

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201704020

引文格式: 高良才, 王欣怡, 陆诗韵, 等. 锈毛草莓积雪草合剂对 STZ 小鼠降血糖作用研究 [J]. 广西植物, 2018, 38(4):451-456
GAO LC, WANG XY, LU SY, et al. Antidiabetic effects of *Fragaria nilgerrensis* and *Centella asiatica* compound on STZ-induced diabetic mice [J].
Guihaia, 2018, 38(4):451-456

锈毛草莓积雪草合剂对 STZ 小鼠降血糖作用研究

高良才*, 王欣怡, 陆诗韵, 周梦璇, 陈清, 林青楠

(华东师范大学 生命科学学院, 上海 200241)

摘要: 采用 75% 乙醇萃取锈毛草莓及积雪草, 制备成合剂, 通过 STZ 诱导建立糖尿病小鼠模型, 随机分为模型组、低剂量组及高剂量组, 分别以蒸馏水、4 及 8 g · kg⁻¹ 锈毛草莓积雪草合剂灌胃, 1 次 · d⁻¹, 持续 4 周, 另设正常组作为对照。探究锈毛草莓积雪草合剂对糖尿病小鼠的降血糖效果及作用机制。结果表明: (1) 不同剂量的锈毛草莓积雪草合剂均能显著降低糖尿病小鼠血糖值, 提高糖耐量并减轻其多食、多饮、多尿的症状。(2) 低剂量组小鼠血清 TC、TG 含量较模型组有显著提高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 肝脏 SOD、CAT 活性显著提高 ($P < 0.05$), MDA 含量明显降低。(3) 低剂量黄毛草莓积雪草合剂效果优于二甲双胍, 毒性实验显示锈毛草莓积雪草合剂实属无毒。该研究结果表明锈毛草莓积雪草合剂具有降血糖作用, 同时能够降低糖尿病小鼠的血脂水平, 其作用机制可能与提高肝脏抗氧化能力有关。

关键词: 锈毛草莓, STZ, 糖尿病, 降血糖, 抗氧化

中图分类号: Q946.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2018)04-0451-06

Antidiabetic effects of *Fragaria nilgerrensis* and *Centella asiatica* compound on STZ-induced diabetic mice

GAO Liangcai*, WANG Xinyi, LU Shiyun, ZHOU Mengxuan, CHEN Qin, LIN Qingnan

(Department of Biology Science, East China Normal University, Shanghai 200241, China)

Abstract: We extracted medicine compound (FN-MC) by 75% ethanol. STZ-induced diabetic mice were randomly divided into model, low-dose and high-dose groups, respectively, and treated with distilled water and FN-MC at doses of 4 and 8 g · kg⁻¹ for 4 weeks. Control group was treated with distilled water. The results showed that FN-MC could significantly lower the fasting blood glucose, reduced food and water intake, and improved the level of OGGT. Low-dose FN-MC could obviously increase the levels of TC and TG ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), decrease the level of MDA, enhance the activities of SOD and CAT ($P < 0.05$). Besides, Low-dose FN-MC was more effective than metformin. Toxicity test showed that FN-MC was non-toxic. In conclusion, FN-MC could decrease blood glucose in STZ-induced diabetic mice by mechanisms of enhancing the activity of antioxidant in liver.

Key words: *Fragaria nilgerrensis*, streptozotocin, diabetic, hypoglycemic, antioxidation

收稿日期: 2017-06-02

基金项目: 上海市科委科研基金(16DZ2348900); 国家大学生创新项目(201610269091) [Supported by Science and Technology Foundation of Shanghai (16DZ2348900); National Training Programs of Innovation and Entrepreneurship for Undergraduates (201610269091)].

作者简介: 高良才(1976-), 男, 福建福清人, 博士, 工程师, 主要从事糖尿病药物开发研究, (E-mail) lcgao@bio.ecnu.edu.cn。

* 通信作者

糖尿病是一种由遗传或后天胰岛素分泌缺陷引起的以糖代谢紊乱及高血糖为特征的代谢性疾病。患者多受其并发症的影响,如心血管病变、糖尿病肾病、眼部病变、糖尿病足等(刘明山,2015)。糖尿病的治疗手段中,西药存在靶点单一的问题,很难在控制血糖的同时对糖尿病并发症有兼顾作用(孔令敏,2012),中草药在这方面有很大优势,其多靶点综合作用、副作用较小的潜在优势使其在糖尿病治疗中成为研究热点(陈吉生和郑聪,2011)。

