

# 乌蕨醇提取物对 1 型糖尿病大鼠的降血糖作用及其机制初探

陈明<sup>1</sup>, 王恒<sup>1</sup>, 赵鸿宾<sup>1</sup>, 余跃生<sup>1</sup>, 段萍<sup>2</sup>, 范芳<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>黔南民族医学高等专科学校; <sup>2</sup>黔南州药品检验所, 都匀 558000;

<sup>3</sup>遵义医科大学生物化学与分子生物学教研室, 遵义 563000

**摘要:**为探讨乌蕨醇提取物对 1 型糖尿病大鼠的降血糖作用及其机制,本研究以链脲佐菌素(STZ)腹腔注射诱导建立 1 型糖尿病大鼠模型,并将大鼠分为空白对照组、1 型糖尿病模型组、乌蕨醇提取物低剂量组(30 mg/kg)和高剂量组(60 mg/kg)。分别用生理盐水及乌蕨醇提取物每天灌胃 1 次,连续 28 d,灌胃容积为 20 mL/kg。结果证明,乌蕨醇提取物可减缓 STZ 致 1 型糖尿病大鼠体重的负增长,降低空腹血糖水平( $P < 0.05$ );升高胰岛素及葡萄糖激酶(GCK)含量;降低醛糖还原酶(AR)含量( $P < 0.05$ )。同时,胰腺组织 HE 染色结果显示:乌蕨醇提取物高、低剂量组糖尿病大鼠的胰岛数目较 1 型糖尿病模型组显著增多,胰岛及外分泌腺萎缩均有不同程度减轻。提示乌蕨醇提取物可显著降低 STZ 致 1 型糖尿病模型大鼠空腹血糖水平,其降糖作用可能与升高糖尿病大鼠血清葡萄糖激酶含量和降低 AR 含量、改善糖尿病大鼠胰岛损伤、促进胰岛  $\beta$  细胞分泌胰岛素有关。

**关键词:**乌蕨;1 型糖尿病;降血糖;

中图分类号:R285;R962

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.12.007

## Hypoglycemic Effects and Its Mechanism of Ethanol Extract from *Stenoloma Chusanum* (L) Ching on Type 1 Diabetic Rats Induced by Streptozotocin

CHEN Ming<sup>1</sup>, WANG Heng<sup>1</sup>, ZHAO Hong-bin<sup>1</sup>, YU Yue-sheng<sup>1</sup>, DUAN Ping<sup>2</sup>, FAN Fang<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Qiannan Medical College for Nationalities; <sup>2</sup>Qiannan Institute for Drug Control, Duyun 558000, China;

<sup>3</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China

**Abstract:** To investigate the hypoglycemic effects of ethanol extract and its mechanism from *Stenoloma chusanum* (L) Ching on type 1 diabetic rats. The research group established a model of type 1 diabetes rats by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ). The SD rats were randomly divided into four groups, including control group, model group, low dose group of 30 mg/kg (LG) and high dose group of 60 mg/kg (HG) and diabetic rat's model induced by STZ. Rats in LG and HG was oral administration by ethanol extract from SLC once a day until 28 days and gastric perfusion volume is 20 mL/kg. The body weight, fasting blood glucose (FBG), serum insulin (INS), glucokinase (GCK) and aldose reductase (AR) of rats in each group were measured and the morphology of pancreas was observed. The 28 days administration of extract of SLC decreased the negative growth of body weight, FBG and AR significantly in diabetic rats induced by STZ ( $P < 0.05$ ) and increased INS, GCK ( $P < 0.05$ ). Morphological observations show that the number of islets in LG and HG was more than that in model group. Islet and exocrine atrophy were reduced in varying degrees. Ethanol extract from SLC has the hypoglycemic effect on fasting blood glucose in diabetic rats induced by STZ, and the mechanism may be related to decreasing aldose reductase, increasing serum glucokinase, protecting the islets and promoting insulin secretion by pancreatic  $\beta$  cells.

