

牛心柿叶多糖对糖尿病小鼠模型的降血糖作用

蔡忠华, 宋美桂*, 赖政宏, 徐叶叶

(广西来宾市武宣县人民医院, 广西 武宣 545900)

[摘要] **目的:**观察牛心柿叶多糖对链脲佐菌素致糖尿病小鼠降血糖作用。**方法:**建立糖尿病小鼠模型,随机分为模型组、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,连续灌胃 15 d。末次给药后葡萄糖氧化酶法测定空腹血糖(FBG);比色法测定血清中游离脂肪酸(FFA)和谷胱甘肽(GSH)水平及肝脏组织中总超氧化物歧化酶(T-SOD)活性和丙二醛(MDA)含量;Western blot 法检测胰腺胰岛受体底物-1(IRS-1)和组织的胰岛素受体(INSR)的表达。**结果:**与模型组比较,牛心柿叶多糖有效降低糖尿病小鼠的血糖($P < 0.05$);升高血清中 GSH 水平,同时降低 FFA 水平($P < 0.05$);提高肝组织中 T-SOD 水平,同时减少 MDA 含量($P < 0.05$);上调胰腺组织中 IRS-1, INSR 的蛋白水平($P < 0.05$)。**结论:**牛心柿叶多糖发挥有效的降血糖作用,机制可能与其对糖尿病小鼠肝脏组织脂质过氧化损伤的保护作用以及改善胰腺组织中 INS 信号转导通路有关。

[关键词] 牛心柿叶多糖; 糖尿病; 降血糖; 抗氧化; 信号通路

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)23-0238-04

Hypoglycemic Effect of Polysaccharide from Bovine Heart Persimmon Leaf in Diabetic Mice

CAI Zhong-hua, SONG Mei-gui*, LAI Zheng-hong, XU Ye-ye
(People' Hospital of Wuxuan, Wuxuan 545900, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the hypoglycemic effect of polysaccharide from bovine heart persimmon leaf in diabetic mice model induced by streptozotocin. **Method:** Diabetic mice model was established by injection of streptozotocin, then the mice were randomly divided into 5 groups: model group, dimethyldiguanide group (0.32 g·kg⁻¹), low-, medium-and high-dosage groups of polysaccharide of bovine heart persimmon leaf (0.3, 0.6, 1.2 g·kg⁻¹). The drugs were given to mice daily for 15 consecutive days. Fasting was carried out before administration for 12 h at the end of 15 days. The blood sample was collected via evulseing the mice eyes, and centrifuged to obtain serum for test. Glucose oxidase (GOD) was used to examine the index of glycemia for fasting plasma glucose (FBG); the levels of free fatty acids (FFA) and glutathione (GSH) in serum as well as the contents of total superoxide dismutase (T-SOD) and malondialdehyde (MDA) in liver tissue were tested by biochemical method. The expressions of IRS-1, INSR in pancreas were measured using Western blot analysis. **Result:** Compared to model control group, the polysaccharide could significantly decrease the level of blood-sugar in diabetic mice, the difference was statistically significant ($P < 0.05$), and increase GSH level in serum, while reduce the NEFA level, difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the model, the polysaccharide could also elevate T-SOD level in liver tissue, while reduce the content of MDA, difference was statistically significant ($P < 0.05$). It also up-regulated the levels of INSR, IRS-1 protein in pancreatic tissue, difference was significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** The polysaccharide of bovine heart persimmon leaf can play the role of hypoglycemic activity though the mechanism may be related to the protective effect of lipid peroxidation

[收稿日期] 20120505(012)

[第一作者] 蔡忠华, 学士, 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, 学士, 主管药师, 从事抗糖尿病研究, Tel:18778216231, E-mail:songmeigui78@163.com

injury in liver tissue and to improve INS signal transduction pathway in the pancreatic tissue of diabetic mice.

