

青钱柳叶 UPLC-Q-TOF-MS 成分分析及其对睾丸的修复作用

方海莲, 刘妹玲, 李巍一, 王成刚, 李芳, 肖竹平* (吉首大学化学化工学院, 武陵山地区民族药解析与创制湖南省工程实验室, 湖南 吉首 416000)

摘要: 目的 研究青钱柳叶水提物的主要成分及其对糖尿病小鼠睾丸组织功能的影响。方法 基于高分辨分子量和质谱碎片信息, 结合数据库匹配, 通过超高效液相色谱-四极杆-飞行时间-质谱联用 (ultra performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry, UPLC-Q-TOF-MS) 分析青钱柳叶水提物的组成成分, PNPG 法测定 α -葡萄糖苷酶抑制活性, 并检测青钱柳叶水提取物高(2 000 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、中(1 000 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、低(500 mg·kg⁻¹·d⁻¹) 剂量对四氧嘧啶诱导的糖尿病小鼠的治疗作用。结果 从青钱柳叶水提取物中鉴定出 20 个化合物, 发现了 3 个新的 α -葡萄糖苷酶抑制剂: 桑色素 [$IC_{50}=(3.98\pm 1.38)\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]、7-羟基香豆素 [$IC_{50}=(33.48\pm 2.54)\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$] 和甲基丁香酚 [$IC_{50}=(34.63\pm 4.66)\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]。青钱柳叶水提取物高、中、低剂量组与模型组相比, 体质量和血糖值均有显著性差异, 且睾丸组织切片显示高剂量组比阳性组有更好的修复效果。结论 青钱柳叶水提取物中、高剂量有显著的降糖作用, 对睾丸组织有较好的修复功能。

关键词: 青钱柳叶; α -葡萄糖苷酶抑制剂; 降血糖; 睾丸修复

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2021)02-0129-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.02.001

引用本文: 方海莲, 刘妹玲, 李巍一, 等. 青钱柳叶 UPLC-Q-TOF-MS 成分分析及其对睾丸的修复作用[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(2): 129-136.

Analysis of *Cyclocarya paliurus* Leaves by UPLC-Q-TOF-MS and Its Effect on Testicular Restoration

FANG Hailian, LIU Meiling, LI Weiyi, WANG Chenggang, LI Fang, XIAO Zhuping* (Hunan Engineering Laboratory for Analyze and Drugs Development of Ethnomedicine in Wuling Mountains, College of Chemistry and Chemical Engineering, Jishou University, Jishou 416000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To analyze the chemical composition of the water extract of *Cyclocarya paliurus* leaves and its influence on testicular tissue in diabetic mice. **METHODS** The water extract of *Cyclocarya paliurus* leaves was analyzed by ultra performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS), and the chemical identification was then carried out based on the high-resolution molecular weight and fragment ion, as well as mass spectral database searching, the α -glucosidase inhibitory activity of some compounds was determined by PNPG method. Therapeutic effect of the *Cyclocarya paliurus* leaves on alloxan-induced diabetic mice was evaluated at doses of high(2 000 mg·kg⁻¹·d⁻¹), medium(1 000 mg·kg⁻¹·d⁻¹) and low(500 mg·kg⁻¹·d⁻¹). **RESULTS** Twenty compounds were identified, and out of them, morin [$IC_{50}=(3.98\pm 1.38)\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$], umbelliferone [$IC_{50}=(33.48\pm 2.54)\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$], and methyleugenol [$IC_{50}=(34.63\pm 4.66)\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$] were first identified as α -glucosidase inhibitors from *Cyclocarya paliurus* leaves. There were significant different in body weight and blood glucose between the high, medium and low dose groups compared with the model group, and section diagram of testicular tissue showed that the high dose group has a better repair effect than the positive group. **CONCLUSION** The water extract of *Cyclocarya paliurus* leaves has significant hypoglycemic effect and good repair function to testicular tissue.

KEYWORDS: *Cyclocarya paliurus* leaves; α -glucosidase inhibitor; hypoglycemic; testicular restoration

糖尿病是一种常见的代谢性内分泌疾病, 是胰岛素分泌缺陷或胰岛素抵抗所致^[1-2], 可引发多种并发症, 如糖尿病酮症酸中毒、糖尿病肾病、糖尿病视网膜病变、糖尿病足等^[3-4], 其发病率呈

逐年上升趋势, 预计 2030 年糖尿病患者总数将增至 5.78 亿^[5]。目前糖尿病治疗以化学合成药为主, 如二甲双胍、磺酰脲类、阿卡波糖等, 具有短期降糖效果好的优点, 但长期服用容易出现耐受性^[6-8]。

基金项目: 国家自然科学基金项目(21867010); 湘西自治州本级重点研发计划项目(2018SF2002); 吉首大学研究生科研创新项目(JGY201924)
作者简介: 方海莲, 女, 硕士生 Tel: 15274345633 E-mail: 15274345633@163.com *通信作者: 肖竹平, 男, 博士, 教授 Tel: (0743)8563911 E-mail: xiaozhuping2005@163.com

中国现代应用药学 2021 年 1 月第 38 卷第 2 期

Chin J Mod Appl Pharm, 2021 January, Vol.38 No.2

· 129 ·

与合成药不同,中草药用于糖尿病治疗不仅历史悠久(2 000 多年)^[9],而且其药效是多种成分、多种机制协同增效的综合表现,不易出现耐受性,因此从中草药中寻找抗糖尿病药物已经引起广泛关注。

青钱柳[Cyclocarya paliurus (Batal.) Iljinsk]为胡桃科青钱柳属植物,其叶常用来当茶饮^[10-11],其叶制产品降糖神茶已获美国FDA批准上市^[12-13]。青钱柳叶的降糖作用主要与其所含的黄酮、三萜和多糖有关,通过激活胰岛β细胞,防止β细胞凋亡,促进肝糖原合成和脂肪细胞对糖的摄取,抑制α-葡萄糖苷酶等多种途径发挥降糖作用^[14-17],其中α-葡萄糖苷酶抑制成分主要为黄酮,但最近发现一些三萜也具有α-葡萄糖苷酶抑制作用^[14],这一发现表明青钱柳叶中α-葡萄糖苷酶抑制成分还有待进一步探索和阐明。

