

# 葛根总黄酮逆转链脲佐菌素 诱导糖尿病小鼠胰腺损伤的研究

徐灵源<sup>1</sup>, 黎荣<sup>2</sup>, 梁韬<sup>3</sup>, 段小群<sup>2</sup>, 韦斯军<sup>1\*</sup>

(1. 右江民族医学院附属医院药剂科, 广西 百色 533000; 2. 桂林医学院, 广西 桂林 541004;  
3. 广西医科大学, 南宁 530021)

**[摘要]** 目的: 研究葛根总黄酮逆转链脲佐菌素(STZ)诱导糖尿病小鼠胰腺损伤。方法: STZ(150 mg·kg<sup>-1</sup>) ip 复制糖尿病小鼠模型, 随机分成 5 组: 模型组、二甲双胍阳性组及葛根总黄酮低、中、高剂量组。ig 给予葛根总黄酮 80, 160, 240 mg·kg<sup>-1</sup>, 阳性组给予二甲双胍 80 mg·kg<sup>-1</sup>, 持续给药 14 d。采用葡萄糖氧化酶法检测空腹血糖(FBG)水平。放射免疫法检测空腹血清胰岛素(FIns)及胰岛素抵抗(IR)水平。ELISA 法检测胰腺组织中谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)、活性氧(ROS)活性和丙二醛(MDA)含量。HE 染色观察胰腺细胞病理学的变化。Western blot 法检测胰脏血红素加氧酶 1(HO-1)的表达。结果: 与模型组比较, 葛根总黄酮有效降低糖尿病小鼠的血糖水平( $P < 0.01$ )。恢复胰岛素水平, 改善 IR( $P < 0.01$ )。增加胰腺 GSH-Px、SOD 活性, 同时降低 ROS、MDA 水平( $P < 0.01$ )。逆转 STZ 致糖尿病小鼠胰岛  $\beta$  细胞损伤。有效下调胰腺 HO-1 蛋白表达( $P < 0.01$ )。结论: 葛根总黄酮对 STZ 致糖尿病小鼠胰腺损伤有保护作用, 机制可能与改善血糖代谢和抗氧化应激有关。

**[关键词]** 葛根总黄酮; 糖尿病; 代谢; 氧化应激

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)08-0231-04

**[doi]** 10.11653/syjf2013080231

## Experimental Study of Reversion of Puerariae Radix Lobatae Flavonoids on Pancreas Injury Induced by Streptozotocin in Mice

XU Ling-yuan<sup>1</sup>, LI Rong<sup>2</sup>, LIANG Tao<sup>3</sup>, DUAN Xiao-qun<sup>2</sup>, WEI Si-jun<sup>1\*</sup>

(1. Affiliated Hospital of YouJiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China;  
2. Guilin Medical University, Guilin 541004, China;  
3. Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the experimental study of reversion of Puerariae Radix Lobatae flavonoids on pancreas injury induced by streptozotocin in mice. **Method:** Being established diabetic mice by intraperitoneal injection of streptozotocin (150 mg·kg<sup>-1</sup>) firstly, and then the mice were randomly divided into 5 groups: model group, dimethyldiguanide group (80 mg·kg<sup>-1</sup>), low-, moderate-and high-dose groups of Puerariae Radix Lobatae flavonoids (80, 160, 240 mg·kg<sup>-1</sup>). The drugs were intragastrically given to mice daily for 14 days. The level of fasting blood glucose (FBG) was tested by glucose oxidase method. The levels of fasting serum insulin (FIns) and insulin resistance (IR) were measured via radioimmunoassay (RIA). The activities of glutathione-peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD) in pancreas tissue, and the contents of reactive oxygen species (ROS) and malondialdehyde (MDA) were using ELISA test. The pathologic changes of pancreatic cells were observed by HE staining. The expression of heme oxygenase-1 (HO-1) in pancreas was through Western blot analysis. **Result:** Compared to model control group, Puerariae Radix Lobatae flavonoids effectively lowered the

**[收稿日期]** 20120918(005)

**[第一作者]** 徐灵源, 硕士, 从事抗糖尿病研究, Tel: 18377619552, E-mail: xulingyuan168@163.com

**[通讯作者]** \* 韦斯军, 副主任药师, 从事抗糖尿病研究, Tel: 13517762363, E-mail: yjkwsj8572@163.com

blood-glucose level in diabetic mice ( $P < 0.01$ ). The insulin level in serum was restored, and IR condition was improved ( $P < 0.01$ ). The activities of GSH-Px, SOD in pancreas tissue were elevated, while the content of ROS, MDA was lessened ( $P < 0.01$ ). And the islet beta cells injure was reversed. The HO-1 expression was down-regulated in pancreatic tissue ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The findings demonstrate that Puerariae Radix Lobatae flavonoids mediate protection against pancreas injury induced by STZ in mice, though the mechanisms involved in amelioration of metabolism in blood glucose and suppression of oxidative stress.

