

# 天麻素的抗糖尿病作用实验

韩磊, 乔爱敏, 刘青

(华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021)

**摘要:** 分离、培养人脐静脉内皮细胞(HUVECs),测定在高糖刺激下胞外乳酸脱氢酶(LDH)的活性,并用链脲佐菌素建立糖尿病小鼠模型,分别以不同天麻素质量浓度干预 14 d 进行试验. 研究表明:天麻素能降低高糖刺激下 HUVECs 胞外 LDH 的活性,减轻高糖对血管内皮细胞造成的损伤;天麻素能显著降低糖尿病小鼠的血糖,降低小鼠血清中甘油三酯、总胆固醇及丙二醛浓度,提高超氧化物歧化酶(SOD)的活性,显示出明显的抗糖尿病作用.

**关键词:** 天麻素; 糖尿病; 血糖; 血脂; 抗氧化

**中图分类号:** R 285.5; R 587.1

**文献标志码:** A

天麻(*Gastrodia elata* Bl.)是兰科多年生寄生植物的干燥块茎,主要产于四川、云南、陕西等地,是我国名贵中药材之一. 天麻素具有镇静、镇痛、抗惊厥等神经保护作用,广泛应用于神经系统疾病的治疗中<sup>[1-2]</sup>. 天麻素是植物天麻中含量最高的活性成分,也存在于其他一些植物中. 近年来的研究表明,天麻素还有其他广泛的生理学活性,如降血压、降血脂等<sup>[3-5]</sup>,但天麻素是否有抗糖尿病活性还未见报道. 本实验室在研究植物金线莲提取物活性的过程中,发现从金线莲中提取的天麻素对高糖损伤的内皮细胞具有保护作用. 鉴于此,本文主要通过天麻素的体内和体外实验来研究其是否具有抗糖尿病的作用.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料及试剂

1) 药物. 天麻素由兰州大学功能有机分子化学国家重点实验室从植物金线莲(*Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.)中分离、鉴定;*D*-葡萄糖注射液(天津市中国大冢制药有限公司,批号:8I96D);盐酸二甲双胍片(广东深圳中联制药有限公司,批号:H44024853).

2) 试剂. M199 培养基(美国 Gibco 公司);链脲佐菌素(STZ,美国 Sigma 公司);乳酸脱氢酶(LDH)、葡萄糖、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)试剂盒(江苏南京建成生物工程研究所);其余均为市售分析纯试剂.

3) 材料. 原代培养的 HUVECs 来自医院健康产妇;实验动物为雄性清洁级 KM 种小鼠,体质量为 23~27 g,由福建医学科学研究所提供,许可证号:SYXK(闽)2006-0002.

### 1.2 仪器

生物安全柜、酶标仪、二氧化碳培养箱购自美国 Thermo 公司;倒置显微镜购自德国徕卡公司;紫外可见分光光度计购自上海美谱达公司.

### 1.3 方法

1.3.1 原代培养的 HUVECs 的分离及鉴定 在无菌条件下,取健康产妇分娩的脐带,参照 Jaffe 等<sup>[6]</sup>的方法进行原代细胞分离、培养,等细胞长满单层后,再进行传代. 实验用第 2~4 代细胞. 在倒置显微镜

收稿日期: 2013-01-19

通信作者: 刘青(1970-),女,博士,副教授,主要从事药理学的研究. E-mail:liuq@hqu.edu.cn.

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(2013J01337); 华侨大学侨办科研基金资助项目(10QZR15); 华侨大学教学改革科研基金资助项目(66661222Y)

下观察细胞形态, 并采用免疫荧光法检测细胞Ⅷ因子相关抗原, 免疫染色阳性证实为内皮细胞。

1.3.2 毒性检测 取生长状态良好的 2~4 代 HUVECs, 用含 10% 新生牛血清的 M199 培养基调整细胞密度至  $1 \times 10^8$  个  $\cdot L^{-1}$ , 接种到 96 孔板, 每孔 100  $\mu L$  细胞悬液, 静置培养 24 h. 然后弃掉旧培养基, 各孔加入 90  $\mu L$  无血清的 M199 培养基, 正常组每孔加入 10  $\mu L$  的 PBS, 药物组按终浓度 10, 20, 50, 100  $\mu g \cdot mL^{-1}$  在各孔中分别加入 10  $\mu L$  天麻素溶液. 每组 6 个复孔, 静置培养 24 h 后, 用 MTT 法检测各组细胞的光密度(D).

