

杜仲多糖对链脲佐菌素致糖尿病小鼠的作用

苏卓¹, 郭诚¹, 梁韬²

(1. 广西梧州市中医院, 广西梧州 543000; 2. 广西医科大学附属口腔医院, 南宁 530021)

[摘要] **目的:**研究杜仲多糖对链脲佐菌素(STZ)致糖尿病小鼠的作用及影响,并探讨相关机制。**方法:**取50只SPF级昆明小鼠按剂量 $120\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ip STZ, ip前禁食12 h。3 d后,测量小鼠空腹血糖(FBG),小鼠 $\text{FBG}\geq 11.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 表明糖尿病小鼠模型造模成功。将造模成功的小鼠随机分成5组,分别为模型组,二甲双胍组($32\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),杜仲多糖高、中、低剂量组($500, 250, 125\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),每组10只。另设正常组小鼠10只。连续ig给药14 d,每天1次。正常组和模型组ig给予等体积的生理盐水。末次给药前禁食12 h,给药1 h后拔眼球取血,离心取血清待测。测定14 d小鼠FBG,放射免疫测定法测定小鼠血清中空腹胰岛素(FNS)含量,计算胰岛素敏感指数(ISI),试剂盒测定血清中甘油三酯(TG),总胆固醇(TC),高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C),低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)的含量;酶联免疫吸附测定(ELISA)测定血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-8(IL-8)和IL-6;蛋白质免疫印迹(Western blot)法测定胰腺组织中转录因子- κ B(NF- κ B),Toll样受体4(TLR4)的蛋白含量。**结果:**与正常组比较,模型组小鼠FBG和血脂TG,TC,LDL-C水平明显升高,HDL-C水平,FNS和ISI含量明显降低,血清中TNF- α ,IL-8和IL-6含量明显升高,胰腺组织中TLR4,NF- κ B蛋白的表达明显升高($P<0.01$);与模型组比较,杜仲多糖各剂量组明显降低小鼠FBG和血脂TG,TC,LDL-C水平,明显升高HDL-C水平,FNS和ISI含量,明显降低血清中TNF- α ,IL-8和IL-6含量,明显降低胰腺组织中TLR4,NF- κ B蛋白的表达($P<0.05, P<0.01$)。**结论:**杜仲多糖具有降血糖和降血脂作用,其作用机制可能与提高糖尿病小鼠机体抗氧化能力、降低炎症因子血清中的含量,以及降低胰腺中TLR4,NF- κ B蛋白含量相关。

[关键词] 杜仲多糖; 链脲佐菌素; 糖尿病; 血脂; 血糖; 炎症因子; Toll样受体4; 核转录因子- κ B

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)14-0161-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016140161

Effects of Eucommiae Cortex Polysaccharide on Streptozotocin-induced Diabetic Mice

SU Zhuo¹, GUO Cheng¹, LIANG Tao²

(1. Traditional Chinese Medicine Hospital of Wuzhou, Wuzhou 543000, China;

2. College of Stomatology Affiliated to Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Eucommiae Cortex polysaccharide on streptozotocin-induced diabetic mice. **Method:** Fifty SPF Kunming mice were intraperitoneally injected with $120\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ streptozotocin (STZ) after being fasted over 12 hours. After 3 days, the fasting blood glucose (FBG) of mice were measured to be $\geq 11.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, indicating the successful modeling. The diabetic mice were randomly divided into 5 groups, with 10 mice per group: model group, metformin group ($32\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), and high, medium and low-dose Eucommiae Cortex polysaccharide groups ($500, 250, 125\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Another 10 healthy mice were considered as normal group. These mice were administrated intragastrically once a day for 14 days. Normal and model groups were given equal volume of saline. One hour after the last administration, the blood samples of 12-hour fasted mice were collected by drawing eyeballs and were centrifuged to separate serum for further measurement. The FBG were detected at the 14th day; the serum fasting insulin (FNS) was measured using radioimmunoassay and then the insulin sensitivity index (ISI) was calculated. Serum triglyceride (TG), total

[收稿日期] 20150317(001)

[基金项目] 广西高校科学技术研究项目(LX2014085)