**Key words:** *Stenoloma chusanum* (L) Ching; type 1 diabetes; hypoglycemia

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是由于胰岛素分泌不足及胰岛素抵抗而引起,以慢性高血糖为特征,

常伴有全身代谢紊乱的一种多病因的代谢疾病。其中 1 型糖尿病是由于胰岛  $\beta$  细胞受到细胞介导的自身免疫性破坏,导致胰岛素分泌绝对不足引起的代谢紊乱<sup>[1]</sup>。乌蕨(*Stenolome chusanum* (L) Ching, SLC)系鳞始蕨科乌蕨属植物,为多年生草本,其味微苦,性寒,具有清热解毒、利湿、止血的功效,广泛

收稿日期:2018-07-04 接受日期:2018-11-07

基金项目:贵州省卫生计生厅黔南民族医学高等专科学校科技联合基金(gzwbj2013-2-006);贵州省教育厅科研项目(黔教科 2002 334)

\* 通信作者 Tel:86-851-28642710; E-mail:fanf1970@126.com

分布于我国许多省份和地区,民间长期用其治疗外伤感染<sup>[2]</sup>。现代研究表明 SLC 含有黄酮、酚类、挥发油、甾体和多糖等成分,其提取物或单体化合物具有较强的抗菌、抗氧化、抗炎、保肝、止血、解毒等作用<sup>[3,4]</sup>。课题组在前期研究了 SLC 对 2 型糖尿病小鼠的降血糖作用<sup>[5]</sup>,本研究旨在进一步观察 SLC 提取物对链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)致 1 型糖尿病模型大鼠空腹血糖的影响,并初步探讨其机制。

## 1 实验材料

### 1.1 动物

健康清洁级 7~8 周龄 SD 大鼠,雄性,体重 180~220 g,由贵州医科大学实验动物中心提供。动物合格证号 SCXK(黔)[2012-0001]。饲养于室温 18~22 ℃、相对湿度 60%~65%、光照周期每天 12 h 的环境中。适应性喂养 3 天。

### 1.2 药品与试剂

SLC 原植物采摘于贵州省都匀市马鞍山林区,经黔南民族医学高等专科学校中药教研室魏学军教授鉴定为鳞始蕨科 SLC 属植物。链脲佐菌素,批号:20150625;胰岛素(insulin, INS),批号:20150722,均购于北京索莱宝科技有限公司(代购于 Sigam 公司,美国)。葡萄糖激酶(glucokinase, GCK)、醛糖还原酶(aldose Reductase, AR)、血糖测试盒(批号:201705),武汉基因美生物科技有限公司。柠檬酸、柠檬酸三钠(20150452),天津市津宏化工有限公司。

### 1.3 仪器和设备

AG-696 型血糖测试仪,天津九安医疗电子股份有限公司;Multiskan MS 型酶标仪,Lab-systems 公司,芬兰;TDL-4ZB 型台式低速离心机,湖南星科科学仪器厂;Agilent Cary 100 型分光光度计,安捷伦科技有限公司,美国。

## 2 实验方法

### 2.1 SLC 提取物的制备

取干燥的 SLC 药材(地上部分)粉碎过筛,称取 1000 g,用 15 倍量 65% 乙醇,80 ℃ 水浴回流提取三次,1 h/次,合并提取液,减压浓缩至无醇味,转移至分液漏斗中,加石油醚萃取 5 次,将母液减压蒸发除去石油醚,然后加入等体积乙酸乙酯,萃取 4~6 次,合并乙酸乙酯萃取液,将其减压浓缩,回收乙酸乙酯,得到乙酸乙酯萃取物,减压干燥;称取干燥的乙

