

瑶药多穗柯提取物对糖尿病大鼠基质金属蛋白酶 8、9 的影响作用研究

邓聿胤¹, 王丽¹, 吕纪华¹, 刘瑛¹, 覃良¹, 叶银斯², 洪芷琴³

(1. 广西壮族自治区中医药研究院/广西中药质量标准研究重点实验室, 广西壮族自治区 南宁 530022; 2. 柳州市红十字会医院, 广西壮族自治区 柳州 545000; 3. 桂林医学院, 广西壮族自治区 桂林 541004)

摘要: 目的 探讨瑶药多穗柯的降糖作用及作用机制。方法 采用高脂饲料+链脲菌素(STZ)制备大鼠糖尿病模型,通过瑶药多穗柯提取物灌胃进行药物干预,检测大鼠体重、血糖、血清胰岛素(INS)、血清糖化血红蛋白(GHbA1c)、血清基质金属蛋白酶 8(MMP-8)及基质金属蛋白酶 9(MMP-9)水平和胰腺病理等指标,从而观察多穗柯降糖作用。结果 与模型组比较,多穗柯提取物 7 g 生药/kg 剂量组大鼠体重增加,血糖降低,血清糖化血红蛋白及基质金属蛋白酶 9 水平降低,血清胰岛素水平升高,胰腺病理病变明显改善。结论 瑶药多穗柯 7 g 生药/kg 剂量具有显著降糖作用,其机制可能与改善胰岛功能,促进胰岛素分泌,调控糖化血红蛋白与基质金属蛋白酶 9 水平相关。

关键词: 糖尿病大鼠; 多穗柯; 胰岛素; 糖化血红蛋白; 基质金属蛋白酶

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 2095-5375(2021)09-0567-005

doi: 10.13506/j.cnki.jpr.2021.09.002

Effects of *Lithocarpus polystachyus* on expression of matrix metalloproteinases 8 and 9 in diabetic rats

DENG Yuyin¹, WANG Li¹, LYU Jihua¹, LIU Ying¹, QIN Liang¹, YE Yinsi², HONG Zhiqin³

(1. Guangxi Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality Standards, Guangxi Institute of Traditional Medical and Pharmaceutical Sciences, Nanning 530022, China; 2. Liuzhou Red Cross Hospital, Liuzhou 545000, China; 3. Guilin Medical University, Guilin 541004, China)

Abstract: Objective To study the hypoglycemic effect of *Lithocarpus polystachyus* and its mechanism. **Methods** Diabetic rat model induced by high-fat diet feeding and Streptozotocin Injection, Through giving the *Lithocarpus polystachyus* extract to observe the effect of polycotyledon extract on body weight, blood glucose, serum insulin, serum glycated hemoglobin, serum matrix metalloproteinase 8, serum matrix metalloproteinase 9 and pathological changes of pancreas in rats. **Results** Compared with the model group, *Lithocarpus polystachyus* extract which dosage was 7 g crude drug/kg could increase the weight of diabetic rats, decrease the levels of fasting blood glucose, serum GHbA1c and serum MMP-9, increase the levels of serum INS, and improve the changes of pancreatic tissue. **Conclusion** *Lithocarpus polystachyus* has significant hypoglycemic effect, which may be related to the improvement of islet function, insulin secretion, regulation of glycated hemoglobin and MMP-9 level.

Key words: Diabetic rats; *Lithocarpus polystachyus*; Insulin; Glycated hemoglobin; Matrix metalloproteinase

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是由遗传、环境等因素联合引起的以糖代谢紊乱为重要表现的一种代谢综合征,其主要表现为多饮、多食、多尿、体重减少及疲乏无力等,严重者甚至出现糖尿病酮症酸中毒,影响患者生命健康。据统计,目前全球约有 3.47

亿糖尿病患者,到 2030 年可能增加到 4.39 亿,我国 2 型糖尿病患病率上升至 11.2%^[1-3],持续增长趋势使糖尿病成为全球重大公共卫生问题之一,寻找安全有效的降糖药物是目前亟待解决的关键问题。多穗柯为壳斗科植物木姜叶柯 [*Lithocarpus litseifolius*

基金项目: 广西重点研发计划项目(No. 桂科 AB17195013)

