

枸杞总多糖对2型糖尿病大鼠细胞因子的影响

尹长江¹, 杨坤宝¹, 张学军¹, 史华宁¹, 张海峰², 宋鸿儒^{1*}

(1. 承德医学院, 河北承德 067000; 2. 承德医学院附属医院, 河北承德 067000)

[摘要] **目的:**探讨枸杞总多糖(lycium barbarum polysaccharide, LBP)对2型糖尿病(NIDDM)大鼠细胞因子的调节作用。**方法:**采用高脂高糖饮食联合小剂量注射链尿佐菌素(streptozotocin, STZ)的方法制备NIDDM大鼠模型,随机选取40只均分为5组:模型组, LBP低(100 mg·kg⁻¹)、中(200 mg·kg⁻¹)、高(400 mg·kg⁻¹)剂量干预组, 格列苯脲干预组(阳性药物组);同时设立基础饲料喂养的正常对照组。Western blot法检测LBP对NIDDM大鼠脾脏组织中白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)表达的影响。**结果:**与正常对照组比较, NIDDM对照组大鼠脾脏组织中IL-1 β , IL-6, TNF- α 蛋白的表达均显著增高;以不同剂量的LBP干预治疗糖尿病大鼠4周后,各治疗组大鼠脾脏组织中IL-1 β , IL-6, TNF- α 的表达均显著降低。**结论:**LBP对NIDDM大鼠的免疫功能的调节作用可能与其抑制IL-1 β , IL-6, TNF- α 蛋白的表达有关。

[关键词] 枸杞总多糖; 糖尿病大鼠; 白细胞介素-1 β ; 白细胞介素-6; 肿瘤坏死因子- α

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)16-0169-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014160169

The Effect of Lycium Barbarum Polysaccharides on Cytokines in Type 2 Diabetic Rats

YIN Chang-jiang¹, YANG Kun-bao¹, ZHANG Xue-jun¹, SHI Hua-ning¹, ZHANG Hai-feng², SONG Hong-ru^{1*}
(1. Chengde Medical University, Chengde 067000, China;
2. Affiliated Hospital of Chengde Medical University, Chengde 067000, China)

[Abstract] **Objective:** This study aimed to investigate the regulation roles of lycium barbarum polysaccharides (LBP) on cytokines in type 2 diabetic (NIDDM) rats. **Method:** High-fat and high-sugar diet in combination with low-dose injection of streptozotocin (STZ) was used to prepare type 2 diabetic (NIDDM) rat model. Forty diabetic immune model rats were randomly selected to divide into five groups: model group, low dose of LBP (100 mg·kg⁻¹) intervention group, medium dose of LBP (200 mg·kg⁻¹) intervention group, high dose of LBP (400 mg·kg⁻¹) intervention group, glibenclamide intervention group (positive drug group). Rats in similar weight fed with basal diet were used as normal control group. Western bolt assay was used to detect the effect of LBP on the expression of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) in type 2 diabetic rats' spleen tissue. **Result:** Compared with the normal control group, the expression of IL-1 β , IL-6, TNF- α in the spleen tissue of NIDDM rats was significantly increased. After 4 weeks' intervention of different doses of LBP, the expression of IL-1 β , IL-6, TNF- α in diabetic rats' spleen tissue in each treatment group significantly decreased. **Conclusion:** LBP may regulate the immune function of type 2 diabetic rats by inhibiting the expression of IL-1 β , IL-6 and TNF- α .

[Key words] total lycium barbarum polysaccharide; diabetic rats; interleukin-1 β ; interleukin-6; tumor necrosis factor- α

[收稿日期] 20140504(152)

[基金项目] 河北省教育厅科技-青年基金项目(QN20131039)

[第一作者] 尹长江, 硕士, 讲师, 从事分子免疫学方面研究, Tel:13731443998, E-mail: ycj981411@163.com

[通讯作者] * 宋鸿儒, 硕士, 教授, 从事中药免疫药理和抗感染免疫工作, Tel:15369081616, E-mail: songhongru@163.com