酸乙酯萃取物适量,加少量水溶解,加适量吐温 80,配制成相应浓度,供实验使用。

### 2.2 STZ 缓冲液的配制及诱导糖尿病大鼠模型的制备<sup>[6]</sup>

#### 2.2.1 STZ 缓冲液的配制

将 STZ 冰浴、避光溶解于 0.1 mol/L 的柠檬酸三钠-柠檬酸缓冲液中(pH4.5),制成浓度为 10 mg/mL 的 STZ 液。

#### 2.2.2 1 型糖尿病大鼠模型的制备

健康雄性 SD 大鼠 60 只,随机分为两组,空白对照组 10 只,模型复制组 50 只;常规饲料喂养,自由饮食饮水,禁食不禁水过夜(约 16 h)。正常组按 6 mL/kg 剂量腹腔注射柠檬酸三钠-柠檬酸缓冲液。模型复制组大鼠按 60 mg/kg 剂量腹腔注射 STZ,注射 72 h 后,将全部大鼠禁食过夜,尾静脉采血,测定空腹血糖(fasting Blood glucose, FBG)值。FBG 值高于 16.7 mmol/L,且出现“三多一少”症状者为模型复制成功。模型复制组有 34 只大鼠符合 1 型糖尿病模型标准。

### 2.3 分组及给药

空白对照组(CG)10 只。将 34 只模型复制成功的大鼠随机分为 1 型糖尿病模型组(IG)12 只,用生理盐水灌胃;SLC 低剂量组(LG)11 只(30 mg/kg)及 SLC 高剂量组(HG)11 只(60 mg/kg)用相应剂量 SLC 醇提取物灌胃。以上各组灌胃体积为 20 mL/kg,每天灌胃 1 次,连续 28 天。

### 2.4 血清制备及相关指标分析

各组大鼠灌胃 28 天后,尾静脉采血测血糖;股动脉取血,离心(3000 rpm)10 min 取血清,根据待测生化指标分析需要分装,置-20 ℃ 冰箱保存备用。测定各组血清中 INS、GCK 及 AR 含量,计算降血糖率(Glucose lowering rate, GLR) = (模型组血糖均值 - 受试药物组血糖均值)/模型组血糖均值 × 100%<sup>[7]</sup>。

### 2.5 大鼠胰腺病理形态学观察

取血后处死大鼠,立即取胰岛组织,以中性福尔马林固定,常规石蜡包埋,切片,进行 HE 染色,光学显微镜下观察拍照。

### 2.6 统计学处理

应用统计软件 SPSS 23.0 对数据进行统计及分析,统计方法为单因素方差分析,数据以均值 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间两两比较采用 SNK 及 LSD 法,  $P < 0.05$  时差异具有统计学意义。

### 3 结果与分析

#### 3.1 SLC 提取物对大鼠体重的影响

造模前各组大鼠体重无明显差异( $P > 0.05$ )。

灌胃 28 天后,1 型糖尿病模型组大鼠体重呈现负增长,空白对照组及 SLC 提取物高剂量组大鼠体重显著上升( $P < 0.05$ );与 1 型糖尿病模型组相比,SLC 提取物高、低剂量组大鼠体重增加( $P < 0.05$ )(见表 1)。

表 1 SLC 醇提取物对大鼠体重的影响 ( $n = 44, \pm s$ )

Table 1 Effects of SLC alcohol extract on body weight in rats ( $n = 44, \pm s$ )

组别 Groups	<i>n</i>	剂量 Doses (mg/kg)	灌胃前体重 Pre-treatment (g)	灌胃 28 天体重 28 days after treatment (g)
空白对照组 CG	10	-	200.3 ± 13.5	322.1 ± 61.6* #
SLC 模型组 IG	12	-	202.4 ± 10.5	170.6 ± 44.9*
SLC 低剂量组 LG	11	30	202.6 ± 14.6	203.3 ± 53.7 #
SLC 高剂量组 HG	11	60	200.4 ± 11.3	229.8 ± 50.8* #

注:与同组灌胃前比较,\* $P < 0.05$ ,与 1 型糖尿病模型组比较 # $P < 0.05$

Note: \* $P < 0.05$ , compared with the same group before gavage, # $P < 0.05$ , compared with the type 1 diabetes model group.