作者简介: 邓聿胤,男,助理研究员,研究方向: 中药民族药药理学研究, E-mail: 2973234258@qq.com

通信作者: 王丽,女,副主任药师,研究方向: 中药民族药的研究与开发, Tel: 0771-5868874, E-mail: 187168979@qq.com

(Hance) Chun.] 的干燥叶^[4], 主要分布于广西百色、凌云、河池等地, 是广西传统壮瑶药。民间用于治疗糖尿病、肺热咳嗽、咽炎、心脑血管等疾病, 具有清热利尿、滋润肝肾之功效。本文以降血糖功效为切入点, 观察多穗柯水提物对糖尿病大鼠胰岛素(INS)、糖化血红蛋白(GHbA1c)、基质金属蛋白酶-8(MMP-8)及基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的影响作用, 为多穗柯降糖药物的研制提供实验依据。

1 实验材料

1.1 实验动物 健康成年 SD 大鼠, 雌雄各半, SPF 级, 体重(200±20) g, 均购自广西医科大学实验动物中心提供, 许可证号: SCXK 桂 2014-0002。实验动物适应性饲养 1 周后用于实验, 饲养环境: 温度 20~25 °C, 相对湿度 60%±10%, 自由饮食, 实验动物使用许可证号: SYXK 桂 2016-0006。

1.2 药物 多穗柯叶, 采自广西巴马市, 经广西壮族自治区中医药研究院制剂中心饶伟源主任药师鉴定为壳斗科植物木姜叶柯 [*Lithocarpus litseifolius* (Hance) Chun.] 后使用。四氧嘧啶(Sigma 公司, 批号: BCB9198V); 链脲佐菌素(STZ, Sigma 公司, 批号: WXBC8740V); 盐酸二甲双胍片(北京京丰制药集团, 批号: 180617)。

1.3 主要试剂 枸橼酸盐缓冲液(博士德生物工程有限公司, 批号: 12D10B24); 大鼠胰岛素(INS)、糖化血红蛋白(GHbA1c)、基质金属蛋白酶-8(MMP-8)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9) ELISA 检测试剂盒均购自天津安诺瑞康生物技术有限公司, 批号分别为 358190226、603190226、420180424、425180424; 美迪信血糖试纸(天津亿朋医疗器械股份有限公司, 批号: SSL20Z2D1)。

1.4 主要仪器 TDL-5-A 低速大容量离心机(上海安亭科学仪器厂); Multiskan Go 全波长全自动多功能酶标仪(Thermo Fisher Scientific 公司); BS224S 型电子天平(北京赛多利斯); 美迪信血糖仪(天津亿朋医疗器械股份有限公司)。

1.5 实验方法

1.5.1 糖尿病大鼠模型制备^[5] 选取健康成年 SD 大鼠 80 只, 雌雄各半, 体重(200±20) g, 适应性饲养 1 周后, 随机分为正常组 10 只和模型组 70 只, 正常组给予基础饲料喂养, 模型组给予高脂饲料(基础饲料 60.4%+猪油 10%+蛋黄粉 8%+胆固醇 1.5%+蔗糖 20%+胆酸钠 0.1%) 喂养, 共 4 周。4 周后所有大鼠禁食不禁水 12 h, 模型组给予腹腔注射 STZ 40 mg·kg⁻¹(枸橼酸钠缓冲液配制), 正常组给予等体积

枸橼酸钠缓冲液。72 h 后剪尾采血测随机血糖, 如果造模前血糖<8.9 mmol·L⁻¹, 造模后血糖≥16.7 mmol·L⁻¹, 体重明显下降者即为造模成功。成模大鼠以正常饲料继续喂养 1 周, 测定血糖稳定后用于后续实验。

1.5.2 多穗柯提取物制备 取多穗柯叶 5 kg, 切碎加 10 倍水煎煮 2 次, 第一次 1.5 h, 第二次 1 h, 滤过, 滤液浓缩至相对密度为 1.25(60 °C) 的清膏, 得到多穗柯水提物, 每克清膏含 2.7 g 生药。灌胃时按照相应剂量配制成相应药液使用。

1.5.3 分组给药 选取糖尿病造模成功血糖稳定大鼠 50 只, 随机分为模型组、二甲双胍组(Met)、多穗柯水提物(DSK)高、中、低剂量组, 每组 10 只。各组大鼠于分组次日开始灌胃给药, DSK 高、中、低剂量组给药剂量分别为 7、3.5、1.75 g 生药/kg, Met 组给药剂量为 0.233 g·kg⁻¹, 给药体积 10 mL·kg⁻¹, 正常组及模型组给予等体积蒸馏水, 每天 1 次, 连续 4 周。