锈毛草莓(*Fragaria nilgerrensis*)为蔷薇科草莓属植物,别名黄毛草莓、白草莓,生长在海拔700~3000 m的山坡草地或沟边林下,分布于我国云南、广西、四川、贵州等地(傅立国,2004),有清热解毒、活血祛瘀的功效,具有较好的药用价值且资源丰富(王丽等,2011)。积雪草(*Centella asiatica*)为伞形科积雪草属植物,别名落得打、连钱草,分布于云南、福建、浙江、江苏、湖南等地,具有镇定、安定的作用(贺惠娟,2010)。云南地区常将锈毛草莓制成合剂用于糖尿病患者辅助治疗,但目前尚未有锈毛草莓积雪草合剂药理作用的研究报道。本实验旨在探究锈毛草莓积雪草合剂对STZ诱导(杨巍等,2006)的糖尿病小鼠的降血糖作用,研究其对糖尿病小鼠的血脂、糖代谢影响,为探究锈毛草莓积雪草合剂的降血糖机理提供依据。

1 材料

1.1 动物

昆明种小鼠120只,成年雄性,体重(20±2)g,由华东师范大学实验动物中心提供。

1.2 试剂

链脲佐菌素(购自上海源聚生物科技有限公司,批号140817、140329),柠檬酸,柠檬酸钠,乙醇,氯化钠,冰醋酸(购自国药集团化学试剂北京有限公司),甘油三酯(TC)、总胆固醇(TG)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.3 仪器

旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),SHB-III循环水式真空泵(上海申胜生物技术有限公司),

稳豪型血糖仪(强生医疗器材有限公司),血糖试纸(Life Scan, Inc.),酶标仪(ELX800 Universal Microplate Reader),T6新悦型分光光度计,台式低速离心机,台式高速离心机(无锡市瑞江分析仪器有限公司),常用手术器械。

2 方法

2.1 STZ 糖尿病小鼠模型建立

小鼠120只适应性饲养一周后,随机选择10只作为空白对照组。剩余小鼠以STZ诱导1型糖尿病模型,按40 mg·kg⁻¹剂量腹腔注射0.4% STZ-枸橼酸钠溶液,正常组腹腔注射等量柠檬酸钠缓冲液。建模1周,小鼠禁食6 h,通过血糖仪测定空腹血糖值,弃去低于15 mmol·L⁻¹或大于30 mmol·L⁻¹的小鼠,选取高于15 mmol·L⁻¹作为STZ诱导的糖尿病小鼠。将建模成功的小鼠按血糖值平均分为模型组、低剂量组和高剂量组。

2.2 锈毛草莓积雪草合剂制备

锈毛草莓与积雪草干燥后剪碎,各称取12 g,75%乙醇500 mL室温下浸提3 h,转移至旋转蒸发器中真空蒸煮后过滤取上清,制成生药浓度0.8 g·mL⁻¹的合剂。

2.3 小鼠灌胃给药及血糖值测定

各组均按10 mL·kg⁻¹体积,正常组和模型组灌胃蒸馏水,低剂量组和高剂量组分别灌胃0.4 g·kg⁻¹和0.8 g·kg⁻¹锈毛草莓积雪草合剂,阳性组灌胃0.15 g·kg⁻¹二甲双胍。1次·d⁻¹,共4周。每周测定小鼠血糖,禁食6 h后尾静脉采血,测定空腹血糖。每周记录小鼠体重、摄食量及饮水量变化。

2.4 口服葡萄糖耐量及生化指标测定

末次给药后1 d,进行口服葡萄糖耐量试验(OGTT)。小鼠禁食5 h,正常饮食1 h后,给予2 g·kg⁻¹葡萄糖溶液灌胃,分别于葡萄糖处理后0、30、60、120 min测定血糖值。小鼠眼球采血,处死后立即取出肝组织,制成肝匀浆。全血于冰浴中静置15 min,2000 r·min⁻¹离心20 min,测定血清中甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)含量,肝脏中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性及丙二醛(MDA)含量,均按试剂盒说明书操作。

