

辣木果实对链尿佐菌素诱导糖尿病大鼠血糖和周围神经病变的改善作用

郝迪, 孔令钰*, 陶遵威, 贺艳培

天津市医药科学研究所, 天津 300020

摘要: **目的** 观察辣木果实对链尿佐菌素诱导大鼠糖尿病血糖和周围神经病变的改善作用, 并探讨其作用机制。 **方法** 采用链尿佐菌素诱发糖尿病大鼠模型。将糖尿病大鼠随机分为模型组、二甲双胍组和辣木果实 7.80、15.61、31.22 g/kg 组, 每组各 10 只。另取正常大鼠 10 只, 作为对照组。模型组和对照组 ig 同体积的纯净水, 二甲双胍组给予盐酸二甲双胍片 0.2 g/kg。所有大鼠给药体积均为 20 mL/kg, 连续给药 8 周。观察药物对糖尿病大鼠空腹血糖、糖化血清蛋白、糖耐量、血中红细胞山梨醇水平、坐骨神经山梨醇水平以及坐骨神经组织形态学的影响。 **结果** 与模型组比较, 辣木果实 15.61、31.22 g/kg 组均能明显降低糖尿病大鼠各时间点血糖曲线下面积 ($P < 0.01$)。治疗 8 周后, 辣木果实 15.61、31.22 g/kg 组红细胞山梨醇水平明显低于模型组 ($P < 0.01$); 辣木果实 7.80、15.61、31.22 g/kg 量组坐骨神经山梨醇水平明显低于模型组 ($P < 0.01$)。治疗 8 周后, 辣木果实 15.61、31.22 g/kg 组糖化血清蛋白水平明显低于模型组 ($P < 0.05$ 、0.01)。辣木果实组坐骨神经病理形态学病变有不同程度减轻, 其中辣木果实 15.61 g/kg 组基本恢复正常, 神经纤维排列紧密。辣木果实 31.22 g/kg 组改善情况弱于辣木果实 15.61 g/kg 组。 **结论** 辣木果实对糖尿病大鼠周围神经病变具有明显的改善作用, 其作用机制可能与体内山梨醇代谢异常的改善有关。

关键词: 辣木果实; 糖尿病; 血糖; 周围神经病变

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2018)01-0019-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2018.01.005

Improvement of *Moringa oleifera* fruit on blood glucose and diabetic peripheral neuropathy in rats

HAO Di, KONG Ling-yu, TAO Zun-wei, HE Yan-pei

Tianjin Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Tianjin 300020, China

Abstract: Objective To observe the improvement of *Moringa oleifera* fruit on blood glucose and peripheral neuropathy in diabetic rats induced by streptozotocin, and discuss its mechanisms. **Methods** Diabetic rat models were induced by streptozotocin. Diabetes rats were divided into model group, metformin group, and *M. oleifera* fruit (7.80, 15.61, and 31.22 g/kg) groups, and each group had 10 rats. Another 10 normal rats were taken as the control group. Rats in the model group and control group were ig administered with the same volume of pure water. Rats in the metformin group were ig administered with 0.2 g/kg Metformin Hydrochloride Tablets. All rats were ig administered with the volume of 20 mL/kg, and treated for 8 weeks. The effects of drugs on fasting blood glucose, glucose tolerance, glycosylated serum protein, erythrocyte sorbitol level, sciatic nerve sorbitol level, and sciatic nerve histomorphology in diabetic rats were observed. **Results** Compared with the model group, blood glucose area under the curves at each time point in *M. oleifera* fruit 15.61 and 31.22 g/kg groups were significantly decreased in diabetic rats ($P < 0.01$). After 8 weeks of treatment, erythrocyte sorbitol levels in *M. oleifera* fruit 15.61 and 31.22 g/kg groups were significantly lower than those in the model group ($P < 0.01$), and sciatic nerve sorbitol levels in *M. oleifera* fruit 7.80, 15.61, and 31.22 g/kg groups were significantly lower than those in the model group ($P < 0.01$). After 8 weeks of treatment, glycosylated serum protein levels in *M. oleifera* fruit 15.61 and 31.22 g/kg groups were significantly lower than those in the model group ($P < 0.05$, 0.01). Sciatic nerve pathological lesions in *M. oleifera* fruit groups were alleviated, and those in *M. oleifera* fruit 15.61 g/kg group returned to normal, and nerve fibers were arranged closely. Improve of *M. oleifera* fruit 31.22 g/kg group were weaker than those in the 15.61 g/kg group. **Conclusion** *M. oleifera*

