

地锦草对糖尿病小鼠胰岛 β 细胞氧化应激和凋亡的影响

王晓敏, 高增光, 周志愉*
(江西中医药大学, 南昌 330004)

[摘要] **目的:** 研究地锦草对糖尿病小鼠胰岛 β 细胞氧化应激和凋亡的影响。**方法:** 尾静脉注射四氧嘧啶溶液($80\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)复制糖尿病小鼠模型。将造模成功的小鼠随机分为5组: 模型组, 阳性对照组(盐酸二甲双胍悬浊液 $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), 地锦草低、中、高剂量组($59, 118, 236\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), 连续给药14 d后, 观察其血糖、胰腺组织超氧化物歧化酶(SOD), 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px), 丙二醛(MDA)水平的变化, 采用末端脱氧核苷酸转移酶介导的dUTP缺口末端标记法(TUNEL法)检测胰岛 β 细胞的凋亡情况。**结果:** 与模型组比较, 地锦草各剂量组小鼠体重下降不明显($P < 0.05$); 与给药前及模型组比较, 地锦草高剂量组和二甲双胍组血糖均下降($P < 0.05$); 与模型组比较, 地锦草高剂量组和二甲双胍组胰腺组织中SOD和GSH-Px活性均升高($P < 0.05$), MDA的含量降低($P < 0.05$), 胰岛 β 细胞凋亡指数降低($P < 0.05$)。**结论:** 地锦草可明显降低糖尿病小鼠的血糖, 其机制可能与增强糖尿病小鼠的抗氧化能力, 减弱氧化应激对糖尿病小鼠胰岛 β 细胞的损伤, 抑制胰岛 β 细胞的凋亡有关。

[关键词] 地锦草; 血糖; 胰岛 β 细胞; 氧化应激; 凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)14-0120-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015140120

Effect of Euphorbiae Humifusae Herba on Pancreatic Islet Beta Cells on Oxidative Stress and Apoptosis in Diabetic Mice WANG Xiao-min, GAO Zeng-guang, ZHOU Zhi-yu* (Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of Euphorbiae Humifusae Herba on pancreatic islet beta cells on oxidative stress and apoptosis in diabetic mice. **Method:** Alloxan solution ($80\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) was injected into mice's caudal vein to establish the model of diabetic mice. The diabetic mice were randomly divided into 5 groups: model group, positive controlled group (metformin group), low-dose Euphorbiae Humifusae Herba group ($59\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), medium-dose Euphorbiae Humifusae Herba group ($118\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) and high-dose Euphorbiae Humifusae Herba group ($236\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$). After successive administration for 14 days, the changes of blood glucose, pancreatic superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and malonaldehyde (MDA) were observed. TUNEL method was used to determine pancreatic islet beta cells apoptosis. **Result:** Compared with model group, the body weight in Euphorbiae Humifusae Herba groups was not obviously decreased ($P < 0.05$). The blood glucose in high-dose group and metformin group was lower than that of model group and before medication ($P < 0.05$). Compared with model group, SOD and GSH-Px level in high-dose group and metformin group were increased ($P < 0.05$), MDA level was decreased ($P < 0.05$), the cell apoptosis index was decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Euphorbiae Humifusae Herba humifusae can obviously decrease blood glucose in diabetic mice, its mechanism is probably related to increasing antioxidant capacity of diabetic mice, reducing the pancreatic islet beta cells damage caused by oxidative stress, inhibiting pancreatic islet beta cells apoptosis.

[Key words] Euphorbiae Humifusae Herba; blood glucose; pancreatic islet beta cell; oxidative stress; apoptosis

[收稿日期] 20141109(009)

[基金项目] 江西省卫生厅中医药科研基金课题(2013A089);江西中医学院2012年度重点学科教师培养计划项目(2012jzzdxk015);江西省卫计委科技项目(20141293)

