

杨桃根总提取物对糖尿病心肌病大鼠的影响

李伟斯, 方芳, 覃斐章, 黄仁彬, 焦杨*
(广西医科大学药学院, 南宁 530021)

[摘要] **目的:**探讨杨桃根总提取物(YTG)对链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病心肌病大鼠心脏功能的影响。**方法:**雄性Wistar大鼠给予高糖高脂饮食4周后,用负荷小剂量的STZ ip建立糖尿病大鼠模型。将造模成功的大鼠随机分为模型组,二甲双胍组,YTG高、中、低剂量组(0.6,0.3,0.15 g·kg⁻¹·d⁻¹),另设正常组,每组8只,ig给药4周,分别测定空腹血糖(FBG),体重,甘油三酯(TG),低密度脂蛋白(LDL),总胆固醇(TC),肌酸激酶(CK),天冬氨酸转氨酶(AST),肌酸激酶同工酶(CK-MB),乳酸脱氢酶(LDH), α -羟丁酸脱氢酶(HBDH),丙二醛(MDA)的含量以及总超氧化物歧化酶(T-SOD)的活性,并进行心肌组织HE染色。**结果:**与正常组比较,模型组FBG,TG,LDL,TC,CK,AST,CK-MB,LDH,HBDH,MDA含量明显升高,体重明显降低,T-SOD的活性明显降低($P < 0.05$);与模型组比较,各YTG治疗组FBG,TG,LDL,TC,CK,AST,CK-MB,LDH,HBDH,MDA含量降低,体重明显升高,T-SOD的活性升高($P < 0.05$)。与正常组比较,模型组心肌细胞排列紊乱,细胞肥大变形,细胞核深染,间质纤维化明显;与模型组比较,各给药组心肌细胞肥大变形有所改善,间质纤维化得到明显改善。**结论:**YTG可减轻糖尿病心肌病大鼠心脏功能的损害,对心脏功能有一定的改善作用,其机制可能与清除自由基有关。

[关键词] 杨桃根总提取物;糖尿病心肌病;高糖高脂饮食;链脲佐菌素

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)07-0128-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015070128

Effects of *Averrhoa carambola* Root Extract on Diabetic Cardiomyopathy in Rats LI Wei-si, FANG Fang, QIN Fei-zhang, HUANG Ren-bin, JIAO Yang* (Pharmacy of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

[Abstract] **Objective:** To examine the potential effect of *Averrhoa carambola* root (Yaotaogen, YTG) extract on streptozotocin (STZ)-induced diabetic cardiomyopathy in rats. **Method:** Male Wistar rats fed a high glucose and hyperlipid diet for 4 weeks. Then diabetes mellitus model was induced by a single injection of STZ. Diabetes mellitus rats were divided into the metformin group, the model group, the high-, medium-, low-dose YTG extract groups (0.6, 0.3, 0.15 g·kg⁻¹·d⁻¹). Another 8 rats were assigned to the normal group. After 4 weeks, the levels of fasting blood-glucose (FBG), body weight (BW), triglyceride (TG), low density lipoprotein (LDL), total cholesterol (TC), creatine kinase (CK), aspartate aminotransferase (AST), creatine kinase isoenzyme (CK-MB), lactic dehydrogenase (LDH), hydroxybutyrate dehydrogenase (HBDH), malondialdehyde (MDA), and the vitality of total superoxide dismutase (T-SOD) were measured. The hematoxylin-eosin (HE) staining of myocardial tissue was conducted. **Result:** Compared to the normal group, the levels of FBG, CK, AST, CK-MB, LDH, HBDH, and MDA increased, BW and the vitality of T-SOD decreased in the model group ($P < 0.05$). Compared to the model group, the levels of FBG, TG, LDL, TC, CK, AST, CK-MB, LDH, HBDH and MDA decreased, BW and the vitality of T-SOD increased in all doses of YTG groups ($P < 0.05$). Moreover, YTG could improve cell hypertrophy deformation and interstitial fibrosis apparently. **Conclusion:** YTG extract has a beneficial effect on heart function by relieving the heart damage in diabetic cardiomyopathy. The mechanism may be related to removing the free radicals.