1.3.3 LDH 活性的测定 取生长状态良好的 HUVECs, 用含 10% 新生牛血清的 M199 培养基调整细胞密度至  $1 \times 10^8$  个  $\cdot L^{-1}$ , 接种到 6 孔板, 每孔 2 mL 细胞悬液, 静置培养 24 h. 弃掉旧的培养基, 每孔加入 1.6 mL 无血清 M199 培养基, 然后正常组每孔加入 400  $\mu L$  溶剂对照 PBS, 模型组每孔加入 200  $\mu L$  溶剂对照, 天麻素给药组按终浓度 20, 50, 100  $\mu g \cdot mL^{-1}$  各孔分别加入 200  $\mu L$  天麻素溶液. 药物与细胞孵育 1 h 后, 模型组与天麻素给药组各孔分别加入高浓度葡萄糖溶液, 使其终浓度为 40  $mmol \cdot L^{-1}$ . 培养 72 h 后, 取培养上清按照试剂盒说明书方法进行 LDH 活性的测定。

1.3.4 小鼠糖尿病模型的建立 小鼠 100 只, 适应性喂养 3 d 后, 随机抽取 10 只为正常对照组. 其余小鼠禁食 12 h 后, 按照 200  $mg \cdot kg^{-1}$  剂量腹腔注射 STZ. 在 72 h 后, 于眼眶后静脉取血测定小鼠空腹血糖(小鼠提前禁食 12 h), 选取血糖值大于 11.1  $mmol \cdot L^{-1}$  的小鼠作为糖尿病模型小鼠。

1.3.5 分组及给药 将造模成功的小鼠按体质量、血糖随机分为 5 组, 即模型组、阳性对照组(200  $mg \cdot kg^{-1}$  二甲双胍), 以及低、中、高剂量天麻组(质量浓度分别为 12.5, 25 和 50  $mg \cdot kg^{-1}$ ), 每组 10 只. 在实验期间, 正常对照组和模型组用生理盐水灌胃, 阳性对照组用二甲双胍溶液灌胃, 高、中、低剂量天麻素组用不同质量浓度的天麻素溶液灌胃. 各组正常喂食, 自由饮水, 每天记录小鼠的体质量, 于第 7 d 在眼眶后静脉取血, 测定其空腹血糖值, 于第 14 d 给药 2 h 后, 在眼球取血并处死动物, 分离血清并检测其血糖、血脂、抗氧化指标。

1.3.6 统计学分析 实验数据用 SPSS 11.0 统计学软件处理, 组间采用单因素方差分析, 所有数据用表示,  $P=0.05$  为差异有统计学意义,  $P<0.01$  为差异有高度统计学意义。

## 2 实验结果

### 2.1 天麻素对正常 HUVECs 的毒性

将不同质量浓度的天麻素与正常 HUVECs 细胞孵育 24 h 后, 发现天麻素对细胞生长无影响( $P>0.05$ ), 如图 1 所示. 图 1 中:  $n=6$ . 从图 1 可知: 10~100  $\mu g \cdot mL^{-1}$  质量浓度范围内, 天麻素对正常血管内皮细胞的生长无毒性效应。

### 2.2 天麻素对高葡萄糖浓度下 LDH 活性的影响

在高葡萄糖浓度刺激下, 天麻素对 LDH 活性的影响( $n=6$ ), 如图 2 所示. 图 2 中: “\*\*”表示与正常组比,  $P<0.01$ ; “#”, “##”分别表示与模型组比,  $P<0.05$ ,  $P<0.01$ 。