糖尿病合并生殖系统损伤是男性糖尿病患者的常见并发症,发病率在50%左右,严重影响着糖尿病患者的健康和生活质量^[18]。目前,临床和动物试验都证明糖尿病可以造成雄性生殖系统损伤,以睾丸的形态学、生精功能和性激素水平的变化作为糖尿病生殖系统损伤的重要表现^[19]。研究发现,天然产物对于糖尿病引起的生殖系统并发症具有一定的治疗作用,毛孙忠等^[20]发现银杏叶提取物可以通过清除自由基抗氧化,改善胰岛素抵抗,调节II型糖尿病大鼠糖脂代谢紊乱,缓解睾丸间质细胞组织学形态损伤,王立哲等^[21]发现藏红花素对糖尿病所致睾丸组织并发症损伤具有一定的保护作用。青钱柳对一些糖尿病并发症也具有缓解和治疗作用,通过缓解氧化应激,对糖尿病早期肾损伤起到保护作用^[22],但对糖尿病引起的睾丸组织损伤的修复作用国内外未见报道。

天然产物成分复杂,分离和检测繁琐、效率低,以高通量、高灵敏度和高分辨率著称的超高效液相色谱-四极杆-飞行时间-质谱联用(ultra performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry, UPLC-Q-TOF-MS)正是解决这一问题的新技术和有效手段,能够同时检测出上百种化合物。UPLC-Q-TOF-MS采用ESI源和多级质谱分析,可以得到更多化合物裂解信息而获得可靠的定性结果^[23-24]。本研究采用UPLC-Q-TOF-MS对样品进行正态电离,根据高分辨分子量和碎片信息,结合

数据库比对,鉴定出其中20个化合物,并对可获得标样的成分进行α-葡萄糖苷酶抑制活性测定,发现了3个新的α-葡萄糖苷酶抑制成分。同时,通过青钱柳叶水提取物对糖尿病小鼠的体内试验,进一步验证青钱柳叶的降糖作用,并观察到青钱柳叶对糖尿病性睾丸损伤具有明显保护作用,这些研究结果为青钱柳叶用于治疗糖尿病性生殖损伤提供了依据。

1 材料

1.1 药物与试剂

青钱柳叶(湘西自治州永顺县)由吉首大学化学化工学院肖竹平教授鉴定。石油醚(分析纯,天津市富宇精细化工有限公司);甲醇(分析纯,成都金山化学试剂有限公司);无水碳酸钠(分析纯)、磷酸二氢钾(批号:20192214)均购自天津市光复科技发展有限公司;磷酸氢二钾(国药集团化学试剂有限公司,批号:F20060118);四氧嘧啶(Macklin公司,批号:C10317497);二甲双胍(九鼎化学试剂网,批号:100664-201805);α-葡萄糖苷酶(批号:#0000093218)、对硝基苯基-α-D-吡喃葡萄糖苷(批号:LKC0S115)均购自Sigma公司;阿卡波糖(拜耳公司,批号:139157);腺嘌呤(批号:P1494851)、香豆素(批号:P1116408)均购自Damas-beta试剂公司;7-羟基香豆素(批号:C10893830)、桑色素(批号:C10545696)、甲基丁香酚(批号:C10467363)均购自Macklin公司;阿魏酸(批号:#J1929052)、杨梅素(批号:#L1708027)均购自阿拉丁化学试剂网;山奈酚(实验室提取);血糖试纸(上海强生医疗器械有限公司)。

1.2 动物

ICR小鼠,60只,体质量18~22g,4周龄,♂,动物生产许可证号:SCXK(湘)2016-0002;来源:湖南斯莱克景达实验动物有限公司。

1.3 仪器

Hidolph Hei-VAP Value 旋转蒸发仪(德国海道夫集团);ME204E 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);万能粉碎机(德清拜杰电器有限公司);Waters-Acquity UPLC I-Class 二元高压液相色谱仪、Waters-Xevo G2-XS Q/ToF 四极杆串联飞行质谱(ESI源)均购自美国Waters科技有限公司;色谱柱为ACQUITY UPLC BEH C₁₈(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm);SpectraMax Plus 384 酶标仪(美国美谷分

子仪器有限公司); 罗氏血糖仪(上海强生医疗器械有限公司)。

2 方法

2.1 提取物的制备

将青钱柳叶置于干燥箱中, 在 60 °C 下干燥 4 h, 用粉碎机粉碎, 过 50 目筛, 经过石油醚脱脂并干燥后, 取 10 g 干燥粉末于烧瓶中, 按液料质量体积比 1:10 分别用蒸馏水在 80 °C 恒温水浴锅中回流提取 2 次, 每次 2 h, 趁热抽滤, 合并滤液浓缩, 冷冻干燥得到粉末水提物。

2.2 UPLC-Q-TOF-MS 分析成分

青钱柳叶水提物用 50% 甲醇溶解, 过滤, 滤液经 0.45 μm 微孔滤膜后, 用 Waters-Acquity UPLC I-Class-Waters-Xevo G2-XS Q/TOF 系统(UPLC-Q-TOF-MS)进行成分分析, 色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C₁₈(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm), 以水溶液(A)-甲醇(B)为流动相梯度洗脱(0~3 min, 10%→50% B; 3~9 min, 50%→100% B; 9~11 min, 100% B; 11~11.1 min, 100%→10% B), 流速 0.3 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C, 检测波长 254 nm。质谱分析在正离子模式下进行, 操作参数设定如下: 毛细管电压 3.0 kV, 去溶剂温度 350 °C, 去溶剂气流 13 L·min⁻¹, 碰撞能为 6 eV, 将质谱仪校准在全扫描质荷比范围内(*m/z* 50~1 200)。