收稿日期: 2017-09-15

基金项目: 天津市中医药管理局中医中西医结合科研课题项目 (13113)

作者简介: 郝迪, 助理研究员, 毕业于内蒙古医科大学, 研究方向为药理学。Tel: (022) 27236137 E-mail: haod2005@126.com

*通信作者 孔令钰, 女, 硕士, 研究方向: 药物分析。Tel: (022) 27235075 E-mail: lingyu_kong@163.com

fruit has obvious effect on peripheral neuropathy in diabetic rats, and the mechanism may be related to the improvement of abnormal metabolism of sorbitol in the body.

Key words: *Moringa oleifera* fruit; diabetes; blood glucose; peripheral neuropathy

糖尿病最常见的并发症之一便是糖尿病周围神经病变,其发病率高达 40%~90%^[1]。糖尿病周围神经病变指的是因糖尿病引发的慢性高血糖状态及其所致的各种病理生理改变,导致的神经系统损伤。这种损伤可累及全身周围神经系统任何部分,高血糖引起的糖基化终末产物形成增加^[2],使得多元醇代谢异常是导致糖尿病周围神经病变的重要原因之一。辣木具有调节血糖的功能^[3]。本课题组前期初步研究发现,辣木果实具有降血糖的作用。辣木降血糖作用的成分有生物碱、黄酮类、多糖类、萜类、皂苷、多肽、氨基酸类以及不饱和脂肪酸类等^[3]。近年来,具有抗氧化和清除自由基作用的黄酮类受到医药界广泛的重视^[4]。辣木果实中总黄酮可能为其治疗糖尿病的有效部位。有学者利用液相色谱-串联质谱法测得辣木果实中黄酮类成分槲皮素、芦丁和山柰酚^[5]。槲皮素具有保护胰岛 β 细胞、提高胰岛素释放水平和抑制醛糖还原酶释放的作用^[6]。山柰酚具有抑制糖苷酶释放的作用^[7-8]。为了观察辣木果实对糖尿病及其周围神经病变的防治作用,探讨其作用机制,本实验通过链脲佐菌素诱导大鼠建立糖尿病模型,在糖尿病周围神经病变形成的同时给予辣木果实进行防治,以血糖、糖化血红蛋白、红细胞山梨醇、坐骨神经病理形态学为指标观察辣木果实对糖尿病周围神经病变的影响,为辣木的开发研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物

SD 大鼠 68 只,雄性,体质量 210~230 g,由中国军事医学科学院卫生学环境医学研究所实验动物中心提供,动物生产许可证号 SCXK(军)2014-0001。屏障环境,动物使用许可证号 SYXK(津)2011-0003。由北京科澳协力饲料有限公司提供符合国家标准的动物饲料。动物饮用纯净水。

1.2 药品与试剂

辣木果实提取物,深棕色,1.77 g 生药/g 提取物,由天津市医药科学研究所制剂室提供,临用时用纯净水配成所需浓度。盐酸二甲双胍片由中美上海施贵宝制药有限公司提供,规格 0.85 g/片,批号 20141003。链脲佐菌素由美国 Sigma 公司提供,北

