

广西莪术多糖对2型糖尿病大鼠的降血糖作用

肖旺¹, 曾建红^{1,2}, 陈旭^{1*}

(1. 桂林医学院, 广西 桂林 541004; 2. 三峡大学医学院, 湖北 宜昌 443002)

[摘要] 目的:探讨广西莪术多糖(CKP)对2型糖尿病(T2DM)大鼠血糖的影响。方法:采用高糖高脂联合腹腔小剂量注射链脲佐菌素(STZ, 45 mg·kg⁻¹)的方法诱导T2DM模型,将造模成功的糖尿病大鼠随机分为4组:糖尿病模型组,CKP低、中、高剂量组(0.5, 1.0, 2.5 g·kg⁻¹),另取10只正常大鼠设为正常组。给药组每天ig给药1次,连续给药6周;模型组和正常组则ig给予同体积的生理盐水。给药6周后,空腹检测大鼠血糖(FBG),胰岛素(INS),总胆固醇(TC),甘油三酯(TG)的水平;通过观察胰腺HE染色及胰腺免疫组化;检测胰岛β细胞Fas蛋白的表达。结果:与正常组大鼠相比,模型组大鼠血糖, TG, TC水平明显增高,且胰腺Fas蛋白表达增高,均具有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,CKP给药组均可降低糖尿病大鼠的血糖, TC和TG水平;减少胰腺Fas蛋白表达,减少胰岛β细胞凋亡($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论:广西莪术多糖降低2型糖尿病大鼠血糖,其作用可能是通过保护胰岛β细胞,减少其凋亡有关。

[关键词] 莪术多糖; 2型糖尿病; 血糖; 胰岛β细胞

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)21-0144-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015210144

Hypoglycemic Effect of *Curcuma kwangsiensis* Polysaccharides on Type 2 Diabetes Mellitus Rats

XIAO Wang¹, ZENG Jian-hong^{1,2}, CHEN Xu^{1*} (1. Guilin Medical University, Guilin 541004, China; 2. Medical Science College of China Three Gorges University, Yichang 443002, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the hypoglycemic effect of *Curcuma kwangsiensis* polysaccharide (CKP) on type 2 diabetes mellitus (T2DM) rats. **Method:** T2DM models were induced through high-sucrose and high-fat diet combined with low-dose abdominal injection of streptozotocin (STZ, 45 mg·kg⁻¹). The successfully modeled rats were randomly divided into 4 groups: T2DM model group, CKP low dosage group (CKP-LG), CKP middle dosage group (CKP-MG) and CKP high dosage group (CKP-HG). Another 10 normal rats were selected as normal group. CKP groups with different dosages (0.5, 1.0, 2.5 g·kg⁻¹·d⁻¹) were ig administered continuously for 6 weeks, once a day. The model group and normal group received ig normal saline of the same volume. After 6 weeks of administration, fasting blood glucose (FBG), insulin (INS), total cholesterol (TC), and triglyceride (TG) levels were detected in rats, and pathological change of pancreas was evaluated by hematoxylin and eosin (HE) staining and immunohistochemistry, Fas protein expressions of pancreatic β cells were detected. **Result:** Compared with the normal rats, FBG, TG, and TC levels were increased significantly in rats of model group, and pancreas Fas protein expressions were increased, with statistically significant difference ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, CKP groups could reduce FBG, TC and TG levels of T2DM rats, and reduce pancreas Fas protein expressions and reduce apoptosis of pancreatic β cells, with significant difference ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** The hypoglycemic effect of CKP on T2DM rats may be achieved by protecting pancreatic β cells and reducing their apoptosis.

