

牛心柿叶多糖对糖尿病小鼠肾脏损伤的保护作用

蔡忠华¹, 钟保恒², 宋美桂^{1*}, 赖政宏¹

(1. 广西来宾市武宣县人民医院, 广西 武宣 545900;

2. 柳州市食品药品检验所, 广西 柳州 545000)

[摘要] **目的:**探讨牛心柿叶多糖对链脲佐菌素致糖尿病小鼠肾脏损伤的保护作用及其机制。**方法:**建立糖尿病小鼠模型,随机分成 5 组:模型组、二甲双胍阳性组及牛心柿叶多糖低、中、高剂量组。ig 给予牛心柿叶多糖 0.3, 0.6, 1.2 g·kg⁻¹, 阳性组给予二甲双胍 0.32 g·kg⁻¹, 连续 ig 15 d。末次给药后,氧化酶法测定空腹血糖(FBG),终点法测 24 h 尿微量白蛋白含量。苏木精-伊红染色法(HE 染色)观察肾脏形态学变化。蛋白质印迹(Western blot)法检测肾脏组织中胰岛素样生长因子(IGF-1)表达。**结果:**与模型对照组比较,牛心柿叶多糖给药组中糖尿病小鼠的血糖明显降低($P < 0.05$),并显著降低尿微量白蛋白含量($P < 0.05$)。下调肾脏组织中 IGF-1 蛋白水平($P < 0.05$),并缓解肾损伤程度。**结论:**牛心柿叶多糖对链脲佐菌素所致糖尿病小鼠肾脏损害具有保护作用,机制可能与其通过抑制肾脏组织中 IGF-1 的表达而调节其下游通路有关。

[关键词] 牛心柿叶多糖; 糖尿病; 肾病; 胰岛素样生长因子

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)01-0261-04

Protective Effect of the Niuxin Persimmon Leaf Polysaccharide on Kidney Injure in Diabetic Mice

CAI Zhong-hua¹, ZHONG Bao-heng², SONG Mei-gui^{1*}, LAI Zheng-hong¹

(1. People's Hospital of Wuxuan, Wuxuan 545900, China;

2. Liuzhou Institute for Food and Drug Control, Liuzhou 545000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protective effect of the Niuxin persimmon leaf polysaccharide on kidney injure in diabetic mice induced by streptozotocin (STZ) and its mechanisms. **Method:** Being established of diabetic mice model, the mice were randomly assigned to 5 groups: model group, melbinum group (0.32 g·kg⁻¹), low, medium and high-dose groups of Niuxin persimmon leaf polysaccharide (0.3, 0.6, 1.2 g·kg⁻¹) for 15 consecutive days. At the end of 15 days, oxidase method was used to examine the blood glucose levels (fasting blood-glucose, FBG), while the endpoint method was used to measured urinary albumin content (24 h). The changes in renal morphology were tested through HE-staining. The expressions of insulin-like growth factors-1 (IGF-1) in renal tissue were determined using Western blot analysis. **Result:** Compared to model control group, Niuxin persimmon leaf polysaccharide could notably diminish the FBG in diabetic mice ($P < 0.05$), and measured urinary albumin content was reduced statistically ($P < 0.05$). The IGF-1 protein level in renal tissue was up-regulated ($P < 0.05$), and the condition of renal injury alleviated finally. **Conclusion:** The results indicate that Niuxin persimmon leaf polysaccharide has protective effect on renal injure in diabetic mice induced by STZ. The mechanism may be related to inhibition of IGF-1 expression in renal tissue to regulate its downstream pathway.