2.3 青钱柳叶水提物对 α-葡萄糖苷酶抑制活性测定

用 PNPG 法进行 α-葡萄糖苷酶抑制活性测定。将提取物用 0.2 mol·L⁻¹ PBS(pH 6.8)溶解, 置于 4 °C 冰箱中备用。活性检测在 96 孔板上进行, 实验组加 25 μL 样品液和 25 μL α-葡萄糖苷酶(0.2 U·mL⁻¹), 对照组用等体积 PBS 代替样品液, 背景组用等体积 PBS 代替 α-葡萄糖苷酶溶液, 空白组加 50 μL PBS。加入完毕后在 37 °C 恒温箱下共培养 15 min, 然后每孔加 50 μL PNPG 底物(2 mmol·L⁻¹), 在 37 °C 恒温箱下共培养 20 min 后, 每孔加 100 μL 0.2 mol·L⁻¹的 NaCO₃ 终止反应并显色, 在酶标仪 405 nm 处测吸光度(*A*)值, 抑制活性用 *JC*₅₀ 表示, 抑制率按如下公式计算:

$$\text{抑制率}/\% = \frac{(A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) - (A_{\text{实验}} - A_{\text{背景}})}{(A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})} \times 100\%$$

2.4 青钱柳叶水提物对糖尿病小鼠的作用

2.4.1 造模及给药方式 ICR ♂ 小鼠 60 只, 适应性喂养 1 周后, 禁食不禁水 12 h。随机选取 10 只

腹腔注射生理盐水, 作为正常组。其余腹腔注射 200 mg·kg⁻¹ 四氧嘧啶溶液(用生理盐水配成 2% 溶液, 现配现用), 注射完后恢复小鼠饮食。3 d 后, 尾静脉采血, 采血前禁食不禁水 12 h, 用罗氏血糖仪测定小鼠空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)。每天观察并记录小鼠体质量、饮水量、进食量、被毛及精神状况。选择 FBG ≥ 11.1 mmol·L⁻¹ 且连续出现多食、多饮、多尿症状的小鼠视为糖尿病动物模型。将造模成功的小鼠随机分为 5 组, 药物组分别给予高、中、低剂量(2 000, 1 000, 500 mg·kg⁻¹·d⁻¹)青钱柳叶水提物, 每天上午 8:00 开始灌胃给药 1 次, 连续灌胃 21 d, 二甲双胍(200 mg·kg⁻¹·d⁻¹)为阳性对照组, 剩余的作为模型组, 每周记录 1 次小鼠体质量和 FBG。

2.4.2 指标检测 在试验期间, 分别测量第 0, 7, 14, 21 天的 FBG 和体质量。试验结束后, 处死小鼠并解剖, 取睾丸做组织切片, HE 染色观察细胞形态的改变, 降糖效果用降糖率表示, 降糖率通过下式计算:

$$\text{降糖率}/\% = \frac{\text{FBG}_{\text{前}} - \text{FBG}_{\text{后}}}{\text{FBG}_{\text{前}}} \times 100\%$$

2.4.3 统计分析 采用 SPSS 20 统计软件进行统计分析, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两两均数比较使用单因素方差分析, *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 青钱柳叶水提物组分分析

根据高分辨分子量和碎片信息, 结合数据库比对, 鉴定出 20 个化合物, 青钱柳叶水提物的基峰图见图 1。

3.2 青钱柳叶水提物组部分结构鉴定

青钱柳叶水提物 UPLC-Q-TOF-MS 成分分析见表 1。以化合物 2、4、9 为代表来阐述化合物结构鉴定的过程。化合物 2: 保留时间 1.48 min, 在正离子模式下, [M+H]⁺ 准分子离子峰为 517.134 3, 化学式为 C₂₅H₂₄O₁₂。 *m/z* 517 [M+H]⁺ 离子有 2 种裂解方式, 一种裂解方式是由分子离子峰丢失 1 分子咖啡酰基, 产生 *m/z* 355.101 6 碎片离子峰, 另一种裂解方式是由分子离子峰丢失 1 分子乙酰基正离子, 产生 *m/z* 163.039 6 的碎片离子峰, 结合文献对照^[25], 推定化合物 2 为异绿原酸类, 异绿原酸有多个异构体, 具体种类无法通过质谱确定, 可借助对照样品质谱分析进行推测, 该类化合物的裂解方式见图 2。

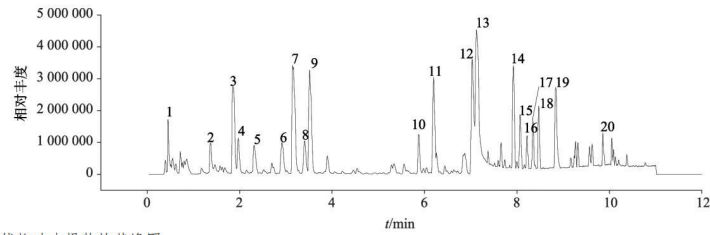


图1 青钱柳叶水提物的基峰图

Fig. 1 Base peak chromatogram of water extract of *Cyclocarya paliurus* leaves

表1 青钱柳叶水提物 UPLC-Q-TOF-MS 成分分析

Tab. 1 Component analysis of water extract of *Cyclocarya paliurus* leaves by UPLC-Q-TOF-MS

