

桑叶总黄酮对 2 型糖尿病大鼠胰岛 β 细胞的影响

穆晓燕¹, 李先佳^{2*}

(1. 漯河医学高等专科学校第二附属医院, 河南 漯河 462300;
2. 漯河医学高等专科学校, 河南 漯河 462002)

[摘要] **目的:**探讨桑叶总黄酮对 2 型糖尿病 (T2DM) 大鼠胰岛 β 细胞抗氧化作用及分子机制。**方法:**采用腹腔注射链脲佐菌素 (STZ, $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 建立 2 型糖尿病动物模型。造模后随机分成模型组、桑叶总黄酮治疗组和罗格列酮组,另取正常大鼠作为对照组,桑叶黄酮低、中、高剂量组和罗格列酮组分别 ig 给药 50, 100, 150, $1.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 模型组和正常对照组灌服相同体积的蒸馏水,连续 5 周后测定大鼠空腹血糖 (FBG)、空腹胰岛素 (FINS) 水平和胰腺组织中超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 含量。免疫组化法检测 Bcl-2, Bax 蛋白的表达,末端脱氧核糖核酸缺口标记法 (TUNEL) 加免疫组化法测定胰岛 β 细胞凋亡率。**结果:**桑叶总黄酮能明显降低胰腺组织 MDA, 提高 SOD, GSH-Px ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 上调抗凋亡基因 Bcl-2 表达, 下调促凋亡基因 Bax 表达 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 降低胰岛细胞凋亡率 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 并能降低 FBG, FINS 和胰岛素抵抗指数 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 以 $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 最为明显。**结论:**桑叶总黄酮能改善 T2DM 大鼠胰岛素抵抗, 增强机体的抗氧化能力, 缓解胰岛 β 细胞凋亡的发生。

[关键词] 桑叶总黄酮; 2 型糖尿病; 胰岛 β 细胞; 氧化损伤; 细胞凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0213-04

[doi] 10.11653/syjf2013110213

Influence of Mori Folium Total Flavonoid on β -cells in Rats with Type-2 Diabetic Mellitus

MU Xiao-yan¹, LI Xian-jia^{2*}

(1. Second Affiliated Hospital of Luohe Medical College, Luohe 462300, China;
2. Luohe Medical College, Luohe 462002, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of Mori Folium total flavonoid (MFTF) on β -cells in rats with type-2 diabetic mellitus (T2DM). **Method:** The rat T2DM model was replicated by streptozotocin (STZ, $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ body weight) injection, the modeling rats were randomly divided into five group, the model group, the MFTF ($50, 100, 150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) groups and rosiglitazone ($1.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) group. 10 normal rats were taken control group. The treatment groups were orally administered once per day, model group was orally administered with distilled water. After treatment for 5 week, fasting blood glucose (FBG) and insulin (FINS) level in serum were estimated. Malondialdehyde (MDA) content, superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) activity in pancreatic tissue were measured. The expression of Bcl-2/Bax in islet tissue was examined by using immunohistochemistry. The pancreatic islet β cell apoptosis was detected by TUNEL. **Result:** MFTF could decrease MDA level significantly and increase SOD, GSH-Px level in pancreatic tissue ($P < 0.05$ - $P < 0.01$), increase the levels of Bcl-2 expression and decrease the expression of Bax protein significantly ($P < 0.05$ - $P < 0.01$). Decrease pancreatic β -cell apoptosis ($P < 0.05$ - $P < 0.01$), decrease the level of glucose, insulin and

[收稿日期] 20120507(016)

[基金项目] 河南漯河医学高等专科学校科研项目(2010-S04)

[第一作者] 穆晓燕, 副主任药师, 本科, 从事临床药学研究, Tel:13839560970, E-mail: muxy1965@163.com

[通讯作者] * 李先佳, 副教授, 研究生, 从事生物活性成分的分离与鉴定, Tel:0395-2964509, E-mail: nzl110@163.com

insulin resistance index ($P < 0.05$ - $P < 0.01$), especially the high dose group ($150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) showed a best action. **Conclusion:** MFTF can improve insulin resistance and resists oxidative stress reaction and decrease apoptosis of pancreatic islet β cell.

