

泽泻多糖对糖尿病大鼠肝脏糖脂代谢的影响

钱增堃, 崔凡*, 凌云熹, 朱文娟, 李小勤, 茆政, 李敏廷
(芜湖第一人民医院, 安徽 芜湖 241000)

[摘要] **目的:**研究泽泻多糖提取物对糖尿病大鼠肝脏糖脂代谢及肝脏脂联素受体 α (Adipo R2),过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR α)mRNA和蛋白表达的影响,并探讨其可能的作用机制。**方法:**采用腹腔注射链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)建立糖尿病大鼠模型,并随机分组为正常组、模型组、盐酸吡格列酮组、泽泻多糖高、中、低(400,200,100 mg·kg⁻¹)剂量组,每组8只,给予相应的药物治疗30 d。实验结束后,比较各组大鼠的体质量,肝重,葡萄糖耐受量(OGTT),空腹血糖值(FBG),空腹胰岛素水平(FINS),糖化血清蛋白(GSP),糖化血红蛋白(HbA1c),血清总胆固醇(TC),甘油三酯(TG),低密度脂蛋白(LDL),高密度脂蛋白(HDL)及肝脏形态组织学等指标;免疫组化法观察大鼠胰腺胰岛素样生长因子(IGF)水平;实时荧光定量PCR(Real-time PCR)法和蛋白免疫印迹法(Western blot)分别检测肝脏组织中Adipo R2,PPAR α mRNA和蛋白表达水平。**结果:**与模型组比较,泽泻多糖能明显降低糖尿病大鼠的体质量和肝重($P < 0.01$),并能明显降低大鼠FBG,HbA1c,GSP水平($P < 0.05$),明显降低TC,TG,LDL水平($P < 0.01$),升高HDL指标水平($P < 0.01$);升高肝脏Adipo R2,PPAR α mRNA水平($P < 0.05$)和蛋白表达水平($P < 0.01$)。**结论:**泽泻多糖具有显著调节糖尿病大鼠糖脂代谢的作用,其作用机制与其提高肝脏Adipo R2,PPAR α mRNA和蛋白表达水平相关联,并对糖尿病并发症和肝脏组织脂肪积累具有一定的防治作用。

[关键词] 泽泻多糖;糖尿病;糖脂代谢

[中图分类号] R22;R24;R285.5;R277.5;R2-0 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)11-0117-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180938

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180226.0910.003.html>

[网络出版时间] 2018-02-26 10:51

Effect of Alismatis Rhizoma Polysaccharide on Glucose-lipid Metabolism in Diabetic Rats

QIAN Zeng-kun, CUI Fan*, LING Yun-xi, ZHU Wen-juan, LI Xiao-qin, MAO Zheng, LI Min-ting
(The First People's Hospital of Wuhu, Wuhu 241000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Alismatis Rhizoma polysaccharide (AP) on glucose-lipid metabolism as well as the mRNA and protein expression of Adipo R2 and PPAR α in diabetic rats, and discuss the potential mechanism. **Method:** Diabetic rats model was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ), and the diabetic rats were randomly divided into six groups, including normal group, model group, Pioglitazone hydrochloride group, AP high, medium and low (400, 200, 100 mg·kg⁻¹) dose groups, $n = 8$ in each group. The drug administration was given for 30 days. The body weight, liver weight, oral glucose tolerance test (OGTT), fasting blood glucose (FBG), fasting insulin (FINS), glycosylated serum protein (GSP), glycosylated hemoglobin (HbA1c), serum total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein (LDL), high density lipoprotein (HDL) and liver histology index were compared. Immunohistochemical method was used to observe the level of insulin-like growth factors (IGF). The protein expression levels of Adipo R2 and

[收稿日期] 20170922(016)

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863计划)项目(2014AA022304)

[第一作者] 钱增堃,主管检验技师,从事心血管分子机制研究,E-mail:qianzengkun@163.com

[通信作者] *崔凡,主任检验师,硕士生导师,从事临床医学检验相关领域内的基础研究和临床工作,E-mail:cuihan_0218@163.com

PPAR α in liver tissues of different groups were measured with Western blot, and the mRNA expression levels were measured with Real-time PCR. **Result:** As compared with the model group, AP could significantly reduce the body weight and liver weight of diabetic rats ($P < 0.01$), as well as the levels of FBG, HbA1c and GSP, improve the indexes of TC, TG, LDL and HDL ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and regulate the mRNA and protein expression levels of Adipo R2 and PPAR α in liver tissues ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** AP can significantly adjust the glucolipid metabolism in diabetic rats, and its potential mechanism is related to the regulation of the expression levels of Adipo R2 and PPAR α , with certain prevention and treatment effect for diabetes complications and fatty accumulation in liver tissues.

[**Key words**] Alismatis Rhizoma polysaccharide; diabetes mellitus; glucose-lipid metabolism

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是一种由于胰岛素分泌相对不足或胰岛素抵抗而引起的糖脂代谢紊乱的疾病^[1]。近年来,糖尿病及其并发症已成为威胁人类健康的主要疾病之一,其死亡率仅次于肿瘤和心血管疾病^[2-3]。目前西医治疗主要以胰岛素和降糖药物为主,存在疗效低、耐受性低以及副作用大等问题^[4-5],而中药以作用温和持久、毒副作用小,作用机制为多成分、多靶点、多效应、多功能的整合作用而具明显特色和优势。

