

葛根素、齐墩果酸及其配伍 对 T2DM 大鼠氧化应激和炎症反应的影响

王会敏¹, 田炜¹, 喇孝瑾¹, 高秀娟¹, 韩婷¹, 王亚¹, 田震亚¹, Hegyi Gabriella², 陈震³, 李继安^{1*}

(1. 河北联合大学, 河北 唐山 063000; 2. 匈牙利佩奇大学, 佩奇 999024;

3. 匈牙利东方国药集团, 佩奇 999024)

[摘要] **目的:** 观察葛根素、齐墩果酸及其配伍对 2 型糖尿病大鼠血糖、血脂、血清超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、糖基化终末产物(AGEs)、超敏 C 反应蛋白(hs-CRP)及胰腺病理组织学的影响。**方法:** 以高糖、高脂饮食联合链脲佐菌素(30 mg·kg⁻¹)ip 法建立 2 型糖尿病大鼠模型, 随机分为模型(M)组、二甲双胍(D)组(100 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、葛根素(P)组(30 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、齐墩果酸(OA)组(10 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、葛根素 + 齐墩果酸(POA)组(40 mg·kg⁻¹·d⁻¹), 同期设正常对照组(K)。各治疗组分别 ig 给予相应药物治疗。治疗前及治疗 2, 4, 6 周分别测定各组大鼠空腹血糖(FBG)及餐后 2 h 血糖(P2hPG), 并于给药 6 周后, 测定大鼠总胆固醇(CHOL)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C), hs-CRP, 血清 SOD, MDA, AGEs 水平, 光镜下观察胰腺病理组织学变化。**结果:** M 组大鼠 FBG, P2hPG, CHOL, TG, LDL-C, hs-CRP, MDA, AGEs 较 K 组升高, HDL-C 和血清 SOD 水平明显下降, 有统计学差异, 对胰腺胰岛细胞有一定损伤。各治疗组大鼠 FBG, P2hPG, CHOL, TG, LDL-C, hs-CRP, MDA, AGEs 较 M 组降低, HDL-C 和血清 SOD 水平增加, 对胰腺胰岛细胞损伤有不同程度改善。POA 组 LDL-C 水平较 P 组、OA 组降低明显($P < 0.05$), 对胰腺胰岛细胞损伤明显改善。**结论:** 葛根素、齐墩果酸及其配伍可改善实验性 2 型糖尿病大鼠的糖、脂代谢, 其作用机制可能与抗氧化、抑制炎症反应有关。其中葛根素配伍齐墩果酸在降低 LDL-C 水平、改善胰岛细胞结构方面优于单纯葛根素、齐墩果酸。

[关键词] 2 型糖尿病; 葛根素; 齐墩果酸; 炎症反应; 氧化应激; 血糖; 血脂

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0174-04

[doi] 10.11653/syfy2013150174

Regulation of Puerarin and Oleanolic Acid on Antioxidant Activity and Suppressing Inflammatory Reaction in Rats with Type 2 Diabetes Mellitus

WANG Hui-min¹, TIAN Wei¹, LA Xiao-jin¹, GAO Xiu-juan¹, HAN Ting¹, WANG Ya¹,

TIAN Zhen-ya¹, Hegyi Gabriella², CHEN Zhen³, LI Ji-an^{1*}

(1. Hebei United University, Tangshan 063000, China;

2. Hungary University of Pécs, Budapest 999024, Hungary;

3. Hungary Oriental Traditional Chinese Medicine Group, Budapest 999024, Hungary)

[Abstract] **Objective:** To observe effects of puerarin and oleanolic acid on blood glucose, blood lipid, superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), advanced glycation end products (AGEs), serum hypersensitive C-reactive protein (hs-CRP) and pancreatic histopathology in rats with type 2 diabetes mellitus (T2DM), and to approach their pharmacological mechanism. **Method:** T2DM rats induced by high calories diet and intraperitoneal injection of streptozotacin (STZ) were randomly divided into five groups: diabetes mellitus (M) group, melbine (D) group, puerarin (P) group, oleanolic acid group (OA) and puerarin with oleanolic

[收稿日期] 20121130(011)

[基金项目] 科技部 2011-2012 年度中国与匈牙利政府间科技合作项目(2010-5-8); 唐山市科技局项目(08360202A-8)

