

荞麦黄酮对 2 型糖尿病胰岛素抵抗大鼠炎症因子的影响

张娜, 彭海兵, 王建行, 韩淑英*

(河北联合大学基础医学院, 河北 唐山 063000)

[摘要] **目的:**探讨荞麦黄酮(FB)对 2 型糖尿病(T2DM)大鼠糖脂代谢、胰岛素抵抗(IR)和炎症因子的影响及机制。**方法:**SD 大鼠以高脂饮食喂养联合小剂量链脲佐菌素(STZ)腹腔注射制备 T2DM 大鼠模型。将大鼠随机分为正常对照组,模型组,阳性对照组(罗格列酮 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, ig),FB 低、中、高剂量组(FB100, 200, 400 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, ig)。测定空腹血糖(FBG)、血清总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)及低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C);放免法测定血清空腹胰岛素(FINS),计算胰岛素敏感指数(ISI);酶联免疫法测定肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6(IL-6)、C-反应蛋白(CRP)。**结果:**模型组大鼠较正常对照组血清 FBG, TC, TG, LDL-C, FINS, TNF- α , IL-6, CRP 均显著升高($P < 0.01$), HDL-C 显著下降($P < 0.01$);给予 FBFL 干预后糖脂代谢各指标明显改善,炎症因子 TNF- α , IL-6, CRP 水平明显降低($P < 0.01$, $P < 0.05$),并呈一定剂量依赖性。**结论:**FB 可能通过降低血清炎症因子 TNF- α , IL-6, CRP 水平,改善 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢紊乱、胰岛素抵抗。

[关键词] 荞麦黄酮; 2 型糖尿病; 炎症因子; 胰岛素抵抗; 大鼠

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)23-0193-04

[doi] 10.11653/syjf2013230193

Effects of Flavones of Buckwheat Flower and Leaf on Inflammation Factors in Rats with Type 2 Diabetes Insulin Resistance

ZHANG Na, PENG Hai-bing, WANG Jian-xing, HAN Shu-ying*

(Department of Pharmacology, Hebei United University, Tangshan 063000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of flavones of buckwheat (FB) on blood glucose and lipids level, insulin resistance and inflammation factors in Rats with Type 2 Diabetes. **Method:** Male SD rats were fed high-fat diet after 4 weeks, then injected small dose streptozotocin (STZ) to establish animal models of type 2 diabetes. The rats were divided into 6 groups: normol group, model group, rosiglitazone group (RSg, $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, ig), low, middle and high dosage-FB group (100, 200, 400 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, ig). After 4 weeks' treatment, the levels of FBG, TC, TG, LDL-C, HDL-C, FINS, TNF- α , IL-6, CRP were detected, and insulin sensitive index (ISI) was calculated. **Result:** Compared with the normol group, levels of serum FBG, TC, TG, LDL-C, FINS, TNF- α , IL-6 and CRP in model group were increased ($P < 0.01$), but the levels of HDL-C and ISI were decreased significantly ($P < 0.01$). In FB groups, levels of FBG, TC, TG, LDL-C, FINS, TNF- α , IL-6 and CRP were reduced compared with model group ($P < 0.01$, $P < 0.05$), while HDL-C and ISI were increased in a dose-dependent manner. **Conclusion:** FB can effectively improve glucose and lipid disorders, improve insulin resistance possibly by decreasing the serum levels of inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6 and CRP of type2 diabetes mellitus rats.

[Key words] flavones of buckwheat; type2 diabetes mellitus; inflammatory cytokines; insulin resistance; rats

[收稿日期] 20130517(009)

[基金项目] 河北省自然科学基金项目(C2010001795)

[第一作者] 张娜, 硕士, 讲师, 从事糖尿病和缺血再灌注损伤的防治研究, Tel:0315-3726344, E-mail: joez_n_79@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 韩淑英, 硕士, 教授, 从事新药开发和利用研究, Tel:0315-3725870, E-mail: shuyinghan59@yahoo.com.cn

