

丹皮乙醇提取物的抗氧化和抗糖尿病活性研究

张露^{1,3},程鑫鹏¹,邓梅¹,
陈明舜^{1,2*},周祺溟¹,彭春彦¹,谢作桦³,涂宗财¹¹江西师范大学生命科学学院 国家淡水鱼加工技术研发专业中心;²江西师范大学健康学院,南昌 330022;³江西德上制药股份有限公司,樟树 331200

摘要:为了充分利用丹皮活性成分资源,本文采用40%、70%和95%的乙醇对丹皮中活性成分进行超声提取,分别得到丹皮40%、70%和95%乙醇提取物(MC₄₀、MC₇₀和MC₉₅),比较了提取物中的总酚和总黄酮含量,以及体外抗氧化能力和抗糖尿病活性,最后采用斑马鱼模型评价了提取物的体内降血糖和外周运动神经保护活性。结果表明:MC₇₀具有最高的总酚(59.17 mg GAE/g,没食子酸当量)和总黄酮(82.59 mg QUE/g,槲皮素当量)含量,同时具有最高的抗氧化活性,其清除DPPH自由基和ABTS自由基的IC₅₀值分别为34.20 μg/mL和16.30 μg/mL,MC₄₀抗氧化活性最差。MC₉₅的糖基化抑制率最高,达95.92%,其次为MC₇₀(81.44%)。高血糖斑马鱼模型实验结果表明,MC₇₀干预后,与模型组相比血糖值降低了52%,外周运动神经损伤程度降低了56%。因此,70%的乙醇可作为提取丹皮中抗氧化和降血糖成分的适宜提取溶剂,提取物具有较好的抗氧化和抗糖尿病潜力,为丹皮后续的高值化利用提供理论基础。

关键词:丹皮;多酚类化合物;抗氧化;斑马鱼;降血糖

中图分类号:R285

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2024)5-0762-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.5.004

Antidiabetic and antioxidant activities of ethanol extracts from Moutan Cortex

ZHANG Lu^{1,3}, CHENG Xin-peng¹, DENG Mei¹,
CHEN Ming-shun^{1,2*}, ZHOU Qi-min¹, PENG Chun-yan¹, XIE Zuo-hua³, TU Zong-cai¹¹National R&D Center for Freshwater Fish Processing, College of Life Science, Jiangxi Normal University;²College of Health, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China;³Jiangxi Deshang Pharmaceutical Co., Ltd., Zhangshu 331200, China

Abstract: This study aimed to fully utilize the resources of Moutan Cortex, 40%, 70% and 95% ethanol solutions were used to extract the active components of Moutan Cortex by ultrasound, and 40%, 70% and 95% ethanol extracts (MC₄₀, MC₇₀ and MC₉₅) were obtained, respectively. The contents of total phenols and total flavonoids, as well as the antioxidant capacity and anti-diabetic activity *in vitro* of the three extracts were compared. Finally, the zebrafish model *in vivo* was used to evaluate the hypoglycemic and peripheral motor neuroprotective activities of the extracts. The results show that MC₇₀ had the highest content of total phenol (59.17 mg GAE/g, gallic acid equivalent) and total flavone (82.59 mg QUE/g, quercetin equivalent). Meanwhile, MC₇₀ exhibited the strongest antioxidant activity, with IC₅₀ values of 34.20 μg/mL and 16.30 μg/m for DPPH and ABTS free radical scavenging capacities, respectively, and MC₄₀ showed the weakest antioxidant activity. In addition, MC₉₅ exhibited the highest inhibition rate of glycosylation (95.92%), followed by MC₇₀ (81.44%). The experimental results of the hyperglycemic zebrafish model showed that MC₇₀ treatment resulted in a 52% decrease in blood glucose levels and a 56% reduction in peripheral motor nerve injury, compared with the model group. The results suggest that 70% ethanol was the suitable solvent for extracting antioxidant and hypoglycemic components from Moutan Cortex, and the extract has good antioxidant and anti-diabetic potential, providing a theoretical basis for the subsequent high-value utilization of the peel.

Key words: Moutan Cortex; polyphenols; antioxidant; zebrafish; anti-diabetes

收稿日期:2023-10-07

接受日期:2024-01-09

基金项目:国家自然科学基金(32301993);江西省自然科学基金(20232BAB205072)

* 通信作者 E-mail: chenshun1221@163.com

糖尿病是一种以机体内血糖值偏高为症状的慢性代谢性疾病。随着现代生活水平的提高和生活方式的改变,糖尿病已成为影响人类健康的第三大因素,仅次于心血管疾病和肿瘤,截止 2021 年,我国的糖尿病患者有 1.4 亿人,全球糖尿病人总数则达到了 5.37 亿人,占全球总人口的 10.5%^[1,2]。糖尿病对人体健康的危害不仅仅在其本身,它还会引起多种并发症,如动脉粥样化、糖尿病病足、视神经损伤导致的视力下降甚至失明等^[3]。研究表明,氧化应激的异常增加会促进糖尿病及其并发症的发生,同时糖尿病患者体内的血糖浓度偏高,会使细胞吸收的葡萄糖远超其正常所需,导致葡萄糖在细胞内的过量积累,细胞内的线粒体膜电位差显著增大,促使辅酶 Q 加速还原氧分子,进而在细胞内产生大量活性氧^[4],破坏胰岛 B 细胞和线粒体的正常功能,促进糖基化终产物(advance glycation end-products, AGEs)形成,增加氧化应激状态,加速糖尿病的进程以及并发症的发生。而抗氧化剂可以通过清除过量产生的自由基或激活内源性抗氧化防御系统来缓解氧化应激,从而缓解糖尿病及其相关并发症的进展^[5]。因此,缓解氧化应激对糖尿病及其并发症的预防与控制具有重要意义。

