

已校对 钟艳梅

知母有效组分的安全性及其对 2 型糖尿病大鼠血糖血脂水平的影响

钟艳梅, 钟静君, 朱建成, 冯毅凡(广东药科大学中心实验室, 广东 广州 510006)

摘要: 目的 考察知母有效组分(总皂苷:多糖=1:1)的安全性及其对 2 型糖尿病大鼠血糖血脂的影响。方法 采用急性毒性实验及一般药理学实验, 考察知母有效组分的安全性, 并通过干预 2 型糖尿病大鼠(T2DM)大鼠模型, 考察对知母有效组分的对其血糖血脂的影响。结果 急性毒性实验小鼠无明显染毒反应, 药物组小鼠体质量增加, 饮水量正常, 排泄物未见异常, 反应灵活, 未见显著的器官病变, 知母有效组分的经口给药最大耐受剂量为 $35 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 对中枢神经, 循环及呼吸系统无显著作用, 知母有效组分高剂量组能显著降低 T2DM 大鼠模型血糖, 改善胰岛素抵抗及血脂紊乱。结论 知母有效组分安全性好, 具有显著的降低 2 型糖尿病大鼠的空腹血糖(FBG), 糖耐量水平及胰岛素水平(FINS), 改善胰岛素抵抗及其血脂紊乱的作用。

关键词: 知母有效组分; 急性毒性实验; 一般药理学实验; 药效学

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2017)05-

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2017.05.0

Study on Safety Evaluation and Pharmacodynamics of Total Effective Components Isolated from Rhizoma *Anemarrhenae*
Zhong Yanmei, Zhong Jingjun, Zhu Jiancheng, Feng Yifan

(Guangdong Pharmaceutical University, Central Laboratory, Guangdong Guangzhou 510006)

Abstract: Objectives: To study the safety of total effective components isolated from Rhizoma *Anemarrhenae* (Total saponins: Total polysaccharides=1: 1) and its pharmacodynamics of antidiabetes. Methods: The safety of total effective components of Rhizoma *Anemarrhenae* was investigated by acute toxicity test and general pharmacological experiment. The effects of total effective components on the antidiabetic and hyperlipidemia were investigated by interfering with the experimental T2DM rats. Results: The the maximum oral administration tolerated dose of total effective components of Rhizoma *Anemarrhenae* was $35 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, and it had no significant influence on central nervous, circulatory and respiratory system. High dose of the total effective components of the Rhizoma *Anemarrhenae* can significantly reduce blood glucose in T2DM rats, improve insulin resistance and dyslipidemia.

Keyword: Rhizoma *Anemarrhenae*, Total Effective Components, Acute Toxicology Test, General Pharmacology Experiment, Pharmacodynamics

中药知母为百合科植物知母(*Anemarrhena asphodeloides* Bunge)的干燥根茎, 味苦, 性寒, 归肺、胃、肾经, 具有清热泻火、滋阴润燥等功效, 主治温热病, 高热烦渴, 消渴等症, 是常用的苦寒清热药, 有悠久的降血糖应用历史^[1]。数十年来, 国内外学者已对知母的化学成分进行了广泛深入的研

究, 发现知母中富含甾体皂苷类、黄酮类、木脂素类、多糖类、微量元素等^[2], 现代药理学研究表明, 知母具有改善阿尔兹海默症^[3-4], 抗炎^[5-6]、抗糖尿病^[7]、抗癌^[8]等作用。知母皂苷、知母多糖为其主要成分, 具有降血糖、降低转氨酶等多种药理活性, 可用于治疗非胰岛素依赖型糖尿病; 同时对白内障、

收稿日期: 2017-05-20

作者简介: 钟艳梅, 女, 助理研究员, 研究方向: 液质仪器分析及中医药代谢性疾病防治。Email: zhongyanmei33@163.com。通信作者: 冯毅凡, 男, 教授, 研究方向: 现代仪器分析技术在药物分析中的应用。Email: tfengyf@126.com。

基金项目: 广东省重大科技专项(2013A022100040); 国家自然科学基金面上项目(21275036), 广东省普通高校青年创新人才项目, 广东药科大学“创新强校工程”项目(2016KQNCX082)。

