

# 石榴鞣花多酚对糖尿病小鼠胰岛功能的影响

张红<sup>1</sup>, 马磊<sup>2</sup>, 刘超翠<sup>2</sup>, 张曼<sup>2</sup>, 张奕之<sup>2\*</sup>

(1. 新疆医科大学附属中医院药学部, 乌鲁木齐 830011;

2. 新疆医科大学基础医学院药理教研室, 乌鲁木齐 830011)

**[摘要]** **目的:**观察石榴鞣花多酚对糖尿病小鼠胰岛功能的影响,初步探讨其作用机制。**方法:**采用腹腔注射链脲佐菌素制备糖尿病小鼠模型,造模成功小鼠随机分为糖尿病模型组,石榴鞣花多酚低、高剂量组,格列本脲组;另取正常小鼠做空白对照。灌胃给药30 d,测量体重和空腹血糖,进行糖耐量实验,取胰脏制备HE和免疫组化切片,观察胰脏病理组织学变化及胰岛素转录因子胰腺十二指肠同源盒-1(PDX-1)的表达。**结果:**与糖尿病模型组比较,石榴鞣花多酚组小鼠体重增加,糖耐量改善,空腹血糖降低明显,胰岛面积增加,PDX-1蛋白表达增加( $P < 0.05$ )。**结论:**石榴鞣花多酚具有一定改善糖尿病小鼠胰岛功能的作用,其作用机制可能与上调胰脏PDX-1的表达有关。

**[关键词]** 石榴鞣花多酚; 糖尿病; 胰岛功能; 胰腺十二指肠同源盒-1

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)19-0174-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014190174

## Effects of Pomegranate Ellagic Polyphenol on Pancreatic Islet Function of Diabetes Mice

ZHANG Hong<sup>1</sup>, MA Lei<sup>2</sup>, LIU Chao-cui<sup>2</sup>, ZHANG Man<sup>2</sup>, ZHANG Yan-zhi<sup>2\*</sup>

(1. Traditional Medicine Hospital Department of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China;

2. Dept. of Pharmacology, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

**[Abstract]** **Objective:** The aim of this study was to observe the effects of pomegranate ellagic polyphenol (PEP) on pancreatic islet function of diabetes mice. **Method:** Streptozotocin was intraperitoneally injected to induce diabetes in mice, and the diabetes mice were randomly divided into model group, low-dose PEP group, high-dose PEP group and glibenclamide group, while normal mice were taken as control group. PEP was intragastrically administrated for 30 d, body weight, fasting blood glucose, sugar tolerance were tested, HE and immunohistochemistry pancreas slice were made to observe pathohistological changes and expression of transcription factor pancreatic duodenal homeobox-1 (PDX-1). **Result:** Compared with diabetes mice, in mice with PEP administration, the body weight, pancreatic islet area and PDX-1 expression increased, while the fasting blood glucose decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** PEP has a certain degree of effect on the improvement of pancreatic islet function in diabetes mice, and the mechanism might be involved in upregulating the expression of protein PDX-1.

**[Key words]** pomegranate ellagic polyphenol; diabetes; islet function; pancreatic duodenal homeobox-1

糖尿病是一种主要以血糖增高为临床特征的代谢障碍性疾病,以前认为2型糖尿病主要是胰岛素

抵抗(IR),现在发现其主要病理生理改变从以IR为主伴有胰岛素分泌不足发展到以胰岛素分泌不足

**[收稿日期]** 20140515(005)

**[基金项目]** 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2012211A038)

**[第一作者]** 张红,副主任药师,从事临床药学研究,Tel:18999853272,E-mail:1773660964@qq.com

**[通讯作者]** \*张奕之,副教授,从事糖尿病药理研究,E-mail:1533465971@qq.com

为主伴随 IR。胰岛功能障碍是 1 型和 2 型糖尿病发病的关键机制,其发病的中心环节之一均有胰腺  $\beta$  细胞功能的绝对或相对减退。因此,寻找保护胰岛功能的天然药物成为学者们关注的热点。石榴为传统中药,也是传统维吾尔药材,富含鞣花多酚类物质,现代研究表明其具有抗脂质过氧化、抗动脉硬化、降压、抗肿瘤、抗病毒等药理学活性<sup>[1]</sup>,但是否影响胰岛功能尚未见报道,因此,本实验采用小鼠糖尿病病理模型,观察石榴鞣花多酚对胰岛功能的影响及机制。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF 级 KM 雄性小鼠,体重(20 ± 2) g,购自新疆医科大学动物实验中心,合格证号 SCXK(新)2009-0001。