泽泻为泽泻科植物泽泻 *Alisma orientalis* 的干燥块茎,具有利水渗湿,泄热,化浊降脂的功效,临床上主要治疗小便不利,水肿胀满,痰饮眩晕,热淋涩痛,高脂血症等^[6]。现代研究表明,泽泻具有多种生物活性^[7],如利尿^[8]、降血脂^[9]、抗动脉粥样硬化^[10]、免疫调节^[11]、降血糖^[12]、肝保护^[13]、抗肿瘤^[14]、抗炎^[15]等。泽泻是治疗糖尿病的传统中药之一^[16],具有较好的降糖作用,杨新波等^[17-20]研究发现泽泻水提取物有明显的降血糖及抗胰岛细胞损伤作用。

本研究通过考察泽泻多糖在调节糖尿病大鼠血糖、血脂水平,血清胰岛素水平以及肝脏脂联素受体 α (Adipo R2),过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR α)基因表达等方面影响,旨在探讨泽泻多糖降低糖尿病大鼠血糖血脂及调节肝脏糖脂代谢相关因子及信号通路方面的影响,并进一步研究其干预大鼠糖脂代谢的效应机制,为临床研究提供理论依据。

1 材料

1.1 动物 SPF 级大鼠 48 只,雌雄各半,体质量(220 \pm 20)g,由南京生物医药研究院提供,合格证 SCXK(苏)2015-0001,常规饲养。

1.2 药品与试剂 泽泻,购自安徽亳州药材市场,经芜湖市药品检验所鉴定为泽泻科植物泽泻 *A. orientalis* 的干燥块茎。盐酸吡格列酮片(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号 9906281);链脲佐菌素

(STZ,美国 Sigma 公司,批号 18883-66-4);葡萄糖(南京春秋生物工程有限公司,批号 PTT20150909);糖化血清蛋白(glycosylated serum protein, GSP),糖化血红蛋白(HbA1c),甘油三酯(triglyceride, TG),总胆固醇(total cholesterol, TC),低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL),高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20150426, 20150829, 20151216, 20151212, 20150318, 20150324);胰岛素样生长因子-1 试剂盒(IGF-1,上海远慕生物科技有限公司,批号 20161201);BCA-100 蛋白质定量测定试剂盒(Thermo 公司,批号 2188554);预先染色的蛋白相对分子质量对照品(marker, Fermentas life Sciece 公司,批号 00096206);兔抗 Adipo R2, PPAR α 抗体(北京博奥森公司,批号 130808, 130808);辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(北京博奥森公司,批号 130927);其他试剂为国产化学分析纯。血糖试纸(罗氏诊断试剂公司 批号 23470337)。

1.3 仪器 血糖仪(美国 Roche 公司);BS200S 型电子天平(德国赛多利斯公司);8543E 型紫外-可见分光光度计(美国安捷伦公司);日立-6070 型全自动生化分析仪(上海长征医学科技有限公司);ZFMQ050PE 型超纯水器(Millipore 公司);5810-R 型低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司);A5002 型酶联免疫检测仪(Tecan 公司);T100 型 PCR 仪,165-8000 型垂直电泳仪,170-3930 型转膜仪,University-Hood II 成像系统(美国 Bio-Rad 公司);膜微孔性的聚偏乙烯双氟化物膜(PVDF,美国 Roche 公司)。X 射线胶片(柯达)。

2 方法

2.1 泽泻多糖的提取与含量测定 取泽泻粉末 50 g,精密称定,料液比为 1:12,回流提取 1 h,过滤,减压浓缩,用 95% 的乙醇沉至最终体积分数为 80%,

醇沉 24 h, 水浴蒸干, 得多糖粗提取物。利用 Sevage 法(三氯甲烷-正丁醇 5:1)去除提取物中的蛋白质。使用 AB-8 大孔树脂纯化多糖, 上柱溶液 pH 8, 用 $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaCl 以 $2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的洗脱速度进行洗脱, 收集洗脱液, 冷冻干燥, 得纯化的泽泻多糖提取物(用硫酸-苯酚法测定多糖质量分数为 68%)。

2.2 糖尿病大鼠模型的建立及分组 健康 SD 大鼠 60 只, 适应性饲养 7 d 后, 随机取 8 只作为正常组, 普通饲料喂养; 其余大鼠采用高脂饲料喂养, 进行糖尿病模型的诱导。喂食 4 周后正常组以外的大鼠禁食 12 h 后, 给予一次性腹腔注射 STZ ($35 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), 诱导糖尿病模型。造模 7 d 后, 大鼠禁食 12 h 后尾静脉取血, 采用血糖仪测定其空腹血糖值 (fasting blood glucose, FBG), 选取 $\text{FBG} \geq 11.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 确定模型成功^[21-22]。造模成功后, 连续给药 30 d, 具体分组和灌胃剂量为正常组、模型组, 灌胃生理盐水 $100 \mu\text{L}$; 阳性组, 灌胃盐酸吡格列酮 $15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$; 泽泻多糖高、中、低剂量组, 灌胃泽泻多糖 $400, 200, 100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。

2.3 观察指标及检测方法 观察各组大鼠的精神状态、皮毛光泽度、活动能力、饮水饮食量、体质量及存活情况。给药 30 d 后, 禁食 12 h 后称质量, 记录体质量, 并用血糖仪测定 FBG。腹腔注射戊巴比妥钠麻醉后腹主动脉取血, $3\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min 后取上清, 用于后续指标检测。大鼠腹主动脉取血后置于冰上, 取完整肝脏后称重, 计算肝体质量比(肝重/体质量)。剪取肝脏相同部位组织, 生理盐水冲洗后浸泡于 10% 甲醛溶液中固定, 苏木素-伊红 (HE) 染色镜下做病理观察; 其余肝组织 $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ 冻存, 用于实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 法和蛋白免疫印迹法 (Western blot) 分别检测肝脏组织中 Adipo R2, PPAR α mRNA 和蛋白表达水平。并分离小鼠胰腺组织, 免疫组化法观察胰岛素样生长因子 (insulin growth factor, IGF) 表达情况。