表 1 锈毛草莓积雪草合剂对 STZ 小鼠空腹血糖值的影响

Table 1 Effects of FN-MC on fasting blood glucose of STZ-induced mice

组别 Group	血糖 Glucose level (mmol · L ⁻¹)				
	给药前 Before treatment	给药 1 周 One week after treatment	给药 2 周 Two weeks after treatment	给药 3 周 Three weeks after treatment	给药 4 周 Four weeks after treatment
正常组 Control group	9.75±1.72 **	8.87±1.00 **	10.68±0.89 **	8.62±0.95 **	8.18±0.43 **
模型组 Model group	20.41±4.39	26.66±2.17	30.15±2.53	33.45±2.43	32.05±3.50
二甲双胍 Metformin group	19.7±3.42	24.3±3.22	28.8±3.34	27.8±2.77 **	24.5±4.34 *
低剂量组 Low-dose group	20.06±4.32	23.22±5.86	25.34±4.50 *	28.40±3.71 **	22.68±7.43 **
高剂量组 High-dose group	18.48±3.83	24.50±2.72	29.97±1.36	28.10±3.69 **	23.68±9.80 *

注: 数据 = 平均值 ± 标准差 (n = 10); 与模型组相比, * 表示 P < 0.05, ** 表示 P < 0.01。下同。

Note: Value = $\bar{x} \pm s$ (n = 10). Compared with the model group, * represents P < 0.05, ** represents P < 0.01. The same below.

表 2 锈毛草莓积雪草合剂对 STZ 小鼠体重的影响

Table 2 Effects of FN-MC on body weight of STZ-induced mice

组别 Group	体重 Weight (g)				
	给药前 Before treatment	给药 1 周 One week after treatment	给药 2 周 Two weeks after treatment	给药 3 周 Three weeks after treatment	给药 4 周 Four weeks after treatment
正常组 Control group	34.35±2.45 *	38.07±2.94 *	40.63±3.78 *	42.37±3.81 *	43.10±4.00 **
模型组 Model group	31.09±3.22	34.93±2.47	36.33±2.58	38.55±2.41	38.95±1.05
二甲双胍 Metformin group	30.76±3.31	35.3±2.24	38.4±3.35	38.8±2.41	39.4±1.34
低剂量组 Low-dose group	30.90±3.10	34.04±2.70	35.73±3.07	37.68±3.56	37.73±4.86
高剂量组 High-dose group	31.32±2.82	33.17±2.80	32.38±2.97 *	32.50±4.22 **	30.97±3.30 **

2.5 急性毒性试验

昆明种雄性小鼠, 每组 10 只, 给药前禁食不禁水 12 h, 分别以梯度浓度锈毛草莓积雪草合剂灌胃, 24 h 后观察小鼠状态。

2.6 统计学处理

采用 SPSS 17.0 进行数据统计, 检验用单因素方差分析 (ANOVA), P < 0.05 有显著性差异。

3 结果与分析

3.1 锈毛草莓积雪草合剂对 STZ 糖尿病小鼠血糖的影响

与正常组相比, 模型组血糖值显著升高 (P < 0.01), 与模型组相比, 二甲双胍及锈毛草莓积雪

草合剂均可显著降低小鼠空腹血糖值 (P < 0.01)。8 g · kg⁻¹锈毛草莓积雪草合剂降血糖作用不如 4 g · kg⁻¹明显, 表明锈毛草莓积雪草合剂对 STZ 小鼠具有明显的降血糖作用, 4 g · kg⁻¹是锈毛草莓积雪草合剂的有效降糖浓度 (表 1)。

3.2 锈毛草莓积雪草合剂对 STZ 糖尿病小鼠体重、饮食量的影响

各组小鼠体重无显著统计学差异 (P > 0.05) (表 2)。与正常组相比较, 模型组小鼠出现了多饮、多食、多尿的情况。二甲双胍及 4 g · kg⁻¹锈毛草莓积雪草合剂可以显著降低小鼠的摄食量和饮水量 (P < 0.01), 有效改善糖尿病小鼠“三多”的状况。8 g · kg⁻¹锈毛草莓积雪草合剂对 STZ 小鼠饮食量影响不稳定 (图 1, 图 2)。表明锈毛草莓积雪