高血脂等糖尿病并发症有防治作用^[9-12]。

本课题组前期采用知母醇提浸膏进行了初步的干预2型糖尿病大鼠实验,结果表明,知母醇提浸膏能够显著的降低2型糖尿病大鼠的空腹血糖(FBG),糖耐量水平^[13];前期研究确立了知母中主要成分知母总皂苷及知母多糖的纯化提取工艺^[14],为了进一步开发知母有效组分作为天然的中药降糖新制剂或保健品,本课题组对知母有效成分(知母总皂苷:知母多糖=1:1)的安全性进行了初步实验研究,并采用知母有效组分干预实验性T2DM大鼠模型,考察其对2型糖尿病大鼠的空腹血糖,糖耐量水平,胰岛素分泌水平,改善高血脂症状的作用,以期为知母作为降糖新药的开发提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂 知母有效组分(根据实验室前期建立的提取方法^[9],委托广州博济医药生物技术股份有限公司制备,知母总皂苷:知母总多糖=1:1),罗格列酮片(太极集团重庆涪陵制药有限公司,批号:H20041399),链脲佐菌素(STZ,美国Sigma公司,批号:S0130-1),果糖(广州市左克生物科技发展有限公司,批号:T0014),甘油三酯测试盒(批号:16F001-2)、总胆固醇测试盒(批号:16F002-2)、低密度脂蛋白胆固醇测试盒(批号:16F004-2)、高密度脂蛋白胆固醇测试盒(批号:16F003-2)、胰岛素ELISA检测试剂盒(批号:H203-48T),均购自南京建成生物工程研究所,肝素钠(中国食品药品检定研究院,批号:140787),柠檬酸、柠檬酸钠(分析纯,国药集团化学试剂有限公司),戊巴比妥钠、无水葡萄糖(分析纯,上海沪试实验室器材股份有限公司)。高糖高脂饲料委托广东省医学实验动物中心制作(配方为:每1000克含猪油100g;蔗糖200g;蛋黄100g;胆固醇10g;胆酸钠5g;标准大鼠饲料585g,经钴60辐射灭菌)。

1.2 主要试剂配制 0.1 mol·L⁻¹柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液:A液:称取2.1g柠檬酸置于100 mL容量瓶中,加入蒸馏水溶解并定容至刻度;B液:称取2.94g柠檬酸钠置于100 mL容量瓶中,加入蒸馏水溶解,定容至刻度。临用前将A液与B液等量混合,用pH计调节pH=4.4,用0.22 μm微孔滤膜过滤,即得。链脲佐菌素(STZ)溶液:分装链脲佐菌素到10 mL离心管中,临用前以配制的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液溶解,配成1%的链脲佐菌素溶液。肝素钠溶液:精密称定0.06671g肝素钠(150 U·mg⁻¹)于10 mL容

量瓶中,用生理盐水溶解并定容,配成1000.65 U·mL⁻¹的肝素钠溶液。2%果糖溶液:称取10g果糖,溶于500 mL蒸馏水中,摇匀即得。0.4 g·mL⁻¹葡萄糖溶液:精密称定100.0251g无水葡萄糖于250 mL容量瓶中,加水溶解,定容,摇匀,配成0.4 g·mL⁻¹的葡萄糖溶液。1%戊巴比妥钠溶液:精密称定0.10063g戊巴比妥钠于10 mL容量瓶中,用生理盐水溶解,定容,配置成1%的戊巴比妥钠溶液。罗格列酮溶液:取12片罗格列酮片(4 mg/片)置于研钵中研成粉末状,加入纯水配制成0.96 mg·mL⁻¹药液。

1.3 仪器与设备 AUWD220电子天平(日本岛津公司),FRESCO17低温高速离心机(Thermo Fisher Scientific公司),DL-360A超声波清洗器(上海之信仪器有限公司),7080型全自动生化分析仪(日本日立集团),三诺安稳免调码血糖仪(三诺生物传感股份有限公司),MD3000生物信号采集系统(安徽正华生物仪器设备有限公司)。

1.4 动物 SD大鼠40只,SPF级,雌雄各半,体重(200±20)g;昆明种小鼠80只,雌雄各半,体重(20±4)g。SD大鼠74只,SPF级,雄性,体重(180±20)g,6~8周龄。均购自广东省医学动物中心,动物合格证号:SCXK(粤)2013-0002。所有动物均饲养于广东药科大学实验动物中心,分笼饲养,每笼5~6只,饲养温度恒定于(20±5)℃,湿度(55±5)%,12 h明暗循环。

1.5 急性毒性实验 将20只昆明种小鼠随机分为空白组,知母有效组分(给药剂量分别为2.5,5,10,20 g·kg⁻¹),每组4只,雌雄各半,用苦味酸标记。禁食不禁水12 h后,分别按照相应剂量灌胃给药,灌胃后,连续1周观察各组小鼠行为,摄食,排便情况,7 d后,对小鼠进行大体解剖,观察脏器异常病变情况。观察小鼠是否出现染毒反应或死亡^[15-18]。

最大耐受量实验:将实验小鼠随机分为药物组与空白组,每组20只,雌雄各半。禁食不禁水12 h后,药物组按35 g·kg⁻¹体重灌胃知母有效组分溶液^[14-17],空白组灌胃等量的蒸馏水作对照。给药后连续观察2周小鼠皮肤黏膜,精神行为,呼吸幅度,排便状况,鼻周与眼周分泌物及是否出现死亡等,并记录给药前后小鼠的体重变化情况。

1.6 一般药理学实验方法

1.6.1 小鼠自发活动实验-上肢抬举实验^[19] 将40只

实验小鼠随机分为知母有效组分低、中、高剂量组与空白组, 每组 10 只, 雌雄各半。知母有效组分各剂量组分别按照 400, 800 和 1600 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃给药, 空白组灌胃等量的蒸馏水。应用小鼠自发活动实验方法, 将小鼠单独放入活动箱中, 适应 5 min 后, 记录给药前 2 min 内小鼠上肢向上抬举次数, 随后按剂量灌胃。观察给药后小鼠的运动, 步态, 肌束震颤等变化, 并采用给药前后平行对照法, 测定给药后 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 h 小鼠的上肢向上抬举次数。

