

槐米中槲皮素的提取及在糖尿病中的功效初步研究

肖上英¹ 饶磊² 庄满娇^{1*}

1 东莞市广东医科大学临床药理学系 广东东莞 523808 2 韶关市韶关学院医学院 广东韶关 512000

【摘要】目的 从槐米中提取槲皮素,并研究其治疗二型糖尿病的生物活性和机制。**方法** 利用碱性加热,从槐米中提取芦丁,再通过酸提法,让芦丁在硫酸作用下加热,分解为槲皮素;通过 Elisa 等方法检测槲皮素对胰岛素的促分泌作用。**结果** 成功制备纯度大于 99% 的槲皮素,其提取率为 86%;细胞学和动物学实验显示槲皮素可显著刺激胰岛细胞的分泌活性。**结论** 成功制备高纯度槲皮素,并初步证实其具有显著促胰岛素分泌活性。

【关键词】 槲皮素;二型糖尿病;胰岛素分泌

【中图分类号】 R587.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1007-3809 (2023) 04-070-03

糖尿病是一种严重危害人类健康的常见慢性病,导致的死亡人数仅次于心脑血管疾病和肿瘤而居第三位。目前全球有 4.63 亿成年人患有糖尿病,据估计到 2030 年全球糖尿病患者人数将增至 5.78 亿,到 2045 年将增至 7 亿^[1]。二型糖尿病(type 2 diabetes, T2DM)是最常见的糖尿病,约占糖尿病病例的 90%。中国由于人口基础大,T2DM 患者的人数是占世界之首。因此开发治疗 T2DM 的药物对于我国医药事业的发展具有重要意义。

胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞损伤是 T2DM 的主要病症,可导致高血糖,继而引起多种并发症,如眼、肾、心脏和神经等的功能障碍^[2]。另外,高血糖引起的高氧化应激水平又会加剧胰岛 β 细胞的损伤,使 T2DM 恶化。抑制 β 细胞凋亡、促胰岛素分泌可有效恢复机体的血糖调节能力,因此被认为是治疗 T2DM 的主要策略。目前临床治疗 T2DM 的促胰岛素分泌药主要包括磺酰脲类和格列奈类等药物,然而这些治疗手段功效有限,它们缺少抗胰岛 β 细胞凋亡的能力,有的甚至加剧胰岛 β 细胞凋亡,且具有显著的副作用,如能引发肝肾功能损害、心血管疾病和胃肠道损伤等^[3]。

传统中药对糖尿病的治疗已有两千多年的历史,西药突出的副作用,使中药成为人们治疗 T2DM 的新期待,它代表着广阔而尚未开发的现代医学资源^[4]。研究发现中药槲皮素能通过多种机制发挥抗胰岛 β 细胞凋亡、促胰岛素分泌的作用^[5]。许多中药材具有改善糖尿病症状,但尚不清楚其具体作用方式,通过热提与酸解^[6],从中药材槐米中提取槲皮素研究其功能,不仅可以完善中药材加工工艺,还可从功能角度研究相关药材作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

槐米购自元岭村菜市场;石灰乳购自康大建材市场;硼砂购自福晨化学公司;乙醇购自阿拉丁公司;浓盐酸、硫酸购自致凡公司;氯仿购自 merck 公司;甲醇购自 merck 公司;甲酸购自 sigma 公司;三氯化铝购自米川化工。

1.2 主要仪器设备

二氧化碳培养箱(美国默克公司);生化酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);倒置相差显微镜(日本奥林巴斯公司);抽滤器(中国一凯公司);旋转蒸发仪(中国科兴公司);真空泵(中国飞跃公司)。

1.3 方法

(1) 槲皮素提纯

按以下比例提取,取槐米粗粉 150 g,加 800 mL 水和 5 g 硼砂,沸腾 30 min,趁热过滤;将滤渣再次用 500 mL 的水重复以上步骤,滤液合并;用浓酸调节 pH 至 4-5,抽滤;沉淀水洗致中性,抽滤;10 倍体积 2% 硫酸溶液,加热回流一个半小时,冷却过滤;水洗致中性,抽干;95% 乙醇回流半小时,过滤,滤液用蒸馏水稀释,静置过夜,得精制槲皮素。