[Key words] *Curcuma kwangsiensis* polysaccharides; type 2 diabetes mellitus; blood glucose; pancreatic β cells

[收稿日期] 20150311(017)

[基金项目] 广西壮族自治区自然科学基金项目(GZNSFAA053138);广西高校中青年教师培养工程项目(桂教人{2013}16号)

[第一作者] 肖旺,在读硕士,从事内分泌代谢疾病及并发症研究, Tel:13557330298, E-mail:84095458@qq.com

[通讯作者] *陈旭,博士,教授,从事天然药物的抗肿瘤机制研究, Tel:13907736890, E-mail:625218705@qq.com

2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 是一种以血糖代谢紊乱为主的慢性疾病,具有高发病率及死亡率。胰岛素抵抗与胰岛 β 细胞功能损伤是 T2DM 发生的主要机制。目前所有的治疗糖尿病的主要两大药物为胰岛素增敏剂和胰岛素,迅速有效的解决了糖尿病的症状及并发症;但对其他各器官所带来的副作用不容忽视。中药对糖尿病的防治已成为热点。广西莪术 *Curcuma kzoangsiensis* 为广西传统的地道药材,主要活性成分为挥发油和多糖等。王美林^[1] 等人已研究证实广西莪术多糖 (CKP) 有较好的抗肿瘤、抗衰老、降血糖和降血脂等多种生物学活性。课题组前期研究证明及初步探讨了 CKP 对鼻咽癌有抑制作用及机制^[2]。本文通过观察 CKP 对糖尿病大鼠血清及胰腺组织中各项指标水平及胰岛 β 细胞 Fas 蛋白表达,探讨 CKP 对 T2DM 大鼠血糖作用的影响,为开发有效治疗糖尿病的新药提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 雄性健康 SD 大鼠,清洁级,体重 (200 ± 20) g,50 只,购自桂林医学院实验动物中心,合格证号 SCXK(桂)2013-0002。

1.2 试剂与药品 链脲佐菌素 (STZ,美国 Sigma 公司,批号 F-0711),CKP(纯度为 90%,由桂林医学院药学院天然药物化学室提取鉴定^[3]),Fas 免疫组化试剂盒(武汉博士德公司,批号 PB0214),BCA 蛋白定量测定试剂盒(碧云天公司,批号 P0012S)。

1.3 仪器 One Toucho Ultra-稳豪血糖仪,配套血糖试纸(美国强生公司),TGL-16G-A 型高速冷冻离心机(上海市金鹏分析仪器有限公司),AU-2700 型全自动生化分析仪(日本奥林巴斯公司)。

2 方法

2.1 造模与分组 选空腹血糖正常的健康 SD 大鼠 40 只,参照 Maiti^[4] 等方法造模(予以高糖高脂

联合链脲佐菌素 45 mg·kg⁻¹,ip),72 h 后空腹测尾静脉血糖,以血糖 ≥ 11.1 mmol·L⁻¹ 为造模成功纳入实验。将造模成功的大鼠随机分为 4 组,分别予以低、中、高剂量 CKP 组(0.5,1.0,2.5 g·kg⁻¹·d⁻¹ ig),模型组 ig 等体积生理盐水,另设正常组 10 只,ig 等体积生理盐水,持续给药 6 周。

2.2 血生化检测 实验结束后大鼠禁食 8 h 测静脉血糖 (FBG) 及体重,水合氯醛 (10%) 3 mL·kg⁻¹ ip 麻醉,取腹主动脉血离心后取血清,采用全自动生化分析仪检测胰岛素 (INS),总胆固醇 (TC),甘油三酯 (TG)。

2.3 胰腺组织病理变化及 Fas 表达 胰腺组织经过 10% 的中性甲醛溶液固定,石蜡包埋,常规切片。HE 染色观察胰岛的形态。免疫组化采用二步法,严格按照试剂盒说明书进行操作,阴性对照用 PBS 代替一抗,细胞胞质出现棕黄色颗粒为阳性表达,每张切片选取 5 个高倍镜视野 (×400),结果用 Image-plus 6.0 软件进行图像半定量分析,测定各实验组大鼠胰腺组织 Fas 阳性目标积分吸光度 IA,IA 越高,Fas 表达就越强。

2.4 统计学处理 各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Stata18.0 统计软件进行 *t* 检验和单因素方差分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠的一般状况 正常组大鼠精神状态好,动作灵活,皮毛光泽,食欲及大小便正常,体重增长;模型组大鼠食欲及饮水量明显增加,精神萎靡,活动迟缓,皮毛杂乱无光泽。试验前各组大鼠体重差异均无统计学意义,造模后 3 d 除正常大鼠外,其余组大鼠体重较前都有所下降,但与正常组比较,无统计学差异;予以莪术多糖干预 6 周后,模型组大鼠体重比其余干预组下降更明显,有统计学意义 (*P* < 0.01)。见表 1。

