

枸杞多糖对大鼠糖尿病的作用研究

黄云兰^{*}, 梁耿, 韦凯东

(广西钦州市第二人民医院药剂科, 广西 钦州 535099)

[摘要] **目的:**研究枸杞多糖对链脲佐菌素(STZ)致糖尿病大鼠的影响。**方法:**雄性 SD 大鼠 50 只腹腔注射 STZ 40 mg·kg⁻¹ 建立糖尿病模型。经检测空腹血糖(FBG)指数确定建立模型后随机分成 5 组:模型组、罗格列酮阳性组及枸杞多糖低、中、高剂量组,每组 10 只。ig 给予枸杞多糖 0.4, 0.8, 1.6 g·kg⁻¹·d⁻¹, 阳性组给予罗格列酮 0.4 g·kg⁻¹·d⁻¹, 正常组及模型组则给予等量生理盐水,连续 ig 30 d。进行行为学观察,采用葡萄糖氧化酶法测定 FBG;放射免疫法测定空腹胰岛素(FNS)、胰岛素敏感指数(ISI)及胰岛素抵抗(IR);酶联免疫法(ELISA)测定大鼠血清瘦素(Leptin)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白介素-6(IL-6);RT-PCR 测定胰岛组织诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的表达。**结果:**与模型对照组比较,给药组明显缓解糖尿病大鼠病情,枸杞多糖显著降低糖尿病大鼠的血糖和有效恢复胰岛素水平($P < 0.01$),并显著降低血清中炎症因子的水平($P < 0.01$);此外,下调胰岛组织中 iNOS mRNA 的表达($P < 0.01$)。**结论:**枸杞多糖对糖尿病大鼠具有明显疗效,其机制可能与恢复糖尿病大鼠胰岛功能以及增强机体抗氧化应激能力和抑制脂毒性有关。

[关键词] 枸杞多糖;降血糖;抗氧化应激;胰岛素;iNOS

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)22-0275-04

Study of Wolfberry Polysaccharide on Diabetic Rats Induced by Streptozotocin

HUANG Yun-lan^{*}, LIANG Geng, WEI Kai-dong

(Second People Hospital of Qinzhou, Qinzhou 535099, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of wolfberry polysaccharide on diabetic rats induced by streptozotocin. **Method:** Fifty male SD rats were injected peritoneally by streptozotocin (STZ) with a dose of 40 mg·kg⁻¹ to establish diabetic rat models. Successful rats model confirmed by detecting fasting blood-glucose (FBG) were randomly divided into 5 groups: normal control group, model group, rogridone group (0.4 g·kg⁻¹·d⁻¹), low-, medium- and high-dosage groups of wolfberry polysaccharide (0.4, 0.8, 1.6 g·kg⁻¹·d⁻¹). The rats in the normal and model control groups were given same volume of normal saline. The drugs were given to mice daily for 30 consecutive days. Glucose oxidase (GOD) method and radioimmunoassay (RIA) were used to examine the Fasting blood glucose (FBG); fasting insulin (FNS), the insulin sensitivity index (ISI) and insulin resistance (IR), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine serum leptin, tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6), iNOS expression in islet tissue was measured with RT-PCR assay. **Result:** Wolfberry polysaccharide significantly reduce the levels of blood-sugar, and effectively alleviate insulin levels ($P < 0.01$), reduce serum levels of inflammatory factor significantly ($P < 0.01$) and in addition, down-regulate iNOS mRNA expression in islets ($P < 0.01$). **Conclusion:** The results suggest that wolfberry polysaccharide has the obvious hypoglycemic and hypolipidemic effects which is related to its improving antioxidant capacity and restoring islet function and inhibiting lipotoxicity.