2.4 口服糖耐量实验 (oral glucose tolerance test, OGTT) 各组大鼠禁食 12 h 后一次性灌胃 25% 葡萄糖溶液 ($5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 分别在 0, 30, 60, 120 min 时尾静脉采血, 检测大鼠 FBG。绘制糖耐量曲线, 采用近似梯形方法计算糖耐量实验血糖值的曲线下面积 (AUC) 按照下式计算。

$$\text{AUC}(\text{mmol}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}) = 1/2(A + B) \times 1/2 + 1/2(B + C) \times 1/2 + 1 \times 2(C + D)$$

式中, A, B, C, D 分别代表 0, 30, 60, 120 min 时的 FBG。

2.5 糖脂代谢相关指标的检测 采用酶标仪和全自动生化分析仪检测 FBG, FINS, GSP, HbA1c, TC, TG, LDL 和 HDL, 具体实验方法参照试剂盒说明书。

胰岛素敏感指数 (ISI) 按照以下公式计算:

$$\text{ISI} = \ln[1 / (\text{FBG} \times \text{FINS})]$$

2.6 肝脏组织 HE 染色 取出浸泡于 10% 甲醛中固定的肝脏组织, 常规洗涤、脱水、石蜡包埋, 切片, HE 染色, 光镜下观察病理变化。

2.7 免疫组化染色法观察 IGF 的表达 取各组大鼠胰腺组织的石蜡切片, 进行免疫组化染色, 观察 IGF 表达情况。免疫组化染色方法具体参照试剂盒说明书。在显微镜下观察免疫组化结果, 并用 Image-ProPlus 进行图像分析, 以棕褐色染色为阳性表达。高倍镜下随机选取 5 个视野, 参照 Fromowitz 半定量分级方法, 在高倍镜下对组织染色结果判定, IGF 阳性表达产物胞浆染色为红棕色, 核不显色; 每张组织切片选 5 个高倍视野观察, 按阳性细胞数占全部细胞比例多少分为 (-) 无阳性细胞; (+) 阳性细胞 1% ~ 25%; (++) 阳性细胞 26% ~ 50%; (+++) 阳性细胞 > 50%。

2.8 Real-time PCR 检测 Adipo R2, PPAR α mRNA 表达 肝脏组织的总 RNA 抽提、反转录及 Real-time PCR 等按照试剂盒说明书操作, Real-time PCR 20 μL 反应体系: SYBR Premix Ex Taq ($2 \times$) 10 μL , 上下引物各 0.4 μL , DNA 模板 1 μL , ROX Reference Dye ($50 \times$) 0.4 μL , DEPC 水 7.8 μL 。反应条件为 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 2 min, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 35 s, 扩增 40 个循环; $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min, 读取溶解曲线; $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 35 s 读取荧光。参照文献[23]的方法, 基因表达量以各样基因 C_t 值减去内参基因 C_t 值表示, 相对表达量以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示。其中, 各指标引物序列为 Adipo R2: 上游 5'-CCATAGGGCAGATAGGCT-3', 下游 5'-CACCAGCAA CCACAAAGA-3' (156 bp); PPAR α : 上游 5'-AGCCA TTCTGCGACATCA-3', 下游 5'-CGTCTGACTCGGTC TTCTTG-3 (315 bp); GAPDH: 上游 5'-ACCACAGTCC ATGCCATCAC-3', 下游 5'-TCCACCACCCTGTTGC TGTA-3 (200 bp)。

2.9 Western blot 检测 Adipo R2, PPAR α 蛋白表达 收集各组肝脏组织, 按 1:5 加入混有蛋白酶抑制剂的 RIPA 缓冲液裂解 500 mL, 匀浆, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 12 500 $\text{r}\cdot\text{min}$ 离心 15 min, 离心后取上清, BCA 法测定蛋白浓度, 进行蛋白定量。蛋白定量后再取等分的上清, 含匹配蛋白量 50 μg , 分离电泳、转膜、染色、剪膜、脱色、封闭、洗膜。稀释一抗 (1:1 000) 后孵育, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 震荡过夜。

稀释二抗后,37 ℃下振摇90 min。加 ELC 荧光底物显色,曝光并采集图片。相应蛋白表达值为条带的灰度值除以 GAPDH 内参校正。

2.10 统计学方法 使用 SPSS 19.0 对数据进行分析处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用配对 *t* 检验,多组间比较采用 One-ANOVA。统计作图采 GraphPad Prism 5.0。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对各组大鼠一般情况的影响 给药前各组大鼠体质量无明显差异,在给药过程中,正常组大鼠体质量逐渐增加,体毛光泽,精神状态好,饮水进食量正常,无“三多一少”症状,未见死亡。各造模大鼠在造模后精神状态差,活动减少,毛色欠光泽,有多饮、多食、多尿现象,体质量有所减轻,出现明显的“三多一少”症状,随着病情的进展症状更加明显。经药物干预治疗后,各组大鼠,食欲增强,毛色渐光泽,活动变多,饮水进食量增加,体质量逐渐回升。