[收稿日期] 20140826(015)

[基金项目] 广西自然科学基金重点项目(2011GXNSFD018030);南宁市科学技术局科技攻关与新产品试制项目(201102084C);广西科技基础条件平台建设项目(12-97-20);南宁市青秀区科学研究与技术开发计划科技攻关与新产品试制项目(2013S12)

[第一作者] 李伟斯, 硕士, 从事生化药理学研究, Tel:0771-5339805, E-mail:837143902@qq.com

[通讯作者] *焦杨, 硕士生导师, 从事生化药理学研究, Tel:0771-5358014, E-mail:jiaoyanggx@163.com

[Key words] *Averrhoa carambola* root extract; diabetic cardiomyopathy; high glucose and hyperlipid diet; streptozotocin

糖尿病是一种内分泌代谢异常的疾病,其并发症的范围非常广泛,几乎遍及全身各组织器官。糖尿病心脏功能损害就是其最常见最严重的并发症之一,称为糖尿病心肌病,严重者可致死亡。杨桃树是酢浆草科植物,其广泛种植于热带和亚热带地区,经本课题组的前期研究发现,杨桃根总提取物(YTG)相关的化学成分有降血糖的活性^[1-3]。目前,尚无将杨桃根用于糖尿病心肌病(diabetic cardiomyopathy, DCM)治疗的临床以及实验研究。本实验采用高糖高脂饮食联合小剂量链脲佐菌素诱导2型糖尿病大鼠模型,观察YTG给药后对糖尿病心肌病大鼠心脏功能的保护作用,并初步探讨这一保护作用的机制。

1 材料

1.1 动物 雄性Wistar大鼠,体重160~200 g,购与广西医科大学实验动物中心。动物合格证号SCXK(桂)2009-0002。

1.2 药物及试剂 二甲双胍(中美上海施贵宝制药有限公司,批号1312125),杨桃根总提取物由本课题组自行提取^[4],取杨桃根碎块500 g加5 L 70%乙醇浸泡12 h后回流提取2 h,过滤,滤液备用,滤渣再次加4 L 70%乙醇回流提取1.5 h,过滤,滤液备用,滤渣加3 L 70%乙醇回流提取1 h,过滤,合并3次滤液,用旋转蒸发器减压浓缩并真空干燥成粉末状,即得醇提取物。取滤渣加5 L水回流提取2 h,过滤,用旋转蒸发器减压浓缩并真空干燥成粉末状,即得水提取物。合并醇提取物和水提取物则是杨桃根总提取物。丙二醛(MDA),考马斯亮蓝测定试剂盒以及总超氧化物歧化酶(T-SOD)活性测定试剂盒(南京建成生物制品有限公司)。

1.3 仪器 722sp型可见分光光度计(上海棱光技术有限公司),TU-1810DSPC型紫外分光光度计(北京普析通用有限公司),ACCU-CHEK Performa型血糖仪(德国罗氏诊断公司),CX-31型倒置显微镜(日本Olympus公司)。

2 方法

2.1 糖尿病模型的建立与分组 雄性Wistar大鼠在室温18~25℃,相对湿度40%~70%,12 h光照昼夜循环的环境适应性喂养1周后,喂以高糖高脂饲料(20%蔗糖,10%猪油,2.5%胆固醇,1%胆盐和66.5%基础饲料)^[5]。4周后,大鼠禁食12 h后,ip链脲佐菌素(STZ)35 mg·kg⁻¹,STZ溶于pH 4.5,

0.1 mol·L⁻¹柠檬酸缓冲液中,4℃配置,随配随用;72 h后,测空腹血糖(FBG),隔日1次,连续3次,将空腹血糖>7.8 mmol·L⁻¹的大鼠诊断为糖尿病大鼠。将糖尿病大鼠随机分为5组,模型组,二甲双胍组,YTG高、中、低剂量组,另设正常组,每组8只。

2.2 给药 二甲双胍组给予二甲双胍0.16 g·kg⁻¹·d⁻¹,YTG高、中、低剂量组分别给予0.6,0.3,0.15 g·kg⁻¹·d⁻¹,模型组和正常组给予等容积的纯净水,连续ig给药4周。