[第一作者] 王会敏, 硕士研究生, 从事中医药治疗代谢性疾病研究, Tel:13731511742, E-mail:wanghuimin-84@163.com

[通讯作者] * 李继安, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 从事中医药治疗代谢性疾病研究, Tel:0315-3726292, E-mail:lnyy@vip.sina.com

acid (POA) group. Fasting blood glucose (FBG) and 2-hour postprandial blood glucose (P2hPG) of rats in each group were measured before treatment and after 2, 4, 6 weeks of administration. After 6 weeks, blood samples were collected for measurement on blood glucose, as well as following indexes, cholesterol (CHOL), triglyceride (TG), HDL-cholesterol (HDL-C), LDL-cholesterol (LDL-C), hs-CRP, SOD, MDA and AGEs. Pathological changes were observed under light microscope by HE staining. **Result:** All indexes were inhibited to certain degrees in every treatment group except HDL-C and SOD. The level of LDL-C in POA group decreased more significantly than that in the P group and OA group ($P < 0.05$), meanwhile, the injury pancreas tissue was improved significantly. **Conclusion:** The puerarin and oleanolic acid could markedly improve glucose and lipid metabolism in experimental type 2 diabetic rats. It may prove that puerarin with oleanolic acid can relieve the degree of oxidative stress reaction through antioxidant activity and suppressing inflammatory reaction. In terms of decreased LDL-C and improvement of the structure of islet cells, the effects in POA group are more stronger than those in P and OA group.

[**Key words**] type 2 diabetes mellitus; puerarin; oleanolic acid; inflammatory reaction; oxidative stress; blood glucose; blood lipid

有研究表明,炎症反应与氧化应激是胰岛素抵抗、胰岛 β 细胞损伤引发糖尿病的重要因素^[1-2]。并且长期糖代谢异常,又可造成糖基化终产物(AGEs)增加,AGEs通过与其受体结合,可促进活性氧(ROS)形成;超氧化物歧化酶(SOD)等抗氧化酶糖基化,进一步削弱机体清除自由基的能力,进而加重氧化应激及炎症反应^[3]。近年来,中药单体成分抗炎、抗氧化应激治疗糖尿病研究报道越来越多,但是,将作用趋同并各具有药理特性的两种以上单体成分配伍研究还比较少见。本实验通过葛根素、齐墩果酸及其配伍干预 2 型糖尿病(T2DM)大鼠,分别观察其对血糖、血脂、血清 SOD、丙二醛(MDA)、AGEs、超敏 C 反应蛋白(hs-CRP)及胰腺组织结构的影响,初步探讨其各自的药理作用及配伍的协同效应,为临床应用提供依据。

1 材料

1.1 动物 选取 SPF 级健康雄性 SD 大鼠 70 只,体重(200 ± 10)g,从天津市山川红实验动物科技有限公司采购,许可证号 SCXK(津)2009-0001。

1.2 药物与试剂 葛根素(广州白云山天心制药股份有限公司,批号 H20043061),齐墩果酸(上海抚生实业有限公司,批号 110709-200505),二甲双胍(北京悦康药业有限公司,批号 1005023),链脲佐菌素(STZ)(美国 Sigma 公司,批号 CAS#18883-66-4),丙二醛(MDA,批号 201111)、超氧化物歧化酶(SOD,批号 201111)、糖基化终末产物(AGEs,批号 201111)试剂盒,均购自上海信然生物技术有限公司。

1.3 仪器 YP1200 电子天平(上海第二天平工厂),唐博士 2300 型血糖仪及配套试纸(All Medicus

有限公司),CTX 型全自动生化分析仪(美国 Beckman 公司),Infinite 200 PRO 酶标仪(Tecan Austria GmbH)。

2 方法

2.1 造模、分组及给药 SPF 级健康雄性 SD 大鼠 70 只,适应性饲养 1 周后,随机选取 10 只作为正常(K)组,其余 60 只为造模组,高脂饲料喂养 6 周后,正常组大鼠隔日分 2 次 ip 等量 0.1 mol·L⁻¹ pH 4.5 的柠檬酸缓冲液,造模组隔日分 2 次 ip STZ 30 mg·kg⁻¹(STZ 溶于 0.1 mol·L⁻¹ 柠檬酸缓冲液中 pH 4.5),并继续给予高脂饲料 2 周,禁食 8 h 后测定空腹血糖(FBG),以 FPG ≥ 11.1 mmol·L⁻¹ 为 2 型糖尿病大鼠模型^[4],造模成功的 53 只,去除 FPG ≥ 30.0 mmol·L⁻¹ 大鼠 3 只。将造模成功的 50 只糖尿病大鼠纳入实验,再随机分为 5 组,即模型组 10 只(ig 等体积的纯净水)、二甲双胍(ig 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹)组 10 只、葛根素(ig 30 mg·kg⁻¹·d⁻¹)组 10 只、齐墩果酸(ig 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹)组 10 只、葛根素 + 齐墩果酸(ig 齐墩果酸 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹ + 葛根素 30 mg·kg⁻¹·d⁻¹)组 10 只,正常组 ig 同体积的纯净水,连续给药 6 周。