[第一作者] 王晓敏, 博士, 副教授, 从事中药防治糖尿病研究, Tel: 0791-87118926, E-mail: wangxm2001@163.com

[通讯作者] *周志愉, 硕士, 讲师, 从事中医药与与内分泌研究, Tel: 0791-87118926, E-mail: zzy_0608@163.com

糖尿病是一种常见多发的慢性内分泌代谢性疾病,高血糖是其主要特征。它的并发症累及多个器官,而且致残、致死率高,严重危害人类的健康与生命^[1-2]。地锦草是中医常用药材,其性味归经:辛、平,入肝、大肠经,具有清热解毒、凉血止血等功效^[3-4],本课题前期实验表明地锦草具有降低糖尿病小鼠血糖的作用^[5],本实验通过观察糖尿病小鼠的血糖、胰腺组织超氧化物歧化酶(SOD),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px),丙二醛(MDA)胰岛 β 细胞凋亡等指标变化,探讨地锦草降血糖的作用机制,为地锦草治疗糖尿病的临床应用提供前期研究基础。

1 材料

1.1 动物 清洁级近交昆明种雄性小鼠 60 只,体重 28~30 g,由江西中医药大学动物实验中心提供,合格证号 SCXK(赣)2011-0001。自然光照,自由进水进食。

1.2 药物 地锦草购自安徽亳州市永刚饮片厂有限公司(南昌益丰大药房,批号 111023),由江西中医药大学中药鉴定教研室张寿文教授鉴定为 *Euphorbiae humifusae* Herba 的全草。将地锦草加 10 倍量水浸泡 30 min 后,加热至沸腾,并保持沸腾 20 min 后过滤,地锦草药渣再加 8 倍量水,加热至沸腾,并保持沸腾 20 min 后过滤,合并 2 次滤液,低温浓缩成药液含量为 0.2 g·mL⁻¹ 的药液,置于 4℃ 冰箱内保存备用。

1.3 试剂 四氧嘧啶(美国 Sigma 公司,批号 BCBD655TV),葡萄糖试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司,批号 122941),TUNEL 试剂盒(美国 Promega 公司,批号 0000062168),SOD 检测试剂盒,GSH-Px 检测试剂盒,MDA 检测试剂盒(南京建成生物工程有限公司,批号 20140514)。

1.4 仪器 DT10K 型电子天平(江苏常熟长青仪器仪表厂),PH140A 型培养箱、干燥箱(上海恒科技有限公司),BX-41 型光学显微镜及摄像系统(日本 Olympus 公司),全套生物组织自动脱水机,石蜡包埋机,摊烤片机(湖北孝感亚光医用电子技术有限公司),RM2235 型切片机(德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 动物模型建立及分组 实验动物禁食不禁水 12 h 后,进行尾静脉注射四氧嘧啶溶液(80 mg·kg⁻¹),注射后 2 h 给予 50% 葡萄糖溶液(20 mL·kg⁻¹)*ig*。饲养 3 d 后,禁食不禁水 12 h,眼眶采血测血糖,血糖值 > 11.1 mmol·L⁻¹ 为糖尿病小鼠,即造

模成功。将造模成功的 50 只糖尿病小鼠按随机数字表法分为 5 组,即模型组,阳性药组(盐酸二甲双胍混悬液),地锦草低、中、高剂量组,每组 10 只。

2.2 给药方法 模型组给予生理盐水(20 mL·kg⁻¹)*ig*,地锦草低、中、高剂量组分别按 59, 118, 236 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 给予地锦草水提液 *ig*,二甲双胍组给予盐酸二甲双胍混悬液(25 mg·kg⁻¹·d⁻¹)*ig*。实验前、第 1,2 周末均称重。连续给药 14 d 后禁食 12 h,称重后眼球取血,静置 30 min 后取血清测血糖值。切取一半胰腺组织匀浆测其 SOD,GSH-Px 活性和 MDA 含量,固定另一半胰腺组织测定胰岛 β 细胞的凋亡率。

2.3 检测指标 采用葡萄糖氧化酶法检测血糖,黄嘌呤氧化酶法测定胰腺 SOD 活性,二硫双硝基苯甲酸(DTNB)直接法测定胰腺 GSH-Px 活性,硫代巴比妥酸法测定胰腺 MDA 含量,具体操作步骤严格按照说明书进行检测。采用 TUNEL 法检测胰岛 β 细胞的凋亡,具体操作步骤严格按照说明书进行检测,结果判定:细胞核呈棕黄色为阳性细胞,即凋亡细胞;未发生凋亡的细胞核呈蓝色。每张切片至少观察 500 个细胞,记录凋亡细胞数,计算凋亡指数(apoptosis index, AI)。

$$AI = \text{凋亡细胞数} / 500 \times 100\%$$

2.4 统计学方法 数据采用 SPSS 13.0 软件统计,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间进行单因素方差分析,两两比较方差齐时 LSD 检验,方差不齐时用 Dunnett's T3 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 一般状况及体重情况 在造模 3 d 后,小鼠逐渐出现了摄食量、摄水量增多,尿多和体重减少的现象。与模型组比较,地锦草高、低剂量组小鼠的一般情况有所好转,各剂量组体重有所上升($P < 0.05$);与二甲双胍组比较,地锦草低剂量组体重显著降低($P < 0.05$),见表 1。