1.6.2 大鼠呼吸频率、动脉插管实验 将 SD 大鼠, 随机分为知母有效组分低、中、高剂量组及空白组, 每组 10 只, 雌雄各半。知母有效组分低、中、高剂量组分别灌胃 200, 400 和 800 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 药液, 空白组灌胃等量的蒸馏水。按 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 一次性给予 1% 戊巴比妥钠腹腔麻醉大鼠, 将麻醉大鼠仰卧固定于大鼠固定板上, 在其四肢接心电图肢导联接头; 并于剑突处接张力换能器。同时, 游离左颈总动脉, 实行动脉插管并接上压力换能器。心电图导联接头和各换能器接头与 MD3000 生物信号采集系统连接, 以收集各组大鼠给药前、后 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 h 的呼吸频率, 心电图, 收缩压, 舒张压和心率等信号。

1.7 知母有效组分干预 2 型糖尿病大鼠的方法

1.7.1 实验性 T2DM 大鼠模型的建立 采用高糖高脂饮食联合小剂量 STZ 法诱导实验性 T2DM 大鼠模型, 具体方法如下: 高脂饲料喂养后的第 42 天禁食不禁水 12 h, 于第 43 天称量各实验鼠空腹体质量, 按 40 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 一次性给予造模组大鼠腹腔注射 1% 的链脲佐菌素溶液, 正常组腹腔注射等量的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液作对照。药后第 7 天禁食不禁水 12 h 后, 尾静脉取血测量空腹血糖(FBG), 并进行口服糖耐量试验 (OGTT), 以 $\text{FBG} > 7.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (126 $\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$) 且 OGTT 2h 血糖 $> 11.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为成模指标^[17]。

1.7.2 知母有效组分干预 T2DM 大鼠 将成模大鼠随机分为模型组 (DM 组, 9 只); 罗格列酮组 (Rog 组, 9 只); 知母有效组分高剂量组 (H 组, 11 只), 知母有效组分中剂量组 (M 组, 10 只), 知母有效组分低剂量组 (L 组, 10 只)。DM 组与正常组以 0.8 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 蒸馏水灌胃, Rog 组作为阳性对照组, 每天以 5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃罗格列酮混悬液; L、M 与 H 组分别以 100, 200, 400 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的知母有效组分灌胃, 每天 1 次, 连续给药 4 周。第 4 周末给药后, 禁食不禁水 12 h, 测量各实验组大鼠的 FBG。随后按 2 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体

质量灌胃 0.4 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的葡萄糖溶液进行 OGTT, 以测试各实验组大鼠的葡萄糖耐量。

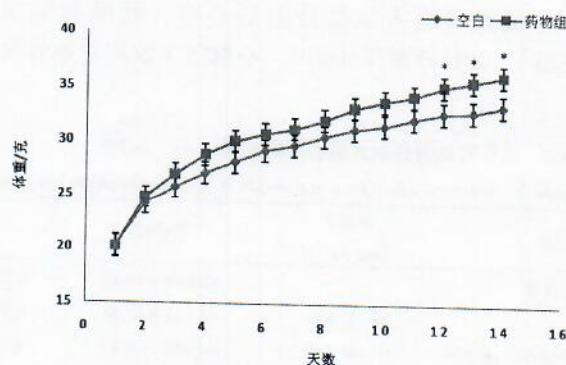
对各实验组大鼠进行眼眶取血, 离心分离血浆, 以测试给药后各组大鼠的空腹胰岛素水平 (FINS), 总胆固醇 (T-CHO), 甘油三酯 (TG), 高密度脂蛋白 (HDL-C) 和低密度脂蛋白 (LDL-C) 水平, 并根据各实验鼠的 FBG 与 FINS 计算其胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR)^[21]。

$$\text{HOMA-IR} = [\text{FINS} \times \text{FBG}] / 22.5$$

1.7 统计学处理方法 数据以 “ $\bar{x} \pm s$ ” 表示, 通过 SPSS22.0 统计学软件对各组实验动物给药前后同一时间点数据进行单因素方差分析。对满足方差齐性数据进行 LSD 检验, 检测组间差异; 方差不齐数据采用两独立样本的非参数检验。

2 结果

2.1 急性毒性实验 与空白组比较, 给药后 7 d~14 d, 所有不同剂量的知母有效组分干预组小鼠均摄食与饮水正常, 毛色干净, 呼吸规律, 反应敏捷, 活动情况良好, 眼周与鼻周无异常分泌物, 大小便正常。最大耐受量实验显示, 经 35 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 知母有效组分灌胃给药 7 d~14 d 后, 药物组小鼠毛色洁净, 活动与饮食正常, 大小便未见异常, 药物组小鼠体质量增加, 对实验小鼠大体解剖后, 未见显著的器官病变, 无明显染毒反应。见图 1。



注: 与正常组比较, * $P < 0.05$ 。

图 1 空白对照组与药物组小鼠体质量变化图 ($\bar{x} \pm s$, $n=20$)

Figure 1 Body weight changes of mice in blank control group and administered group