[Key words] wolfberry polysaccharide; hypoglycemic activity; anti-oxidative stress; insulin; iNOS

枸杞含有黄酮类、多糖、多种氨基酸、生物碱、挥发油等多种天然化学成分。现代药理研究表明,枸杞具有抗氧化、抗衰老、抗肿瘤、降压、降脂、降血糖和增强机体免疫力等功效^[1-2]。据文献报道,枸杞在治疗糖尿病及其并发症方面有一定的治疗作用^[3-4]。本实验通过建立链脲佐菌素致糖尿病大鼠模型,探讨枸杞多糖对糖尿病大鼠的影响及其可能的作用机制,为其今后对糖尿病的药物开发利用奠定理论基础。

1 材料

1.1 枸杞多糖制备 经广西中医药研究院鉴定,枸杞为茄科落叶灌木植物宁夏枸杞 (*Lycium barbarum* L) 的成熟果实。实验提取流程:枸杞碎粉 0.5 kg,加 4 500 mL 蒸馏水,煮 3 次,每次 2 h,纱布过滤,合并滤液,高速离心 15 min,用微波真空干燥器浓缩,得浓缩液 500 mL,置冰箱中放置(4 ℃) 1 d,高速离心 15 min,过滤,加入分析纯 95% 乙醇,使乙醇终浓度为 85%,醇沉 12 h,抽滤,收集药渣,再用无水乙醇、丙酮洗涤 3 次,所得药渣定性测定仅含多糖和蛋白质,Sevag 法除去蛋白质,经化学法鉴别为枸杞多糖即可使用。

1.2 动物 雄性 SD 大鼠 60 只,体重(200 ± 20) g,购自广西医科大学实验动物中心,动物合格证号 SCXK(桂)2009-0002。

1.3 药物与试剂 链脲佐菌素(STZ),美国 Sigma 公司,批号 80082038。罗格列酮,成都恒瑞制药有限公司,批号 201110265。血糖试剂盒,四川迈克科技股份有限公司生产,批号 1202024。胰岛素放射免疫分析试剂盒,北京北方生物技术研究所产品,批号 120235。TNF- α 放免试剂盒,北京北方生物技术研究所,批号 120246。Leptin ELISA 试剂盒,武汉博士德生物工程有限公司,批号 20120204。IL-6 ELISA 试剂盒,武汉博士德生物工程有限公司,批号 20120221。cDNA 逆转录试剂盒, Fermentas 公司,批号 00065429。总 RNA 提取试剂盒,北京天根生化科技有限公司,批号 K8975。RT-PCR 试剂盒,日本 Takara 公司,批号 RE1201-6。

1.4 仪器 DFM-96 型多管放射免疫计数器(众成机电技术公司)。722S 紫外分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)。DDL-5 高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂)。WBZ-2 微波真空干燥机(贵阳新奇微波工业有限责任公司)。9602A 酶标仪(北京艾普生物设备有限公司)。ABI Stepone Plus 型实时荧光定量 PCR 仪(美国

ABI 公司)。5810 型高速低温离心机(德国 Eppendorf 公司)。凝胶电泳成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 糖尿病大鼠模型 大鼠造模前禁食 12 h,腹腔注射 STZ 溶液 40 mg·kg⁻¹, 2 d 后尾静脉采血测空腹血糖(FBG),选取 FBG ≥ 16.8 mol·L⁻¹ 的作为糖尿病大鼠模型^[5]。

2.2 分组及给药 除正常对照组(10 只),经检测空腹血糖(FBG)指数确定成模后,随机分成 5 组:模型组、罗格列酮阳性组及枸杞多糖低、中、高剂量组,每组 10 只。ig 给予枸杞多糖 0.4, 0.8, 1.6 g·kg⁻¹·d⁻¹, 阳性组给予罗格列酮 0.4 g·kg⁻¹·d⁻¹, 正常组及模型组则给予等量生理盐水,连续 ig 30 d。观察大鼠的精神活动、毛发改变、饮水量、进食量、大小便等一般状态,并记录体重变化情况、死亡情况等。在第 30 天给药前禁食 12 h,给药 1 h 后摘眼球取血,离心取血清待测。