2型糖尿病主要以胰岛细胞损伤和胰岛素分泌不足、糖脂代谢紊乱、血糖升高等为主要特征^[1]。此外,有研究证实,2型糖尿病患者存在不适当的免疫应答反应,表明2型糖尿病的发病与机体的免疫功能紊乱有一定的联系^[2]。非抗原特异性免疫治疗可提高2型糖尿病患者的免疫功能,同时对胰岛功能具有较好的保护作用。目前,用于2型糖尿病免疫治疗的制剂主要包括胸腺肽、白蛋白和免疫球蛋白等几种,但上述制剂是针对免疫功能低下的补充剂,属于对症治疗,对免疫功能改善往往是暂时性的,且不能兼顾对糖尿病本病的改善。因此,近年来国内外学者将目光转向了具有降糖和免疫调节作用的天然植物药的研究与开发^[3]。而枸杞多糖是其主要活性组分,是一种非特异免疫增强剂,现代药理学研究表明其具有降血糖、降血脂、调节机体免疫及抗氧化等多种生物学活性^[4]。本研究拟探讨枸杞总多糖对2型糖尿病大鼠免疫功能的调节作用,为枸杞总多糖2型糖尿病的临床应用提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 动物 Wistar大鼠,雄性,体重(160±10)g,购自北京维通利华动物实验中心,合格证号为SCXK(京)2010-0016。基础饲料、高脂高糖饲料均购自北京维通利华动物实验中心,高脂高糖饲料配方为:15%蔗糖,10%猪油,1.5%胆固醇,1.0%胆酸钠,63.5%基础饲料。

1.2 药物 枸杞子由承德医学院中药所赵春颖研究员鉴定为茄科植物宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L. 的干燥成熟果实(河北省承德市中药材科技开发公司,批号2010429141742875),枸杞总多糖由本实验室从枸杞子中提取。

1.3 试剂 兔抗大鼠IL-1 β 抗体、兔抗大鼠IL-6抗体、兔抗大鼠TNF- α 抗体、兔抗大鼠 β -actin抗体均购自美国Sigma公司;RP标记的山羊抗兔IgG购自美国Rockland公司。

2 方 法

2.1 2型糖尿病大鼠模型制备 大鼠适应性喂养1周后,给予高脂高糖饲料,喂养4周后,禁食12h,以40 mg·kg⁻¹剂量腹腔注射STZ(STZ溶于0.1 mol·L⁻¹柠檬酸缓冲液,pH 4.5)。继续高脂高糖饲料喂养1周后,禁食12h,采用毛细玻璃管从大鼠眼内眦静脉取血1 mL,以空腹血糖水平作为判断2型糖尿病模型造模成功的判断标准^[5],ISI = ln[1/FBG × FNS],FBG为空腹血糖,FNS为空腹胰岛素。

2.2 实验分组 随机选取糖尿病模型大鼠40只,

分为5组:模型组,枸杞总多糖低(100 mg·kg⁻¹)、中(200 mg·kg⁻¹)、高剂量(400 mg·kg⁻¹)组,格列苯脲组5 mg·kg⁻¹(阳性药物组);另取基础饲料喂养且体重相近的大鼠8只作为正常对照组。其中,3个多糖干预组和格列苯脲干预组大鼠每天灌胃相应剂量的药物(溶于0.9%生理盐水),正常对照组和模型组大鼠则每天灌胃同等容积的0.9%生理盐水,持续灌胃4周。试验过程中除正常对照组大鼠以基础饲料喂养外,其余各组大鼠均喂以高脂高糖饲料。

2.3 采用酶法测定血糖(FBG)水平 灌胃4周后,各组大鼠禁食12h,采用10 g·L⁻¹戊巴比妥钠以45 mg·kg⁻¹剂量腹腔麻醉大鼠,从各组大鼠的腹主动脉取血5 mL,3 000 r·min⁻¹离心10 min分离血清,采用酶法测定血糖(FBG)水平。