#### 3.2 SLC 提取物对大鼠空腹血糖及降糖率的影响

模型复制后空白对照组 FBG 低于 16.7 mmol/L,其余各组血糖均高于 16.7 mmol/L,且大鼠出现三多一少症状,表明模型复制成功。灌胃前,空白对照组大鼠 FBG 均低于其他各组( $P < 0.05$ ),其他各组间 FBG 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。灌胃 28

天后,与空白对照组相比,其余各大鼠 FBG 显著上升( $P < 0.05$ )。与 1 型糖尿病模型组相比,SLC 提取物高、低剂量组 FBG 显著下降( $P < 0.05$ );但 SLC 提取物高、低剂量组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )(见表 2)。

表 2 SLC 提取物对大鼠 FBG 及 GLR 的影响

Table 2 Effects of SLC alcohol extract on FBG and GLR in rats

组别 Group	<i>n</i>	灌胃前 FBG FBG before treatment (mmol/L)	灌胃后 FBG FBG after treatment (mmol/L)	GLR (%)
空白对照 CG	10	6.40 ± 1.11	6.12 ± 1.06 #	-
SLC 模型组 IG	12	20.89 ± 2.02*	22.07 ± 0.76	-
SLC 低剂量组 LG	11	20.69 ± 2.81*	13.17 ± 1.66 #	40.3
SLC 高剂量组 HG	11	20.81 ± 2.319*	11.94 ± 1.92 #	45.90

注:灌胃前,与空白对照组比较,\* $P < 0.05$ ;灌胃后与 1 型糖尿病模型组比较,# $P < 0.05$ 。

Note: \* $P < 0.05$ , before treatment, compared with the control group, # $P < 0.05$ , after treatment, compared with type 1 diabetes model group.

#### 3.3 SLC 提取物对大鼠胰岛素的影响

灌胃 28 天后,与空白对照组相比,各组大鼠血清 INS 水平均下降( $P < 0.05$ );与 1 型糖尿病模型

组比较,SLC 高、低剂量组 INS 水平显著增加( $P < 0.05$ ),SLC 高、低剂量组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )(见表 3)。

表 3 SLC 提取物对大鼠 INS 水平的影响

Table 3 Effects of SLC alcohol extract on INS in rats

组别 Group	<i>n</i>	给药 28 天 INS INS level 28 days after administration (mU/L)
空白对照组 CG	10	331.45 ± 63.38 #
SLC 模型组 IG	12	136.37 ± 18.03*
SLC 低剂量组 LG	11	262.74 ± 40.38* #
SLC 高剂量组 HG	11	256.15 ± 44.12* #

注: \* $P < 0.05$ ,与空白对照组比较; # $P < 0.05$ ,与 1 型糖尿病模型组比较。

Note: \* $P < 0.05$ , compared with the control group; # $P < 0.05$ , compared with the type 1 diabetes model group.

### 3.4 SLC 提取物对大鼠血清 GCK、AR 的影响

与空白对照组比较,各组大鼠血清 GCK 含量显著下降( $P < 0.05$ ),与 1 型糖尿病模型组比较,SLC

高、低剂量组 GCK 均出现了显著增加( $P < 0.05$ );与 1 型糖尿病模型组比较,SLC 高、低剂量组 AR 含量显著降低( $P < 0.05$ )(见表 4)。

表 4 SLC 提取物对大鼠 GCK、AR 的影响

Table 4 Effects of SLC alcohol extract on GCK、AR in rats

组别 Group	<i>n</i>	GCK (ng/mL)	AR (ng/mL)
空白对照组 CG	10	10.98 ± 0.79 <sup>#</sup>	2049.63 ± 530.75 <sup>#</sup>
SLC 模型组 IG	12	6.63 ± 0.56 <sup>#</sup>	3130.12 ± 557.58 <sup>*</sup>
SLC 低剂量组 LG	11	8.40 ± 0.51 <sup>*#</sup>	2604.18 ± 172.08 <sup>*#</sup>
SLC 高剂量组 HG	11	10.05 ± 0.80 <sup>*#</sup>	2259.28 ± 151.48 <sup>*#</sup>

注: \*  $P < 0.05$ ,与空白对照组比较; #  $P < 0.05$ ,与 1 型糖尿病模型组比较。

Note: \*  $P < 0.05$ , compared with the control group; #  $P < 0.05$ , compared with the type I diabetes model group.