表 1 莪术多糖对 2 型糖尿病大鼠模型体重的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Influence of CKP on blood weight of type 2 diabetes model rat ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	体重/g		
			试验前	造模后 3 d	给药 6 周后
正常	-	10	185.7 ± 7.9	391.3 ± 11.4	417.2 ± 14.7 ¹⁾
模型	-	9	187.6 ± 9.4	318.6 ± 26.9	181.5 ± 9.8
莪术多糖	0.5	9	187.6 ± 7.9	310.9 ± 38.4	225.2 ± 27.8 ¹⁾
	1.0	10	191.4 ± 10.8	328.8 ± 27.2	244.9 ± 30.7 ¹⁾
	2.5	10	189.4 ± 9.5	310.6 ± 23.4	215.3 ± 9.8 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ *P* < 0.01(表 2 同)。

3.2 对糖尿病大鼠 FBG, TG, TC, INS 的影响 与正常组相比,模型组血清 TC, TG, FBG 的含量显著增高 ($P < 0.01$), INS 水平明显降低 ($P < 0.01$);

模型组比较,莪术多糖各剂量给药组大鼠血清 TG, TC, FBG 有明显降低 ($P < 0.01$),其中以中剂量组降低数值最大;INS 明显提高 ($P < 0.01$)。见表 2。

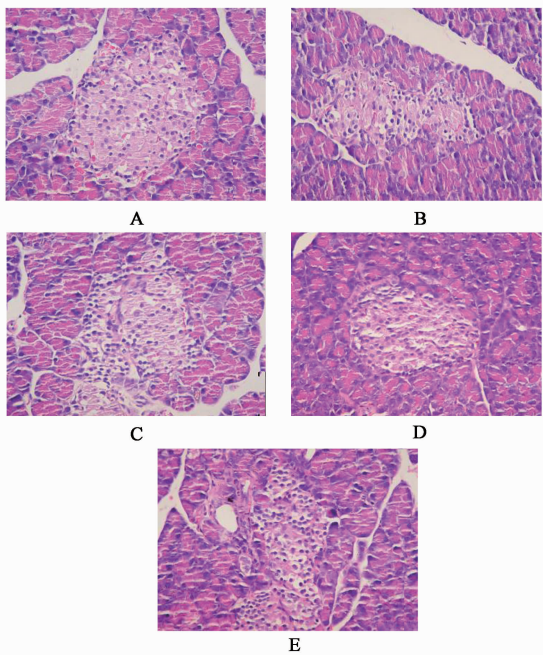
表 2 CKP 对 T2DM 大鼠血清 FBG, TG, TC, INS 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of CKP on FBG, TG, TC and INS in T2DM rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	n	FBG/ $mmol \cdot L^{-1}$	TG/ $mmol \cdot L^{-1}$	TC/ $mmol \cdot L^{-1}$	INS/ $mU \cdot L$
正常	-	10	$5.5 \pm 0.6^{1)}$	$1.0 \pm 0.3^{1)}$	$2.6 \pm 0.2^{1)}$	$27.9 \pm 2.9^{1)}$
模型	-	9	21.7 ± 3.9	1.6 ± 0.2	5.6 ± 0.3	10.7 ± 2.3
莪术多糖	0.5	9	$17.8 \pm 1.5^{1)}$	$1.4 \pm 0.1^{1)}$	$4.4 \pm 0.5^{1)}$	$15.9 \pm 2.2^{1)}$
	1.0	10	$11.6 \pm 2.8^{1)}$	$1.2 \pm 0.2^{1)}$	$3.3 \pm 0.2^{1)}$	$18.5 \pm 1.2^{1)}$
	2.5	10	$16.1 \pm 0.8^{1)}$	$1.4 \pm 0.1^{1)}$	$4.5 \pm 0.2^{1)}$	$17.9 \pm 2.6^{1)}$

