

## 柿叶不同溶剂萃取物对糖尿病小鼠抗氧化能力的影响

邓航<sup>1,2</sup>, 温庆伟<sup>1</sup>, 罗昱澜<sup>2</sup>, 黄媛恒<sup>1</sup>, 黄仁彬<sup>1</sup>

(1. 广西医科大学药学院, 南宁 530021; 2. 桂林医学院附属医院, 广西 桂林 541001)

**[摘要]** 目的: 研究柿叶不同溶剂萃取物对链脲佐菌素 (STZ) 糖尿病模型小鼠抗氧化能力的影响。方法: 柿叶乙醇总提物分别用氯仿、乙酸乙酯、正丁醇依次萃取, 得到不同溶剂萃取物。经乙醇提取后得到柿叶残渣, 经水煮乙醇沉淀后得水提醇沉萃取物。将实验小鼠随机分成: 正常对照组, 模型组, 格列本脲组 [25 mg/(kg.d)], 不同溶剂萃取物低、高剂量组。连续灌胃给药 15 d, 在相应时间采血测定丙二醛 (MDA)、超氧化歧化酶 (SOD) 等指标。结果: 乙酸乙酯萃取物和水提醇沉萃取物显著降低 STZ 所致糖尿病小鼠肝脏 MDA 含量和提高肝脏 SOD 活力 ( $P < 0.01$  或  $0.05$ ), 提高肝脏抗氧化能力; 氯仿萃取物和正丁醇萃取物对 STZ 所致糖尿病小鼠无抗氧化作用。结论: 提高糖尿病小鼠机体抗氧化能力可能是柿叶乙酸乙酯萃取物和水提醇沉萃取物降糖作用的机制之一。

**[关键词]** 柿叶; 乙酸乙酯萃取物; 水提醇沉萃取物; 降血糖作用; SOD

DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2012.05.007

## Influence of different extracts from persimmon leaves on the antioxidant activity in diabetic mice

DENG Hang<sup>1,2</sup>, WEN Qingwei<sup>1</sup>, LUO Yulan<sup>2</sup>, HUANG Yuanheng<sup>1</sup>, HUANG Renbin<sup>1</sup>

(1. Pharmaceutical School, Guangxi Medical University, Nanning 530021; 2. Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin Guangxi 541001, China)

### ABSTRACT

**Objective:** To investigate the antioxidant effect of different solvent extracts from persimmon leaves (PL) in diabetic mice induced by streptozotocin (STZ).

**Methods:** The total ethanol-extracted fraction of PL was further extracted with chloroform, ethyl acetate and n-butanol, in that order, the residues after ethanol extraction were water-extracted and alcohol-precipitated, and concentrated. The hypoglycemic effects of different solvents extracts from PL were evaluated in diabetic mice induced by STZ. The experimental mice were randomly divided into groups: control group, model group, glibenclamide group, low and high dosage groups of the various solvent extracts. The drugs were administrated to mice in every morning for 15 days. During this time period, the contents of malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) were determined.

**Results:** The water-extracted and ethanol-precipitated fractions and the ethyl acetate-extracted fraction markedly reduced the content of MDA and increased the activity of SOD in the livers of STZ-induced diabetic mice ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). The chloroform-extracted and n-butanol-extracted

收稿日期 (Date of reception): 2012-01-21

作者简介 (Biography): 邓航, 硕士, 副主任药师, 主要从事抗糖尿病药物的研究。

通信作者 (Corresponding author): 黄仁彬, Email: huangrenbin518@163.com

基金项目 (Foundation item): 广西省自然科学基金 (桂科自 0832013Z)。 This work was supported by Guangxi Provincial Natural Science Foundation, P. R. China (0832013Z).

fraction did not markedly reduce the content of MDA nor increase the activity of SOD in liver of STZ-induced diabetic mice ( $P>0.05$ ).

**Conclusion:** The ethyl acetate-extracted fraction, water-extracted and ethanol-precipitated fraction of persimmon leaves have potential value in the treatment of diabetes. The mechanism of action of the antioxidant is related to the hypoglycemic effects of extracts from persimmon leaves.