编号	保留时间/min	测量值 m/z	质量数误差/mDa	离子种类	分子式	化合物
1	0.52	136.062 6	0.9	[M+H] ⁺	C ₅ H ₇ N ₅	腺嘌呤
2	1.48	517.134 3	0.2	[M+H] ⁺	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₂	异绿原酸
3	1.87	163.039 5	0.2	[M+H] ⁺	C ₉ H ₈ O ₃	7-羟基香豆素
4	1.98	195.065 4	0.3	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	阿魏酸
5	2.33	147.044 7	0.7	[M+H] ⁺	C ₉ H ₈ O ₂	香豆素
6	2.79	319.043 9	-0.9	[M+H] ⁺	C ₁₃ H ₁₀ O ₈	杨梅素
7	2.92	303.049 2	-0.7	[M+H] ⁺	C ₁₃ H ₁₀ O ₇	槲皮素
8	3.03	179.106 6	-0.9	[M+H] ⁺	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	甲基丁香酚
9	3.41	287.054 2	-0.9	[M+H] ⁺	C ₁₂ H ₁₀ O ₆	山奈酚
10	5.94	167.070 4	0.1	[M+H] ⁺	C ₁₁ H ₁₄ O ₃	2-羟基-5-甲氧基苯乙酮
11	6.44	471.344 8	-2.1	[M+H] ⁺	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	南五味子酸
12	6.72	335.218 8	-2.9	[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	14-去氧穿心莲内酯
13	7.16	301.140 5	-2.9	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₂₀ O ₄	反式-3,3',5,5'-四甲氧基二苯乙烯
14	7.67	527.349 4	-3.0	[M+H] ⁺	C ₃₂ H ₄₈ O ₆	射干醛
15	8.08	441.370 7	-2.1	[M+H] ⁺	C ₃₀ H ₄₈ O ₂	异栝楼仁二醇
16	8.11	661.392 1	-1.2	[M+H] ⁺	C ₃₇ H ₅₆ O ₁₀	脱氧升麻烃
17	8.69	409.113 9	1.0	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₂₀ O ₁₀	凯林葡萄糖苷
18	8.75	435.354 2	-1.8	[M+H] ⁺	C ₃₀ H ₄₆ O ₂	5-脱氢栝楼仁二醇
19	8.84	246.230 0	-0.7	[M+H] ⁺	C ₁₄ H ₁₀	(3,3-二甲基)癸基苯
20	9.87	705.582 1	-3.0	[M+H] ⁺	C ₃₉ H ₆₀ O ₁₁	去甲基鞣果酸皂苷元-木糖-阿拉伯糖皂苷

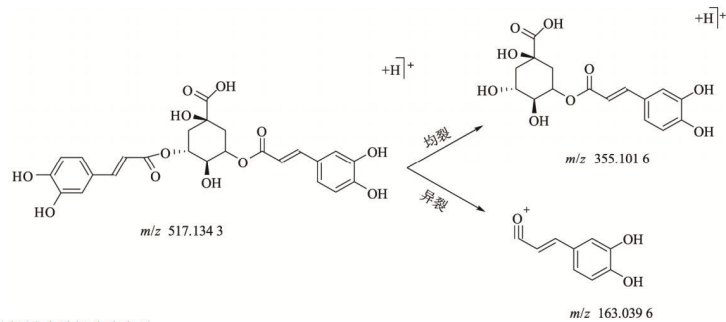


图2 异绿原酸裂解碎片离子

Fig. 2 Fragmentation ion of isochlorogenic acid

化合物 4: 保留时间 1.98 min, 在正离子模式下, $[M+H]^+$ 准分子离子峰为 195.065 4, 化学式为 $C_{10}H_{10}O_4$, 其二级质谱显示主要碎片离子峰为 m/z 177.054 7, 163.043 3, 准分子离子先失去 1 分子 H_2O 形成 $[M+H-H_2O]^+$ 碎片峰 m/z 177.054 7, 准分子离子也可能会先失去 1 分子 CH_3OH 形成 $[M+H-CH_3OH]^+$ 碎片峰 m/z 163.043 3, 且单个化合物的离子图响应值与总离子流图对应, 结合数据库信息与文献报道^[26-27], 推定化合物 4 为阿魏酸。在正离子模式下, 阿魏酸的酚羟基和甲氧基

比羧基优先接受 H^+ , 按图 3 方式进行裂解, 从而产生 177.054 7, 163.043 3 几个主要的碎片离子峰。

化合物 9: 保留时间 3.41 min, 在正离子模式下, $[M+H]^+$ 准分子离子峰为 287.054 2, 化学式为 $C_{15}H_{10}O_6$ 。其二级质谱显示产生 m/z 163.045 9, 153.018 4 的碎片离子峰, 且单个化合物的离子图响应值与总离子流图对应, 结合数据库信息与文献报道^[28-29], 推定化合物 9 为山奈酚。山奈酚按图 4 所示的方式裂解产生了上述碎片离子。

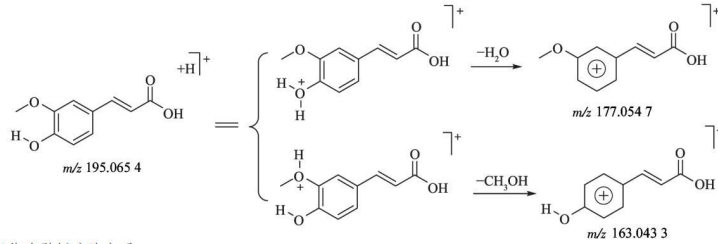


图 3 阿魏酸裂解碎片离子
Fig. 3 Fragmentation ion of ferulic acid

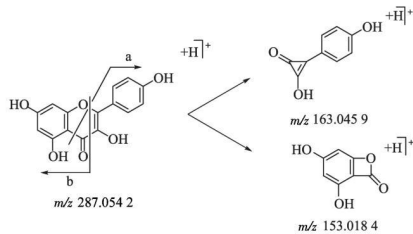


图 4 山奈酚裂解碎片离子
Fig. 4 Fragmentation ion of kaempferol

3.3 α -葡萄糖苷酶抑制活性

通过与 α -葡萄糖苷酶一些关键的氨基酸残基结合, 抑制该酶水解 α -葡萄糖苷键的活性, 降低单位时间内进入血液的葡萄糖的量, 从而能有效降低餐后血糖。本实验对青钱柳叶水提物和 UPLC-Q-TOF-MS 分析出的成分中可获得标样的物质进行了 α -葡萄糖苷酶的抑制活性测定, 以阿卡波糖为阳性对照组, 结果见表 2。青钱柳叶水提物显示出 $[IC_{50}=(16.42\pm 2.83)\mu g \cdot mL^{-1}]$ 比阳性对照组阿卡波糖 $[IC_{50}=(25.30\pm 1.07)\mu g \cdot mL^{-1}]$ 更好的活性, 与 Ning 等^[14]报道的结果一致。在所测试的组分中,