2.2 一般药理学实验

2.2.1 对小鼠自主活动的影响 知母有效组分对小鼠自发活动的作用见表 1 及图 2, 对比空白组, 知母有效组分中低剂量组小鼠没有出现自发活动减少, 震

颤, 流涎和大小便异常等情况, 对小鼠的自发活动无显著影响($P>0.05$), 组间比较无统计学意义($P>0.05$), 高剂量组小鼠在药后 1h 内, 部分小鼠出现俯卧, 梳理毛发减少等情况, 小鼠自发活动减少($P<0.05$), 但在 2h 后, 自发活动正常。可能是由于知母高剂量组溶液较粘稠灌胃后短时间造成小鼠的不适所致。

表1 知母有效组分对小鼠每 2 min 自发活动次数的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 1 Effect of active components of Anemarrhena on spontaneous activity in mice

组别	剂量 / ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	给药前	抬前脚次数			
			0.5 h	1 h	2 h	3 h
正常组	-	34.3 $\pm$ 7.41	29.4 $\pm$ 12.35	27.7 $\pm$ 6.86	24.2 $\pm$ 5.81	24.1 $\pm$ 6.35
	低 -L 200	32.2 $\pm$ 5.88	28.4 $\pm$ 8.96	27.1 $\pm$ 6.26	25.7 $\pm$ 5.81	25.9 $\pm$ 5.36
知母有效组分	中 -M 400	30.8 $\pm$ 8.35	27.9 $\pm$ 4.65	25.7 $\pm$ 5.10	25.3 $\pm$ 2.54	22.7 $\pm$ 5.74
	高 -H 800	29.4 $\pm$ 6.97	20.5 $\pm$ 4.74*	21.4 $\pm$ 8.30*	22.1 $\pm$ 4.01	20.8 $\pm$ 4.44

注: 与空白组比较, * $P<0.05$ 。

2.2.2 对大鼠呼吸系统的影响 给予大鼠知母有效组分前后, 各剂量药物组对大鼠呼吸频率的作用情况显示, 在实验剂量范围内, 各组实验大鼠的呼吸频率在给药前后平行对照或与正常组大鼠的组间比较, 均未见明显改变, 差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

2.2.3 对大鼠心血管系统的影响 知母有效组分高、中、低剂量组大鼠给药前后心率, 动脉收缩压(SBP), 动脉舒张压(DBP), 心电图 T 波均无显著改

表3 知母有效组分对大鼠心率的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

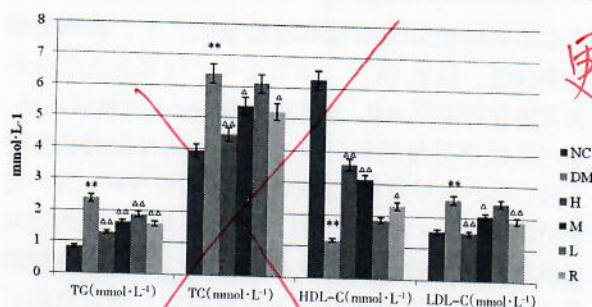
Table 3 Effect of effective components of Anemarrhena on heart rate in rats

组别	剂量 / ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	给药前	心率 / 次 $\cdot\text{min}^{-1}$			
			0.5 h	1 h	2 h	3 h
正常组	-	424.84 $\pm$ 14.40	422.03 $\pm$ 13.29	424.33 $\pm$ 13.48	423.55 $\pm$ 21.23	418.45 $\pm$ 28.39
	低 -L 200	433.12 $\pm$ 13.88	427.77 $\pm$ 18.24	435.79 $\pm$ 14.46	438.10 $\pm$ 11.97	425.47 $\pm$ 14.23
知母有效组分	中 -M 400	423.61 $\pm$ 28.48	420.06 $\pm$ 26.54	422.08 $\pm$ 24.90	427.09 $\pm$ 23.02	412.91 $\pm$ 27.61
	高 -H 800	420.84 $\pm$ 21.05	429.05 $\pm$ 25.80	435.82 $\pm$ 21.34	426.49 $\pm$ 22.99	428.16 $\pm$ 24.55

表4 知母有效组分对大鼠动脉收缩压 SBP 及舒张压 DBP 的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$, mmHg)

Table 4 Effect of effective components of Anemarrhena on arterial systolic and diastolic pressure in rats

组别	剂量 / ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	给药前	收缩压 SBP				给药前	舒张压 DBP			
			0.5 h	1 h	2 h	3 h		0.5 h	1 h	2 h	3 h
正常组	-	121.97 $\pm$ 8.54	118.66 $\pm$ 8.19	120.40 $\pm$ 7.86	118.24 $\pm$ 8.23	118.23 $\pm$ 9.32	87.79 $\pm$ 4.36	85.89 $\pm$ 3.88	83.32 $\pm$ 5.39	84.30 $\pm$ 5.35	82.06 $\pm$ 3.33
	低 -L 200	125.37 $\pm$ 6.83	120.35 $\pm$ 10.10	120.22 $\pm$ 8.64	119.81 $\pm$ 10.64	118.54 $\pm$ 7.95	86.10 $\pm$ 4.45	86.11 $\pm$ 1.67	81.45 $\pm$ 4.80	82.27 $\pm$ 2.68	83.46 $\pm$ 3.62
知母有效组分	中 -M 400	120.99 $\pm$ 7.99	118.05 $\pm$ 8.90	116.56 $\pm$ 6.42	113.73 $\pm$ 7.79	111.43 $\pm$ 5.50	87.39 $\pm$ 4.57	85.43 $\pm$ 4.29	84.05 $\pm$ 5.18	82.41 $\pm$ 4.78	79.89 $\pm$ 5.06
	高 -H 800	127.28 $\pm$ 8.49	124.05 $\pm$ 8.90	119.87 $\pm$ 7.35	118.90 $\pm$ 7.78	115.46 $\pm$ 8.37	88.92 $\pm$ 5.17	87.25 $\pm$ 5.38	84.94 $\pm$ 5.48	83.23 $\pm$ 5.58	82.08 $\pm$ 5.53



