

• 药理 •

油茶醇提物对 2 型糖尿病小鼠血糖的作用

张伟云¹, 洪珠凤², 陈全成^{3*}, 许长江¹, 王晓禹¹ (1. 厦门医学高等专科学校中心实验室、厦门市中药生物工程重点实验室、福建省中药精加工与健康产品开发重点研究室、福建省道地药材生物工程重点实验室, 厦门医学高等专科学校药学系 厦门 361008; 2. 厦门山宝工贸有限公司 厦门 361009; 3. 厦门大学药学院 厦门 361102)

摘要:目的 筛选油茶(*Camellia oleifera* Abel.) 降低 2 型糖尿病小鼠血糖的有效部位。方法 采用腹腔注射烟碱、链脲霉素诱导的 2 型糖尿病小鼠模型, 应用超声提取法分别获得油茶叶、果、籽的乙醇提取物, 筛选降低血糖的有效部位。结果 阳性药罗格列酮每日灌胃剂量 10mg/kg · BW 连续灌胃 21d 后, 降低了 2 型糖尿病小鼠血糖。分别灌胃油茶叶、油茶果、油茶籽乙醇提取物, 按每日剂量 100mg/kg · BW 连续灌胃 21d 后, 均在一定程度上降低 2 型糖尿病小鼠血糖。油茶籽乙醇提取物对口服葡萄糖耐受试验(Oral glucose tolerance test, OGTT) 作用最明显。与对照组相比, 1 μ M 和 2 μ M 的阳性药罗格列酮均能明显促进 3T3-L1 前脂肪细胞分化; 油茶籽乙醇提取物在 0.5 μ g · mL⁻¹ 和 1 μ g · mL⁻¹ 浓度下也体现出促进分化的活性。结论 油茶籽乙醇提取物降低了 2 型糖尿病小鼠的血糖, 促进了 3T3-L1 前脂肪细胞的分化, 但其具体作用机制尚需深入研究。

关键词: 油茶; 2 型糖尿病小鼠; 血糖; 3T3-L1 前脂肪细胞; 分化

中图分类号: R284; R965 文献标识码: A 文章编号: 1006-3765(2017)-01-0712-0021-04

Effect of Ethanol Extract from *Camellia Oleifera* Abel. on Blood Glucose in Type 2 Diabetic Mice

ZHANG Wei-Yun¹, HONG Zhu-feng², CHEN Quan-cheng^{3*}, XU Chang-jiang¹, WANG Xiao-yu¹ (1. Central Laboratory of Xiamen Medical College, Xiamen Key Laboratory of Biotechnology of Chinese Traditional Medicine, Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Finish Processing and Health Product Development of Fujian Province, Fujian Provincial Key Laboratory of Genuine Regional Drug Bio-engineering, Xiamen Medical College, Xiamen 361008, China; 2. Xiamen Shan Bao Industry and Trade Co., Ltd., Xiamen 361009, China; 3. School of Pharmaceutical Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate effective parts possessing property of lowering blood glucose in type 2 diabetic mice from *Camellia oleifera* Abel. **METHODS** Leaf, fruit and seed ethanol extract of *C. oleifera* were obtained through ultrasonic extraction and were subsequently subject to type 2 diabetic mice model induced by intraperitoneal injection of streptozocin and nicotine. **RESULTS** In accordance with the positive drug rosiglitazone by intragastric administration once daily dose of 10mg/kg · BW, continuous intragastric administration for 21 days, blood glucose in type 2 diabetic mice was reduced. In accordance with a daily dose of 100mg/kg · BW leaf, fruit and seed ethanol extract of *C. oleifera*, continuous intragastric administration for 21 days respectively, in a certain extent, blood glucose in type 2 diabetic mice was reduced. Moreover, effect of seed ethanol extract on blood glucose and oral glucose tolerance test (OGTT) is the most obvious. Compared with control group (treated with insulin), 1 μ M and 2 μ M of positive drug rosiglitazone can significantly promote differentiation of 3T3-L1 pre-adipocytes. *C. oleifera* seed etha-