桑色素活性最好, IC_{50} 达 $(3.98\pm 1.38)\mu g \cdot mL^{-1}$, 是阿卡波糖活性的 6 倍, 是青钱柳叶水提物的 4 倍, 其余成分的活性比青钱柳叶水提物更低, 这说明青钱柳叶中各成分间存在协同作用。此外还观察到分子结构与活性存在明显的相关性, 杨梅素、山奈酚的结构差别主要是 B 环上羟基数目及位置的不同, 杨梅素在 C-3'、C-4'、C-5' 含有 3 个羟基, 而山奈酚仅在 C-4' 位含有 1 个羟基, 酶活性的检测结果表明杨梅素比山奈酚有更高的 α -葡萄糖苷酶抑制活性。桑色素、7-羟基香豆素和甲基丁香酚为首次在青钱柳叶中发现的 α -葡萄糖苷酶抑制剂。

表 2 青钱柳叶水提物与单个化合物对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性

Tab. 2 α -Glucosidase inhibitory activity of total extract and single compound from water extract of *Cyclocarya paliurus* leaves

样品	IC_{50}	样品	IC_{50}
阿卡波糖	25.30±1.07	香豆素	-12.65±0.71 ^a
青钱柳叶水提物	16.42±2.83	杨梅素	61.99±2.09
腺嘌呤	77.07±2.81	桑色素	3.98±1.38
7-羟基香豆素	33.48±2.54	甲基丁香酚	34.63±4.66
阿魏酸	91.10±1.86	山奈酚	32.24±1.27

注: ^a为 $125 \mu g \cdot mL^{-1}$ 浓度下的抑制率值。
Note: ^ameant inhibition rate value under $125 \mu g \cdot mL^{-1}$ concentration.

3.4 青钱柳叶水提取物对糖尿病小鼠的作用

3.4.1 对小鼠体质量的影响 糖尿病具有“三多一少”即多饮、多食、多尿、体质量低的特征，因此，在进行青钱柳叶水提取物对糖尿病小鼠的降糖效果试验时，以其最明显的特征作为药效分析，随着症状的减缓，可以定性了解药物的药效。在糖尿病小鼠治疗期间，对每天的饮食和饮水状况进行记录，发现糖尿病小鼠在造模后出现多饮、多食的状况，随着药物的治疗，21 d 后糖尿病各组小鼠的饮食量均有所减少。在此期间通过垫料的潮湿情况判断

出小鼠多尿现象逐渐缓解，毛发也从最初暗黄色逐渐变白，糖尿病症状逐渐减弱，体质量上升，结果见表 3。给药第 21 天，青钱柳高剂量组增重快于阳性对照组，同时与模型组相比，不同剂量的青钱柳叶水提取物对小鼠体质量的影响均有统计学意义 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。小鼠治疗阶段与灌药前相比的体质量增量，正常组上升最显著，其他组有不同程度的增加，其中青钱柳叶水提取物高剂量组较为显著，结果表明，青钱柳叶水提取物高剂量组能有效阻止糖尿病小鼠的体质量减轻。结果见图 5。

表 3 青钱柳叶水提取物对糖尿病小鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab. 3 Effect of water extract of *Cyclocarya paliurus* leaves on weight of diabetic mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

分组	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	体质量/g			
		灌药前	第 7 天	第 14 天	第 21 天
正常组	—	22.58±0.96	26.73±1.68 ²⁾	28.02±1.43 ²⁾	29.64±1.50 ²⁾
模型组	—	17.93±2.84	18.86±2.70	18.59±1.63	19.30±0.18
阳性对照组	200	19.93±1.55	20.91±1.27	21.36±1.36 ¹⁾	22.96±0.96 ²⁾
青钱柳叶水提取物高剂量组	2 000	20.10±2.45	21.45±1.76	22.34±0.78 ¹⁾	24.80±1.23 ²⁾
青钱柳叶水提取物中剂量组	1 000	19.70±1.13	20.60±1.44	22.75±1.82 ²⁾	23.14±1.11 ²⁾
青钱柳叶水提取物低剂量组	500	19.97±0.78	19.61±1.44	20.62±2.12	22.06±1.32 ¹⁾

注：与模型组相比，¹⁾ $P<0.05$ ，²⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with model group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

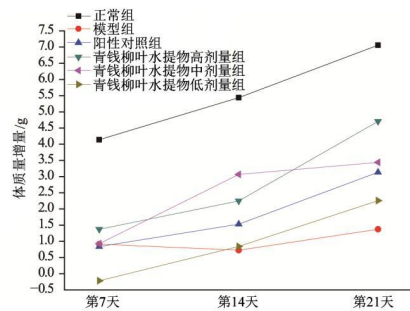


图 5 小鼠体质量随灌药时间的增量曲线图

Fig. 5 Graph of the increment of weight in mice with the time of infusion

3.4.2 对小鼠 FBG 的影响 糖尿病小鼠在给药期间，每周断食 12 h 后尾静脉采血，用罗氏血糖仪测 FBG。灌胃给药 21 d 内，血糖下降率总体呈上升趋势，模型组血糖下降最缓慢，3 个剂量组均表现出显著的降糖疗效 ($P<0.05$)，高剂量组疗效最佳，与阳性对照组相当。第 14 天的整体血糖下降率最显著，尤其青钱柳叶水提取物高剂量组和阳性对照组，青钱柳叶水提取物高剂量组血糖下降率达 50.8%，比模型组高 30.1%，比阳性对照组高