丹皮(Moutan Cortex, MC),毛茛科牡丹的干燥根皮,味苦、微辛,是一种传统的中药材,有清热、活血的功效,已有千年的使用历史。研究发现丹皮提取物具有多种药理活性,如抗肿瘤、抗菌、抗氧化、抗糖尿病等特性,其中丹皮酚、植物甾醇、糖类和黄酮类化合物是主要活性成分^[6-9]。Zhang 等^[10]发现,丹皮酚具有明显的体外抗氧化能力,能通过激活核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2 related factor, Nrf2)/Kelch 样 ECH 相关蛋白 1(Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)-抗氧化应答元件(antioxidant response element, ARE)信号通路(Nrf2/Keap1-ARE)来诱导氧化应激。Lian 等^[11]发现丹皮中的活性多糖成分对糖尿病并发症的肾病有改善作用。Wu 等^[12]指出丹皮活性成分有明显的降血糖作用,其机制与抑制糖异生、促进糖原合成、抗氧化等有关。但对于丹皮中不同极性溶剂提取物体内抗氧化和降血糖活性,以及在糖尿病并发症中对神经的保护功效还未有报道。

本文使用 40%、70% 和 95% 的乙醇对丹皮进行超声提取,比较丹皮不同浓度乙醇提取物中的总酚和总黄酮含量,通过 DPPH 自由基和 ABTS 自由基

清除能力实验测定样品的抗氧化能力,利用荧光光谱法考察提取物的抗糖基化能力,通过与阿卡波糖的对比评价样品的 α -葡萄糖苷酶抑制能力,最后利用高血糖动物模型评价样品在动物体内的降血糖能力以及对外周运动神经的保护功效。以期为丹皮提取物在抗糖尿病和抗氧化方面的综合应用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

丹皮购于中国安徽省安庆市安庆春源药房,经江西师范大学袁涛教授鉴定为毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮,用粉碎机粉碎后 4 °C 保存备用。

2,2'-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(ABTS)(纯度 $\geq 99\%$,批号:E2018132,上海阿拉丁生化科技公司);1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)(纯度 $\geq 98\%$,批号:M8GZJ-ET,上海梯希爱化成工业有限公司);4-对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷(pNPG)(纯度 $\geq 99\%$,批号:J15HS188691,上海原叶生物科技有限公司);氨基胍盐酸盐(纯度 $\geq 98\%$,批号:MKBV7865V)、阿卡波糖(纯度 $\geq 99\%$,批号:LRAC2934)、牛血清白蛋白(纯度 $\geq 98\%$,批号:WXBC7823V)、 α -葡萄糖苷酶(纯度 $\geq 99\%$,批号:000232545)(美国 Sigma-Aldrich 公司);槲皮素(纯度 $\geq 98\%$,批号:2230818002)、果糖(纯度 $\geq 90\%$,批号:C11032587)、PBS 磷酸盐缓冲溶液(北京索莱宝科技有限公司);没食子酸(纯度 $\geq 99\%$,批号:C14384465,上海麦克林生化科技公司);盐酸吡格列酮片(批号:19101252,江苏德源药业股份有限公司);磷酸西格列汀片(批号:S040520,杭州默沙东制药有限公司)。

1.2 动物

选取年龄均为 5 dpf(day post fertilization, dpf)的野生型 AB 斑马鱼和转基因运动神经元绿色荧光品系斑马鱼进行实验,所有斑马鱼由怀特生物公司养鱼中心繁殖提供,实验动物使用许可证号为:SYXK(浙)2012-0171,该公司获得了国际实验动物护理评估与认证协会(AAALAC)的认证(No. 001458),实验动物伦理审查已通过杭州环特生物科技股份有限公司实验动物管理与使用伦理委员会(编号:IACUC-2020-2574-01)。

1.3 仪器和设备

KQ5200DE 台式数控超声波清洗器(北京仪诺

科兴科技发展有限公司); Synergy H1 型酶标仪(美国 Bio Tek 公司); F-7000 荧光分光光度计(日本日立公司); LGJ-1D-80 冷冻干燥机(北京亚泰科隆仪器技术有限公司); AZ100 电动聚焦连续变倍荧光显微镜(日本 Nikon 公司)。

1.4 方法

1.4.1 丹皮中活性物质的提取

称取一定质量的丹皮粉末按 1:20 (g/mL) 的料液比分别与 40%、70% 和 95% 乙醇混合, 50 °C, 400 W 超声提取 1.0 h, 抽滤、收集上清液, 残渣再按照上述的方法提取一次, 抽滤后合并上清液^[13]。45 °C 条件下真空浓缩, 最后冷冻干燥分别得到丹皮提取物 MC₄₀、MC₇₀ 和 MC₉₅, 溶解成一定浓度的溶液后用于后续分析。

1.4.2 总酚和总黄酮含量测定

1.4.2.1 总酚含量

采用福林酚染色法测定总酚含量^[14]。200 μL 适宜浓度的提取物溶液或没食子酸(gallic acid, GA)与 0.1 mL Folin-Ciocalteu 试剂反应 5 min, 加入 0.3 mL 0.2 g/mL Na₂CO₃ 溶液和 1.0 mL 蒸馏水, 避光反应 25 min 后, 采用酶标仪测定反应体系在 765 nm 处的吸光度, 以蒸馏水代替样品作空白。以 20~100 μg/mL 的没食子酸溶液为标准品绘制标准曲线。结果用没食子酸当量 mg GAE/g 表示。