作者简介: 张伟云, 女(1980.3-), 学历: 博士, 职称: 副教授, 从事中药药效物质基础研究工作。

通讯作者: 陈全成, 男(1977.3-), 学历: 博士, 职称: 副教授, 硕士生导师, 从事药物化学研究工作。

基金项目: 福建省教育厅中青年教师教育科研项目杰青项目 JA14421; 厦门市科技局科技计划高校创新项目 3502Z20143026; 厦门市科技局科技计划项目 3502Z20144031; 福建省教育厅中青年教师教育科研项目 JA13425; 福建省自然科学基金计划资助项目 2015J01065; 福建省科技厅自然科学基金青年创新项目 2014D008; 福建省卫生系统中青年骨干人才培养项目基础项目 2015-ZQN-JC-45, 该两项项目由厦门市卫生和计划生育委员会资助研究经费; 厦门医学高等专科学校科研基金 Z2013-12, Z2013-25。

nol extract as the most effective part for lowering blood glucose at $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ concentration also promoted 3T3-L1 pre-adipocyte differentiation. **CONCLUSION** It was suggested that *C. oleifera* seed ethanol extract lowered blood glucose in type 2 diabetic mice and enhanced differentiation of 3T3-L1 pre-adipocytes, but the specific mechanism needs further study.

KEY WORDS: *Camellia oleifera* Abel.; Type 2 diabetic mice; Blood glucose; 3T3-L1 Pre-adipocytes; Differentiation

油茶(*Camellia oleifera* Abel.) 为山茶科山茶亚属油茶族植物, 遍布我国南方各省。油茶根皮、花、种子、油粕、茶油均被《中华人民共和国药典》记载。茶油是油茶种子的脂肪油, 精制茶油的不饱和脂肪酸含量较高, 国内目前已见茶油对2型糖尿病患者干预效果的研究报道。2型糖尿病是一种多基因遗传因素、环境因素综合作用引起的内分泌代谢性疾病。其病理生理的两个中心环节是胰岛 β 细胞功能紊乱和胰岛素抵抗⁽¹⁾。本研究初步探索油茶叶、油茶果、油茶籽对2型糖尿病小鼠血糖的影响及其可能的作用机制。

核转录因子过氧化物酶体增殖物激活受体(Peroxisome proliferators-activated receptors, PPARs) 属于核受体超家族的成员, 包括PPAR α 、PPAR β 、PPAR γ 3种亚型⁽²⁾。PPAR γ 主要表达于脂肪组织中, 是脂肪细胞分化的主要调节因子, 控制与胰岛素敏感性相关的多种因子的表达, 在糖脂代谢平衡调节中发挥重要作用⁽³⁾。噻唑烷二酮类药物可作为PPAR γ 的配体与其结合而改变其活性, 从而增强机体胰岛素敏感性, 缓解胰岛素抵抗⁽⁴⁾, 促进3T3-L1脂肪细胞吸收葡萄糖。在3T3-L1前脂肪细胞分化过程中, PPAR γ 2的基因表达被上调。目前, PPAR γ 已经成为治疗2型糖尿病的靶点。噻唑烷二酮类药物中罗格列酮和吡格列酮已上市, 可有效降低血浆中甘油三酯的水平 and 胰岛素抵抗, 但可能引起肥胖、水肿, 少量肝毒性等不良反应^(5,6)。

中药治疗胰岛素抵抗具有多层次且持久温和的优点, 为开发中药新药提供一定参考, 从中药中寻找治疗和改善2型糖尿病的有效部位和有效成分是一条重要的途径。本试验应用3T3-L1前脂肪细胞分化模型, 以噻唑烷二酮类代表药物罗格列酮为阳性对照药, 应用2型糖尿病小鼠模型, 从油茶中筛选降低2型糖尿病小鼠血糖的有效部位, 为拓展油茶在食品及医药等方面的应用提供物质基础和理论依据。将筛选出的油茶降糖有效部位应用于3T3-L1前脂肪细胞分化模型, 为获得上调PPAR γ 表达进而增强胰岛素敏感性、促进葡萄糖吸收的活性物质奠定基础。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 罗氏血糖仪(ACCU-CHEK Active, 罗氏诊断产品(上海)有限公司), CO₂恒温培养箱(新加坡ESCO, IFS-110-8), 荧光显微镜(XTZ-Y3, 上海天珠光学仪器厂), 旋转蒸发仪(N-1001V, 日本EYELA东京理化器械株式会社)等。

1.2 试剂 油红O(批号为#SLBM4444V)、苏木素伊红溶液(批号为SLBK4345V)、胰岛素(批号为I0305000)、罗格列酮(批号为#074M4704V)均购自美国SIGMA-ALDRICH公司。胎牛血清、胰酶、Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM)均购