[第一作者] 苏卓,主管药师,从事抗糖尿病药物基础研究,Tel:13517749626,E-mail:wangshaojun2014@163.com

cholesterol (TC), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) were analyzed using commercial kits. enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) method was utilized to detect TNF- α , IL-8 and interleukin-6 (IL-6) levels. The protein levels of Toll-like receptor 4 (TLR4) and nuclear transcriptional factor- κ B (NF- κ B) in pancreas tissues were analyzed by Western blot. **Result:** Compared with the normal group, the model group showed significant increases in FBG, lipid TG, TC, LDL-C, serum TNF- α , IL-8 and IL-6 contents, and protein expressions of TLR4 and NF- κ B in pancreas, and significant decreases in HDL-C, FNS and ISI ($P < 0.01$); Compared with the model group, Eucommiae Cortex polysaccharide groups showed significant decreases in FBG, lipid TG, TC, LDL-C, serum TNF- α , IL-8 and IL-6 contents, and protein expressions of TLR4 and NF- κ B in pancreas, and significant increases in HDL-C, FNS and ISI ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** The mechanism of Eucommiae Cortex polysaccharide on hypoglycemia and hypolipidemic may associate with improving antioxidant capacity, decreasing serum contents of inflammatory cytokines and inhibiting the expressions of TLR4, NF- κ B proteins in diabetic mice.

[Key words] Eucommiae Cortex polysaccharide; streptozotocin; diabetes; blood gid; blood glucose; inflammatory factor; Toll-like receptor 4; nudear transcriptional factor- κ B

糖尿病是一种以高血糖为特征,胰岛素分泌缺陷或其生物作用受损的代谢性疾病^[1]。目前临床上治疗糖尿病主要采用化学合成药物或胰岛素来刺激胰岛素分泌或增加糖的消耗从而改善机体内糖代谢混乱的情况^[2]。近年研究发现,部分中药及其活性成分对降血糖治疗糖尿病以及并发症的预防有明显疗效,中药防治糖尿病已是国内外的研究热点^[3]。杜仲多糖为杜仲科植物杜仲的干燥树皮中提取的主要成分。杜仲味甘,性温,具有清除体内垃圾,加强人体细胞物质代谢,防止肌肉骨骼老化,平衡人体血压,分解体内胆固醇,降低体内脂肪,恢复血管弹性,利尿清热,广谱抗菌,兴奋中枢神经,提高白血球药理作用^[4]。本实验采用链脲佐菌素(STZ)所致的小鼠糖尿病模型,探讨杜仲多糖对糖尿病小鼠的治疗作用及机制。

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠, SPF 级,雌雄各半,体重 18~22 g,动物使用许可证号 SYXK(桂)2009-0004,由广西医科大学实验动物中心提供。

1.2 药物及试剂 杜仲经广西中医药研究院鉴定为杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* 的干燥树皮。杜仲多糖由本实验室采用“水提醇沉法”制备所得,盐酸二甲双胍片(北京京丰制药有限公司,批号 140512),链脲佐菌素(STZ,美国 Sigma 公司,批号 SO130),碘[125I]胰岛素放射免疫分析药盒(北京北方生物技术研究所,批号 141128),高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)测定试剂盒和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)测定试剂盒(长春汇力生物技术有限公司,批号分别为 20140916,批号 20140928),甘油三

酯(TG)测定试剂盒和总胆固醇(TC)测定试剂盒(四川迈克科技股份有限公司,批号分别为 1501062,1501041),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)测定试剂盒及白细胞介素-8(IL-8)测定试剂盒,白细胞介素-6(IL-6)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20141202,20141026,20141115),核转录因子- κ B(NF- κ B)兔抗大鼠单抗及 Toll 样受体 4(TLR4)兔抗大鼠单抗(美国 Thermo Scientific 公司,批号分别为 PA5-16758,PA5-15214)。

1.3 仪器 罗氏卓越型血糖仪(德国 ACCU-CHEK Performa 公司),DFM-96 型多管放射免疫计数器(众成机电技术公司)。

2 方法

2.1 糖尿病模型建立 小鼠造模前禁食 12 h,按照 120 mg·kg⁻¹ ip STZ 柠檬酸缓冲液。ip 72 h 后尾巴取血测小鼠空腹血糖(FBG),FBG \geq 11 mmol·L⁻¹的选为糖尿病模型小鼠。