[**Key words**] Mori Folium total flavonoid; type-2 diabetic mellitus; pancreatic islet β cell; oxidative injury; apoptosis

2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 多以血糖代谢紊乱为特点, 可并发眼、肾、神经和心血管等多脏器的慢性损害。体内氧自由基失衡和胰岛素抵抗是引起 2 型糖尿病发生两个重要因素。胰岛素抵抗增加血糖的浓度, 氧化应激导致胰岛 β 细胞受损, 包括 β 细胞分泌胰岛素的功能下降和细胞数量的减少, 并代偿性增强胰岛素抵抗^[1]。部分研究显示, 桑叶总黄酮具有消除氧自由基、抗脂质过氧化等作用^[2]。本研究观察其对 T2DM 大鼠胰岛素抵抗、胰腺组织氧化应激指标及胰岛 β 细胞凋亡的影响, 并对其可能的机制进行探讨。

1 材料

1.1 动物 健康 Wistar 雄性大鼠 60 只, 体重 180 ~ 200 g, 由郑州大学实验动物中心提供, 许可证号 SCXK(豫)2010-0001。

1.2 药品和试剂 桑叶总黄酮 (Mori Folium total flavonoid, TFMF), 水提取, 纯度 87%, 由漯河医学高等专科学校天然产物实验室提供 (批号 20100312); 链脲佐菌素 (STZ) 购自美国 Sigma 公司; 罗格列酮片 (rosiglitazone tablets, RT, 批号 100911), 购自成都恒瑞制药有限公司; 空腹血糖 (FBG), 超氧化物歧化酶 (SOD), 谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px), 丙二醛 (MDA) (批号 20100509, 20100812, 20100727, 20100419), 测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所; [¹²⁵I] 胰岛素 (ISN) 放射免疫分析药盒 (鼠专用, 批号 20100123) 购自北京科美东雅生物技术有限公司; Bcl-2, Bax 免疫组化染色试剂盒, TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (批号 100301, 100308, 100523) 均购自博士德公司; 其他试剂均为分析纯。

1.3 仪器 Mias-2000 图像分析系统 (四川大学智胜软件股份有限公司), Olympus BX50 型光学显微镜 (日本 Olympus 公司), SN-695A 型放射免疫 γ -测量仪 (上海原子能研究所日环仪器一厂)。

2 方法

2.1 动物模型的建立和分组 大鼠常规喂养 1 周, 随机选取 10 只大鼠作为正常对照组, 普通饲料喂养。其余的 50 只大鼠高糖高脂 (10% 猪油, 20% 蔗糖, 1% 胆酸盐, 2.5% 胆固醇, 66.5% 常规饲料) 饲

料喂养, 喂养 6 周后, 给予 1 次性 ip 链脲佐菌素 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (以 pH 4.2 的 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 枸橼酸缓冲液配成 0.25% 浓度), 对照组 ip 等容积的 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 枸橼酸缓冲液, 72 h 后尾静脉取血测血糖, 空腹血糖 $> 17.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为造模成功。将成模大鼠随机分为 5 组, 即: 模型组, 桑叶黄酮治疗组 (TFMF 组; 低剂量组、中剂量组、高剂量组), 罗格列酮组, 每组 10 只。桑叶黄酮低、中、高剂量组和罗格列酮组分别 ig 给药 50, 100, 150, $1.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 剂量, 模型组和正常对照组 ig 相同体积的蒸馏水, 连续干预 5 周。

2.2 取材 末次 ig 12 h, 2% 戊巴比妥钠 ip 麻醉, 眼眶取血, $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 分离血清, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冻存。取胰腺组织, 0.01% PBS 冲洗 2 次, 部分用双蒸馏水 1: 5 研磨成组织匀浆, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液备用。部分胰腺组织 4% 多聚甲醛溶液固定, 备用。

2.3 生化指标检测 按照试剂盒说明书测定血清中 FBG 水平和 FINS 活性, 并计算胰岛素抵抗指数 [胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR) = 空腹血糖 (FBG, $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) \times 空腹胰岛素 (FIN, $\text{mU} \cdot \text{L}^{-1}$) / 22.5]。严格按照说明书测定胰腺组织 SOD, GSH-Px, MDA。

