

杜仲叶黄酮对糖尿病大鼠的血糖控制 及对胰岛细胞的保护作用

邢冬杰*, 孙永显, 陈桂玉, 宿世震

(山东中医药高等专科学校, 山东烟台 264199)

[摘要] **目的:**探讨杜仲叶黄酮对糖尿病大鼠血糖控制及对胰岛细胞的保护作用。**方法:**链脲佐菌素复制糖尿病大鼠模型,模型大鼠分为4组,即模型组、阳性药物组(格列本脲, $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、杜仲叶黄酮($2.5, 5.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)组,并设立正常组。*ig*给药,每日1次,连续28 d。取血测定大鼠空腹血糖(FBG),游离胰岛素(FINS)水平,并行口服葡萄糖耐量试验(OGTT);部分胰组织制备组织匀浆后测定超氧化物歧化酶(SOD),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)及丙二醛(MDA)的含量;部分胰腺组织制作病理切片及HE染色,镜下观察胰岛形态及细胞数。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠的FBG显著升高,FINS下降,糖耐量降低,胰腺组织中的SOD及GSH-Px水平降低,MDA水平升高,病理切片显示胰岛明显发生萎缩($P < 0.01$);与模型组比较,杜仲叶黄酮能明显降低糖尿病大鼠胰腺组织中MDA水平、提高SOD及GSH-Px水平,并能降低大鼠的FBG,改善糖耐量,提高FINS水平($P < 0.01, P < 0.05$),病理切片显示大鼠的胰岛面积增加、细胞数明显增多($P < 0.01, P < 0.05$)。**结论:**杜仲叶黄酮可明显降低糖尿病大鼠的血糖,改善糖耐量,增加FINS水平,对胰岛细胞具有保护作用,推测降低氧化应激反应是其机制之一。

[关键词] 杜仲叶; 黄酮; 糖尿病大鼠; 胰岛细胞; 氧化应激

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)13-0148-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015130148

Effect of *Eucommia ulmoides* Leaves Flavonoids on Blood Glucose Control and Protection of Islet Cells in Diabetic Rats XING Dong-jie*, SUN Yong-xian, CHEN Gui-yu, SU Shi-zhen (*Shandong College of Traditional Chinese Medicine, Yantai 264199, China*)

[Abstract] **Objective:** To explore effect of *Eucommia ulmoides* leaves flavonoids on blood glucose control and the protection of islet cells in diabetic rats. **Method:** Streptozocin was used to copy diabetic rats model, modeling rats were divided into four groups, model group, positive drug group (glyburide, $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), *E. ulmoides* leaves flavonoids groups ($2.5, 5.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), the normal group was setup. After 28 days fasting blood glucose (FBG) was collected, serum free insulin (FINS) level and oral glucose tolerance test were carried out. Superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and malondialdehyde (MDA) content of pancreas homogenate was assayed. Hematoxylin and eosin (HE) staining was used to the microscopic observation islet morphology and cell number. **Result:** Compared with normal group, the significant increase of FBG and MDA, FINS falling and reduced glucose tolerance, the SOD and GSH-Px levels in model group rats were observed. Pathological islet apparently showed atrophy ($P < 0.01$). Compared with model group, *E. ulmoides* leaves flavonoids could obviously decrease the MDA level, raise the level of SOD and GSH-Px, reduce FBG, improve glucose tolerance and the level of FINS ($P < 0.01, P < 0.05$). Pathological section showed that the rat islet was increased, the number of cells was increased obviously ($P < 0.01, P < 0.05$). **Conclusion:** *E. ulmoides* leaves flavonoids can obviously reduce the blood sugar of diabetic rats, improve the glucose tolerance, and increase the level of FINS, has the protection of islet cell function, antioxidative stress reaction is one of its mechanisms.

[Key words] *Eucommia ulmoides* leaves; flavonoids; diabetic rats; islet cell; oxidative stress

[收稿日期] 20141119(008)

[通讯作者] *邢冬杰, 硕士, 讲师, 从事糖尿病及其并发症的治疗研究, Tel: 0535-2765121, E-mail: sddjdyx@163.com

杜仲叶为杜仲科植物杜仲的干燥叶。药理学研究表明,杜仲叶的药用有效成分与杜仲基本一致,其主要成分有黄酮类、环烯醚萜苷类、木脂素类等,具有降血压、调节血脂、抗病毒、抗炎、延缓衰老等作用^[1-2],民间曾用杜仲叶泡水治疗糖尿病,笔者前期实验也证实了杜仲叶具有降糖、降脂等作用,为了进一步了解其药理作用,通过建立糖尿病大鼠模型,给予杜仲叶黄酮灌胃治疗,探讨杜仲叶黄酮对糖尿病大鼠的血糖控制、对胰腺的保护作用及机制。