注: FINS: 空腹胰岛素; NC: 正常组; DM: 模型组; H、M、L: 知母有效组分高、中、低剂量组; R: 罗格列酮组

注: 与正常组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与模型组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

图2 给药干预后, 各组大鼠的 FINS 水平及 HOMA-IR 比较

Figure 2 The FINS levels and HOMA-IR of the rats in each test group after administration

表2 知母有效组分对大鼠每分钟呼吸次数的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 2 Effect of active components of Anemarrhena on respiratory rate in rats

组别	剂量 / ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	给药前	呼吸次数			
			0.5 h	1 h	2 h	3 h
正常组	-	83.87 $\pm$ 2.20	85.38 $\pm$ 2.25	86.28 $\pm$ 2.31	84.78 $\pm$ 3.06	86.09 $\pm$ 3.10
	低 -L 200	82.71 $\pm$ 3.38	84.50 $\pm$ 3.49	83.87 $\pm$ 3.35	83.92 $\pm$ 3.53	85.00 $\pm$ 3.73
知母有效组分	中 -M 400	84.19 $\pm$ 2.84	84.43 $\pm$ 2.92	85.34 $\pm$ 2.69	87.01 $\pm$ 1.48	86.80 $\pm$ 4.38
	高 -H 800	84.36 $\pm$ 2.85	85.39 $\pm$ 3.28	86.21 $\pm$ 3.28	87.51 $\pm$ 3.94	86.90 $\pm$ 4.37

变, 与正常组比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。说明知母有效组分对麻醉大鼠的心血管系统无明显的毒性影响。结果见表 3-5。

表 5 知母有效组分对大鼠心电图 T 波的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$, uv)

Table 5 Effect of effective components of Anemarrhena on ECG T wave in rats

组别	剂量 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	给药前	T 波			
			0.5 h	1 h	2 h	3 h
正常组		159.81 $\pm$ 6.83	159.76 $\pm$ 13.45	154.28 $\pm$ 12.84	155.85 $\pm$ 10.39	157.58 $\pm$ 6.57
低-L 200		154.91 $\pm$ 7.84	152.68 $\pm$ 5.27	153.16 $\pm$ 9.70	157.01 $\pm$ 6.01	154.60 $\pm$ 6.25
知母有效组分						
中-M 400		155.06 $\pm$ 7.81	154.12 $\pm$ 12.37	148.12 $\pm$ 10.61	150.74 $\pm$ 10.14	153.62 $\pm$ 8.43
高-H 800		159.06 $\pm$ 4.97	160.88 $\pm$ 6.23	156.42 $\pm$ 5.78	157.66 $\pm$ 6.39	159.27 $\pm$ 4.70

2.3 知母有效组分干预 2 型糖尿病大鼠实验结果

本次实验以注射 STZ 1 周后, 根据大鼠 FBG $> 7.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($126 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$) 且 OGTT 2 h 后血糖 $> 11.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为成模标准, T2DM 大鼠模型的成模率为 79.03 %。

2.3.1 口服葡萄糖耐量测试 各组实验大鼠 0 h, 0.5 h, 1 h 和 2 h 的血糖值均明显升高。与正常组比较, 模型组在不同时间的葡萄糖耐量均明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 知母有效组分高、中、低剂量组普通糖耐量均有降低, 其中, 知母有效组分高剂量组降低明显, 与模型组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 知母有效组分中剂量组葡萄糖耐量在 1 h 和 2 h 有降低, 与模型组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 知母有效组分低剂量组葡萄糖耐量随有降低, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 说明知母有效组分干预的 T2DM 模型大鼠的空腹血糖及糖耐量有所改善, 见表 6。

表 6 给药后各试验组大鼠的口服葡萄糖耐量比较 ($\bar{x} \pm s$, $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)
Table 6 Oral glucose tolerance of rats in each test-group after administration