1.5.4 指标检测 末次给药后禁食不禁水 12 h, 各组大鼠测定体重, 水合氯醛腹腔注射麻醉, 剪尾采血测定空腹血糖, 腹主动脉采血, 离心取血清(3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 离心半径 15 cm) 后, 应用 ELISA 法检测血清 INS、GHbA1c、MMP-8 及 MMP-9 水平。大鼠取血后处死, 取胰腺组织, 10% 甲醛固定, 脱水, 常规石蜡包埋, 切片, HE 染色, 进行组织学评价。

1.6 统计学分析 试验数据用 SPSS 22.0 软件进行统计学处理, 计量资料以($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, *P*<0.05 代表差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 多穗柯对糖尿病大鼠体重和空腹血糖的影响

与正常组比较, 模型组大鼠体重显著降低, 空腹血糖显著升高(*P*<0.05); 与模型组比较, 多穗柯中剂量组和二甲双胍组给药 4 周后大鼠体重明显增加, 多穗柯高、中剂量组及二甲双胍组给药 4 周后大鼠空腹血糖明显降低(*P*<0.05), 提示多穗柯水提物可以显著增加糖尿病大鼠的体重, 降低糖尿病大鼠的空腹血糖(见图 1~2)。

2.2 多穗柯对糖尿病大鼠血清 INS、GHbA1c 的影响

与正常组比较, 模型组大鼠血清 INS 水平显著降低, 血清 GHbA1c 水平显著升高(*P*<0.05); 与模型组比较, 多穗柯高、中剂量组和二甲双胍组大鼠血清 INS 水平显著升高, 血清 GHbA1c 水平显著降低(*P*<0.05), 提示多穗柯水提物可以提高糖尿病大鼠胰岛素分泌, 调控糖化血红蛋白水平(见图 3~4)。

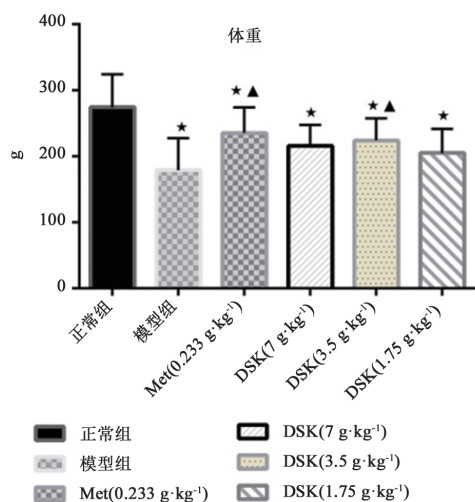


图1 各组大鼠体重水平比较

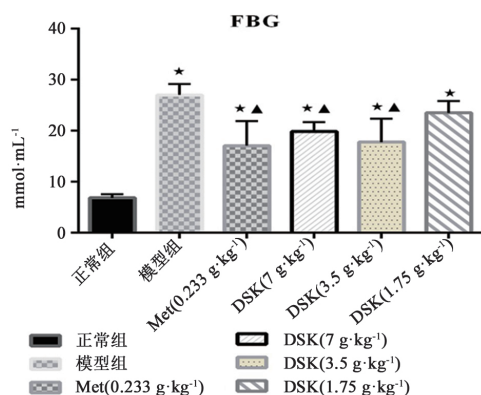
注: 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, ▲ $P < 0.05$ 

图2 各组大鼠空腹血糖水平比较

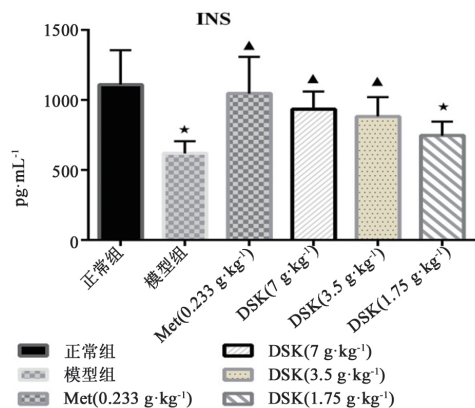
注: 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, ▲ $P < 0.05$ 

图3 各组大鼠血清 INS 水平比较

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, ▲ $P < 0.05$

2.3 多穗柯对糖尿病大鼠血清 MMP-8、MMP-9 的影响 与正常组比较,模型组大鼠血清 MMP-8、MMP-9 水平显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较,多穗柯高、中、低剂量组和二甲双胍组大鼠血清 MMP-9 水平均显著降低,二甲双胍组大鼠血清 MMP-8