1.4.2.2 总黄酮含量

采用 AlCl₃·6H₂O 比色法测定总黄酮含量^[15]。将 100 μL 浓度合适的提取物溶液或槲皮素(querceetin, QU)与 100 μL 60 mg/mL AlCl₃·6H₂O 溶液混合室温下反应 15 min, 测反应体系在 430 nm 波长处的吸光值, 使用无水乙醇代替样品作为空白组。以 5~50 μg/mL 槲皮素为标准品绘制总黄酮含量标准曲线, 根据标准曲线计算样品中总黄酮的含量, 结果用槲皮素当量 mg QUE/g 表示。

1.4.3 体外抗氧化活性测定

通过 DPPH 自由基和 ABTS 自由基清除能力评价不同提取物的抗氧化能力^[16]。DPPH 自由基清除能力测定: 分别取 50 μL 稀释到适宜浓度的样品和槲皮素与 150 μL 0.15 mmol/L DPPH 甲醇溶液于 96 孔酶标板上混合, 避光室温反应 30 min 后于 517 nm 测吸光值(A)。

ABTS 自由基清除能力测定: 取 50 μL 不同浓度的样品或槲皮素分别与 200 μL 稀释后的 ABTS 自由基溶液于室温反应 6 min, 然后用酶标仪测反应体

系在 734 nm 的吸光值(A_s)。其中用 70% 甲醇溶液代替样品、70% 甲醇溶液和无水乙醇分别代替样品和自由基溶液、无水乙醇代替自由基溶液分别为对照组(A_c)、对照空白组(A_b)和样品空白组(A_j)。自由基清除率(R_s)的计算公式如下。

$$R_s = \frac{(A_c - A_b) - (A_s - A_j)}{A_c - A_b} \times 100\% \quad (1)$$

1.4.4 体外抗糖尿病活性测定

1.4.4.1 抗糖基化活性分析

采用牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)—果糖糖基化模型评价样品的抗糖基化能力^[17]。用 pH 7.4 的 PBS 溶液配置 20 mg/mL 的 BSA 和 500 mmol/L 的果糖溶液。取 1 mL BSA 溶液、1 mL 果糖溶液与 200 μL 1.0 mg/mL 样品溶液混匀后于 55 °C 反应 48 h。最后分别以 370 nm 和 440 nm 为激发波长和发射波长, 用荧光分光光度计测定荧光强度值, 样品的 AGEs 形成抑制率(R₁)用公式 2 计算。

$$R_1 = \frac{(FI_c - FI_b) - (FI_s - FI_d)}{FI_c - FI_b} \times 100\% \quad (2)$$

其中 FI_s、FI_c、FI_b、FI_d 分别为样品组、对照组、对照空白组和样品空白组的荧光强度。

1.4.4.2 α-葡萄糖苷酶活性抑制能力分析

参照 Yu 等^[18]的方法, 取 50 μL 适宜浓度的提取物溶液与 50 μL 0.1 U/mL 的 α-葡萄糖苷酶于 96 孔酶标板上混匀, 室温反应 6 min 后加入 50 μL 5.0 mmol/L 的 pNPG, 37 °C 反应 10 min 后加入 100 μL 0.2 mol/L Na₂CO₃ 溶液终止反应, 在 405 nm 处测定吸光值。以阿卡波糖为阳性对照品, 根据文献方法计算抑制率和 IC₅₀ 值。

1.4.5 体内降血糖评价及神经损伤保护

1.4.5.1 最大耐受浓度测定

随机选取 390 尾 5 dpf 野生型 AB 品系斑马鱼于 50 mL 烧杯中, 每个实验组 30 尾。向饲养水中分别加入浓度为 62.5、125、250、500、1 000 和 2 000 μg/mL 的丹皮提取物, 每个烧杯中液体体积为 25 mL, 实验组均用高糖高脂饲料建立斑马鱼高血糖模型, 每天给药 7.5 h, 连续给药两天, 实验期间及时统计各实验组的斑马鱼死亡数量并将其移除, 最终确定丹皮提取物对高血糖斑马鱼模型的最大耐受浓度(maximum tolerated concentration, MTC)。

1.4.5.2 辅助降血糖功效评价

随机选取 270 尾 5 dpf 野生型 AB 品系斑马鱼

于 50 mL 烧杯中,每个实验组 30 尾。向饲养水中分别加入浓度为 500、1 000 和 2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的丹皮提取物,吡格列酮为阳性对照,实验组均用高糖高脂饲料建立斑马鱼高血糖模型,每天给药 7.5 h,连续给药两天后,使用血糖仪采集数据,分析血糖值。

1.4.5.3 外周运动神经功效保护评价

随机选取 270 尾 5 dpf 转基因运动神经元绿色荧光品系斑马鱼于 50 mL 烧杯中,每个实验组 30 尾,向饲养水中分别加入浓度为 1 000、1 500 和 2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的丹皮提取物,西格列汀为阳性对照。实验组均用高糖高脂饲料建立斑马鱼高血糖模型,每天给药 7.5 h,连续给药两天后,在每个实验组中随机选取 10 尾斑马鱼用荧光显微镜拍照,分析其泄殖孔上方两个体节所在区域的外周运动神经荧光强度。