2.3 血糖和体重的测定 实验末期,大鼠禁食12 h,测体重并用罗氏血糖仪测FBG。

2.4 取材 血清:给药结束后,大鼠禁食12 h,眼内眦静脉取血,3 000 r·min⁻¹,5 min,分离出血清,冷冻保存备用。心脏:取血后,立即处死大鼠,取其心脏,用冰冻的生理盐水清洗,滤纸吸干,切心尖1/2放于10%的甲醛溶液中固定,剩余的心肌组织分装保存于-80℃冰箱。

2.5 指标的测定 用全自动生化仪测DCM大鼠血清中甘油三酯(TG),低密度脂蛋白(LDL),总胆固醇(TC),肌酸激酶(CK),天冬氨酸转氨酶(AST),肌酸激酶同工酶(CK-MB),乳酸脱氢酶(LDH), α -羟丁酸脱氢酶(HBDH)的水平。试剂盒测心肌匀浆上清液中的MDA,总蛋白的含量以及T-SOD的活性。

2.6 HE染色 将心肌组织切成3 mm左右的薄片后用0.01 mol·L⁻¹ PBS泡过夜,取薄片用常规梯度的乙醇脱水包埋切片,制成石蜡切片。经过二甲苯脱蜡和梯度乙醇复水后,用HE染色,最后再进行梯度乙醇和二甲苯脱水,并滴加中性树脂封固,镜检。

2.7 统计学分析 采用SPSS 16.0软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间经方差齐性检验,若方差齐则用LSD法进行组间比较,若方差不齐则用Ganes-Howell法进行组间比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对DCM大鼠FBG和体重的影响 给药4周后,模型组的大鼠明显消瘦,毛发没有光泽并有多饮多食多尿的表现。与正常组比较,模型组大鼠体重明显降低($P < 0.05$),FBG明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,YTG高、中剂量组的大鼠体重明显增加,FBG也有所降低($P < 0.05$),毛发恢复光泽,但仍有轻微的多饮多食多尿的现象。见表1。

表 1 YTG 对 DCM 大鼠 FBG 和体重的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Effects of YTG on FBG and body weight in DCM rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	FBG/mmol·L ⁻¹	体重/g
正常	-	5.8 ± 0.6	364.4 ± 20.4
模型	-	10.9 ± 1.1 ¹⁾	292.6 ± 25.6 ¹⁾
二甲双胍	0.16	6.5 ± 1.3	354.8 ± 22.6
YTG	0.6	6.4 ± 1.0 ²⁾	352.8 ± 18.7 ²⁾
	0.3	6.7 ± 1.4 ²⁾	350.9 ± 24.2 ²⁾
	0.15	10.8 ± 1.2	324.9 ± 33.6

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

表 2 YTG 对 DCM 大鼠 CK,AST,CK-MB,LDH 和 HBDH 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Effects of YTG on CK,AST,CK-MB,LDH and HBDH in DCM rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CK/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	CK-MB/U·L ⁻¹	LDH/U·L ⁻¹	HBDH/U·L ⁻¹
正常	-	818.5 ± 100.7	111.2 ± 18.7	788.5 ± 92.2	753.6 ± 121.3	248.7 ± 22.4
模型	-	1 273.0 ± 372.7 ¹⁾	175.8 ± 54.3 ¹⁾	1 028.2 ± 217.3 ¹⁾	1 009.6 ± 204.2 ¹⁾	339.6 ± 76.8 ¹⁾
二甲双胍	0.16	834.6 ± 129.8	116.7 ± 28.2	757.3 ± 178.1	725.8 ± 97.0	246.6 ± 37.9
YTG	0.6	877.1 ± 148.3 ²⁾	118.3 ± 25.8 ²⁾	753.1 ± 209.1 ²⁾	786.5 ± 130.5 ²⁾	256.5 ± 54.8 ²⁾
	0.3	865.0 ± 327.3 ²⁾	124.5 ± 25.8 ²⁾	1 034.0 ± 263.0 ²⁾	756.2 ± 217.4 ²⁾	256.2 ± 57.6 ²⁾
	0.15	1 076.4 ± 182.1	141.6 ± 32.8	1 034.5 ± 263.5	973.3 ± 226.6	341.1 ± 88.8