2.2 标本采集与指标检测 各组大鼠分别于给药前、给药后 2,4,6 周测定 FBG,P2 hPG,(空腹 8 h 后 ig 50% 葡萄糖 10 mL·kg⁻¹),实验结束禁食 8 h 后麻醉从腹主动脉取血,分离血清,然后处死取其胰腺组织。用全自动生化分析仪测定 CHOL,TG,HDL-C,LDL-C,hs-CRP,采用酶联免疫反应试验(ELISA)法测定 SOD 活性及 MDA,AGEs 水平,用 HE 染色法观察各组大鼠胰腺组织的病理学变化。

2.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 分析软件,实验

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多个样本均数比较采用单因素方差分析方法,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

3 结果

3.1 各组大鼠血糖,血脂和 hs-CRP 的水平 给药前模型组及各用药组 FBG, P2hPG 明显升高,与正常组比较有显著差异 ($P < 0.01$);治疗 2,4 周后模型组大鼠血糖未见明显降低,但各治疗组大鼠血糖呈下降趋势;治疗 6 周后模型组大鼠血糖水平仍然较高,并

且其 CHOL, TG, LDL-C, hs-CRP 水平显著升高, HDL-C 水平降低,与正常组比较差异显著 ($P < 0.05$);葛根素组、齐墩果酸组、葛根素 + 齐墩果酸组、二甲双胍组给药 6 周后,其 FBG, P2hPG, CHOL, TG, LDL-C, hs-CRP 水平较模型组显著降低 ($P < 0.05$), HDL-C 水平显著升高 ($P < 0.05$);其中葛根素 + 齐墩果酸组 LDL-C 水平较葛根素组、齐墩果酸组降低明显 ($P < 0.05$)。见表 1~3。

表 1 葛根素、齐墩果酸及其配伍对 T2DM 大鼠给药前、给药后 2,4,6 周空腹血糖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

mmol·L⁻¹

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	给药前	给药后 2 周	给药后 4 周	给药后 6 周
正常	-	4.61 ± 0.87	4.71 ± 0.42	4.18 ± 0.33	4.2 ± 0.37
模型	-	15.88 ± 2.33 ²⁾	15.68 ± 2.01 ²⁾	15.39 ± 2.28 ²⁾	15.35 ± 2.65 ²⁾
二甲双胍	100	16.76 ± 3.43 ²⁾	13.74 ± 2.11 ²⁾	13.01 ± 2.44 ^{2,3)}	12.38 ± 3.02 ^{2,3)}
葛根素	30	14.35 ± 1.78 ²⁾	13.95 ± 3.61 ²⁾	12.84 ± 2.74 ^{2,3)}	12.77 ± 1.60 ^{2,3)}
齐墩果酸	10	15.23 ± 2.52 ²⁾	13.91 ± 2.65 ²⁾	12.93 ± 1.81 ^{2,3)}	11.54 ± 3.87 ^{2,3)}
齐墩果酸 + 葛根素	10 + 30	15.21 ± 1.78 ²⁾	13.99 ± 2.85 ²⁾	13.31 ± 2.30 ^{2,3)}	12.04 ± 5.04 ^{2,3)}

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⁾ $P < 0.01$;与二甲双胍组比较⁵⁾ $P < 0.05$ (表 2~4 同)。

表 2 葛根素、齐墩果酸及其配伍对 T2DM 大鼠给药前、给药后 2,4,6 周餐后 2 h 血糖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

mmol·L⁻¹

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	给药前	给药后 2 周	给药后 4 周	给药后 6 周
正常	-	6.81 ± 0.65	6.97 ± 2.03	5.87 ± 1.11	5.91 ± 0.79
模型	-	21.82 ± 3.91 ²⁾	20.94 ± 3.06 ²⁾	20.56 ± 3.49 ²⁾	18.96 ± 4.26 ²⁾
二甲双胍	100	20.23 ± 3.04 ²⁾	18.23 ± 2.89 ^{2,3)}	16.98 ± 3.16 ^{2,3)}	14.05 ± 4.02 ^{2,3)}
葛根素	30	21.00 ± 1.98 ²⁾	18.61 ± 1.82 ²⁾	17.53 ± 3.46 ^{2,3)}	15.02 ± 3.87 ^{2,3)}
齐墩果酸	10	20.84 ± 3.20 ²⁾	19.01 ± 2.59 ²⁾	16.94 ± 2.48 ^{2,3)}	14.95 ± 4.16 ^{2,3)}
齐墩果酸 + 葛根素	10 + 30	18.91 ± 5.84 ²⁾	18.45 ± 2.21 ²⁾	17.54 ± 2.50 ^{2,3)}	15.01 ± 3.23 ^{2,3)}