随着生活水平的日益提高,我国已成为全球糖尿病发病的第一大国。2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM), 占糖尿病患者 90% 以上, 其病因及发病机制目前尚未十分清楚, 与胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 和胰岛素分泌不足有关。目前大量研究认为糖尿病是机体的一种慢性炎症, 炎症因子与 IR 密切相关^[1-2]。因此, 抗炎治疗改善胰岛素抵抗为防治糖尿病提供新的思路和方法。我室前期大量工作表明荞麦黄酮 (flavones of buckwheat, FB) 具有抗氧化^[3]、降血脂^[4]、降血糖^[5]等多种生物学作用, 本研究进一步探讨 FB 对 T2DM 大鼠炎症因子的影响及机制。

1 材料

1.1 动物及饲料 健康雄性 SD 大鼠, SPF 级, 体重 (200 ± 10) g, 由天津市山川红实验动物科技有限公司提供, 合格证号 SCXK(津)-2009-0001。大鼠普通饲料和高脂饲料, 由北京科奥协力饲料有限公司提供, 合格证号 SCXK(京)-2009-0008。

1.2 药品与试剂 荞麦黄酮 (FB) 由荞麦花叶 (自内蒙古库伦旗) 提取得到^[4-5], 由河北联合大学药理学系提供。罗格列酮 (RSG, 葛兰素史克有限公司, 批号 20100616); 链脲佐菌素 (STZ, 美国 Sigma 公司); 胰岛素放射免疫分析试剂盒 (原子高科股份有限公司); TNF-α, IL-6, CRP ELISA 测定试剂盒 (上海蓝基生物科技有限公司); 血清总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、高密度脂蛋白 (HDL-C)、低密度脂蛋白 (LDL-C) (浙江东瓯生物工程有限公司)。

1.3 仪器 血糖检测仪及试纸 (韩国唐博士), SpectraMax190 型全波长读数仪 (美国), CheMray240 型全自动生化分析仪 (深圳雷杜公司), FT630 g 型微机多探头放免仪 (北京市核仪器厂), SIGMA-2M/ETM 型低温高速离心机 (美国)。

2 方法

2.1 模型制备、分组与给药 随机抽取 10 只 SD 大

鼠为正常对照组, 高脂饲料喂养 4 周后, 腹腔注射链脲佐菌素 (streptozocin, STZ) 30 mg·kg⁻¹, 1 周后再次注射 1 次。72 h 后测空腹血糖 ≥ 11.1 mmol·L⁻¹, 同时糖耐量 120 min 血糖值高于空腹血糖值的 20% 作为造模成功标准^[6]。造模成功的大鼠, 随机分为模型组, FB 低、中、高剂量组 (分别以 FB 100, 200, 400 mg·kg⁻¹灌胃), 阳性对照组 (以罗格列酮 1 mg·kg⁻¹灌胃), 每组各 11 只; 正常对照组和模型组以等容积生理盐水灌胃, 上述各组均每天给药 1 次, 连续 4 周。

2.2 血糖、血脂检测 末次给药后禁食不禁水 12 h, 尾静脉采血, 罗氏血糖仪测定空腹血糖水平。10% 水合氯醛麻醉后腹主动脉取血, 分离血清, 全自动生化分析仪测定血清总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、高密度脂蛋白 (HDL-C)、低密度脂蛋白 (LDL-C)。

2.3 血清胰岛素测定 采用放免分析法测定空腹胰岛素 (FINS) 水平。计算胰岛素敏感指数 (ISI), 以空腹血糖与空腹胰岛素乘积倒数的自然对数来表示, 即 $ISI = \ln(FBG \times FINS)^{-1}$ 。

2.4 血清炎症因子测定 采用酶联免疫法测定 TNF-α, IL-6, CRP, 按试剂盒说明书进行。

2.5 统计学处理 所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 11.5 软件以 One-Way ANOVA (单因素方差分析) 做统计学分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠血糖、血脂变化比较 与正常大鼠比较, 模型组大鼠 FBG, TC, TG, LDL-C 均明显升高 ($P < 0.01$), 而 HDL-C 显著降低 ($P < 0.01$), 表明模型组大鼠出现糖脂代谢紊乱; 给予 FB 及阳性药罗格列酮治疗后, FBG, TC, TG, LDL-C 均不同程度降低, HDL-C 升高, FB 高剂量组差异具有显著性, 且效果与阳性对照组相近。结果见表 1。

