg/kg) could significantly reduce the fasting blood glucose after 7 days of administration, and ST 500 mg/kg could improve the oral glucose tolerance of diabetic mice. 【Conclusion】 Tibet turnip (*Brassica rapa* L.) root extract n-butanol fraction, named ST, has hypoglycemic effect on alloxan-induced diabetic mice.

Key words: turnip (*Brassica rapa* L.); crude saponins; hypoglycemic effect; OGTT; organ index

糖尿病是一种碳水化合物、脂肪和蛋白质代谢紊乱综合症,世界约有 10% 的人都是糖尿病患者^[1]。糖尿病的常见临床表现为经常口渴、尿量增加、酮血症和酮尿症,当酮体出现在血液中或者尿液中时,就称为酮酸中毒,如果不立即采取有效措施,将会导致其他糖尿病的并发症^[2]。目前用以治疗糖尿病的药物主要有胰岛素和能促进胰岛素分泌的磺脲类药物、过氧化物酶体增生激活受体 γ 激动药和 α -糖苷酶抑制剂^[3],但这些药物的作用都有限,如双胍类药物并不能提高血清胰岛素水平,更重要的是他们都有一定的副作用,如可能导致低血糖等,所以寻求一些治疗效果良好、副作用小、可长期服用的降糖药物,对糖尿病的防治具有重要意义。芫根是青藏高原特有的一种 2 年生草本植物,属十字花科,主要分布在我国西部海拔 3 000~4 000 m 的西藏和青海高原地区,当地人称它“妞妈”,一般将它作为主食和蔬菜,也作为传统中药用以缓解高原缺氧反应。芫根提取物具有降血脂的功效^[4],且从芫根中提取的芫根多糖能提高试验小鼠的耐缺氧能力^[5]。但目前对芫根降血糖作用的研究尚未见报道。本试验探讨了芫根提取物对四氧嘧啶所致糖尿病小鼠的降血糖作用,并研究了其对小鼠口服耐糖量的影响,以期芫根潜在经济价值的药用研究开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物及试剂 芫根(干),由西藏高原植物研究所提供;四氧嘧啶,美国 Sigma 公司生产;薯蓣皂苷元(纯度 $\geq 98\%$),贵州迪达生物有限公司产品;羧甲基纤维素钠(CMC-Na),南京良友化工有限公司产品;格列本脲片,天津太平洋制药有限公司产品;其他化学试剂均为四川科龙化学试剂厂产品。

1.1.2 试验动物 普通级昆明小鼠,雄性,体质量 28~32 g,由四川达硕实验动物有限公司提供,动物使用核准号为 SCXK(川)2008-24。

1.1.3 仪器 三诺安稳型血糖仪,长沙三诺生物传感器公司生产;岛津 UV-2450 型紫外可见分光光度计,日本岛津公司生产;高速万能粉碎机,北京中

兴伟业仪器有限公司生产;旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂生产;电热鼓风干燥箱,上海阳光实验仪器有限公司生产。

1.2 标准曲线的绘制

准确称取薯蓣皂苷元对照品 2.5 mg,置于 25 mL 容量瓶中,加甲醇定容至刻度线,得质量浓度为 0.1 g/L 的薯蓣皂苷元对照品。分别精确吸取对照品溶液 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 和 1.2 mL 于 10 mL 试管中,挥干溶剂后加入质量浓度 50 g/L 香草醛冰醋酸(新鲜配制)0.4 mL 和高氯酸 1.6 mL,在 60 °C 水浴中加热 15 min,冷却后加冰醋酸 5 mL,在 406 nm 波长下测定吸光度(OD_{406}),以薯蓣皂苷元质量为横轴(x),以 OD_{406} 为纵轴(y),绘制标准曲线。

1.3 芫根粗总皂苷的制备

将芫根(干)用高速粉碎机粉碎,过 0.25 mm 筛得芫根干粉备用。取一定量的芫根干粉,以 10 倍体积的体积分数 70% 乙醇回流提取 7 h,重复提取 3 次,合并提取液并减压蒸馏得到棕色浸膏;以 3 倍体积的热水溶解浸膏,之后以等体积石油醚萃取 3 次,萃取得到的水溶部分以等体积水饱和正丁醇萃取 3 次,合并正丁醇萃取液,减压蒸馏,干燥至恒质量得到芫根正丁醇萃取相,即为芫根粗总皂苷(ST),得率为 5.29%。取质量浓度为 0.3 g/L 的正丁醇萃取物浸膏 1 mL,按 1.2 节方法测定 OD_{406} ,根据 1.2 节绘制的标准曲线,计算芫根正丁醇萃取物中的总皂苷含量。

