

石榴果实乙酸乙酯提取物对胰岛素抵抗大鼠血糖及血脂的干预作用

曾婷婷^{1,2}, 刘晓梅¹, 田长江¹, 马晓霞¹, 庄馨琪¹, 包·照日格图^{1*}

(1. 云南中医学院 国家中医药管理局中药(免疫)药理学三级科研实验室, 昆明 650500;
2. 云南省中医医院, 昆明 650021)

[摘要] **目的:**观察石榴果实乙酸乙酯提取物(PGFEAE)对正常大鼠及胰岛素抵抗(IR)大鼠模型血糖、血脂的干预作用,评价其改善胰岛素抵抗的药理作用。**方法:**高糖高脂饲料喂养加链脲佐菌素(STZ)2次ip(30 mg·kg⁻¹)建立胰岛素抵抗大鼠模型。分别以PGFEAE 100, 200, 300 mg·kg⁻¹ ig干预4周后,检测空腹血糖(FBG)、空腹胰岛素水平(FINS)、胰岛素敏感指数(ISI)、血清游离脂肪酸(FFA)浓度、甘油三酯(TG)浓度。**结果:**与正常组相比,模型组FBG, FINS, FFA, TG水平显著上升,胰岛素(INS)水平下降($P < 0.05$, $P < 0.01$);造模4周后,正常组与模型组大鼠FBG, FINS, TG分别为5.94, 30.71, 0.57 mmol·L⁻¹; 13.05, 42.36, 1.62 mmol·L⁻¹;给药4周后,与模型组相比,PGFEAE各剂量组均可有效降低胰岛素抵抗大鼠模型FBG, FINS, FFA, TG水平,使胰岛素抵抗大鼠模型INS水平升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论:**PGFEAE可有效改善胰岛素抵抗大鼠血糖、血脂偏高的症状,其对正常大鼠血糖、血脂无干预作用。

[关键词] 石榴果实乙酸乙酯提取物; 胰岛素抵抗; 空腹血糖; 胰岛素水平

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)23-0152-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015230152

Intervention Effects of Ethyl Acetate Extract of *Punica granatum* Fruit on Blood Glucose and Blood Lipid in Rats with Insulin Resistance ZENG Ting-ting^{1,2}, LIU Xiao-mei¹, TIAN Chang-jiang¹, MA Xiao-xia¹, ZHUANG Xin-ying¹, BAO · Zhaorigetu^{1*} (1. Three Scientific Research Laboratories (immune) of Chinese Traditional Medicine and Pharmacology of the State Administration of Traditional Chinese Medicine (TCM), Yunnan University of TCM, Kunming 650500, China; 2. Yunnan Provincial Hospital of TCM, Kunming 650021, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the intervention effect of ethyl acetate extract of *Punica granatum* fruit (PGFEAE) on blood glucose and blood lipid in rats with insulin resistance (IR) and normal rats, and evaluate its pharmacological effects on improving insulin resistance. **Method:** High-sugar and high-fat diet plus intraperitoneal injection of streptozocin (STZ) twice (30 mg·kg⁻¹) to establish rat models of insulin resistance. After 4 weeks of ig administering 100, 200, 300 mg·kg⁻¹ PGFEAE respectively, fasting blood glucose (FBG), fasting insulin (FINS), insulin sensitivity index (ISI), serum free fatty acid (FFA) concentration, and triglyceride (TG) concentration were measured. **Result:** Compared with the normal group, FBG, FINS, FFA, and TG levels were significantly higher and ISI level was lower in model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), after 4 weeks of modeling, FBG, FINS, and TG levels were 5.94, 30.71, 0.57 mmol·L⁻¹. 13.05, 42.36, 1.62 mmol·L⁻¹ respectively in normal group and model group. After 4 weeks of treatment, various dose groups of PGFEAE can effectively reduce FBG, FINS, FFA, and TG levels and increase ISI level in rats with insulin resistance compared with the model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** PGFEAE can effectively improve the symptoms of high blood glucose and blood lipid in rats with insulin resistance.