[**Key words**] Puerariae Radix Lobatae flavonoids; diabetes; metabolism; oxidative stress

研究发现,传统中药葛根含有大豆异黄酮、苜蓿素本糖苷、葛根素、微量元素、氨基酸等活性物质<sup>[1]</sup>。并具有舒张平滑肌,改善心脑血管,护肝作用,抗癌作用,提高记忆功能和降血糖作用等广泛的药理功效<sup>[2-3]</sup>。本实验拟腹腔注射链脲佐菌素(STZ)复制糖尿病小鼠模型,以糖代谢和氧化应激为主要研究目标,探讨葛根总黄酮对糖尿病小鼠的治疗作用及其机制,为其早期防治糖尿病的应用提供科学依据。

## 1 材料

**1.1 动物** 昆明种小鼠,SPF级,雌雄各半,体重( $20 \pm 2$ )g,动物许可证号 SCXK 桂 2009-0002,由广西医科大学实验动物中心提供。实验期间动物自由摄食、饮水。动物饲养于符合医学实验动物环境设施要求的饲养环境中。

**1.2 药物与试剂** 二甲双胍片(深圳市中联制药有限公司,批号 20120618)。链脲佐菌素(STZ,美国 Sigma 公司,批号 8008193462)。血糖试剂盒(四川迈克科技股份有限公司生产,批号 20120736)。胰岛素(Ins)放射免疫分析试剂盒(北京北方生物技术研究所产品,批号 111259)。超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽-过氧化物酶(GSH-Px)、活性氧(ROS)、丙二醛(MDA)试剂盒:(均购于南京建成生物工程研究所,批号 20120718),血红素加氧酶 1(HO-1)蛋白抗体(Bioworld Technology, Inc, USA, 批号 BS1432),DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 20120704),SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(碧云天生物技术研究所,批号 DZ12078),多克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology,批号 SC-1293),HRP 标记的兔抗羊 IgG 抗体(Santa Cruz Biotechnology,批号 SC-1256)。预染蛋白 Marker(Fermentas 公司,批号 SM120711)。

**1.3 仪器** 722S 紫外分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),DFM-96 型多管放射免疫计数器(众成机电技术公司),WBZ-2 微波真空干燥机(贵阳新奇微波工业有限责任公司),DDL-5 高速

冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂),5810 型高速低温离心机(德国 Eppendorf 公司),2235 型病理组织切片机(德国 Leitz 公司),DMR + 550 型病理图像分析仪(德国莱卡公司)。垂直电泳仪、转膜及显影设备(BIO-RAD 公司),酶免分析仪(美国 Thermo Forma 公司)。

## 2 方法

**2.1 葛根总黄酮制备**<sup>[4]</sup> 葛根干燥粗粉 1 000 g,加 65% 乙醇 9 000 mL,回流 4 次,每次 5 h,趁热过滤,滤液经旋转蒸发仪减压浓缩,将浓缩物溶解后,高速离心 15 min,重复 3 次,所得沉淀物加适量 90% 乙醇溶解后过滤,滤液用 1:3 石油醚萃取,弃上层醚相,萃取液用旋转蒸发仪浓缩,再经蒸发皿用水浴蒸发至析出沉淀,沉淀重结晶即得葛根总黄酮。Sevage 法除去蛋白质,经检测为黄酮类化合物即可使用。

**2.2 小鼠糖尿病模型** 造模前禁食 12 h,一次性 ip 链脲佐菌素  $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。3 d 后眼内眦采血测空腹血糖(FBG)水平,选取  $\text{FBG} \geq 11.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的小鼠作为糖尿病模型<sup>[5]</sup>,共 50 只供实验使用。