(2) MIN-6 胰岛细胞培养

复苏:将含有 1 mL 细胞悬液的冻存管在 37℃ 水浴中迅速摇晃解冻,加入 5 mL DMEM 培养基混合均匀。在 1000 rpm/min 条件下离心 5 min,弃去上清液,补加 4-6 mL 培养基后吹匀。然后将所有细胞悬液加入培养瓶中培养过夜。第二天,换液并检查细胞密度。弃去培养上清,用 PBS 润洗细胞 1-2 次。加 1-2 mL 消化液(0.25% Trypsin-0.53 mM EDTA)于培养瓶中,置于 37℃ 培养箱中消化 1-2 min,然后在显微镜下观察细胞消化情况,若细胞大部分变圆并脱落,迅速拿回操作台,加入 5 mL 以上含 10% 血清的 DMEM 培养基终止消化。轻轻吹打细胞,细胞脱落后吸出,在 1000 rpm/min 条件下离心 8-10 min,弃去上清液,补加 1-2 mL 培养液后吹匀。按 5-6 mL/瓶补加培养液,将细胞悬液按 1:2 到 1:5 的比例分到新的含 5-6 mL 培养液的新皿中或者瓶中。如果细胞密度达 80%-90%,即可进行传代培养。

(3) 胰岛细胞促分泌活性检测

将培养细胞传代 2 天,长到 70% 融合阶段,换成无血清培养基,饥饿细胞过夜。细胞分为空白对照、模型组、阳性药组和治疗组。将细胞用 PBS 清洗两遍,换成 Hanks 溶液,在溶液中加入槲皮素,1 h 后取培养基测根据胰岛素检测试剂盒说明书进行胰岛素含量检测。

(4) 口服葡萄糖耐量实验

糖尿病小鼠禁食过夜后,灌胃生理盐水,5 mg/kg 的格列美脲或槐米槲皮素,随后灌胃葡萄糖溶液(剂量为 2 g/kg),测定 15, 30, 60, 90 和 120 min 的血糖值及胰岛素水平。

(5) 统计学分析

应用 SPSS17 软件进行统计分析,单组数据间使用 t 检验,多组数据间使用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 槲皮素的鉴定

槲皮素的提取率达 86%,制备纯度大于 99%。提取获得的槲皮素为黄绿色结晶,紫外光照射显蓝色荧光,加三氯化铝乙醇溶液,会发出黄绿色荧光,加盐酸镁粉发出红色。

2.2 双氧水诱导胰岛细胞糖尿病模型

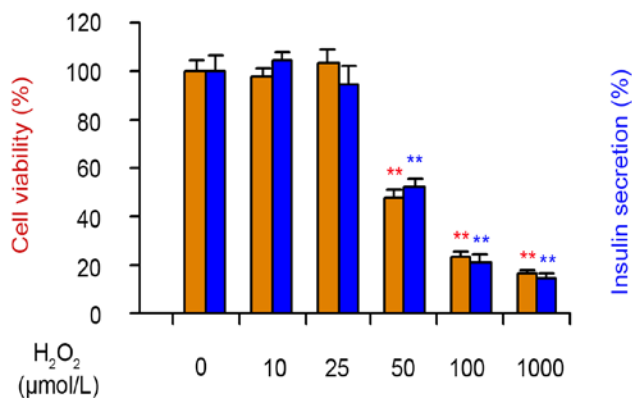


图 1: T2DM 模型建立

T2DM 患者胰岛素分泌能力减退, 引起这一现象的原因有

两方面, 一方面, 胰岛 β 细胞胰岛素分泌活性减弱, 另一方面, 胰岛 β 细胞绝对数量减少。双氧水具有快速成模, 可检测促分泌活性与抗凋亡活性两方面的特点, 常用于二型糖尿病 (T2DM) 的细胞模型建立^[7]。如图 1 所示, 采用梯度浓度的双氧水刺激胰岛 β 细胞, 检测细胞的促分泌活性以及细胞活性, 从结果看, 50 $\mu\text{mol/L}$ 双氧水, 可将胰岛 β 细胞促分泌活性与细胞活性降低 50% 左右, 比较适合作为造模浓度而选用。