2.4 Western blot法检测各组大鼠脾脏组织中IL-1 β ,IL-6及TNF- α 等因子表达 将大鼠脾脏组织分别放入装有1 mL预冷的0.01 mmol·L⁻¹ PBS的匀浆器中,冰浴条件下匀浆,3 000 r·min⁻¹离心5 min,弃去上清;然后向沉淀物中加入400 μ L的蛋白裂解液,冰上裂解40 min;4 $^{\circ}$ C,12 000 r·min⁻¹离心15 min,收集上清即为蛋白提取溶液。BCA蛋白试剂盒对蛋白浓度进行定量,10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳对大鼠脾脏组织总蛋白进行分离,电转至PVDF膜上,5%脱脂奶粉-TBST封闭,分别用适宜效价的第一抗体(一抗分别为:1:500兔抗大鼠IL-1 β 抗体;1:500兔抗大鼠IL-6抗体;1:500兔抗大鼠TNF- β 抗体;1:5 000兔抗大鼠 β -actin抗体)和RP标记的山羊抗兔IgG二抗(1:5 000)进行孵育,期间用TBST充分洗膜,ECL检测特异性荧光信号,X射线胶片进行感光,常规显影、定影,晾干保存备用。胶片扫描后,采用Quantity One-v 4.6.2软件对显影条带进行分析,分别计算IL-1 β ,IL-6和TNF- α 条带与 β -actin条带的灰度比值,作为IL-1 β ,IL-6和TNF- α 蛋白的相对表达水平。

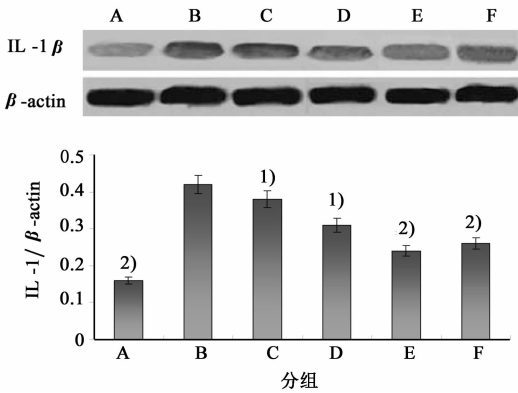
2.5 统计学处理 采用SPSS 13.0统计分析程序对试验数据进行处理,数据以 $\bar{x} \pm s$,组间两两比较用LSD-*t*检验,组间差异显著性用方差分析法检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结 果

3.1 对FBG水平的影响 由表1可以看出,枸杞多糖干预治疗能够显著地降低糖尿病大鼠的血糖水平,且与对照药物格列苯脲作用效果相当。

3.2 对脾脏组织中IL-1 β 蛋白表达的影响 与正常

对照组相比,模型组大鼠脾脏 IL-1 β 蛋白的表达提高了 1.625 倍 ($P < 0.01$);而经枸杞总多糖和格列苯脲干预治疗后,糖尿病大鼠脾脏组织中 IL-1 β 蛋白的表达均显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。在各治疗组中,枸杞总多糖高剂量和格列苯脲干预组的治疗效果最为明显。其中,400 mg·kg⁻¹ 枸杞总多糖干预组与模型对照相比降低了 42.86% ($P < 0.01$),而格列苯脲治疗组与模型对照相比降低了 40.28% ($P < 0.01$),两者之间无显著性差异。见图 1。



A. 正常对照;B. 模型;C. LBP 低剂量;D. LBP 中剂量;
E. LBP 高剂量;F. 格列苯脲

与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (图 2,3 同)。

图 1 枸杞总多糖对 2 型糖尿病大鼠脾脏组织中 IL-1 β 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

表 1 枸杞总多糖对 2 型糖尿病大鼠 FBG 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

| 组别 | 剂量/mg·kg ⁻¹ | FBG/mmol·L ⁻¹ |
|------|------------------------|---------------------------|
| 正常对照 | - | 4.56 ± 0.43 ²⁾ |
| 模型 | - | 12.59 ± 1.13 |
| LBP | 100 | 9.26 ± 0.89 ¹⁾ |
| | 200 | 8.19 ± 0.76 ²⁾ |
| | 400 | 6.76 ± 0.59 ²⁾ |
| | 格列苯脲 | 5 |