组别	剂量 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	葡萄糖耐量 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)			
		0 h (FBG)	0.5 h	1 h	2 h
模型组	-	17.16 $\pm$ 2.22**	24.64 $\pm$ 1.95**	22.54 $\pm$ 1.15**	19.71 $\pm$ 1.91**
正常组	-	4.38 $\pm$ 0.28	7.83 $\pm$ 0.89	7.51 $\pm$ 0.92	5.53 $\pm$ 0.42
知母有效组分高剂量组	400	13.26 $\pm$ 1.45 $\Delta\Delta$	20.59 $\pm$ 3.39 $\Delta\Delta$	17.92 $\pm$ 2.04 $\Delta\Delta$	15.38 $\pm$ 1.62 $\Delta\Delta$
知母有效组分中剂量组	200	15.22 $\pm$ 1.54	22.5 $\pm$ 2.77	19.89 $\pm$ 2.43 $\Delta\Delta$	16.96 $\pm$ 1.92 $\Delta\Delta$
知母有效组分低剂量组	100	17.85 $\pm$ 2.94	23.18 $\pm$ 4.08	21.44 $\pm$ 4.03	18.13 $\pm$ 2.28
罗格列酮组	5	14.61 $\pm$ 1.55 $\Delta\Delta$	22.01 $\pm$ 3.71	19.26 $\pm$ 2.69 $\Delta\Delta$	15.52 $\pm$ 2.29 $\Delta\Delta$

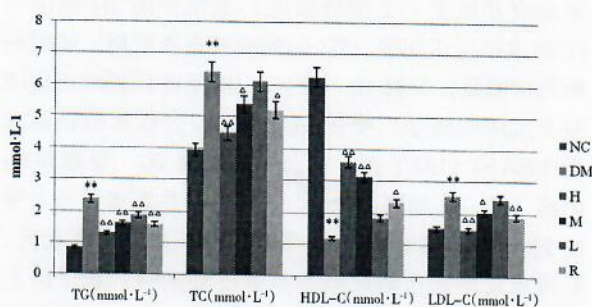
注: 与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

2.3.2 给药后各组大鼠空腹胰岛素水平 (FINS) 及 HOMA-IR

由图 3 可见, T2DM 大鼠模型 FINS 显著增加, 与正常组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 表明

T2DM 大鼠呈现高胰岛素分泌症状, 出现胰岛素抵抗, 在药物干预后, 各组 T2DM 大鼠的 FINS 水平出现不同程度的下降, 知母有效组分各剂量组均有显著性降低, 与模型组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 说明知母有效组分能显著减少 T2DM 大鼠 FINS。HOMA-IR 指数结果显示, 与模型组比较, 知母有效组分不同剂量组均显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 表明知母有效组分能够显著改善 T2DM 大鼠的胰岛素抵抗。

2.3.3 血脂指标的测定



注: TG: 甘油三酯; TC: 总胆固醇; HDL-C: 高密度脂蛋白; LDL-C: 低密度脂蛋白; NC: 正常组; DM: 模型组; H、M、L: 知母有效组分高、中、低剂量组; R: 罗格列酮组

图 3 给药后各实验组大鼠的血脂指标

Figure 3 The blood lipid indexes of rats in each group after administration

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

各组大鼠的血脂指标如图 3 所示, T2DM 模型大鼠的 TC, TG 及 LDL-C 水平显著增加, 而 HDL-C 则显著降低, 与模型组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 表明 T2DM 大鼠出现血症紊乱症状。与模型组比较, 知母有效组分高、中、低剂量组的 TG 显著下降 ($P < 0.01$), 知母有效组分高、中剂量组的 HDL-C 显著增加 ($P < 0.01$), 能有效降低糖尿病鼠血浆中 TC 和 LDL-C 水平, 改善了 T2DM 大鼠的血脂紊乱。

3 讨论

本次实验首次较为系统地采用急性毒性及一般药理结果对知母有效组分 (知母总皂苷: 知母总多糖 = 1: 1) 进行了初步的用药安全性考察。实验结果表明该有效组分对实验小鼠、大鼠无明显的毒副作用, 初步证明了该知母有效组分的安全性良好, 可进一步用于临床开发研究。

知母长期以来是中医药治疗糖尿病的临床常用

中药, 目前对知母的研究多以复方或药对如知母黄柏最为常见, 本次实验主要对于知母有效组分(知母总皂苷: 知母总多糖=1:1)干预 T2DM 大鼠的血脂血脂的共同影响进行了考察, 实验结果表明该有效组分不仅能有效降低 T2DM 大鼠的 FBG、FINS 水平, 改善 T2DM 大鼠的葡萄糖耐量、高胰岛素血症及胰岛素抵抗, 而且同时能够降低 T2DM 的 TG, T-CHO 和 LDL-C, 并提高血浆中 HDL-C 水平, 改善其血脂紊乱。