2.3 槲皮素对 T2DM 模型细胞的促分泌活性与抗凋亡活性

正常情况下, 机体能通过响应血糖水平促进胰岛素分泌, 发挥调控血糖能力。因此, 在胰岛素分泌实验中, 采用 0 mmol/L 的低糖溶液, 以及 8.3 mmol/L 高糖的 DMEM 培养基, 检测槲皮素促 T2DM 模型细胞胰岛素分泌的能力^[8]。如图 2 所示, 从槐米中提取的槲皮素在 8.3 mmol/L 高糖条件下表现出显著的促胰岛素分泌活性, 并具有显著抗胰岛 β 细胞凋亡活性。

2.4 槲皮素对小鼠胰岛素分泌的影响以及 OGTT 实验

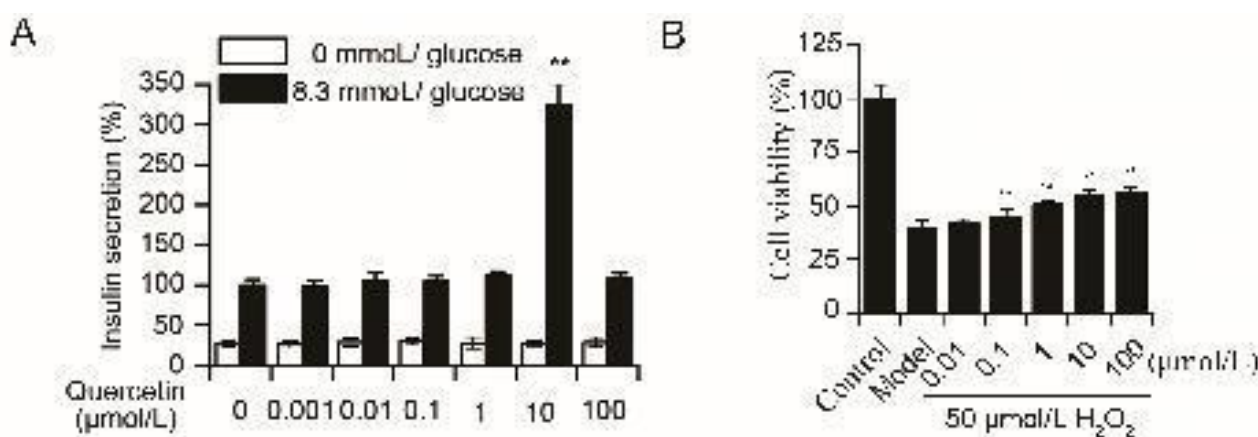


图 2: 槲皮素的促分泌 (A) 与抗凋亡活性 (B)