**1.2 药品与试剂** 石榴鞣花多酚(pomegranate ellagic polyphenol, PEP),北京化工大学袁启鹏教授课题组协助提取制备;链脲佐菌素(STZ, Sigma 公司,批号 S0B0);格列苯脲片(云鹏制药,批号 A110903),胰腺十二指肠同源盒-1(PDX-1, A-17)抗体(sc-14664, donkey anti-goat), IgG-HRP(sc-2020, Santa Cruz Biotechnology, Inc)。

**1.3 仪器** advantage 血糖仪血糖试纸(德国罗氏康全), BA400 型显微镜(麦克迪奥), XS205 型电子天平(METTLER TOLEDO)等。

## 2 方法

**2.1 糖尿病小鼠模型** 小鼠禁食 12 h,腹腔注射 STZ 150 mg · kg<sup>-1</sup> (STZ 溶解于 pH 4.4 的 0.1 mmol · L<sup>-1</sup> 冷柠檬酸缓冲液,新鲜配制)。3 d 后禁食 12 h 用血糖仪检测小鼠空腹血糖,以空腹血糖 ≥ 11.1 mmol · L<sup>-1</sup> 为成模标准。

**2.2 分组与给药** 将糖尿病模型小鼠随机分为糖尿病模型组(M 组),石榴鞣花多酚低剂量组(LP 组,150 mg · kg<sup>-1</sup>),石榴鞣花多酚高剂量组(HP 组,300 mg · kg<sup>-1</sup>),格列本脲组(G 组,1.2 mg · kg<sup>-1</sup>),M 组和空白组灌胃生理盐水,每日 10:00 给药。

**2.3 指标检测** 给药后每 2 周称重;剪尾尖取血测小鼠空腹血糖(测试前禁食 12 h);进行葡萄糖耐量试验。给药 30 d 后摘取胰脏,制备 HE 切片观察胰脏病理学改变,制备免疫组化片检测 PDX-1 表达。

**2.4 统计学分析** 采用 SPSS 16.0 统计软件对数据进行处理,实验数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,AVON 法进行方差齐性检验及多组间比较。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 PEP 对糖尿病小鼠体重的影响** 与正常组比较,糖尿病模型组小鼠在给药第 2,4 周体重明显降低,有显著统计学差异( $P < 0.05$ );与模型组比较,石榴鞣花多酚低、高剂量组和格列苯脲组体重在给药第 4 周明显增加,有统计学差异( $P < 0.05$ ),见表 1。

表 1 石榴鞣花多酚对糖尿病小鼠体重的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /mg · kg <sup>-1</sup>	给药前	给药第 2 周	给药第 4 周
		/g	/g	/g
正常	-	20.15 ± 2.11	31.37 ± 1.96	38.86 ± 2.72
模型	-	20.71 ± 2.36	15.57 ± 2.25 <sup>2)</sup>	15.2 ± 3.47 <sup>1)</sup>
鞣花多酚	150	21.09 ± 1.96	17.85 ± 2.89	20.6 ± 2.13 <sup>3)</sup>
	300	20.55 ± 2.09	16.78 ± 1.94	22.7 ± 2.72 <sup>3)</sup>
格列本脲	1.2	20.42 ± 2.56	18.10 ± 2.97 <sup>3)</sup>	19.8 ± 2.42 <sup>3)</sup>

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

**3.2 PEP 对糖尿病小鼠空腹血糖的影响** 与正常组比较,糖尿病模型组小鼠空腹血糖显著升高。与模型组比较,石榴鞣花多酚低、高剂量组均能明显降低空腹血糖( $P < 0.05$ );给药 4 周时,鞣花多酚低、高剂量组空腹血糖增高,但仍低于糖尿病模型组( $P < 0.05$ ),见表 2。