**2.3 分组及给药** 将糖尿病小鼠随机分成 5 组(每组 10 只):模型组、二甲双胍阳性组及葛根总黄酮低、中、高剂量组。并设立正常组(10 只健康小鼠)。ig 给予葛根总黄酮 80, 160, 240  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,阳性组给予二甲双胍 80  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,正常组及模型组则给予等量生理盐水,持续给药 14 d。末次给药前禁食 12 h,给药 1 h 后摘眼球取血,离心取血清待测。

**2.4 指标检测** 采用葡萄糖氧化酶法检测空腹血糖(FBG)水平。放射免疫法检测血清空腹胰岛素(FIns)及胰岛素抵抗(IR)水平。ELISA 法检测胰腺组织中 GSH-Px, SOD, ROS, MDA 含量。HE 染色观察胰腺细胞病理学的变化。Western blot 法检测胰腺脏 HO-1 的表达。所有实验操作过程均严格按照厂家说明书指导进行。

**2.5 统计学方法** 采用 SPSS 13.0 软件,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$  有统计学

意义。

### 3 结果

**3.1 对糖尿病小鼠 FBG 的影响** 治疗前模型组和其他给药组的小鼠 FBG 明显升高,与正常组比较差别有统计意义( $P < 0.01$ )。提示造模成功。治疗后,二甲双胍和葛根总黄酮有效地降低糖尿病小鼠 FBG 水平,与模型组比较差别有统计意义( $P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 葛根总黄酮对糖尿病小鼠 FBG 的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	FBG/mmol·L <sup>-1</sup>	
		治疗前	治疗后
正常	-	7.84 ± 1.62	8.01 ± 1.79
模型	-	18.16 ± 3.54 <sup>1)</sup>	19.76 ± 4.21 <sup>1)</sup>
二甲双胍	80	17.94 ± 3.11 <sup>1)</sup>	13.85 ± 2.06 <sup>2)</sup>
葛根总黄酮	80	18.05 ± 3.92 <sup>1)</sup>	16.42 ± 3.15 <sup>2)</sup>
	160	18.23 ± 3.67 <sup>1)</sup>	15.87 ± 2.93 <sup>2)</sup>
	240	18.19 ± 3.85 <sup>1)</sup>	14.06 ± 2.12 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

**3.2 对糖尿病小鼠 FIns, IR 的影响** 糖尿病小鼠血清中 FIns 水平明显上升,表现出显著地胰岛素抵

表 3 葛根总黄酮对糖尿病小鼠胰腺 GSH-Px, SOD, ROS, MDA 水平的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	GSH-Px/nmol·mg	SOD/U·mg	ROS/U·mL <sup>-1</sup>	MDA/nmol·mg <sup>-1</sup>
正常	-	469.57 ± 52.83	213.67 ± 49.25	12.04 ± 3.36	3.48 ± 1.29
模型	-	152.64 ± 27.53 <sup>1)</sup>	86.57 ± 21.09 <sup>1)</sup>	43.18 ± 6.74 <sup>1)</sup>	11.65 ± 3.89 <sup>1)</sup>
二甲双胍	80	391.78 ± 43.62 <sup>2)</sup>	183.26 ± 42.56 <sup>2)</sup>	23.56 ± 4.38 <sup>2)</sup>	5.74 ± 2.13 <sup>2)</sup>
葛根总黄酮	80	217.63 ± 29.18 <sup>2)</sup>	102.37 ± 24.38 <sup>2)</sup>	39.21 ± 6.49 <sup>2)</sup>	10.43 ± 3.25 <sup>2)</sup>
	160	284.92 ± 31.36 <sup>2)</sup>	138.46 ± 35.27 <sup>2)</sup>	30.72 ± 5.64 <sup>2)</sup>	8.94 ± 2.76 <sup>2)</sup>
	240	375.46 ± 40.58 <sup>2)</sup>	171.59 ± 40.62 <sup>2)</sup>	25.89 ± 4.92 <sup>2)</sup>	6.12 ± 2.53 <sup>2)</sup>

**3.4 葛根总黄酮对糖尿病小鼠胰腺 HO-1 蛋白表达的影响** Western blot 结果表明,糖尿病小鼠胰脏中 HO-1 蛋白表达明显上调,与正常组比较差别有统计意义( $P < 0.01$ )。药物干预后,二甲双胍和葛根总黄酮有效地下调糖尿病小鼠胰脏中 HO-1 蛋白表达,与模型组比较差别有统计意义( $P < 0.01$ )。见表 4。