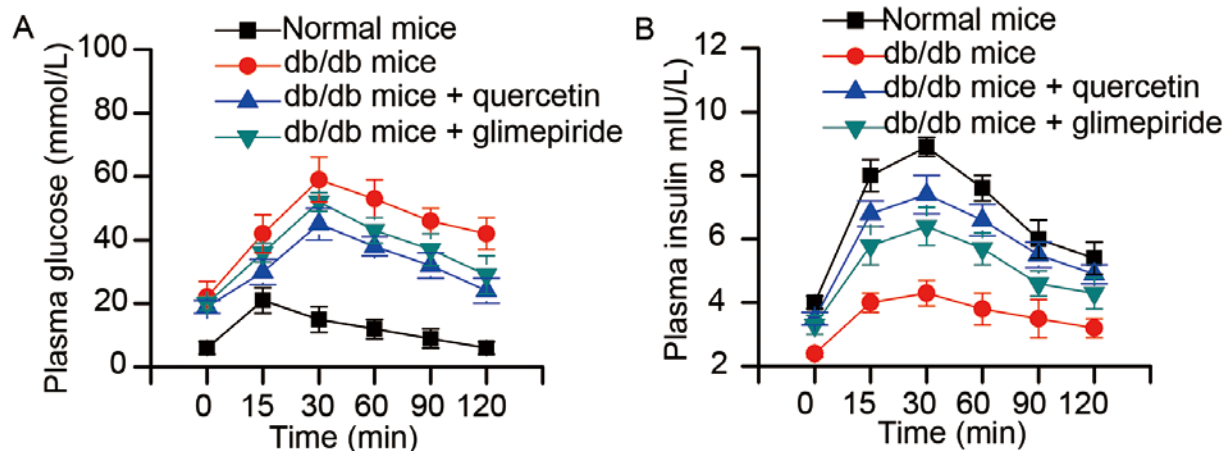


图 3: 槐米槲皮素的糖耐量 OGTT 实验

口服糖耐量实验是检测实验动物血糖调控能力的常用方法。如图 3 所示, 槲皮素具有显著的促胰岛素分泌和降血糖作用。槲皮素的促胰岛素分泌活性显著高于格列美脲组, 血糖控制同样好于格列美脲组, 说明槲皮素在槐米中发挥显著的促胰岛素分泌作用。

3 讨论

糖尿病是常见的血糖血脂引起的慢性病, T2DM 是其主要类型, 在二型糖尿病中后期胰岛素分泌逐渐减弱。传统的控制饮食、加强锻炼, 改善胰岛素分泌效果不佳, 急需药物介入, 调控胰岛素分泌, 降低血糖。

传统中医药在消渴症 (糖尿病) 治疗方面具有独特优势, 比如可通过食疗等方式发挥治疗作用。本研究明确了在槐米中槲皮素具有通过促进胰岛素分泌而发挥降血糖的功效, 本课题主要集中在单体成分的药学活性方面, 如何通过饮食加工, 有效利用槐米中槲皮素发挥降血糖功效尚需进一步研究验证。

参考文献:

[1] Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: results from

(下转第 74 页)

流灌注显像方法对于短暂性脑缺血发作和腔隙性脑梗死方面阳性率显著高于MRI, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。详见表1。

3 结果

MRI 检测对极小病灶^[3]以及急性、超急性脑梗死^[4]有较好的检出率。近几年, 不断有国内外研究指出^[5, 6], 脑血流灌注显像能够检出部分短暂性脑缺血发作患者在发作期间的脑血流量低灌注状态, 从而对患者的复发以及形成脑梗死的几率进行较准确的推断。朱传明^[7]的研究指出, 脑血流灌注显像对于腔隙性脑梗死以及短暂性脑缺血发作的患者诊断优于MRI, 更多病灶能够被检出。

本研究显示, 脑血流灌注显像、MRI 和CT的缺血灶检出率分别为89.5% (188/210)、85.7% (180/210)、65.7% (138/210), CT的缺血灶检出率显著低于脑血流灌注显像和MRI ($P < 0.05$); 脑血流灌注显像方法对于多脑梗死和大面积脑梗死方面的阳性率与MRI 差异轻微, 不具有统计学意义($P > 0.05$); 脑血流灌注显像方法对于短暂性脑缺血发作和腔隙性脑梗死方面阳性率显著高于MRI, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。与朱传明的研究结果一致。

综上所述, 脑血流灌注显像对短暂性脑缺血发作患者的缺血灶更加敏感, 检出效果良好, 但其在大面积梗死灶检出率与MRI 相似, 临床上应根据患者的实际情况选择合适的检查方法, 精简诊断时间, 提升诊断效率和临床价值。

(上接第71页)

the international diabetes federation diabetes atlas, 9th edition. Diabetes research and clinical practice 2019, 157-162.

[2]Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. Nature Reviews Endocrinology 2018, 14(2): 88-98.

[3]Gloyn AL, Drucker DJ. Precision medicine in the management of type 2 diabetes. The Lancet Diabetes & Endocrinology 2018, 6(11): 891-900.

[4]Tian JX, Jin D, Bao Q, Ding QY, Zhang HY, Gao ZZ, Song JX, Lian FM, Tong XL.Evidence and potential mechanisms of traditional Chinese medicine for the treatment of type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. Diabetes Obesity & Metabolism 2019.21(8):1801-1816.

[5]Ghorbani A, Rashidi R, Shafiee-Nick R. Flavonoids for

参考文献:

[1] 谭玉珍, 陈远英, 朱翠荣. 应用颈动脉彩色多普勒超声结合理化指标在缺血性脑卒中疾病诊断的价值分析[J]. 中国实用医药, 2021, 10(12): 47-48.