有研究表明²²血脂紊乱与胰岛素抵抗(IR)互为因果造成并加重了 2 型糖尿病, 血浆中的 TG 浓度与 FINS 水平呈正相关。TG 与葡萄糖竞争利用, 使葡萄糖利用障碍, 导致 IR。随后, IR 促进肝脏游离脂肪酸合成酶的转录, 增加 TG、VLDL 合成的原料游离脂肪酸(FFA)的生成, 从而产生大量 TG, 导致高 TG 血症, 进一步加剧 IR²³⁻²⁴。同时高胰岛素水平及大量的 FFA 也使得 HDL 合成受阻。从而加重血脂紊乱, 形成负反馈加重糖尿病及其并发症病情。基于以上理论, 高血糖, 血脂紊乱及胰岛素抵抗是一系列重大代谢疾病(糖尿病, 冠心病, 三高疾病等)的关键致病危险因素, 知母有效组分发挥了中药安全低毒有效多靶点的优势, 具有较好的调节血糖血脂作用, 而且可能通过这些作用预防和治疗其他多种重大代谢疾病及其综合征, 这将为知母应用于其他代谢病的防治提供了思路及理论依据。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [2] 刘卓, 隋海娟, 闫恩志, 等. 知母皂苷对脂多糖引起巨噬细胞分泌 TNF- α 和 NO 的影响及机制[J]. 中药药理与临床, 2013, 29(1): 65-67.
- [3] Zhao X, Liu C, Qi Y, et al. Timosaponin B-II ameliorates scopolamine-induced cognition deficits by attenuating acetylcholinesterase activity and brain oxidative damage in mice [J]. Metab Brain Dis, 2016, 31(6): 1455-1461.
- [4] Liu Y W, Zhu X, Lu Q, et al. Total saponins from Rhizoma Anemarrhenae ameliorate diabetes-associated cognitive decline in rats: involvement of amyloid- β decrease in brain [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 139(1): 194-200.
- [5] Lei X, Dong W T, Bi X Y, et al. [Therapeutic Material Basis of Chemical Subdivisions of Anemarrhenae Rhizoma on Anti-inflammatory and Immunomodulatory Effects][J]. Zhong Yao Cai, 2015, 38(9): 1904-7.
- [6] Kim J Y, Shin J S, Ryu J H, et al. Anti-inflammatory effect of anemarsaponin B isolated from the rhizomes of Anemarrhena asphodeloides in LPS-induced RAW 264.7 macrophages is mediated by negative regulation of the nuclear factor- κ B and p38 pathways[J]. Food Chem Toxicol, 2009, 47(7): 1610-7.
- [7] Han J, Yang N, Zhang F, et al. Rhizoma Anemarrhenae extract ameliorates hyperglycemia and insulin resistance via activation of AMP-activated protein kinase in diabetic rodents[J]. J Ethnopharmacol, 2015, 172: 368-76.
- [8] Nho K J, Chun J M, Kim H K. Induction of mitochondria-dependent apoptosis in HepG2 human hepatocellular carcinoma cells by timosaponin A-III [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2016, 45: 295-301.
- [9] 吴妍. 知母提取物的提取及制剂工艺研究[D]. 广东药学院, 2008.
- [10] 刘卓, 隋海娟, 闫恩志, 等. 知母皂苷对脂多糖引起巨噬细胞分泌 TNF- α 和 NO 的影响及机制[J]. 中药药理与临床, 2013, 29(1): 65-67.
- [11] 刘卓, 金英, 刘婉珠, 等. 知母皂苷对脂多糖引起的大鼠学习记忆障碍和炎症反应的影响[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(10): 1362-1366.
- [12] 李春梅, 高永林, 李敏, 等. 知母皂苷对小鼠血糖的影响[J]. 中药药理与临床, 2005, 21(4): 22-23.
- [13] 钟艳梅, 冯毅凡. 知母醇提物药效学研究[J]. 亚太传统医药, 2016, 12(6): 16-17.
- [14] 孟青, 吴妍, 梁汉明, 等. 知母降糖有效部位的质量控制方法研究[J]. 广东药学院学报, 2015, 31(4): 450-453.
- [15] 李永明. 丹参多糖的急性和亚急性毒性试验研究[J]. 药学研究, 2016, (01): 16-18+36.
- [16] 何茉莉, 闫姝, 张小波, 等. 苍耳子小鼠最大耐受量实验观察[J]. 中国中西医结合外科杂志, 1998, (02): 46-47.
- [17] Mowla A, Alauddin M, Rahman M A, et al. Antihyperglycemic effect of Trigonella foenum-graecum (fenugreek) seed extract in alloxan-induced diabetic rats and its use in diabetes mellitus: a brief qualitative phytochemical and acute toxicity test on the extract[J]. Afr J Tradit Complement Altern Med, 2009, 6(3): 255-61.
- [18] Kamdem Boniface P, Singh M, Kumar Maurya A, et al. Acute and sub-chronic toxicity of HPLC fingerprinted extract of Conyza sumatrensis (Retz.) E.H. Walker in rodents [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 149(3): 833-7.
- [19] 朱彬, 李凤新, 郜欣, 等. 虎杖总蒽醌提取物一般药理学实验研究[J]. 东北师大学报(自然科学版), 2009, (2): 160-163.
- [20] 陈锡峰, 杨俊卿, 周岐新. 姜黄提取物一般药理作用实验研究[J]. 医学临床研究, 2004, (10): 1206-1208.
- [21] 张玉军, 钟正贤, 陈敬民, 等. 一点红提取物的一般药理作用观察[J]. 中成药, 2011, (7): 1238-1241.
- [22] 李东环, 王国姿, 刘松, 等. 应用 HOMA- β 与 HOMA-IR 评价芩连降糖方对 2 型糖尿病胰岛 β 细胞功能的影响, 四川中医, 2016, 34(4): 55-57.
- [23] 陆泽元, 林峰昊, 邵豪, 等. 血脂紊乱类型与胰岛素抵抗的关系[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2004, (5): 66-68.
- [24] 朱姿英, 薛耀明. 高甘油三酯血症和 2 型糖尿病[J]. 中国糖尿病杂志, 2003, (2): 81-82.
- [25] 杨曦, 刘红. 胰岛素抵抗、血脂异常与氧化应激[J]. 实用医学杂志, 2007, (15): 2440-2442.