[收稿日期] 20150531(001)

[基金项目] 云南中医学院临床中药学重点学科建设项目

[第一作者] 曾婷婷, 硕士, 从事药理学工作, Tel: 13759534285, E-mail: 708915602@qq.com

[通讯作者] *包·照日格图, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事临床中药学研究, Tel: 0871-65918133, E-mail: rigdan@126.com

[Key words] ethyl acetate extract of *Punica granatum* fruit; insulin resistance; fasting glucose; insulin levels

石榴皮作为一味常用中药已被广泛研究并运用于临床,石榴花多酚已被证明对2型糖尿病大鼠血糖有干预作用^[1]。然而石榴果实作为一个整体,并没有得到充分的研究与运用。前期研究发现,石榴果实乙酸乙酯提取物(PGFEAE)对胰岛素样生长因子I及肿瘤坏死因子- α (INF- α)刺激下的3T3L1前脂肪细胞的增殖有抑制作用^[2],因此本文以PGFEAE为研究对象,观察其对链脲佐菌素诱发胰岛素抵抗大鼠模型糖脂代谢的影响。

1 材料

1.1 药材 石榴 *Punica granatum* 购自云南蒙自,经云南中医学院药用植物学博士吴凯鉴定为石榴科石榴属石榴种浆果。

1.2 动物 清洁级健康雄性SD大鼠,体重(200±20)g,120只,由成都中医药大学实验动物中心提供,合格证号SCXK(川)2008-0024。

1.3 仪器 SP-756型紫外-可见分光光度仪(上海光谱仪器有限公司),DNM-9602G型酶标仪(北京普朗新技术有限公司),三诺安稳血糖仪、血糖试纸(长沙三诺生物传感技术股份有限公司),TDA型温控仪、水浴锅(北京永光明医疗仪器厂),TGL-16B型台式离心机(上海安亭科学仪器厂),PT124S型电子天平(上海梅特勒托利多仪器有限公司),定量采血管(南通福利来医疗器材有限公司),其林贝尔漩涡混合仪(江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

1.4 试剂及药品 阳性药罗格列酮(rosiglitazone, Adamas-beta公司,批号P08788RT),生理盐水(贵州天地药业有限公司,批号H13082809),肝素钠注射液(天津市生物化学制药厂,批号200902C4),75%乙醇(昆明力健消毒制品有限公司,批号130810),甘油三酯(TG)试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司,批号136180),游离脂肪酸(FFA)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号20131024),胰岛素酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(上海沪峰生物科技有限公司,批号13060)。

2 方法

2.1 PGFEAE的制备 鲜品石榴80kg晒干至18kg,乙酸乙酯浸泡1周后提取,反复提取3次,最后得到PGFEAE共270g。

2.2 造模 SD大鼠,120只,室温18~22℃,湿度

50%~60%,明暗周期12/12h,自由摄食、饮水。给予基础饲料(含碳水化合物53%,脂肪5%,蛋白质23%),适应性饲养1周,自由摄食、饮水。随机抽取12只大鼠作为正常组及12只大鼠为给药组(不造模,待造模组造模成功后,将同时给予本组大鼠石榴果实乙酸乙酯提取物),给予普通标准饲料。其余大鼠均给予高脂饲料(基础饲料中加入食盐2%,白糖10%,猪油15%)^[3]喂养4周后,禁食8~10h。造模组大鼠将在造模第3,4周,分2次ip链脲佐菌素(STZ,30mg·kg⁻¹)^[4],溶于0.1mol·L⁻¹pH4.4枸橼酸缓冲液中)。正常组及正常给药组共24只大鼠分2次ip等量0.1mol·L⁻¹,pH4.4枸橼酸缓冲液。待第4周,第2次STZ注射后,饲养72h,测血糖(测前所有大鼠禁食8~10h)。以FBG值≥11.1mmol·L⁻¹^[5]为胰岛素抵抗大鼠成模标准。根据血糖值平均分组,1d后选用进入正式实验。

2.3 分组及给药 筛选成模大鼠60只,将其分为5组,每组12只:模型组(给三蒸水,ig),石榴果实乙酸乙酯提取物(PGFEAE)低、中、高剂量组,给予PGFEAE100,200,300mg·kg⁻¹ig,阳性药罗格列酮组(ROG)给予ROG3mg·kg⁻¹ig;以上60只大鼠持续给予高脂饲料;正常组给予纯水及基础饲料,正常给药组给予PGFEAE200mg·kg⁻¹ig。治疗周期均为4周。给药期间有死亡(注射STZ容易导致大鼠死亡,模型组死亡4只,阳性药组死亡2只,PGFEAE高剂量组死亡1只,中剂量组死亡2只,低剂量组死亡3只),最终按每组8只做统计。