[2] 廖玉锋, 李英斌, 周梅君. 颈动脉彩色多普勒超声检测对缺血性脑血管疾病的诊断分析[J]. 实用医技杂志, 2020, 22(10): 1047-1048.

[3] 卢燕. 检查颈动脉IMT及斑块应用彩色多普勒超声及与缺血性脑卒中的相关性分析[J]. 中国CT和MRI杂志, 2022, 13(05): 23-24, 44.

[4] 苏峻峰, 胡小辉, 夏烈新. 踝臂指数与CT灌注成像在脑缺血早期的诊断价值[J]. 中国医学物理学杂志, 2022, 145(02): 294-297.

[5] 张军, 潘嘉伟, 于向荣. 等. 4D-CT血管造影在急性缺血性脑卒中中的应用价值[J]. 中国医学计算机成像杂志, 2022, 21(03): 260-263.

[6] 韩新生, 钱伟军, 徐建可, 等. 64层螺旋CT检测颈动脉斑块和狭窄与前循环缺血性脑卒中的关系[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2021, 16(4):398-400.

[7] 朱传明, 李慧英, 杨淑贞, 等. CT、MRI及脑血流灌注显像诊断缺血性脑卒中的价值[J]. 现代中西医结合杂志, 2021, 23(25): 2740-2741, 2744.

preserving pancreatic beta cell survival and function: A mechanistic review. Biomedicine & Pharmacotherapy 2019, 111: 947-957.

[6] 侯一楠, 梁群, 杨俊, 潘郭海容, 王广军, 杨露. 中药注射剂和中药提取物治疗脓毒症急性肺损伤的研究进展. 中国医院用药评价与分析. 2023, 23, 120-122.

[7] 陈欢, 张铭珈, 倪慧, 朱艳芳, 敖海清. 应激损伤糖尿病细胞模型的建立及不同浓度逍遥散含药血清对其生存率的影响. 时珍国医国药. 2019, 30, 4.

[8] 曹成玲, 张蓓蓓, 于身存, 司尚安, 张桂菊. 栀子活性成分改善肥胖相关胰岛素抵抗的作用机制研究进展. 中医药导报. 2023, 29, 124-129.

[9] 李晶, 魏健. 刺五加, 枸杞子配伍对糖尿病模型小鼠降血糖作用的研. 食品研究与开发. 2017, 38(9):4.

[10] 以萱. 中医药整体治疗糖尿病有优势[J]. 中华养生保健, 2011(8):2

(上接第72页)

其越来越多地被应用于急性肾损伤的检查当中。在老年脓毒症患者急性肾损伤的早期诊断中, 采用超声诊断技术来观测患者的肾脏血流动力学指标, 可以及时发现其肾脏受损情况, 同时还有助于了解其生理结构变化, 从而做出更准确的诊断。在超声检查中, 肾叶间动脉阻力指数可以呈现出肾脏的血流灌注情况, 从而反映出肾内血管弹性的改变及其小血管内的血流量变化, 继而反映出肾小动脉血流的变化。本组研究结果显示: 急性肾损伤组患者第一天和第七天的肾叶间动脉阻力指数均显著高于非急性肾损伤组患者, 数据差异具有统计学意义($P < 0.05$); 急性肾损伤组患者第七天的血肌酐水平显著高于非急性肾损伤组患者, 且较第一天有显著上升, 数据差异具有统计学意义($P < 0.05$)。可以得出结论: 采

用超声早期诊断老年脓毒症患者急性肾损伤准确性较高, 值得在临床上推广应用。但本研究样本量小, 尚有待进一步的大规模多中心研究来证实。

参考文献:

[1] 陈九军. 老年脓毒症患者急性肾损伤的超声早期诊断评价[J]. 中华医院感染学杂志, 2021, 13:3253-3254+3257.

[2] 葛肖艳, 曾艾, 张伟, 成静, 芦桂林. 重症全身性感染患者急性肾损害超声早期诊断的临床评价[J]. 中华医院感染学杂志, 2020, 08:1712-1714.

[3] 陈君耀, 谢志刚, 易惠明. 重症全身性感染患者急性肾损害超声早期诊断的意义[J]. 中华医院感染学杂志, 2021, 24:6134-6135+6138.