1 材料

1.1 动物 SD大鼠,SPF级,雄性,体重186~206 g,山东省实验动物中心提供,合格证号SCXK(鲁)2014-0010。

1.2 药物与试剂 杜仲叶黄酮:杜仲叶购自烟台同仁堂大药房,产地湖南,经山东中医药高等专科学校中药鉴定教研室王苏丽教授鉴定为杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* 的干燥叶,70%乙醇60℃浸提3次,时间分别为3,2,1 h,合并提取液,萃取后真空干燥,粉碎备用,1 g提取物相当于生药40 g,黄酮质量分数75.2%^[3],灌胃前配成质量浓度12.5 g·L⁻¹(相当于生药0.5 g·mL⁻¹)、复温至30℃使用。链脲佐菌素(streptozocin,STZ,购于Sigma公司,批号S0130),超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD),谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase,GSH-Px),考马斯亮蓝蛋白,丙二醛(malondialdehyde,MDA),游离胰岛素(free insulin,FINS)试剂盒(南京建成生物工程有限公司,批号分别为20140318,20140315,20140310,20140221,20140311)。

1.3 仪器 罗康全活力型血糖仪及配套试纸(德国罗氏诊断公司),ST-60型索氏提取器(上海精密科学仪器有限公司),RE-5205型旋转蒸发器(上海雅荣生化设备仪器有限公司),TYM500型光学显微镜(日本奥林巴斯有限公司),SN-695 B型智能放免 γ 测量仪(上海原子核研究所日环仪器一厂)。

2 方法

2.1 对正常大鼠空腹血糖(fasting blood glucose,FBG)的影响 大鼠30只,随机分3组,每组10只,即正常组、杜仲叶黄酮高、低剂量组(以生药计,下同)2.5,5.0 g·kg⁻¹,每日1次,连续ig给药7 d。末次给药后60 min,剪尾取血测定FBG。

2.2 杜仲叶黄酮对糖尿病大鼠各指标的影响

2.2.1 模型制备及分组给药 大鼠60只,适应性喂养1周,随机选取10只为正常组。余禁食12 h,ip 55 mg·kg⁻¹的STZ溶液,正常组ip等剂量的柠檬酸缓冲

液。72 h后测定FBG,初测FBG ≥ 16.5 mmol·L⁻¹并稳定5 d,复测16.5 mmol·L⁻¹ \leq FBG ≤ 25.0 mmol·L⁻¹为成模大鼠^[4]。成模大鼠随机分为模型组、格列本脲组(10 mg·kg⁻¹)、杜仲叶黄酮低、高剂量组(2.5,5.0 g·kg⁻¹),每组10只,ig给药。正常组和模型组按10 mL·kg⁻¹ig蒸馏水,每日1次,共28 d。

2.2.2 大鼠一般情况观察 灌胃前1 d(0 d),第7,14,28天测定1次体重,记录24 h饮水量。

2.2.3 指标检测 灌胃前1 d(0 d)内毗静脉取血测定FBG,灌胃第14,28天内毗静脉取血测定给药后2 h血糖值。第27天,灌胃后10 min,葡萄糖2.5 g·kg⁻¹行口服葡萄糖耐量试验(oral glucose tolerance test,OGTT)。剪尾取血测定灌胃前(0 min),灌胃后30,60,120 min的血糖值,并计算血糖曲线下面积(area under the curve,AUC)^[5]。第28天腹主动脉取血,离心取血清,放免法测定FINS。取胰腺组织,部分制备匀浆,离心后取上清液检测SOD,GSH-Px及MDA。部分4%多聚甲醛固定,常规石蜡包埋、切片,HE染色后光镜下观察,每张切片随机选取5个胰岛,计算其面积的平均值、胰岛细胞数,应用IMS细胞图像分析系统进行分析。

2.3 统计学分析 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据采用SPSS 18.0统计软件分析,多组间比较采用方差分析,两两比较采用SNK法, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对正常大鼠FBG的影响 与正常组比较,杜仲叶黄酮(2.5,5.0 g·kg⁻¹)2个给药组对正常大鼠FBG无明显影响。

3.2 各组大鼠体重、饮水量的比较 与正常组比较,模型组大鼠的体重下降明显、饮水量增加显著($P < 0.01$);与模型组比较,随着治疗进行,杜仲叶黄酮2个给药组大鼠的体重增加、饮水量下降($P < 0.01$, $P < 0.05$),5.0 g·kg⁻¹组作用明显。见表1。