1.4 糖尿病模型小鼠的制备

在试验开始前,对所有试验小鼠禁食 12 h。试验当天随机选取 8 只小鼠作为空白对照组,尾静脉注射质量浓度为 9 g/L 的生理盐水 0.3 mL。其余小鼠尾静脉注射新鲜配制的 8.5 mg/mL 的四氧嘧啶溶液,剂量为 85 mg/kg,72 h 时从眼眶静脉丛取血测定空腹血糖,取血糖值 ≥ 16.9 mmol/L 的小鼠,即糖尿病模型小鼠用于后续试验。

1.5 芫根粗总皂苷对糖尿病小鼠空腹血糖的影响

选取 32 只血糖值 ≥ 16.9 mmol/L 的糖尿病模型小鼠,按空腹血糖值随机分为 4 组,每组 8 只,分别为模型对照组(每日灌胃质量浓度 5 g/L CMC-Na 溶液 10 mL/kg)、阳性对照组(每日灌胃质量浓

度 1.875 mg/mL 降糖药物格列本脲 25 mg/kg)、ST 低剂量组(每日灌胃质量浓度 37.5 g/L ST 500 mg/kg,约相当于生药剂量 10 g/kg)和 ST 高剂量组(每日灌胃 75 g/L ST 1 000 mg/kg,约相当于生药剂量 20 g/kg)。另取 8 只正常小鼠作为空白对照组,每日灌胃质量浓度 5 g/L 的 CMC-Na 溶液 10 mL/kg。所有药物均溶解于质量浓度 5 g/L CMC-Na 溶液中。各组在给药 7 d 后测定最终空腹血糖,之后处死所有小鼠并解剖取出胸腺、肝脏、肾脏和脾脏组织,分别称质量后计算脏器指数^[6]。

1.6 芜根总皂苷对糖尿病小鼠口服耐糖量(OG-TT)的影响

参照文献^[7]的方法,取糖尿病模型小鼠 24 只,随机分为 3 组,每组 8 只,分别为模型对照组(灌胃质量浓度 5 g/L CMC-Na 溶液 10 mL/kg)、阳性对照组(灌胃质量浓度 1.875 mg/mL 降糖药物格列本脲 25 mg/kg)和 ST 组(灌胃质量浓度 37.5 g/L ST 500 mg/kg)。另取正常小鼠 8 只作为正常对照组,灌胃质量浓度 5 g/L CMC-Na 溶液 10 mL/kg。试验前 1 天禁食 12 h,试验当天各组灌胃相应的药物。在灌胃 30 min 后,立刻灌胃质量浓度 0.15 mg/mL 的葡萄糖溶液 2.5 mg/kg。在给予葡萄糖之后的 0,30,60 和 120 min 分别采血,测定血糖含量。

1.7 数据统计分析

试验数据均以“平均值±标准差”表示,用 SPSS 11 进行 ANOVA 方差分析,用 Microsoft Excel 制图。

2 结果与分析

2.1 芜根正丁醇萃取物中总皂苷含量的测定

以吸光度 OD₄₀₆ 为纵轴(y),薯蓣皂苷元质量为

横轴(x),绘制薯蓣皂苷元标准曲线如图 1 所示。对标准曲线进行回归分析,得回归方程为 $y=3.27x-0.0218$, $R^2=0.9997$,曲线在薯蓣皂苷元质量为 0.04~0.12 mg 时线性良好。将正丁醇萃取物样品的 OD₄₀₆ 代入标准曲线方程,计算得芜根正丁醇萃取物中总皂苷的含量为 $(31.5\pm1.7)\%$ ($n=2$)。