3.2 对糖尿病小鼠血糖的影响 第 2 周末模型组小鼠血糖水平仍高于正常水平。地锦草低、高剂量组,二甲双胍组血糖水平与模型组比较均有显著性差异($P < 0.05$);与二甲双胍组比较,地锦草中、低剂量组血糖均显著增高($P < 0.05$),但地锦草高剂量组与二甲双胍组之间差异无统计学意义,见表 2。

3.3 对糖尿病小鼠胰腺组织 SOD,GSH-Px 活性和 MDA 含量的影响 与模型组比较,地锦草高剂量组和二甲双胍组糖尿病小鼠胰腺组织中 SOD 和 GSH-Px 活性均明显升高($P < 0.05$),MDA 的含量显著降

表 1 地锦草对糖尿病小鼠体重的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of Euphorbiae Humifusae Herba on body weight of diabetic mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	体重/g		
		0 周	1 周	2 周
模型	-	28.79 ± 1.95	22.56 ± 2.32	18.45 ± 2.98
二甲双胍	25	28.01 ± 2.15	24.69 ± 3.51	21.14 ± 3.34 ¹⁾
地锦草	59	28.55 ± 2.27	23.02 ± 2.89	19.31 ± 3.27 ^{1,2)}
	118	27.83 ± 3.14	23.42 ± 3.06	20.78 ± 2.44 ¹⁾
	236	27.28 ± 2.76	24.36 ± 2.91	21.62 ± 2.81 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$;与二甲双胍组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 3~4 同)。

表 2 地锦草对糖尿病小鼠血糖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of Euphorbiae Humifusae Herba on blood glucose in diabetic mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	血糖/mmol·L ⁻¹		
		造模前	给药前	给药后
模型	-	8.79 ± 1.95	12.56 ± 2.32	11.45 ± 2.97
二甲双胍	25	8.01 ± 2.15	12.69 ± 3.51	9.14 ± 3.34 ¹⁾
地锦草	59	8.55 ± 2.27	13.02 ± 2.89	10.62 ± 2.61 ^{1,2)}
	118	7.83 ± 3.14	11.42 ± 3.06	11.78 ± 4.30 ²⁾
	236	7.28 ± 2.76	13.36 ± 2.91	9.31 ± 2.16 ¹⁾

注:与给药前及模型组比较¹⁾ $P < 0.05$;与二甲双胍组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

低 ($P < 0.05$);与二甲双胍组比较,地锦草中、低剂量组胰腺 SOD 和 GSH-Px 活性均显著下降,MDA 含量升高 ($P < 0.05$)。见表 3。