水平显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较,多穗柯各剂量组大鼠血清 MMP-8 水平有下降趋势,但无统计学差异 ($P > 0.05$)。提示多穗柯水提取物可以调节糖尿病大鼠血清 MMP-9 水平(见图 5~6)。

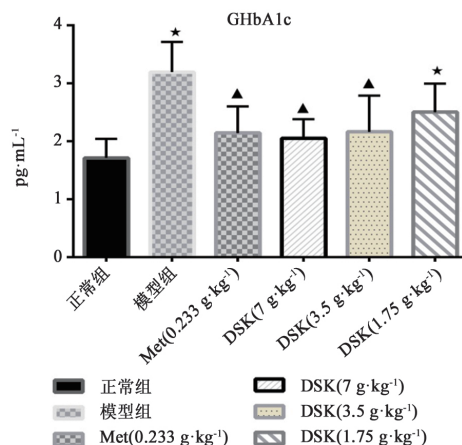


图4 各组大鼠血清 GHbA1c 水平比较

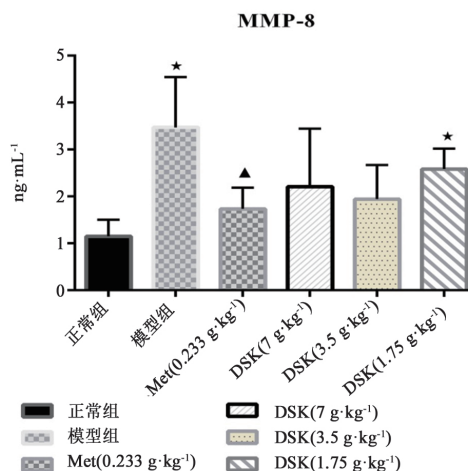
注: 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, ▲ $P < 0.05$ 

图5 各组大鼠血清 MMP-8 水平比较

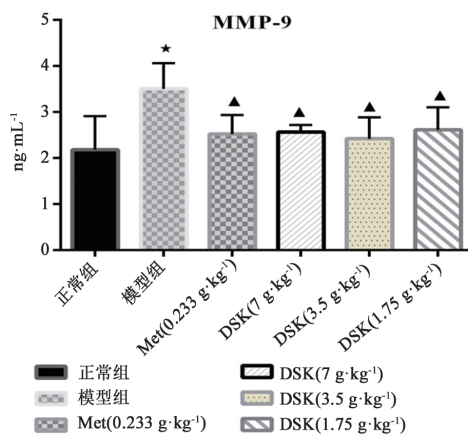
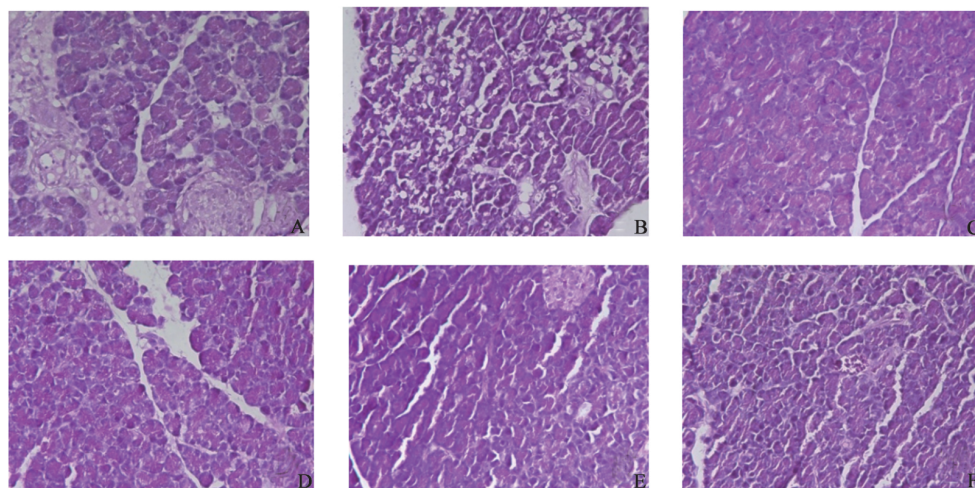
注: 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, ▲ $P < 0.05$ 