自美国Hyclone公司, 其余所用试剂均为分析纯。

1.3 样品来源 2014年9月上旬于福建省龙岩市上杭县蓝溪镇采集油茶叶, 2014年10月下旬采集油茶果, 油茶籽, 分别经厦门大学药学院陈全成副教授鉴定为*Camellia oleifera* Abel.的叶、果、籽。

2 方法

2.1 油茶提取物及对照品溶液的准备 称取油茶叶、油茶果、油茶籽各5kg, 阴干, 粉碎, 过60目筛, 分别用油茶叶、油茶果、油茶籽粗粉体积的8倍量70%乙醇于60℃超声提取, 提取3次, 每次20min, 合并3次滤液并减压浓缩, 分别得到稠状油茶叶、油茶果、油茶籽的乙醇提取浓缩物1100g、1250g、1280g。

分别称取油茶叶、油茶果、油茶籽的乙醇提取浓缩物各10mg, 称取对照品罗格列酮3.94mg, 分别超声溶解于1mL二甲亚砜溶剂中, 于4℃冰箱保存作为测试母液。

2.2 实验动物 动物试验采用110只雄性5~6周龄体重为21~23g的SPF级C57BL/6小鼠, 购自上海斯莱克实验有限责任公司, 动物合格证号2015000501745。饲养间配以12h光照/12h黑暗循环, 温度控制为23~25℃, 湿度为45%~55%。所有动物实验操作步骤均在国家动物实验标准(GB/T 27416-2014)的指导下完成。实验期间除做血糖测定、OGTT及处死前16h须禁食外, 小鼠自由进食、饮水。试验前, 小鼠适应动物实验室环境2周。

2.3 诱导2型糖尿病小鼠模型 小鼠被随机分组, 每组8只。除空白组小鼠外, 其它组小鼠均被两次腹腔注射链脲霉素(注射剂量为100mg/kg·BW)和烟碱(注射剂量为240mg/kg·BW)。第一次腹腔注射链脲霉素和烟碱后, 间隔两天再进行第2次腹腔注射。分别于第一次腹腔注射链脲霉素和烟碱的前一天(标记为第0天)和注射后的第7天, 第14天, 第21天测定各组小鼠空腹血糖值。实验期间每隔一天测量并记录各组小鼠体重。

第22天进行口服葡萄糖耐受试验(Oral glucose tolerance test, OGTT), 即空腹16h以上, 测定空腹血糖值, 作为0min的数值, 然后按照2.0g/kg·BW的剂量灌胃葡萄糖溶液, 分别在灌胃后的第30min、60min、120min测定各组小鼠血糖值。空腹血糖 $>7\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 且OGTT过程中血糖值明显高于空白组小鼠血糖值的小鼠即为2型糖尿病小鼠。

2.4 测定灌胃药物后2型糖尿病小鼠的血糖 根据小鼠体重, 每天分别严格按照剂量连续灌胃生理盐水或阳性药物溶液或测试药物溶液, 共计灌胃21天。空白组(未被诱导的正常小鼠)和糖尿病模型组(被诱导成2型糖尿病的小鼠)均灌

胃 10mL/kg · BW 生理盐水; 阳性对照组(被诱导成 2 型糖尿病小鼠, 且灌胃阳性药物罗格列酮) 灌胃剂量为 10mg/kg · BW; 测试药物组(被诱导成 2 型糖尿病小鼠, 且分别灌胃油茶叶乙醇提取物、油茶果乙醇提取物、油茶籽乙醇提取物) 灌胃剂量高、中、低剂量分别为 100mg/kg · BW、50mg/kg · BW、25mg/kg · BW。为初步检测油茶各部位提取物的降血糖效果, 分别在每组小鼠初次灌胃的前一天(标记为第 0 天)和灌胃给药后的第 7 天、第 14 天、第 21 天测定小鼠空腹血糖值。实验期间每天测量并记录各组小鼠体重。

2.5 灌胃药物 22 天后对 2 型糖尿病小鼠进行 OGTT 于初次灌胃给药(每日灌胃剂量 100mg/kg · BW) 后的第 22 天进行 OGTT, 分别测定并记录第 0min、30min、60min、120min 各组小鼠血糖值, 从而评估油茶各部位提取物对 2 型糖尿病小鼠 OGTT 中血糖的影响。

2.6 细胞培养 小鼠 3T3-L1 前脂肪细胞用 DMEM 添加 10% 热灭活胎牛血清在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

