

牛心柿叶多糖对链脲佐菌素致糖尿病小鼠 胰脏损伤的保护作用

宋美桂, 赖政宏, 徐叶叶, 蔡忠华*

(广西来宾市武宣县人民医院, 广西 武宣 545900)

[摘要] **目的:**研究牛心柿叶多糖对链脲佐菌素致糖尿病小鼠胰脏损伤的保护作用。**方法:**建立糖尿病小鼠模型,随机分为模型组、二甲双胍组($32\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)及牛心柿叶多糖低、中、高剂量组($30, 60, 120\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),连续灌胃给药15 d。采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);酶联免疫法(ELISA)测定血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白介素-8(IL-8)和白介素-6(IL-6);HE染色观察小鼠胰脏病理形态;Western blot检测胰脏中核转录因子 κB (NF- κB)的表达。**结果:**与模型组比较,牛心柿叶多糖明显降低糖尿病小鼠血糖,恢复胰岛素水平($P < 0.05$);可降低血清炎症细胞因子水平($P < 0.05$),对胰脏损伤有保护作用,并下调胰脏组织中NF- κB 蛋白水平。**结论:**牛心柿叶多糖具有降血糖和调节胰岛素作用,可能与其恢复糖尿病小鼠胰岛功能以及抑制胰脏中炎症因子有关。

[关键词] 牛心柿叶多糖; 降血糖; 胰岛素; NF- κB ; 保护作用

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)20-0247-04

Protective Effect of Polysaccharides from Niuxin Persimmon Leaf on Pancreas Injury Induced by Streptozotocin in Diabetic Mouse

SONG Mei-gui, LAI Zheng-hong, XU Ye-ye, CAI Zhong-hua*

(People's Hospital of Wuxuan, Wuxuan 545900, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protective effect of polysaccharides from Niuxin persimmon leaf on pancreas injury induced by streptozotocin (STZ) in diabetic mouse. **Method:** Diabetic mice model was established by injection of STZ. The model mice were randomly divided into 5 groups: model group, dimethyldiguanide group ($32\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), low-, medium-and high-dosage groups of Niu Xin persimmon leaf polysaccharides ($30, 60, 120\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). The drugs were given to mice daily for 15 consecutive days. Fasting 12 h at the end of 15th day, the blood samples were collected and centrifuged to obtain serum for test. Glucose oxidase (GOD) and radioimmunoassay (RIA) were used to examine the index of glycemia and insulin for fasting blood glucose (FBG) and fasting insulin (FINS); the levels of tumor necrosis factor (TNF), interleukin-8 (IL-8), interleukin-6 (IL-6) in serum were tested by ELISA. Pathological change was observed by HE staining for mouse pancreas specimens; Expression of NF- κB in pancreas was determined using Western blot analysis. **Result:** Compared to model control group, Niuxin persimmon polysaccharides significantly reduced the levels of blood-sugar and restored insulin levels in diabetic mice, with significant difference ($P < 0.05$). Inflammatory cytokine levels in serum were reduced by the polysaccharides with a significant difference ($P < 0.05$). The polysaccharides also showed protective effect against the pancreatic injury; as well as down-regulation of NF- κB protein in pancreatic tissue. **Conclusion:** Niuxin persimmon leaf polysaccharides can play the role of hypoglycemic activity and regulation of insulin. The mechanism may be associated with restoring islet function and inhibition of the inflammatory pathway

[收稿日期] 20120416(001)

[第一作者] 宋美桂, 主管药师, 从事糖尿病研究, Tel: 18778216231, E-mail: songmeigui78@163.com

[通讯作者] * 蔡忠华, 主管药师, 从事糖尿病研究, Tel: 13978281565, E-mail: caizhonghua668@163.com

in the pancreas.

[Key words] Niuxin persimmon leaf polysaccharides; hypoglycemic activity; insulin; NF- κ B; protection

牛心柿叶是广西特色的中草药之一,资源丰富,因其具有良好的治疗糖尿病效果在民间广为使用。实验研究表明,柿叶中含有天然黄酮类、多糖、三萜类、酚类等有效成分^[1]。可生津止渴、活血止血,止咳定喘,具有降血糖、降血压、降胆固醇、软化血管、抗衰老、抗肿瘤等药理效应^[2]。本研究建立链脲佐菌素(STZ)诱发糖尿病小鼠模型,以核因子 κ B(NF- κ B)信号通路为研究对象,从抑制炎症通路角度探讨牛心柿叶多糖治疗糖尿病的作用,为其治疗糖尿病提供实验依据和理论支持。