**3.5 小鼠胰腺组织细胞病理学观察** HE 染色结果显示,正常组胰岛是结构完整, $\beta$  细胞排列有序,轮廓清晰可见, $\beta$  细胞数量丰富。模型组中胰岛结构受损, $\beta$  细胞减少,并伴有变性或坏死,偶见炎症浸润。二甲双胍组胰岛形态有一定恢复, $\beta$  细胞数量增加。葛根总黄酮低剂量组胰岛  $\beta$  细胞减少,但其形态有一定的修复。中剂量组(图 E)胰岛结构有所改善, $\beta$  细胞数量逐渐回增。高剂量组胰岛结

构恢复, $\beta$  细胞密度增加明显。见图 1。

表 2 葛根总黄酮对糖尿病小鼠 FIns, IR 的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	FIns/mU·L <sup>-1</sup>	IR
正常	-	18.79 ± 4.65	1.92 ± 0.41
模型	-	54.62 ± 8.31 <sup>1)</sup>	4.15 ± 0.73 <sup>1)</sup>
二甲双胍	80	32.45 ± 6.69 <sup>2)</sup>	3.09 ± 0.54 <sup>2)</sup>
葛根总黄酮	80	49.08 ± 7.57 <sup>1)</sup>	3.92 ± 0.67 <sup>2)</sup>
	160	43.76 ± 7.16 <sup>1)</sup>	3.64 ± 0.61 <sup>2)</sup>
	240	34.59 ± 6.88 <sup>2)</sup>	3.27 ± 0.58 <sup>2)</sup>

**3.3 对糖尿病小鼠胰腺 GSH-Px, SOD, ROS, MDA 水平的影响** 模型组糖尿病小鼠胰腺组织中 GSH-Px, SOD 活性明显下降,而 ROS, MDA 水平升高,与正常组比较差别有统计意义( $P < 0.01$ )。给药后,二甲双胍组和葛根总黄酮组小鼠胰腺组织中 GSH-Px, SOD 活性显著上升,而 ROS, MDA 水平逐渐降低,与模型组比较差别有统计意义( $P < 0.01$ )。见表 3。

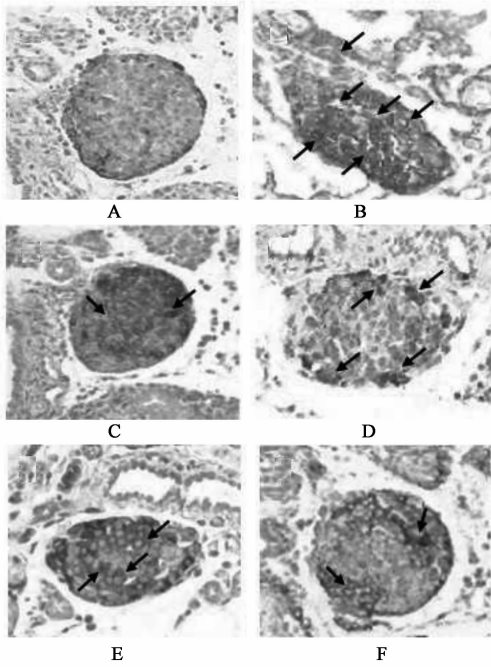
表 4 葛根总黄酮对糖尿病小鼠胰腺 HO-1 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	HO-1	
		A	HO-1/ $\beta$ -actin/%
正常	-	0.27 ± 0.06	18.24 ± 3.12
模型	-	0.94 ± 0.18 <sup>1)</sup>	76.83 ± 8.56 <sup>1)</sup>
二甲双胍	80	0.46 ± 0.09 <sup>2)</sup>	39.48 ± 5.63 <sup>2)</sup>
葛根总黄酮	80	0.81 ± 0.15 <sup>2)</sup>	62.59 ± 7.48 <sup>2)</sup>
	160	0.69 ± 0.11 <sup>2)</sup>	42.62 ± 5.27 <sup>2)</sup>
	240	0.51 ± 0.13 <sup>2)</sup>	53.86 ± 6.51 <sup>2)</sup>

构恢复, $\beta$  细胞密度增加明显。见图 1。

## 4 讨论

糖尿病是一种慢性疾病,其主要病因是胰岛素分泌不足或产生胰岛素抵抗,最终会导致血糖代谢



A. 正常组; B. 模型组; C. 二甲双胍 80 mg·kg<sup>-1</sup>组;  
D. 葛根总黄酮 80 mg·kg<sup>-1</sup>组; E. 葛根总黄酮 160 mg·kg<sup>-1</sup>组;  
F. 葛根总黄酮 240 mg·kg<sup>-1</sup>组