3.3 大鼠胰腺的组织形态学变化 对照组大鼠胰岛结构完整、境界清晰,呈圆形或椭圆形细胞团,分布于胰腺腺泡之间,胰岛细胞胞浆丰富,红染,核圆形。模型组大鼠胰岛明显萎缩,面积减少,边界模糊不清,分布稀疏,且出现空泡区。CKP-M 组大鼠胰岛萎缩和胰岛病变程度明显好转(图 1)。

统计学意义 ($P < 0.01$)。与模型组比较,中剂量药组 Fas 阳性表达明显减弱 ($P < 0.01$)。见图 2,表 3。



A. 正常组; B. 模型组; C. CKP $0.5 g \cdot kg^{-1}$ 组; D. CKP $1.0 g \cdot kg^{-1}$ 组; E. CKP $2.5 g \cdot kg^{-1}$ 组(图 2 同)

图 1 CKP 对 T2DM 大鼠胰腺组织病理变化的影响(HE, $\times 400$)
Fig.1 Influence of CKP on pathological changes of pancreatic tissue in T2DM rats (HE, $\times 400$)

3.4 胰岛 Fas 免疫组化图像分析 Fas 阳性蛋白在胰岛细胞胞质显色为棕黄色颗粒,在正常组大鼠胰岛细胞胞浆中有少量的 Fas 表达,呈弱阳性表达。与正常组比较,模型组中 Fas 表达明显增强,差异有

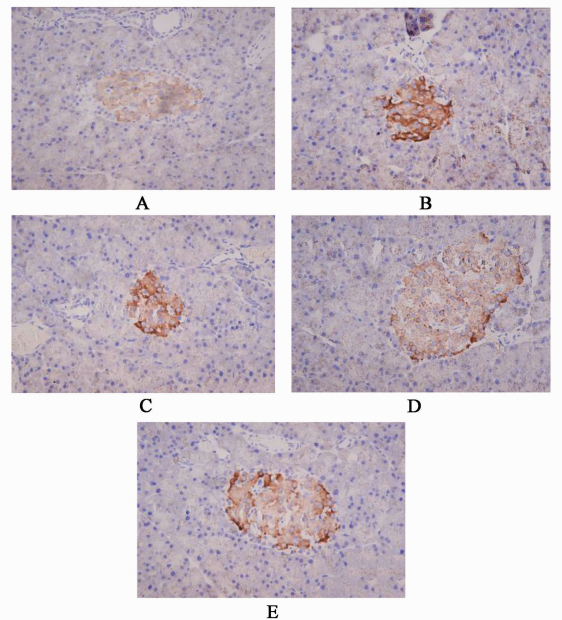


图 2 CKP 对 T2DM 大鼠胰腺组织中 Fas 表达的影响(免疫组化, $\times 400$)

Fig.2 Effect of CKP on Fas expression of pancreatic tissue in T2DM rats (IHC, $\times 400$)

表 3 CKP 对 T2DM 大鼠胰腺组织胰岛 Fas 免疫组化的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Effect of CKP on immunohistochemical of Fas in pancrease of T2DM rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	n	Fas/IA
正常	-	10	0.243 ± 0.175
模型	-	9	$0.437 \pm 0.349^{1)}$
莪术多糖	0.5	9	$0.364 \pm 0.248^{2)}$
	1.0	10	$0.275 \pm 0.225^{2)}$
	2.5	10	$0.356 \pm 0.251^{2)}$

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

本实验采用成年 SD 大鼠高糖高脂饲料喂养一段时间后,再给予小剂量的 STZ,诱导出病理、生理改变都接近于人类 2 型糖尿病的动物模型。在此基础上观察用不同剂量的莪术多糖对糖尿病大鼠的氧化指标及胰腺组织病理切片的影响,初步探讨莪术多糖对糖尿病大鼠的降血糖机制。