2.3 检测方法 应用葡萄糖氧化酶法测定空腹血糖(FBG),放射免疫法测定空腹胰岛素(FINS)、胰岛素敏感指数(ISI)及胰岛素抵抗(IR),酶联免疫法(ELISA)测定大鼠血清瘦素(Leptin)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白介素-6(IL-6)。实验步骤均按照厂家试剂盒使用说明进行。

$$\text{降糖率} = (\text{用药前空腹血糖} - \text{用药后空腹血糖}) / \text{用药前空腹血糖} \times 100\%$$

$$\text{胰岛素敏感性指数(ISI)} = \text{Ln}[1 / (\text{FINS} \times \text{FBG})]$$

2.4 RT-PCR 法检测 iNOS mRNA 的表达 采用 Trizol 法抽提细胞中总 RNA,用核酸蛋白测定仪测定 RNA 含量及纯度, A₂₆₀/A₂₈₀ 均在 1.8 ~ 2.0。取 cDNA 5 μ g,采用 M-MuLV 逆转录酶将其逆转录成 cDNA。引物序列为: iNOS: FP: 5'-TCACCTATCGCACCCG-3', RP: 5'-CGCCACAAACATAAA-3', 产物长度: 472 bp; GAPDH: FP: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3', RP': 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3', 产物长度: 240 bp。PCR 扩增 cDNA,条件为:95 ℃ 预变性 5 min,95 ℃ 变性 30 s,退火 30 s,70 ℃ 延伸 30 s,30 个循环后,70 ℃ 延伸 10 min。所有 PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶上电泳后,用凝胶成像系统拍照,Quantity One 软件测定灰度值。

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* < 0.01 有统计学意义。

3 结果

3.1 对糖尿病大鼠模型的一般状况的影响 实验观察到糖尿病大鼠模型形体明显消瘦,精神萎靡,毛竖无光泽,伴有多食、多饮和多尿等症状。灌胃给药后,罗格列酮、枸杞多糖组的大鼠较模型组表现为体重增长明显,精神状态良好,粪尿有所正常。见表1。

表1 枸杞多糖对糖尿病大鼠体重的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$) g

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	初始体重	第15天体重	第30天体重
正常	-	205.12 ± 15.79	245.53 ± 24.25	292.89 ± 28.12
模型	-	206.31 ± 15.58	182.74 ± 12.51 ¹⁾	145.41 ± 11.86 ¹⁾
罗格列酮	0.004	204.45 ± 18.12	228.11 ± 22.71 ²⁾	268.72 ± 25.42 ²⁾
枸杞多糖	0.4	206.83 ± 17.63	214.58 ± 20.30 ²⁾	243.63 ± 23.24 ²⁾
	0.8	205.73 ± 16.29	223.65 ± 21.54 ²⁾	259.32 ± 24.52 ²⁾
	1.6	206.28 ± 15.53	231.80 ± 22.29 ²⁾	274.74 ± 25.17 ²⁾

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

3.2 对糖尿病大鼠模型FBG的影响 实验表明,模型组大鼠与正常组比较FBG显著增高。药物干预后,枸杞多糖可有效降低糖尿病大鼠的血糖水平,即FBG逐渐降低,差别有统计学意义($P < 0.01$)。但与正常组比较,给药各组FBG均高于正常组,差别有统计学意义($P < 0.01$)。见表2。

表2 枸杞多糖对糖尿病大鼠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	-	6.02 ± 1.82	6.51 ± 1.71	
模型	-	17.96 ± 1.59 ¹⁾	17.85 ± 2.43 ¹⁾	
罗格列酮	0.004	17.23 ± 2.13 ¹⁾	12.35 ± 1.26 ²⁾	32.4
枸杞多糖	0.4	17.58 ± 2.27 ¹⁾	14.31 ± 2.36 ²⁾	18.6
	0.8	16.74 ± 2.43 ¹⁾	12.07 ± 2.41 ²⁾	27.9
	1.6	17.26 ± 2.53 ¹⁾	11.31 ± 2.19 ²⁾	34.5

3.3 对糖尿病大鼠模型FNS, ISI, IR的影响 与正常组比较,模型组胰岛素水平异常升高,出现胰岛素抵抗现象,差别有统计学意义($P < 0.01$)。药物治疗后,罗格列酮组和其他各组大鼠FNS水平较模型组有明显下降,差别有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,罗格列酮组和枸杞多糖高、中、低剂量组的ISI有所提高,而罗格列酮组和枸杞多糖高、中、低剂量组的IR下降,差别有统计学意义($P < 0.01$)。提示枸杞多糖能明显提高糖尿病大鼠对胰岛素的敏感性。见表3。