图 1 葛根总黄酮对糖尿病模型小鼠  
胰脏组织病变的影响(HE, ×400)

紊乱而引发系列的严重并发症<sup>[6]</sup>。因此,有效地恢复胰岛素、血糖的稳态水平是抗糖尿病中药(新药)筛选的重要评价指标。在本实验中,给予葛根总黄酮梯度剂量治疗后,STZ 所致的糖尿病小鼠高血糖病况逐渐地降低,呈现明显的剂量依赖性。表明葛根总黄酮能具有改善胰岛素敏感性以及降血糖作用。

研究发现,胰岛  $\beta$  细胞功能障碍是糖尿病主要发病机制之一<sup>[7]</sup>。高血糖诱导的氧化应激性损伤会引起胰岛素调控能力下降,使其合成分泌减少,同时  $\beta$  细胞功能衰退,将进一步加剧代谢紊乱<sup>[8]</sup>。而对抗活性氧(ROS)介导的细胞损伤是治疗糖尿病的有效策略之一。本实验中,STZ 所致的糖尿病小鼠胰腺组织中抗氧化酶活性明显降低,而脂毒性物质 MDA 含量累积。同时 HE 染色结果发现胰岛结构受损, $\beta$  细胞变性或坏。提示 STZ 诱发糖尿病小鼠产生了氧化应激性损伤。而葛根总黄酮治疗能有效地增加其胰腺组织中 GSH-Px, SOD 活性,并降低 ROS,MDA 水平。表明葛根总黄酮具有提高糖尿病小鼠抗氧化应激能力以及减轻脂毒性作用。

正常生理状况下,血红素加氧酶 1(HO-1)主要

存在代谢活跃的组织中,如胰腺。当应激发生时,HO-1 被过度激活并产生大量游离铁离子和 CO 在内环境下进一步加重氧化损伤,破坏线粒体而干扰呼吸供能途径<sup>[9-10]</sup>。本实验中,STZ 所致的糖尿病小鼠胰腺组织中内源性 HO-1 蛋白显著高于正常对照小鼠,提示 STZ 化学物质因素的刺激诱导了 HO-1 异常表达,与上述实验氧化应激性损伤结果一致。因此,抑制胰腺组织 HO-1 异常表达是抗帕金森的潜在靶点之一。葛根总黄酮治疗有效地下调 STZ 致糖尿病小鼠胰腺内源性 HO-1 蛋白表达,与 HE 染色观察胰岛修复和  $\beta$  细胞数量增加结果一致。表明葛根总黄酮对 STZ 致胰腺损伤有保护作用,推测与其逆转胰腺组织中 HO-1 异常表达有关。

### [参考文献]

[1] 李国辉,张庆文,王一涛. 葛根的化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2010,35(23):3156.  
[2] 郭建平,孙其荣. 葛根药理作用研究进展[J]. 中草药,1995,26(3):163.  
[3] 王春怡,李卫民,高英. 黄芪葛根汤对 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗及 PPAR- $\gamma$  mRNA 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(5):152.  
[4] 张永煜,陈晓华,孙锐杰,等. 愈风宁心中葛根总黄酮的提取工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志,1999,5(2):12.  
[5] 赵保胜,董淑云,霍海如,等. 2 型糖尿病动物模型的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2005,11(5):62.  
[6] Scheen A J. Pathophysiology of type 2 diabetes[J]. Acta Clin Belg,2003,58(6):335.  
[7] Craig W S. Islet cell dysfunction in progression to diabetes mellitus[J]. J Am Osteopath Assoc, 2007,107(3):1.  
[8] Lightfoot Y L, Chen J, Mathews C E. Oxidative stress and beta cell dysfunction[J]. Methods Mol Biol, 2012(900):347.  
[9] Han Z, Varadaraj S, Giedt R J, et al. Mitochondria-derived reactive oxygen species mediate hemeoxygenase-1 expression in sheared endothelial cells [J]. J Pharmacol Exp Ther,2009,329(1):94.  
[10] Seo W Y, Goh A R, Ju S M, et al. Celastrol induces expression of heme oxygenase-1 through ROS/Nrf2/ARE signaling in the HaCaT cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011,407(3):535.

[责任编辑 聂淑琴]