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 对脾脏组织中 IL-6 蛋白表达的影响 与正常对照组相比,模型组大鼠脾脏组织 IL-6 蛋白的表达提高了 3.067 倍 ($P < 0.01$);而经枸杞总多糖和格列苯脲干预治疗后,糖尿病大鼠脾脏组织中 IL-6 蛋白的表达均显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。在各治疗组中,枸杞总多糖高剂量和格列苯脲干预组的治疗效果最为明显。其中,400 mg·kg⁻¹ 枸杞总多糖干预组与模型组对照相比降低了 47.54% ($P < 0.01$),而格列苯脲治疗组与模型对照相比降低了 49.21% ($P < 0.01$),两者之间无显著性差异。见图 2。

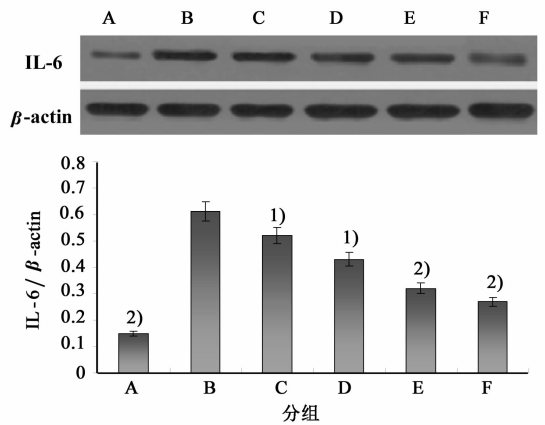


图 2 枸杞总多糖对 2 型糖尿病大鼠脾脏组织中 IL-6 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.4 对脾脏组织中 TNF- α 蛋白表达的影响 与正常对照组相比,糖尿病模型组大鼠脾脏组织 TNF- α 蛋白的表达提高了 2.667 倍 ($P < 0.01$);而经枸杞总多糖和格列苯脲干预治疗后,糖尿病大鼠脾脏组织中 TNF- α 蛋白的表达均显著降低 ($P < 0.05$)。在各治疗组中,枸杞总多糖高剂量和格列苯脲干预组的治疗效果最为明显。其中,400 mg·kg⁻¹ 枸杞总多糖干预组与糖尿病模型对照相比降低了 46.97% ($P < 0.01$),而格列苯脲治疗组与模型对照相比降低了 48.92% ($P < 0.01$),两者之间无显著性差异。见图 3。

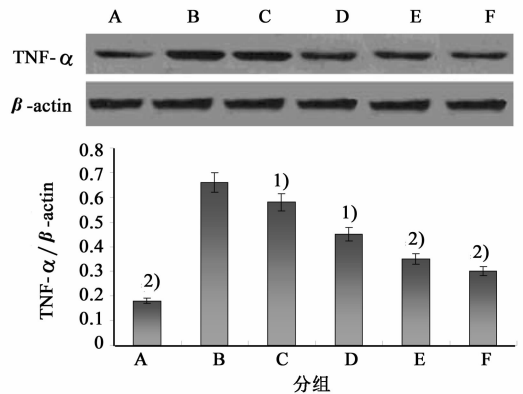


图 3 枸杞总多糖对 2 型糖尿病大鼠脾脏组织中 TNF- α 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

4 讨论

氧化应激是指活性氧和活性氮的产生与机体内抗氧化防御系统消除之间失衡,导致 ROS 和 RNS 产生过多,使机体蛋白和核酸发生损伤^[5]。有研究表明,氧化应激可能是糖尿病发病的根本原因之一^[6]。Kim H S 等^[7] 研究发现,氧化应激可通过激活 NF- κ B 通路调控一些炎性细胞因子(如 IL-1 β , IL-6, TNF- α 和 IFN- γ 等)的表达,进而诱导胰腺、脾

脏等细胞发生自身免疫和炎症反应,造成机体自身免疫功能紊乱,进而引起糖代谢紊乱,糖代谢产物堆积,加重机体免疫异常,导致并发症的发生。

在与氧化应激相关的众多炎性细胞因子中,IL-1 β 是一种作用广泛的细胞因子,其参与炎症反应,能促进机体的免疫应答;IL-6是机体内多种细胞产生的一种细胞因子,其可参与机体多种病理生理过程。有研究表明,作为机体免疫系统重要的调节因子,IL-1 β 和IL-6基因的异常表达和蛋白水平的增高与糖尿病的发生和发展密切相关^[8]。此外,TNF- α 是一种由单核巨噬细胞产生的炎性细胞因子,有研究显示,TNF- α 可诱导胰岛细胞表达Fas,进而通过Fas/FasL相互作用选择性的破坏胰岛细胞^[9],另外TNF- α 可诱导一氧化氮合酶(iNOS)的高度表达,生成大量NO,进一步产生氧化应激,破坏胰岛细胞^[10]。