京博爱科贸有限公司分装,临用前用柠檬酸缓冲液配制 pH 4.4。无水葡萄糖,天津化学试剂批发公司。

1.3 仪器与材料

GLM-73 测利得血糖测定仪, TGL-16G 离心机(上海安亭科学仪器厂), S-648 恒温水浴箱(上海医疗器械厂), PL-203 精密电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司],德国莱卡 Leica EG1150H 自动生物组织包埋机, Leica RM2255 切片机, Olympus 显微镜, IDA-2000 高清晰度数码显微图像分析系统。

2 方法

2.1 分组和给药

取 SD 大鼠,禁食 12 h 后,用 0.1 mmol/L 枸橼酸钠缓冲液(pH 4.4)将链脲佐菌素配成 1% 的溶液, ip 60 mg/kg 72 h 后于大鼠眼静脉取血,测定空腹血糖,当血糖值大于 16.7 mmol/L 确定为糖尿病大鼠。将糖尿病大鼠随机分为模型组、二甲双胍组和辣木果实 7.80、15.61、31.22 g/kg 组,每组各 10 只。另取正常大鼠 10 只,作为对照组。模型组和对照组 ig 同体积的纯净水,二甲双胍组给予盐酸二甲双胍片 0.2 g/kg^[9]。辣木果实是根据本课题组急性毒性试验设计的剂量。所有大鼠给药体积均为 20 mL/kg,连续给药 8 周。每周末称量体质量 1 次,根据体质量的变化调整下周给药剂量。

2.2 观察指标

2.2.1 空腹血糖 大鼠眼静脉取血,于造模后使用测利得血糖测定仪及配套试纸测定空腹血糖

2.2.2 糖化血清蛋白 于实验第 8 周末腹主动脉取血,离心后取血清,采用生化法测定糖化血清蛋白水平。

2.2.3 糖耐量测定 实验第 8 周末各组大鼠 ig 葡萄糖 2.0 g/kg,在 0、0.5、1、2 h 测定血糖值,观察血糖曲线下面积的变化。

$$\text{血糖曲线下面积} = (a + 2b + 3c + 2d) / 4$$

a 、 b 、 c 、 d 分别代表 0、0.5、1、2 h 血糖值

2.2.4 红细胞山梨醇 于腹主动脉取血,肝素抗凝,3 000 r/min 离心 15 min,弃去血浆,留取红细胞,用 10 倍体积生理盐水洗涤 3 次,再用生理盐水以 1:3 稀释压积红细胞。取红细胞稀释液 0.5 mL,加

入等量双蒸水破膜,然后加2~3 mL预冷的6%过氯酸沉淀蛋白,4 000 r/min离心5 min,取上清液,采用高效液相色谱法测定山梨醇水平^[10]。

2.2.5 坐骨神经山梨醇 大鼠ip戊巴比妥45 mg/kg进行麻醉,然后将大鼠俯卧固定在固定架上,剖开双侧股部皮肤,暴露出坐骨神经,用无菌剥离器剥离坐骨神经后取出。将坐骨神经组织称定质量,加冷生理盐水,制备成20%的匀浆液。取200 μ L大鼠空白坐骨神经匀浆液,采用高效液相色谱法测定坐骨神经山梨醇水平^[10]。

2.2.6 坐骨神经病理形态学观察 大鼠ip戊巴比妥45 mg/kg进行麻醉,将大鼠俯卧固定于固定架上,剖开双侧股部皮肤,暴露出坐骨神经,用无菌剥离器剥离坐骨神经后取出。用10%甲醛固定、石蜡包埋、连续切片、HE染色,观察坐骨神经的病理形态学。

2.3 统计学分析

实验全部统计数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差检验,并使用SPSS 11.5统计软件包进行统计分析。