表 1 各组大鼠血糖、血脂含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	FBG/mmol·L ⁻¹	TC/mmol·L ⁻¹	TG/mmol·L ⁻¹	LDL-C/mmol·L ⁻¹	HDL-C/mmol·L ⁻¹
正常对照	10	-	6.32 ± 2.13	1.36 ± 0.28	0.89 ± 0.28	1.11 ± 0.20	1.54 ± 0.36
模型	11	-	18.19 ± 3.76 ²⁾	2.21 ± 0.35 ²⁾	2.07 ± 0.47 ²⁾	2.05 ± 0.37 ²⁾	0.90 ± 0.36 ²⁾
FB 低剂量	11	100	17.76 ± 4.99 ²⁾	1.92 ± 0.40 ²⁾	1.76 ± 0.45 ²⁾	1.84 ± 0.39 ²⁾	1.08 ± 0.32 ²⁾
FB 中剂量	11	200	15.85 ± 3.79 ²⁾	1.78 ± 0.33 ^{2,4)}	1.65 ± 0.37 ^{2,3)}	1.74 ± 0.36 ^{2,3)}	1.16 ± 0.37 ¹⁾
FB 高剂量	11	400	13.61 ± 2.34 ^{2,4)}	1.53 ± 0.31 ⁴⁾	1.26 ± 0.38 ^{1,4)}	1.61 ± 0.34 ^{2,4)}	1.32 ± 0.32 ^{1,4)}
阳性对照	11	1	10.78 ± 3.22 ^{2,4)}	1.50 ± 0.38 ⁴⁾	1.15 ± 0.41 ⁴⁾	1.48 ± 0.40 ^{1,4)}	1.33 ± 0.39 ⁴⁾

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

3.2 各组大鼠胰岛素和胰岛素敏感指数 模型组大鼠血清 FINS 明显升高 ($P < 0.01$), ISI 明显降低 ($P < 0.01$), 提示模型组大鼠出现胰岛素抵抗。给予 FB 干预后, FINS 有不同程度降低, 且呈一定剂量依赖性(低、中剂量组差异不显著, 高剂量组差异具有显著性 $P < 0.01$); ISI 不同程度升高(FB 中剂量组 $P < 0.05$, 高剂量组 $P < 0.01$)。结果见表 2。

3.3 各组大鼠细胞炎性因子变化比较 模型组大鼠血清 TNF- α , IL-6, CRP 水平明显高于正常大鼠 ($P < 0.01$); 与模型组比较, FB 组各炎症因子水平均不同程度降低, 并呈一定剂量依赖性, 其中以高剂量 FB 与阳性对照药罗格列酮治疗效果显著 ($P < 0.01$)。结果见表 3。

表 2 各组大鼠胰岛素和胰岛素敏感指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 /mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	FINS /μmol·L ⁻¹	ISI
正常对照	10	-	14.47 ± 4.23	-4.43 ± 0.45
模型	11	-	23.85 ± 5.22 ²⁾	-6.03 ± 0.35 ²⁾
FB 低剂量	11	100	20.13 ± 4.47 ¹⁾	-5.82 ± 0.26 ²⁾
FB 中剂量	11	200	19.52 ± 5.40 ¹⁾	-5.67 ± 0.38 ^{2,3)}
FB 高剂量	11	400	17.92 ± 5.27 ⁴⁾	-5.45 ± 0.24 ^{2,4)}
阳性对照	11	1	17.66 ± 5.99 ⁴⁾	-5.16 ± 0.28 ^{2,4)}

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

表 3 各组大鼠细胞炎性因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	TNF- α /nmol·mL ⁻¹	IL-6/mg·L ⁻¹	CRP/μg·mL ⁻¹
正常对照	10	-	1.07 ± 0.26	116.45 ± 36.68	4.05 ± 0.62
模型	11	-	2.11 ± 0.55 ²⁾	234.98 ± 42.84 ²⁾	5.84 ± 0.77 ²⁾
FB 低剂量	11	100	1.91 ± 0.59 ²⁾	200.36 ± 43.67 ²⁾	5.43 ± 0.49 ²⁾
FB 中剂量	11	200	1.73 ± 0.56 ²⁾	177.85 ± 42.75 ^{2,4)}	4.83 ± 0.45 ^{2,4)}
FB 高剂量	11	400	1.48 ± 0.39 ⁴⁾	160.32 ± 43.12 ^{1,4)}	4.38 ± 0.76 ⁴⁾
阳性对照	11	1	1.18 ± 0.47 ⁴⁾	139.98 ± 53.64 ⁴⁾	4.37 ± 0.79 ⁴⁾