[**Key words**] polysaccharide from bovine heart persimmon leaf; diabetes; hypoglycemic activity; oxidation resistance; signaling pathway

牛心柿叶是广西地方中草药,民间已用来治疗糖尿病,效果良好。国内外药理研究表明柿叶具有降血压、降胆固醇、增强免疫功能、抗衰老、抗肿瘤等广泛的药理活性^[1-2]。本实验采用一次性腹腔注射链脲佐菌素(STZ)建立糖尿病小鼠模型,针对INS信号转导通路的形成及相关影响因素,探讨牛心柿叶多糖对INS通路的干预作用及其机制,为其降血糖机制的阐明、药物的开发提供理论依据。

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,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2012038)。游离脂肪酸(NEFA)测试盒(上海森雅生物技术有限公司,批号2012032)。谷胱甘肽(GSH)测试盒(上海森雅生物技术有限公司,批号2012031)。总超氧化物歧化酶(T-SOD)测试盒(上海森雅生物技术有限公司,批号2012038)。丙二醛(MDA)测试盒(上海森雅生物技术有限公司,批号2012039)。SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(上海西唐生物科技有限公司,批号WB1203)。多克隆抗体(批号SC-1236)。兔抗羊IgG-HRP抗体(上海江莱生物科技有限公司,批号2012-0312)。预染蛋白Marker(西安润德生物技术有限公司,批号RD1203)。

1.3 仪器 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)。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)。DDL-5型高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂)。

2 方法

2.1 牛心柿叶多糖提取 牛心柿叶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。参照张伟杰等^[3]方法采用“水提醇沉法”提取柿叶多糖:取1 kg干燥柿叶粗粉,加入9 L蒸馏水后加热提取6 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1 L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-硫酸法显色反应鉴定为多糖类化合物,并定性测定多糖含量为62.5 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 mol·L⁻¹的小鼠作为糖尿病模型^[4]。

2.3 分组及给药 经检测FBG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、高剂量组以及正常组。参照有关文献拟定给药^[5],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。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 应用葡萄糖氧化酶法测定空腹血糖(FBG);生物化学法(比色法)测定血清中游离脂肪酸(FFA)和谷胱甘肽(GSH)水平;并检测肝脏组织中总超氧化物歧化酶(T-SOD)活性和丙二醛(MDA)含量;Western blot法检测胰脏组织的胰岛素受体(INSR)和胰岛素受体底物-1(IRS-1)的表达。

2.5 Western blot法检测IRS-1, INSR的表达 参照Orkunoglu等^[6]方法,取各组小鼠胰脏组织约100 mg,剪碎成小块。5 000 r·min⁻¹离心1 min,上清移入EP管中,沉淀物中加入0.01 mL裂解缓冲液,混匀。取蛋白样品,根据上样浓度的量,煮沸10 min,每孔上样量为20 μg,同时上样Marker。取出PVDF膜,丽春红溶液染色10 min,用洗膜液洗10 min。将膜浸入5%脱脂奶粉中,封闭过夜。用杂交液稀释抗体,IRS-1单体为1:1 000(INSR则为1:1 500),将膜浸入抗体中,室温摇床上反应3 h。取出PVDF膜用洗膜液洗3次,每次15 min。与二抗反应,稀释抗体,IRS-1二抗为1:2 000(INSR则为1:3 000),将膜浸入抗体中,室温摇床上反应1 h。将PVDF放入暗盒,曝光、显影、定影、晾干保存。胶片应用图象分析系统进行分析。

2.6 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 STZ 致糖尿病小鼠 FBG 的影响 牛心柿叶多糖可明显降低 STZ 致糖尿病小鼠 FBG。给药前,模型组和给药各组的小鼠 FBG 显著升高,与正常组比较差别有统计意义($P < 0.05$)。给药后,给药各组的小鼠 FBG 均有所降低,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 STZ 致糖尿病小鼠 FBG 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	FBG/mmol·L ⁻¹		降糖率 /%
		药前	药后	
正常	-	6.72 ± 1.85	6.89 ± 1.92	-
模型	-	17.49 ± 3.66 ¹⁾	19.54 ± 4.01 ¹⁾	-
二甲双胍	0.32	18.07 ± 2.85 ¹⁾	14.16 ± 2.03 ²⁾	34.6
牛心柿叶多糖	0.3	17.85 ± 3.74 ¹⁾	16.84 ± 3.17 ²⁾	13.1
	0.6	18.13 ± 2.98 ¹⁾	15.96 ± 2.87 ²⁾	20.4
	1.2	17.56 ± 2.34 ¹⁾	14.27 ± 2.15 ²⁾	29.7