2.4 空腹胰岛素(FINS)检测,胰岛素敏感指数(ISI)计算,空腹血糖(FBG)及降血糖率^[6]于给药前,给药第2,4周,各组大鼠禁食不禁水12h,采用眼底静脉丛取血,分离血清。ELISA法测定FINS。并计算胰岛素敏感指数 $ISI = \ln [1 / (FINS \cdot FBG)]$ ^[7]。分别于造模前,造模4周,给药第2,4周禁食不禁水12h,采用大鼠尾尖取血,用血糖仪检测FBG。以胰岛素抵抗模型组大鼠的空腹血糖值作为参比,计算受试物降血糖率(blood glucose lowering rate, GLR)。

$$GLR = (\text{模型组血糖均值} - \text{受试物组血糖均值}) / \text{模型组血糖均值}$$

2.5 TG, FFA检测 按2.4分离血清。分别测定TG, FFA,操作步骤分别按照试剂盒说明书进行。

TG在给药前、给药第2周、第4周、各检测1次(共3次),FFA于给药第4周后检测1次。

2.6 体重 每2周,即造模前、造模第2、4周,给药2、4周,称重1次,观察动物体重增长变化,每天记录各组大鼠死亡情况。

2.7 统计学方法 采用SPSS 16.0进行统计学处理,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素

方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对IR模型大鼠FINS水平和ISI的影响 造模4周,各造模组大鼠FINS较正常组有显著升高($P < 0.01$),ISI较正常组显著降低($P < 0.01$)。与模型组相比经PGFEAE干预4周后,大鼠FINS有所降低,ISI有所升高($P < 0.05, P < 0.01$),见表1。

表1 PGFEAE对胰岛素抵抗大鼠胰岛素敏感指数与胰岛素水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of PGFEAE on insulin sensitivity index and insulin level in rats with insulin resistance ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	造模后		给药2周		给药4周	
		FINS/mmol·L ⁻¹	ISI	FINS/mmol·L ⁻¹	ISI	FINS/mmol·L ⁻¹	ISI
正常	-	30.7 ± 2.4	-5.20 ± 0.13	30.6 ± 4.5	-5.13 ± 0.20	30.6 ± 4.5	-5.08 ± 0.16
正常 + PGFEAE	200	31.8 ± 1.6	-5.16 ± 0.07	31.5 ± 2.3	-5.10 ± 0.13	32.4 ± 1.6	-5.22 ± 0.08
模型	-	42.3 ± 2.0 ¹⁾	-6.19 ± 0.53 ¹⁾	43.3 ± 1.4 ¹⁾	-6.46 ± 0.07 ¹⁾	44.9 ± 1.8 ¹⁾	-6.29 ± 0.50 ¹⁾
ROG	3	43.5 ± 2.0 ¹⁾	-6.25 ± 0.46 ¹⁾	35.7 ± 3.6 ³⁾	-5.59 ± 0.48 ³⁾	31.0 ± 0.6 ³⁾	-5.44 ± 0.30 ³⁾
PGFEAE	100	43.2 ± 2.3 ¹⁾	-6.23 ± 0.40 ¹⁾	38.5 ± 1.7 ³⁾	-5.81 ± 0.32 ²⁾	34.7 ± 1.8 ³⁾	-5.78 ± 0.31 ²⁾
	200	42.9 ± 2.3 ¹⁾	-6.29 ± 0.42 ¹⁾	37.6 ± 1.5 ³⁾	-5.78 ± 0.27 ²⁾	33.8 ± 2.4 ³⁾	-5.66 ± 0.16 ²⁾
	300	43.1 ± 2.4 ¹⁾	-6.23 ± 0.46 ¹⁾	35.6 ± 0.6 ³⁾	-5.71 ± 0.27 ³⁾	33.0 ± 1.8 ³⁾	-5.59 ± 0.13 ³⁾