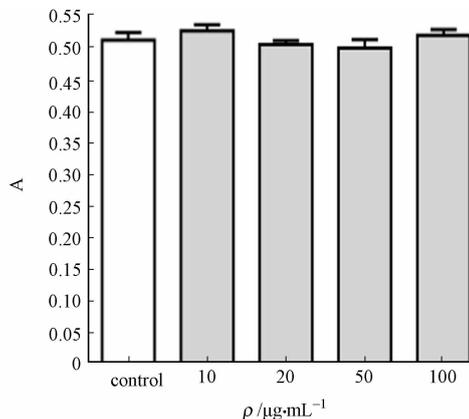


图 1 天麻素对 HUVECs 增殖活力的影响

Fig. 1 Effect of gastrodin on the viability of HUVECs

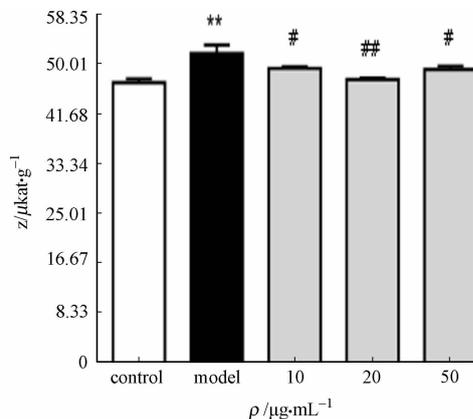


图 2 脐静脉内皮细胞中乳酸脱氢酶的活性

Fig. 2 Lactate dehydrogenase activity in HUVECs

从图2可知:模型组细胞培养上清中LDH的活性明显增强,表明HUVECs细胞膜完整性遭到破坏,胞浆酶发生外泄,HUVECs受到损伤.天麻素各浓度给药组均能降低HUVECs胞外LDH水平,LDH渗漏显著减少.说明天麻素对高浓度葡萄糖诱导的HUVECs损伤具有一定的保护作用.

### 2.3 天麻素对糖尿病小鼠体质量的影响

考察天麻素对糖尿病小鼠体质量( $m$ )的影响,结果如表1所示.从表1可知:随着实验天数的延长,正常组小鼠的体质量越来越大,而模型组小鼠体质量未见增加,其他给药组和模型组相似,小鼠体质量未见增加;实验第7d与第14d时,模型组、给药组与正常组小鼠体质量有明显差异.说明天麻素对糖尿病小鼠体质量改善不明显.

表1 天麻素对糖尿病小鼠体质量的影响( $n=8$ )  
Tab.1 Effect of gastrodin on body weight of diabetic mice ( $n=8$ )

组别	$m/g$ <sup>①</sup>		
	0 d	7 d	14 d
正常组	20.23±0.66	26.00±0.67	27.66±1.82
模型组	20.28±0.90	20.08±1.65**	20.26±1.83**
阳性对照组	21.31±1.61	21.28±1.88**	20.55±1.76**
高剂量天麻素组	20.44±1.17	19.72±1.75**	19.95±1.73**
中剂量天麻素组	19.25±1.39	19.02±2.20**	19.68±2.05**
低剂量天麻素组	21.74±3.75	23.22±4.68**	21.24±4.49**

① 上标“\*\*”表示与正常组比, $P<0.01$

### 2.4 天麻素对糖尿病小鼠体饮食和饮水量的影响

在不同实验时间,不同组别小鼠的饮食和饮水量情况( $n=8$ ),如图3,4所示.图3,4中:“\*\*”表示与正常组比, $P<0.01$ ;“#”,“##”分别表示与模型组比, $P<0.05$ , $P<0.01$ .

由图3,4可知:与正常组相比,小鼠诱导成糖尿病后,饮食量与饮水量明显增多,呈吃多、喝多现象,且随着实验的进行,模型组小鼠多饮多食现象未见减轻;而药物干预组小鼠,在实验开始,多饮多食现象明显,且随着药物作用时间的延长,小鼠的饮食、饮水量开始下降.说明天麻素对糖尿病小鼠的多食多饮现象有改善.