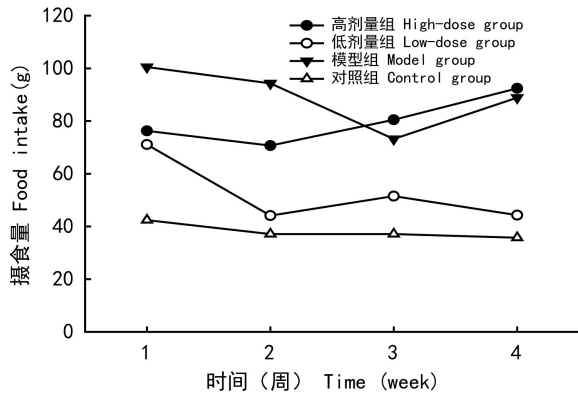


图1 锈毛草莓积雪草合剂对 STZ 小鼠摄食量的影响 ($n=10$)

Fig. 1 Effects of FN-MC on food intake of STZ-induced mice ($n=10$)

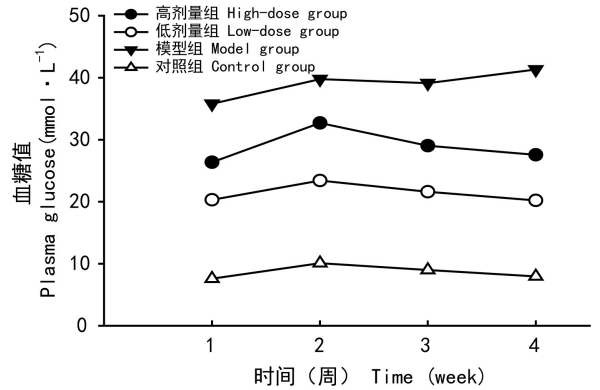


图3 锈毛草莓积雪草合剂对 STZ 小鼠口服葡萄糖耐量的影响 ($n=10$)

Fig. 3 Effects of FN-MC on OGTT of STZ-induced mice ($n=10$)

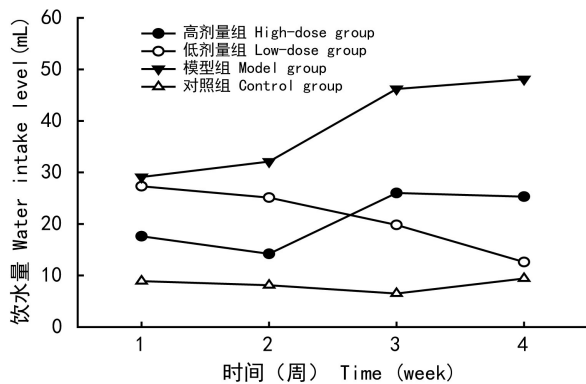


图2 锈毛草莓积雪草合剂对 STZ 小鼠饮水量的影响 ($n=10$)

Fig. 2 Effects of FN-MC on water intake of STZ-induced mice ($n=10$)

草合剂能改善糖尿病小鼠的代谢水平, $4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 是锈毛草莓积雪草合剂的有效作用浓度。

3.3 锈毛草莓积雪草合剂对 STZ 糖尿病小鼠口服葡萄糖耐量的影响

与正常组相比,模型组血糖值持续升高。与模型组相比,阳性组及低剂量组小鼠血糖值明显下降,接近自身正常水平。高剂量组小鼠血糖值不稳定(图3)。图3结果表明,二甲双胍及锈毛草莓积雪草合剂对 STZ 糖尿病小鼠的 OGTT 有明显

修复和改善作用。 $8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 锈毛草莓积雪草合剂糖耐量修复作用不如 $4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 锈毛草莓积雪草合剂明显。结果说明,锈毛草莓积雪草合剂能显著修复糖尿病小鼠的口服葡萄糖耐糖量, $4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 是锈毛草莓积雪草合剂的有效作用浓度。

3.4 锈毛草莓积雪草合剂对 STZ 糖尿病小鼠血脂及肝脏抗氧化水平的影响

与正常组相比,模型组 TC、TG、MDA 含量明显升高 ($P < 0.05$), SOD、CAT 活性显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组相比,锈毛草莓积雪草合剂可显著降低 STZ 小鼠血液中 TC、TG 含量 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 显著提高 SOD、CAT 活性 ($P < 0.01$), 明显降低 MDA 含量(表3), 表明锈毛草莓积雪草合剂能有效恢复糖尿病小鼠的血脂水平, 同时可明显提高糖尿病小鼠肝脏抗氧化能力。

