

葛根素对链脲佐菌素诱导妊娠期糖尿病大鼠氧化应激损伤的保护作用

李会柏¹, 魏亚超², 刘娇梅³

1. 邯郸市中心医院 内分泌一科, 河北 邯郸 056001

2. 邯郸市中心医院 药学部, 河北 邯郸 056001

3. 邯郸县疾病预防控制中心 计划免疫科, 河北 邯郸 056000

摘要: **目的** 研究葛根素对链脲佐菌素诱导妊娠期糖尿病大鼠氧化应激损伤的保护作用。**方法** 通过 ip 链脲佐菌素 35 mg/kg 制备妊娠期糖尿病大鼠模型。选取 64 只模型大鼠并根据血糖水平随机分为模型组、葛根素 40、80、160 mg/kg 组, 另选取 16 只同期妊娠的大鼠作为妊娠对照组, 并取 16 只同龄非妊娠雌性大鼠作为非妊娠对照组。ig 给药治疗, 1 次/d, 给药容积为 20 mL/kg, 连续给药 2 周。分别于给药前和给药第 7、14 天测定空腹血糖水平。给药治疗 2 周后, 测定丙氨酸转氨酶(ALT)、天门冬氨酸转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)活性, 检测血清中丙二醛(MDA)含量及总抗氧化能力(T-AOC)水平; 测定肝脏组织中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性和 MDA 含量。给药 2 周后, 通过 HE 染色观察肝脏组织病理形态学改变。**结果** 葛根素 160 mg/kg 组大鼠空腹血糖水平较模型组显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与模型组比较, 葛根素 80、160 mg/kg 组大鼠血清中 ALT、AST 活性和 MDA 含量均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 葛根素 160 mg/kg 组 ALP 活性显著降低 ($P < 0.01$)、T-AOC 水平显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 葛根素 80、160 mg/kg 组肝脏组织中 SOD 活性显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), MDA 含量显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01); 葛根素 160 mg/kg 组 CAT 活性显著升高 ($P < 0.01$)。葛根素组大鼠肝脏组织病理形态学改变明显改善。**结论** 葛根素对链脲佐菌素诱导妊娠期糖尿病大鼠氧化应激损伤具有保护作用, 其作用机制可能与葛根素能够有效改善抗氧化酶活性、降低氧化应激损伤有关。

关键词: 葛根素; 妊娠期糖尿病; 氧化应激; 保护作用

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2015)07-0774-05

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2015.07.005

Protection of puerarin against oxidative stress injury in gestational diabetic rats induced by streptozocin

LI Hui-bai¹, WEI Ya-chao², LIU Jiao-mei³

1. The First Department of Endocrinology, Handan Central Hospital, Handan 056001, China

2. Department of Pharmacology, Handan Central Hospital, Handan 056001, China

3. Department of Immunization, Handan County Center for Diseases Prevention and Control, Handan 056000, China

Abstract: Objective To investigate protective effects of puerarin against oxidative stress injury in gestational diabetic rats induced by streptozocin. **Methods** Gestational diabetic model rats were made by ip administration with streptozocin (35 mg/kg). According to blood glucose levels, a total of 64 gestational diabetic rats were randomly divided into model group and puerarin (40, 80, and 160 mg/kg) groups. And other 16 pregnant rats in the same period were selected into the gestation control group, and 16 non-gestation female rats of the same age also were selected into the non-gestation control group. Rats were ig administered with dosage of 20 mL/kg, and the treatment was adopted once daily and lasted for 2 weeks. The level of fasting blood sugar in gestational diabetic rats were determined before treatment and treated for 7 and 14 d. After treatment for 2 weeks, the activities of ALT, AST, and ALP in serum were determined. Also the content of MDA and the level of T-AOC in serum were determined. The activity of SOD, CAT, and the content of MDA in hepatic tissue were determined. Histopathological changes of hepatic tissue were observed by HE staining. **Results** Compared with model group, the level of fasting blood sugar of puerarin 160 mg/kg group was significantly decreased ($P < 0.05$, 0.01). Compared with model group, the activities of ALT, AST, and the content of MDA of puerarin 80 and 160 mg/kg groups were significantly decreased ($P < 0.05$, 0.01), and the activity of ALP in serum of puerarin 160 mg/kg group was significantly

收稿日期: 2015-01-08

作者简介: 李会柏, 男, 本科, 主治医师。Tel: 13315071229 E-mail: hdlhuhuibai@163.com

decreased ($P < 0.01$), while the level of T-AOC in serum was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with model group, the activity of SOD in hepatic tissue of puerarin 80 and 160 mg/kg groups were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$), but the content of MDA was significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$), and the activity of CAT in hepatic tissue of puerarin 160 mg/kg group was significantly increased ($P < 0.01$). Histopathological changes of hepatic tissue in puerarin groups were significantly improved.

Conclusion Puerarin has protection against oxidative stress injury in gestational diabetic rats induced by streptozocin, which perhaps is related to improvement of the anti-oxidant enzyme activity and depression of oxidative stress.