7.18%。在给药的第 21 天，药物组均持续表现较好的降糖率，值得注意的是与第 14 天相比，低、中剂量降糖率持续提升更为显著，表明虽然青钱柳叶水提取物高剂量组的疗效比中低剂量组更好，但长期的中、低剂量服用也能达到较好的疗效，而且从理论而言，低剂量不良反应风险较小，虽然目前并没有文献表明青钱柳有明显的不良反应。结果见图 6。

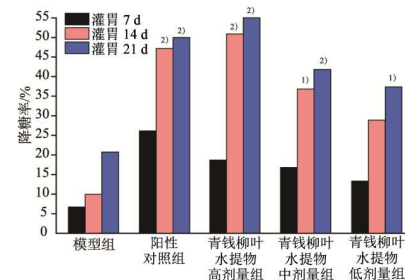


图 6 小鼠血糖率随灌药时间下降柱状图 ($n=10$)

与模型组相比，¹⁾ $P<0.05$ ，²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 6 Histogram of the decrease of blood glucose rate in mice with the time of infusion ($n=10$)

3.4.3 青钱柳叶水提取物对小鼠睾丸组织的影响

睾丸的结构和功能受神经内分泌系统的调节,糖尿病“三高现象”连锁反应,糖基化终末产物的大量形成诱发不同程度脑细胞水肿和皱缩效应,影响下丘脑和垂体功能的正常发挥,导致睾丸失去正常调节,出现相应的结构和功能异常^[30]。天然产物对糖尿病引起的睾丸损害有一定的修复作用^[31-33]。各组小鼠睾丸组织切片见图7,镜下可见正常小鼠睾丸中单个完整且排列紧密的生精小管,各级生精细胞排列规则,管腔内可见密集精子。模型组小鼠睾丸的各级生精细胞层数减少,可见生精细胞从基膜脱离,排列紊乱,精子数量减少,大部分管腔内未见精子。药物组生精小管及各级生精细胞形态基本正常,生精细胞排列规则,与模型组比管腔内精子较多,高、中、低剂量组对各级生精细胞表现出不同程度的修复作用,存在剂量依赖关系,高剂量组效果最好,其睾丸组织切片与正常组和阳性对照组相似。

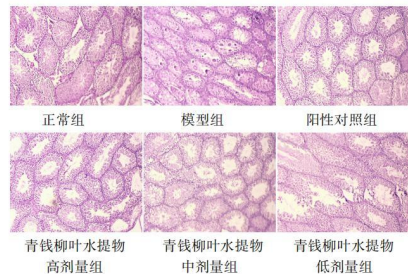


图7 睾丸组织切片图(HE, 200×)

Fig.7 Section diagram of testicular tissue(HE, 200×)

4 讨论

本实验采用UPLC-Q-TOF-MS检测出青钱柳叶水提取物中70个化学组分,鉴定出20个组分。对可获得标样的8个主要化合物进行了 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定,发现青钱柳中3个新的 α -葡萄糖苷酶抑制剂: 桑色素、7-羟基香豆素和甲基丁香酚。在8个测定的化合物中桑色素活性最好 $[IC_{50} = (3.98 \pm 1.38) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}]$,是阳性对照组阿卡波糖的6倍,可以作为新型 α -葡萄糖苷酶抑制剂研究的先导化合物。通过青钱柳叶提取物对糖尿病小鼠的治疗,结果表明该水提取物不仅可以显著降低小鼠FBG,而且对糖尿病损伤的睾丸组织表现出良好的修复作用,这些结果为扩展青钱柳叶的应用范围奠定基础。

中国现代应用药学 2021 年 1 月第 38 卷第 2 期

REFERENCES

- [1] LU J M. Updated key points of 2013 China guideline for type 2 diabetes[J]. Chin J Dia(中国糖尿病杂志), 2014, 22(10): 865-869.
- [2] TONG X L, NI Q, WEI J P, et al. Diabetes TCM diagnosis and treatment standard[J]. World J Integr Tradit West Med(世界中西医结合杂志), 2011(6): 540-547.
- [3] BROWNLEE M. The pathobiology of diabetic complications: A unifying mechanism[J]. Diabetes, 2005, 54(6): 1615-1625.
- [4] LIANG Y S, ZENG Y, ZHU Z W, et al. Effect of Tibetan medicine Jikan-Mingmu formula on diabetic retinopathy rats[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2020, 37(11): 1281-1289.
- [5] IDF Diabetes atlas. 9th edition: International diabetes federation[J/OL]. 2019. <http://www.diabetesatlas.org/en/>.
- [6] XU S S, ZHANG H B, ZHOU J P, et al. Advances of new antidiabetic drugs[J]. Jcpu, 2011, 42(2): 97-106.
- [7] JOHNSON J A, SIMPSON S H, EURICH D T, et al. Comment on: Evans JM, Ogston SA, Emslie-Smith A, Morris A (2006) Risk of mortality and adverse cardiovascular outcomes in type 2 diabetes: A comparison of patients treated with sulfonylureas and metformin. Diabetologia 49: 930-936[J]. Diabetologia, 2006, 49(11): 2805-2806.
- [8] WU T Z, TRAHAIR L G, LITTLE T J, et al. Effects of vildagliptin and metformin on blood pressure and heart rate responses to small intestinal glucose in type 2 diabetes[J]. Dia Care, 2017, 40(5): 702-705.
- [9] TIAN J X, JIN D, BAO Q, et al. Evidence and potential mechanisms of traditional Chinese medicine for the treatment of type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis[J]. Diabetes Obes Metab, 2019, 21(8): 1801-1816.
- [10] ZOU R C, WU S J, JIAO S Q, et al. Research progress of extraction, isolation, purification and bioactivities of polysaccharides from *Cyclocarya paliurus*[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(4): 603-608.
- [11] SHIN S O, SEO H J, PARK H, et al. Effects of mulberry leaf extract on blood glucose and serum lipid profiles in patients with type 2 diabetes mellitus: A systematic review[J]. Eur J Integr Med, 2016, 8(5): 602-608.
- [12] KURIHARA H, FUKAMI H, KUSUMOTO A, et al. Hypoglycemic action of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja in normal and diabetic mice[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2003, 67(4): 877-880.
- [13] WANG Q Q, JIANG C H, FANG S Z, et al. Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antioxidant effects of ethanol and aqueous extracts of *Cyclocarya paliurus* leaves in type 2 diabetic rats[J]. J Ethnopharmacol, 2013, 150(3): 1119-1127.
- [14] NING Z W, ZHAI L X, HUANG T, et al. Identification of α -glucosidase inhibitors from *Cyclocarya paliurus* tea leaves using UF-UPLC-Q/TOF-MS/MS and molecular docking[J]. Food Funct, 2019, 10(4): 1893-1902.
- [15] DONG Y S, HU Y, YANG W X, et al. Study on chemical constituents and α -glucosidase inhibitory activity of *Cyclocarya paliurus* in Guizhou province[J]. Nat Prad Res Dev(天然产物研究与开发), 2019(31): 940-945.
- [16] ZHU K N, JIANG C H, TIAN Y S, et al. Two triterpenoids from *Cyclocarya paliurus* (Batal) Iljinsk (Juglandaceae) promote glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes: The