3.2 对糖尿病大鼠肝重和肝体质量比的影响 给药前各组大鼠体质量无明显差异,给药 30 d 后,模

型组大鼠体质量明显减轻,盐酸吡格列酮组大鼠体质量较模型组有所减轻($P < 0.05$),泽泻多糖各组大鼠体质量在给药 30 d 后体质量均较给药前有所升高,与模型组比较差异明显,“三多一少”症状明显减轻,用药各组呈剂量效应关系。此外,模型组大鼠的肝重显著高于正常组大鼠($P < 0.01$);与模型组相比,吡格列酮可显著减轻糖尿病大鼠的肝重($P < 0.05$);泽泻多糖高、中剂量组大鼠肝重在给药 30 d 后肝重均较给药前有所下降,与模型组比较差异明显。从肝体质量比可以看出,给药结束后,正常组大鼠肝体质量比显著低于模型组($P < 0.01$);经吡格列酮治疗后,大鼠的肝体质量比与模型组相比有明显差异($P < 0.01$);经高、中剂量泽泻多糖治疗后,大鼠肝体质量比虽明显高于正常组,但与模型组比较也有所降低($P < 0.01$),与肝重结果的趋势相一致;低剂量组泽泻多糖在给药后尚未表现出降低肝体质量比的效果。这说明高、中剂量泽泻多糖可减轻糖尿病大鼠肝重并降低其肝体质量比,这可能与泽泻多糖减少大鼠肝脏内脂质堆积,从而减轻肝脏脂肪化程度的作用有关。见表 1。

表 1 泽泻多糖对糖尿病大鼠体质量和肝重的影响

Table 1 Effect of Alismatis Rhizoma polysaccharides (AP) on body mass and liver mass of diabetic rats

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	体质量($\bar{x} \pm s, n = 8$)/g		肝重($\bar{x} \pm s, n = 8$)/g	肝脏指数/%
		给药前	给药后		
正常	-	222.6 ± 5.3	246.9 ± 9.8	8.2 ± 0.4	3.33
模型	-	219.3 ± 7.5 ¹⁾	198.5 ± 5.6 ¹⁾	10.2 ± 0.4 ¹⁾	5.17 ¹⁾
盐酸吡格列酮	15	223.8 ± 5.7	241.6 ± 8.5 ²⁾	8.5 ± 0.6 ²⁾	3.54 ³⁾
泽泻多糖	400	225.6 ± 8.0	249.2 ± 6.6	8.9 ± 0.6 ³⁾	3.57 ³⁾
	200	225.1 ± 4.9	230.2 ± 7.3	9.3 ± 0.7 ²⁾	4.04 ³⁾
	100	222.7 ± 7.1	218.7 ± 6.2 ³⁾	10.5 ± 0.5	4.81

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 2~5,图 3,4 同)。

3.3 对糖尿病大鼠 FBG, FINS, ISI, GSP, HbA1c 的影响 给药 30 d 后,模型组大鼠 FBG 仍明显高于正常组($P < 0.01$),表明糖尿病大鼠模型建模成功。盐酸吡格列酮组及泽泻多糖各剂量组大鼠 FBG 含量较模型组均显著降低,显示出较好的降糖作用($P < 0.05$),且泽泻多糖各组表现出明显的量-效关系。模型组血清 FINS 水平较正常组显著升高($P < 0.01$),而胰岛素敏感指数明显下降($P < 0.01$),表现为胰岛素抵抗。吡格列酮和泽泻多糖高、中剂量组均能明显增加糖尿病大鼠对胰岛素的敏感性($P < 0.05$),这说明泽泻多糖具有一定的增强胰岛素敏感性,降低糖尿病大鼠的血糖和胰岛素水平的

功能。给药 30 d 后,与正常组相比,模型组大鼠 GSP 水平明显升高($P < 0.01$),各给药组大鼠 GSP 较模型组均有一定程度的下降,但差异无统计学意义。同样地,模型组大鼠 HbA1c 水平明显升高($P < 0.01$),除泽泻多糖低剂量组外,各给药组大鼠 HbA1c 较模型组均明显降低。见表 2。

3.4 对糖尿病大鼠 OGTT 的影响 与正常组相比,模型组大鼠在口服葡萄糖后 0, 30, 60, 90, 120 min 时 FBG 均显著升高,说明糖尿病大鼠已经失去对血糖的调节能力,在摄入葡萄糖后出现 FBG 值显著升高的情况,在 120 min 后,FBG 仍持续在较高的水平;与模型组相比,盐酸吡格列酮组和不同剂量的泽

表 2 泽泻多糖对糖尿病大鼠 FBG, FINS, GSP 及 HbA1c 的影响

Table 2 Effect of AP on FBG, FINS, GSP and HbA1c of diabetic rats

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	FBG($\bar{x} \pm s, n=8$) /mmol·L ⁻¹	FINS($\bar{x} \pm s, n=8$) /mU·L ⁻¹	ISI	GSP($\bar{x} \pm s, n=8$) /mmol·L ⁻¹	HbA1c($\bar{x} \pm s, n=8$) /mmol·L ⁻¹
正常	-	5.76 ± 0.68	21.51 ± 0.82	-4.84	1.48 ± 0.11	14.20 ± 0.21
模型	-	26.63 ± 3.89 ¹⁾	31.83 ± 3.91 ¹⁾	-6.74 ¹⁾	4.42 ± 0.24 ¹⁾	35.36 ± 0.06 ¹⁾
盐酸吡格列酮	15	8.91 ± 2.96 ³⁾	22.65 ± 2.96 ²⁾	-5.30 ³⁾	2.28 ± 0.19 ³⁾	19.28 ± 0.12 ³⁾
泽泻多糖	400	12.84 ± 7.04 ³⁾	24.92 ± 2.45 ³⁾	-5.76 ³⁾	2.42 ± 0.22	21.84 ± 0.23 ³⁾
	200	15.92 ± 3.28 ²⁾	27.18 ± 1.87 ³⁾	-6.07 ³⁾	2.68 ± 0.09	21.37 ± 0.15 ³⁾
	100	18.67 ± 8.23 ²⁾	31.36 ± 1.74 ²⁾	-6.37 ²⁾	3.04 ± 0.15	34.66 ± 0.19