2.4 Bcl-2, Bax 蛋白检测 部分胰腺组织常规石蜡包埋, 连续切片 ($4 \text{ } \mu\text{m}$ 厚), 免疫组化 SABC 法及 DAB 显色系统检测 Bcl-2, Bax 蛋白的表达, 随机选取 15 个视野于 200 倍显微镜下观察, 图像分析系统分析蛋白表达情况, 统计阳性率。

2.5 胰岛 β 细胞凋亡检测 将胰腺组织常规石蜡包埋, 连续切片 ($4 \text{ } \mu\text{m}$ 厚), 末端脱氧核糖核酸缺口标记法 (TUNEL) 加免疫组化法标记凋亡的胰岛 β 细胞。胰岛区域随机选取 15 个视野 400 倍显微镜下观察, 胞浆呈浅棕色、胞核呈棕褐色者为凋亡的胰岛 β 细胞, 图像分析系统分析统计胰岛 β 细胞阳性率^[3]。

阳性率 (AI) = β 细胞凋亡数 / β 细胞总数 $\times 100\%$

2.6 统计学方法 采用 SPSS 15.0 软件对数据进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计数资料采用 χ^2 检验, 计量资料采用 t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 血糖,胰岛素及胰岛素抵抗指数的变化 模型组 FBG, FINS, HOMA-IR 明显高于正常对照组 ($P < 0.01$), 提示糖尿病动物模型建立。TFMF 能降低 FBG, FINS, HOMA-IR, 尤其以高剂量组作用明显, 与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 且与罗格列酮组作用相当, 见表 1。

表 1 桑叶总黄酮对 T2DM 大鼠 FBG, INS, HOMA-IR 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量 /mg·kg ⁻¹ | FBG /mmol·L ⁻¹ | FINS /mU·L ⁻¹ | HOMA-IR |
|------|----------------------------|------------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| 正常对照 | - | 5.17 ± 0.21 ²⁾ | 23.39 ± 2.47 ²⁾ | 5.41 ± 0.58 ²⁾ |
| 模型 | - | 24.55 ± 2.49 | 31.12 ± 1.81 | 34.99 ± 0.87 |
| 罗格列酮 | 1.8 | 11.33 ± 1.27 ²⁾ | 24.28 ± 2.26 ²⁾ | 12.31 ± 0.64 ²⁾ |
| TFMF | 50 | 17.56 ± 1.75 ¹⁾ | 29.11 ± 1.78 ¹⁾ | 22.81 ± 0.71 ¹⁾ |
| | 100 | 14.39 ± 1.47 ¹⁾ | 27.35 ± 1.93 ¹⁾ | 17.51 ± 0.59 ¹⁾ |
| | 150 | 12.51 ± 1.41 ²⁾ | 25.33 ± 2.17 ²⁾ | 14.11 ± 0.52 ²⁾ |

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

3.2 各组大鼠胰腺组织匀浆中 SOD, MDA, GSH-Px 的变化 模型组 MDA 明显高于正常对照组, SOD, GSH-Px 明显低于正常对照组 ($P < 0.01$)。TFMF 组能降低 MDA, 升高 SOD, GSH-Px, 尤以高剂量组作用明显, 与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 且与罗格列酮组作用相当, 见表 2。

表 2 桑叶总黄酮对 T2DM 大鼠胰腺组织 SOD, MDA, GSH-Px 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量 /mg·kg ⁻¹ | MDA /nmol·mL ⁻¹ | SOD /U·mL ⁻¹ | GSH-Px /U·mL ⁻¹ |
|------|----------------------------|-------------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| 正常对照 | - | 4.19 ± 0.46 ²⁾ | 88.21 ± 8.16 ²⁾ | 649.41 ± 71.29 ²⁾ |
| 模型 | - | 8.49 ± 0.72 | 57.48 ± 5.27 | 479.39 ± 68.26 |
| 罗格列酮 | 1.8 | 5.71 ± 0.51 ²⁾ | 75.31 ± 5.83 ²⁾ | 610.25 ± 57.31 ²⁾ |
| TFMF | 50 | 7.63 ± 0.63 ¹⁾ | 62.35 ± 6.29 ¹⁾ | 523.44 ± 63.38 ¹⁾ |
| | 100 | 6.49 ± 0.74 ¹⁾ | 68.27 ± 6.34 ²⁾ | 571.45 ± 58.57 ¹⁾ |
| | 150 | 5.79 ± 0.75 ²⁾ | 72.48 ± 5.62 ²⁾ | 611.35 ± 62.44 ²⁾ |

