七种滇产植物改善胰岛素抵抗作用研究*

孙 玲[1],林 华[2],杨献文[3],牛艳芬[2],李顺林[3],李 玲[2]**
(昆明医学院[1]基础医学院微生物及免疫学教研室,昆明 650031,[2]药学院暨重点实验室,昆明 650031,
[3]中国科学院昆明植物研究所,昆明 650204)

摘 要 目的:研究乌墨、望江南等7种滇产植物对胰岛素抵抗3T3-L1脂肪细胞糖摄取的影响,以及乌墨根提取物对胰岛素抵抗小鼠的改善作用。方法:采用地塞米松诱导形成胰岛素抵抗3T3-L1脂肪细胞模型,观察乌墨、望江南等7种滇产植物对该细胞模型葡萄糖消耗的影响;采用高脂诱导形成胰岛素抵抗小鼠模型,观察乌墨根的乙醇提取物对其葡萄糖耐量和胰岛素耐量的影响。结果:乌墨根的乙醇提取物(10mg/L)和望江南叶的乙醇提取物(10mg/L)明显增加胰岛素抵抗细胞葡萄糖的消耗量,并有一定的浓度依赖性;乌墨根乙醇提取物可明显改善胰岛素抵抗小鼠的葡萄糖耐量和胰岛素耐量。结论:乌墨根的乙醇提取物和望江南叶的乙醇提取物能促进胰岛素抵抗3T3-L1脂肪细胞对葡萄糖的摄取,改善胰岛素抵抗状态;此外,乌墨根的乙醇提取物还能改善胰岛素抵抗小鼠的胰岛素抵抗状态。

关键词 乌墨;3T3-L1脂肪细胞;胰岛素抵抗;葡萄糖消耗;糖耐量;胰岛素耐量

糖尿病(Diabetes Mellitus,DM)是一种常见的慢性内分泌代谢性疾病,其中2型糖尿病占糖尿病患者总数的90%以上[1]。胰岛素抵抗(insulinresistance,IR)是2型糖尿病最显著的特点和重要的病理生理基础之一[2],由于胰岛素增敏剂能显著提高机体胰岛素敏感性,改善胰岛素抵抗状态(IR),因此寻找胰岛素增敏剂已经成为2型糖尿病治疗药物研究开发的一个热点。

中草药治疗糖尿病有着悠久的历史,入药的绝大多数都为植物[3],这些植物在治疗糖尿病时具有低毒、高效、价格低廉等特点,近年来也从中提取、分离出多种具有药理活性的化合物[4~6],从植物中寻找胰岛素增敏剂是一条治疗糖尿病的新途径。本实验采用地塞米松诱导形成的胰岛素抵抗3T3-L1脂肪细胞模型,从滇产植物中筛选胰岛素增敏剂,并在高脂诱导的胰岛素抵抗小鼠模型上做进一步的体内验证研究,以期为从天然植物中寻找具有胰岛素增敏活性的化学成分奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验药物 匙藤(Gymnema sylvestre)、望江南(Cassia racemosa)、乌墨(Syzygium cumini)、皱果五层龙(Salacia polysperm)、柳叶五层龙(Salacia cochichinensis)、橙果五层龙Salacia aurantica细獐牙菜(Swertia sp)采自云南省西双版纳州,经由中国科学院西双版纳热带植物园崔景云研究员鉴定后,由中国科学院昆明植物研究所制备并提供其乙醇提取物。

1.2 动物和细胞 ICR小鼠,雄性,体重18~22 g,由昆明医学院实验动物中心提供,实验动物生产许可证号:[SCXK(滇)2005-2008]。3T3-L1前脂肪细胞(3T3-L1 preadipocyte),购自中国科学院上海生命科学研究所细胞库。

1.3 试剂 地塞米松(Dex)、胰岛素(Ins)和3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMX)均购自Sigma公司;高糖DMEM培养基(H-DMEM)购自GIBCO公司;新生牛血清和胎牛血清(FBS)分别购自中美合资兰州民海生物工程有限公司和杭州四季青生物工程材料有限公司;葡萄糖氧化酶法测定试剂盒为上海荣盛生物技术有限公司产品。

1.4 仪器 酶标仪(美国Bio-Rad Model 680)