表 3 YTG 对 DCM 大鼠 TG,LDLC,TC,MDA 和 T-SOD 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 3 Effects of YTG on TG,LDLC,TC,MDA and T-SOD in DCM rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TG/mmol·L ⁻¹	LDLC/mmol·L ⁻¹	TC/mmol·L ⁻¹	MDA/μmol·L ⁻¹	T-SOD/U·mL ⁻¹
正常	-	0.6 ± 0.1	0.2 ± 0.0	2.2 ± 0.1	3.3 ± 0.6	100.1 ± 9.9
模型	-	0.9 ± 0.2 ¹⁾	0.3 ± 0.1 ¹⁾	3.1 ± 0.5 ¹⁾	7.4 ± 0.7 ¹⁾	27.9 ± 7.2 ¹⁾
二甲双胍	0.16	0.6 ± 0.1	0.2 ± 0.0	1.9 ± 0.3	4.0 ± 0.7	99.0 ± 11.5
YTG	0.6	0.6 ± 0.1 ²⁾	0.2 ± 0.1 ²⁾	2.0 ± 0.3 ²⁾	4.0 ± 0.6 ²⁾	99.0 ± 8.9 ²⁾
	0.3	0.7 ± 0.1 ²⁾	0.2 ± 0.1 ²⁾	2.2 ± 0.2 ²⁾	4.0 ± 0.3 ²⁾	99.7 ± 6.1 ²⁾
	0.15	0.8 ± 0.2	0.2 ± 0.0	2.6 ± 0.3	7.3 ± 1.1	32.6 ± 9.9

3.4 对 DCM 大鼠心肌组织的影响 大鼠心肌组织 HE 染色后观察,正常组心肌细胞排列紧密整齐,细胞核染色清晰可见;模型组心肌细胞排列紊乱,细胞肥大变形,细胞核深染,间质纤维化明显;二甲双胍组和 YTG 高剂量组心肌细胞排列稍乱,细胞形态与正常组的大体相同,核染清晰,其余各组均有所改善。见图 1。

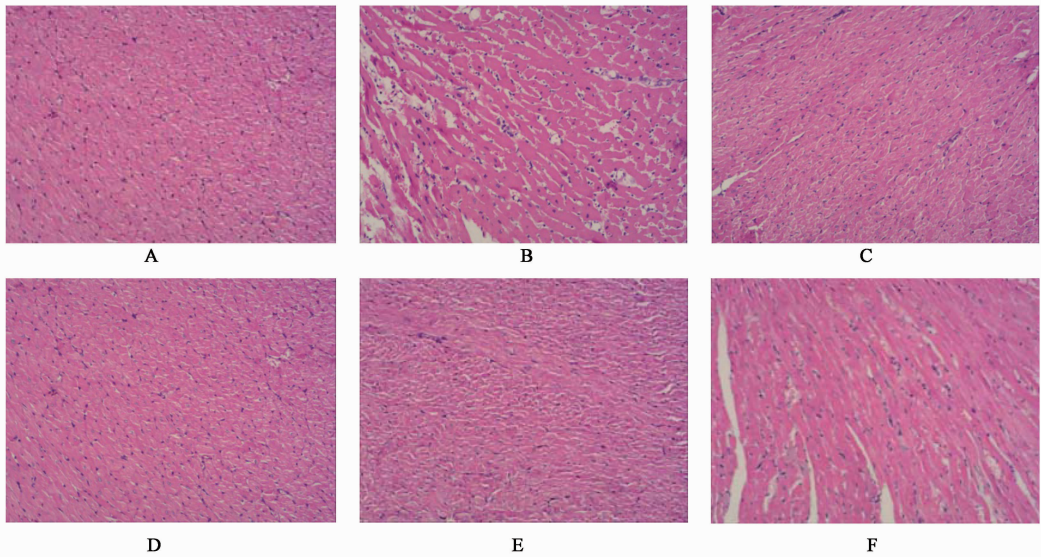
4 讨论

1972 年,Rubler 等人^[6]在糖尿病患者中发现一种特异性心肌病变。在 1974 年 Hamby 等^[7]首次提出 DCM 这一个概念后,就有很多学者针对 DCM 的

3.2 对 DCM 大鼠血清中 CK,AST,CK-MB,LDH, HBDH 水平的影响 与正常组比较,模型组中的 CK,AST,CK-MB,LDH, HBDH 水平明显升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,YTG 高、中剂量组中的 CK,AST,CK-MB,LDH, HBDH 水平明显降低 ($P < 0.05$)。见表 2。

