

金花茶多酚对 2 型糖尿病大鼠胰腺的保护作用

马硕¹, 蒲志军¹, 张小玲¹, 赵理云¹, 谢爱泽², 周小艳¹, 邹登峰^{1*}

(1. 桂林医学院, 广西 桂林 541004; 2. 广西医科大学第一附属医院, 南宁 530021)

[摘要] 目的: 观察金花茶多酚(*Camellia nitidissima* polyphenols, CNP)对 2 型糖尿病大鼠血糖和胰腺的影响, 探讨 CNP 对胰腺的保护作用。方法: 建立 2 型糖尿病大鼠模型的方法为高糖高脂饲料喂养 4 周结合腹腔注射小剂量链脲佐菌素(STZ, 30 mg·kg⁻¹)。将大鼠分为正常组, 高脂组, 模型组, CNP 低、中、高剂量组。各 CNP 组预防给药 7 d 后造模, 用快速血糖仪测定各组大鼠的空腹血糖值(FBG)。造模后分别于第 1, 2, 3 天摘取大鼠胰腺, 制成石蜡切片, 苏木精-伊红(HE)染色, 观察胰腺组织病理变化; 免疫组化法(immunohistochemistry, IHC)标记胰岛素分泌情况并统计胰岛细胞阳性率。结果: 与正常组和高脂组比较, 模型组大鼠 FBG 显著升高($P < 0.05$), 胰岛 β 细胞有明显形态学改变, 胰岛细胞阳性率明显降低($P < 0.05$)。与模型组比较, CNP 中、高剂量组 FBG 显著降低($P < 0.05$), 并且呈现一定程度的剂量相关性, 胰岛 β 细胞损伤程度明显降低, 胰岛细胞阳性率显著回升($P < 0.05$), CNP 低剂量组无明显差异。结论: CNP 能修复胰腺损伤, 促进胰岛素分泌, 有效降低空腹血糖、改善葡萄糖耐受, 提示金花茶多酚对胰腺有剂量依赖性的保护作用。

[关键词] 金花茶多酚; 糖尿病; 大鼠模型; 胰腺病理; 胰岛素

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)18-0089-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017180089

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170628.1610.016.html>

[网络出版时间] 2017-06-28 16:10

Protective Effect of *Camellia nitidissima* Polyphenols on Pancreas in Diabetic Rats

MA Shuo¹, PU Zhi-jun¹, ZHANG Xiao-ling¹, ZHAO Li-yun¹, XIE Ai-ze²,
ZHOU Xiao-yan¹, ZOU Deng-feng^{1*}

(1. Guilin Medical University, Guilin 541004, China; 2. The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of *Camellia nitidissima* polyphenols (CNP) on blood glucose and pancreas in type 2 diabetic rats, and explore the protective effect of CNP on pancreas. **Method:** A rat model of type 2 diabetes mellitus was established with high-glucose and high-fat diets combined with intraperitoneal injection of low-dose streptozotocin (STZ, 30 mg·kg⁻¹) for four weeks. The rats were divided into normal control group, high-fat control group, model control group, low-dose CNP group, medium-dose CNP group and high-dose CNP group. Each group was treated with CNP for 7 days, and then the fasting blood glucose (FBG) was measured by fast blood glucose meter. At the 1, 2 and 3 day after modeling, pancreas were collected, made into paraffin sections and stained by hematoxylin-eosin (HE staining). The pathological changes of pancreatic tissues were observed. Immunohistochemistry (IHC) was used to label insulin secretion and measure the positive rate of insulin. **Result:** Compared with the normal control group and the high-fat control group, the FBG of the model control group increased significantly ($P < 0.05$). Islet β cells had significant morphological changes, and islet cell

[收稿日期] 20170418(008)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81460119); 广西“2011 协同创新中心”-壮瑶药协同创新中心项目(桂 2013[20]号); 2016 年自治区级大学生创新创业训练计划项目(201610601064)

[第一作者] 马硕, 在读硕士, 从事天然药物开发与研究, Tel: 15295516573, E-mail: 503017132@qq.com

[通讯作者] * 邹登峰, 硕士, 副教授, 从事天然药物的开发与研究, Tel: 18907732411, E-mail: zdf1226@163.com

positive rate was significantly reduced ($P < 0.05$). Compared with the model control group, FBG of medium-dose and high-dose CNP groups decreased significantly ($P < 0.05$), with a certain dose dependence. Islet β cell damage was significantly reduced, and Islet cell positive rate significantly increased ($P < 0.05$). There was no significant difference between low-dose CNP group and model control group. **Conclusion:** CNP can repair pancreatic injury, promote insulin secretion, effectively reduce fasting blood glucose and improve glucose tolerance, suggesting that CNP have a dose-dependent protective effect on pancreas.