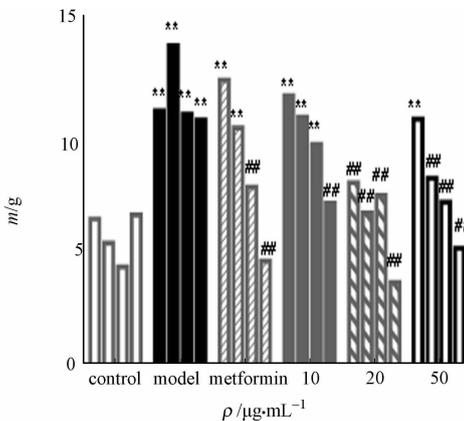


图3 不同组别小鼠的饮食情况  
Fig.3 Food intake of mice

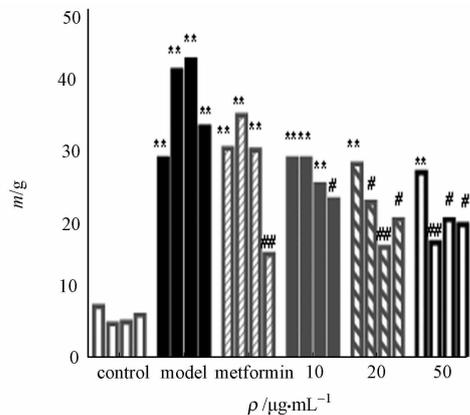


图4 不同组别小鼠的饮水情况  
Fig.4 Water intake of mice

### 2.5 天麻素对糖尿病小鼠血糖的影响

考察天麻素对糖尿病小鼠血糖浓度( $c$ (血糖))的影响,结果如表2所示.

由表2可知:造模后小鼠血糖值均明显升高,与正常组相比有显著差异,且模型组小鼠在实验过程中的血糖值一直保持上升水平,说明糖尿病模型小鼠造模成功;阳性对照组给予二甲双胍14d后,小鼠血糖值与模型组相比有显著下降.

由表2还可知:天麻素组在给药治疗7d后,小鼠血糖与模型组相比有下降趋势,且不同剂量的天麻素组间血糖值相差不大.在给药14d后,天麻素组小鼠血糖与模型组相比已经明显降低,其中高、中

剂量的天麻素显示出了较为显著的降血糖作用.

表 2 天麻素对糖尿病小鼠血糖的影响( $n=8$ )

Tab. 2 Effect of gastrodin on blood glucose of diabetic mice ( $n=8$ )

组别	$c(\text{血糖})/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}\text{①}$		
	0 d	7 d	14 d
正常组	$5.32 \pm 0.94$	$5.32 \pm 0.94$	$6.42 \pm 0.10$
模型组	$13.14 \pm 1.27^{**}$	$15.04 \pm 2.49^{**}$	$18.61 \pm 1.67^{**}$
阳性对照组	$13.35 \pm 2.79^{**}$	$15.66 \pm 3.85$	$12.79 \pm 3.48^{\#\#}$
天麻素(高剂量)	$12.43 \pm 3.34^{**}$	$13.56 \pm 3.08$	$12.82 \pm 2.24^{\#\#}$
天麻素(中剂量)	$12.67 \pm 3.36^{**}$	$14.53 \pm 2.39$	$15.23 \pm 2.70^{\#\#}$
天麻素(低剂量)	$12.88 \pm 2.05^{**}$	$14.20 \pm 4.49$	$16.63 \pm 3.60$

① 上标“\*\*”表示与正常组比,  $P < 0.01$ ; “#”, “##”表示与模型组比,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$

## 2.6 天麻素对糖尿病小鼠血脂的影响

考察天麻素对糖尿病小鼠血脂的影响, 结果如表 3 所示. 由表 3 可知: 模型组小鼠血清中总胆固醇(TC)和甘油三脂(TG)浓度显著高于正常组; 阳性对照组的 TC, TG 浓度与模型组相比没有明显差异, 表明二甲双胍降血脂作用可能不明显.