3.3 大鼠胰腺组织 Bcl-2/Bax 及胰岛β细胞凋亡的变化 模型组胰腺组织中 Bcl-2 表达水平明显低于正常对照组, Bax 表达水平和细胞凋亡率明显高于正常对照组 ($P < 0.01$)。TFMF 组能升高胰腺组织 Bcl-2 表达水平, 降低 Bax 表达水平和细胞凋亡率, 尤以高剂量组作用明显 ($P < 0.05$ 或 0.01), 且与 RT 组作用相当, 见表 3。

表 3 桑叶总黄酮对 T2DM 大鼠胰腺组织 Bcl-2, Bax 及胰岛β细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$) %

| 组别 | 剂量 /mg·kg ⁻¹ | 凋亡率 | 阳性率 | |
|------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | | Bcl-2 | Bax |
| 正常对照 | - | 8.37 ± 1.95 ²⁾ | 0.53 ± 0.09 ²⁾ | 0.31 ± 0.11 ²⁾ |
| 模型 | - | 24.53 ± 5.32 | 0.22 ± 0.13 | 0.61 ± 0.19 |
| 罗格列酮 | 1.8 | 11.35 ± 4.63 ²⁾ | 0.46 ± 0.10 ²⁾ | 0.41 ± 0.17 ¹⁾ |
| TFMF | 50 | 19.52 ± 4.39 | 0.31 ± 0.15 | 0.59 ± 0.16 |
| | 100 | 15.74 ± 4.57 ¹⁾ | 0.39 ± 0.13 ¹⁾ | 0.52 ± 0.15 |
| | 150 | 12.56 ± 4.64 ²⁾ | 0.41 ± 0.17 ²⁾ | 0.39 ± 0.12 ¹⁾ |

4 讨论

胰岛素抵抗和胰岛β细胞功能受损是 T2DM 两个最重要的发病环节, 胰岛素抵抗的存在降低胰岛素敏感性, 机体为克服 IR 而产生代偿性高胰岛素血症^[4]。胰岛是人体中抗氧化能力较弱的器官, 对 ROS 水平变化比较敏感, 高血糖及高血脂可诱导氧化应激和炎症反应, 并诱发胰岛细胞的损伤、引发胰岛β细胞的损伤和凋亡, 从而引发糖尿病^[5]。胰岛β细胞凋亡异常增多是导致胰岛β细胞数量减少的重要原因, 并代偿性加重胰岛素抵抗。

氧自由基能使生物膜发生脂质过氧化生成脂质过氧化物 (LPO), LPO 可分解产生 MDA。SOD 和 GSH-Px 是超氧阴离子自由基的还原剂, 可抑制脂质过氧化反应。由于胰岛β细胞的 SOD 和 GSH-Px 等含量低, 过多自由基可使其耗竭, 胰岛损伤加重^[6]。本实验显示, 模型大鼠胰腺组织 SOD, GSH-Px 较正常对照组明显降低, MDA 较正常对照组明显增高, 提示模型组大鼠胰腺组织氧化应激水平升高, 抗氧化保护能力下降。

高浓度 ROS 使凋亡基因和抗凋亡基因表达失衡, 改变线粒体的稳态, 下调抗凋亡基因 Bcl-2 表达, 上调促凋亡基因 Bax 表达, 启动不可逆转的凋亡过程^[5]。本实验显示, 糖尿病模型大鼠胰岛β细胞 Bcl-2 蛋白表达水平下降, Bax 蛋白表达水平升高, 细胞凋亡数增加, 可能是糖尿病大鼠 Bcl-2/Bax 调控失衡, 造成细胞凋亡的发生。

桑叶中的黄酮类化合物具有较好的降血糖、降血脂、清除氧自由基作用^[7-8]。实验表明, 桑叶总黄酮能降低胰岛素含量和胰岛素抵抗指数, 说明其能通过提高靶组织的胰岛素敏感性来实现其降糖作用, 间接降低自由基水平。同时桑叶总黄酮提高胰腺组织 SOD, GSH-Px 活力、降低 MDA 含量, 表明桑叶总黄酮具有抗氧化, 清除自由基和脂质过氧化物