泻多糖均能降低葡萄糖负荷后糖尿病大鼠的 FBG, 尤其是高剂量的泽泻多糖的改善效果与盐酸吡格列

酮相当,说明泽泻多糖可有效地调节糖尿病大鼠的血糖水平。见表 3。

表 3 泽泻多糖对糖尿病大鼠 OGTT 的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 3 Effect of AP on OGTT of diabetic rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	葡萄糖/mmol·L ⁻¹				AUC/mmol·h·L ⁻¹
		0 min	30 min	60 min	120 min	
正常	-	5.76 ± 0.68	9.73 ± 1.65	8.84 ± 1.57	5.95 ± 0.35	15.91 ± 0.78
模型	-	26.63 ± 3.89 ¹⁾	32.08 ± 3.27 ¹⁾	31.57 ± 4.96 ¹⁾	29.38 ± 2.67 ¹⁾	61.07 ± 1.43 ¹⁾
盐酸吡格列酮	15	8.91 ± 2.96 ³⁾	29.87 ± 2.69	25.82 ± 2.78 ³⁾	13.26 ± 2.72 ³⁾	43.16 ± 1.98 ³⁾
泽泻多糖	400	12.84 ± 7.04 ³⁾	31.56 ± 1.89	25.64 ± 2.43 ²⁾	15.33 ± 2.12 ³⁾	45.39 ± 3.42 ³⁾
	200	15.92 ± 3.28 ³⁾	30.75 ± 3.15	30.45 ± 2.01	27.45 ± 2.45 ²⁾	54.76 ± 3.28
	100	18.67 ± 8.23 ³⁾	31.43 ± 2.83	30.06 ± 5.12	27.66 ± 2.98	56.92 ± 2.19

3.5 对糖尿病大鼠血清血脂水平的影响 给药 30 d 后,与正常组相比较,模型组大鼠血清中 TG, TC 及 LDL 水平均显著升高($P < 0.01$), HDL 水平显著降低($P < 0.01$)。与模型组相比,盐酸吡格列酮组及泽泻多糖高、中剂量组血清中 TG 水平明显下降($P < 0.01$)。各给药组 TC 均较模型组有一

定水平的降低,但泽泻多糖中剂量组下降明显($P < 0.01$)。盐酸吡格列酮组与泽泻多糖各剂量组 LDL 较模型组明显下降($P < 0.05$)。泽泻多糖中剂量组及盐酸吡格列酮组 HDL 较模型组大鼠有显著升高,差异具有显著性意义($P < 0.01$)。见表 4。

表 4 泽泻多糖对糖尿病大鼠血清血脂水平的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 4 Effect of AP on TC, TG, HDL and LDL of diabetic rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	TG	TC	HDL	LDL
正常	-	0.85 ± 0.10	1.64 ± 0.28	36.11 ± 8.21	0.67 ± 0.23
模型	-	2.01 ± 0.15 ¹⁾	4.06 ± 1.19 ¹⁾	24.64 ± 7.45 ¹⁾	6.11 ± 1.42 ¹⁾
盐酸吡格列酮	15	1.09 ± 0.08 ³⁾	2.38 ± 0.58 ²⁾	31.95 ± 5.31 ³⁾	5.53 ± 2.82 ³⁾
泽泻多糖	400	1.11 ± 0.04 ³⁾	2.85 ± 0.51	32.94 ± 8.18 ²⁾	2.96 ± 2.68 ³⁾
	200	1.38 ± 0.05 ³⁾	3.13 ± 0.25 ³⁾	30.86 ± 7.23 ³⁾	4.08 ± 2.48 ³⁾
	100	1.94 ± 0.11	3.49 ± 0.63	27.87 ± 6.33	5.67 ± 3.19 ²⁾

3.6 对糖尿病大鼠肝脏形态组织学改变的影响 正常组大鼠肝小叶结构正常,排列整齐规则,以中央静脉为核心向四周放射状排列,肝细胞呈多角形,无

肿胀,中央有一个或多个圆形细胞核;模型组及各给药组大鼠肝组织正常结构均有不同程度的病变,与正常组相比,模型组大鼠镜下可见肝小叶界限不清,

肝细胞肿胀,胞质疏松着色浅,密度减低,形态不规则,局部有炎性细胞浸润。盐酸吡格列酮组与各剂量泽泻多糖治疗后肝脏病变具有不同程度的减轻,细胞肿胀减轻,其中盐酸吡格列酮组和高剂量泽泻多糖组作用为最佳。结果表明,泽泻多糖对糖尿病大鼠肝脏有明显的保护作用。见图 1。

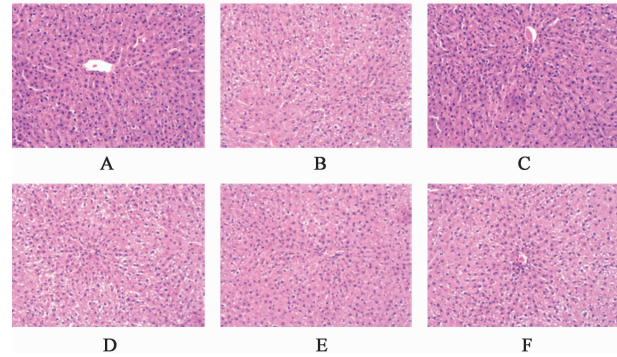


图 1 泽泻多糖对糖尿病大鼠肝脏形态组织学改变的影响(HE, ×200)

Fig.1 Effect of AP on histological morphology of livers in diabetic rats (HE, ×200)

3.7 对糖尿病大鼠 IGF 的影响 正常组大鼠组织细胞浆未见 IGF 阳性表达,部分区域存在微弱表达。与正常组比较,模型组大鼠组织 IGF 阳性表达率显著增强($P < 0.05$)。盐酸吡格列酮组及泽泻多糖各剂量组大鼠组织中 IGF 阳性表达程度与模型组组比较,阳性表达降低,且泽泻多糖各剂量组呈一定的量-效关系。而高剂量泽泻多糖组和盐酸吡格列酮组表达差异无统计学意义。见表 5,图 2。