3.3 对 DCM 大鼠 TG,LDLC,TC,MDA 和 T-SOD 水平的影响 与正常组比较,模型组的 TG,LDLC,TC,MDA 均明显的升高 ($P < 0.05$),T-SOD 则明显降低 ($P < 0.05$);与模型组比较,YTG 高、中剂量组的 TG,LDLC,TC,MDA 明显降低,而 T-SOD 明显升高 ($P < 0.05$)。见表 3。

特征、临床表现、病理结构等方面进行了研究和描述。糖尿病患者有心功能和心肌结构的改变,它是不同于高血压、冠心病和其他已知心脏疾病的一种独立存在的疾病^[8]。基于糖尿病的基础上而产生的心血管疾病 DCM 是糖尿病患者死亡的重要原因之一。经研究发现^[9],死于心血管系统疾病的糖尿病患者高达 70% 以上,是非糖尿病者心血管系统死亡率的 2~3 倍。因此,DCM 已经成为当今医学界研究学习的重点和热点。目前,DCM 的机制尚未明确,且对 DCM 的治疗多采用传统的治疗药物,如强心剂、血管紧张素转化酶抑制剂、β-受体阻滞剂等。



A. 正常组; B. 模型组; C. 二甲双胍组; D. YTG 0.6 g·kg⁻¹组; E. YTG 0.3 g·kg⁻¹组; F. YTG 0.15 g·kg⁻¹组

图 1 YTG 对 DCM 大鼠心肌组织的影响(HE, ×100)

Fig.1 Effects of YTG on cardiac muscle tissue in DCM rats(HE, ×100)

所以对建立正确的动物模型,研究探讨 DCM 的机制和治疗有着重要的意义。

恰当的动物模型是研究 2 型 DCM 发病机制、病理结构和治疗药物的基础,力求与 DCM 患者临床的发病形态相吻合。在实验对象上如能使用转基因动物则效果最佳,但其对实验室的条件要求甚高,且价格昂贵,使用受到限制。单纯的用高糖高脂饲料喂养诱导也会出现心脏功能障碍^[10-11],代谢异常等特点,但不明显,且造模周期很长。本实验采用的是 Wistar 大鼠,高糖高脂饲料喂养 4 周后用 STZ 多次低剂量诱导成模。与小鼠相比,大鼠的胰岛 β 细胞对 STZ 的敏感性更强更稳定^[12]。高糖高脂饮食可使大鼠出现肥胖和高血脂,胰岛 β 细胞可被低剂量的 STZ 选择性破坏,致使机体胰岛素含量降低,血糖升高,引起 DC,继而引起心肌病变。有关资料显示,糖尿病大鼠 2 周后即有心肌超微结构的改变^[13]。此方法的优点是成本低、成模率高、死亡率低、周期短。

由于胰岛素绝对或相对不足,造成心肌细胞对葡萄糖的利用受阻,心肌细胞能量的获取只能依靠脂肪酸氧化。但在生成等量 ATP 的前提下,脂肪酸氧化所需要的耗氧量比葡萄糖要高很多。而耗氧量的增多会直接损害心肌细胞,使心肌细胞的结构和功能发生改变,比如间质纤维化,心肌细胞肥大,心肌顺应性降低等等^[14]。在实验中对心肌细胞进行 HE 染色,与模型组相比较, YTG 高剂量的心肌细胞排列稍整齐,细胞形态也相对正常,核染清晰。

糖尿病以胰岛素抵抗和代谢紊乱为特征,而代谢紊乱会导致糖尿病心肌损伤^[15],进而引起性能障碍。临床上常用 CK, AST, CK-MB, LDH, HBDH 来判断心肌损伤,与模型组比较, YTG 高、中剂量组的 CK, AST, CK-MB, LDH, HBDH 均明显下降。T-SOD 活力的高低间接反应了机体清除氧自由基的能力,而 MDA 含量额高低又间接反应了机体被自由基攻击的严重程度。在实验中,与模型组比较, YTG 高、中剂量组的 T-SOD 明显提高,且 MDA 明显降低。所以, YTG 对糖尿病所引起的心肌损伤有一定的改善作用,其机制可能与清除自由基有关,有待进一步的研究。

[参考文献]