### 3.5 SLC 提取物对大鼠胰岛形态学的影响

HE 染色结果显示,正常对照组胰岛分布正常,细胞形态规整、分布规则,胰岛形态及外分泌腺无明显病理改变(Fig. 1A)。1 型糖尿病模型组胰岛萎缩,

胰岛数目明显减少,胰岛部分细胞空泡变性,胰岛内可见炎性细胞浸润(Fig. 1B)。SLC 提取物高剂量组较 1 型糖尿病模型组,胰岛萎缩不同程度减轻,炎性细胞浸润程度减轻,胰岛数目增加(Fig. 1D)。

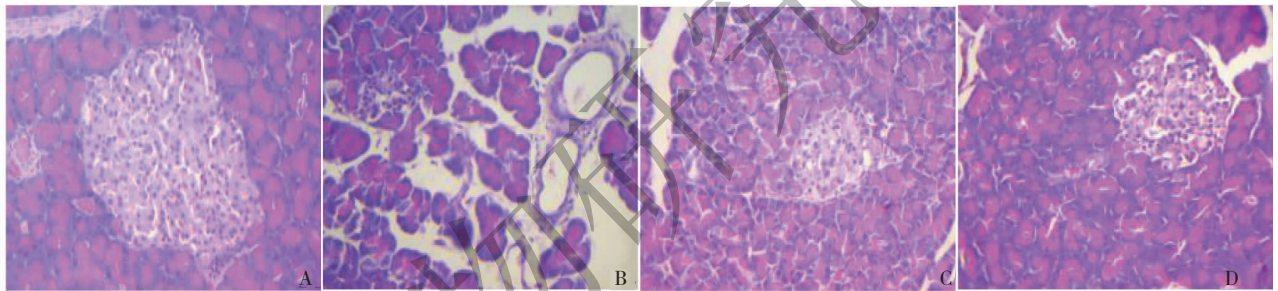


图 1 SLC 提取物对大鼠胰岛形态学的影响

Fig. 1 Effects of SLC alcohol extract on islet morphology in rats

注:A. 空白对照组 B. 模型组;C. 低剂量组;D. 高剂量组。

Note: A. Control group B. type I diabetes model group; C. Low dose group; D. High dose group.

## 4 结论

本研究采用链脲佐菌素腹腔注射诱导法复制 1 型糖尿病动物模型,造模后大鼠 FBG 值高于 16.7 mmol/L,且出现“三多一少”症状者为模型复制成功。

GCK 是己糖激酶同工酶的一种,存在于胰腺和肝脏中,是糖代谢的重要调节因子。研究发现在糖尿病个体中普遍存在 GCK 活性的降低<sup>[8]</sup>,同时发现 GCK 对糖代谢有显著调节作用,GCK 活性微小的改变即可导致糖代谢的显著变化,因此认为 GCK 是具有前景的糖尿病治疗药物新靶点。AR 是多元醇通路中重要的限速酶,持续高血糖刺激下,细胞内多元醇代谢通路被激活,葡萄糖在 AR 的催化下还原为

渗透性强的山梨醇,后者在山梨醇脱氢酶(SDH)作用下转成果糖。肾组织 AR 活性的增强,机体抗氧化能力低下与糖尿病肾损伤的发生、发展关系密切<sup>[9]</sup>,GCK 是 INS 分泌的葡萄糖感受器,可影响 INS 的分泌,具有协同 INS 调控糖代谢的能力<sup>[10]</sup>。

本研究用 SLC 醇提取物对 1 型糖尿病模型大鼠进行降血糖实验。结果显示,与模型组比较,SLC 提取物低剂量组在给药 28 天后大鼠体重无明显变化,高剂量组给药 28 天后体重显著增加;SLC 提取物可显著降低 1 型糖尿病大鼠 FBG 水平,同时显著升高 1 型糖尿病大鼠的血清 INS 浓度。SLC 提取物高剂量组、低剂量组的 GLR 分别达到 45.90%、40.30%。提示 SLC 提取物能有效缓解糖尿病大鼠消瘦的状况,对大鼠糖尿病的症状有一定缓解作用。