2.2 分组及给药 将造模成功的小鼠随机分为模型组,二甲双胍 32 mg·kg⁻¹组,杜仲多糖 125,250,500 mg·kg⁻¹组,每组 10 只动物。另设 10 只正常小鼠作为正常组。ig 给药,每天 1 次,连续 14 d。正常组和模型组 ig 给予等体积的生理盐水。末次给药前禁食不禁水 12 h,给药后 1 h 尾巴取血,测定血糖,摘眼球采血,离心取血清待测。

2.3 观测指标 放射免疫法测定空腹胰岛素(FNS),酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定血清中 TNF- α 和 IL-8 和 IL-6 水平,试剂盒测定血清中 TG,TC,LDL-C,HDL-C 的含量;蛋白质免疫印迹(Western blot)法检测胰脏中 NF- κ B,TLR4 的

表达。

2.4 统计学分析 采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,经方差齐性检验,方差齐者采用 *t* 检验,方差不齐者采用校正 *t* 检验进行统计处理,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对糖尿病小鼠 FBG 的影响 与正常组比较,模型组小鼠 FBG 明显升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,二甲双胍组和杜仲多糖组小鼠 FBG 明显下降 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 杜仲多糖对糖尿病小鼠 FBG 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of Eucommiae Cortex polysaccharide on FBG in diabetic mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	FBG/mmol·L ⁻¹		降糖率 /%
		药前	药后	
正常	-	7.35 ± 1.53	7.68 ± 1.25	-
模型	-	14.31 ± 1.59 ²⁾	18.22 ± 1.94 ²⁾	-
二甲双胍	32	15.26 ± 2.08 ²⁾	12.07 ± 1.23 ³⁾	20.9
杜仲多糖	500	15.19 ± 2.56 ²⁾	12.28 ± 1.84 ³⁾	19.2
	250	16.13 ± 2.28 ²⁾	13.59 ± 2.18 ³⁾	15.7
	125	15.69 ± 2.02 ²⁾	14.72 ± 2.63 ³⁾	6.2

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⁾ $P < 0.01$ (表 2~5 同)。

表 3 杜仲多糖对 STZ 所致糖尿病小鼠 TG,TC,LDL-C,HDL-C 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effects of Eucommiae Cortex polysaccharide on TG,TC,LDL-C,HDL-C in diabetic mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$) mmol·L⁻¹

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	TG	TC	LDL-C	HDL-C
正常	-	0.61 ± 0.19	0.92 ± 0.45	0.28 ± 0.16	1.53 ± 0.19
模型	-	1.43 ± 0.28 ²⁾	1.67 ± 0.34 ²⁾	0.69 ± 0.22 ²⁾	0.78 ± 0.12 ²⁾
二甲双胍	32	0.96 ± 0.31 ⁴⁾	1.08 ± 0.41 ³⁾	0.31 ± 0.11 ³⁾	1.21 ± 0.37 ³⁾
杜仲多糖	500	1.07 ± 0.35 ³⁾	1.17 ± 0.39 ³⁾	0.35 ± 0.15 ³⁾	1.36 ± 0.21 ⁴⁾
	250	1.19 ± 0.25 ³⁾	1.28 ± 0.37 ³⁾	0.43 ± 0.08 ³⁾	1.23 ± 0.23 ³⁾
	125	1.31 ± 0.36	1.52 ± 0.32	0.44 ± 0.12 ³⁾	0.94 ± 0.37 ³⁾

3.4 对 STZ 所致糖尿病小鼠血清中炎症因子的影响

与正常组比较,模型组小鼠血清中 TNF- α ,IL-8,IL-6 炎症因子的含量明显升高,与正常组比较差异有统

表 4 杜仲多糖对 STZ 所致糖尿病小鼠 TNF- α ,IL-8,IL-6 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effects of Eucommiae Cortex polysaccharide on TNF- α ,IL-8,IL-6 in diabetic mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$) mmol·L⁻¹

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	TNF- α	IL-8	IL-6
正常	-	0.049 ± 0.002	0.065 ± 0.013	0.077 ± 0.014
模型	-	0.148 ± 0.021 ²⁾	0.181 ± 0.032 ²⁾	0.214 ± 0.075 ²⁾
二甲双胍	32	0.056 ± 0.020	0.072 ± 0.020	0.117 ± 0.033
杜仲多糖	500	0.113 ± 0.027 ³⁾	0.129 ± 0.032 ³⁾	0.175 ± 0.038 ³⁾
	250	0.081 ± 0.013 ⁴⁾	0.118 ± 0.025 ⁴⁾	0.142 ± 0.034 ⁴⁾
	125	0.069 ± 0.032 ⁴⁾	0.093 ± 0.023 ⁴⁾	0.115 ± 0.022 ⁴⁾