1.5 方法 参照文献方法[7,8]取细胞状态良好的3T3-L1前脂肪细胞以2×10^4 cell/ml密度接种于96孔培养板内含10%新生牛血清的H-DMEM培养基中,置于37℃、5% CO_2、95%空气、饱和湿度的CO_2培养箱内培养。待细胞生长融合4 d后,换用含Ins 5 ml/L、Dex 250 nmol/L、IBMX 0.5 mol/L和10% FBS的H-DMEM的成脂培养基开始诱导分化,每2d换液一次,直到细胞完成分化。

1.5.1 3T3-L1脂肪细胞胰岛素抵抗模型的建立及药物处理[7,8] 取分化成脂的细胞,在培养基中加入100 nmol/L Dex培养6d诱导胰岛素抵抗,每2天换一次液,以培养基中葡萄糖的消耗量反映胰岛素抵抗的程度。在胰岛素抵抗形成后,设正常对照组、胰岛素抵抗组、植物提取物组和阳性对照罗格列酮组,药物作用48h后,测定细胞培养基中的葡萄糖含量,观察各提取物对胰岛素抵抗脂肪细胞糖摄取的影响,并在葡萄糖测定之后用改良MTT法观察细胞活力情况。

1.5.2 乌墨提取物对正常小鼠血糖的影响 雄性ICR小鼠20只,体重18~22 g,随机分为正常对照组和乌墨乙醇提取物组,分别一次性灌胃给予0.5% CMC-Na和乌墨乙醇提取物2.0 g/kg,于给药后30min和60 min分别自小鼠尾静脉取血,用葡萄糖氧化酶法测血糖,观察乌墨提取物对正常小鼠血糖的影响。

1.5.3 乌墨提取物对高脂诱导胰岛素抵抗小鼠血糖的影响 雄性ICR小鼠30只,体重18~22 g,随机分为正常对照组、高脂模型组和乌墨提取物组,正常对照组饲喂基础饲料,高脂模型组和乌墨提取物组以高脂饲料(基础饲料+30%猪油)饲喂诱导胰岛素抵抗模型小鼠,高脂饲料饲喂2周后行口服糖耐量试验,异常者视为模型成功,分别给予0.5% CMC-Na和乌墨乙醇提取物2.0 g/kg,均按20 ml/kg灌胃给药,每天1次,连续7天。实验期间,每天记录小鼠的进食量和饮水量,并观察动物的一般情况;每周测量一次小鼠的体重;试验结束时分别做葡萄糖耐量试验和胰岛素耐量试验。即于给药第6天,各试验组小鼠于给药后1h腹腔注射葡萄糖2.5g/kg,分别取糖负荷后0、15、30、60、

* 国家自然科学基金资助项目(30760306),云南省应用基础研究计划重点项目(2006C009Z) ** 通讯作者

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

120 min 的尾静脉血测血糖水平,并计算血糖曲线下面积。于给药第 7 天,末次给药后 1h,各试验组小鼠皮下注射胰岛素 0.6 U/kg,分别取注射后 0、15、30、60、120 min 的尾静脉血测血糖水平,并计算血糖曲线下面积。

2 结果

2.1 7 种滇产植物对胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖消耗的影响 由表 1 可见,在地塞米松作用下,脂肪细胞对培养基中葡萄糖的消耗量减少 15.3%,与正常脂肪细胞相比,差异有统计学意义,提示成功诱导出胰岛素抵抗细胞;各植物提取物作用于胰岛素抵抗的脂肪细胞 48h 后,乌墨根和望江南叶的乙醇提取物明显增加胰岛素抵抗细胞葡萄糖的消耗量,并有一定的浓度依赖性,当终浓度为 100 mg/L 时,葡萄糖的消耗量分别较胰岛素抵抗组增加 11.52% 和 9.64%,与胰岛素抵抗细胞相比,差异有显著性,提示乌墨根和望江南叶的乙醇提取物可以促进胰岛素抵抗脂肪细胞对葡萄糖的摄取,改善胰岛素抵抗状态;其它植物提取物对胰岛素抵抗细胞的葡萄糖消耗量没有明显的促进作用。MTT 法检测表明各处理因素对细胞活力无影响。

2.2 乌墨对正常小鼠的血糖的影响 由表 2 可见,正常小鼠被给予乌墨根乙醇提取物灌胃后,血糖有一定的降低趋势,但与对照组相比,差异无统计学意义,提示乌墨根提取物对正常小鼠血糖无明显影响。