1 材料

1.1 动物 SPF 级昆明种小鼠,雌雄各半,体重(20±2)g,动物使用许可证号 SYXK(桂)2009-0004。由广西医科大学实验动物中心提供。

1.2 药物与试剂 链脲佐菌素(STZ),美国 Sigma 公司,批号 8008193342。二甲双胍片,北京京丰制药有限公司,批号 120216。血糖试剂盒,四川迈克科技股份有限公司,批号 2012038。胰岛素放射免疫分析试剂盒,北京北方生物技术研究所,批号 120342。肿瘤坏死因子(TNF- α)试剂盒,白介素 8(IL-8)试剂盒(ELISA),白介素 6(IL-6)试剂盒(ELISA),南京建成生物工程研究所生产,批号分别为 2012036,2012039,2012031。SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液,碧云天生物技术研究所,批号 DZ12037。多克隆抗体, Santa Cruz Biotechnology,批号 SC-1238。HRP 标记的兔抗羊 IgG 抗体, Santa Cruz Biotechnology,批号 SC-1235。预染蛋白 Marker, Fermentas 公司,批号 SM1203。

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)。Gel doc 2000 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 牛心柿叶多糖制备 牛心柿叶(Niuxin Persimmon leaf)经广西中医药研究院考证为柿科植物柿(*Diospyros kaki* L. f.)的干燥叶。多糖提取参照金迪等^[3]方法采用“水提醇沉法”:取 1 000 g 干

燥柿叶粉碎成粗粉,加入 9 000 mL 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 1 000 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,Sevag 法除去蛋白质,经苯酚-硫酸法鉴别为多糖即可使用。

2.2 小鼠糖尿病模型建立 造模前小鼠禁食 12 h,受试小鼠腹腔 STZ 150 mg·kg⁻¹。72 h 后眼内眦采血测空腹血糖(FBG),选取 FBG \geq 11.1 mmol·L⁻¹的小鼠作为糖尿病模型^[4]。

2.3 分组及给药 经血测 FBG 指数确定成模后,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、高剂量组和正常组。参照相关文献^[5-6],ig 给予牛心柿叶多糖 30,60,120 mg·kg⁻¹,阳性组给予二甲双胍 32 mg·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。应用葡萄糖氧化酶法测定 FBG;放射免疫法测定空腹胰岛素(FNS);ELISA 测定血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白介素-8(IL-8)和白介素-6(IL-6)水平;HE 染色观察小鼠胰脏病理形态;Western blot 法检测胰脏中核转录因子 κ B(NF- κ B)的表达。

2.4 Western blot 法检测 NF- κ B 蛋白 参照 Mariappan 等^[7]实验方法,取胰脏标本加 100 μ L 蛋白裂解液(Tris-HCl,pH 7.5;100 mmol·L⁻¹ EDTA,0.5 mmol·L⁻¹ PMSF)裂解,高速离心 15 min。取上清测蛋白浓度至 5 g·L⁻¹,SDS-PAGE 蛋白缓冲液按比例加热混合,低温离心 10 min,取上清分装置-20 $^{\circ}$ C 备用。制备 SDS-PAGE 胶,4 $^{\circ}$ C 保存过夜,之后上样进行垂直电泳,用 SDS-PAGE 胶分离后转移到 PVDF 膜上,PVDF 膜用含有 5% 脱脂奶粉的 TBST(Tris-HCl,pH 7.4;0.2% Tween-20)溶液封闭 1 h 后,加入相应一抗在 4 $^{\circ}$ C 共摇床孵育过夜,用 TBST 洗 3 次,每次 5 min,加相应二抗(1:2 000)在室温摇床孵育 1 h,经 TBST 洗 3 次,每次 5 min。在暗房内用发光剂发光,显影,定影,分析。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计软件,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 实验数据表明,糖尿病模型组中小鼠 FBG 异常升高,与正常组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。药物干预后,二甲双胍组和牛心柿叶多糖组有效地降低 STZ 致糖尿病小鼠的 FBG 水平($P < 0.05$)。与正常组比较,药物干预组小鼠的 FBG 均高于正常组,差异无统计学意义。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 /mg·kg ⁻¹	FBG/mmol·L ⁻¹	
		药前	药后
正常	-	6.23 ± 0.71	7.84 ± 0.83
模型	-	15.94 ± 1.52	18.06 ± 2.04 ¹⁾
二甲双胍	32	16.15 ± 1.54	11.74 ± 1.18 ²⁾
牛心柿叶多糖	30	17.01 ± 1.63	15.83 ± 1.47 ²⁾
	60	16.87 ± 1.59	13.87 ± 1.25 ²⁾
	120	16.35 ± 1.56	11.25 ± 1.09 ²⁾