1.5 数据统计分析

本文中所有实验均重复三次,实验结果以平均值 \pm 标准差表示。采用 SPSS 软件对数据进行统计,并采用 Duncan 单因素方差分析(one-way analysis of variance, ANOVA)分析显著性, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义,图片采用 Origin 2019 和 GraphPad Prism 9.5 绘制。

2 结果与分析

2.1 提取物得率

本文采用不同浓度乙醇溶液结合超声波辅助提取丹皮中的多酚类化合物,提取物得率见表 1, MC_{40} 得率最高(8.4%), MC_{70} 得率最低(4.98%),提取得

率随着乙醇溶液的浓度增加,先下降后增加。根据相似相溶原理,当乙醇浓度为 40% 时溶液的极性大,丹皮中的极性较大的物质较多且易溶于溶剂中;当乙醇浓度升高到 70%,溶液极性减小使得溶剂中的大极性物质溶解减少,得率下降;但当乙醇浓度继续增加时,一些脂溶性和醇溶性的杂质物质也提取出来,促使得率再次升高^[19]。

2.2 总酚总黄酮含量分析

如表 1 所示,用不同浓度的乙醇提取丹皮得到的总酚、总黄酮含量有一定的差异,不同浓度的乙醇提取物中总酚和总黄酮含量从高到低的顺序皆为: $\text{MC}_{70} > \text{MC}_{95} > \text{MC}_{40}$ 。 MC_{70} 的总酚和总黄酮含量分别为 $59.17 \pm 5.61 \text{ mg GAE}/\text{g}$ 和 $82.59 \pm 0.49 \text{ mg QUE}/\text{g}$,远高于 MC_{95} 和 MC_{40} 。 MC_{70} 的总酚含量和总黄酮含量分别是 MC_{40} 的 4.24 倍和 3.81 倍,而 MC_{95} 中总酚和总黄酮的含量与 MC_{40} 又相差不大,其可能的原因是在一定浓度的乙醇范围内,即浓度小于 70% 时,丹皮中极性较强的酚类和黄酮类化合物易溶于极性大的溶液中,而乙醇的溶解渗透的能力强,随着乙醇浓度的增加,丹皮提取物中的总酚总黄酮含量增加;当乙醇浓度超过 70% 时,随着乙醇浓度的增加,一方面溶剂的极性随之变小,另一方面丹皮中其他的脂溶性、醇溶性以及其他的杂质物质同时被提取出来,导致提取物中的总酚总黄酮含量下降^[20]。综上分析,可以发现使用 70% 乙醇为溶剂,辅助超声提取对丹皮中的总酚和总黄酮的提取效果最佳。

表 1 丹皮提取物的得率及总酚和总黄酮含量

Table 1 Extraction rate, total phenolics and total flavonoids content of Moutan Cortex extracts

样品 Sample	得率 Yield (%)	总酚 Total phenol (mg GAE/g)	总黄酮 Total flavone (mg QUE/g)
MC_{40}	8.40	13.95 ± 1.99^c	21.68 ± 0.53^c
MC_{70}	4.98	59.17 ± 5.61^a	82.59 ± 0.49^a
MC_{95}	6.45	17.83 ± 2.06^b	23.65 ± 0.28^b

注:同列不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Note: Different letters in the same column indicate significant differences ($P < 0.05$).

2.3 丹皮提取物体外抗氧化能力分析

DPPH 自由基清除能力和 ABTS 自由基清除能力是广泛运用于检测天然产物抗氧化能力的指标,样品清除自由基的 IC_{50} 值越低,说明其抗氧化活性越高。当抗氧化物质清除自由基后,整个反应体系的吸光值就会下降,因此可以通过吸光值的下降程度评价样品 DPPH 自由基清除能力^[21]。如表 2 和

图 1 所示,提取物均具有较好的 DPPH 自由基清除能力和 ABTS 自由基清除能力。 MC_{95} 具有最强的 DPPH 自由基清除能力,其 IC_{50} 值为 $16.30 \mu\text{g}/\text{mL}$,约是标准品槲皮素 ($\text{IC}_{50} = 37.02 \mu\text{g}/\text{mL}$, $P < 0.05$) 的 2.2 倍, DPPH 自由基清除能力最弱的是 MC_{40} , IC_{50} 值为 $106.73 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。而 MC_{70} 的 ABTS 自由基清除能力最强,其的 IC_{50} 值为 $16.30 \mu\text{g}/\text{mL}$,远低于槲

皮素 ($IC_{50} = 31.89 \mu\text{g/mL}$), MC_{40} 次之 ($IC_{50} = 63.44 \mu\text{g/mL}$)。以上结果表明, 自由基清除能力与提取物中总酚总黄酮的含量有一定相关性, 可以推测丹皮