3 结果

3.1 辣木果实对糖尿病大鼠空腹血糖的影响

大鼠ip链脲佐菌素72 h后,成模和各给药组大鼠的空腹血糖均明显高于对照组($P < 0.01$),见表1。

3.2 辣木果实对糖尿病大鼠糖化血清蛋白的影响

与对照组比较,模型组大鼠糖化血清蛋白水平均明显升高($P < 0.01$)。治疗8周后,辣木果实15.61、31.22 g/kg组糖化血清蛋白水平明显低于模型组($P < 0.05$ 、0.01),见表2。

表1 辣木果实对糖尿病大鼠空腹血糖的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1 Effects of *Moringa oleifera* fruits on fasting blood glucose in diabetic rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	空腹血糖/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	5.52 ± 0.73
模型	—	21.48 ± 3.50 ^{##}
二甲双胍	0.2	22.87 ± 2.94 ^{##}
辣木果实	7.80	21.19 ± 1.98 ^{##}
	15.61	20.27 ± 1.19 ^{##}
	31.22	22.28 ± 1.88 ^{##}

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$

^{##} $P < 0.01$ vs model group

表2 辣木果实对糖尿病大鼠糖化血清蛋白水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Effects of *M. oleifera* fruits on saccharification serum protein in diabetic rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	糖化血清蛋白/(μ mol·L ⁻¹)
对照	—	216.84 ± 25.85
模型	—	410.52 ± 31.44 ^{##}
二甲双胍	0.2	335.87 ± 35.43 ^{**}
辣木果实	7.80	383.33 ± 58.07
	15.61	374.60 ± 36.58 [*]
	31.22	344.87 ± 58.07 ^{**}

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

3.3 辣木果实对糖尿病大鼠糖耐量的影响

与模型组比较,辣木果实15.61、31.22 g/kg组均能明显降低糖尿病大鼠各时间点血糖曲线下面积($P < 0.01$),见表3。

表3 辣木果实对糖尿病大鼠血糖和糖耐量的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 3 Effects of *M. oleifera* fruits on fasting blood glucose and glucose tolerance in diabetic rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	空腹血糖/(mmol·L ⁻¹)	餐后0.5 h血糖/(mmol·L ⁻¹)	餐后1 h血糖/(mmol·L ⁻¹)	餐后2 h血糖/(mmol·L ⁻¹)	血糖曲线下面积
对照	—	5.51 ± 0.82	8.41 ± 0.75	14.36 ± 2.77	7.43 ± 1.34	19.95 ± 2.17
模型	—	19.19 ± 2.06 ^{##}	33.12 ± 0.57 ^{##}	31.97 ± 2.24 ^{##}	31.58 ± 3.45 ^{##}	63.13 ± 1.55 ^{##}
二甲双胍	0.2	8.77 ± 2.76 ^{**}	33.30 ± 0.00 ^{**}	32.50 ± 1.64 ^{**}	27.72 ± 6.01 ^{**}	59.75 ± 4.08 ^{**}
辣木果实	7.80	11.8 ± 2.04 ^{**}	30.62 ± 3.66	31.98 ± 3.83	32.00 ± 3.83	61.08 ± 4.84
	15.61	9.82 ± 2.56 ^{**}	30.48 ± 1.38	31.13 ± 4.58	25.35 ± 4.75 [*]	56.39 ± 5.63 ^{**}
	31.22	9.54 ± 2.04 ^{**}	27.86 ± 6.45 ^{**}	31.39 ± 4.60 ^{**}	27.76 ± 5.88	56.97 ± 8.33 ^{**}

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

表4 辣木果实对糖尿病大鼠红细胞、坐骨神经山梨醇水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 4 Effects of *M. oleifera* fruits on levels of erythrocyte and ischiol in diabetic rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	红细胞山梨醇/ (mmol·L ⁻¹)	坐骨神经山梨醇/ (mmol·L ⁻¹)
对照	—	0.32 ± 0.11	1.26 ± 0.04
模型	—	0.76 ± 0.15 ^{##}	2.46 ± 0.40 ^{##}
二甲双胍	0.2	0.41 ± 0.11 ^{**}	1.51 ± 0.33 ^{**}
辣木果实	7.80	0.64 ± 0.24	1.68 ± 0.09 ^{**}
	15.61	0.57 ± 0.18 ^{**}	1.62 ± 0.09 ^{**}
	31.22	0.50 ± 0.12 ^{**}	1.56 ± 0.25 ^{**}