与模型组相比, 天麻素组的 TC 浓度都有明显降低, 其中低剂量的天麻素降低 TC 的作用最为显著. 与模型组相比, 高、低剂量的天麻素有降低小鼠血清中的 TG 浓度的趋势, 而中剂量天麻素则降 TG 浓度的作用显著. 说明天麻素对糖尿病小鼠血脂紊乱有一定改善.

表 3 天麻素对糖尿病小鼠血脂和抗氧化活性的影响 ( $n=8$ )

Tab. 3 Effect of gastrodin on blood lipid and antioxidant activity of diabetic mice ( $n=8$ )

组别	$c(\text{TC})/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}\text{①}$	$c(\text{TG})/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}\text{①}$	$\sigma(\text{SOD})/\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}\text{①}$	$c(\text{MDA})/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{①}$
正常组	$2.25 \pm 0.56$	$0.56 \pm 0.13$	$164.14 \pm 11.60$	$3.38 \pm 1.49$
模型组	$3.46 \pm 0.80^{**}$	$1.20 \pm 0.48^{**}$	$136.76 \pm 12.28^{**}$	$7.33 \pm 4.21^*$
阳性对照组	$3.27 \pm 0.63^{**}$	$1.13 \pm 0.50^{**}$	$153.58 \pm 17.76$	$3.50 \pm 1.15^{\#\#}$
高剂量天麻素组	$2.60 \pm 0.69^{\#\#}$	$1.12 \pm 0.62^{**}$	$171.54 \pm 27.87^{\#\#}$	$7.03 \pm 2.15$
中剂量天麻素组	$2.70 \pm 0.14^{\#\#}$	$0.76 \pm 0.28^{\#\#}$	$165.32 \pm 20.88^{\#\#}$	$3.14 \pm 1.36^{\#\#}$
低剂量天麻素组	$2.41 \pm 0.42^{\#\#}$	$1.08 \pm 0.35^{**}$	$142.44 \pm 30.29$	$3.44 \pm 0.12^{\#\#}$

① 上标“\*”, “\*\*”表示与正常组比,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ; “#”, “##”表示与模型组比,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$

## 2.7 天麻素对糖尿病小鼠抗氧化活性的影响

考察天麻素对糖尿病小鼠抗氧化活性的影响, 结果如表 3 所示. 由表 3 可知: 模型组小鼠血清中抗氧化酶 SOD 活性较正常组明显降低, 而 MDA 浓度显著升高. 说明糖尿病时小鼠的抗氧化能力下降, 氧化产物增多. 药物干预 14 d 后, 与模型组相比, 阳性对照组的 SOD 活性有增高趋势, MDA 浓度显著降低, 说明二甲双胍对糖尿病小鼠体内氧化应激有一定降低作用.

与模型组相比, 天麻素组的 SOD 活性有增高趋势, 高、中剂量比较明显. 小鼠血浆中 MDA 浓度趋于下降, 中、低剂量比较明显. 说明, 天麻素能提高糖尿病小鼠的抗氧化能力, 对 SOD 和 MDA 的影响中, 不同剂量天麻素质检存在差异, 无明显剂量依赖关系.

## 3 讨论

1963 年, Rakieta 等<sup>[7]</sup>首次报告 STZ 可诱发糖尿病, STZ 对动物的胰岛  $\beta$  细胞有选择性破坏作用, 能导致许多动物产生糖尿病, 利用不同剂量的 STZ 复制糖尿病模型的方法开始在国内外应用. 雄鼠对 STZ 比雌鼠敏感, 选用雄鼠制备模型的成模率明显高于雌鼠<sup>[8]</sup>. 因此, 本实验选择雄鼠建模. 用 STZ 诱导后, 小鼠的血糖增高显著, 并出现了多食、多引, 体质量减少的糖尿病症状. 糖尿病小鼠经天麻素治疗 14 d 后, 血糖明显下降, 说明, 天麻素能降低糖尿病小鼠的血糖.