2.7 前脂肪细胞分化、油红 O 染色 参照文献所述方法^[7-10] 采用油红 O 染色法, 检测油茶叶、油茶果、油茶籽对 3T3-L1 前脂肪细胞分化的影响。首先, 将 3T3-L1 前脂肪细胞以 4 × 10³ 个/孔的比例接种到 96 孔细胞板, 培养 24h 后, 各组分别用药物处理 3d。其中阳性对照组分别用终浓度为 1μM 的胰岛素和终浓度为 1μM 或 2μM 的罗格列酮进行处理, 测试组分别用终浓度为 1μM 的胰岛素和终浓度为 0.5μg · mL⁻¹ 或 1μg · mL⁻¹ 的油茶叶乙醇提取物、油茶果乙醇提取物、油茶籽乙醇提取物进行处理, 对照组只用终浓度为 1μM 的胰岛素处理, 空白对照组不做任何特殊处理。7d 后对细胞进行油红 O/苏木素伊红染色, 先用 10% 福尔马林固定 1h, 然后用油红 O 溶液(油红 O 溶解于 60% 异丙醇) 室温染色 2h, 再用苏木素伊红室温染色 15min。最后, 用 60% 异丙醇清洗除去未结合的染料, 清洗 3 次后在显微镜下拍摄染色图像。

2.8 统计分析 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析, 多组均数间的两两比较采用 LSD 法检验, 以 $P < 0.05$ $P < 0.01$ 表示有统计学意义。

3 结果

3.1 2 型糖尿病小鼠模型的建立 于腹腔注射链脲霉素和烟碱后的第 7 天、第 14 天、第 21 天分别测定空白组和模型组小鼠的空腹血糖值, 并于第 22 天进行 OGTT, 综合评估 2 型糖尿病小鼠模型是否成功建立。与空白对照组小鼠相比, 2 型糖尿病模型组小鼠在体重方面无显著性差异, 血糖在第 21 天呈现明显的升高(见图 1A, ** $P < 0.01$), OGTT 的结果显示糖尿病模型组小鼠血糖在 30、60、120min 时均明显增高(见图 1B, ** $P < 0.01$), 说明 2 型糖尿病小鼠模型被成功建立。

3.2 油茶提取物对 2 型糖尿病小鼠血糖的作用 与糖尿病对照组相比, 阳性对照组罗格列酮(每日灌胃剂量为 10mg · kg⁻¹) 的第 7、14、21 天后, 小鼠血糖明显被降低, 且呈显著性差异(** $P < 0.01$), 体现了很强的降血糖作用。每日灌胃剂量为 100mg · kg⁻¹ 的油茶叶、油茶果、油茶籽乙醇提取物在第 7、14、21 天后也展现出较好地降低血糖活性(见图 2, ** $P < 0.01$)。

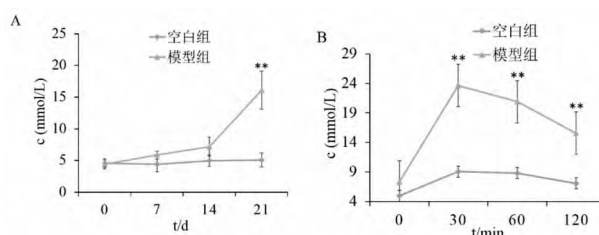


图 1 2 型糖尿病模型小鼠的血糖(A)、OGTT(B) (n=8; 与空白组相比, ** $P < 0.01$)

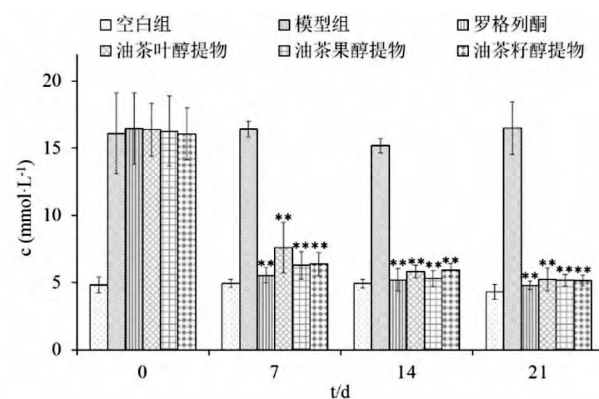


图 2 油茶醇提取物降低 2 型糖尿病小鼠血糖 (n=8, 与 2 型糖尿病模型组相比, ** $P < 0.01$)