[**Key words**] *Camellia nitidissima* polyphenols (CNP); diabetes; rat model; pancreatic pathology; insulin

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 是一种常见的内分泌代谢性疾病,是由多种病因引起的慢性高血糖为特征的代谢紊乱^[1]。胰岛素分泌或作用缺陷,或者两者同时存在是引起代谢异常的主要原因,胰岛素缺乏或胰岛素受体不敏感在所有糖尿病类型中扮演着核心作用^[2]。因此,保护胰岛 β 细胞,促进胰岛素分泌,控制血糖,对治疗和预防糖尿病具有重要意义。从慢性疾病的预防和控制角度来看,药食同源的药材具有广泛的应用前景。金花茶 (*Camellia nitidissima*) 是广西特有的珍稀保护植物^[3],同时是一种很好的药食同源的药材^[4]。民间将其用于治疗高血压、痢疾、咽喉炎等疾病^[5]。临床研究证明金花茶叶降血糖胶囊有较好的辅助降血糖作用^[6],但作用成分尚不明确。金花茶多酚 (*C. nitidissima* polyphenols, CNP) 是金花茶中的主要化学成分^[7],具有抗氧化作用^[8],且研究表明植物多酚具有降血糖^[9]、降血脂^[10]等作用。但关于金花茶多酚降血糖的研究尚未明确。本实验拟采用高糖高脂饲料喂养结合腹腔注射链脲佐菌素 (STZ) 法建立 2 型糖尿病 (T2DM) 大鼠模型^[11],研究金花茶多酚对糖尿病大鼠的降血糖作用,及其对 STZ 造成糖尿病大鼠胰岛细胞的保护作用,从而初步探讨 CNP 治疗 T2DM 作用机制,为寻找治疗和预防 T2DM 的新靶点和新药物奠定基础。

1 材料

1.1 动物 清洁级雄性健康 SD 大鼠,体重 (200 ± 20) g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,合格证号 SCXK (湘) 2011-0003,在桂林医学院动物实验中心适应性喂养 1 周,实验通过桂林医学院实验动物伦理委员会 (批号 4503000057375) 审查;基础饲料、高糖高脂饲料 (蔗糖 20%,猪油 18%,蛋黄粉 3%,基础饲料 59%),购买自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。

1.2 药品及试剂 CNP 由桂林医学院天然药物化学实验室制备,纯度为 97.04%;福林酚、没食子酸

(Solarbio 公司,批号分别为 818H017,1118A021); 链脲佐菌素 (STZ,德国 Sigma 公司,批号 1122F031); 无水碳酸钠、柠檬酸、柠檬酸三钠 (西陇化工有限公司,批号分别为 150121,20151026,20151120); 戊巴比妥钠 (德国默克公司分装,批号 100402); 10% 中性甲醛,由桂林医学院第二附属医院提供; 鼠抗人胰岛素单克隆抗体 (Insulin,即用型),快捷型酶标羊抗鼠/兔 IgG 聚合物, DAB 显色试剂盒 (福州迈新试剂公司,批号分别为 1510043060,1509084070,1501012020)。

1.3 仪器 infinite M200 PRO 型光栅型连续波长酶标仪 (德国 Tecan Austria GmbH 公司); 罗氏卓越精采型血糖仪 (德国罗氏诊断有限公司); 0.22 μm 滤菌器 (德国 Millipore 公司); Arcadia 型包埋机, RM2235 型切片机, DM2000 型正置手动显微镜 (德国 Leica 公司); HH-US-A 型数控恒温水浴箱 (上海赫田科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 茶多酚纯度测定 参照 GB/T8313-2008 采用福林酚法测定茶多酚含量^[12]。于 96 孔板中加入 0.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 样品 20 μL , 7.5% 碳酸钠溶液 80 μL , 3 min 后,向混合物中加入福林酚试剂 100 μL , 室温下反应 30 min。使用酶标仪在 765 nm 测量混合物的吸光度 A。基于使用没食子酸标准溶液 (25 ~ 200 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) 的标准曲线计算总多酚含量。重复 3 次。