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

3.2 对IR模型大鼠FBG的影响及降血糖率 造模前各组大鼠FBG差异均无显著性,造模4周后,各造模组大鼠FBG较正常组有显著升高($P < 0.05, P < 0.01$),经PGFEAE干预4周后,大鼠FBG有所

降低,与模型组相比有显著差异($P < 0.05, P < 0.01$),见表2。以第4周的数据分析结果显示,PGFEAE低、中、高剂量组降糖率分别为27.9%,34.5%,38%。

表2 PGFEAE对胰岛素抵抗大鼠空腹血糖的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of PGFEAE on fasting blood glucose in rats with insulin resistance ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	FBG/mmol·L ⁻¹			
		造模前	造模4周	给药2周	给药4周
正常	-	4.33 ± 0.16	5.94 ± 0.63	5.51 ± 0.42	5.23 ± 0.32
正常 + PGFEAE	200	4.19 ± 0.55	5.48 ± 0.33	5.21 ± 0.46	5.60 ± 0.36
模型	-	4.29 ± 0.41	13.05 ± 6.32 ²⁾	14.87 ± 1.10 ²⁾	13.12 ± 5.78 ²⁾
ROG	3	4.38 ± 0.37	13.27 ± 6.03 ²⁾	8.38 ± 4.59 ⁴⁾	7.68 ± 2.30 ⁴⁾
PGFEAE	100	4.45 ± 0.31	12.76 ± 5.14 ¹⁾	9.19 ± 3.41 ⁴⁾	9.49 ± 2.35
	200	4.42 ± 0.60	13.64 ± 5.25 ²⁾	8.94 ± 2.57 ⁴⁾	8.63 ± 1.24 ³⁾
	300	4.35 ± 0.36	13.06 ± 5.77 ²⁾	8.79 ± 2.39 ⁴⁾	8.18 ± 1.02 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 PGFEAE对各组大鼠FFA, TG及体重的影响^[8] 与正常组相比,模型组大鼠的FFA, TG显著升高($P < 0.01$),给予PGFEAE干预4周后,FFA和TG均显著降低,与模型组相比有显著差异($P < 0.05, P < 0.01$),见表3。造模4周,与正常组相比,模型组大鼠的体重显著下降($P < 0.01$),给予PGFEAE干预4周后,给药组体重有所上升,与模型

组相比,差异无统计学意义。

4 讨论

复制与人类临床发病相似的IR动物模型,是研究IR及判断药物是否有效的关键,本课题采用高脂高糖高盐饲料喂养联合STZ 2次腹腔注射复制实验性IR模型,基本符合临床发病特点^[9],适合IR的研究。

表 3 PGFEAE 对胰岛素抵抗大鼠 TG 和 FFA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 3 Effect of PGFEAE on FFA and TG in rats with insulin resistance ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	TG/mmol·L ⁻¹			FFA/ μ mol·L ⁻¹
		造模 4 周	给药 2 周	给药 4 周	给药 4 周
正常	-	0.57 ± 0.11	1.03 ± 0.49	1.09 ± 0.36	684.97 ± 216.93
正常 + PGFEAE	200	0.53 ± 0.12	1.00 ± 0.65	0.89 ± 0.53	678.60 ± 215.50
模型	-	1.62 ± 0.08 ¹⁾	2.13 ± 0.53 ¹⁾	2.33 ± 0.32 ¹⁾	981.78 ± 234.09 ¹⁾
ROG	3	1.65 ± 0.01 ¹⁾	1.80 ± 0.42	1.46 ± 0.19 ³⁾	883.73 ± 124.57 ³⁾
PGFEAE	100	1.62 ± 0.04 ¹⁾	1.98 ± 0.14	1.54 ± 0.56 ²⁾	906.47 ± 103.93 ³⁾
	200	1.66 ± 0.04 ¹⁾	1.93 ± 0.11	1.34 ± 0.69 ³⁾	900.04 ± 113.56 ³⁾
	300	1.64 ± 0.08 ¹⁾	1.82 ± 0.13	1.07 ± 0.42 ³⁾	890.51 ± 101.15 ³⁾