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs model group

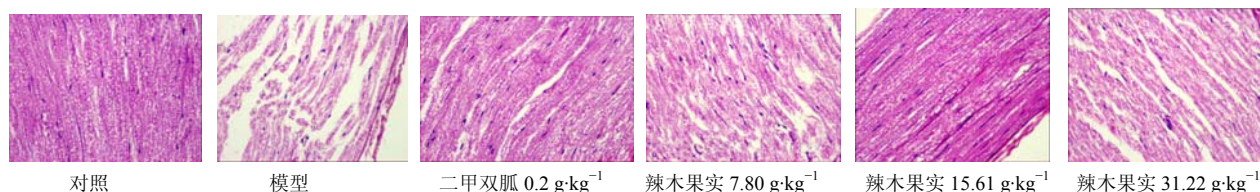


图1 辣木果实组大鼠坐骨神经的病理形态学

Fig. 1 Pathomorphology of sciatic nerve in rats of *M. oleifera* fruits groups

4 讨论

糖尿病周围神经病变作为糖尿病常见的慢性并发症,其病因和发病机制具有复杂多样的特点,而山梨醇代谢通路活性增强导致的山梨醇在坐骨神经内大量蓄积是糖尿病周围神经病变发病的重要机制之一^[11-12],所以糖尿病周围神经病变发病的重要标记物之一便是山梨醇水平的异常增加。

现代医学认为,糖尿病神经病变发生发展的关键因素之一就是山梨醇代谢异常^[13]。葡萄糖进入神经组织后有两条代谢通路,分别为有氧氧化和糖酵解途径代谢。正常情况下,葡萄糖主要经己糖激酶催化为6-磷酸葡萄糖进入糖酵解通路。但若长期处于高血糖状态,则多元醇代谢途径可被激活,多元醇的代谢有两个关键酶:醛糖还原酶和山梨醇脱氢酶。当葡萄糖进入细胞后被醛糖还原酶还原为山梨醇,然后山梨醇脱氢酶再将其氧化为果糖。神经组织内缺少果糖激酶,则这些过多的果糖不能分解,使山梨醇和果糖聚集,造成神经细胞内渗透压升高、神经细胞水肿、变性、坏死。肌醇是组成磷脂酰肌醇和神经髓鞘组织的组成成分,葡萄糖与肌醇结构非常相似,高血糖可以竞争性地抑制神经组织摄取

3.4 辣木果实对糖尿病大鼠坐骨神经病理形态学影响

对照组大鼠坐骨神经神经的纤维排列紧密,髓鞘部分结构完整,且排列整齐,轴突清晰,施万细胞散在髓鞘的边缘。模型组大鼠的神经纤维排列紊乱,髓鞘肿胀、模糊不清,且髓鞘内可见渗出,轴突萎缩,甚至有部分轴突消失,神经纤维肿胀变形。二甲双胍和辣木果实等其余各组坐骨神经神经病变均有不同程度减轻,其中辣木果实 15.61 g/kg 组坐骨神经神经病变基本恢复正常,神经纤维排列紧密。辣木果实 31.22 g/kg 组坐骨神经神经病变改善情况弱于辣木果实 15.61 g/kg 组。见图1。

肌醇,使神经组织肌醇水平降低,合成传递神经信息的重要介质磷酸肌醇也减少,导致神经传导功能受损。由此可见,蓄积的山梨醇直接产生神经毒性作用。所以体内山梨醇的水平可以作为考察糖尿病神经病变的一个指标。