2.2 分组及给药 大鼠随机分为 6 组,正常组 15 只,高脂组 15 只,建模动物 80 只,随机分为模型组, CNP 低、中、高剂量组,每组各 20 只。预防性给药 7 d, 然后进行造模。其中正常组、高脂组、模型组均以蒸馏水灌胃, CNP 低、中、高剂量组以 CNP 水溶液灌胃,剂量分别为 50, 100, 200 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 且实验期间持续给药。

2.3 模型建立^[11] 高脂组及造模动物高糖高脂饲料喂养 4 周,正常组喂养基础饲料。将 STZ 溶于配制好的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (使用前配成浓度

0.1 mol·L⁻¹ pH 4.4 的无菌柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液,0.22 μm 滤菌器过滤)中,配成为 1% 的溶液(避光冰浴,现配现用),造模动物按 STZ 30 mg·kg⁻¹ 的剂量行腹腔注射;正常组及高脂组腹腔注射等体积柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液^[13-14]。1,2 d 后尾尖取血,用血糖仪测定其空腹血糖(FBG,禁食 12 h 后所测血糖),FBG ≥ 16.7 mmol·L⁻¹ 视为造模成功。

2.4 标本采集及指标检测

2.4.1 空腹血糖检测 禁食 12 h,不禁水,每组取 5 只大鼠,尾尖取血,用快速血糖仪检测 FBG。于造模前(0 d),造模后 1,2,3 d 分别检测 4 次。

2.4.2 胰腺组织形态学检查 造模后 1,2,3 d,每组各取 5 只大鼠,麻醉(2% 戊巴比妥钠腹腔注射)后,迅速摘取胰腺,用 0.9% 生理盐水洗净,经中性甲醛固定 24 h,组织脱水,石蜡包埋,切片(厚度 3 μm)。石蜡切片脱蜡水化,HE 染色,脱水风干后中性塑胶封片,光学显微镜下观察胰岛形态。低倍镜(×100)下选取具有代表性的胰岛采集图像。

2.4.3 胰岛素分泌水平测定 胰腺组织切片(厚度 3 μm),脱蜡水化,根据试剂说明书进行胰腺组织 Insulin 染色,封闭,经一抗、二抗孵育,DAB 显色,脱水风干后中性塑胶封片,光学显微镜下观察胰岛 β 细胞染色情况,正常胰腺组织的胰岛 β 细胞胞质呈阳性。每组 5 张切片,低倍镜(×100)下选取 1 个切面较大且染色具有代表性的胰岛采集图像,手动计数单个胰岛中的胰岛细胞总数(A)与单个胰岛中的阳性

细胞数(B),并计算阳性细胞率(阳性率 = B/A × 100%),以 $\bar{x} \pm s$ 表示,分析评价胰岛细胞的功能。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 18.0 统计软件。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异性判断采用 t 检验或单因素方差分析,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 茶多酚纯度 没食子酸回归方程为 Y = 1.497 5X - 0.01 (R² = 0.990 5)。样品(质量浓度 0.54 g·L⁻¹) 在 765 nm A 为 0.078 47。根据公式(1)计算,样品中茶多酚质量分数为 97.04%。

$$\text{茶多酚质量分数} = A \times V \times d / (\text{SLOPE} \times m) \times 100\% \quad (1)$$

式中 A 为样品测试液吸光度;V 为样品溶液体积;d 为稀释倍数;SLOPE 为标准曲线斜率;m 为样品称样量。

3.2 动物一般状态比较 实验期间,正常组大鼠饮食、饮水及活动等行为正常,体重持续增加。高脂饮食加腹腔注射小剂量 STZ 后,模型动物逐渐出现多饮、多尿、多食等症状,因造模后实验周期短,糖尿病大鼠无明显消瘦迹象。

3.3 CNP 对大鼠空腹血糖水平的影响 与正常组比较,高脂组 FBG 略高,但无显著性差异。模型组 1,2 d 的 FBG 持续高于 16.7 mmol·L⁻¹ 且较正常组和高脂组有显著差异(P < 0.05),视为该方法造模成功。与模型组比较,CNP 中、高剂量组 FBG 明显降低(P < 0.05),并且呈现一定程度的剂量相关性。见表 1。