3.5 对胰腺中 TLR4,NF- κ B 的蛋白含量的影响

与正常组比较,模型组胰腺中 TLR4,NF- κ B 蛋白含量升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,二甲双胍组和杜仲多糖组的小鼠胰腺组织中 TLR4,NF- κ B 的含量下

3.2 对糖尿病小鼠血清胰岛素及胰岛素敏感指数 (ISI) 的影响 与正常组比较,模型组小鼠血清胰岛素含量显著下降 ($P < 0.01$);与模型组比较,杜仲多糖 500,250 mg·kg⁻¹ 组胰岛素含量明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),胰岛素敏感指数 ISI 有所增加。见表 2。

表 2 杜仲多糖对 STZ 致糖尿病小鼠血清胰岛素和胰岛素敏感指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of Eucommiae Cortex polysaccharide on serum insulin and insulin sensitivity index in diabetic mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	胰岛素/mU·L ⁻¹	ISI
正常	-	22.13 ± 4.05	-5.18 ± 0.23
模型	-	11.71 ± 3.94 ²⁾	-5.94 ± 0.31
二甲双胍	32	19.84 ± 4.07 ⁴⁾	-5.61 ± 0.35
杜仲多糖	500	17.86 ± 3.38	-5.69 ± 0.34
	250	15.51 ± 3.22 ³⁾	-5.72 ± 0.47
	125	13.15 ± 3.79 ⁴⁾	-5.83 ± 0.31

3.3 对 STZ 所致糖尿病小鼠模型空腹血脂的影响

与正常组比较,模型组小鼠血清 TG,TC,LDL-C 的含量均有所提高,而 HDL-C 则明显降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,杜仲多糖给药组血清 TG,TC,LDL-C 的含量均下降,而 HDL-C 含量上升 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 3。

计学意义 ($P < 0.01$);与模型组比较,二甲双胍组和杜仲多糖给药组小鼠血清中 TNF- α ,IL-8,IL-6 炎症因子水平逐渐下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 4。

降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 5,图 1。

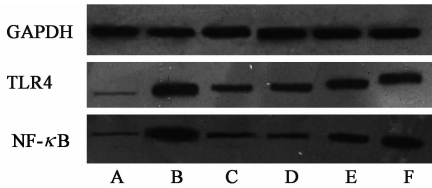
4 讨论

糖尿病是由多种病因而引起的胰岛功能紊乱的代谢性疾病^[5]。随着糖尿病病情的发展可导致一

表 5 杜仲多糖对胰腺中 TLR4, NF-κB 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 5 Effects of Eucommiae Cortex polysaccharide on pancreas TLR4, NF-κB protein content ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	TLR4	NF-κB
空白	-	0.09 ± 0.01	0.13 ± 0.02
模型	-	0.82 ± 0.11 ²⁾	0.71 ± 0.09 ²⁾
二甲双胍	32	0.34 ± 0.24 ⁴⁾	0.22 ± 0.04 ⁴⁾
杜仲多糖	500	0.41 ± 0.19 ³⁾	0.29 ± 0.09 ⁴⁾
	250	0.57 ± 0.27 ³⁾	0.38 ± 0.11 ³⁾
	125	0.68 ± 0.23	0.52 ± 0.07 ³⁾



A. 空白组; B. 模型组; C. 二甲双胍组; D. 杜仲多糖 500 mg·kg⁻¹组; E. 杜仲多糖 250 mg·kg⁻¹组; F. 杜仲多糖 125 mg·kg⁻¹组

图 1 杜仲多糖对胰腺中 TLR4, NF-κB 蛋白表达的影响

Fig. 1 Effects of Eucommiae Cortex polysaccharide on pancreas TLR4, NF-κB protein content