表 2 石榴鞣花多酚对糖尿病小鼠空腹血糖影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /mg · kg <sup>-1</sup>	给药前	给药第 2 周	给药第 4 周
		/mmol · L <sup>-1</sup>	/mmol · L <sup>-1</sup>	/mmol · L <sup>-1</sup>
正常	-	4.32 ± 0.61	4.74 ± 0.64	4.24 ± 0.67
模型	-	4.63 ± 0.92	16.96 ± 1.09 <sup>2)</sup>	22.05 ± 1.08 <sup>2)</sup>
鞣花多酚	150	4.41 ± 0.83	9.99 ± 1.04 <sup>4)</sup>	16.90 ± 0.23 <sup>3)</sup>
	300	4.59 ± 0.77	6.25 ± 0.42 <sup>4)</sup>	19.97 ± 0.98 <sup>3)</sup>
格列本脲	1.2	5.01 ± 0.70	8.49 ± 1.15 <sup>4)</sup>	11.96 ± 0.68 <sup>4)</sup>

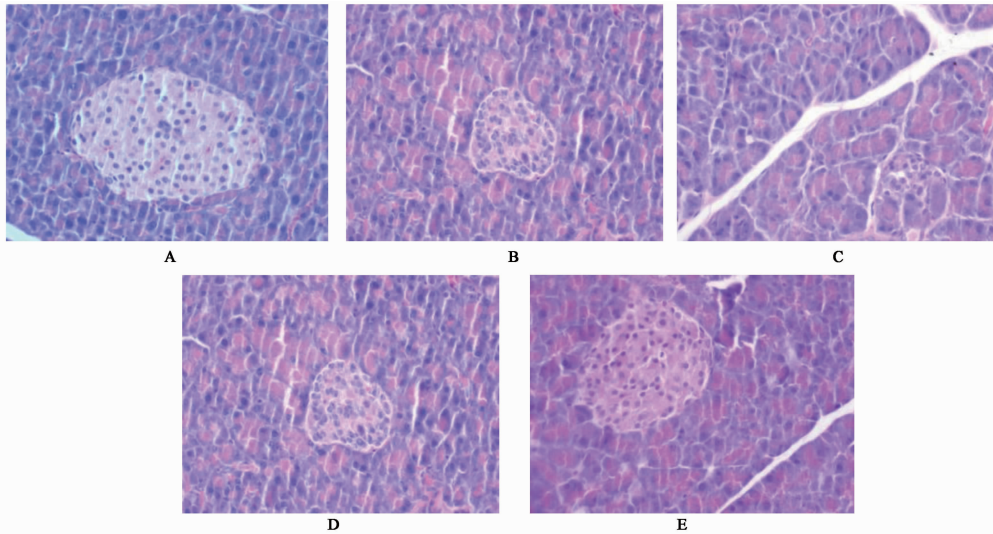
**3.3 PEP 对糖尿病小鼠葡萄糖耐量的影响** 在糖尿病模型第 1 周,各组小鼠血糖水平差异不大,但糖耐量实验显示石榴鞣花多酚低、高剂量组在灌胃葡萄糖后 1,2 h 血糖值均明显低于模型组,差别有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 3。

表 3 石榴鞣花多酚对糖尿病小鼠葡萄糖耐量影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /mg · kg <sup>-1</sup>	糖耐量 / mmol · L <sup>-1</sup>		
		0 h	1 h	2 h
正常	-	4.34 ± 0.64	8.67 ± 0.75	4.66 ± 0.52
模型	-	15.34 ± 0.68 <sup>2)</sup>	23.87 ± 0.44 <sup>2)</sup>	16.17 ± 0.62 <sup>2)</sup>
鞣花多酚	150	14.78 ± 0.75	17.72 ± 0.76 <sup>3)</sup>	13.62 ± 0.63 <sup>3)</sup>
	300	13.36 ± 0.29	17.04 ± 0.63 <sup>3)</sup>	12.34 ± 0.27 <sup>3)</sup>

**3.4 PEP 对糖尿病小鼠胰脏病理组织学影响** 各组小鼠胰脏切片 HE 染色,光镜观察。正常对照组小鼠胰岛多为圆形或椭圆形的细胞团,界限清楚,数量较多,胰岛内细胞排列规则,数量较多。模型组胰岛数

量明显减少,形态不规则,胰岛内细胞数量减少,核的形态大小不一,排列不规则。与模型组比较,石榴鞣花多酚给药组胰岛数目增多,形态较规则,多为圆形,排列较整齐,胰岛内细胞数量增多。见图 1。



A. 正常对照组;B. 格列本脲组;C. 糖尿病模型组;D. 石榴鞣花多酚大剂量组;E. 石榴鞣花多酚低剂量组

图 1 各组小鼠胰脏组织病理学结果 (HE × 400)