乙醇提取物中除总酚总黄酮外, 可能含有其他的活性成分影响自由基清除能力, 如可水解单宁^[22], 进一步说明丹皮具有很好的抗氧化开发潜力。

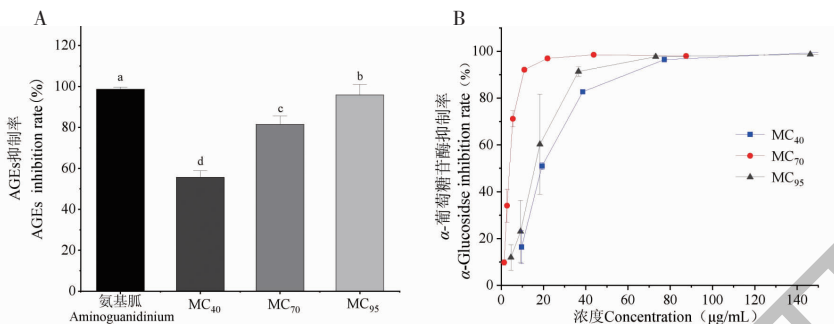


图1 丹皮乙醇提取物的 DPPH (A) 和 ABTS (B) 自由基清除率

Fig. 1 DPPH (A) and ABTS(B) radical scavenging rate of ethanol extracts from Moutan Cortex

表2 丹皮乙醇提取物的抗氧化和 α -葡萄糖苷酶抑制活性

Table 2 Antioxidant and α -glucosidase inhibitory activity of ethanol extracts from Moutan Cortex

样品 Sample	自由基清除活性 Free radical scavenging activity ($IC_{50}, \mu\text{g/mL}$)		α -葡萄糖苷酶抑制活性 α -Glucosidase inhibitory activity ($IC_{50}, \mu\text{g/mL}$)
	DPPH	ABTS	
MC_{40}	106.73 ± 16.02^a	63.44 ± 2.83^b	191.22 ± 3.00^a
MC_{70}	34.20 ± 0.36^c	16.30 ± 0.88^d	3.58 ± 0.35^c
MC_{95}	16.30 ± 0.74^d	76.86 ± 4.57^a	14.94 ± 4.43^b
槲皮素 Quercetin	37.02 ± 0.24^b	31.89 ± 2.46^c	-

注: 同列不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: Different letters in the same column indicate significant differences ($P < 0.05$).

2.4 体外抗糖基化活性分析及 α -葡萄糖苷酶抑制活性

2.4.1 抗糖基化活性分析

糖基化是指蛋白质通过酶促反应和还原糖形成糖蛋白的过程^[23], 而 AGEs 会导致各类糖尿病的并发症, 增加体内胰岛素抵抗程度, 进一步加重糖尿病病情^[24]。因此, 有效抑制 AGEs 产生对预防和控制糖尿病及其并发症具有重要的意义。丹皮不同浓度乙醇提取物对糖基化的抑制程度见图 2。由图可知, 当样品浓度为 0.09 mg/mL 时, MC_{40} 的糖基化抑制率效果仅有 55.56% , 远低于标准品氨基胍 (98.65% , $P < 0.05$)。 MC_{95} 对糖基化抑制率达到了 95.92% , 与标准品接近, 并且 MC_{70} 的抑制率也达到了 81.44% 。说明 MC_{70} 、 MC_{95} 具有较好的糖基化抑制能力。

2.4.2 α -葡萄糖苷酶活性抑制能力分析

α -葡萄糖苷酶是一种肠上皮细胞分泌的关键的碳水化合物水解酶, 负责将双糖、三糖和低聚糖降解

为可吸收的单糖, 在餐后血糖上升的过程中起重要作用, 抑制 α -葡萄糖苷酶活性已被认为是控制糖尿病及其并发症的重要方法之一^[25]。丹皮不同浓度乙醇提取物的 α -葡萄糖苷酶活性抑制能力随提取物浓度变化曲线见图 2。由图可知, 所有的提取物都具有良好的 α -葡萄糖苷酶抑制能力, MC_{70} 的 IC_{50} 值为 $2.15 \mu\text{g/mL}$, MC_{40} 和 MC_{95} 的 IC_{50} 值分别为 $12.30 \mu\text{g/mL}$ 和 $19.27 \mu\text{g/mL}$, 而标准品阿卡波糖的 IC_{50} 值高达 $2.22 \times 10^3 \mu\text{g/mL}$, 远远高于所有乙醇提取的丹皮组分。抑制能力最强的为 MC_{70} , 约为阿卡波糖的 1032 倍, 表明使用 MC_{70} 的 α -葡萄糖苷酶抑制效果最好。综合含量和体外活性检测的结果, 选择 MC_{70} 用于后续的丹皮体内降血糖研究。

2.5 体内降血糖评价

2.5.1 最大耐受浓度

近年来, 因具有容易观察组织和器官、药物诱导时间短、允许使用少量化合物等优点, 斑马鱼一直是筛选代谢性疾病药物中最受欢迎的模式生物之一。

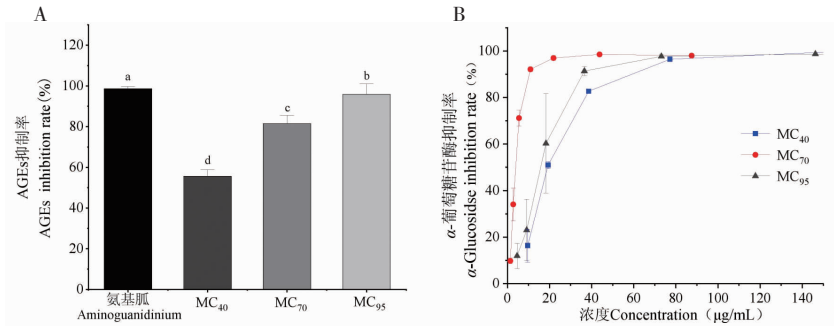


图2 丹皮乙醇提取物的 AGEs (A) 和 α -葡萄糖苷酶抑制率 (B)

Fig. 2 AGEs (A) and α -glucosidase (B) inhibition rate of ethanol extracts from Moutan Cortex

注:图中不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。Note: Different letters in the figure indicate significant differences ($P < 0.05$).