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2~3 同)。

3.2 对 STZ 致糖尿病小鼠 NEFA, GSH 的影响 模型组糖尿病小鼠血清中 FFA 水平显著升高,而 GSH 水平则显著降低,与正常组比较差别有统计意义($P < 0.05$)。给药后,二甲双胍组和牛心柿叶多糖治疗各组的 FFA 水平明显降低,而 GSH 水平则显著升高,与模型组比较差异有统计意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 牛心柿叶多糖对 STZ 致糖尿病小鼠血清中 NEFA, GSH 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	FFA	GSH
		/mmol·L ⁻¹	/g·L ⁻¹
正常	-	1.63 ± 0.59	84.52 ± 16.37
模型	-	3.18 ± 1.06 ¹⁾	36.71 ± 9.82 ¹⁾
二甲双胍	0.32	1.72 ± 0.64 ²⁾	72.45 ± 14.66 ²⁾
牛心柿叶多糖	0.3	2.65 ± 0.92 ²⁾	43.52 ± 11.79 ²⁾
	0.6	2.21 ± 0.81 ²⁾	52.79 ± 12.83 ²⁾
	1.2	1.98 ± 0.73 ²⁾	68.59 ± 13.27 ²⁾

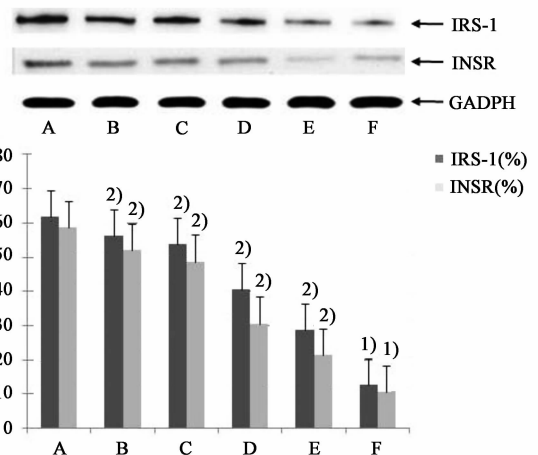
3.3 对 STZ 致糖尿病小鼠肝组织 T-SOD, MDA 的影响 模型组糖尿病小鼠肝组织中 T-SOD 水平显著降低,而 MDA 含量明显增多,与正常组比较差异有统计意义($P < 0.05$)。给药后,二甲双胍组和牛心柿叶多糖治疗各组小鼠肝组织中 T-SOD 水平明显增多,而 MDA 含量逐渐减少,与模型组比较差

别有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 牛心柿叶多糖对 STZ 致糖尿病小鼠肝组织 T-SOD, MDA 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	T-SOD	MDA
		/U·mg ⁻¹	/nmol·mg ⁻¹
正常	-	182.35 ± 46.49	6.53 ± 1.47
模型	-	91.24 ± 23.57 ¹⁾	14.29 ± 3.95 ¹⁾
二甲双胍	0.32	175.89 ± 42.31 ²⁾	7.36 ± 1.83 ²⁾
牛心柿叶多糖	0.3	118.63 ± 27.49 ²⁾	12.86 ± 3.04 ²⁾
	0.6	137.48 ± 31.05 ²⁾	10.35 ± 2.62 ²⁾
	1.2	169.62 ± 38.87 ²⁾	8.29 ± 2.05 ²⁾

3.4 对 STZ 致糖尿病小鼠胰脏中 IRS-1, INSR 表达的影响 Western blot 结果显示,模型组糖尿病小鼠胰脏中 IRS-1, INSR 水平明显下调,与正常组比较差异有统计意义($P < 0.05$)。给药后,二甲双胍和牛心柿叶多糖各组有效地上调糖尿病小鼠胰脏中 IRS-1, INSR 的蛋白水平,与模型组比较差别有统计意义($P < 0.05$)。见图 1。



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

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

图 1 牛心柿叶多糖对 STZ 致糖尿病小鼠胰脏中 IRS-1, INSR 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