Chin J Mod Appl Pharm, 2021 January, Vol.38 No.2

· 135 ·

3.4.3 青钱柳叶水提物对小鼠睾丸组织的影响

睾丸的结构和功能受神经内分泌系统的调节,糖尿病“三高现象”连锁反应,糖基化终末产物的大量形成诱发不同程度脑细胞水肿和皱缩效应,影响下丘脑和垂体功能的正常发挥,导致睾丸失去正常调节,出现相应的结构和功能异常^[30]。天然产物对糖尿病引起的睾丸损害有一定的修复作用^[31-33]。各组小鼠睾丸组织切片见图7,镜下可见正常小鼠睾丸中单个完整且排列紧密的生精小管,各级生精细胞排列规则,管腔内可见密集精子。模型组小鼠睾丸的各级生精细胞层数减少,可见生精细胞从基膜脱离,排列紊乱,精子数量减少,大部分管腔内未见精子。药物组生精小管及各级生精细胞形态基本正常,生精细胞排列规则,与模型组比管腔内精子较多,高、中、低剂量组对各级生精细胞表现出不同程度的修复作用,存在剂量依赖关系,高剂量组效果最好,其睾丸组织切片与正常组和阳性对照组相似。

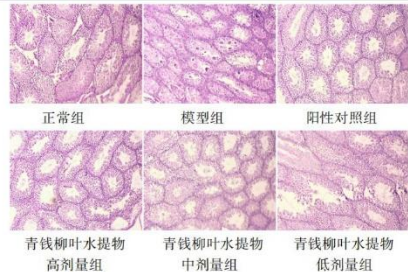


图7 睾丸组织切片图(HE, 200×)

Fig. 7 Section diagram of testicular tissue(HE, 200×)

4 讨论

本实验采用 UPLC-Q-TOF-MS 检测出青钱柳叶水提物中 70 个化学组分, 鉴定出 20 个组分。对可获得标样的 8 个主要化合物进行了 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定, 发现青钱柳中 3 个新的 α -葡萄糖苷酶抑制剂: 桑色素、7-羟基香豆素和甲基丁香酚。在 8 个测定的化合物中桑色素活性最好 [$IC_{50} = (3.98 \pm 1.38) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$], 是阳性对照组阿卡波糖的 6 倍, 可以作为新型 α -葡萄糖苷酶抑制剂研究的先导化合物。通过青钱柳叶提取物对糖尿病小鼠的治疗, 结果表明该水提物不仅可以显著降低小鼠 FBG, 而且对糖尿病损伤的睾丸组织表现出良好的修复作用, 这些结果为扩展青钱柳叶的应用范围奠定基础。

中国现代应用药学 2021 年 1 月第 38 卷第 2 期

REFERENCES

- [1] LU J M. Updated key points of 2013 China guideline for type 2 diabetes[J]. Chin J Dia(中国糖尿病杂志), 2014, 22(10): 865-869.
- [2] TONG X L, NI Q, WEI J P, et al. Diabetes TCM diagnosis and treatment standard[J]. World J Integr Tradit West Med(世界中西医结合杂志), 2011(6): 540-547.
- [3] BROWNLEE M. The pathobiology of diabetic complications: A unifying mechanism[J]. Diabetes, 2005, 54(6): 1615-1625.
- [4] LIANG Y S, ZENG Y, ZHU Z W, et al. Effect of Tibetan medicine Jikan Mingmu formula on diabetic retinopathy rats[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2020, 37(11): 1281-1289.
- [5] IDF Diabetes atlas. 9th edition: International diabetes federation[J/OL]. 2019. <http://www.diabetesatlas.org/en/>.
- [6] XU S S, ZHANG H B, ZHOU J P, et al. Advances of new antidiabetic drugs[J]. Jcpu, 2011, 42(2): 97-106.
- [7] JOHNSON J A, SIMPSON S H, EURICH D T, et al. Comment on: Evans JM, Ogston SA, Emslie-Smith A, Morris A (2006) Risk of mortality and adverse cardiovascular outcomes in type 2 diabetes: A comparison of patients treated with sulfonylureas and metformin. Diabetologia 49: 930-936[J]. Diabetologia, 2006, 49(11): 2805-2806.
- [8] WU T Z, TRAHAIR L G, LITTLE T J, et al. Effects of vildagliptin and metformin on blood pressure and heart rate responses to small intestinal glucose in type 2 diabetes[J]. Dia Care, 2017, 40(5): 702-705.
- [9] TIAN J X, JIN D, BAO Q, et al. Evidence and potential mechanisms of traditional Chinese medicine for the treatment of type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis[J]. Diabetes Obes Metab, 2019, 21(8): 1801-1816.
- [10] ZOU R C, WU S J, JIAO S Q, et al. Research progress of extraction, isolation, purification and bioactivities of polysaccharides from *Cyclocarya paliurus*[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(4): 603-608.
- [11] SHIN S O, SEO H J, PARK H, et al. Effects of mulberry leaf extract on blood glucose and serum lipid profiles in patients with type 2 diabetes mellitus: A systematic review[J]. Eur J Integr Med, 2016, 8(5): 602-608.
- [12] KURIHARA H, FUKAMI H, KUSUMOTO A, et al. Hypoglycemic action of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja in normal and diabetic mice[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2003, 67(4): 877-880.
- [13] WANG Q Q, JIANG C H, FANG S Z, et al. Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antioxidant effects of ethanol and aqueous extracts of *Cyclocarya paliurus* leaves in type 2 diabetic rats[J]. J Ethnopharmacol, 2013, 150(3): 1119-1127.
- [14] NING Z W, ZHAI L X, HUANG T, et al. Identification of α -glucosidase inhibitors from *Cyclocarya paliurus* tea leaves using UF-UPLC-Q/TOF-MS/MS and molecular docking[J]. Food Funct, 2019, 10(4): 1893-1902.
- [15] DONG Y S, HU Y, YANG W X, et al. Study on chemical constituents and α -glucosidase inhibitory activity of *Cyclocarya paliurus* in Guizhou province[J]. Nat Prad Res Dev(天然产物研究与开发), 2019(31): 940-945.
- [16] ZHU K N, JIANG C H, TIAN Y S, et al. Two triterpenoids from *Cyclocarya paliurus* (Batal) Iljinsk (Juglandaceae) promote glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes: The