3.3 各组大鼠FBG,FINS的比较 与正常组比较,模型组大鼠FBG显著升高、FINS下降($P < 0.01$);与模型组比较,杜仲叶黄酮2个给药组能明显降低FBG,升高FINS水平($P < 0.01$)。见表2。

3.4 各组大鼠OGTT的比较 与正常组比较,模型组大鼠OGTT呈现异常,灌胃后30,60,120 min的血糖值显著升高,AUC明显增加($P < 0.01$);与模型组比较,杜仲叶黄酮2个给药组糖负荷后,血糖及AUC明显下降($P < 0.01$),5.0 g·kg⁻¹组作用明显。见表3。

表 1 杜仲叶黄酮对糖尿病大鼠体重、饮水量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of *E. ulmoides* leaves flavonoids on body weights and water quantity of diabetic rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	剂量 /g·kg ⁻¹	体重/g				饮水量 /mL·kg ⁻¹ ·d ⁻¹
		0 d	7 d	14 d	28 d	
正常	-	195.2 ± 5.4	205.2 ± 6.6	208.8 ± 3.5	224.6 ± 3.8	45.8 ± 3.2
模型	-	176.7 ± 6.9 ¹⁾	180.8 ± 4.7 ¹⁾	183.7 ± 4.6 ¹⁾	189.2 ± 4.6 ¹⁾	91.5 ± 5.3 ¹⁾
格列本脲	0.01	178.9 ± 7.0 ¹⁾	184.3 ± 8.6 ¹⁾	189.7 ± 9.0	205.8 ± 7.8 ³⁾	71.5 ± 4.7 ³⁾
杜仲叶黄酮	2.5	179.2 ± 5.7 ¹⁾	182.7 ± 8.4 ¹⁾	188.8 ± 9.3	203.4 ± 9.3 ³⁾	70.5 ± 5.5 ³⁾
	5.0	173.7 ± 5.4 ¹⁾	183.2 ± 9.1 ¹⁾	191.7 ± 9.2 ²⁾	210.8 ± 7.5 ³⁾	66.0 ± 8.1 ³⁾

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

表 2 杜仲叶黄酮对糖尿病大鼠 FBG, FINS 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of *E. ulmoides* leaves flavonoids on FBG and FINS of diabetic rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	剂量 /g·kg ⁻¹	FBG/mmol·L ⁻¹			FINS /mU·L ⁻¹
		0 d	14 d	28 d	
正常	-	5.02 ± 0.79	4.79 ± 0.61	5.39 ± 0.68	23.90 ± 1.74
模型	-	21.29 ± 2.26 ¹⁾	22.06 ± 1.93 ¹⁾	21.80 ± 1.55 ¹⁾	12.40 ± 1.23 ¹⁾
格列本脲	0.01	20.82 ± 1.95 ¹⁾	12.45 ± 0.78 ³⁾	10.17 ± 0.76 ³⁾	21.37 ± 1.28 ³⁾
杜仲叶黄酮	2.5	21.32 ± 1.72 ¹⁾	19.80 ± 1.48 ³⁾	16.04 ± 1.02 ^{3,4)}	14.73 ± 0.90 ^{3,4)}
	5.0	21.11 ± 2.06 ¹⁾	18.61 ± 1.89 ³⁾	14.35 ± 0.77 ^{3,4)}	16.94 ± 2.25 ^{3,4)}

表 3 杜仲叶黄酮对糖尿病大鼠口服葡萄糖耐量 (OGTT) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effects of *E. ulmoides* leaves flavonoids on oral glucose tolerance test of diabetic rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	剂量 /g·kg ⁻¹	血糖/mmol·L ⁻¹				OGTT 的 AUC /mmol·h·L ⁻¹
		0 min	30 min	60 min	120 min	
正常	-	4.83 ± 0.60	8.84 ± 0.69	6.81 ± 0.40	4.98 ± 0.60	16.39 ± 1.04
模型	-	19.91 ± 1.53 ¹⁾	25.45 ± 1.34 ¹⁾	21.53 ± 0.84 ¹⁾	21.01 ± 1.21 ¹⁾	50.60 ± 1.75 ¹⁾
格列本脲	0.01	18.81 ± 1.34	23.02 ± 0.95 ³⁾	14.35 ± 2.39 ³⁾	11.25 ± 0.82 ³⁾	36.48 ± 1.59 ³⁾
杜仲叶黄酮	2.5	19.01 ± 1.60	24.98 ± 1.11	17.91 ± 1.02 ³⁾	15.52 ± 1.26 ³⁾	42.31 ± 1.46 ³⁾
	5.0	18.80 ± 1.64	21.86 ± 1.43 ³⁾	16.05 ± 1.03 ³⁾	14.65 ± 1.00 ³⁾	39.41 ± 1.29 ³⁾