[Key words] Niuxin persimmon leaf polysaccharide; diabetes; nephropathy; IGF-1; protection

[收稿日期] 20120620(015)

[第一作者] 蔡忠华, 主管药师, 从事抗糖尿病研究, Tel:13978281565, E-mail:caizhonghua668@163.com

[通讯作者] * 宋美桂, 主管药师, 从事抗糖尿病研究, Tel:18778216231, E-mail:songmeigui78@163.com

近年研究表明,柿叶由于具有降胆固醇、增强免疫功能、降血压、抗衰老等广泛的应用前景^[1]。据报道,用柿叶治疗慢性肾炎蛋白尿获得一定的疗效,且副作用低^[2-3]。本实验拟建立糖尿病小鼠模型,观察牛心柿叶多糖对糖尿病小鼠肾脏组织中胰岛素样生长因子(IGF-1)的表达的影响,探讨其与糖尿病肾病(DN)发展的关联性,为阐明其对 DN 的干预机制做出初步的实验研究。

1 材料

1.1 动物 SPF 级昆明种小鼠,雌雄各半,体重(20±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。

1.2 药物与试剂 二甲双胍片,北京京丰制药有限公司(规格 250 mg/片),批号 120216。链脲佐菌素(STZ),美国 Sigma 公司,批号 8008193342。血糖试剂盒,四川迈克科技股份有限责任公司,批号 2012046。SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液,上海西唐生物科技有限公司,批号 WB1208。多克隆抗体,Santa Cruz Biotechnology,批号 SC-1259。鼠抗兔 IgG-HRP 抗体,上海江莱生物科技有限公司,批号 20120436。预染蛋白 Marker,西安润德生物技术有限公司,批号 QE1204。

1.3 仪器 DDL-5 型高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂)。722S 型紫外分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)。WBZ-2 型微波真空干燥机(贵阳新奇微波工业有限责任公司)。Gel doc 2000 型低温高速离心机(德国西门子公司)。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 牛心柿叶多糖提取 牛心柿叶(Niuxin Persimmon leaf)经广西中医药研究院鉴定为柿科植物柿 *Diospyros kaki* L. f. 的干燥叶。采用水提醇沉法提取柿叶多糖:取 0.5 kg 干燥柿叶粗粉,加入 4 500 mL 蒸馏水后加热提取 4 h,纱布过滤后合并滤液,8 000 r·min⁻¹离心 3 次,然后采用微波真空干燥器浓缩直至 500 mL 浓缩液。加入 95% 乙醇沉淀,再经无水乙醇、丙酮、乙酸乙酯相继洗涤后,低温干燥得柿叶多糖,Sevage 法除去蛋白质。经苯酚-硫酸法鉴定为多糖类化合物,并定性测定多糖含量为 31.5 g。

2.2 小鼠糖尿病模型建立 造模前小鼠禁食 12 h,腹腔注射 STZ 150 mg·kg⁻¹。72 h 后眼内眦采血测空腹血糖(FBG),选取 FBG≥11.1 mmol·L⁻¹ 的小鼠

作为糖尿病模型^[4]。

2.3 分组及给药 经检测空腹血糖确定成模后,随机分成 5 组(每组 10 只):模型组、二甲双胍阳性组及牛心柿叶多糖低、中、高剂量组。并设置正常组(10 只)。参照有关文献拟定剂量^[5-6],ig 给予牛心柿叶多糖 0.3, 0.6, 1.2 g·kg⁻¹,阳性组给予二甲双胍 0.32 g·kg⁻¹,正常组及模型组则给予等量生理盐水,连续灌胃 15 d。

2.4 指标检测 氧化酶法测定空腹血糖(FBG),终点法测 24 h 尿微量白蛋白含量。HE 染色观察肾脏形态学变化。在广西医科大学科学实验中心进行 Western blot 法检测肾脏组织中胰岛素样生长因子(IGF-1)表达的实验研究。所有实验操作过程均严格按照厂家使用说明书进行。

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 糖尿病小鼠 FBG,尿蛋白的影响 实验显示,随着病情的发展 STZ 致糖尿病小鼠 FBG 明显增高,同时 24 h 尿微量白蛋白水平显著升高,与正常组比较差别有统计学意义(*P* < 0.05)。药物治疗后,二甲双胍和牛心柿叶多糖给药各组的小鼠 FBG 均有所降低,而尿蛋白水平逐渐减少,与模型组比较差别有统计意义(*P* < 0.05)。见表 1。