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

4 讨论

2型糖尿病是一种糖脂代谢性疾病,是环境因素和遗传因素共同作用的结果,其病因及发病机制尚未完全清楚。糖脂代谢紊乱、胰岛素抵抗贯穿于T2DM的发病过程^[7-8]。近年来,炎症学说在糖尿病发病机制的研究中备受关注,认为炎症因子是IR的重要致病因素^[2,9]。国内外大量临床及实验研究发现, TNF- α , IL-6, CRP、瘦素、抵抗素等炎症标志物及细胞因子与IR密切相关^[10-12]。

本实验以高脂饮食喂养联合小剂量链脲佐菌素腹腔注射后,大鼠出现明显的糖脂代谢紊乱、高胰岛素血症和胰岛素抵抗,成功制备了大鼠T2DM模型。实验结果显示,模型组大鼠血清CRP, TNF- α , IL-6水平明显高于正常大鼠,表明炎症反应参与了T2DM胰岛素抵抗的发生发展。CRP是机体受到损伤或炎症刺激后由肝脏产生的一种急性期蛋白,参与多种炎症反应过程,是反映机体慢性炎症反应的敏感标志物。疾病状态下,CRP可引起脂肪组织分泌的多种细胞因子和激素(如,IL-1, IL-6),抑制胰岛素信号转导,导致IR。IL-6, TNF- α 是细胞因子网络中的重要成员,均可通过多种途径或者协同其他细胞因子共同作用,参与IR的发生和发展:降低胰岛素受体底物(IRS)-1酪氨酸磷酸化程度,抑制胰岛素信号转导,导致IR;下调葡萄糖转运子4(GLUT4),抑制胰岛素刺激的葡萄糖转运,直接参

与IR;影响脂代谢,间接影响IR。

抗炎治疗降低炎症因子水平改善IR为T2DM的治疗提供了一个新方向。Huvers等^[10]报道,给予TNF- α 阻断治疗的患者炎症反应减轻,IR得到明显改善。国内许多学者对中药抗炎治疗糖尿病做了大量研究,李彩蓉等^[12]报道何首乌的活性成分二苯乙烯苷对糖尿病大鼠具有保护作用,其机制可能与其调节血脂、抗氧化和抗炎作用有关。张永鹏等^[13]的研究表明糖平煎可以改善T2DM大鼠的炎症反应,改善胰岛素抵抗。本实验中FB由荞麦花叶提取得到。荞麦为蓼科一年生宿根性植物,其花叶提取物主要为黄酮类化合物,前期工作表明荞麦花叶提取物具有抗氧化,影响血管活性,降血脂等多种作用^[3-5]。给予模型大鼠FB干预后,明显改善糖脂代谢紊乱和胰岛素抵抗,且呈一定剂量依赖性。其机制可能与FB降低TNF- α , IL-6, CRP等炎症因子水平有关,进而影响胰岛素信号转导,葡萄糖转运以及脂代谢过程,改善IR。研究结果表明FB具有减轻炎症反应,降糖降脂,改善胰岛素抵抗的作用,且呈一定剂量依赖性。

[参考文献]

- [1] 肖燕爽,李巧云,谢远芳. 2型糖尿病胰岛素抵抗与炎症相关因子的研究[J]. 实用糖尿病杂志, 2012, 8(1):11.
- [2] 张豫文,洪洁. 炎症因子与胰岛素抵抗[J]. 诊断学理论与实践, 2010, 9(1):90.

苦参碱抑制神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞增殖作用研究

高晓红¹,徐伟²,李文杰³,马汉伟⁴,白银亮^{1*}

(1. 兰州大学第二医院药学部,兰州 730030; 2. 兰州大学第二医院神经外科,兰州 730030;
3. 郑州大学药学院,郑州 450001; 4. 兰州大学第二医院小儿内科,兰州 730030)