## KEY WORDS

persimmon leaves; ethyl acetate-extracted fraction; water-extracted and ethanol-precipitated fraction; hypoglycemic effect; superoxide dismutase

柿叶为柿科植物柿的树叶, 全国大部分地区均有分布。柿叶<sup>[1-5]</sup>可作为药用或有可能成为药物。柿叶入药, 始见于明代《滇南本草》, 以后诸家本草及医药书多有记载。近年来的研究<sup>[1,4,6-7]</sup>表明其有降血糖的作用。本实验比较了柿叶不同溶剂萃取物对链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)糖尿病模型小鼠血糖及抗氧化能力的影响, 初步探讨柿叶降血糖的作用机制, 为进一步研究柿叶降血糖的有效成分, 开发和利用新的柿叶制剂用于糖尿病的临床治疗提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 柿叶不同溶剂萃取物的制备

柿叶(经广西中医药研究所鉴定, 产地: 广西灵山县)500 g 粉碎, 粗粉用70%乙醇冷浸30 min后, 回流提取2 h, 纱布过滤, 滤液用布氏漏斗抽滤后于旋转蒸发器减压浓缩, 浓缩液依次用石油醚和氯仿/乙酸乙酯/正丁醇萃取, 分别减压浓缩氯仿、乙酸乙酯、正丁醇萃取液, 真空干燥后研碎得氯仿萃取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物。

乙醇提取后柿叶残渣, 加水煮沸, 微沸1.5 h, 过滤, 滤渣加水煮沸, 微沸1.5 h, 合并滤液, 滤液于3000 r/min离心20 min, 取上清液于微波干燥器浓缩, 浓缩液加95%乙醇, 混匀、静置24 h, 抽滤, 滤渣依次用无水乙醇、丙酮各洗涤5次, 挥干溶剂后, 得水提醇沉萃取物。

### 1.2 动物

清洁级昆明种小鼠, 雌雄兼有, 体质量( $25 \pm 3$ ) g, 购自广西医科大学实验动物中心, 合格证号SCXK桂2003-0003; 动物饲料为广西医科大学实验动物中心生产(标准饲料)。

### 1.3 药物与试剂

STZ为深圳晶美公司进口分装, Product ID:380-010-G001。格列本脲(Glibenclamide)购自浙江南洋药业有限公司, 规格2.5 mg/片, 批号20051101。血糖试剂盒为四川迈克科技股份有限公司生产, 批号1106121。吐温-80为广东汕头市西陇化工厂生产, 批号: 0507081。丙二醛(MDA)测定试剂盒(批号20061206)、超氧化物歧化酶(SOD)测试盒(批号20070131)、考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒(批号20070103)均购自南京建成生物工程研究所第一分所。

### 1.4 仪器

722S紫外分光光度计为上海精密科学仪器有限公司产品; RE-52旋转式蒸发器为上海安亭实验仪器有限公司产品; FJ-200高速分散匀质机为上海标本模型制造厂产品。高速冷冻离心机TGL-16G-A为上海市金鹏分析仪器有限公司产品; 微波真空干燥机WBZ-2为贵阳新奇微波工业有限责任公司产品。

### 1.5 小鼠糖尿病模型建立

小鼠禁食12 h, 按文献[6]方法并做预试验后, 以150 mg/kg STZ行腹腔注射(STZ溶于0.1 mol/L, pH4.2的柠檬酸/柠檬酸钠缓冲液中, 现配现用, 冰浴保存)。正常对照组小鼠腹腔注射等量上述缓冲液。72 h后(小鼠采血前禁食12 h)眼内眦采血50  $\mu$ L, 用生理盐水稀释5倍, 于离心机3500 r/min离心15 min, 分离血清, 用葡萄糖试剂盒测定小鼠空腹血糖(FBG), 凡FBG  $\geq 11.1$  mmol/L视为糖尿病动物模型<sup>[8]</sup>。