表 3 葛根素、齐墩果酸及其配伍对 T2DM 大鼠干预 6 周后血脂及超敏 C 反应蛋白的含量变化 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	CHOL /mmol·L ⁻¹	TG /mmol·L ⁻¹	LDL-C /mmol·L ⁻¹	HDL-C /mmol·L ⁻¹	hs-CRP /mg·L ⁻¹
正常	-	1.02 ± 0.33	0.67 ± 0.16	0.30 ± 0.13	0.12 ± 0.04	0.09 ± 0.04
模型	-	1.69 ± 0.26	0.94 ± 0.41 ²⁾	0.51 ± 0.11 ²⁾	0.05 ± 0.02 ²⁾	0.15 ± 0.01 ²⁾
二甲双胍	100	0.58 ± 0.11 ^{2,3)}	0.28 ± 0.06 ^{2,3)}	0.19 ± 0.07 ^{1,3)}	0.08 ± 0.03 ³⁾	0.12 ± 0.02 ^{1,3)}
葛根素	30	0.58 ± 0.22 ^{2,3)}	0.31 ± 0.11 ^{2,3)}	0.31 ± 0.06 ^{3,5)}	0.09 ± 0.03 ³⁾	0.09 ± 0.03 ^{1,3,5)}
齐墩果酸	10	0.75 ± 0.28 ³⁾	0.45 ± 0.13 ^{1,3)}	0.31 ± 0.09 ^{3,5)}	0.09 ± 0.04 ³⁾	0.11 ± 0.02 ^{1,3)}
齐墩果酸 + 葛根素	10 + 30	0.81 ± 0.29 ³⁾	0.48 ± 0.21 ^{3,5)}	0.23 ± 0.05 ³⁾	0.09 ± 0.02 ³⁾	0.09 ± 0.04 ^{1,3,5)}

3.2 各组大鼠血清中 SOD, MDA, AGEs 实验 6 周后,模型组大鼠与正常组比较,其血清中 SOD 活性明显下降 ($P < 0.05$), MDA, AGEs 含量明显增加 ($P < 0.05$);二甲双胍组、葛根素组、齐墩果酸组、葛根素 + 齐墩果酸组与模型组比较, SOD 水平显著升高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), MDA, AGEs 水平显著降低 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 各用药组之间比较差异无

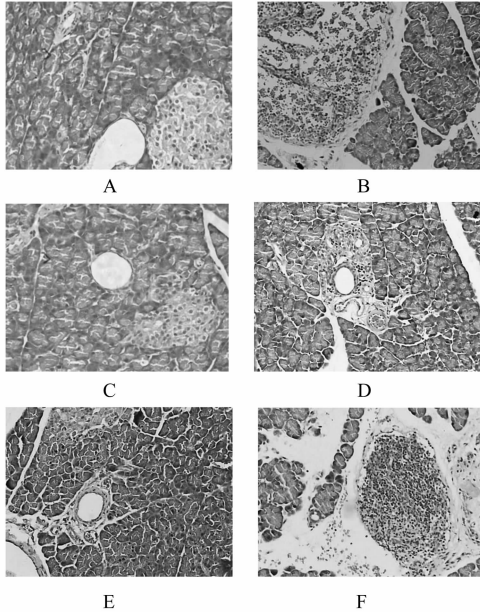
统计学意义。见表 4。

3.3 干预 6 周后各组大鼠胰腺组织病理形态学的改变 光镜下观察正常组大鼠胰岛及胰腺腺泡结构完整,胰岛细胞排列规整,边界清晰。模型组大鼠胰岛细胞排列较乱,胰岛数目明显减少,胰岛周围有炎症细胞浸润,胰岛小叶明显萎缩,边界不齐,胰岛细胞胞质肿胀、胞核缩小。二甲双胍组大鼠胰岛小