3.5 锈毛草莓积雪草合剂急性毒性试验

以 $12\ 000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量一次灌胃后, 24 h 内无小鼠死亡。表明锈毛草莓积雪草合剂的小鼠一次经口最大耐受量 (LD_{50}) 大于 $12\ 000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 则其 LD_{50} 大于 $12\ 000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 属实际无毒级。

4 讨论

糖尿病是以高血糖为基本特征的一种多基因

表 3 锈毛草莓积雪草合剂对 STZ 小鼠血脂及肝脏抗氧化水平的影响

Table 3 Effects of FN-MC on serum lipids and liver antioxidation of STZ-induced mice

组别 Group	血脂 Blood fat		抗氧化水平 Antioxidant level		
	TC (mg · dL ⁻¹)	TG (mg · dL ⁻¹)	SOD (U · mg ⁻¹ protein)	MDA (nmol · mg ⁻¹ protein)	CAT (U · mg ⁻¹ protein)
正常组 Control group	149.6±20.5 *	127.4±27.4 **	2.11±0.11 **	2.38±0.99 *	12.36±1.38 *
模型组 Model group	194.2±32.5	251.3±70.8	1.51±0.31	4.88±1.74	9.69±1.35
二甲双胍 Metformin group	155.8±30.2 **	201.8±59.3 *	1.81±0.32 *	3.87±0.87 *	10.89±1.34
低剂量组 Low-dose group	151.2±20.2 **	177.8±45.1 *	1.99±0.24 *	3.43±0.99 *	11.43±2.45

综合性慢性病症,随着发病率快速增长,糖尿病及其并发症已成为严重威胁人类健康的一大问题,为除心血管疾病和癌症之外的第三大致死疾病(Szkudelski, 2001)。1型糖尿病由胰岛素分泌绝对不足引起,在包括胰岛素在内的各种降糖药物中,中药以其副作用小的特点而被广泛关注和研究,开发在降血糖的同时对糖尿病并发症也有一定控制效果的中药合剂具有重要的现实意义与广阔的市场前景。STZ 能够被胰岛 B 细胞上的低亲和葡萄糖转运蛋白(GLUT2)转运,特异性地引起胰岛 B 细胞结构破坏,从而造成胰岛素分泌障碍,是目前常用的糖尿病建模方法(Kai & Xue, 2011;张芳林等,2002)。血清中总胆固醇(TC)及甘油三酯(TG)是机体基本代谢物质。甘油三酯参与人体内能量代谢,胆固醇主要用于细胞浆膜、类固醇激素和胆汁酸等物质的合成。因此 TC、TG 常作为糖尿病脂代谢检测的重要指标;代谢紊乱所产生的过氧化物游离体可造成机体损伤,SOD、CAT 作为代谢中抗氧化重要酶,固其活性变化可用于衡量机体抗氧化水平(Liu et al, 2017);该研究通过 STZ 多次小剂量腹腔注射,诱导形成血糖值持续而稳定升高、血脂含量升高的糖尿病小鼠模型。

锈毛草莓为蔷薇科草莓属植物,可清热解毒、活血祛瘀,具有较好的药用价值。积雪草(*Centella asiatica*),别名铜钱草,属伞形科积雪草属。近年来研究发现,积雪草具有抗氧化功效,能够调节血

脂、保护肝脏(林丽敏等,2014;贺惠娟,2010)。该实验采用锈毛草莓和积雪草制备的中药合剂作为研究药物,探究其降血糖效应和具体作用机制。实验结果显示,低剂量锈毛草莓积雪草合剂对 STZ 小鼠具有明显的降糖作用,能够缓解糖尿病小鼠多饮、多食、多尿的症状。研究表明,糖尿病小鼠血清中总胆固醇(TC)及甘油三酯(TG)含量明显升高,机体的脂质代谢处于紊乱状态,该实验中,低剂量锈毛草莓积雪草合剂能有效提高 TC、TG 含量,调节机体脂代谢水平;有效恢复糖尿病小鼠受损的糖耐量,显著提高 SOD、CAT 活性,明显减少 MDA 累积,有效改善机体抗氧化水平。结果表明锈毛草莓积雪草合剂对 STZ 小鼠的血脂、糖代谢、抗氧化能力三方面均有调节作用。急性实验结果显示锈毛草莓积雪草合剂实属无毒,提示其作为降血糖中药合剂具有重要的前景。实验中,高剂量锈毛草莓积雪草合剂对糖尿病小鼠空腹血糖有显著的降低作用,但效果不如低剂量组明显,其原因可能是该剂量远大于其药物半数有效量,即低剂量组小鼠血药浓度已经接近峰值,提高剂量后,药效不会更加明显反而出现拮抗现象。所以,优化合剂使用剂量,探讨其作用的最佳浓度区间,是进一步开发研究的关键。