3.5 各组大鼠胰腺组织中 SOD, GSH-Px, MDA 的比较 与正常对照组比较,模型组大鼠 SOD, GSH-Px 水平降低,MDA 水平升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,杜仲叶黄酮 2 个给药组能明显升高 SOD, GSH-Px 的水平,降低 MDA 水平 ($P < 0.01$)。见表 4。

表 4 杜仲叶黄酮对糖尿病大鼠胰腺组织中 SOD, MDA, GSH-Px 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effects of *E. ulmoides* leaves flavonoids on SOD, MDA and GSH-Px of diabetic rats pancreatic tissue ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	剂量 /g·kg ⁻¹	SOD	MDA	GSH-Px
		/U·mg ⁻¹	/μmol·g ⁻¹	/U·mg ⁻¹
正常	-	22.4 ± 1.4	1.3 ± 0.3	63.9 ± 5.2
模型	-	7.4 ± 2.2 ¹⁾	5.6 ± 1.2 ¹⁾	25.2 ± 3.1 ¹⁾
格列本脲	0.01	8.2 ± 2.3	4.9 ± 1.0	28.3 ± 4.1 ²⁾
杜仲叶黄酮	2.5	15.3 ± 2.2 ^{3,4)}	2.4 ± 0.9 ^{3,4)}	49.2 ± 3.1 ^{3,4)}
	5.0	19.2 ± 2.4 ^{3,4)}	1.7 ± 0.3 ^{3,4)}	58.3 ± 3.7 ^{3,4)}

3.6 各组大鼠胰腺组织形态的比较 正常大鼠胰岛 β 细胞数较多,细胞核清楚,细胞界限清晰;模型大鼠胰岛明显发生萎缩,胰岛结构疏松,β 细胞数明

显减少,与正常对照组比较差异明显 ($P < 0.01$);与模型组比较,杜仲叶黄酮 2 个给药组的胰岛面积、细胞数均有明显改善 ($P < 0.01, P < 0.05$)。见表 5,图 1。

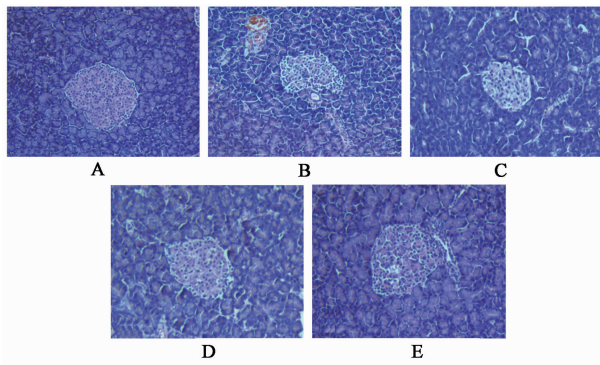
表 5 杜仲叶黄酮对糖尿病大鼠胰腺面积及细胞数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effects of *E. ulmoides* leaves flavonoids on of pancreatic tissue morphology of diabetic rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	剂量/g·kg ⁻¹	胰岛面积/μm ²	胰岛细胞数/个
正常	-	8 168 ± 161	89.3 ± 6.7
模型	-	2 244 ± 256 ¹⁾	35.5 ± 6.2 ¹⁾
格列本脲	0.01	2 197 ± 194	34.4 ± 3.1
杜仲叶黄酮	2.5	3 942 ± 156 ^{3,4)}	40.8 ± 4.4 ^{2,4)}
	5.0	4 464 ± 254 ³⁾	50.4 ± 6.4 ^{3,4)}

4 讨论

糖尿病是由于胰岛素绝对不足或胰岛素作用缺陷而引起的以慢性血糖升高为特点的代谢紊乱性疾病,高糖可以导致各器官的并发症。Park 等研究表明^[6],杜仲叶水提取物可以通过增加糖酵解而发挥降



A. 正常组; B. 模型组; C. 格列本脲 0.01 g·kg⁻¹ 组; D. 杜仲叶黄酮 2.5 g·kg⁻¹ 组; E. 杜仲叶黄酮 5.0 g·kg⁻¹ 组

图 1 杜仲叶黄酮对糖尿病大鼠胰腺组织形态的影响(HE, ×200)

Fig.1 Effects of *E. ulmoides* leaves flavonoids on pancreatic tissue morphology of diabetic rats(HE, ×200)