表 4 葛根素、齐墩果酸及其配伍对 T2DM 大鼠干预 6 周后血清中 SOD,AGEs,MDA 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	SOD/U·mL ⁻¹	AGEs/ng·mL ⁻¹	MDA/nmol·L ⁻¹
正常	-	20.82 ± 1.56	15.75 ± 1.26	14.36 ± 1.84
模型	-	18.40 ± 2.28 ^{1,5)}	17.16 ± 0.78 ^{2,5)}	16.80 ± 1.32 ^{2,5)}
二甲双胍	100	21.87 ± 3.42 ³⁾	16.35 ± 0.77 ³⁾	14.92 ± 1.61 ³⁾
葛根素	30	24.22 ± 1.81 ^{2,3)}	15.66 ± 0.39 ³⁾	14.30 ± 2.17 ³⁾
齐墩果酸	10	20.86 ± 2.17 ³⁾	15.97 ± 0.39 ³⁾	14.07 ± 1.04 ³⁾
齐墩果酸 + 葛根素	10 + 30	22.35 ± 1.06 ³⁾	16.09 ± 0.63 ³⁾	14.46 ± 1.53 ³⁾

叶边界清楚,细胞形态较好,胰岛细胞核、细胞质较清晰,少有空泡变。葛根素组、齐墩果酸组大鼠:胰岛边界清晰,胰岛小叶间有血管扩张、少量红细胞渗出和少量炎性细胞浸润。葛根素 + 齐墩果酸组大鼠:胰岛细胞结构完整,胰岛边界较清晰,细胞数量较模型组增加,无明显肿胀、坏死,无核固缩现象,接近正常胰岛结构。见图 1。



A. 正常对照组;B. 模型组;C. 二甲双胍 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹组;
D. 葛根素 30 mg·kg⁻¹·d⁻¹组;E. 齐墩果酸 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹组;
F. 齐墩果酸 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹ + 葛根素 30 mg·kg⁻¹·d⁻¹组

图 1 各组大鼠胰腺病理形态学变化(HE 染色, ×400)

4 讨论

氧化应激及炎症反应参与了糖尿病及其并发症的发生和发展^[5]。现代药理研究证明,葛根素、齐墩果酸在改善糖、脂代谢,抗炎、抗氧化应激方面作用趋同^[6-7],并且葛根素还可保护血管内皮、非内皮依赖性舒张血管、预防糖尿病血管并发症等作用^[8-9];齐墩果酸还可保护胰腺 β 细胞,刺激胰岛素分泌和抑制 α-葡萄糖苷酶的活性^[10]。能否通过两种单体成分配伍发挥更好的改善糖、脂代谢是我们

所关注的焦点。本实验通过葛根素、齐墩果酸及其配伍对 2 型糖尿病大鼠进行干预,研究结果进一步提示,氧化应激及炎症反应为 2 型糖尿病发生、发展的重要因素,葛根素、齐墩果酸在降糖、调脂、抑制炎症反应、抗氧化及胰岛细胞保护方面均各自发挥了效应,二者配伍在降低 LDL-C 和减轻胰岛细胞损害方面显示了一定的协同作用,但在降糖、抑制炎症反应、抗氧化等其他方面未显示出配伍的优越性,尚需做进一步研究探讨其原因所在。

[参考文献]

- [1] Bloch-Damti A, Bashan N. Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2005, 7(11/12):1553.
- [2] Herbert Tilg, Alexander R Moschen. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance [J]. *Mol Med*, 2008, 14(3/4):222.
- [3] Jeong K H, Lee T W, Ihm C G, et al. Effects of sildenafil on oxidative and inflammatory injuries of the kidney in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Am J Nephrol*, 2009, 29:274.
- [4] 刘玥,谢鸣,张业. 2 型糖尿病胰岛素抵抗大鼠模型中医外观表征的变化 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(14):127.
- [5] 李步满,高彦彬,吴丽丽,等. 糖脂平对 2 型糖尿病大鼠糖、脂毒性及胰腺组织氧化应激的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(14):139.
- [6] 张明发,沈雅琴. 齐墩果酸和熊果酸的抗炎及其抗变态反应 [J]. *抗感染药学*, 2011, 8(4):235.
- [7] 谭业克,晋红梅. 葛根素对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的抗氧化作用及对部分生化指标的影响 [J]. *现代检验医学杂志*, 2008, 23(3):63.
- [8] 朱慧渊. 川芎嗪与葛根素配伍对脑缺血损伤大鼠脑组织内 NGF 水平的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(15):218.
- [9] 徐轶尔,李秋红,杨菲菲. 中药葛根的药理药效研究 [J]. *吉林中医药*, 2010, 30(11):993.
- [10] 周志勇,袁丁. 齐墩果酸药理作用研究进展 [J]. *中国医院药学杂志*, 2008, 28(23):2031.

[责任编辑 聂淑琴]