系列的并发症症状,如肾损伤、视网膜脱落、坏疽等^[6-7],故糖尿病严重影响着人类的生存质量及生命健康^[8]。目前临床上治疗糖尿病的方法主要为通过口服化学药物或皮下注射胰岛素的方法控制血糖。但是随着西药应用时间的增长,会越来越常的出现副作用及引发更多的糖尿病病发症,西药治疗糖尿病受到越来越多人的质疑。随着近年对中药研究的深入,发现部分中药及其活性成分对糖尿病的预防及治疗有明显疗效,同时中药对机体的副作用小时其治疗糖尿病的一大优势。杜仲味甘,性温,对内分泌系统具有一定的调节作用,但其作用机制仍未明确^[4]。本实验结果显示,杜仲多糖能有效降低糖尿病小鼠的血糖和恢复胰岛素水平,提示降血糖是杜仲多糖抗糖尿病的药效学方法之一。

糖尿病导致机体的免疫功能和抗氧化应激能力障碍,致使机体内的血脂的代谢功能失调^[9]。实验结果表明,杜仲多糖可使 STZ 所致糖尿病小鼠血清中 TG, TC, LDL-C 的含量均降低,而使 HDL-C 含量升高。表明杜仲多糖可改善 STZ 所致糖尿病小鼠的血脂代谢紊乱状况。

炎症因子在糖尿病的发生及发展过程中有着重要作用。炎症因子与脂肪内分泌、氧化应激、免疫系统相互作用而引起胰岛素抵抗和 β 细胞结构与功能的障碍^[10]。实验结果表明,模型组小鼠血清中 TNF-α, IL-8, IL-6 炎症因子的含量较高。与模型组

比较,二甲双胍、杜仲糖给药组小鼠血清中 TNF-α, IL-8, IL-6 的含量下降。实验结果表明,STZ 所致糖尿病小鼠会造成 TNF-α, IL-8, IL-6 炎症因子含量上升引发炎症反应。而持续的慢性炎症状态可能持续的攻击胰岛细胞造成其细胞损伤。杜仲多糖通过降低炎症因子的含量来缓解胰岛细胞受到炎症因子的攻击,从而改善胰岛素的分泌。

NF-κB 的过度表达通过启动靶基因的转录,介导免疫应答、炎症反应以及细胞生长和凋亡等生理效应^[11]。TLR 是参与非特异性免疫(天然免疫)的一类重要蛋白质分子。TNF-α, IL-6, IL-8 等可以通过 TLR4 信号转导途径激发细胞内炎症通路。实验结果表明,杜仲多糖组小鼠胰腺组织中 TLR4, NF-κB 的蛋白含量较模型组低。提示,杜仲多糖可通过降低 TLR4, NF-κB 的蛋白含量抑制炎症通路来介导胰岛细胞功能,改善胰岛素水平。

[参考文献]

[1] 韦继红. 糖尿病健康教育的研究与进展[J]. 当代医学, 2013, 19(13): 14-15.

[2] 陈浩, 龚利, 邵盛, 等. 糖尿病运动疗法研究进展[J]. 中医学报, 2015, 30(2): 186-188.

[3] 张培利, 郭慧娟, 张国丽. 中药的糖尿病防治作用浅析[J]. 航空航天医学杂志, 2014, 25(11): 1584-1585.

[4] 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.

[5] 庄前玲, 郭桂芳, 李湘萍. 糖尿病前期的临床研究进展[J]. 中华护理杂志, 2011, 46(8): 832-834.

[6] 李敏州, 高彦彬, 马鸣飞, 等. 糖尿病肾病发病机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(22): 344-349.

[7] 郭静, 孟庆海, 殷秋忆, 等. 通塞脉片对实验性糖尿病足模型大鼠的作用研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(11): 2091-2096.

[8] 李菁, 李峥, Marie Nolan. 影响糖尿病患者自我管理心理社会因素的研究进展[J]. 中华护理杂志, 2014, 49(2): 207-211.

[9] 傅晓英. 2 型糖尿病患者糖代谢紊乱与脂代谢紊乱关系的临床研究[J]. 中国慢性病预防与控制, 2004, 12(5): 200-202.

[10] 盛志新, 谢丹红. 炎症与 2 型糖尿病的关系[J]. 新乡医学, 2008, 39(5): 345-347.

[11] 冯建华, 李洁, 王殿云. 清热解方对 2 型糖尿病大鼠胰岛 β 细胞及骨骼肌细胞 NF-κB/IκB 信号途径的调节作用[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(1): 93-95.

[责任编辑 周冰冰]