在本研究中,对IL-1 β 和IL-6的检测结果表明,枸杞总多糖可明显抑制2型糖尿病大鼠脾脏中IL-1 β 和IL-6的表达,提示抑制细胞炎症因子IL-1 β 和IL-6的释放可能是枸杞总多糖调节机体自身免疫功能的机制之一。同时,IL-1 β 和IL-6的表达升高可导致2型糖尿病大鼠的胰岛损伤,枸杞总多糖干预后IL-1 β 和IL-6表达下调也表明2型糖尿病大鼠的胰岛损伤减轻,间接验证了枸杞总多糖对胰岛组织的保护作用。对TNF- α 的检测结果表明,枸杞总多糖治疗组大鼠脾脏组织中TNF- α 的蛋白表达水平较糖尿病对照组均明显下调,提示枸杞总多糖可能通过下调TNF- α 的表达来调节机体自身免疫功能,进而抵御氧化应激对胰岛 β 细胞的损伤。

此外,本次研究显示,枸杞总多糖与对照药物格列苯脲的作用效果相似。就作用机制而言,格列苯脲主要是通过刺激胰岛 β 细胞释放胰岛素,降低机体的血糖水平,进而缓解高血糖造成的糖毒性作用,降低氧化应激水平,减轻机体自身免疫功能紊乱。试验结果提示,枸杞总多糖与格列苯脲的降血糖效果相似,能够明显地降低糖尿病大鼠的血糖水平,且两者均可显著影响IL-1 β ,IL-6和TNF- α 等炎症因子的表达。枸杞总多糖可能也是通过改善机体的糖代谢,调节机体自身免疫,延缓糖尿病并发症的发生,

但具体的作用机制还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Amos A F A, Mc Carty D J, Zimmet P. The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010 [M]. Diabet Med, 1997, 14(Suppl 5):S1.
- [2] Butler A E, Janson J, Bonner-Weir S, et al. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes[J]. Diabetes, 2003, 52(1):102.
- [3] Zhang H N, He J H, Lin Z B. *In vitro* and *in vivo* protective effect of Ganoderma lucidum polysaccharide on alloxan-induced pancreatic islets damage [J]. Life Sciences, 2003, 73(18):2307.
- [4] 王玲, 李维波. 枸杞多糖对糖尿病小鼠模型免疫功能的影响[J]. 上海免疫学杂志, 2000, 20(3):159.
- [5] 李光伟, Bennu PH. 关于空腹血糖、空腹胰岛素乘积的倒数在流行病学研究中应用的补充说明[J]. 中华糖尿病杂志, 2005, 13(4):247.
- [6] Reddy V P, Zhu X W, Perry G, et al. Smith oxidative stress in diabetes and alzheimer's disease [J]. J Alzheimers Dis, 2009, 16:763.
- [7] Fardoun R Z. The use of vitamin E in type 2 diabetes mellitus[J]. Clin Exp Hypertens, 2007, 29(3):135.
- [8] Kim H S, Loughran P A, Rao J, et al. Carbon monoxide activates NF-kappa B via ROS generation and akt pathways to protect against cell death of hepatocytes [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008, 295:G146.
- [9] Fernandez R J M, Broch M, Vendrell J, et al. Interleukin-6 gene polymorphism and insulin sensitivity [J]. Diabetes, 2000, 49(3):517.
- [10] Donath M Y, Storrng J, Maedler K, et al. Inflammatory mediators and islet β -cell failure: a link between type 1 and type 2 diabetes [J]. J Mol Med, 2003, 81(8):455.
- [11] Bruun J M, Roeske-Nielsen A, Richelsen B, et al. Sulfatide increases adiponectin and decreases TNF-alpha, IL-6, and IL-8 in human adipose tissue *in vitro* [J]. Mol Cell Endocrino J, 2007, 263(1/2):142.

[责任编辑 何希荣]