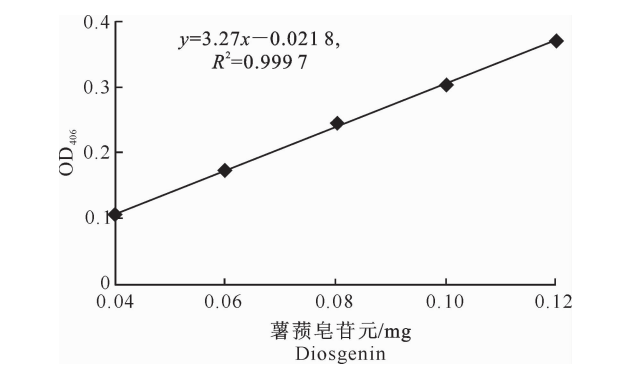


图 1 薯蓣皂苷元的标准曲线

Fig.1 Standard curve of Diosgenin

2.2 芜根粗总皂苷对糖尿病小鼠空腹血糖的影响

由表 1 可见,除正常对照组外,其他各试验组小鼠的初始(0 d)血糖平均值均≥16.9 mmol/L,并且相互间无显著差异,说明糖尿病小鼠建模和分组成功。连续给药 7 d 后,ST 低剂量组和高剂量组可以显著地降低糖尿病小鼠的空腹血糖($P<0.05$),其血糖值较模型对照组小鼠分别降低了 21.1%和 27.2%,与阳性对照组(其血糖较模型对照组下降了 23.5%)无显著差异($P>0.05$),说明 ST 降血糖效果明显,具有作为降血糖药物开发的潜质。同时,ST 低剂量组和 ST 高剂量组小鼠血糖值之间无显著差异($P>0.05$),说明 500 mg/kg 的 ST 使用剂量已经较大,再增大剂量已经不能有效提高其降血糖效果。

表 1 芜根总皂苷对糖尿病小鼠空腹血糖的影响

Table 1 Hypoglycemic effect of crude saponins of turnip root on the fasting blood glucose of diabetic mice

组别 Group	剂量/ (mg·kg ⁻¹) Dose	空腹血糖值/(mmol·L ⁻¹) Fasting blood glucose		组别 Group	剂量/ (mg·kg ⁻¹) Dose	空腹血糖值/(mmol·L ⁻¹) Fasting blood glucose	
		0 d	7 d			0 d	7 d
正常对照组 Normal control	—	5.46±1.28	5.87±1.16	ST 低剂量组 ST low dose	500	21.69±4.00	17.11±2.26 * #
模型对照组 Model control	—	21.39±4.29	20.81±4.48	ST 高剂量组 ST high dose	1 000	21.99±3.80	16.00±2.38 * #
阳性对照组 Positive control	25	22.14±3.52	16.94±2.92 *				

注:“*”表示与模型对照组相比差异显著($P<0.05$);“#”表示与阳性对照组相比差异不显著($P>0.05$)
Note:“*”Means significant difference compared with model control($P<0.05$);“#” Means no significant different compared with positive control($P>0.05$)

2.3 芜根粗总皂苷对糖尿病小鼠脏器指数的影响

由表 2 可知,阳性对照组和 ST 高剂量组小鼠

的胸腺指数分别为 8.5 ± 2.1 和 8.8 ± 3.0 ,虽然相比正常对照组小鼠(21.4 ± 3.9)还有较大差距,但已

显著地高于模型对照组 ($P<0.05$),说明阳性药物格列本脲和 ST 均能在一定程度上提高糖尿病小鼠的免疫力。各组小鼠的脾脏指数没有显著性差异 ($P>0.05$),但是模型对照组小鼠的脾脏指数均值低于其他各组。

在本试验中,糖尿病模型对照组小鼠的肾脏指数显著高于正常对照组小鼠 ($P<0.05$),而 ST 高剂量组小鼠的肾脏指数显著低于糖尿病模型对照组小鼠 ($P<0.05$),表明芜根皂苷可以降低高血糖对肾

脏的破坏,从而降低糖尿病肾病的发病率。

肝脏指数以模型对照组小鼠显著高于正常对照组,说明四氧嘧啶诱导的糖尿病小鼠的肝脏发生肿大;2 个 ST 剂量组小鼠的肝脏指数显著低于模型对照组 ($P<0.05$),其中 ST 高剂量组小鼠的肝脏指数与正常对照组小鼠已无显著性差异 ($P>0.05$),而阳性药物格列本脲对肝脏指数未表现出明显的改善作用。