**3.5 PEP 对糖尿病小鼠胰岛 PDX-1 表达的影响** 免疫组化显示糖尿病模型组胰腺胰岛中 PDX-1 阳性表达区域面积比 ( $6.25 \pm 2.17$ )% 显著低于正常对照组 ( $27.64 \pm 2.48$ )% ( $P < 0.05$ )。石榴鞣花多酚低、高剂量组 PDX-1 阳性表达区域面积比分别为 ( $9.11 \pm 2.97$ )% , ( $10.14 \pm 1.64$ )% ,较糖尿病模型组增加 ( $P < 0.05$ ) ,但仍然显著低于正常对照组 ( $P < 0.05$ )。格列本脲组 PDX-1 阳性表达区域面积比 ( $14.47 \pm 2.77$ )% 较糖尿病模型组增加 ( $P < 0.05$ )。

#### 4 讨论

近年来研究显示,胰岛细胞功能状态可能是糖尿病是否发生的决定性因素,也是防止糖尿病病程进展的重要保障。PDX-1 被认为是胰岛素分泌细胞群发育的主控基因,不仅是胰岛素转录因子,还可以调控胰岛素相关基因如葡萄糖激酶 (GK)、葡萄糖转运蛋白 (GLUT2) 等的表达,对促进胰岛  $\beta$  细胞增殖以及抑制其凋亡也有重要作用,是维持胰岛  $\beta$  细胞的正常功能的重要因子<sup>[2]</sup>。PDX-1 表达缺陷与糖尿病的发生密切相关,长期高血糖可以损伤 PDX-1 基因,使 PDX-1 表达下调,使胰岛素分泌减少,会进一步加重血糖代谢紊乱<sup>[3]</sup>。本实验证实与正常小鼠相比,糖尿病小鼠血糖显著升高,胰岛面积明显萎缩,PDX-1 表达明显减少。

石榴是新疆地区特色药食两用植物,近年来随着药理作用的深入研究,其化学成分特别是鞣花多酚类的药理学活性日益受到重视。国外研究显示,鞣花多酚能通过激活 HuH7 细胞内 PPAR gamma-PKA-cAMP 途径<sup>[4]</sup>增强对氧磷酶 1 (PON1) 基因启动活性,同时促进 PON1 表达,进而保护低密度脂蛋白 (LDL),高密度脂蛋白 (HDL) 免于被氧化;能提高 PPAR  $\gamma$ /PPAR- $\alpha$  的表达从而改善肝脏脂肪代谢及胰岛素敏感性<sup>[5]</sup>;其抗炎作用显著,能抑制细胞因子引起的炎症<sup>[6]</sup>,减少 IL-1 诱导的 p38 $\alpha$ -MAPK 的磷酸化,抑制 JNK-MAPK 和 NF- $\kappa$ B 活性<sup>[7]</sup>;能减低糖尿病小鼠肾脏的糖基化<sup>[8]</sup>和炎症等。这些研究表明鞣花多酚具有明显的肝细胞保护、血管保护等作用,对改善糖尿病并发症引起的靶器官损伤很有益处,但对糖尿病发病的源头器官——胰脏的研究尚欠缺。

本课题组前期研究发现,富含多酚的石榴乙酸乙酯提取物对胰岛细胞生长活力有显著影响,且能对抗高糖高脂毒性促进大鼠原代培养胰岛细胞分泌胰岛素<sup>[9]</sup>。本研究在动物体内实验显示石榴鞣花多酚灌胃后,对 STZ 诱导的糖尿病小鼠有明显降低血糖作用,高剂量组在给药 2 周时作用尤其显著 ( $6.25 \pm 0.42$ ) mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> vs ( $16.96 \pm 1.09$ ) mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>。