3.3 油茶提取物对 2 型糖尿病小鼠 OGTT 的影响 OGTT 结果显示, 与糖尿病对照组相比, 油茶籽乙醇提取物(灌胃剂量为 100mg/kg · BW) 在 30min 时显著降低了 2 型糖尿病小鼠的血糖值(见图 3, * $P < 0.05$), 体现了具有较好的降血糖活性和改善糖耐量的潜能, 而油茶叶和油茶果的乙醇提取物灌胃给药组降血糖和改善糖耐量的作用不明显。

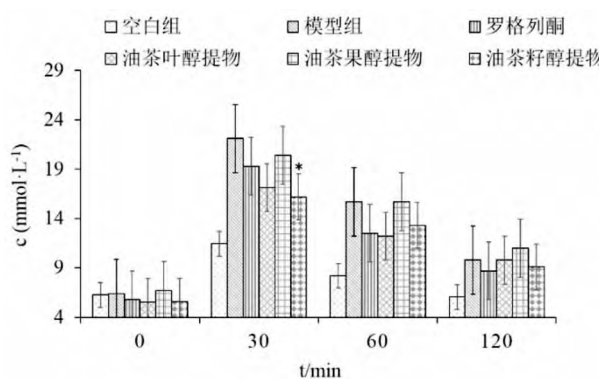


图 3 油茶醇提取物对 2 型糖尿病小鼠 OGTT 的作用 (n=8; 与糖尿病模型组相比, * $P < 0.05$)

3.4 油茶提取物对 3T3-L1 前脂肪细胞分化的影响 油红 O 染料能溶于细胞中的脂类, 与甘油三酯结合呈红色脂肪滴。经药物处理后, 油红 O 染色出现脂肪滴, 说明该药物促进 3T3-L1 前脂肪细胞分化过程。与对照组相比, 阳性对照药罗格列酮在 1μM 和 2μM 的浓度下均新生成了的脂肪细胞并被染色为红色(见图 4c 和 d), 表明 3T3-L1 前脂肪细胞被罗格列酮成功诱导为脂肪细胞。筛选出的具有较强降低血糖活性

的油茶籽乙醇提取物具有类似阳性对照药罗格列酮促进前脂肪细胞分化的活性,在 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度下均体现出诱导 3T3-L1 前脂肪细胞分化为脂肪细胞的活性(见图 4e 和 f)。

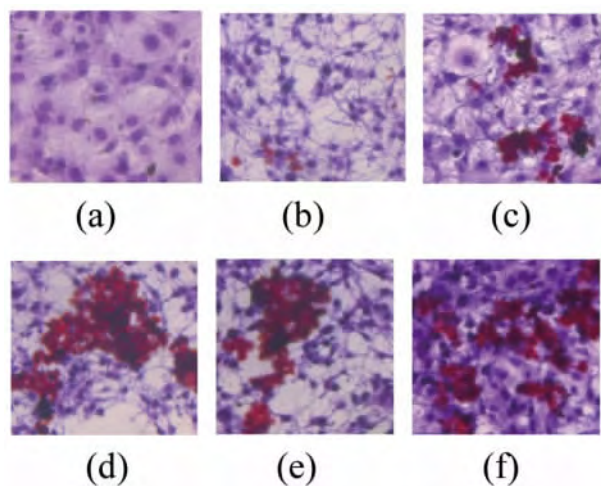


图 4 3T3-L1 前脂肪细胞分化模型油红染色图像 (a) 3T3-L1 前脂肪细胞, (b) 对照组(只加胰岛素处理), (c) $1 \mu\text{M}$ 罗格列酮, (d) $2 \mu\text{M}$ 罗格列酮, (e) $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 油茶籽乙醇提取物, (f) $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 油茶籽乙醇提取物

4 讨论

动物试验结果表明,油茶叶、油茶果、油茶籽乙醇提取物均能不同程度地降低 2 型糖尿病小鼠血糖,而且油茶籽乙醇提取物调控 OGTT 血糖水平。3T3-L1 前脂肪分化试验结果提示油茶籽乙醇提取物具有促进 3T3-L1 前脂肪细胞分化的活性。油茶籽乙醇提取物降低 2 型糖尿病小鼠血糖的作用机制可能与其促进 3T3-L1 前脂肪细胞分化进而上调 PPAR γ 基因表达,改善 2 型糖尿病胰岛素抵抗有关,但其具体作用机制尚需深入研究。本试验的开展为将油茶开发成保健食品、