桑叶总黄酮抗运动疲劳作用及相关机制研究

马向前^{1*}, 胡颖²

(1. 燕山大学体育学院, 河北 秦皇岛 066004; 2. 燕山大学教务处, 河北 秦皇岛 066004)

[摘要] 目的: 研究桑叶总黄酮抗疲劳作用并探讨其作用机制。方法: 将小鼠分为桑叶总黄酮高、低剂量组(桑叶总黄酮 1, 0.4 g·kg⁻¹)、肌酸给药组(肌酸 3 g·kg⁻¹)、阴性对照组和正常对照组(0.9% 生理盐水), 给药 14 d 后小鼠进行负重游泳实验(除正常对照组外), 采血分离血清, 测定与疲劳有关的生化指标, 应用体外自由基清除实验及小鼠肝组织脂质自氧化法测定桑叶总黄酮抗氧化及清除自由基能力。结果: 与阴性对照组比较, 小鼠给药桑叶总黄酮后负重游泳时间明显延长($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 血清肌酐和尿素氮浓度降低, 丙二醛的生成受到抑制($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论: 桑叶总黄酮具有抗疲劳、清除自由基、抑制小鼠肝脏组织脂质自氧化的活性。其抗疲劳能力与其较强的自由基的清除作用相关。

[关键词] 桑叶黄酮; 抗疲劳; 自由基; 清除能力

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0216-04

[doi] 10.11653/syfy2013110216

Anti-fatigue Effect and Mechanism of Flavonoids from Mori Folium

MA Xiang-qian^{1*}, HU Ying²

(1. Physical Education Institute, Qinhuangdao 066004, China;

2. Educational Administration Office, Yanshan University, Qinhuangdao 066004, China)

[Abstract] **Objective:** To study the anti-fatigue effect of flavonoids from Mori Folium and discuss its mechanism. **Method:** Male Kunming mice were randomly divided into groups of flavonoids group (0.4, 1g·kg⁻¹

[收稿日期] 20121104(003)

[基金项目] 河北省科学技术研究与发展计划项目(10457222)

[通讯作者] * 马向前, 硕士, 副教授, 从事体育教育训练学研究, Tel: 13013269061, E-mail: xiangqian58@126.com

作用, 减轻氧化损伤, 进而保护胰岛 β 细胞, 并进一步上调抗凋亡基因 Bcl-2 水平, 下调促凋亡基因 Bax 表达, 保持胰岛 β 细胞及结构完整, 降低凋亡的发生, 阻止并发症的发生, 改善糖尿病症状。

总之, 桑叶总黄酮能改善 T2DM 大鼠胰岛素抵抗, 增强机体的抗氧化能力, 减轻氧化应激, 上调 Bcl-2/Bax, 缓解胰岛 β 细胞凋亡, 预防、延缓 T2DM 的发生。

[参考文献]

- [1] Evans J L, Goldfine I D, Maddux B A, et al. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction[J]. Diabetes, 2003, 52(1): 1.
- [2] 俞灵莺, 李向荣. 植物黄酮类抗糖尿病及其并发症的研究进展[J]. 国外医学: 卫生学分册, 2000, 27(6): 331.
- [3] 孙志, 韩海荣, 马丽, 等. 针对 2 型糖尿病胰岛 β 细胞

凋亡的影响[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(6): 966.

- [4] 丁海燕, 赵瑞景, 尹小妹, 等. 吡咯烷二硫代氨基甲酸酯减轻 2 型糖尿病大鼠胰岛 β 细胞氧化损伤[J]. 基础医学与临床, 2012, 32(1): 36.
- [5] 郑楚, 唐金良, 杨冬业, 等. 罗汉果总黄酮对实验性糖尿病大鼠的治疗作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(22): 194.
- [6] 安丽萍, 王英平, 王春梅, 等. 五味子油对 2 型糖尿病大鼠胰岛 β 细胞凋亡的影响[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2012, 38(1): 84.
- [7] 李明聪, 杨丹, 郭英, 等. 桑叶中黄酮类化学成分及药理作用研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(2): 377.
- [8] 原爱红, 马骏, 蒋晓峰, 等. 桑叶中糖苷酶抑制活性组分的筛选[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(3): 223.

[责任编辑 聂淑琴]