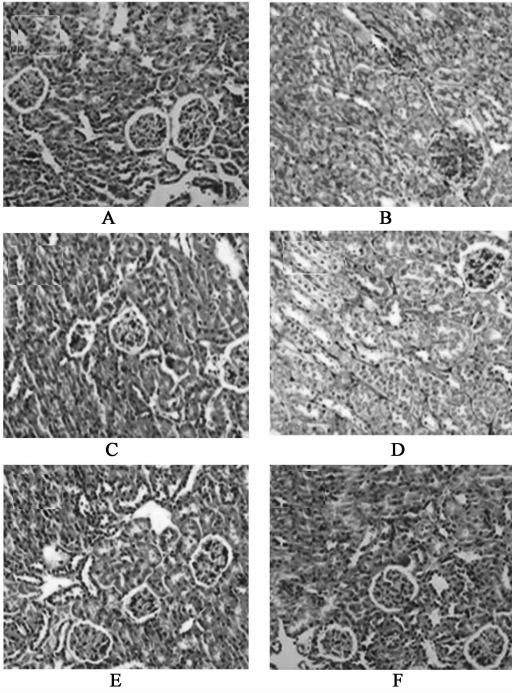
表 1 牛心柿叶多糖对糖尿病小鼠 FBG、尿蛋白的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	FBG/mmol·L ⁻¹		尿蛋白 /mg·24 h ⁻¹
		药前	药后	
正常	-	6.87 ± 1.42	6.74 ± 1.58	1.69 ± 0.45
模型	-	18.16 ± 2.38 ¹⁾	25.39 ± 4.71 ¹⁾	8.57 ± 1.32 ¹⁾
牛心柿叶多糖	0.3	18.55 ± 3.12 ¹⁾	17.53 ± 3.35 ²⁾	7.39 ± 1.06 ²⁾
	0.6	18.76 ± 3.04 ¹⁾	14.25 ± 3.14 ²⁾	4.18 ± 0.92 ²⁾
	1.2	18.63 ± 3.45 ¹⁾	13.84 ± 2.53 ²⁾	2.75 ± 0.68 ²⁾
二甲双胍	0.32	17.49 ± 3.53 ¹⁾	13.37 ± 2.18 ²⁾	2.87 ± 0.71 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾*P* < 0.05;与模型组比较²⁾*P* < 0.05。

3.2 小鼠肾脏形态学观察 染色结果显示,正常组肾小球形态较一致,排列有序,包曼氏囊腔轮廓清晰,同时其毛细血管丛基底膜正常,未见增生或炎症浸润现象发生。与正常组比较,模型组肾小球毛细血管丛基底膜显著增厚,系膜基质增生或增多,包曼氏囊腔呈弥漫性肾小球硬化变化,上皮细胞浊肿,有炎症浸润发生。二甲双胍组肾小球形态恢复,其内细胞数量增加,基底膜增生减轻。牛心柿叶多糖低

剂量组,肾小球数量减少,形态有一定的恢复,但存在糖尿病肾病特征。中剂量组肾组织病变有所减轻,肾小球结构较清晰,以及其数量逐渐增多。高剂量组肾小球形态较均匀,结构和数量恢复明显,较模型组明显改善。见图1。