4 讨论

糖尿病是终生性疾病,其各种并发症已成为糖尿病患者致残及早亡的主要原因,临床上其病发以慢性高血糖为主要特征的代谢紊乱^[7]。调控血糖水平是糖尿病治疗的有效措施之一。本实验显示,二甲双胍、牛心柿叶多糖各给药组均不同程度降低糖尿病小鼠的血糖水平,并呈现出剂量-时间依赖

性,提示牛心柿叶多糖具有良好的治疗效果。

肝脏是调节血糖浓度的主要器官之一,它对维持血糖的稳定有着重要作用^[8]。实验证明过量 FFA 对肝脏的有毒性效应并导致细胞功能紊乱,严重阻碍糖原异生作用^[9]。此外,超氧化物歧化酶(SOD)具有平衡机体 ROS 的能力,而降低脂质过氧化终产物丙二醛(MDA)含量可缓解机体介导的免疫损伤^[10]。本实验结果表明,二甲双胍、牛心柿叶多糖能明显提高糖尿病小鼠血清中 GSH 水平,并降低 FFA 的水平,同时提高肝脏组织中 SOD 水平,并降低 MDA 含量,说明牛心柿叶多糖能够提高糖尿病小鼠肝脏抗氧化应激能力,同时对抗糖脂毒性作用,改善糖尿病小鼠肝脏的功能。推测其对糖尿病小鼠脂质过氧化损伤的保护作用可能是其降血糖的机制之一。

实验表明,胰脏组织中存在胰岛素受体底物 IRS-1,IRS-1 信号通路主要与糖代谢功能的调控有关^[11]。因此,INS 信号传递减弱或受阻会触发胰岛素抵抗(IR)的发生和发展,并影响血糖代谢^[12]。实验结果显示,糖尿病小鼠胰脏组织中 IRS-1,INSR 表达明显下调,并带动血浆 FFA 水平上升后,阻碍 IRS-1,INSR 磷酸化进程,致使胰岛细胞 INS 信号转导通路受影响,最终造成胰脏功能障碍。给予二甲双胍、牛心柿叶多糖治疗后,糖尿病小鼠血糖代谢得到有效改善,表现为胰脏组织中 IRS-1,INSR 的表达显著上调,可能与其改善 STZ 致糖尿病小鼠胰脏组织中 INS 信号转导通路而发挥降血糖作用有关。

[参考文献]

- [1] 郑皓,鲁周民,刘月梅,等.柿叶的药理作用研究进展及开发利用现状[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2007,35(12):81.
- [2] Kawakami K, Aketa S, Sakai H, et al. Antihypertensive and vasorelaxant effects of water-soluble proanthocyanidins from persimmon leaf tea in

- spontaneously hypertensive rats [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2011,75(8):1435.
- [3] 张伟杰,王鹏,林茜,等.3种中药多糖的提取工艺[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(16):19.
- [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] Orkunoglu Suer F E, Mergen H. Molecular scanning for mutations in the insulin receptor substrate-1 (IRS-1) gene in Turkish with type 2 diabetes mellitus [J]. *Endocr J*. 2005,52(5):593.
- [7] 付士玲,姚莉敏.糖尿病合并感染的临床分析[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(6):260.
- [8] Katsube T, Yamasaki M, Shiwaku K, et al. Effect of flavonol glycoside in mulberry (*Morus alba* L.) leaf on glucose metabolism and oxidative stress in liver in diet-induced obese mice [J]. *J Sci Food Agric*, 2010,90(14):2386.
- [9] Ibdah J A, Paul H, Zhao Y, et al. Lack of mitochondrial trifunctional protein in mice causes neonatal hypoglycemia and sudden death [J]. *J Clin Invest*. 2001,107(11):1403.
- [10] Ray G, Husain S A. Oxidants, antioxidants and carcinogenesis [J]. *Indian J Exp Biol*, 2002,40(11):1213.
- [11] 洪靖,李光伟. IRS-1 基因与肥胖、2 型糖尿病 [J]. 中日友好医院学报,2003,17(2):107.
- [12] Tuo Y, Wang D, Li S, et al. Long-term exposure of INS-1 rat insulinoma cells to linoleic acid and glucose *in vitro* affects cell viability and function through mitochondrial-mediated pathways [J]. *Endocrine*, 2011,39(2):128.

[责任编辑 李玉洁]