为进一步了解 SLC 提取物缓解大鼠糖尿病症状的可能机制,本研究观察了 SLC 提取物对糖尿病大鼠胰岛形态学及血清 GCK、AR 含量的影响。结果显示,在灌胃 28 天后不同剂量 SLC 提取物对大鼠受损的胰岛结构均有修复作用,主要体现为:胰岛及外分泌腺萎缩程度减轻,炎性细胞浸润程度减轻,胰岛数目增加。其中,高剂量组修复作用优于低剂量组。血清学检测结果显示,SLC 提取物能够显著增高糖尿病大鼠血清 GCK 含量、显著降低 AR。

综上所述,SLC 提取物对 STZ 所致 1 型糖尿病大鼠有降血糖作用,可降低 1 型糖尿病大鼠 FBG,增加体重,修复受损的胰岛结构。其降糖作用可能与升高糖尿病大鼠血清 GCK 含量和降低 AR 含量,改善模型组大鼠胰岛损伤,促进胰岛  $\beta$  细胞分泌 INS 有关。SLC 对糖尿病大鼠的降血糖作用及具体机制有待进一步研究。

#### 参考文献

- 1 Yang YJ(杨永晶),Han LJ(韩丽娟),Meng J(孟晶),*etal.* Effect of raspberry pulp powder on blood glucose, immune response and oxidative stress in type 1 diabetic rats[J]. *Nat Prol Res Det* (天然产物研究与开发), 2015, 27: 1717-1722.
- 2 Chen M(陈明),Chen JX(陈金秀),Duan P(段萍). A series of toxicology studies of *Stenoloma chusanum* Ching[J]. *J Chin Med Pharm* (中医药学报). 2000,6:48-50.
- 3 Wu SQ(吴思琪). Seasonal-dynamics, composition analysis, antioxidant activity and antitumor activity of flavonoids from

*Stenoloma chusanum* Ching[D]. Shanghai:Shanghai Normal University(上海师范大学),2016.

- 4 Chen M(陈明),Duan P(段萍),Chen JX(陈金秀). Experimental study on the antibacterial activity of *Stenoloma chusanum* Ching[J]. *J Qiannan Med Coll* (黔南民族医学学报). 1998,11(4):1-2.
- 5 Chen M(陈明),Wang H(王恒),Zhao HB(赵鸿宾),*et al.* Experimental study on hypoglycemic effect of *Stenoloma chusanum* Ching on mice[J]. *DM New World* (糖尿病新世界). 2017,20(7):33-35.
- 6 Ramachandran S,Faisal TK,Anjumary J,*et al.* Comparative evaluation of hypoglycemic and hypolipidemic activity of various extract of *Anogeissuslatifolia* bark in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *J Complement Integr Med*,2017,14: 20160130.
- 7 Wu W,Sun Z,Qian L,*et al.* Influence of the glucose-lowering rate on left ventricular function in patients with type 2 diabetes and coronary heart disease[J]. *Journal of Diabetes & Its Complications*,2012,26(2):83-88.
- 8 Haeusler R A,Camastra S,Astiarraga B,*et al.* Decreased expression of hepatic glucokinase in type 2 diabetes[J]. *Mol-Metab*,2014,4:222-226.
- 9 Wang X,Li W,Kong D. Cyclocaryapaliurus extract alleviates diabetic nephropathy by inhibiting oxidative stress and aldose reductase[J]. *Ren Fail*,2016,38:678-685.
- 10 Hua H,Shang L,Martinez H,*et al.* iPSC-derived  $\beta$  cells model diabetes due to glucokinase deficiency[J]. *J Clin Invest*, 2017,127:1115.

致谢:对以下合作单位参与本刊的学术建设表示由衷的感谢!

广西壮族自治区药用植物园

昆明医科大学药学院

西南交通大学生命科学与工程学院

西南交通大学期刊社