本研究采用高血糖斑马鱼模型评价丹皮提取物降低血糖水平和神经损伤保护的能力。在本实验条件下,丹皮对斑马鱼的 MTC 详见表 3。由表可知,丹

皮提取物浓度低于 2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 不会对斑马鱼的正常生活造成影响,证实后续实验中使用该浓度的丹皮提取物对实验的无关变量没有明显可见的影响。

表 3 MC₇₀的毒理性($n = 30$)

Table 3 The maximum tolerated concentration result of Moutan Cortex extracts ($n = 30$)

组别 Group	浓度 Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	死亡数 Fatality	死亡率 Mortality rate (%)	毒性表型 Toxic phenotype
对照组 Control	-	0	0.0	活力正常无明显异常
MC ₇₀	62.5	0	0.0	活力正常无明显异常
	125	0	0.0	活力正常无明显异常
	250	0	0.0	活力正常无明显异常
	500	0	0.0	活力正常无明显异常
	1 000	0	0.0	活力正常无明显异常
	2 000	0	0.0	活力正常无明显异常

2.5.2 辅助降血糖功效

如图 3 所示,与正常组(control, Con)相比,模型组(model, Mod)的斑马鱼血糖值显著提升至 2.06 mmol/L, 500、1 000 和 2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 MC₇₀处理后,斑马鱼血糖值随之分别降低至 1.55 mmol/L、1.45 mmol/L 和 1.05 mmol/L,同时 18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的吡格列酮(pioglitazone, Pio)也将血糖值下降至 1.10 mmol/L。由此可见,随着丹皮提取物浓度的上升,与模型对照组相比,斑马鱼体内的血糖值显著降低($P < 0.05$)。其中 2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MC₇₀和吡格列酮处理的斑马鱼体内血糖值相对模型对照组分别下降了 52% 和 48%,表明 2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MC₇₀具有和标准品相似的降血糖功效。由于天然植物提取成分,有对机体副作用小、获取便捷、价格便宜等优势,表明丹皮在降血糖和抗糖尿病领域具有巨大的应用潜力。

2.6 外周运动神经保护功效评价

糖尿病周围神经病变是糖尿病患者常见的慢性并发症,在排除其他原因的情况下患者会出现周围神经功能障碍(运动和感觉)相关的症状,如痛觉异常、神经传导功能下降等。现代研究发现,神经细胞能量的获取主要是依赖于葡萄糖,而糖尿病的高血糖所引起的代谢紊乱会直接影响外周神经细胞的代谢,从而促使周围神经细胞发生病变^[26]。Ghalami 等^[27]通过大鼠实验发现,丹皮酚对于大鼠的神经有一定的保护作用。为了评价丹皮对糖尿病并发症的预防作用,本文通过检测转基因斑马鱼外周运动神经荧光强度来评价丹皮对神经的保护功效。

由图 4 所示,1000、1 500 和 2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 MC₇₀将外周运动神经的荧光强度由模型对照组的 139 884 像素分别提高至 175 371、178 855 和 217

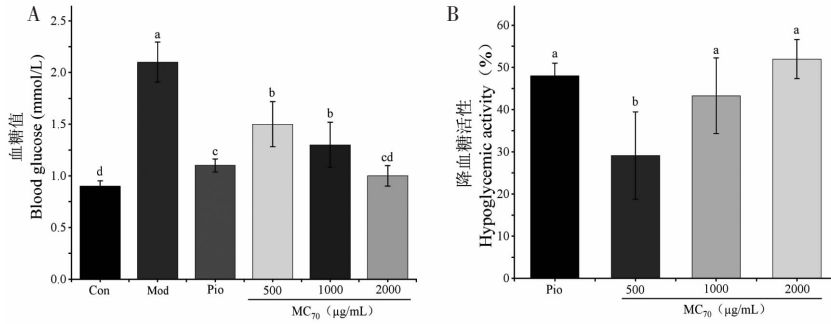


图3 MC_{70} 对斑马鱼血糖值的影响(A)及其降血糖活性(B)

Fig. 3 Effect of MC_{70} on blood glucose levels in zebrafish (A) and its hypoglycemic activity (B)

注:图中不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。下同。Note: Different letters in the figures indicate significant differences ($P < 0.05$), the same below.

877 像素, 350 $\mu\text{g/mL}$ 的西格列汀 (sitagliptin, Sit) 也将该荧光强度提升至 179 871 像素。随着丹皮提取物浓度的提升, 斑马鱼外周运动神经的荧光强度不断提高, 表明丹皮提取物对神经的保护能力不断提高。其中 2.0 mg/mL MC_{70} 和西格列汀的神经保护

功效相比模型组分别提升了 56% 和 26%。根据图 5 荧光典型图可以看出, 丹皮提取物处理后的运动神经的荧光强度看起来与正常无异, 说明丹皮提取物对外周运动神经具有一定的保护作用。