表 1 CNP 对大鼠空腹血糖水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Effect of CNP on fasting blood glucose level in rats($\bar{x} \pm s, n = 5$)

mmol·L⁻¹

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	0 d	1 d	2 d	3 d
正常	-	5.52 ± 0.40	6.20 ± 0.38	5.92 ± 0.27	6.0 ± 0.24
高脂	-	6.12 ± 0.46	6.76 ± 0.46	6.90 ± 1.02	6.64 ± 0.61
模型	-	5.70 ± 0.84	18.14 ± 7.29 ¹⁾	22.02 ± 2.11 ²⁾	23.98 ± 1.23 ²⁾
CNP	50	6.84 ± 1.04	13.74 ± 3.89	17.44 ± 7.31	19.44 ± 3.88
	100	4.96 ± 0.38	11.42 ± 1.48	17.20 ± 2.29 ³⁾	17.10 ± 5.35 ³⁾
	200	5.18 ± 0.42	9.38 ± 0.73 ³⁾	14.76 ± 2.86 ⁴⁾	14.94 ± 0.85 ⁴⁾

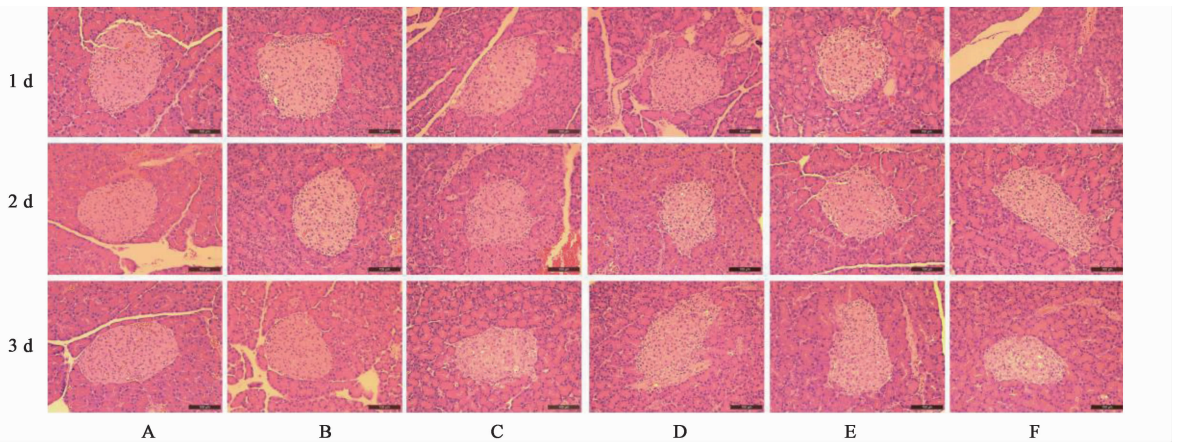
注:与正常组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01;与模型组比较³⁾ P < 0.05, ⁴⁾ P < 0.01。

3.4 CNP 对大鼠胰腺组织形态的影响 光镜下观察:正常组大鼠胰岛为近圆形的细胞团,分散于胰腺腺泡之间,边缘界限清晰整齐,数量较多,细胞分布均匀。胞浆丰富,细胞核多为椭圆形,大小均一。高脂组与正常组的胰腺组织相似。模型组胰岛数量显著下降,分布稀疏,边缘不清,胰岛细胞数量减少,松散紊乱,体积缩小,且组织损伤程度随时间加剧。与模型组相比,CNP 中、高剂量组损伤程度明显改善,

且改善情况与剂量和时间呈一定的正相关性。见图 1。

3.5 CNP 对大鼠胰岛素分泌水平的影响

3.5.1 CNP 对大鼠胰腺组织 Insulin 染色的影响 正常胰腺组织 Insulin 染色,胰岛 β 细胞胞质阳性,DAB 显色为棕黄色。正常胰岛中,胰岛 β 细胞约占胰岛细胞总数的 70%。光镜下观察,造模动物各组的胰岛均有损伤,胰岛数量减少,分布稀疏,边缘



A. 正常组; B. 高脂组; C. 模型组; D ~ F. CNP 低、中、高 ($50, 100, 200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 剂量组 (图 2 同)

图 1 CNP 对大鼠胰腺组织形态的影响 (HE, $\times 100$)