表 2 芜根粗总皂苷对糖尿病小鼠脏器指数的影响

Table 2 Effect of crude saponins of turnip root on the organ index of diabetic mice					
组别 Group	剂量/(mg · kg ⁻¹) Dose	胸腺指数 Thymus index	脾脏指数 Spleen index	肾脏指数 Kidney index	肝脏指数 Liver index
正常对照组 Normal control	—	21.4±3.9 a	31.8±4.8	150.4±12.1 a	394.5±19.8 a
模型对照组 Model control	—	4.7±2.0 b	27.3±7.1	197.0±22.0 b	483.9±36.3 b
阳性对照组 Positive control	25	8.5±2.1 c	30.5±6.9	188.0±15.0 b	492.2±68.8 b
ST 低剂量组 ST low dose	500	6.3±2.1 b	30.8±4.7	193.2±16.5 b	431.2±31.0 c
ST 高剂量组 ST high dose	1 000	8.8±3.0 c	30.5±4.9	175.9±17.2 c	394.7±19.2 a

注:同列数据后标有不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)。
Note:Different later after the data in the same column means significantly different ($P<0.05$).

2.4 芜根粗总皂苷对糖尿病小鼠 OGTT 的影响

由 2.2 节可知,500 mg/kg ST 对糖尿病小鼠空腹血糖的影响与 1 000 mg/kg ST 没有显著差异,所以在 OGTT 试验中 ST 组只设置了 500 mg/kg 的剂量处理。由表 3 可以看出,阳性对照组小鼠的血

糖值在每一个时间点均显著低于模型对照组 ($P<0.05$),而 ST 组小鼠在灌胃给糖 0,60 和 120 min 时的血糖值均极显著地低于模型对照组 ($P<0.01$),说明 ST 可以在短时间内降低餐后血糖,并且其降血糖效果优于阳性药物格列苯脲。

表 3 芜根粗总皂苷对糖尿病小鼠口服耐糖量的影响

Table 3 Effect of crude saponins of turnip root on diabetic mice OGTT					
分组 Group	剂量/(mg · kg ⁻¹) Dose	血糖值/(mmol · L ⁻¹)Blood glucose			
		0 min	30 min	60 min	120 min
正常对照组 Normal control	—	5.48±1.28	16.18±1.61	12.02±1.58	8.02±1.35
模型对照组 Model control	—	24.12±2.28	28.00±2.38	27.15±2.10	25.10±2.98
阳性对照组 Positive control	25	20.88±3.30 *	23.80±1.84 *	23.00±1.63 *	21.96±1.24 *
ST 组 ST Group	500	19.74±3.07 * *	23.28±2.45 *	21.82±2.51 * *	18.45±2.78 * *

注:数据后“*”和“* *”分别代表与模型对照组相比差异达显著 ($P<0.05$)和极显著 ($P<0.01$)水平。
Note:“*”和“* *” mean that the marked group has significant difference ($P<0.05$) and extremely significant difference ($P<0.01$) with compared with Model Control respectively.

3 讨论与结论

糖尿病是一种代谢失衡疾病,其特点为高血糖并伴随有碳水化合物、脂肪和蛋白质的代谢失衡。四氧嘧啶对胰岛 β 细胞的毒性源自于其产生的自由基^[8],如果这些自由基可以被抗氧化物质消除,则可以保护胰腺^[9]。芜根 ST 可以显著降低四氧嘧啶所致糖尿病小鼠的血糖,其可能的机制之一是 ST 可

以清除四氧嘧啶产生的自由基,从而保护了胰岛 β 细胞。

格列本脲是一种磺酰类药物,这类药物不仅可以刺激胰岛素分泌,还可以促使肝脏和其他组织对血糖的利用,从而降低血糖含量^[10],长期服用格列本脲可以得到更多的胰岛样效应^[11]。本试验结果表明,芜根皂苷同格列苯脲一样,长时间服用既可以降低空腹血糖,也可以在服用后短时间内降低餐后

血糖,说明羌根皂苷可能可以促进胰岛素的分泌和其他器官对血糖的利用。本试验证明,500 mg/kg剂量的ST已经可以明显降低小鼠的血糖值,继续增大剂量,虽不能显著提高降血糖的效果,但可以更好地减少小鼠的脏器损伤。胸腺是小鼠重要的免疫器官,在给予糖尿病小鼠1 000 mg/kg剂量的ST时,其胸腺指数的改善效果最好,所以更大剂量的ST可以更好地增强糖尿病小鼠的免疫能力。一般情况下,血糖的过量利用、加强的糖原、脂肪和蛋白质的合成会导致糖尿病人的肾脏质量增大^[12-14],这些变化可能会导致严重的肾脏微血管并发症,这是导致糖尿病肾病的原因之一^[15]。本研究表明,ST高剂量组小鼠的肾脏指数与正常对照组没有显著差异。由于糖尿病肾病是糖尿病引起的最严重的并发症之一,也是糖尿病患者主要的死亡原因之一,因此与低剂量ST相比,高剂量ST对糖尿病并发症的控制效果更好。