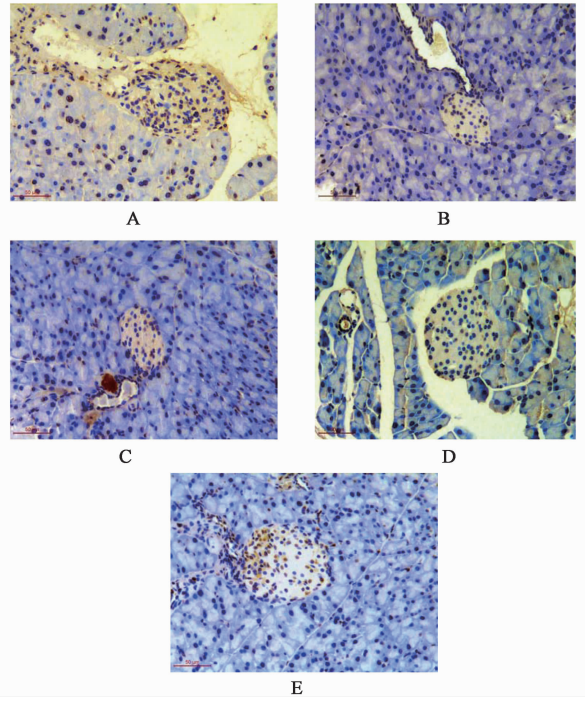
表 3 地锦草对糖尿病小鼠胰腺 SOD, GSH-Px 活性和 MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of Euphorbiae Humifusae Herba on pancreatic SOD, GSH-Px and MDA in diabetic mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	SOD	GSH-Px	MDA
		/U·mg ⁻¹	/U·mg ⁻¹	/μmol·g ⁻¹
模型	-	52.99 ± 6.30	72.44 ± 7.65	8.22 ± 1.45
二甲双胍	25	73.14 ± 9.06 ¹⁾	93.34 ± 10.41 ¹⁾	5.02 ± 1.19 ¹⁾
地锦草	59	57.79 ± 6.38 ²⁾	74.47 ± 7.29 ²⁾	7.81 ± 0.93 ²⁾
	118	54.70 ± 5.79 ²⁾	73.34 ± 11.61 ²⁾	7.94 ± 1.52 ²⁾
	236	69.91 ± 7.27 ¹⁾	91.13 ± 9.41 ¹⁾	5.15 ± 0.78 ¹⁾

3.4 对胰岛 β 细胞凋亡的影响 地锦草高剂量组、二甲双胍组糖尿病小鼠胰岛 β 细胞凋亡指数均显著低于模型组 ($P < 0.05$);与二甲双胍组比较,地锦草中、低剂量组胰岛 β 细胞凋亡指数均明显升高 ($P <$

0.05)。见图 1,表 4。



A. 模型组;B. 地锦草 59 mg·kg⁻¹组;C. 地锦草 118 mg·kg⁻¹组;D. 地锦草 236 mg·kg⁻¹组;E. 二甲双胍 25 mg·kg⁻¹组

图 1 地锦草对胰岛 β 细胞凋亡的影响 (TUNEL, × 200)

Fig. 1 Effect of Euphorbiae Humifusae Herba on pancreatic islet beta cells apoptosis (TUNEL, × 200)

表 4 地锦草对胰岛 β 细胞凋亡指数 (AI) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of Euphorbiae Humifusae Herba on pancreatic islet beta cells apoptosis index ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	AI/%
模型	-	27.66 ± 3.72
二甲双胍	25	15.53 ± 2.87 ¹⁾
地锦草	59	26.12 ± 4.75 ²⁾
	118	25.87 ± 3.46 ²⁾
	236	16.75 ± 2.68 ¹⁾

4 讨论

氧化应激是指机体受到多种因素刺激后,体内活性氧族 (ROS) 产生过多,抗氧化能力下降,打破了机体正常氧化/抗氧化动态平衡,造成生物大分子如蛋白质、脂质、核酸等的氧化损伤,干扰正常生命活动而形成的一种严重的应激状态^[6-7]。近年来研究表明,胰岛 β 细胞氧化应激损伤与糖尿病的发生和发展密切相关^[8]。肝脏合成糖原和脂肪能力下降,血液中的葡萄糖和游离脂肪酸增多,促进胰岛 β 细胞产生过多氧自由基和醛类氧化物,而谷胱甘肽还原酶活性下降,导致胰岛 β 细胞氧化应激。氧化应

激活 C-jun 蛋白 N-末端激酶或者抑制蛋白激酶 B 的活性,促进转录因子 FOX-1 进入胞核^[9-10]。而 FOX-1 导致胰十二指肠同源盒-1 (pancreatic and duodenal homeobox-1, PDX-1) 转录因子从细胞核中移到胞浆,抑制其活性^[11],诱导胰岛 β 细胞内凋亡相关基因的表达上调,还可损伤线粒体,从而诱导胰岛 β 细胞凋亡^[12]。

SOD 是一种重要的抗氧化酶,是生物体内清除自由基的首要物质。SOD 可对抗与阻断因氧自由基对细胞造成的损害,并及时修复受损细胞,减少自由基造成的对细胞伤害^[13]。GSH-Px 是机体内广泛存在的一种重要的过氧化物分解酶,其主要作用是以谷胱甘肽为底物,与 SOD, CAT 协同作用清除机体内的各种氧自由基,以减轻或阻断脂质过氧化反应,保护细胞免受氧化损伤^[14]。MDA 是氧化应激反应的一种标志性产物,它是脂质在自由基作用下产生氧化应激反应所生成的产物,且具有细胞毒性,通常用来评价机体氧化应激水平,间接反映出细胞受损的程度^[15-16]。