图6 各组大鼠血清 MMP-9 水平比较

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, ▲ $P < 0.05$

2.4 多穗柯对糖尿病大鼠胰腺组织的影响 镜下显示: 正常组大鼠胰腺组织结构正常, 胰岛为圆形或椭圆形, 细胞轮廓规则整齐; 模型组大鼠胰腺组织结构

紊乱, 胰岛细胞萎缩, 轮廓不规则, 排列紊乱, 有脂肪病变; 与模型组比较, 多穗柯高、中、低剂量组和二甲双胍组大鼠胰腺组织病理病变明显减轻(见图7)。



A. 正常组; B. 模型组; C. Met(0.233 g · kg⁻¹); D. DSK(7 g · kg⁻¹); E. DSK(3.5 g · kg⁻¹); F. DSK(3.5 g · kg⁻¹)

图7 各组大鼠胰腺组织病理(HE×200)

3 讨论

糖尿病是以慢性高血糖为主的内分泌代谢疾病, 其病理机制以胰岛素抵抗为主, 伴胰岛素分泌明显缺陷或胰岛素相对不足从而产生胰岛素抵抗障碍^[6]。糖尿病的治疗目前主要集中在两个方向: 一是通过肌注胰岛素合成制剂来降低血糖; 二是通过口服降糖药物来降低血糖。临床应用广泛的口服降糖药主要是双胍类和磺脲类, 需结合年龄、病程、肝肾功能状况等多方面因素指导使用, 使用不当或长期服用均会产生低血糖、胃肠道反应等副作用^[7-9]。因此, 寻找疗效确切、副作用小、安全稳定的口服降糖药仍是糖尿病药物研究的主要方向。

胰岛素是由胰岛β细胞产生的内分泌激素, 能够调节机体血糖、加速葡萄糖的摄取和利用, 是反映胰岛素细胞贮备和分泌功能的重要指标。在长期高脂状态下, 胰岛分泌胰岛素代偿性增加, 使胰岛功能逐渐衰竭, 从而导致胰岛素分泌降低, 葡萄糖摄取和利用减少从而使机体血糖升高。糖化血红蛋白在机体中通过持续、缓慢且不可逆的糖化反应形成, 是红细胞中血红蛋白与血清中糖类相结合的产物, 血糖浓度及血糖与血红蛋白接触的时间均能够影响糖化血红蛋白的含量, 《中国2型糖尿病防治指南(2020年版)》将“糖化血红蛋白”首次正式纳入糖尿病诊断标准中^[10-11]。因此, 胰岛素与糖化血红蛋白均可作为评价降糖药物作用的重要指标。本研究多穗柯能够显著提高糖尿病大鼠胰岛素分泌水平, 降低

血清糖化血红蛋白含量, 改善胰腺组织病变, 提示多穗柯能够提高机体对糖尿病的耐受性, 改善胰岛功能, 促进胰岛素分泌, 调控糖化血红蛋白水平, 具有降糖效应。

糖尿病病因还与众多细胞因子和酶活性改变有关, 基质金属蛋白酶(MMPs)是一类具有类似结构和共同生物化学性质的金属依赖性蛋白内切酶家族。在2型糖尿病中, 高血糖引起的糖基化终末产物积累, 及高胰岛素血症导致的ROS和氧化应激增加^[12], 均会显著促进MMPs的高表达和酶活性增强。MMP-9主要是由中性粒细胞分泌产生的酶, MMP-8是一种多形核细胞的间质胶原酶, 研究显示^[12-13], 2型糖尿病患者血清中MMP-9、MMP-8水平均显著升高, 在一定程度上反映了糖尿病早期血管病变, 对评估、发现早期糖尿病及糖尿病并发症意义重大。本研究中糖尿病模型大鼠血清MMP-8、MMP-9水平显著升高, 与文献报道相符。多穗柯能够显著降低糖尿病大鼠血清MMP-9水平, 提示多穗柯也许能够通过调控MMP-9水平干预糖尿病大鼠早期血管病变。

综上所述, 本研究对瑶药多穗柯降糖作用进行了实验研究, 明确了瑶药多穗柯具有降糖作用, 其机制可能与改善胰岛功能, 促进胰岛素分泌, 调控糖化血红蛋白与MMP-9水平, 提高机体对糖尿病的耐受性有关, 为多穗柯的开发应用提供了理论依据。但本文仅开展了多穗柯降糖药效作(下转第581页)