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

3.2 对 STZ 致糖尿病小鼠 FINS 的影响 模型组中小鼠血清胰岛素水平显著升高,并引发了胰岛素抵

表 3 牛心柿叶多糖对 STZ 致糖尿病小鼠血清中炎症因子的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	mmol·L ⁻¹		
		TNF- α	IL-8	IL-6
正常	-	0.059 ± 0.002 1	0.064 ± 0.002 9	0.078 ± 0.003 5
模型	-	0.165 ± 0.047 3 ¹⁾	0.192 ± 0.058 6 ¹⁾	0.215 ± 0.064 9 ¹⁾
二甲双胍	32	0.071 ± 0.005 2 ²⁾	0.085 ± 0.006 4 ²⁾	0.112 ± 0.023 7 ²⁾
牛心柿叶多糖	30	0.108 ± 0.020 8 ²⁾	0.123 ± 0.035 7 ²⁾	0.164 ± 0.045 2 ²⁾
	60	0.096 ± 0.013 5 ²⁾	0.106 ± 0.018 2 ²⁾	0.141 ± 0.037 4 ²⁾
	120	0.078 ± 0.005 9 ²⁾	0.091 ± 0.007 3 ²⁾	0.119 ± 0.025 3 ²⁾

3.4 小鼠胰岛形态学观察 HE 染色结果显示,正常组胰岛是完整的椭圆形细胞团,细胞排列均匀,存在于胰腺与腺泡之间,数量较多且清晰。与正常组比较,模型组中胰岛形态紊乱疏松,数目明显减少。二甲双胍组胰岛结构恢复,边缘清晰,细胞数量得到恢复。牛心柿叶多糖低剂量组,胰岛细胞数量减少,细胞形态有一定程度的恢复。中剂量组胰岛结构清晰,胰岛细胞数量逐渐增多。高剂量组胰岛细胞分布较均匀,四周明显,细胞数目比模型组有明显增加。提示二甲双胍、牛心柿叶多糖对 STZ 致糖尿病小鼠胰岛细胞损伤有一定的保护作用。见图 1。

3.5 对 STZ 致糖尿病小鼠胰脏中 NF- κ B 表达的影响 Western blot 结果表明,糖尿病模型组小鼠胰脏中 NF- κ B 蛋白水平明显上调,与正常组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。药物干预后,二甲双胍组和牛心柿叶多糖组有效地降低 STZ 致糖尿病小鼠

抗,与正常组比较差别有统计意义($P < 0.05$)。经治疗后,二甲双胍组和牛心柿叶多糖治疗组的 FINS 水平明显降低($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 牛心柿叶多糖对 STZ 致糖尿病小鼠 FINS、IR 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	FINS		IR
		/ μ U·mL ⁻¹		
正常	-	16.98 ± 2.47	1.71 ± 0.29	
模型	-	51.76 ± 7.68 ¹⁾	3.84 ± 0.46 ¹⁾	
二甲双胍	32	33.86 ± 4.27 ²⁾	3.16 ± 0.32 ²⁾	
牛心柿叶多糖	30	49.18 ± 7.01 ²⁾	3.49 ± 0.43 ²⁾	
	60	45.76 ± 6.93 ²⁾	3.31 ± 0.38 ²⁾	
	120	35.21 ± 4.52 ²⁾	3.19 ± 0.34 ²⁾	

3.3 对 STZ 致糖尿病小鼠血清中炎症因子的影响

结果表明,模型组小鼠血清中 TNF- α , IL-8, IL-6 水平明显升高,与正常组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。经治疗后,二甲双胍组和牛心柿叶多糖干预组小鼠血清中炎症因子水平逐渐下降($P < 0.05$)。见表 3。

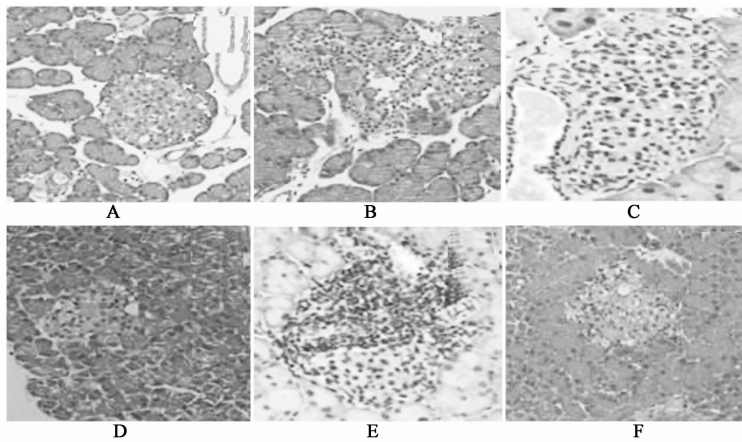
的胰脏中 NF- κ B 蛋白水平($P < 0.05$)。见图 2。

4 讨论

糖尿病是由多种因素引起的胰岛功能紊乱的疾病,它严重危害着人类的生存质量及生命健康^[8]。血糖一旦不受控制会触发系列并发症,导致肾、眼、足等部位的衰竭病变^[9],故控制血糖是抗糖尿病药物的重要策略之一。实验结果表明,二甲双胍、牛心柿叶多糖能有效降低糖尿病小鼠的血糖和恢复胰岛素水平,提示降血糖是牛心柿叶多糖抗糖尿病的主要药效之一。