3.4 枸杞多糖对糖尿病大鼠血清Leptin, IL-6, TNF-α水平的影响 与正常组比较,糖尿病大鼠模型组血清中的Leptin, IL-6, TNF-α水平明显升高,差别有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组相比,罗格列酮组和枸杞多糖高、中、低剂量组的Leptin, IL-6, TNF-α水平均有所降低,差别有统计学意义($P < 0.01$)。见表4。

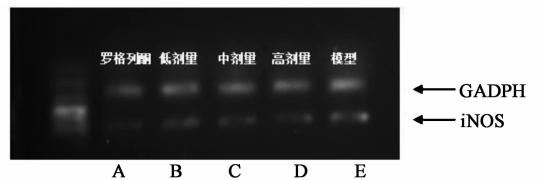
表3 枸杞多糖对糖尿病大鼠FNS, ISI, IR的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	FNS /μU·mL ⁻¹	ISI	IR
正常	-	9.98 ± 1.43	-4.09 ± 0.39	1.57 ± 0.36
模型	-	31.27 ± 4.81 ¹⁾	-6.32 ± 0.37 ¹⁾	3.61 ± 0.41 ¹⁾
罗格列酮	0.004	20.37 ± 4.38 ²⁾	-5.54 ± 0.45 ²⁾	3.01 ± 0.52 ²⁾
枸杞多糖	0.4	28.95 ± 3.19 ²⁾	-6.12 ± 0.52 ²⁾	3.45 ± 0.31 ²⁾
	0.8	26.55 ± 5.74 ²⁾	-5.71 ± 0.61 ²⁾	3.23 ± 0.33 ²⁾
	1.6	20.07 ± 5.13 ²⁾	-5.18 ± 0.42 ²⁾	3.02 ± 0.47 ²⁾

表4 枸杞多糖对糖尿病大鼠血清Leptin, IL-6, TNF-α水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	Leptin /μg·L ⁻¹	IL-6 /pg·mL ⁻¹	TNF-α /ng·mL ⁻¹
正常	-	2.36 ± 0.58	72.93 ± 6.91	0.39 ± 0.18
模型	-	4.28 ± 0.91 ¹⁾	95.71 ± 9.63 ¹⁾	1.65 ± 0.23 ¹⁾
罗格列酮	0.004	2.69 ± 0.84 ²⁾	84.19 ± 8.24 ²⁾	0.96 ± 0.17 ²⁾
枸杞多糖	0.4	3.90 ± 0.71 ²⁾	90.32 ± 8.74 ²⁾	1.52 ± 0.14 ²⁾
	0.8	3.31 ± 0.63 ²⁾	87.93 ± 8.56 ²⁾	1.38 ± 0.15 ²⁾
	1.6	2.74 ± 0.69 ²⁾	85.25 ± 8.33 ²⁾	0.94 ± 0.16 ²⁾

3.5 对糖尿病大鼠胰岛组织iNOS mRNA的影响 与模型组比较,罗格列酮组和枸杞多糖组有效下调胰岛细胞iNOS mRNA水平,差别有统计学意义($P < 0.01$)。其中,枸杞多糖高剂量组的效果最为明显,可能与其含多糖量最多有关。见图1。



A. 罗格列酮0.004 mg·kg⁻¹组; B. 枸杞多糖0.4 mg·kg⁻¹组; C. 枸杞多糖0.8 mg·kg⁻¹组; D. 枸杞多糖1.6 mg·kg⁻¹组; E. 模型组

图1 枸杞多糖对糖尿病大鼠胰岛组织iNOS mRNA的影响

4 讨论

糖尿病是胰岛功能减退、胰岛素抵抗等原因引发的糖、蛋白质、脂肪、水和电解质等一系列代谢紊乱综合征,是一种慢性的终身性疾病,且患病率有上升的趋势^[6]。糖尿病的主要临床症状多为“三多一少”多食、多饮、多尿及消瘦^[7]。而糖尿病治疗策略主要为降血糖和恢复胰岛素水平。实验结果显示,罗格列酮、枸杞多糖对糖尿病大鼠有显著降血糖效果,此外枸杞多糖能缓解糖尿病大鼠的体重下降状况和改善大鼠的精神状态。