糖作用,本实验研究发现,杜仲叶黄酮对正常大鼠无降糖作用,但可降低糖尿病大鼠的血糖,并呈现剂量依赖性,以 120 min 作用明显,同时能显著改善糖尿病大鼠的糖耐量,其作用与格列本脲相当。给予杜仲叶黄酮灌胃后,糖尿病大鼠精神状态好转,较模型组活泼、毛发整齐,同时大鼠的饮水量下降,还能减缓糖尿病大鼠体重的下降。此外,大鼠的胰岛素分泌较模型组增加,故推测杜仲叶黄酮可刺激胰腺分泌胰岛素,从而发挥降糖作用。

目前认为,氧化应激与糖尿病及其并发症的关系密切^[7-8]。糖尿病患者体内高糖的状态下,活性氧簇及活性氮簇生成过多,超过机体清除能力而导致氧化应激。胰岛 β 细胞对活性氧和活性氮敏感,同时抗氧化酶(SOD, GSH-Px)水平较低,因此 β 细胞容易受到氧化损伤而细胞数量减少,且氧化应激程度的增加与 β 细胞减少呈正相关^[9]。SOD 及 GSH-Px 可反映机体或细胞抗氧化的能力,MDA 可间接反映机体受氧自由基攻击的程度,因此通过测定体内 SOD, GSH-Px 及 MDA 水平,能够反映机体组织的氧化-抗氧化状态^[9-10]。本实验结果显示,糖尿病大鼠胰腺组织中的 SOD, GSH-Px 水平下降,MDA 水平升高,同时胰腺病理切片中胰岛面积缩小、细胞数减少,表明模型大鼠的胰腺组织中自由基产生增加,抗氧化的能力下降,胰腺组织已存在明显损伤。杜仲叶黄酮(2.5, 5.0 g·kg⁻¹)2 个给药组的胰腺组织中 SOD, GSH-Px 水平升高,MDA 水平下降,并呈剂量依赖性,同时胰腺病理切片显示胰岛面积、细胞

数较模型组增加,表明杜仲叶黄酮可以降低糖尿病模型大鼠胰腺组织中的氧化应激水平,减缓氧自由基损伤,抑制脂质过氧化物的形成,提高自由基清除能力,从而促进胰岛的修复和再生,推测这可能是杜仲叶发挥降糖及保护胰腺组织的作用机制之一。

杜仲是属于落叶乔木,叶子属于可再生资源,此外,杜仲叶具有保护内皮细胞、降血压、调节血脂等作用^[1],这对于糖尿病的并发症治疗均有益处,若能深入研究,相信在糖尿病的防治方面具有广阔的应用前景。

[参考文献]

- [1] 袁天翊,方莲花,吕扬,等. 杜仲叶的药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志,2013,38(6):781-785.
- [2] Luo D, Or T C, Yang C L, et al. Anti-inflammatory activity of iridoid and catechol derivatives from *Eucommia ulmoides* oliver [J]. ACS Chem Neurosci, 2014,5(9):855-866.
- [3] 杨玉琼,王伟,赵军,等. 杜仲叶中黄酮的提取、检测方法研究进展[J]. 中药材,2009,32(2):312-314.
- [4] 王兴红,郑亚萍,魏芳. 槲皮素对链脲佐菌素诱导糖尿病大鼠氧自由基和一氧化氮的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(5):244-247.
- [5] 杨宇轩,胡森科,张敬华,等. 大豆多肽对糖尿病模型大鼠的血糖控制及对胰岛细胞的保护作用[J]. 西安交通大学学报:医学版,2014,35(2):191-195.
- [6] Park S A, Choi M S, Kim M J, et al. Hypoglycemic and hypolipidemic action of Du-zhong (*Eucommia ulmoides* oliver) leaves water extract in C57BL/KsJ-db/db mice [J]. J Ethnopharmacol,2006,107(3):412-417.
- [7] Murotomi K, Umeno A, Yasunaga M, et al. Switching from singlet-oxygen-mediated oxidation to free-radical-mediated oxidation in the pathogenesis of type 2 diabetes in model mouse[J]. Free Radic Res,2014,48(11):1-6.
- [8] Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S, et al. Oxidative stress in cardiac and skeletal muscle dysfunction associated with diabetes mellitus [J]. J Clin Biochem Nutr,2011,48(1):68-71.
- [9] 杨升华,尹卫东. 氧化应激与糖尿病研究进展[J]. 微量元素与健康研究,2011,28(3):54-57.
- [10] Stanton R C. Oxidative stress and diabetic kidney disease [J]. Curr Diab Rep,2011, 11(4):330-336.

[责任编辑 聂淑琴]