### 1.6 分组及给药

将成模小鼠110只随机分为模型组、格列本脲组、不同溶剂萃取物低、高剂量组( $n=10$ )。各组

小鼠自由饮水、每组小鼠每日分上午和下午 2 次给予同样量饲料, 以适当控制摄食。

灌胃给药: 格列本脲组 [25 mg/(kg·d)], 氯仿萃取物低、高剂量组 [分别为 187.5, 750 mg/(kg·d)], 乙酸乙酯萃取物低、高剂量组 [分别为 62.5, 250 mg/(kg·d)], 正丁醇萃取物低、高剂量组 [分别为 31.25, 125 mg/(kg·d)], 水提醇沉物低、高剂量组 [分别为 150, 600 mg/(kg·d)], 用时配成等体积不同浓度溶液 (每 10 g 小鼠灌胃 0.1 mL)。氯仿萃取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物、水提醇沉萃取物用无水乙醇、吐温-80、蒸馏水按 1:1:10 的比例配成溶液。成模后第 2 天开始给药, 每天上午空腹给药 1 次, 连续灌胃 15 d。正常对照组和模型组小鼠每 10 g 灌胃 0.1 mL 空白溶剂 (无水乙醇:吐温-80、蒸馏水按 1:1:10 比例配制)。

## 1.7 指标测定

### 1.7.1 一般指标

观察小鼠的精神活动、毛发改变、饮水量、进食量、大小便等一般状态, 并记录体质量变化情况、死亡情况等。

### 1.7.2 血糖的测定

造模第 3 天用采血针刺破眼内眦, 取血 50  $\mu$ L, 用生理盐水稀释 5 倍, 于离心机 3500 r/min 离心 15 min, 分离血清, 用葡萄糖试剂盒测定小鼠 FBG。成模小鼠分组后第 2 天开始分别给予空白溶剂、格列本脲及高、低剂量柿叶不同溶剂萃取物, 以后分别在用药第 7 天, 第 15 天用葡萄糖氧化酶法测定各组 FBG。

### 1.7.3 肝组织中 MDA 和 SOD 测定

各组小鼠给药第 15 天采血后, 处死, 取肝组织, 用冰生理盐水清洗, 滤纸吸干, 称重后低温冰箱冷冻保存, 测定前取出用生理盐水配成 10% 肝组织液, 用高速匀质机制成 10% 肝组织匀浆, 于冷冻离心机 3000 r/min 离心 15 min, 取上清液按要求用生理盐水稀释一定倍数后用于肝组织蛋白含量、肝组织 MDA 和 SOD 测定。组织蛋白质含量测定采用考马斯亮蓝蛋白测定法; MDA 含量测定采用硫代巴比妥酸法; SOD 活性测定采用黄嘌呤氧化酶法。

## 1.8 统计学处理

采用 SPSS11.5. 统计软件进行统计分析, 数据采用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示, 各组间比较采用方差检验,  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各萃取物对 STZ 所致糖尿病小鼠的一般状况和血糖的影响

正常小鼠造模成功后出现小鼠精神萎靡, 形体消瘦、多食、多饮和多尿等症状, 成模小鼠体质量下降较快。灌胃给药后, 各组一般状况比较: 格列本脲组、乙酸乙酯萃取物高剂量组和水提醇沉萃取物高剂量组较其他组小鼠状态有较明显的改善, 精神状态良好, 病死率低, 体质量增长速度较糖尿病模型组稍快但差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

给药两周, 各组 FBG 均有不同程度的降低。与同期糖尿病模型组 FBG 比较, 格列本脲组, 氯仿萃取物高剂量组, 乙酸乙酯萃取物低、高剂量组, 水提醇沉萃取物低、高剂量组血糖均显著降低。降糖效果呈现一定的剂量依赖性和时间依赖性。正丁醇萃取物低、高剂量组血糖水平与同期糖尿病模型组比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。乙酸乙酯萃取物高剂量组与格列本脲组降血糖作用差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。各萃取物对 STZ 所致糖尿病小鼠血糖水平的影响见表 1。