Chin J Mod Appl Pharm, 2021 January, Vol.38 No.2

· 135 ·

- relationship to AMPK activation[J]. *Phytomedicine*, 2015, 22(9): 837-846.
- [17] LI J, LUO M, LUO Z, et al. Transcriptome profiling reveals the anti-diabetic molecular mechanism of *Cyclocarya paliurus* polysaccharides[J]. *J Funct Foods*, 2019(55): 1-8.
- [18] KAN M C. The ameliorate effects of Hawthorn Leaves Flavonoids on the testicular tissue lesion in type 2 diabetic mellitus rats[J]. *Modern J Integr Tradit West Med(现代中西医结合杂志)*, 2016, 25(18): 1957-1960.
- [19] ZHAO H G, PU C N, GONG S L. Diabetic damage to male reproduction and its mechanism[J]. *Nati J Androl(中华男科学杂志)*, 2004, 10(10): 767-770.
- [20] MAO S Z, CHEN G R, LEI K F, et al. Protective effect of Ginkgo biloba extract on testicular tissue of diabetic rats[J]. *Chin J Pathophysiol(中国病理生理杂志)*, 2004, 20(7): 121-125.
- [21] WANG L Z, WANG Z X, MA X W. Study on the protective effect of crocin on testicular tissue injury caused by diabetes mellitus[J]. *Tianjin J Tradit Chin Med(天津中医药)*, 2019, 36(5): 491-494.
- [22] WANG L L, GAO X M, JIA L, et al. Effects of *Cyclocarya paliurus* on early kidney injury markers and oxidative stress in T2DM rats[J]. *Globel Tradit Chin Med(环球中医药)*, 2020, 13(3): 349-353.
- [23] LIN Q Y, PU H L, GUAN H D, et al. Rapid identification and pharmacokinetic studies of multiple active alkaloids in rat plasma through UPLC-Q-TOF-MS and UPLC-MS/MS after the oral administration of *Zanthoxylum nitidum* extract[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020(186): 113232. Doi: 10.1016/j.jpba.2020.113232.
- [24] QIN W H, YANG Y, LI Q, et al. Analysis of chemical compositions from Nepal Cordyceps by UPLC-Q-TOF-MS[J]. *Chin J New Drugs(中国新药杂志)*, 2019, 28(13): 1574-1581.
- [25] GUO M N, LIU S X, ZHAO Y M, et al. Analysis on chemical constituents in Bupleuri Radix by HPLC-Q-TOF-MS[J]. *Chin Tradit Herbal Drugs(中草药)*, 2016, 47(12): 2044-2052.
- [26] YANG F, XIAO Y S, ZHANG F F, et al. High performance liquid chromatography-mass spectrometry analysis of *Radix Angelica Scientis*[J]. *Acta Pharm Sin(药理学学报)*, 2006, 41(11): 1078-1083.
- [27] ZHANG M T, BI A Y, ZHANG X, et al. Evaluate effects of different drying methods on quality of Tianshu capsule on substance basis[J]. *Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志)*, 2017, 42(18): 3537-3545.
- [28] ZHANG Y Z, CHEN H B. Investigations of the fragmentation behavior of 11 isoflavones with ESI-IT-TOF-MSn[J]. *J Chin Pharm Sci*, 2014, 23(9): 631. Doi: 10.5246/jcps.2014.09.081.
- [29] XU S F, CHEN W J, CAO W. Fragmentation pathway of Kaempferol in electrospray[J]. *Chin J Appl Chem(应用化学)*, 2009, 26(10): 1250-1252.
- [30] PAN L. *Pathological Atlas of Experimental Diabetes*[M]. Beijing Science Press(北京科学出版社), 2007, 153-156.
- [31] MADIAS J E. An animal model of diabetic peripheral neuropathy and the pathophysiology of takotsubo syndrome: A proposal of an experiment[J]. *Int J Cardiol*, 2016(222): 882-884.
- [32] WANG L Z, WANG Z X, MA X W. Study on the protective effect of crocin on testicular tissue injury caused by diabetes mellitus[J]. *Tianjin J Tradit Chin Med(天津中医药)*, 2019, 36(5): 491-494.
- [33] LANG M Y, XU C K, GUO J. Research progress on clinical application of hypoglycemic Chinese medicine[J]. *World Latest Med Inform(世界最新医学信息文摘)*, 2018, 18(80): 94-96.

收稿日期: 2020-04-16
(本文责编: 蔡珊珊)