表 2 乌墨提取物对正常小鼠血糖的影响($\bar{x} \pm s$,n = 10)

组别	剂量(g/kg)	血糖(mmol/L)	
		30	60(min)
正常组	CMC-Na	6.80 ± 0.63	6.52 ± 0.88
乌墨提取物	2.0	5.94 ± 0.82	6.24 ± 0.90

2.3 乌墨对高脂诱导胰岛素抵抗小鼠的影响 由表 3 可见,灌胃给予胰岛素抵抗小鼠乌墨根的乙醇提取物 2.0 g/kg 一周后,动物的进食量和饮水量明显下降,与模型对照组相比,差异有显著性意义,体重也有降低趋势,但尚未达到统计学显著意义。

表 1 7 种滇产植物对胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞糖消耗的影响($\bar{x} \pm s$,n = 6)

组别	学名	部位	浓度(mg/L)	葡萄糖消耗量(mmol/L)	增加率(%)
对照			DMSO	15.78 ± 1.03	
模型			DMSO	13.36 ± 0.84	-15.30
罗格列酮			10μM	14.86 ± 1.13*	11.25
望江南	Cassia racemosa	叶	1	13.7 ± 0.47	2.53
			10	14.75 ± 0.92*	10.45
			100	14.90 ± 1.05*	11.52
	Cassia racemosa	茎	1	13.09 ± 1.33	-2.02
			10	14.13 ± 2.06	5.76
			100	14.09 ± 1.12	5.44
	Cassia racemosa	根	1	13.34 ± 0.92	-0.14
			10	14.06 ± 1.05	5.26
			100	14.06 ± 1.16	5.25
乌墨	Syzygium cumini	根	1	14.08 ± 0.38	5.38
			10	14.62 ± 0.58*	9.45
			100	14.65 ± 0.81*	9.64
	Syzygium cumini	叶	1	14.01 ± 1.27	4.90
			10	13.61 ± 1.35	1.90
			100	14.60 ± 1.33	9.25
	Syzygium cumini	茎	1	13.84 ± 1.23	3.60
			10	13.85 ± 1.14	3.67
			100	14.22 ± 0.98	6.45
皱果五层龙	Salacia polysperm	叶	1	12.69 ± 1.32	-5.04
			10	14.08 ± 1.75	5.41
			100	14.42 ± 1.01	7.95
	Salacia polysperm	茎	1	12.86 ± 1.00	-11.24
			10	13.56 ± 1.42	1.48
			100	14.06 ± 1.43	5.22
柳叶五层龙	Salacia cochichinensis	全草	1	14.45 ± 1.48	8.17
			10	14.43 ± 0.85	8.01
			100	14.25 ± 1.38	6.69
橙果五层龙	Salacia aurantica	全草	1	13.51 ± 1.25	1.13
			10	14.96 ± 1.51*	12.01
			100	14.32 ± 1.20	7.22
细獐牙菜	Swertia sp	全草	1	13.76 ± 1.22	2.99
			10	14.22 ± 1.05	6.46
			100	14.17 ± 1.19	6.08
匙藤	Gymnema sylvestre	全草	1	12.47 ± 1.08	-6.67
			10	13.90 ± 1.20	4.08
			100	13.96 ± 1.04	4.48

与对照组比较 * $P<0.05$,** $P<0.01$(下同)

表 3 乌墨提取物对高脂诱导胰岛素抵抗小鼠进食量、饮水量和体重的影响($\bar{x} \pm s$,n = 10)

组别	剂量(g/kg)	进食量(g/kg.d)		饮水量(ml/kg.d)		体重(g)	
		给药前	给药后	给药前	给药后	给药前	给药后
正常	CMC-Na	520.8 ± 113.9	553.0 ± 208.8	239.2 ± 30.4	247.8 ± 22.3	33.9 ± 3.6	34.9 ± 3.8
模型	CMC-Na	660.2 ± 138.1	687.2 ± 62.8	243.1 ± 23.7	209.5 ± 15.3	36.1 ± 3.3	36.9 ± 4.2
乌墨提取物	2.0	565.4 ± 141.5	505.4 ± 139.5*	240.0 ± 10.5	167.5 ± 16.8*	36.1 ± 2.2	35.0 ± 3.5