(编辑: 宋威)

宋老师：您好

以下我的文章校对修改的地方，麻烦您更改下。

(1) 图 2 更换为：

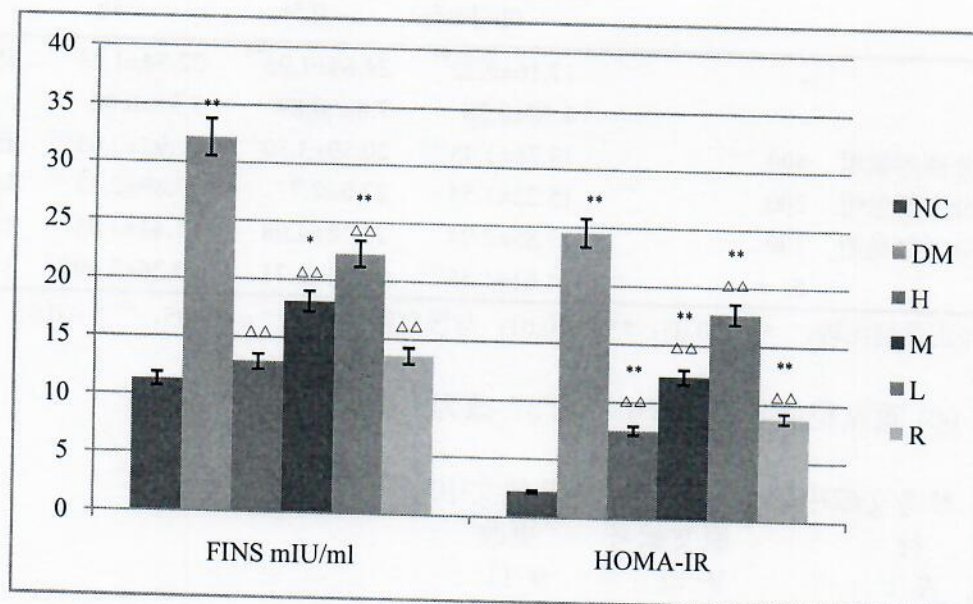


图 2 给药干预后，各组大鼠的 FINS 水平及 HOMA-IR 比较； Fig 2 The FINS levels and HOMA-IR of the rats in each test group after administration

(注：与正常组比较，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ；与模型组比较， $\Delta p < 0.05$ ， $\Delta\Delta p < 0.01$ 。FINS：空腹胰岛素，NC：正常组；DM：模型组；H、M、L：知母有效组分高、中、低剂量组；R：罗格列酮组)

(2) 原校对稿 599 页右栏倒数第二行“2.2.1.....”项下，“表 1 及图 2”删去“及图 2”

(3) 原校对稿中表 6 更改，加入红字标示的内容

表 6 给药后各试验组大鼠的空腹血糖 (FBG) 和口服葡萄糖耐量 (OGTT) 比较 ($\bar{x} \pm s$, mmol.L⁻¹)

Tab 6 Fasting blood-glucose (FBG) and oral glucose tolerance test (OGTT) of rats in each group after administration ($\bar{x} \pm s$, mmol.L⁻¹)

组别	剂量 (mg · kg ⁻¹)	葡萄糖耐量 mmol.L ⁻¹			
		0h(FBG)	0.5h	1h	2h
模型组	-	17.16±2.22**	24.64±1.95**	22.54±1.15**	19.71±1.91**
正常组	-	4.38±0.28	7.83±0.89	7.51±0.92	5.53±0.42
知母有效组分高剂量组	400	13.26±1.45 ^{△△}	20.59±3.39 ^{△△}	17.92±2.04 ^{△△}	15.38±1.62 ^{△△}
知母有效组分中剂量组	200	15.22±1.54	22.5±2.77	19.89±2.43 ^{△△}	16.96±1.92 ^{△△}
知母有效组分低剂量组	100	17.85±2.94	23.18±4.08	21.44±4.03	18.13±2.28
罗格列酮组	5	14.61±1.55 ^{△△}	22.01±3.71	19.26±2.69 ^{△△}	15.52±2.29 ^{△△}

注: 与正常组比较, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; 与模型组比较, [△] $p < 0.05$, ^{△△} $p < 0.01$, 。

(5) 601 页左栏倒数第 2 行中“图 3”改为“图 2”

(6) 参考文献中删去 10, 并更改其他文中序号

页	行	原文献号	更改
p598,	左 1	9-12	9-11
p598	左 4	13	12
p598	左 6	14	13
p598	右倒数 6	15-18	14-17
p598	右倒数 1	19	18
p599	左 9	20-21	19-20
p599	右 8 (段 2 末行)	22	21
p602	左段 2 行 1	23	22
p602	左段 2 行 7	24-25	23-24