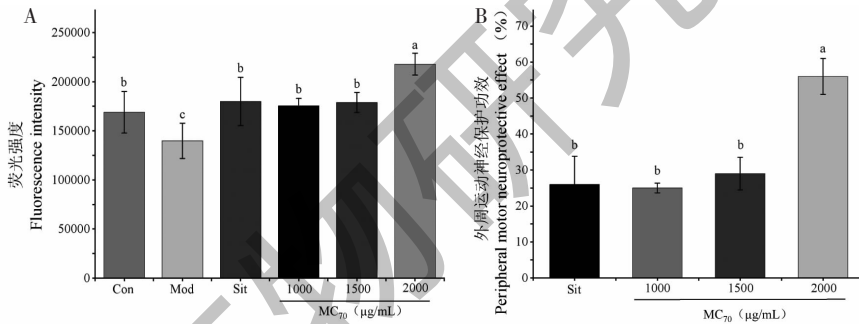


图4 丹皮提取物对斑马鱼外周运动神经荧光强度的影响(A)及其周运动神经保护能力(B)

Fig. 4 Effect of Moutan Cortex extract on the fluorescence intensity of peripheral motor nerves in zebrafish (A) and its protective capacity against peripheral motor nerves (B)

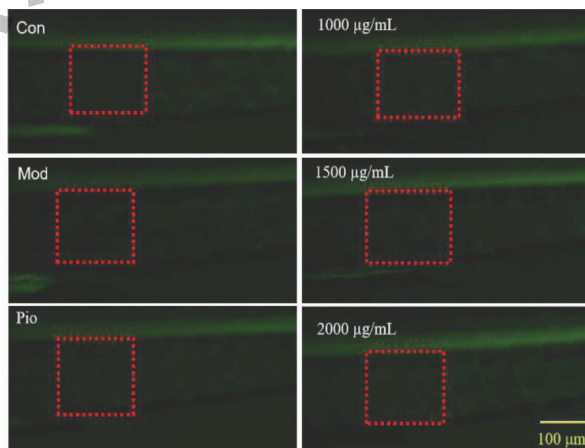


图5 丹皮提取物处理后斑马鱼外周运动神经荧光强度典型图

Fig. 5 Fluorescence intensity of peripheral motor nerve in zebrafish treated with Moutan Cortex extract

3 结论

据相关报道,目前我国的糖尿病人数众多且呈年轻化的趋势,严重地危害了我国国民的生命健康安全。如今市场上的糖尿病的药物多为化工合成,具有一定的副作用,而植物来源的提取物具有天然、高效和副作用小等特点。本文比较了丹皮不同浓度乙醇溶液超声提取物的抗糖尿病和抗氧化活性,分析了丹皮在抗糖尿病方面的应用潜力。研究得出,使用70%乙醇作为溶剂时,得率为4.98%,其丹皮提取物具有最高的总酚和总黄酮含量,分别为59.17 mg GAE/g和82.59 mg QUE/g,具有较好的体外抗氧化和降血糖活性,DPPH自由基、ABTS自由基清除能力以及 α -葡萄糖苷酶抑制能力 IC_{50} 值分别为16.30、34.20和2.10 μ g/mL,糖基化抑制率为81.44%。通过高血糖动物模型实验,进一步证明了 MC_{70} 具有降低血糖含量的功效;当丹皮提取物浓度为2 mg/mL时,辅助降血糖功效为52%,同时在该浓度下 MC_{70} 具有56%的外周运动神经保护功效。使用70%乙醇溶液超声提取的丹皮提取物具有良好的抗氧化、抗糖尿病能力,以及辅助降血糖功效,在抗糖尿病方面具有研究潜力和应用价值。

参考文献

- 1 Sun H, Saeedi P, Karuranga S, et al. IDF Diabetes Atlas: global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2022, 183: 109119.
- 2 Li H, Zhang gy, jiang yh, et al. system dynamic model simulates the growth trend of diabetes mellitus in chinese population: implications for future urban public health governance [J]. *Int J Public Health*, 2022, 67: 1605064.
- 3 Papatheodorou K, Banach M, Bekiari E, et al. Complications of diabetes 2017 [J]. *J Diabetes Res*, 2018, 2018: 3086167.
- 4 Zhang P, Li T, Wu X, et al. Oxidative stress and diabetes: antioxidant strategies [J]. *Front Med*, 2020, 14: 18.
- 5 Zhong O, Hu J, Wang JY, et al. Antioxidant for treatment of diabetic complications: a meta-analysis and systematic review [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2022, 36: e23038.
- 6 Yang SC, Liu XY, He JY, et al. Insight into seasonal change of phytochemicals, antioxidant, and anti-aging activities of root bark of *Paonia suffruticosa* (Cortex Moutan) combined with multivariate statistical analysis [J]. *Molecules*, 2021, 26: 6102.
- 7 Zhang L, Chen WX, Li LL, et al. Paeonol suppresses proliferation and motility of non-small-cell lung cancer cells by dis-