本研究结果表明,CKP 降低了 T2DM 大鼠的血糖,提高了糖尿病大鼠的胰岛素水平,具有降血糖作用。其药理作用机制可能通过 CKP 减少胰岛 Fas 蛋白的表达,保护胰岛细胞的功能,减少其凋亡。研究显示胰岛 β 细胞功能的损伤在 T2DM 发病机制中起着重要作用^[5]。而 Fas/FasL 配体系统可能是介导胰岛 β 细胞凋亡的途径之一,属于死亡受体介导的信号途径(外源性途径)、线粒体途径(内源性途径)及内质网通路 3 条凋亡途径中的死亡受体通路^[6-7]。已有研究表明^[8],Fas 及 FasL 系统参与了糖尿病胰岛 β 细胞凋亡的调控,且胰岛 β 细胞 Fas 及 FasL 的表达增加与凋亡细胞数的增加相平行。因此,Fas 蛋白表达的减少意味着胰岛 β 细胞凋亡减少。本实验结果显示 CKP 明显的降低了 T2DM 大鼠的血糖(尤其以中剂量组明显,说明该药效并不与药量成正比。),这种作用可能通过减少胰岛细胞 Fas 蛋白的表达,保护胰岛 β 细胞凋亡有关。

TC, TG 显著升高是 T2DM 患者脂类代谢紊乱的常见表现。本实验研究表明 CKP 明显降低了 T2DM 大鼠血清中 TC, TG 含量,其可能通过改善 T2DM 大鼠的脂毒性调节糖尿病大鼠的脂代谢紊乱。脂毒性是指脂质代谢紊乱,主要表现为高甘油三酯血症。研究显示脂毒性可能通过氧化应激,内质网应激及炎症应激的共同作用引起胰岛 β 细胞功能障碍^[9]。同时 TC 对胰岛 β 细胞有直接毒性作用^[10]本实验研究结果中 CKP 降低了糖尿病大鼠的 TG, TC, 这可能是其抗糖尿病大鼠的机制之一。

综上所述,CKP 具有改善糖尿病大鼠血糖、调节脂代谢紊乱的作用,并可保护胰岛 β 细胞的凋亡,

可能是多方面不同药理作用交汇调控的结果,有成为治疗糖尿病新药的潜力,但其详细药理作用机制有待于深入研究。

[参考文献]

- [1] 王关林,罗红梅,方宏筠,等. 莪术多糖的分离提取及其生物学活性研究[J]. 营养学报, 2004, 26(5): 366-369.
- [2] Zeng J H, Dai P, Lingyun Renb, et al. Apoptosis-induced anti-tumor effect of *Curcuma kwangsiensis* polysaccharides against human nasopharyngeal carcinoma cells [J]. Carbohydr Polym, 2012, 89(4): 1067-1072.
- [3] 黄凤香,廖迎,曾建红,等. 广西莪术多糖水提工艺优化及不同产地多糖含量测定[J]. 湖北农业科学, 2013, 56(16): 3947-3950.
- [4] MAITI S, ALI K M, JANA K, et al. Ameliorating effect of mother tincture of *Syzygium jambolanum* on carbohydrate and lipid metabolic disorders in streptozotocin-induced diabetic rat: Homeopathic remedy [J]. Nat Sci Biol Med, 2013, 4(1): 68-73.
- [5] Liu J P. Molecular mechanisms of aging and related diseases [J]. Clin Exp Pharmacol P, 2014, 41(7): 445-458.
- [6] Pearl Yafe M, Kaminitz A, Yolcu E S, et al. Pancreatic islets under attack: cellular and molecular effectors [J]. Curr Pharm Des, 2007, 13(7): 749-760.
- [7] Zakeri Z, Lockshin R A. Cell death: history and future [J]. Adv Exp Med Biol, 2008(615): 1-11.
- [8] 李承德,李静静,王琳,等. 黄芪多糖对 Fas 介导的糖尿病大鼠胰岛 β 细胞凋亡的抑制作用[J]. 中药材, 2011, 34(10): 1579-1582.
- [9] 高政南,刘栩晗. 脂毒性对胰岛 β 细胞的影响及其临床对策[J]. 实用糖尿病杂志, 2014, 10(6): 12-15.
- [10] Lu X, Liu J, Hou F, et al. Cholesterol induces pancreatic beta cell apoptosis through oxidative stress pathway [J]. Cell Stress Chaperones, 2011, 16(5): 539-548.

[责任编辑 聂淑琴]