A. 正常对照组;B. 模型对照组;C. 二甲双胍 32 mg·kg⁻¹组;
D. 牛心柿叶多糖 0.3 g·kg⁻¹组;E. 牛心柿叶多糖 0.6 g·kg⁻¹组;
F. 牛心柿叶多糖 1.2 g·kg⁻¹组

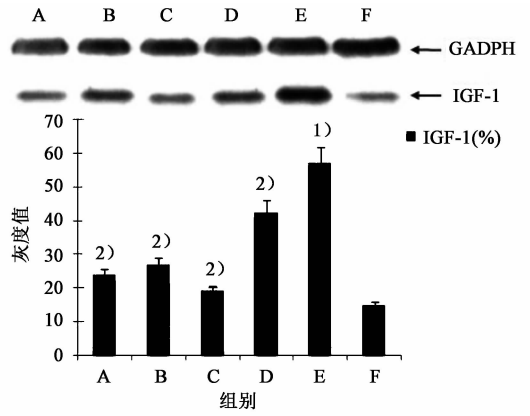
图1 牛心柿叶多糖对糖尿病小鼠肾脏细胞的影响(HE染色,×100)

3.3 对糖尿病小鼠肾脏中 IGF-1 表达的影响 与正常组比较,模型组糖尿病小鼠肾脏中 IGF-1 蛋白表达显著增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。药物治疗后,二甲双胍和牛心柿叶多糖干预组有效地降低糖尿病小鼠肾脏中 IGF-1 的蛋白表达,与模型组比较差别有统计意义($P < 0.05$)。见图2。

4 讨论

糖尿病肾病(DN)是糖尿病发生发展中慢性并发症之一,具有较高的死亡率^[7]。DN 主要病理特征为肾小球病变(基底膜增厚,高渗滤,蛋白尿等)。所以对 DN 肾小球的保护策略是治疗糖尿病(调控血糖)的潜在手段之一。本实验显示糖尿病小鼠血糖,尿微量白蛋白均显著高于正常对照组,同时提示 DN 小鼠造模成功。而牛心柿叶多糖的治疗有效地降低 DN 小鼠的血糖,提示早期有效的干预作用对于控制血糖具有显著作用。

尿蛋白和肾脏病理检测是 DN 评估重要的指标



与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$;

A. 二甲双胍 0.32 g·kg⁻¹组;B. 牛心柿叶多糖 0.6 g·kg⁻¹组;
C. 牛心柿叶多糖 1.2 g·kg⁻¹组;D. 牛心柿叶多糖 0.3 g·kg⁻¹组;
E. 模型对照组; F. 正常对照组

图2 牛心柿叶多糖对糖尿病小鼠肾脏中 IGF-1 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

值^[8]。尿总蛋白与相对应肾脏的病理改变间存在一定的相关性,其值可为糖尿病肾病动物模型的愈况提供参考^[9]。在本实验中糖尿病模型组小鼠尿蛋白明显高于正常组,出现了肾脏炎症浸润、高滤过和肾小球基质增生,表现为早期糖尿病肾病。牛心柿叶多糖的治疗可以下调 DN 小鼠的尿蛋白水平,提示介导尿蛋白水平与缓解肾脏病理损伤具有相关性。

国内外研究发现,IGF-1 对 DN 的发生发展所涉及的可能机制是:诱发 iNOS 的表达产生过多的 NO,造成肾小球损失,表现为滤过率和血浆流量增加,最终引发 DN 早期的尿蛋白水平升高;导致肾小球基底膜弥漫性增生,减少基质胶原蛋白的降解;促使肾小球系膜细胞脂质积累,酿成肾小球硬化;IGF-1还促使系膜细胞对葡萄糖的不断摄取,加剧了肾脏负荷以及高血糖的后果^[10-11]。本次实验结果显示,给予二甲双胍、牛心柿叶多糖治疗后,DN 小鼠血糖和尿蛋白水平得到有效控制,同时表现为肾脏组织中 IGF-1 的表达明显降低。提示牛心柿叶多糖的干预对糖尿病小鼠肾损伤具有保护作用。

[参考文献]

[1] 姜红波,赵卫星,冯国栋,等. 柿叶的主要有效成分及药理作用研究进展[J]. 化工时刊,2010,24(6):38.
[2] 周嘉善. 柿叶治慢性肾炎蛋白尿有效[J]. 中医杂志,1983,6(1):79.
[3] 聂文军. 柿叶的临床新用途[J]. 中国误诊学杂志,2002,2(8):1268.