除氯仿萃取高剂量组外, 其他各组降糖水平与观察到的小鼠一般状况、病死率一致, 血糖水平显著降低者, 糖尿病小鼠一般状态良好, 糖尿病症状有所改善、病死率低。

### 2.2 各萃取物对糖尿病小鼠肝组织 MDA 和 SOD 的影响

STZ 所致糖尿病各组小鼠肝组织中 MDA 值较正常组有显著增高, SOD 值显著降低。用药 15 d 后, 与模型组比较, 乙酸乙酯萃取物组、水提醇沉萃取物组能有效降低肝组织 MDA 值, 相应增高 SOD 活力 ( $P<0.01$  或 0.05, 表 2)。

表 1 各萃取物对 STZ 所致糖尿病小鼠血糖水平的影响 ( $n=10, \bar{x}\pm s$ )Table 1 Influence of different extracts from persimmon leaves on blood glucose levels in STZ-induced diabetic mice ( $n=10, \bar{x}\pm s$ )

组别	给药剂量/[mg/(kg·d)]	血糖/(mmol/L)			降糖率/%
		初始	7 d	15 d	
正常组		3.93 ± 1.34 <sup>**△</sup>	3.53 ± 1.48 <sup>**△</sup>	3.59 ± 1.15 <sup>**△</sup>	
模型组		17.08 ± 2.79 <sup>**</sup>	16.89 ± 4.61 <sup>**△</sup>	15.69 ± 3.31 <sup>**△△</sup>	8.14
格列本脲组	25	17.11 ± 3.24 <sup>**</sup>	13.26 ± 4.31 <sup>**</sup>	9.35 ± 2.36 <sup>**#</sup>	45.35
氯仿萃取物					
低剂量组	187.5	17.88 ± 2.34 <sup>**</sup>	15.12 ± 1.64 <sup>**</sup>	13.04 ± 4.14 <sup>**△</sup>	27.07
高剂量组	750	17.25 ± 2.15 <sup>**</sup>	14.54 ± 3.02 <sup>**</sup>	11.53 ± 3.59 <sup>**#</sup>	33.16
乙酸乙酯萃取物					
低剂量组	62.5	17.34 ± 3.73 <sup>**</sup>	13.21 ± 3.96 <sup>**</sup>	11.06 ± 2.52 <sup>**#</sup>	36.22
高剂量组	250	17.15 ± 2.82 <sup>**</sup>	13.02 ± 2.11 <sup>**#</sup>	9.36 ± 1.96 <sup>**#</sup>	45.23
正丁醇萃取物					
低剂量组	31.25	16.99 ± 2.43 <sup>**</sup>	16.17 ± 3.54 <sup>**△</sup>	15.60 ± 2.98 <sup>**△△</sup>	8.18
高剂量组	125	16.85 ± 2.88 <sup>**</sup>	16.67 ± 4.48 <sup>**△</sup>	15.26 ± 4.22 <sup>**△△</sup>	9.44
水提醇沉萃取物					
低剂量组	150	17.01 ± 3.20 <sup>**</sup>	15.14 ± 2.39 <sup>**</sup>	12.43 ± 3.66 <sup>**△</sup>	26.92
高剂量组	600	17.19 ± 3.05 <sup>**</sup>	15.17 ± 3.33 <sup>**</sup>	12.50 ± 3.22 <sup>**△</sup>	27.28

与模型组比较, <sup>\*</sup> $P<0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P<0.01$ ; 与正常组比较, <sup>\*</sup> $P<0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P<0.01$ ; 与格列本脲组比较, <sup>△</sup> $P<0.05$ , <sup>△△</sup> $P<0.01$ 。

表 2 各萃取物对 STZ 所致糖尿病小鼠肝组织 MDA 和 SOD 的影响 ( $n=10, \bar{x}\pm s$ )Table 2 Influence of different extracts from persimmon leaves on MDA and SOD in liver of STZ-induced diabetic mice ( $n=10, \bar{x}\pm s$ )