Fig. 1 Effect of CNP on morphology of pancreas in rats (HE, $\times 100$)

不清, 胰岛细胞松散紊乱, 体积缩小。与正常组比较, 造模动物各组的胰岛阳性细胞数量明显减少。

预防性给予 CNP 治疗的各组糖尿病大鼠, 阳性细胞数量较模型组有所恢复。见图 2。

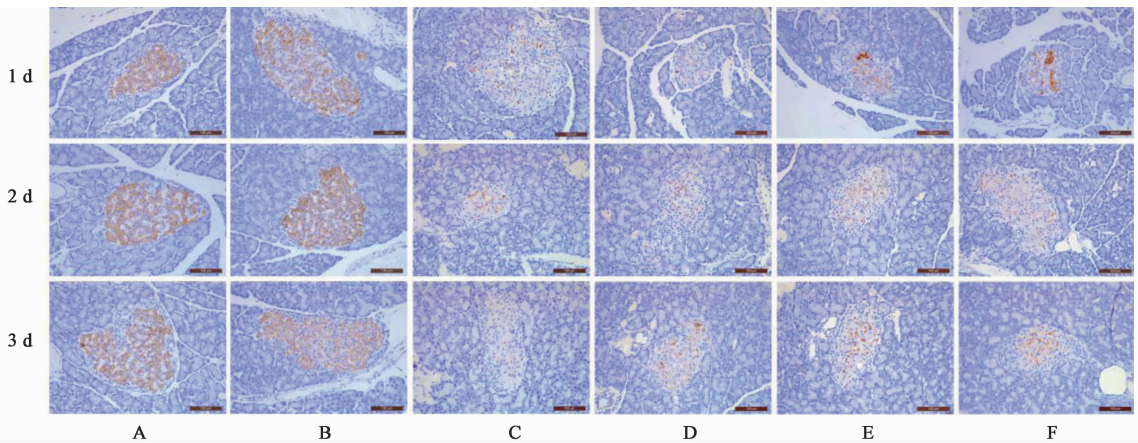


图 2 CNP 对大鼠胰腺组织 insulin 染色的影响 (免疫组化, $\times 100$)

Fig. 2 Effect of CNP on insulin staining in rat pancreas (IHC, $\times 100$)

3.5.2 CNP 对大鼠胰岛阳性细胞率的影响 与正常组和高脂组比较, 模型组免疫组化呈阳性的胰岛 β 细胞数量明显降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较, CNP 中、高剂量组胰岛素含量明显回升 ($P < 0.05$), CNP 低剂量组无明显差异。见表 2。

表 2 CNP 对大鼠胰岛阳性细胞率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Effect of CNP on islet-positive cells in rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$) %

组别	剂量 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	1 d	2 d	3 d
正常	-	67.50 \pm 2.24	65.44 \pm 3.19	68.04 \pm 1.93
高脂	-	70.90 \pm 2.25	70.04 \pm 2.84	70.30 \pm 3.38
模型	-	29.28 \pm 1.34 ¹⁾	31.96 \pm 1.93 ¹⁾	21.82 \pm 1.93 ¹⁾
CNP	50	29.44 \pm 1.39	32.56 \pm 1.36	23.30 \pm 1.40
	100	30.48 \pm 1.48	32.76 \pm 2.43	26.90 \pm 2.69 ²⁾
	200	33.12 \pm 3.18	35.38 \pm 0.89 ²⁾	27.36 \pm 1.86 ³⁾

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

4 讨论

糖尿病是由于胰岛功能减退、胰岛素抵抗等造成的代谢紊乱疾病, 以高血糖为特征, 主要与遗传、环境、生活饮食习惯等有关。STZ 是一种光谱抗生素, 可使 β 细胞功能受损、胰岛素合成减少, 引发糖尿病^[15]。高糖高脂饲料喂养结合 STZ 诱导糖尿病模型, 对机体组织毒性相对较小、使用剂量小、动物存活率高, 是一种成熟的糖尿病造模方法。实验结果表明糖尿病模型大鼠, 第 1, 2 天的空腹血糖持续高于 $16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 且基本无死亡。CNP 中、高剂量能显著性降低糖尿病大鼠空腹血糖, 呈现剂效相关性, 但依然高于正常组空腹血糖。提示 CNP 能改善糖尿病大鼠血糖, 表现出良好的降血糖作用。