表 5 泽泻多糖对糖尿病大鼠 IGF 的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 5 Positive expression rates of IGF in pancreatic tissue ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	IGF/%
正常	-	12.54 ± 1.13
模型	-	17.78 ± 1.42
盐酸吡格列酮	15	13.58 ± 1.13 ²⁾
泽泻多糖	400	13.82 ± 1.25 ²⁾
	200	14.56 ± 1.12
	100	16.24 ± 1.02

3.8 对糖尿病大鼠肝脏组织中 Adipo R2, PPAR α 信号通路的影响 模型组大鼠肝脏组织中 Adipo R2, PPAR α 蛋白及 mRNA 表达水平均显著降低。与模型组比较,盐酸吡格列酮组大鼠肝脏

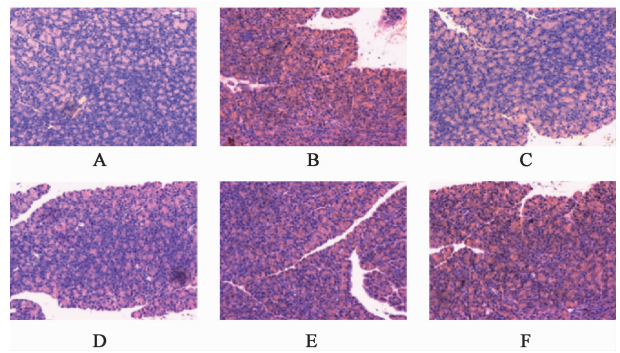


图 2 泽泻多糖对糖尿病大鼠 IGF 表达的影响(免疫组化, ×200)

Fig.2 Expression level of IGF in pancreatic tissue of different rats (IHC, ×200)

Adipo R2, PPAR α 蛋白及 mRNA 表达水平均明显上调($P < 0.01$);泽泻多糖高、中剂量组大鼠肝脏 Adipo R2, PPAR α 蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$), Adipo R2, PPAR α mRNA 表达水平也有一定水平的升高($P < 0.05$)。在上调 Adipo R2, PPAR α 基因表达上,各给药组之间无统计学差异。见图 3,4。

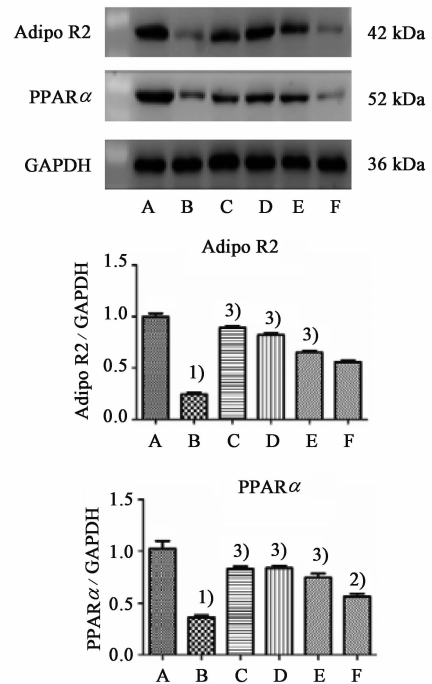


图 3 泽泻多糖对糖尿病大鼠肝脏组织中 Adipo R2, PPAR α 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig.3 Effect of AP on protein expression levels of Adipo R2 and PPAR α in different rats($\bar{x} \pm s, n = 8$)

4 讨论

糖尿病是一种以慢性高血糖为主要特征的、多病因的代谢性疾病,其特点是胰岛素分泌下降或胰岛素抵抗(IR),从而导致体内糖、脂等多种代谢

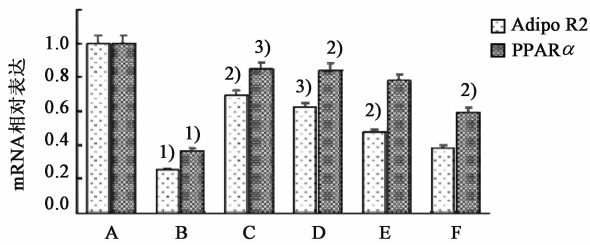


图 4 泽泻多糖对糖尿病大鼠肝脏组织中 Adipo R2, PPARα mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 4 Effect of AP on mRNA expression levels of Adipo R2 and PPARα in different rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

紊乱,血糖持续升高,严重高血糖时出现典型的“三多一少”症状(多饮、多尿、多食和消瘦),进而导致各种组织,特别是眼、肾、心脏、血管、神经的慢性损害、功能障碍,严重危害人们的身心健康。此外,糖脂代谢紊乱既可造成胰岛素抵抗^[24-25],又可损害β细胞功能^[26],因此,针对纠正糖脂代谢紊乱是治疗糖尿病的重要手段。