综上所述,锈毛草莓积雪草合剂具有明显的降血糖作用,对糖尿病并发症有一定的控制效果,这可能与改善了肝脏抗氧化水平有关,锈毛草莓积雪草作为降血糖中药合剂具有良好的应用前

景。其中各药物成分的比例及使用剂量的优化有待进一步研究。

参考文献:

- CHEN JS, ZHENG C, 2011. Application of Chinese herbal medicine intreatment of diabetes mellitus and its complications [J]. Trad Med Form, (23):276-278. [陈吉生, 郑聪, 2011. 中药治疗糖尿病及其并发症的应用分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, (23):276-278.]
- FU LG, 2004. Higher plants of China [M]. Qingdao: Qiangdao Publishing House, 6: 704. [傅立国, 2004. 中国高等植物 [M]. 山东: 青岛出版社, 6: 704.]
- HE HJ, 2010. Antioxidant and immuneregulatory effects of *Centella asiatica* extracts [J]. Chin J Pathophys, 26(4): 771-776. [贺惠娟, 2010. 积雪草提取物的抗氧化及免疫调节作用研究 [J]. 中国病理生理杂志, 26(4): 771-776.]
- KAI H, XUE GL, 2011. Evaluation of antidiabetic potential of selected traditional Chinese medicines in STZ-induced diabetic mice [J]. J Ethnopharmacol, 137(3):1135-1142.
- KONG LM, 2012. Clinical analysis of complication of senile diabetic; a report of 150 cases [J]. Chin J Gener Pract, (6): 847-849. [孔令敏, 2012. 150 例老年糖尿病并发症临床总结分析 [J]. 中华全科医学, (6): 847-849.]
- LIN LM, ZHAO Y, PENG L, et al, 2014. The hypolipidemic and liver protective effect of asiatic acid on hyperlipidemic golden hamsters [J]. Chin J Biochem Pharm, (4): 40-43. [林丽敏, 赵云, 彭璐, 等, 2014. 积雪草酸对高脂血症金黄地鼠的血脂调节及肝脏保护作用研究 [J]. 中国生化药物杂志, (4):40-43.]
- LIU M, SONG X, ZHANG J, et al, 2017. Protective effects on liver, kidney and pancreas of enzymaticand acidic-hydrolysis of polysaccharides by spent mushroom compost (*Hypsizigus marmoreus*) [J]. Sci Rep, 7:43212.
- LIU MS, 2015. Clinical analysis of Western medicine prescription on diabetes [J]. World Lat Med, (73):121 [刘明山, 2015. 糖尿病西药处方用药临床分析 [J]. 世界最新医学信息文摘, (73):121.]
- SZKUDELSKI T, 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in β cells of rat pancreas [J]. Physiol Res, 50(6): 537-546.
- WANG L, LI XF, FU DH, et al, 2011. Study on the Pharmacognosy of *Fragaria nilgerrensis* [J]. J Yunnan Univ Trad Chin Med, 34(5): 11-14. [王丽, 李学芳, 符德欢, 等, 2011. 白毛草莓的生药学研究 [J]. 云南中医学院学报, 34(5): 11-14]
- YANG W, LUO CY, YU CL, et al, 2006. Pathogenesis of mouse diabetes mellitus models induced by different doses of streptozotocin [J]. Jilin Univ (Med Ed), (3):432-435. [杨巍, 罗春元, 于春雷, 等, 2006. 不同剂量 STZ 诱导小鼠糖尿病模型的发病机制 [J]. 吉林大学学报(医学版), (3):432-435.]
- ZHANG FL, LI G, LIU YP, 2002. Rat model of type 2 diabetic mellitus and its glycometabolism characters [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 10(1): 16-19. [张芳林, 李果, 刘优萍, 2002. 2 型糖尿病大鼠模型的建立及其糖代谢特征分析 [J]. 中国实验动物学报, 10(1): 16-19.]