研究表明,iNOS 的表达通过合成释放 NO 介导胰岛组织的损伤^[8]。NO 对胰岛 β 细胞损伤机制主要为:超氧化自由基对 β 细胞攻击;裂解 β 细胞 DNA 断链诱导细胞凋亡;引发 β 细胞能量代谢障碍,导致其死亡;直接激活环氧化酶(COX-1,2)触发炎症反应^[9-11]。因此,阻断 iNOS/NO 对 β 细胞的损伤作用对改善胰岛功能有重要意义。实验结果表明,模型组胰岛组织中 iNOS mRNA 表达较活跃,推测其介导 β 细胞损伤而降低胰岛素释放。罗格列酮和枸杞多糖治疗组能有效抑制胰岛组织中 iNOS 表达,阻断 NO 对 β 细胞的损伤,增强抗氧化应激能力,并改善胰岛功能。

胰岛素抵抗(IR)是诱发糖尿病发病的基础之一^[12-13],胰岛素抵抗能提高引起血浆中胰岛素和血糖的水平,导致代谢综合征和胰岛素的分泌缺陷。目前以胰岛素抵抗为靶向的药物干预是抗糖尿药物研发的新策略之一。Leptin, TNF- α , IL-6 属于血清的炎症因子,降低血清的炎症因子,能改善机体脂代谢并降低机体脂毒性,从而改善 IR^[14-15]。本实验结果显示,给予枸杞多糖治疗后,大鼠的胰岛素敏感指数均有所增加,血清中的 Leptin, IL-6, TNF- α 水平均有下降,提示枸杞多糖能有效提高胰岛素敏感指数,改善胰岛素抵抗状态和缓解脂毒性,对糖尿病大鼠有一定的治疗作用。

[参考文献]

[1] 蒋万志,张洪泉. 枸杞多糖在免疫和抗衰老方面的研究进展[J]. 中国野生植物资源,2010,6(2):5.
[2] 顾云燕,吴瑾瑾. 枸杞多糖抗肿瘤作用实验研究进展

[J]. 浙江临床医学,2007,9(9):1255.
[3] 左红举,喇万英. 枸杞多糖的降血糖作用及对糖尿病并发症的研究现状和展望[J]. 甘肃中医,2009,22(4):77.
[4] 王玲,张才军,李维波,等. 枸杞多糖-D 对四氧嘧啶糖尿病小鼠高血糖的防治作用[J]. 河北中医,2000,22(2):159.
[5] Hong L L, Xu G X, Shen G M, et al. Establishment of the model of type 2 diabetes in SD rats [J]. Lab Ani Sci & Admi, 2005,22(4):1.
[6] 刘德慧,邢翔飞. 2 型糖尿病大鼠模型的特点及评价[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(12):212.
[7] Samsom M, Bharucha A, Gerich J E, et al. Diabetes mellitus and gastric emptying: questions and issues in clinical practice[J]. Diabetes Metab Res Rev, 2009,25(6):502.
[8] Giannoukakis N, Mi Z, Rudert W A, et al. Prevention of beta cell dysfunction and apoptosis activation in human islets by adenoviral gene transfer of the insulin-like growth factor I[J]. Gene Ther, 2000,7(23):2015.
[9] Lenzen S. Oxidative stress: the vulnerable beta-cell[J]. Biochem Soc Trans. 2008,36(3):343.
[10] Wang M, Cramer M, Pugazhenth S. Modulation of apoptosis pathways by oxidative stress and autophagy in β cells[J]. Exp Diabetes Res, 2012,20(2):64.
[11] Calle M C, Fernandez M L. Effects of resistance training on the inflammatory response [J]. Nutr Res Pract, 2010,4(4):259.
[12] 刘永生,李晓坤,王金菊. 苦瓜总皂苷对 2 型糖尿病模型大鼠胰岛素抵抗、脂联素和瘦素的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(9):177.
[13] Defronzo R A. Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links [J]. Diabetologia, 2010,53(7):1270.
[14] Schulte D M, Müller N, Neumann K, et al. Pro-inflammatory wnt5a and anti-inflammatory sFRP5 are differentially regulated by nutritional factors in obese human subjects[J]. PLoS One, 2012,7(2):32.
[15] 余臣祖,安小平,康学东,等. 黄金胶囊对 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(3):199.

[责任编辑 李玉洁]