甘宝胶囊对小鼠急性肝损伤的保护作用

曹国琼, 张永萍*, 隋艳华, 肖承鸿

(贵阳中医学院, 贵阳 550002)

[摘要] **目的:**研究甘宝胶囊对四氯化碳(CCl₄)、乙醇、扑热息痛所致小鼠急性肝损伤的保护作用。**方法:**取昆明种小鼠60只,随机分为6组:空白对照组,肝损伤模型对照组,甘宝胶囊0.125,0.25,0.5 g·kg⁻¹剂量组,联苯双酯阳性对照组0.2 g·kg⁻¹;ig给药,每日1次,至设定日期末分别用CCl₄、乙醇、扑热息痛造成急性肝损伤模型。比色法检测血清中的丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)和碱性磷酸酶(AKP)的水平,同时测定肝脏系数,此外CCl₄造模组测溶血素、脾脏和胸腺系数。**结果:**甘宝胶囊高、中剂量组能明显降低由CCl₄、乙醇、扑热息痛致肝损伤模型的ALT,AST,肝脏系数($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。高剂量组能显著降低扑热息痛造模小鼠AKP的活性($P < 0.05$),并显著升高CCl₄造模小鼠的溶血素含量,降低胸腺系数及脾脏系数($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论:**甘宝胶囊对四氯化碳、乙醇、扑热息痛致肝损伤具有明显的保护作用。

[关键词] 甘宝胶囊;肝损伤;四氯化碳;扑热息痛

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)01-0264-04

Protective Effects of Ganbao Capsule on Liver Injury in Mice

CAO Guo-qiong, ZHANG Yong-ping*, SUI Yan-hua, XIAO Cheng-hong
(Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protect effects of Ganbao capsule on liver-injury induced by carbon tetrachlotide (CCl₄) ethanol and acetaminophen in mice. **Method:** Sixty KM mice were divided into 6 groups randomly: blank control group, model group with liver injury, three experimental groups (Ganbao capsule 0.125, 0.25, 0.5 g·kg⁻¹ respectively), positive control group (biphenyl double ester 0.2 g·kg⁻¹). CCl₄, ethanol and acetaminophen were accordingly given to mice by oral gavage once in order to make the acute liver injury model at

[收稿日期] 20120627(008)

[基金项目] 贵州省中药现代化项目(黔科合中药字[2011]5032号)

[第一作者] 曹国琼, 硕士, 从事药物新制剂与新剂型研究, Tel:15885089935, E-mail:cgqxch1986@126.com

[通讯作者] *张永萍, 硕士, 教授, 从事药物新制剂与新剂型研究, Tel:0851-5615144, E-mail:zgygpg@126.com

[4] 赵保胜,董淑云,董淑云,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.

[5] 邓航,贺敏,李江,等. 柿叶多糖对糖尿病小鼠降血糖作用及其机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4):114.

[6] 邢莎莎,陈超. 香橼子总多酚对糖尿病小鼠的降血糖作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11):169.

[7] Mahnensmith R L. Diabetic nephropathy: a comprehensive approach [J]. Hosp Pract (Off Ed), 1993, 28(3):129.

[8] Sarafidis P A, Riehle J, Bogojevic Z, et al. A comparative evaluation of various methods for microalbuminuria screening [J]. Am J Nephrol, 2008, 28(2):324.

[9] 屈智慧,杨立志,赵颖,等. 糖尿病大鼠蛋白尿与肾脏病理及 nephrin 表达的相关性研究[J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(9):1441.

[10] Levin-Iaina N, Iaina A, Raz I. The emerging role of NO and IGF-1 in early renal hypertrophy in STZ-induced diabetic rats [J]. Betes Metab Res Rev, 2011, 27(3):235.

[11] Berfield A K, Chait A, Oram J F, et al. IGF-1 induces rat glomerular mesangial cells to accumulate triglyceride [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2006, 290(1):138.

[责任编辑 李玉洁]