图 1 结果表明给予葡萄糖负荷后,胰岛素抵抗模型组小鼠的糖耐量曲线异常升高,于给葡萄糖后 15 分钟达峰值,而乌墨提取物则明显压低糖耐量曲线,各时间点与模型组比较,差异有统计学意义,曲线下面积也明显小于模型组;胰岛素耐量试验结果表明皮下注射胰岛素后,动物血糖明显降低,胰岛素抵抗组小鼠血糖的降低程度明显小于正常对照组,给予抵抗小鼠乌墨提取物后,胰岛素耐量曲线明显改善,曲线下面积显著小于模型组,提示乌墨提取物能改善小鼠的胰岛素抵抗状态。

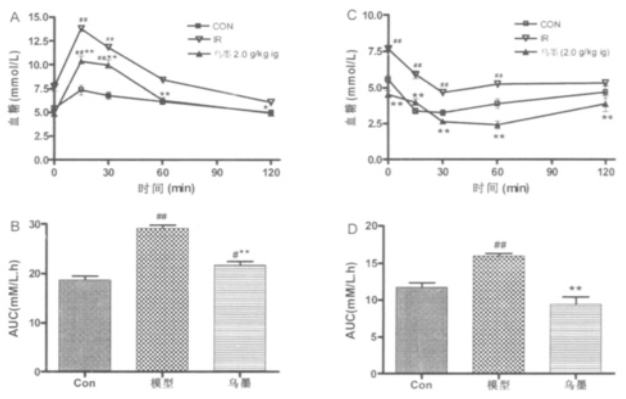

图 1 乌墨灌胃给药对高脂诱导胰岛素抵抗小鼠糖耐量(A、B 图,葡萄糖 2.0 g/kg ip)和胰岛素耐量(C、D 图,胰岛素 0.5 u/kg sc)的影响

3 讨论

胰岛素是体内唯一的降糖激素,在维持正常血糖中起着重要的作用,参与调节机体糖、脂肪和蛋白质代谢的作用。当外周

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

组织尤其是肌肉、脂肪组织、肝脏对内源性或外源性胰岛素的敏感性和反应性降低,导致生理剂量的胰岛素产生低于正常的生理效应时,即产生胰岛素抵抗或胰岛素敏感性降低。胰岛素增敏剂可降低机体胰岛素拮抗性,是促进胰岛素发挥正常作用的重要递质。

近年来,国内外学者对乌墨种子、果实和树皮的水或乙醇提取物的抗糖尿病作用进行了研究,发现具有降低正常和化学性糖尿病动物血糖水平的作用[9~13],本研究采用的乌墨及其他6种试验药物都生长在云南低海拔热带地区,均为具有降糖作用的民族药物,在民间用于防治2型糖尿病。

本实验首先通过地塞米松诱导3T3-L1脂肪细胞产生胰岛素抵抗,经地塞米松处理后的3T3-L1脂肪细胞对胞外葡萄糖的摄取明显减少,对胰岛素的敏感性降低,符合胰岛素抵抗的明显特征[7,8],说明3T3-L1脂肪细胞胰岛素抵抗模型造模成功。之后再以7种滇产植物提取物与3T3-L1脂肪细胞胰岛素抵抗模型作用,观察各提取物对其糖摄取的影响,从中筛选胰岛素增敏剂。试验结果表明,乌墨根和望江南叶的乙醇提取物显著增加地塞米松诱导胰岛素抵抗3T3-L1脂肪细胞的葡萄糖消耗量,而望江南和乌墨其它部位的提取物、以及其它植物提取物则没有明显的改善作用,提示乌墨根和望江南叶能促进胰岛素抵抗的脂肪细胞的葡萄糖摄取,改善胰岛素抵抗状态。体内研究结果表明,灌胃给予高脂饲料诱导的胰岛素抵抗小鼠乌墨根的提取物后,胰岛素抵抗小鼠的葡萄糖耐量和胰岛素耐量均明显改善,与体外研究结果一致,提示乌墨根中存在着改善胰岛素抵抗状态的化学物质,值得进一步深入研究以获得植物来源的胰岛素增敏剂,开创中药治疗糖尿病的新途径。