研究发现, 胰岛 β 细胞功能障碍是糖尿病主要发病机制之一^[16]。胰岛素是调控机体血糖水平的

主要激素,胰岛中央区的 β 细胞是合成胰岛素的主要场所,因此胰腺组织的状态及分泌胰岛素功能对于血糖的调控至关重要^[17]。本研究显示,CNP 能有效修复 STZ 对胰岛的损伤,显著性提高胰岛素分泌水平,该趋势与血糖变化情况一致。多项研究表明,CNP 具有很强的抗氧化活性,清除自由基和还原能力与绿茶多酚相当^[18-20]。

综上所述,本研究结果显示 CNP 能通过修复胰岛损伤,促进胰岛素分泌,有效降低空腹血糖、改善葡萄糖耐受。CNP 对胰岛的保护作用,可能与其抗氧化功效有关。

[参考文献]

[1] Alam U, Asghar O, Azmi S, et al. General aspects of diabetes mellitus [J]. Handb Clin Neurol, 2014, 126 (126):211-222.

[2] Schmidt A M. Recent highlights of ATVB diabetes mellitus [J]. Ann Marie Schmidt, 2014, 34 (5): 954-958.

[3] 广西科学院广西植物研究所. 广西植物志 [M]. 南宁:广西科技出版社,1965:780-785.

[4] 黄海. 防城港金花茶研究课题成功申报国家 863 计划 [N]. 北京:中国食品安全报,2014-05-27(A03).

[5] 贺栋业,李晓宇,王丽丽,等. 金花茶化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22 (3):231-234.

[6] 冯桥,王志萍,徐奎,等. 金花茶叶降血糖胶囊辅助治疗 2 型糖尿病的临床观察 [J]. 广西中医药, 2015, 38 (5):32-33.

[7] 林华娟,秦小明,曾秋文,等. 金花茶茶花的化学成分及生理活性成分分析 [J]. 食品科技,2010 (10): 88-91.

[8] WAN C P, YU Y Y, ZHOU S R, et al. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Camellia nitidissima* Chi [J]. Asian J Chem, 2011, 23(7):2893-2898.

[9] 李新明,李群,高忠东,等. 苹果多酚及其活性单体的降血糖作用研究 [J]. 安徽农业科学,2017, 45 (2): 148-149,152.

[10] 王硕,侯小利,周小雷,等. 甜茶多酚对高脂血症大鼠的降血脂作用及其机制研究 [J]. 中国药理学杂志, 2015, 50 (20):1811-1815.

[11] Furman B L. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats [J]. Curr Protoc Pharmacol, 2015, 70 (5):1-20.

[12] 中华人民共和国卫生部. GB/T 8313-2008, 茶叶中茶多酚和儿茶素类含量的检测方法 [S]. 北京:中国标准出版社,2008.

[13] 陈欣,文武,郁正亚. 高糖高脂饲料联合小剂量链脲佐菌素制备 SD 大鼠 2 型糖尿病模型 [J]. 中国医药导刊,2015,17(7):737-738,740.

[14] 何超群,杨婷媛,王连艳,等. SD 大鼠 II 型糖尿病模型的建立与评价 [J]. 过程工程学报,2015,15(3): 501-505.

[15] Lenzen S. The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes [J]. Diabetologia, 2008, 51(2):216-226.

[16] Weir G C, Bonner-Weir S. Islet β cell mass in diabetes and how it relates to function, birth, and death [J]. Ann N Y Acad Sci, 2013, 1281 (1):92-105.

[17] Lovre D, Fonseca V. Benefits of timely basal insulin control in patients with type 2 diabetes [J]. J Diabetes Complicat, 2015,29(2):295-301

[18] 宁恩创,韦璐,秦小明,等. 金花茶多酚的抗氧化活性研究 [J]. 食品科技,2010(8):108-111.

[19] 颜栋美,姚艾东. 金花茶多酚抗氧化性能的研究 [J]. 河南工业大学学报:自然科学版, 2009, 30 (2): 42-45.

[20] 李仁菊. 广西金花茶中多酚的提取和抗氧化性能研究 [D]. 南宁:广西大学,2007.

[责任编辑 邹晓翠]