本试验表明,羌根皂苷对四氧嘧啶所致糖尿病小鼠具有良好的降血糖作用,为西藏羌根作为降血糖药物或保健品的开发提供了理论依据。

[参考文献]

- [1] Vetrichelvan T, Jegadeesan M, Devi B A. Anti-diabetic activity of alcoholic extract of *Celosia argentea* Linn. seeds in rats [J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2002, 25(4): 526-528.
- [2] Craig M E, Hattersley A, Donaghue K C. Definition, epidemiology and classification of diabetes in children and adolescents [J]. Pediatr Diabetes, 2009, 10(Suppl.): 3-12.
- [3] 徐斯盛, 张惠斌, 周金培, 等. 新型抗糖尿病药物研究进展 [J]. 中国药科大学学报, 2011, 42(2): 97-106.
Xu S S, Zhang H B, Zhou J P, et al. Research progress of new antidiabetic drugs [J]. Journal of China Pharmaceutical University, 2011, 42(2): 97-106. (in Chinese)
- [4] 皮宁宁, 蒋思萍, 陈志娟, 等. 羌根提取物对高血脂症大鼠调节作用的初步研究 [J]. 四川动物, 2010, 29(3): 472-477.
Pi N N, Jiang S P, Chen Z J, et al. Initial study of extracts of *Bassia rapa* L. on hyperlipemia in rats [J]. Sichuan Journal of Zoology, 2010, 29(3): 472-477. (in Chinese)
- [5] Xie Y, Jiang S P, Su D H, et al. Composition analysis and anti-hypoxia activity of polysaccharide from *Brassica rapa* L. [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2010, 47(4): 528-533.
- [6] Zhang Z, Zhang W S, Du X F. Hypoglycemic effects of black glutinous corn polysaccharides on alloxan-induced diabetic mice [J]. European Food Research and Technology, 2010, 230(3): 411-415.
- [7] Bhatia A, Mishra T. Hypoglycemic activity of *Ziziphus mauritiana* aqueous ethanol seed extract in alloxan-induced diabetic mice [J]. Pharmaceutical Biology, 2010, 48(6): 604-610.
- [8] Heikkilä R E, Barden H, Cohen G. Prevention of alloxan-induced diabetes by ethanol administration [J]. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1974, 190(3): 501-506.
- [9] Fischer L J, Hamburger S A. Inhibition of alloxan action in isolated pancreatic islets by superoxide dismutase, catalase, and a metal chelator [J]. Diabetes, 1980, 29(3): 213-216.
- [10] Luzi L, Pozza G. Glibenclamide: An old drug with a novel mechanism of action [J]. Acta Diabetologica, 1997, 34(4): 239-244.
- [11] Shah S N, Badole S L, Kamble H V, et al. Effect of trigonelline: An active compound from *Trigonella foenum graecum* Linn. in alloxan induced diabetes in mice [J]. J Cell Tissue Res, 2006, 6(1): 585-590.
- [12] Levi M, Sun L J, Halailhel N, et al. Role of sterol regulatory element-binding protein 1 in regulation of renal lipid metabolism and glomerulosclerosis in diabetes mellitus [J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277: 18919-18927.
- [13] Meyer C, Stumvoll M, Nadkarni V, et al. Abnormal renal and hepatic glucose metabolism in type 2 diabetes mellitus [J]. Journal of Clinical Investigation, 1998, 102(3): 619-624.
- [14] Peterson D T, Greene W C, Reaven G M. Effect of experimental diabetes mellitus on kidney ribosomal protein synthesis [J]. Diabetes, 1971, 20(10): 649-654.
- [15] Raju J, Gupta D, Rao A R, et al. Trigonella foenum graecum (fenugreek) seed powder improves glucose homeostasis in alloxan diabetic rat tissues by reversing the altered glycolytic, gluconeogenic and lipogenic enzymes [J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2001, 224(1/2): 45-51.