预防或辅助治疗 2 型糖尿病及综合利用油茶提供参考。

致谢:感谢厦门市第一医院糖尿病研究所上官兆水研究员提供 3T3-L1 前脂肪细胞。

参考文献

- (1) 丁少川,张瑞珍,刘成柱. 2 型糖尿病与胰岛素抵抗和代谢综合征 (J). 现代预防医学 2009, 36(3): 564-566.
- (2) Shearer B G, Billin A N. The next generation of PPAR drugs: do we have the tools to find them (J). Biochim Biophys Acta, 2007, 1771(8): 1082-1093.
- (3) Wagner K D, Wagner N. Peroxisome proliferator-activated receptor β/δ (PPAR β/δ) acts as regulator of metabolism linked to multiple cellular functions (J). Pharmacol Ther 2010, 125(3): 423-435.
- (4) Wang L M, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig E M, et al. Natural product agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ): a review (J). Biochem Pharmacol 2014, 92(1): 73-89.
- (5) Soccio R E, Chen E R, Lazar M A. Thiazolidinediones and the promise of insulin sensitization in type 2 diabetes (J). Cell Metab, 2014, 20(4): 573-591.
- (6) Schfer H L, Linz W, Falk E, et al. AVE8134, a novel potent PPAR α agonist improves lipid profile and glucose metabolism in dyslipidemic mice and type 2 diabetic rats (J). Acta Pharmacol Sin 2012, 33(1): 82-90.
- (7) Zhang W Y, Lee J J, Kim Y, et al. Effect of eriodictyol on glucose uptake and insulin resistance in vitro (J). J Agric Food Chem 2012, 60(31): 7652-7658.
- (8) Zhang W Y, Lee J J, Kim I S, et al. Stimulation of glucose uptake and improvement of insulin resistance by aromadendrin (J). Pharmacology, 2011, 88(5-6): 266-274.
- (9) Zhang W Y, Lee J J, Kim Y, et al. Amelioration of Insulin Resistance by Scopoletin in High-Glucose-Induced Insulin-Resistant HepG2 Cells (J). Horm Metab Res 2010, 42(13): 930-935.
- (10) Zhang W Y, Lee J J, Kim I S, et al. 7-O-Methylaromadendrin Stimulates Glucose Uptake and Improves Insulin Resistance in Vitro (J). Biol Pharm Bull 2010, 33(9): 1494-1499.

灵芝颗粒对小鼠免疫功能的影响

王金亮^{1,2}, 吴长辉^{1,2}, 华正根^{1,2}, 姚渭溪², 李 晔^{1,2*}, 陈冠敏³ (1. 福建仙芝楼生物科技有限公司 福州 350002; 2. 国家食用菌加工技术研发分中心 福州 350002; 3. 福建省疾病预防控制中心 福州 350001)

摘要:目的 研究灵芝颗粒对小鼠免疫功能的影响。方法 小鼠按体重分成五大组,分别为免疫一组:空斑、溶血素测定、脏器指数;免疫二组: NK 活性、淋转试验;免疫三组: DTH 试验;免疫四组:小鼠碳廓清试验;免疫五组:小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验。每组动物按体重随机分成 4 小组,每小组 10 只动物,按人日推荐量的 5 倍、10 倍、30 倍分别设 0.833 、 1.67 、 $5.00 \text{g}/\text{kg} \cdot \text{BW}$ 3 个剂量组和蒸馏水对照组。动物每天按 $20 \text{mL}/\text{kg} \cdot \text{BW}$ 连续灌胃 30 天后,分别进行碳廓清测定、迟发型变态反应(DTH)检测、抗体生成细胞和血清溶血素测定、小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞(半体内法)和脏器/体重比值测定、ConA 诱导的小鼠淋巴细胞转化实验和小鼠 NK 细胞活性测定(乳酸脱氢酶 LDH 测定法)。结果 样品各剂量组与对照组比较:①各剂量组小鼠体重、胸腺指数、脾指数、小鼠碳廓清能力、小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞的吞噬率和吞噬

作者简介:王金亮,男(1979-),学历:硕士。职称:高级工程师。研究方向为功能性食品开发及高新技术应用。E-mail: yanfa2@xianzhilou.com
基金项目:全国公益性行业(农业)科研专项(项目编号 201303079)