本实验通过连续给药 4 周发现,PGFEAE 能够使 IR 大鼠血糖、胰岛素水平下降,从而使胰岛素敏感指数上升。由此推测 PGFEAE 可能通过改善胰岛素抵抗而发挥对 IR 大鼠模型的治疗作用,其确切作用机制有待下一步深入研究。胰岛素抵抗引起脂代谢异常与肝脏的胰岛素抵抗有关,其中一个重要的机制是胰岛素抵抗使脂肪细胞释放过多的 FFA。FFA 和 TG 是肝脏极低密度脂蛋白的主要来源。胰岛素抵抗使脂肪细胞释放过多的 FFA,既能引起脂代谢异常,又可以反过来加重胰岛素抵抗。在此基础上,本实验通过动态观测 PGFEAE 对 IR 模型大鼠 TG 水平的影响,并检测血清 FFA 水平,研究和探讨 PGFEAE 对 IR 大鼠模型血脂的影响,进一步探讨其可能的作用靶点。肥胖是导致胰岛素抵抗最主要的原因,尤其是中心性肥胖^[10];然而实验数据显示,模型组大鼠体重要低于正常组,笔者分析这可能与腹腔注射 STZ 有关。另一方面,长期处于高血糖状态,同样会导致胰岛素抵抗,因此体重并不影响实验结论。

罗格列酮属噻唑烷二酮类药物,能增加靶组织对胰岛素的敏感性,改善胰岛素抵抗,是治疗 IR 的首选药物。通过实验结果发现,罗格列酮能显著改善 IR 大鼠的胰岛素敏感指数,对 TG,FFA 也有一定的干预作用。由于实验涉及到 TG 和 FFA 两个指标的检测,若增加二甲双胍做阳性药会更加理想。

笔者设置正常给药组的目的是探讨 PGFEAE 对正常大鼠血糖、血脂的影响。若 PGFEAE 使正常大鼠血糖、血脂升高,那么正常人吃石榴过量则可能导致血糖、血脂升高,因为石榴中含有糖分;若 PGFEAE 能使正常大鼠血糖、血脂下降,那么血糖、血脂偏高的患者则可以多吃些石榴从而有一定的食疗效果。但从另一方面来说,这仅仅只是推断,因

为 PGFEAE 是石榴果实经乙酸乙酯浸泡后提取得到的,产生作用的部分有可能是石榴皮,有可能是石榴果肉,也有可能是石榴籽,或者是几个部分混合产生的协同作用。实验结果表明,PGFEAE 对正常大鼠的血糖、血脂并没有干预作用。

[参考文献]

[1] 魏媛媛,李潇,阿吉艾克拜尔·艾萨,等. 石榴花多酚对链脲佐菌素诱发 2 型糖尿病大鼠糖代谢的影响[J]. 中国医院药学杂志,2011,31(7):537-540.

[2] 朱自仙. 石榴三种提取物对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖的作用研究[D]. 昆明:云南中医学院,2012.

[3] 万春平,包·照日格图,却翎,等. 萜萜醇提取物对胰岛素抵抗综合征大鼠模型的防治作用研究[J]. 中草药,2010,41(1):96-98.

[4] 王利军,张汝学,贾正平,等. 高脂饲料加 STZ 联合诱导的大鼠糖尿病模型 HPA 轴功能变化与糖脂代谢的关系[J]. 中国药理学通报,2010,26(3):325-329.

[5] 汤球. 2 型糖尿病大鼠模型的制备与评价[J]. 四川医学,2011,32(4):463-465.

[6] 魏媛媛. 石榴花多酚对糖尿病大鼠血糖血脂的影响及其作用机制的研究[D]. 乌鲁木齐:新疆医科大学,2011.

[7] 燕娟,郭巍伟,梁执群,等. 2 型糖尿病大鼠模型的建立及其验证[J]. 临床和实验医学杂志,2009,8(4):5-6.

[8] 陈秋,夏永鹏,邱宗荫. 胰岛素抵抗大鼠模型的建立与评价[J]. 江苏医药,2006,32(3):238,530.

[9] 梁兴伦,韩明向. 胰岛素抵抗模型大鼠的中医证候研究[J]. 中国中西医结合杂志,2001,21(7):528-530.

[10] 邓彬,戴林,白成,等. 吡格列酮对实验性大鼠糖脂代谢紊乱的影响[J]. 大连医科大学学报,2003,25(4):253-255.

[责任编辑 聂淑琴]