组别	肝组织 MDA 值/(nmol/mgprot)	肝组织 SOD 值/(U/mgprot)
正常组	9.63 ± 0.70 <sup>**</sup>	234.15 ± 27.19 <sup>**</sup>
模型组	15.18 ± 3.35 <sup>**△△</sup>	108.00 ± 10.47 <sup>**△△</sup>
格列本脲组	10.34 ± 1.43 <sup>**</sup>	200.30 ± 16.98 <sup>**</sup>
氯仿萃取物		
低剂量组	12.83 ± 1.05 <sup>**△</sup>	116.39 ± 11.10 <sup>**△△</sup>
高剂量组	12.92 ± 0.98 <sup>**△</sup>	116.11 ± 13.00 <sup>**△△</sup>
乙酸乙酯萃取物		
低剂量组	11.04 ± 1.24 <sup>**#</sup>	174.37 ± 26.68 <sup>**#</sup>
高剂量组	11.21 ± 1.15 <sup>**#</sup>	171.59 ± 17.63 <sup>**#</sup>
正丁醇萃取物		
低剂量组	13.90 ± 1.13 <sup>**△</sup>	120.37 ± 16.15 <sup>**△△</sup>
高剂量组	12.46 ± 2.15 <sup>**△</sup>	117.40 ± 10.88 <sup>**△△</sup>
水提醇沉萃取物		
低剂量组	11.49 ± 1.19 <sup>**#</sup>	178.59 ± 57.46 <sup>**#</sup>
高剂量组	10.63 ± 1.54 <sup>**</sup>	198.51 ± 32.20 <sup>**</sup>

与模型组比较, <sup>\*\*</sup> $P<0.01$ ; 与正常组比较, <sup>\*</sup> $P<0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P<0.01$ ; 与格列本脲组比较, <sup>△</sup> $P<0.05$ , <sup>△△</sup> $P<0.01$ 。

### 3 讨论

肝脏是胰岛素发挥作用的主要靶器官之一, 在调节机体糖代谢中发挥重要作用。据报道, 在糖尿病的发展过程中通常伴随自由基对肝组织的氧化损伤<sup>[9]</sup>。另据报道, STZ 诱导的糖尿病大鼠的肝细胞肿大、轻度变形, 肝窦变窄甚至消失, 肝

脏抗氧化能力显著下降<sup>[10]</sup>。自由基引起肝的损伤主要是由于自由基在体内不断的产生, 又由体内存在的酶抗氧化体系和非酶抗氧化体系对自由基进行清除, 但是当机体在病理情况下产生过多的自由基就会损害大分子, 引起脂质过氧化和膜损伤, 造成细胞膜不完整, 也可导致细胞骨架与细胞膜的连接被破坏, 从而导致肝细胞损伤<sup>[11]</sup>。



肝脏损伤的指标除了谷丙转氨酶 (ALT) 和谷草转氨酶 (GOT) 升高外, 通常还可表现为肝组织中 MDA 升高和 SOD 降低<sup>[9,10-12]</sup>。而药物对肝脏的保护作用则表现 MDA 的降低和 SOD 的升高<sup>[11-12]</sup>。本实验结果表明: 乙酸乙酯萃取物组、水提醇沉萃取物组能有效降低肝组织 MDA 值, 相应增高 SOD 活力 ( $P < 0.01$  或  $0.05$ ), 提示其能提高抗氧化酶活性, 增强机体的抗氧化能力, 清除活性氧自由基以解除自由基对肝脏和胰岛  $\beta$  细胞的损伤, 促进肝脏功能的恢复, 可能是柿叶降血糖作用的机制之一。同时, 本实验结果显示氯仿萃取物无抗氧化能力, 可能是该组虽降糖作用显著, 但小鼠一般状况差、病死率高的原因。Sakanaka 等<sup>[3]</sup> 研究也显示柿叶茶的水提物和甲醇提取物对超氧自由基、羟自由基均有较好的清除能力, 并证明柿叶黄酮具有明显的抗氧化作用, 可有效抑制脂质过氧化。

总之, 本实验提示从柿叶分离得到的乙酸乙酯萃取物、水提醇沉萃取物, 可能通过提高小鼠的抗氧化能力, 减少氧自由基对机体的损害而改善糖尿病小鼠机体状况, 使糖尿病小鼠的血糖水平降低、糖尿病症状改善及病死率降低, 从而为进一步研究柿叶降血糖的有效成分, 以及为开发和利用新的柿叶制剂用于糖尿病的临床治疗提供实验依据。