参考文献

1 Krentz AJ,Bailey CJ. Oral antidiabetic agents: current role in type 2 diabetes mellitus. Drugs, 2005;65(3): 385~411

2 Hayden MR,Sowers JR. Redox imbalance in diabetes. Antioxid redox signal,2007;9(7): 865~867

3 Li WL, Zheng HC, Bukuru J, et al. Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. J Ethnopharmacol, 2004;92: 1~21

4 Tan MJ, Ye JM, Turner N, et al. Antidiabetic avtivities of triterpenoids isolation from bitter melon associated with activation of the AMPK pathway. Chem Biol,2008;15: 263~273

5 任晋玮,万祺,栾新慧,等. 天然化合物治疗糖尿病的研究进展. 军事医学科学院院刊,2006;30: 375~378

6 Nakashima N, Kimura I, Kimura M, et al. Isolation of pseudoprototimosaponin AIII from rhizomes of Anemarrhena asphodeloides and its hypoglycemic activity in streptozotocin-induced diabetic mice. J Nat Prod, 1993;56: 345~350

7 Anil Kumar KL, Marita AR. Troglitazone prevents and reverses dexamethasone induced insulin resistance on glycogen synthesis in 3T3 adipocyte. Br J Parm acol, 2000; 130(2): 351~358

8 左益槃,牛艳芬,林华,等. 双(α-呋喃甲酸)氧钒对胰岛素抵抗3T3-L1脂肪细胞糖摄取的影响. 中国药理学通报,2008;24(7): 902~905

9 Mahapatra PK, Pal M, Chaudhari AKN, et al. Preliminary studies on glycemic effect of Syzyginium Cumini seeks. IRCS medical Science Biochemistry, 1985;13: 129~133

10 Teixeira CC, Pinto LP, Kessler FHP, et al. The effect of Syzyginium Cumini(L) Skeels on postprandial blood glucose level in non diabetic rats and rats with streptozotocin induced diabetes mellitus. J Ethanopharmacol, 1997; 56: 209~213

11 Prince PS, Menon VP, Pari L. Hypoglycemic activity of Syzyginium Cumini seeds: effect on lipid peroxidation in alloxon diabetic rats. J Ethanopharmacol,1998;61: 1~7

12 Sharma SB, Nasir A, Prabhu KM, et al. Hypoglycemic and hypolipidemic effect of ethanolic extract of seeds of Eugenia jambolana in alloxon-induced diabetic rabbits. J Ethanopharmacol,2003; 85: 201~206

13 Prince PS, Kamalakkannan N, Menon VP. Antidiabetic and antihyperlipidaemic effect of alcoholic Syzyginium cumini seeds in alloxon-induced diabetic albino rats. J Ethanopharmacol, 2004; 91: 209~213

云木香对豚鼠离体肠平滑肌的影响*

张 猛[1,2], 郭建生[1,2,3]**,聂子文[1,2],刘红艳[1,2],陈 君[1,2]

([1]湖南中医药大学;[2]湖南省教育厅中药学现代化研究重点实验室;
[3]国家中药管理局药性与药效研究三级实验室,长沙 410208)

摘 要 目的:观察云木香水煎液、水提液、醇提液、挥发油对豚鼠离体肠平滑肌的作用,并探讨云木香对豚鼠离体肠平滑肌作用的物质基础。方法:以给药前后3分钟豚鼠离体肠平滑肌平均振幅为观测指标,采用BL-420F生物机能实验系统,观察并比较云木香四种提取液对豚鼠离体肠平滑肌的作用情况。结果:云木香水煎液、醇提液、挥发油能显著降低豚鼠正常离体肠平滑肌的平均振幅($P<0.01$),小剂量水提液能升高豚鼠正常离体肠平滑肌的平均振幅($P<0.05$);四种提取液均能降低乙酰胆碱所致痉挛状态下的豚鼠离体肠平滑肌的平均振幅。结论:小剂量云木香水提液能兴奋豚鼠正常离体肠平滑肌,水煎液、醇提液、挥发油能够抑制豚鼠离体肠平滑肌的自主活动;四种云木香提取液均能拮抗乙酰胆碱所致痉挛状态下的豚鼠离体肠平滑肌。

关键词 云木香;水煎液;水提液;醇提液;挥发油;豚鼠;离体肠

* 基金项目:国家科技部973资助项目:中药药性理论相关基础问题研究(2007CB512603);湖南省科技计划项目;湖南省中药重点学科

** 通讯作者

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net