- [1] 黄桂红,贺敏,黄仁彬. 杨桃根醇提物对糖尿病模型小鼠的降血糖作用[J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29(15):1256-1258.
- [2] 黄桂红,黄纯真,黄仁彬. 阳桃根多糖对糖尿病小鼠胰岛素及胸、脾指数的影响[J]. 中国药师, 2009, 12(7):848-850.
- [3] 黄桂红,马杰津,贺敏,等. 杨桃根醇提物对糖尿病模型小鼠的血糖及抗氧化能力的影响研究[J]. 中国药房, 2009, 20(24):1849-1851.
- [4] 裴月湖. 天然药物化学实验[M]. 北京:人民卫生出版社, 2005:114-125.
- [5] 董世芬,洪纓,樊江波,等. 实验性 2 型糖尿病心肌病大鼠模型的建立与评价[J]. 中国实验动物学报, 2009, 17(4):245-251.

- [6] Rubler S, Dlugash J, Yuceoglu Y Z, et al. New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis [J]. *Am J Cardiol*, 1972, 30 (6) : 595-602.
- [7] Hamby R I, Zoneraich S, Sherman L, et al. Diabetic cardiomyopathy [J]. *JAMA*, 1974, 229 (13) : 1749-1754.
- [8] Fang Z Y, Prins J B, Marwick T H. Diabetic cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications [J]. *Endocr Rev*, 2004, 25 (4) : 543-547.
- [9] Sowers J R, Epstein M, Frohlich E D. Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease: an update [J]. *Hypertension*, 2001, 38 (3) : 1053-1059.
- [10] Park S Y, Cho Y R, Kim H J, et al. Unraveling the temporal pattern of diet-induced insulin resistance in individual organs and cardiac dysfunction in C57BL/6 mice [J]. *Diabetes*, 2005, 54 (12) : 3530-3540.
- [11] 包慧兰, 陈黎. 淫羊藿苷抗糖尿病大鼠心肌线粒体氧化应激损伤作用研究 [J]. *中国中药杂志*, 2011, 36 (11) : 1503-1507.
- [12] Bolzan D, Bianchi M S. Genotoxicity of streptozotocin [J]. *Mutat Res*, 2002, 512 : 221-225.
- [13] Ceriello A. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a 'causal' therapy [J]. *Diabetes Care*, 2003, 26 (3) : 1589-1596.
- [14] 施志明, 钱晓明, 周晓军, 等. 实验性糖尿病大鼠心肌超微结构观察 [J]. *中国糖尿病杂志*, 1996, 4 (1) : 28-32.
- [15] Finck B N, Han X, Courtois M, et al. A critical role for PPAR α -mediated lipotoxicity in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy: modulation by dietary fat content [J]. *PNAS*, 2003, 100 (3) : 1226-1231.

[责任编辑 周冰冰]

《中国中药杂志》2015年征订启事

《中国中药杂志》创刊于1955年7月,是由中国科协主管,中国药学会主办,中国中医科学院中药研究所承办的综合性中医药学术期刊,在国际国内医药学领域内具有广泛影响。位居中国中文核心期刊、中国科技核心期刊“双核心”首位。曾荣获第三届国家期刊奖百种重点期刊、国家新闻出版广电总局“中国百强报刊”,以及历届国家中医药管理局全国优秀中医药期刊评比一等奖、百种中国杰出学术期刊、中国精品科技期刊等奖项。在国际上被 Medline, Scopus 等国外十余家著名数据库收录。全面反映我国中药与天然药物学科领域最新进展与研究动态。主要报道该领域新成果、新技术、新方法与新思路,内容包括栽培、资源与鉴定、炮制、药剂、化学、药理、临床等专业。设有专论、综述、研究论文、研究报告、临床、民族药、学术探讨、药事管理等栏目。主要读者对象为各级管理部门、科研院所、大专院校、工厂企业以及医院等从事中医药科研、管理、生产、医院制剂及临床等方面的人员。

2015年本刊每期定价为50元,208页,全年定价1200元。国内刊号11-2272/R,国际刊号1101-5302。欢迎广大读者到本编辑部或当地邮局订阅,邮发代号2-45。本刊地址:北京东直门内南小街16号;邮政编码100700;电子信箱 cjcmm2006@188.com;联系方式详见中国中药杂志网站 www. cjcmm. com. cn