本实验结果显示,连续给予地锦草水提液灌胃 14 d 后,地锦草高剂量组和二甲双胍组糖尿病小鼠胰腺组织中 SOD 和 GSH-Px 活性均明显高于模型组 ($P < 0.05$),MDA 的含量显著低于模型组 ($P < 0.05$),提示地锦草可增强糖尿病小鼠的抗氧化能力,减弱氧化应激水平。本实验结果还显示,地锦草高剂量组、二甲双胍组糖尿病小鼠胰岛 β 细胞凋亡指数均显著低于模型组 ($P < 0.05$),地锦草高剂量组和二甲双胍组糖尿病小鼠的血糖均显著低于给药前及模型组 ($P < 0.05$),提示地锦草可明显降低糖尿病小鼠的血糖,其机制可能与增强糖尿病小鼠的抗氧化能力,减弱氧化应激对糖尿病小鼠胰岛 β 细胞的损伤,抑制胰岛 β 细胞的凋亡有关。其具体机制有待于进一步研究。

[参考文献]

[1] 赵红霞,汪文来,贾海骅,等. 单味中药防治糖尿病的现代研究探讨[J]. 中国医药导刊,2013,15(10):1692-1694.
[2] 赵萍丽,李心悦,张媛,等. 健康教育对胰岛素治疗糖尿病患者的影响[J]. 中国伤残医学,2014,22(11):272-273.

[3] 王婷婷,文今福,金松南. 地锦草的化学成分及药理作用研究进展[J]. 泰山医学院学报,2012,33(8):629-632.
[4] 谢奇,李治建,斯拉甫·艾白,等. 地锦草化学成分及其抗真菌作用的研究进展[J]. 医药导报,2011,30(7):880-883.
[5] 周志愉,谢斌,王晓敏. 地锦草水提液对糖尿病小鼠的降血糖作用[J]. 南昌大学学报:医学版,2014,54(6):5-7.
[6] 韩宝玲. 氧化应激在 2 型糖尿病及其并发症发病机制中的作用[J]. 实用临床医药杂志,2011,15(3):122-124.
[7] 杨楠楠,刚晓坤,刘青. 糖尿病肾病与氧化应激[J]. 中国老年学杂志,2013,33(5):1237-1239.
[8] 陈善源,徐勤. 2 型糖尿病中胰岛 β 细胞氧化应激损伤机制与相关治疗药物的研究进展[J]. 中国药房,2011,22(37):3533-3536.
[9] Buteau J, Shlien A, Foisy S, et al. Metabolic diapause in pancreatic beta-cells expressing again-of-function mutant of the forkhead protein foxo1 [J]. J Biol Chem, 2007, 282(1):287-293.
[10] Laybutt D R, Preston A M, Akerfeldt M C, et al. Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes [J]. Diabetologia, 2007, 50(4):752-763.
[11] Kaneto H, Miyatsuka T, Kawamori D, et al. PDX-1 and MafA play a crucial role in pancreatic beta-cell differentiation and maintenance of mature beta-cell function [J]. Endocr J, 2008, 55(2):235-252.
[12] Allagnat F, Christulia F, Ortis F, et al. Sustained production of spliced X-box binding protein 1 (XBP1) induces pancreatic beta cell dysfunction and apoptosis [J]. Diabetologia, 2010, 53(6):1120-1130.
[13] 姜洋,杨惠民. 补肾祛痰化痰法对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠氧化应激水平的影响研究[J]. 环球中医药, 2014, 7(5):321-327.
[14] 赵轩,高彦彬,朱智耀,等. 糖脂平对胰岛素抵抗大鼠骨骼肌氧化应激的影响[J]. 环球中医药, 2014, 7(5):333-337.
[15] 周摇俊,何湘珍,肖启国,等. 金樱子对大鼠糖尿病性白内障细胞凋亡和氧化应激的影响[J]. 中南医学科学杂志, 2014, 42(3):241-244.
[16] 鞠礼,张明宇. 血脂代谢紊乱对 2 型糖尿病患者氧化应激反应的影响[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2014, 48(3):215-217.

[责任编辑 聂淑琴]