糖尿病是以高血糖为主要特征的, 涉及糖类、脂类及蛋白质紊乱的代谢性疾病. 本实验显示, STZ 诱导的糖尿病小鼠血脂异常, 同时小鼠体内的氧化应激水平明显增高. 这些异常变化最终可导致糖尿病

综合症的发生,而威胁患者的生命.天麻素能明显降低血浆中总胆固醇和甘油三酯的浓度.说明,天麻素有调节血脂的作用.这和于滨等<sup>[9]</sup>报道天麻有显著降血脂作用一致.

近年来的研究表明,氧化应激是糖尿病损伤的重要因素<sup>[10]</sup>.本实验显示糖尿病小鼠体内氧化应激水平增高.天麻素显示出一定的抗氧化能力,能增强体内氧化酶的活性,降低脂质过氧化产物的浓度.

本实验室的研究表明,天麻素有显著的降血糖作用,能调节糖尿病时的脂代谢紊乱,并对高糖引起的氧化应激有一定抑制作用,这些结果为拓宽天麻素的临床应用提供了参考.

#### 参考文献:

- [1] 吴思凤. 浅谈天麻素药理作用及临床应用分析[J]. 中医临床研究, 2011, 3(22): 93.
- [2] 于颖, 樊光辉. 天麻素的临床应用研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2012, 10(9): 1117-1118.
- [3] DAI Ji-nan, ZONG Yi, ZHONG Lian-mei, et al. Gastrodin inhibits expression of inducible NO synthase, cyclooxygenase-2 and proinflammatory cytokines in cultured LPS-stimulated microglia via MAPK pathways[J]. PLoS One, 2011, 6(7): e21891.
- [4] SHU Chun-ming, CHEN Chang-gui, ZHANG Da-ping, et al. Gastrodin protects against cardiac hypertrophy and fibrosis[J]. Mol Cell Biochem, 2012, 359(1/2): 9-16.
- [5] ZHANG Qin, YANG Yun-mei, YU Guo-you. Effects of gastrodin injection on blood pressure and vasoactive substances in treatment of old patients with refractory hypertension: a randomized controlled trial[J]. Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao, 2008, 6(7): 695-699.
- [6] JAFFE E A, NACHMAN R L, BECKER C G, et al. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria[J]. J Clin Invest, 1973, 52(11): 2745-2756.
- [7] RAKIETEN N, RAKIETEN M L, NADKARNI M V. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917)[J]. Cancer Chemotherapy Reports, 1963, 29: 91-98.
- [8] MORDES J P, WILLY M S. Influence of age and sex on insensitivity to STZ diabetes[J]. Diabetes, 1980, 29(Suppl 2): 132.
- [9] 于滨, 左增艳, 蒋建东. 天麻细粉和天麻素降血脂作用的实验研究[J]. 中国医药生物技术, 2010, 5(6): 415-418.
- [10] 任艳, 郭晖. 氧化应激与糖尿病及其并发症的相关性[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2009, 12(12): 1975-1976.

## Research on Anti-Diabetic Efficacy of Gastrodin

HAN Lei, QIAO Ai-min, LIU Qing

(College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** The human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were separated and cultivated. The lactate dehydrogenase (LDH) activity in damaged HUVECs stimulated by high glucose was then determined. The anti-diabetic experiment in vivo was performed on streptozotocin (STZ)-induced diabetic mice, and the diabetic mice were treated with gastrodin (12.5, 25 and 50 mg · kg<sup>-1</sup>) for 14d. The results showed that the gastrodin could decrease the extracellular LDH activity of HUVECs and reduce the damage of endothelial cells under high glucose. Moreover, gastrodine could decrease the blood glucose of diabetes mice significantly, and the serum triglyceride (TG), the content of total cholesterol (TC), and the malondialdehyde (MDA) content were all decreased. It also improved the super oxide dismutase (SOD) activity in diabetic mice serum. Therefore, it can be concluded that the gastrodin has an obvious anti-diabetic effect in the STZ-induced diabetic mouse model.

**Keywords:** gastrodin; diabetes; blood glucose; blood lipid; antioxidant

(责任编辑: 陈志贤 英文审校: 刘源岗)