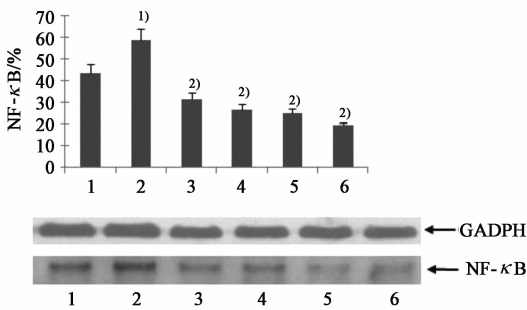
有实验研究指出,胰岛 β 细胞损伤将会影响到胰岛素合成分泌,进而引发机体内物质与能量代谢障碍,并出现胰岛素抵抗^[10]。HE 染色显示,牛心柿叶多糖对 STZ 致糖尿病小鼠胰岛细胞损伤有一定的修复作用,提示其有恢复调节胰岛素代谢的能力。

有实验表明,NF- κ B 的过度表达通过启动靶基



A. 正常组; B. 模型组; C. 二甲双胍 32 mg·kg⁻¹组; D. 牛心柿叶多糖 30 mg·kg⁻¹组;
E. 牛心柿叶多糖 60 mg·kg⁻¹组; F. 牛心柿叶多糖 120 mg·kg⁻¹组

图 1 牛心柿叶多糖对 STZ 致糖尿病小鼠胰岛细胞的影响(HE 染色, ×100)



1. 牛心柿叶多糖低剂量组; 2. 模型组; 3. 牛心柿叶多糖中剂量组;
4. 牛心柿叶多糖高剂量组; 5. 二甲双胍组; 6. 正常组
与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$

图 2 牛心柿叶多糖对 STZ 致糖尿病小鼠胰脏中
NF-κB 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

因的转录,介导免疫应答、炎症反应以及细胞生长和凋亡等生理效应^[11-12]。同时有学者提出糖尿病是低水平的炎症疾病^[13]。本实验结果发现,模型组小鼠血清中炎症因子 TNF- α , IL-8, IL-6 水平较高,同时胰脏组织中 NF- κ B 蛋白水平上调,表明糖尿病小鼠发生炎症反应,而二甲双胍、牛心柿叶多糖治疗能有效逆转其水平。提示牛心柿叶多糖通过抑制炎症通路来介导胰岛细胞功能,改善胰岛素水平。这可能是其抗糖尿病作用的重要机制之一。

[参考文献]

[1] 陈光,徐绥绪,沙沂. 柿叶的化学成分研究(I) [J]. 中国药物化学杂志, 2000, 10(4) : 298.
[2] 林娇芬,林河通,谢联辉,等. 柿叶的化学成分、药理作用、临床应用及开发利用 [J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(7) : 90.
[3] 金迪,梁英,孙工兵,等. 植物多糖提取技术的研究进展 [J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2011, 23(5) : 76.
[4] 张远远,杨志伟. 啮齿类动物糖尿病模型 [J]. 中国实

验动物学报, 2011, 19(3) : 269.
[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] 吴金环,顾红岩,喇孝瑾,等. 地黄与熟地黄对糖尿病小鼠血糖血脂的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8) : 161.
[7] Mariappan N, Elks C M, Sriramula S, et al. NF-kappa B-induced oxidative stress contributes to mitochondrial and cardiac dysfunction in type II diabetes [J]. Cardiovasc Res, 2010, 85(3) : 473.
[8] Knowler W C, Fowler S E, Hamman R F, et al. 10-year follow-up of diabetes incidence and weight loss in the diabetes prevention program outcomes study [J]. Lancet, 2009, 374(9702) : 1677.
[9] Stolar M. Glycemic control and complications in type 2 diabetes mellitus [J]. Am J Med, 2010, 123(3) : 3.
[10] Kayaniyl S, Vieth R, Retnakaran R, et al. Association of vitamin D with insulin resistance and beta-cell dysfunction in subjects at risk for type 2 diabetes [J]. Diabetes Care, 2010, 33(6) : 1379.
[11] Sethi G, Sung B, Aggarwal B B. Nuclear factor-kappa B activation: from bench to bedside [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2008, 233(1) : 21.
[12] Lawrence T. The nuclear factor NF-kappa B pathway in inflammation [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009, 1(6) : 52.
[13] Stejskal D, Adamovská S, Bartek J, et al. Resistin concentrations in persons with type 2 diabetes mellitus and in individuals with acute inflammatory disease [J]. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2003, 147(1) : 63.

[责任编辑 李玉洁]