## 参考文献

- 唐竞. 柿叶及其产品在心血管病糖尿病防治方面的新进展[J]. 山西医药杂志, 2008, 37(8): 740-741.  
TANF Jing. New developments of prevention and treatment of cardiovascular disease and diabetes in persimmon and its products [J]. Shanxi Medical Journal, 2008, 37(8): 740-741.
- Lee JS, Lee MK, Haeral TY. Supplementation of whole persimmon leaf improves lipid profiles and suppress body weight gain in rats fed high-fat diet [J]. Food Chem Toxicol, 2006, 44(11): 1875-1883.
- Sakanaka S, Tachibana Y, Okada Y. Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (Kakinoka-cha) [J]. Food Chem, 2005, 89(11): 569-575.
- 邓航, 贺敏, 李江, 等. 柿叶多糖对糖尿病小鼠降血糖作用及其机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 114-117.  
DENG Hang, HE Ming, LI Jiang, et al. Hypoglycemic effect of persimmon leaf polysaccharide in diabetic mice induced by streptozotocin [J]. Chinese Journal of experimental traditional medical Formula, 2011, 17(4): 114-117.
- Thuong PT, Lee CH, Dao TT, et al. Triterpenoids from the leaves of Diospyros Kaki (persimmon) and their inhibitory effects on protein tyrosine phosphatase 1B [J]. J Nat Prod, 2008, 71(10): 1775-1778.
- 张秋燕, 刘秀萍, 赵燕燕, 等. 柿叶提取物对链脲佐菌素糖尿病小鼠血糖血脂的影响[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(14): 1451-1453.  
ZHANG Qiuyan, LIU Xiupin, ZHAO Yanyan, et al. Effects of water extracts from persimmon leaves on glycerin and lipidemia in mice with streptozotocin-induced diabetes [J]. Journal of Third Military Medical University, 2005, 27(14): 1451-1453.
- 姜红波, 赵卫星, 冯国栋. 柿叶的主要有效成分及药理作用研究进展[J]. 化工时刊, 2010, 24(6): 38-44.  
JIANG Hongbo, ZHAO Weixing, FENG Guodong, et al. The development of main active ingredients and pharmacological effects of persimmon leaf [J]. Chemical Industry Times, 2010, 24(6): 38-44.
- 朱愉. 实验动物的疾病模型[M]. 天津: 科技翻译出版社, 1997: 252-258.  
ZHU Yu. Disease models of experimental animal [M]. Tianjin: Tianjin Science and Technology Translation and Publishing Corporation, 1997: 252-258.
- 陈蕴清, 张小平. 糖尿病患者血清SOD和MDA的检测及临床意义[J]. 河北医学, 2000, 6(5): 427-429.  
CHEN Wenqing, ZHANG Xiaoping. An examination on SOD and MDA in the serum of diabetes patients and its clinical significance [J]. Hebei Medicine, 2000, 6(5): 427-429.
- 孔锐, 丁虹, 黎七雄. 硒和大蒜素对糖尿病小鼠肝脏生化功能改变的保护作用[J]. 华西医学杂志, 2001, 16(2): 104-105.  
KONG Rui, DING Hong, LI Qixiong. Effects of selenium and allitridi on the biochemical function of liver in alloxan diabetic mice [J]. West China Medical Journal. 2001, 16(2): 104-105.
- Ugur H, Amat N, Talip A, et al. Protective effect of Cichorium glandulosum root extract on carbon tetrachloride-induced and galactosamine-induced hepatotoxicity in mice [J]. Food Chem Toxicol, 2009, 47(8): 2022-2030.
- Sabzevari O, Hosseini A, Paydar H, et al. Hepatoprotective activity of scrophularia striata against acetaminophen induced liver injury in mice [J]. Toxicol Lett, 2008, 180(1): 32-57.

(本文编辑 彭敏宁)