行比较,三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 、人参皂苷 R_{b1} 含量大都稳定在 $1.11 \sim 1.54 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (平均值为 $1.35 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)、 $5.85 \sim 8.31 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (平均值为 $7.08 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)、 $2.92 \sim 4.41 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (平均值为 $3.46 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$),不同企业药品之间三七总皂苷的含量整体比较稳定,含量差别不是非常明显。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典 2015 年版(一部) [M].北京:中国医药科技出版社,2015.
- [2] 许学丽,田洪根,李秀莲.消栓通络片中人参皂苷 R_{g1} 含量测定的不确定度评定 [J].解放军药学学报,2011,27(5):446-448.
- [3] 尤慧莲,孙义才,尹宁宁,等.消栓通络片中人参皂苷 R_{g1} 含量测定方法的建立 [J].中国药师,2004,7(2):99-100.
- [4] 郭红英.三七的化学成分和药理作用研究 [J].医学信息,2016,29(32):99-100.

- [5] 王莹,褚扬,李伟,等.三七中皂苷成分及其药理作用的研究进展 [J].中草药,2015,46(9):1381-1392.
- [6] 陈亮,钱一帆.HPLC 测定田七痛经胶囊中人参皂苷 R_{g1} 、 R_{b1} 及三七皂苷 R_1 含量 [J].中国中医药信息杂志,2015,22(10):77-80.
- [7] 罗兰,李明丽,康佳珍,等.HPLC 测定脑得生固体分散体胶囊中三七皂苷类成分的含量 [J].海峡药学,2017,29(5):43-46.
- [8] 付传山,洪挺,王笑琴.RP-HPLC 法同时测定舒胸颗粒中 3 种皂苷类成分的含量 [J].中国医药科学,2017,7(13):33-35.
- [9] 费毅琴,杨萍,肖凌,等.HPLC 法快速筛查中成药中三七/人参茎叶代替根和根茎 [J].中成药,2015,37(8):1730-1733.
- [10] 郑立雄,陈金东,任杨帆,等.三七叶与茎 HPLC 的比较分析及 R_{b3} 含量的测定 [J].云南中医学院学报,2014,37(5):32-35.

(上接第 570 页)

用研究,其化学成分及作用机制有待进一步深入探讨。

参考文献:

- [1] 中华医学会糖尿病学分会.中国 2 型糖尿病防治指南 (2020 年版) [J].中华内分泌代谢杂志,2021,37(4):311-398.
- [2] 俞璇,张莺莺,欧成举,等.糖化血红蛋白检测在 2 型糖尿病诊断中的临床价值及其影响因素 [J].皖南医学院学报,2017,36(2):157-158.
- [3] 张晓春.糖尿病发展现状分析 [J].临床医药实践,2015,24(10):784-786.
- [4] 饶伟源,冉国粮,邱宏聪,等.多穗柯质量标准研究 [J].中南药学,2017,15(6):116-119.
- [5] 吴晨曦,董文婷,霍金海,等.玉米须水煎液对 II 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗的影响 [J].中药药理与临床,2018,34(6):108-112.
- [6] 王敏.糖尿病发病机制的研究进展 [J].铜陵职业技术学院学报,2016,15(1):43-44.
- [7] 刘海艳.口服磺脲类药物的 29 例 2 型糖尿病患者发生

低血糖诱因探讨 [J].中国冶金工业医学杂志,2020,37(3):314-315.

- [8] 徐信妮,井高静,常锐霞,等.磺脲类药物 2 型糖尿病的安全性和有效性的网状 meta 分析 [J].中国现代应用药学,2019,36(21):2707-2714.
- [9] 张红霞.口服降糖药物不良反应研究进展 [J].天津药学,2017,29(2):75-78.
- [10] 冯晓晶,杨燕怡,方奕元,等.糖化血红蛋白和空腹血糖筛查体检人群血糖状态的差异性分析 [J].中华预防医学杂志,2021,55(6):780-785.
- [11] 张众志,张红梅,张静,等.1,5-脱水葡萄糖醇、果糖胺和糖化血红蛋白在糖尿病诊断中的价值 [J].实用临床医药杂志,2015,19(7):38-40.
- [12] 司庆盈,刘昌盛,王霞,等.2 型糖尿病患者血清 MMP-8 水平与颈动脉粥样硬化的相关性 [J].山东大学学报(医学版),2010,48(3):15-18.
- [13] DAS S, MAITI A. Matrix Metalloproteinases in Subjects With Type 2 Diabetes Mellitus: Pattern of MMP-2 and MMP-9 Profile in Diabetes Mellitus Type-2 Patients [J]. AIJRFANS,2013,3(1):57-60.