本实验采用 STZ 诱导糖尿病大鼠模型出现糖尿病症状后,检测血清中 FBG, FINS, GSP, HbA1c 含量。FBG 值反映瞬时血糖的变化, GSP 和 HbA1c 反映血糖长期控制水平, FINS 和 ISI 反映出胰岛素分解血糖的能力,同时检测 5 个指标能够更全面、更客观地反映糖尿病大鼠血糖水平的变化。研究结果显示,模型组大鼠血清中的 FBG, FINS, HbA1c, GSP 均明显高于正常组,泽泻多糖组能明显降低模型大鼠上述指标的升高,同时升高模型大鼠的 ISI,提示泽泻多糖对糖尿病大鼠具有明显降低血糖的作用。此外,本实验还检测了各组大鼠血清中 TC, TG, LDL 和 HDL 水平,结果显示,模型组大鼠血清中的 TC, TG, LDL 均明显高于正常组,而泽泻多糖组能明显降低模型大鼠上述指标的升高,同时升高模型大鼠的 HDL 水平,且呈明显的量-效关系。说明糖尿病大鼠在出现高血糖症状后,也表现出明显的高脂血症及明显的肝脏脂肪堆积症状,说明糖代谢和脂代谢之间有着密切的联系,高血糖可以引起脂代谢紊乱,高糖血症为原发性改变,高脂血症为继发性改变。众所周知,糖酵解的中间产物可形成甘油和脂肪酸,从而合成脂肪;脂肪分解产生的甘油和脂肪酸,可沿不同途径转变成糖。研究表明,糖尿病患者体内过高的血糖不能进入正常的分解代谢,使糖-脂转化,产生大量的 TG;此外,因糖的分解受阻,导致脂肪组织分解代谢增强,使得游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)水平升高,进而刺激肝脏合成大量的极低密度脂蛋白胆固醇(very low density lipoprotein

cholesterol, VLDL-C),产生血脂异常^[27]。因此,在糖尿病的治疗中,除了严格控制血糖以外还应积极采取综合措施纠正脂质代谢紊乱,以防止及延缓糖尿病慢性并发症的发生与发展。本实验说明泽泻多糖具有明显的降低血糖和调节血脂作用,对于高血糖引起的糖脂代谢紊乱具有良好的改善效果。

IGF 和胰岛素结构具有同源性,与糖尿病的发生关系密切^[28]。IGF 可以改善血糖控制,并通过降低血清生长激素(GH)来改善胰岛素抵抗。糖尿病患者高胰岛素血症与血清 IGF-1 水平呈正相关关系^[29]。本实验中,糖尿病大鼠胰腺组织 IGF 阳性表达,而泽泻多糖组大鼠胰腺组织胰岛细胞破坏程度轻于模型组,其 IGF 表达显著减弱,提示泽泻多糖降低血糖与调节 IGF 表达有关。

脂肪组织是机体维持糖脂代谢平衡的重要分泌器官,能够分泌多种细胞因子如脂联素(adiponectin)等。脂联素能够活化腺苷酸激活蛋白激酶(AMPK)通路,刺激葡萄糖的利用和脂肪酸的氧化,使其在胰岛素信号传导过程中的恶化作用降低,从而改善胰岛素抵抗^[30-31]。而脂联素发挥其生理功能主要是由脂联素受体(Adipo R1/R2)介导的,脂联素与 Adipo R1/R2 结合后,分别通过 Adipo R1/AMPK 和 Adipo R2/PPARα 信号通路发挥其调节糖脂代谢的功能^[32],而在肝脏中表达的主要是 Adipo R2/PPARα 信号通路。过氧化物酶体增殖物激活受体家族(peroxisome proliferator-activated receptor, PPARs)属于 II 型核受体超家族成员,是配体激活的转录因子,参与正常发育、糖脂代谢、糖尿病、肿瘤等过程^[33]。PPARs 有 α, δ 和 γ3 个亚型,在多个组织器官糖脂代谢的调解中发挥重要作用。其中,PPARα 是脂肪代谢的关键性转录调节因子,其主要生理作用在于调节血脂异常^[34-35]。PPARα 的许多靶基因与脂类代谢有关,参与脂肪酸的摄取、结合、运输、氧化以及脂蛋白组装等。PPARα 激活后可促进肉碱脂酰转移酶(carnitine acyl-transferase),载脂蛋白(apolipoprotein)等基因的表达,不但能降低血液中 TC, TG, LDL 水平,升高 HDL 水平,还能调节炎症反应,改善胰岛素抵抗。在本实验中,Real-time PCR 结果显示,与模型组相比,泽泻多糖可显著上调肝脏 Adipo R2 以及 PPARα mRNA 的表达。Western blot 结果显示,泽泻多糖显著提高糖尿病大鼠肝脏 Adipo R2 以及 PPARα 蛋白表达。据此提示,泽泻多糖可有效地调节肝脏 Adipo R2/PPARα 信号转导通路。泽泻多糖降低糖尿病大鼠血糖血脂

水平,可能是通过参与调节 Adipo R2 激活 PPAR α 通路,纠正糖尿病大鼠的血糖水平,有效地改善糖尿病大鼠肝脏糖脂代谢紊乱。

综上所述,泽泻多糖对糖尿病大鼠具有明显的降低血糖、调节血脂异常的作用,其调节糖脂代谢的作用机制与其调节肝脏 IGF 表达以及促进胰岛素信号通路中 Adipo R2 和 PPAR α 的蛋白表达相关。该实验结果对防治糖尿病及其并发症的发生具有积极的意义,为泽泻多糖将来进一步在糖尿病及其并发症的防治研究提供了一定的实验依据。

[参考文献]

[1] Association A D. Diagnosis and classification of diabetes mellitus [J]. *Diabetes Care*, 2012, 36(1): S67-S74.

[2] Shaw J E, Sicree R A, Zimmet P Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2010, 87(1): 4-14.

[3] Atlas D. *International Diabetes Federatio* [M]. Cape Town. South Africa; Press Release, 2006: 133.

[4] 陈荣. 拜糖平与二甲双胍治疗 2 型糖尿病疗效及药物副作用分析 [J]. *中国实用医药*, 2015, 10(35): 28-29.

[5] 徐斯盛, 张惠斌, 周金培, 等. 新型抗糖尿病药物的研究进展 [J]. *中国药科大学学报*, 2011, 42(2): 97-106.

[6] 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: 229.

[7] TIAN T, CHEN H, ZHAO Y Y. Traditional uses, phytochemistry, pharmacology, toxicology and quality control of *Alisma orientale* (Sam.) Juzep: a review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 158(1): 373-387.