- rupting STAT3/NF- κ B signaling [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 572616.
- 8 Qian WD, Li XC, Liu QM, et al. Antifungal and antibiofilm efficacy of paeonol treatment against biofilms comprising *Candida albicans* and/or *Cryptococcus neoformans* [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 884793.
- 9 Lau CH, Chan CM, Chan YW, et al. Pharmacological investigations of the anti-diabetic effect of Cortex Moutan and its active component paeonol [J]. *Phytomedicine*, 2007, 14: 778-784.
- 10 Zhang B, Yu D, Luo N, et al. Four active monomers from Moutan Cortex exert inhibitory effects against oxidative stress by activating Nrf2/Keap1 signaling pathway [J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2020, 24: 373-384.
- 11 Lian YP, Zhu MM, Yang B, et al. Characterization of a novel polysaccharide from Moutan Cortex and its ameliorative effect on AGEs-induced diabetic nephropathy [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 176: 589-600.
- 12 Wu LL, Li ZP, Cao SJ, et al. Research progress on improving diabetes and its complications of active ingredients of Moutan Cortex [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2022, 53: 4162-4169.
- 13 Pan XH, Zhao W, Liu YL, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of paeonol and loganin [J]. *Guid J Tradit Chin Med Pharm (中医药导报)*, 2020, 26: 5.
- 14 Zhang L, Liu PF, Tu ZC, et al. Comparison of antioxidant activity and enzyme inhibitory activity of different plant parts of *Torreya grandis cv. merrilli* [J]. *Food Sci (食品科学)*, 2018, 39: 78-83.
- 15 Zhang L, Tu ZC, Xie X, et al. Antihyperglycemic antioxidant activities of two *Acer palmatum* cultivars, and identification of phenolics profile by UPLC-QTOF-MS/MS: New natural sources of functional constituents [J]. *Ind Crops Prod*, 2016, 89: 522-532.
- 16 Zhang L, Yang SH, Tu ZC, et al. Influence of *in vitro* simulated digestion on stability and free radical scavenging and α -glucosidase inhibitory activities of *Acer palmatum* leaves polyphenols [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2018, 30: 354-361.
- 17 Zhang L, Lu Y, Ye YH, et al. Insights into the mechanism of quercetin against BSA-fructose glycation by spectroscopy and high-resolution mass spectrometry: effect on physicochemical properties [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67: 236-246.
- 18 Yu CC, Yao YY, Geng XY, et al. Inhibitory effects of different polar extracts of acorns on α -amylase and α -glucosidase [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2022, 34: 1838-1845.

- 19 Xia YH, Liu Y, Zhou M, et al. Extraction process optimization and antioxidant activity of total flavonoids from *Haloragis micrantha* (Thunb.) R. Brown [J]. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2023, 44: 244-250.
- 20 Xia YH, Liu Y, Zhou M, et al. Extraction process optimization and antioxidant activity of total flavonoids from *Haloragis micrantha* (Thunb.) R. Brown [J]. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2023, 44: 244-250.
- 21 Zhang L, Huang XX, Tu ZC, et al. Comparison of bioactive compounds, antioxidant activity and α -glucosidase inhibition activity of five by-products from lotus seed production [J]. *Food Sci* (食品科学), 2018, 39: 33-38.
- 22 Zhang L, Wang YH, Mei QG, et al. Composition and antioxidant and antidiabetic activities of different polyphenol fractions from the fruits of *Rubus chingii* Hu [J]. *Food Sci* (食品科学), 2022, 43: 192-199.
- 23 Chang CH, Su YJ, Gu LP, et al. Microwave induced glycosylation of egg white protein; study on physicochemical properties and baking performance-ScienceDirect [J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 118.
- 24 Kandarakis SA, Piperi C, Topouzis F, et al. Emerging role of advanced glycation-end products (AGEs) in the pathobiology of eye diseases [J]. *Prog Retinal Eye Res*, 2014, 42: 85-102.
- 25 Laar FAVD, Lucassen PLB J, Akkermans RP, et al. Alpha-glucosidase inhibitors for type 2 diabetes mellitus (Review) - art. no. CD003639. pub2 [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2005, 2: CD003639.
- 26 Yang XX, Zhang L, Chen X, et al. Research progress of diabetic peripheral neuropathy mechanisms in type 2 diabetes [J]. *Chin Pharm Bull* (中国药理学通报), 2016, 32: 598-602.
- 27 Ghalami J, Mojarad TB, Mansouri M, et al. Paeonol protection against intrastriatal 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease [J]. *Basic Clin Neurosci*, 2021, 12: 43-56.
-
- (上接第 804 页)
- 21 Murphy TA, Dang CV, Young JD. Isotopically nonstationary ^{13}C flux analysis of Myc-induced metabolic reprogramming in B-cells [J]. *Metab Eng*, 2013, 15: 206-217.
- 22 Yuneva MO, Fan TW, Allen TD, et al. The metabolic profile of tumors depends on both the responsible genetic lesion and tissue type [J]. *Cell Metab*, 2012, 15: 157-170.
- 23 San-Millan I, Brooks GA. Reexamining cancer metabolism; lactate production for carcinogenesis could be the purpose and explanation of the Warburg effect [J]. *Carcinogenesis*, 2017, 38: 119-133.
- 24 DeWaal D, Nogueira V, Terry AR, et al. Hexokinase-2 depletion inhibits glycolysis and induces oxidative phosphorylation in hepatocellular carcinoma and sensitizes to metformin [J]. *Nat Commun*, 2018, 9: 446.
- 25 Patra KC, Wang Q, Bhaskar PT, et al. Hexokinase 2 is required for tumor initiation and maintenance and its systemic deletion is therapeutic in mouse models of cancer [J]. *Cancer Cell*, 2013, 24: 213-228.
- 26 Chen JQ, Zou L, Lu G, et al. PFKF alleviates glucose starvation-induced metabolic stress in lung cancer cells via AMPK-ACC2 dependent fatty acid oxidation [J]. *Cell Discov*, 2022, 8: 52.
- 27 Yang WW, Xia Y, Hawke D, et al. PKM2 phosphorylates histone H3 and promotes gene transcription and tumorigenesis [J]. *Cell*, 2012, 150: 685-696.
- 28 Sharma D, Singh M, Rani R. Role of LDH in tumor glycolysis; Regulation of LDHA by small molecules for cancer therapeutics [J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 87: 184-195.