[摘要] 目的:观察苦参碱对人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞增殖的影响,并探讨其作用机制。方法:取对数生长期 SK-N-SH 细胞,用磺酰罗丹明 B(SRB)法检测苦参碱(0.5,1.0,2.0 g·L⁻¹)作用 24,48,72 h 后 SK-N-SH 细胞的增殖抑制率,流式细胞仪检测细胞凋亡率和细胞周期,Western blot 检测半胱天冬氨酸蛋白酶(Caspase)-9 和 Caspase-3 蛋白的表达。结果:苦参碱对 SK-N-SH 细胞增殖具有明显抑制作用,且表现出剂量和时间依赖性。0.5,1.0,2.0 g·L⁻¹ 苦参碱作用 24,48,72 h 后 SK-N-SH 细胞的抑制率分别为(19.06±3.17)%,(30.18±3.02)%,(38.55±6.12)%;(45.12±4.02)%,(60.45±5.51)%,(71.38±7.91)%;(58.91±4.36)%,(73.44±8.17)%,(88.37±4.57)%。流式细胞仪检测对照组及各浓度组凋亡率分别为(2.45±0.49)%,(12.56±2.21)%,(19.44±4.32)%,(30.12±3.35)%,与对照组比较,苦参碱组的凋亡率均显著性增高(P<0.001);细胞周期结果显示苦参碱作用 SK-N-SH 细胞 48 h 后 G₀/G₁ 期细胞明显增多(P<0.01),S 期细胞明显减少(P<0.01)。苦参碱可显著上调 Caspase-9 和 Caspase-3 蛋白表达(P<0.01,P<0.01)。结论:苦参碱对神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞的增殖具有抑制作用,这种作用与其阻滞细胞周期和激活 Caspase-9 和 Caspase-3 表达进而诱导产生细胞凋亡有关。

[关键词] 苦参碱;人神经母细胞瘤;凋亡;半胱天冬氨酸蛋白酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)23-0196-04

[doi] 10.11653/syfy2013230196

[收稿日期] 20130706(005)

[基金项目] 中央高校基本科研业务费专项项目(lzujby-2013-46)

[第一作者] 高晓红,副主任医师,从事中药药理学研究,Tel:0931-8942355,E-mail:gxhong0616@163.com

[通讯作者] * 白银亮,Tel:0931-8942491,E-mail:lzuby1@163.com

- [3] Li-Sha Zhu, Xin-Chao Ma, Shu-Ying Han, et al. Effect of total flavones of buckwheat leaf on blood lipid and lipid peroxides [J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation, 2004, 8(25): 5178.
- [4] 韩淑英,王志路,储金秀,等. 荞麦花叶黄酮对 2 型糖尿病大鼠胰岛抵抗及肝组织 PTP1B 的影响[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(23): 3114.
- [5] 白静,姜妍,韩婷,等. 荞麦花叶黄酮对 2 型糖尿病 C₅₇ 小鼠糖脂代谢及胰岛素抵抗的影响[J]. 广东医学, 2012, 33(13): 1876.
- [6] 李才. 人类疾病动物模型的复制[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 345.
- [7] Pedrini M, Massuda R, Fries G R, et al. Stress, inflammatory markers and factors associated in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. J Psychiatr Res, 2012, 46(6): 819.
- [8] 周才杰,黄鸣清,陈长青,等. 丹酚酸 B 改善 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢及胰岛素抵抗的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(13): 233.
- [9] Alice P S Kong, Kai-Chow Choi, Gary TC Ko, et al. Associations of overweight with insulin resistance, β -cell function and inflammatory markers in Chinese adolescents[J]. Pediatric Diabetes, 2008, 9(5): 488.
- [10] Frank C Huvers, Calin Popa, Mihai G Netea, et al. Improved insulin sensitivity by anti-TNF α antibody treatment in patients with rheumatic diseases[J]. Ann Rheum Dis, 2007, 66(4): 558.
- [11] Krane V, Winkler K, Drechsler C, et al. Association of LDL cholesterol and inflammation with cardiovascular events and mortality in hemodialysis patients with type 2 diabetes mellitus [J]. Am J Kidney Dis, 2009, 54(5): 902.
- [12] 李彩蓉,蔡飞,黎荣,等. 二苯乙烯苷对糖尿病大鼠肾小球系膜细胞增殖及分泌炎症因子的影响[J]. 中药药理与临床, 2010, 26(2): 13.
- [13] 张永鹏,刘静,靳国印,等. 糖平煎对 2 型糖尿病大鼠炎症细胞因子的干预作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21): 235.

[责任编辑 顾雪竹]