[8] ZHOU X, XU T, LIU Y. *Alisma orientale* (Sam.) Juzep., a common traditional Chinese medicine plant as a diuretic agent [J]. *Drug Plants II*, 2010, 28(2): 427-445.

[9] DAN H, WU J, PENG M, et al. Hypolipidemic effects of *Alismatis rhizome* on lipid profile in mice fed high-fat diet [J]. *Saudi Med J*, 2011, 32(7): 701-707.

[10] QIN J G, WANG Y H, LIANG J P, et al. Effect of *Alismaceae* on regulating the expression of liver basal membrane heparan sulfate proteoglycan in ApoE-knock out atherosclerosis mice [J]. *Chin Arch Trad Chin Med*, 2007, 25(4): 696-698.

[11] Kubo M, Matsuda H, Tomohiro N, et al. Studies on *Alismatis rhizoma*. I. Anti-allergic effects of methanol extract and six terpene components from *Alismatis*

rhizoma (dried rhizome of *Alisma orientale*). [J]. *Biol Pharm Bull*, 1997, 20(5): 511-516.

[12] LI Q, QU H. Study on the hypoglycemic activities and metabolism of alcohol extract of *Alismatis Rhizoma* [J]. *Fitoterapia*, 2012, 83(6): 1046-1053.

[13] JANG M, HAN Y, Nam J, et al. Protective effects of *Alisma orientale* extract against hepatic steatosis via inhibition of endoplasmic reticulum stress [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(11): 26151-26165.

[14] Fong W F, WANG C, ZHU G Y, et al. Reversal of multidrug resistance in cancer cells by *Rhizoma Alismatis* extract [J]. *Phytomedicine*, 2007, 14(2-3): 160-165.

[15] HAN C W, Kwun M J, Kim K H, et al. Ethanol extract of *Alismatis Rhizoma* reduces acute lung inflammation by suppressing NF- κ B and activating Nrf2 [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 146(1): 402-410.

[16] 吴嘉瑞, 王凯欢, 纪凯, 等. 基于数据挖掘的中医治疗糖尿病处方用药规律分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(22): 214-217.

[17] 杨新波, 黄正明, 陈红艳, 等. 泽泻不同溶剂提取物对糖尿病小鼠血糖及血液生化指标的影响 [J]. *解放军药学报*, 2006, 22(6): 419-421.

[18] 杨新波, 黄正明, 曹文斌, 等. 泽泻提取物对正常及四氧嘧啶小鼠糖尿病模型的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2002, 8(3): 24-26.

[19] 杨新波, 黄正明, 曹文斌, 等. 泽泻水提取物对正常及高血糖小鼠血糖的影响 [J]. *中药药理与临床*, 1998, 14(6): 29-30.

[20] 杨新波, 黄正明, 曹文斌, 等. 泽泻提取物对链脲佐菌素高血糖小鼠的治疗和保护作用 [J]. *解放军药学报*, 2002, 18(6): 336-338.

[21] 杨景锋, 任艳芸, 赵天才, 等. 抵挡芪桂汤对胰岛素抵抗大鼠血清 Resistin、ROS 含量的影响 [J]. *陕西中医药大学学报*, 2016, 39(4): 65-67.

[22] 顾红岩, 吴金环, 白素芬, 等. 人参二味胶囊对糖尿病大鼠血糖、血脂的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(7): 132-135.

[23] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.

[24] 王焯, 朱向东. 葛根芩连汤对 2 型糖尿病 ZDF 大鼠 CRP, TNF- α , IL-6 的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(21): 130-134.

[25] Boden G, CHEN X. Effects of fat on glucose uptake and utilization in patients with non-insulin-dependent diabetes [J]. *J Clin Invest*, 1995, 96(3): 1261-1268.

- [26] Alexander R, Ponniah S, Hasday J, et al. Elevated levels of proinflammatory cytokines in the semen of patients with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome[J]. *Urology*, 1998, 52(5): 744-749.
- [27] 徐琳, 赵魁彦, 龚惠红, 等. 血脂异常与 2 型糖尿病视网膜病变的关系探讨[J]. *陕西医学杂志*, 2012, 41(6): 691-692.
- [28] Ueki K, Okada T, HU J, et al. Total insulin and IGF-I resistance in pancreatic cells causes overt diabetes[J]. *Nat Genet*, 2006, 38(5): 583-588.
- [29] 王平, 马芳玲, 母义明, 等. 2 型糖尿病伴高甘油三酯血症患者血清胰岛素样生长因子结合蛋白 1 水平与胰岛素抵抗的相关性分析[J]. *中国糖尿病杂志*, 2007, 15(3): 140-141.
- [30] ZOU C, SHAO J. Role of adipocytokines in obesity-associated insulin resistance [J]. *J Nutr Biochem*, 2008, 19(5): 277-286.
- [31] Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, et al. Adipokines in the treatment of diabetes mellitus and obesity[J]. *Expert Opinon Pharm*, 2009, 10(2): 239-254.
- [32] 刘利梅, 赵亚莉, 李丽, 等. 脂联素的信号转导通路[J]. *生理科学进展*, 2005, 36(2): 130-132.
- [33] Wahli W, Desvergne B, Kersten S. Roles of PPARs in health and disease [J]. *Nature*, 2000, 405 (6785): 421-424.
- [34] 吴敏娜, 朱翠凤. 过氧化物酶体增殖物激活受体与 2 型糖尿病及其心血管并发症的研究进展[J]. *医学综述*, 2010, 16(20): 3139-3142.
- [35] Fruchart J, Duriez P, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators regulate genes governing lipoprotein metabolism, vascular inflammation and atherosclerosis [J]. *Curr Opin Lipidol*, 1999, 10(3): 245-257.

[责任编辑 全燕]