糖尿病周围神经病变是糖尿病最常见的慢性并发症之一,有报道认为确诊1年的糖尿病患者中其神经病变的发生率为7%,而病程25年以上者,发病率达50%^[14],因而有效地预防和控制糖尿病神经病变尤为迫切。本实验采用链脲佐菌素诱导糖尿病大鼠模型,在糖尿病周围神经病变形成的同时给予辣木果实提取物防治。实验中发现辣木果实能明显降低糖尿病大鼠空腹血糖,改善糖尿病大鼠糖耐量,能明显降低糖化血清蛋白水平,并能降低红细胞中山梨醇水平,也可减轻坐骨神经髓鞘水肿,改善神经病变。因此辣木果实对糖尿病大鼠周围神经病变具有明显的改善作用,其作用机制可能与体内山梨醇代谢异常的改善有关。

综上所述,辣木果实可以作为一种治疗或辅助治疗糖尿病及其周围神经病变的药物,本研究为辣木果实的开发利用提供了参考。

参考文献

- [1] 刘磊, 夏宁. 糖尿病周围神经病变研究进展 [J]. 广西医科大学学报, 2010, 27(2): 317-319.
- [2] 吴道爱, 徐浣白, 汪运生. 糖尿病亚临床周围神经病变与病程、糖基化血红蛋白的关系 [J]. 蚌埠医学院学报, 2010, 35(8): 782-783.
- [3] 赵欢, 曹玉霖, 朱彦锋. 辣木的血糖调节功能研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(10): 1791-1796.
- [4] 孙丰雷, 郎江明, 吴伟康. 黄酮类天然药物有效成分治疗糖尿病及其并发症研究进展 [C]. 第六次中国中西医结合糖尿病学术会议论文汇编. 北京: 中国中西医结合学会, 2002: 39-44.
- [5] Devaraj V C, Krishna B G, Viswanatha G L, *et al.* Simultaneous determination of quercetin, rutin and kaempferol in the leaf extracts of *Moringa oleifera* Lam. and *Raphanus sativus* Linn. by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Integr Med*, 2011, 9(9): 1022-1030.
- [6] 毛晓明, 张家庆. 槲皮素等中药提取物对醛糖还原酶的抑制作用 [J]. 中国中药杂志, 1993, 18(10): 623-624.
- [7] 卫强, 纪小影, 徐飞, 等. 木槿叶化学成分及抑制 α -葡萄糖苷酶活性研究 [J]. 中药材, 2015, 38(5): 975-979.
- [8] 吴巧敏, 金雅美, 倪海祥. 山柰酚对2型糖尿病大鼠慢性并发症相关因子的影响 [J]. 中草药, 2015, 46(12): 1806-1809.
- [9] 王嫻, 滕赞, 张锦, 等. 二甲双胍对2型糖尿病大鼠降脂作用的研究 [J]. 中国血液流变学杂志, 2006, 16(2): 182-184.
- [10] 杨鑫伟, 年宏蕾, 姚伟杰, 等. 高效液相色谱法测定大鼠坐骨神经组织中山梨醇的浓度 [J]. 检验医学与临床, 2015, 12(1): 6-8.
- [11] Stavniichuk R, Shevalye H, Hirooka H, *et al.* Interplay of sorbitol pathway of glucose metabolism, 12/15-lipoxygenase, and mitogen-activated protein kinases in the pathogenesis of diabetic peripheral neuropathy [J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 83(7): 932-940.
- [12] Li G, Sun C, Wang Y, *et al.* A clinical and neuropathological study of Chinese patients with diabetic peripheral neuropathy [J]. *PloS One*, 2014, 9(3): e91772.
- [13] 游建明, 纪云西, 黄贵华, 等. 糖尿病周围神经病变病机演变初探 [J]. 新中医, 2011, 43(3): 1-2.
- [14] 郑方道. 糖尿病神经病变 [J]. 开卷有益: 求医问药, 1999(4): 9.