$L^{-1}$ 。在糖尿病造模第1周,各组小鼠血糖水平差异不大,这时观察了鞣花多酚对餐后血糖的影响,糖尿病模型组小鼠餐后1 h 血糖突高,显示胰岛素分泌能力受损,而石榴鞣花多酚给药组餐后1 h 血糖显著降低,显示可能改善了胰岛功能从而改善了对血糖浓度的调节能力,也可能是其对肠道葡萄糖苷酶的抑制作用,延缓葡萄糖的吸收,具体机制有待进一步研究。胰脏病理组织学结果显示糖尿病模型组小鼠胰岛面积严重萎缩,而石榴鞣花多酚给药组胰岛面积明显增加,同时观察到胰岛 PDX-1 的表达增加,因此初步推测鞣花多酚可能通过上调胰岛 PDX-1 的表达,改善胰岛功能而降低血糖。已知 PDX-1 可以促进胰岛  $\beta$  细胞的增殖,抑制细胞凋亡,而鞣花多酚是否对胰岛细胞的凋亡有影响及具体分子机制有待进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] Johanningsmeier S D, Harris G K. Pomegranate as a functional food and nutraceutical source [J]. *Annu Rev Food Sci Technol*, 2011, 2:181.
- [2] Kaneto H, Matsuoka T A, Miyatsuka T, et al. PDX-1 functions as a master factor in the pancreas [J]. *Front Biosci*, 2008, 13(3):6406.
- [3] Kaneto H, Matsuoka T A. Down-regulation of pancreatic transcription factors and incretin receptors in type 2 diabetes [J]. *World J Diabetes*, 2013, 4(6):263.
- [4] Khateeb J, Gantman A, Kreitenberg A J, et al.

Paraoxonase 1 ( PON1 ) expression in hepatocytes is upregulated by pomegranate polyphenols: a role for PPAR-gamma pathway [ J ]. *Atherosclerosis*, 2010, 208 (1):119.

- [5] Yoshimura Y, Nishii S, Zaima N, et al. Ellagic acid improves hepatic steatosis and serum lipid composition through reduction of serum resistin levels and transcriptional activation of hepatic ppara in obese, diabetic KK-A ( y ) mice [ J ]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 434(3):486.
- [6] Giménez-Bastida J A, Larrosa M, González-Sarrías A, et al. Intestinal ellagitannin metabolites ameliorate cytokine-induced inflammation and associated molecular markers in human colon fibroblasts [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(36):8866.
- [7] Rasheed Z, Akhtar N, Haqqi T M. Pomegranate extract inhibits the interleukin-1 $\beta$ -induced activation of MKK-3, p38 $\alpha$ -MAPK and transcription factor RUNX-2 in human osteoarthritis chondrocytes [ J ]. *Arthritis Res Ther*, 2010, 12(5):R195.
- [8] Chao C Y, Mong M C, Chan K C, et al. Anti-glycative and anti-inflammatory effects of caffeic acid and ellagic acid in kidney of diabetic mice [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2010, 54(3):388.
- [9] 姚海, 王焯, 徐永华, 等. 石榴皮乙酸乙酯提取物对胰岛细胞生长活力的影响 [J]. *新疆医科大学学报*, 2010, 33(10):1168.

[责任编辑 邹晓翠]

## 《中国医药导报》杂志 欢迎订阅 欢迎投稿

《中国医药导报》杂志是国家卫生和计划生育委员会主管、中国医学科学院主办的医药卫生期刊,现为旬刊,国内统一刊号:CN11-5539/R,国际标准刊号 ISSN1673-7210,邮发代号:80-372,本刊系中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)、美国化学文摘(CA)收录期刊、解放军医学图书馆中文生物医学期刊全文数据库收录期刊,所刊登的文章被万方数据、中国知网、中文科技期刊数据库全文收录。每期定价20元,全年36期优惠价540元。

本刊设专家论坛、综述、论著、实验研究、药理与毒理、临床研究、药物与临床、麻醉与镇痛、医学检验、病理分析、影像与介入、病例报告、医疗器械、中医中药、生物医药、药品检验、制剂与技术、药师与临床、不良反应监测、药物经济学、调查研究、护理研究、教育研究、科研管理、法规与标准、卫生研究、医疗管理、产业与市场、医药监管、工作探讨等栏目。是广大医药卫生科研、教育、医护、药事、经营管理人员了解医药研究进展、发展动态,展示医药科研成果,学习先进经验,探讨工作难题,交流和提高业务学术水平的得力助手,也是发表医药学术论文的阵地。在本刊发表的论文可获得继续教育学分。本刊订户凭订阅单复印件投稿优先发表。

社址:北京市朝阳区通惠家园惠润园(壹线国际)5-3-601 邮编:100025

投稿热线:010-59679061 59679063 发行热线:010-59679533

传真:010-59679056 投稿邮箱:yydb@vip.163.com

网址:www.yiyaodaobao.com.cn