Key words: puerarin; gestational diabetes mellitus; oxidative stress; protection

妊娠期糖尿病是指在妊娠期发生或首次发现的糖耐量受损,是围手术期常见并发症之一,在我国的发病率接近 7%,严重危害母体和胎儿的健康^[1]。研究发现,妊娠期糖尿病具有多种病理生理机制^[2],其中抗氧化酶活性下降、氧自由基过剩与其发病及并发症的发生发展有着密切的联系^[3-5]。葛根素是葛根中主要有效成分之一,属于异黄酮类化合物,She 等^[6]和 Tang 等^[7]分别通过体内和体外研究发现,葛根素具有明显的抗氧化作用,此外葛根素还具有降血脂、抗凋亡、抗炎、抗癌等多种生物学作用^[8-11]。本实验采用一次性腹腔注射链脲佐菌素的方法制备妊娠期糖尿病大鼠模型,探讨葛根素对妊娠期糖尿病大鼠氧化应激损伤的保护作用。

1 材料

1.1 实验动物

清洁级雌雄性 SD 大鼠,体质量 210~250 g,购于河北省实验动物中心,动物许可证号 SCXK(冀)2008-1-003。

1.2 试验药物和试剂

葛根素(湖南金农生物资源股份有限公司,质量分数 $\geq 98\%$,批号 20130509);丙氨酸转氨酶(ALT)、天门冬氨酸转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)和丙二醛(MDA)测定试剂盒购于南京建成生物工程研究所,批号分别为 140103、131226、140306、140229;总抗氧化能力(T-AOC)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)测定试剂盒购于北京博奥森生物技术有限公司,批号分别为 130611、131127、130924;链脲佐菌素购自美国 Sigma 公司,批号 131115;乌拉坦购自北京化学试剂公司,批号 20140321;其他试剂均为分析纯。

1.3 主要仪器

UV759 紫外-可见分光光度计(上海圣科仪器设备有限公司);URIT-8020 全自动生化分析仪(武汉天鹰医疗设备有限公司);KD-2508 轮转切片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司);GF-1 高速组织匀浆机(北京众益中和生物技术有限公司);

24D 台式高速离心机(深圳市赛泰克生物科技有限公司);光学显微镜(日本 Olympus 公司);血糖仪(罗氏公司)。

2 方法

2.1 大鼠妊娠期糖尿病模型的制备^[12]

雌性 SD 大鼠在室温 23~25 °C、相对湿度 65%~70%、光照周期 12 h:12 h 环境下饲养。经高脂饲料喂养 8 周后,将处于动情前期的雌鼠与雄鼠按 1:2 的比例合笼过夜,次日镜检阴道涂片观察到精子的确定为孕鼠,即妊娠 1 d。于妊娠 5 d 时 ip 链脲佐菌素 35 mg/kg,3 d 后测定空腹血糖,稳定在 13.5 mmol/L 以上的认定为妊娠期糖尿病大鼠造模成功。

2.2 分组

选取 64 只妊娠期糖尿病大鼠根据血糖水平随机分为妊娠期糖尿病模型组和葛根素 40、80、160 mg/kg 组^[13];另选取 16 只同期妊娠大鼠,作为妊娠对照组,并取 16 只同龄非妊娠大鼠作为非妊娠对照组。葛根素各治疗组连续 ig 给药治疗,妊娠期糖尿病模型组、妊娠对照组和非妊娠对照组分别 ig 等体积生理盐水,1 次/d,给药容积为 20 mL/kg,连续给药 2 周。

2.3 空腹血糖水平的测定

分别于给药前和给药第 7、14 天由尾静脉取血,通过血糖仪测定空腹血糖水平,并记录。

2.4 血清中 ALT、AST、ALP、MDA 和 T-AOC 的测定

给药治疗 2 周后,ip 乌拉坦实施麻醉,经腹主动脉取血,1 500 r/min 离心 10 min 后取上层血清,遵照试剂盒操作方法和步骤,通过全自动生化分析仪测定 ALT、AST、ALP 活性,通过紫外-可见分光光度计检测血清中 MDA 含量及 T-AOC 水平。

2.5 肝脏组织中 SOD、CAT 和 MDA 的测定

待以上实验取血完成后,开腹取肝脏组织,剪碎后进行研磨匀浆,3 500 r/min 离心 5 min 后取上清液,按试剂盒操作方法,通过紫外-可见分光光

度测定肝脏组织中 SOD、CAT 活性和 MDA 含量。

2.6 肝脏组织病理形态学观察

给药 2 周后, ip 乌拉坦实施麻醉, 开腹取肝脏组织, 置于 10% 甲醛溶液中进行固定, 石蜡包埋、切片 (厚度为 5 μm), 然后进行苏木精-尹红 (HE) 染色, 通过光镜观察肝脏组织病理形态学改变。

2.7 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 运用软件 SPSS 15.0 进行统计分析, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 检验。

3 结果

3.1 葛根素对妊娠期糖尿病大鼠空腹血糖的影响

妊娠对照组、非妊娠对照组大鼠的空腹血糖无显著性差异; 与妊娠对照组比较, 模型组大鼠空腹血糖水平显著升高 ($P < 0.01$); 葛根素 160 mg/kg 组大鼠空腹血糖水平较模型组显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01), 见表 1。

3.2 葛根素对妊娠期糖尿病大鼠血清中 ALT、AST、ALP 活性, MDA 含量及 T-AOC 水平的影响

妊娠对照组、非妊娠对照组大鼠血清中 ALT、AST、ALP 活性, MDA 含量及 T-AOC 水平均无显著性差异; 与妊娠对照组比较, 模型组大鼠血清中 ALT、AST、ALP 活性和 MDA 含量显著升高 ($P < 0.01$), T-AOC 水平显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 葛根素 80、160 mg/kg 组大鼠 ALT、AST 活性和 MDA 含量均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01), 葛根素 160 mg/kg 组 ALP 活性显著降低 ($P < 0.01$)、T-AOC 水平显著升高 ($P < 0.05$), 见表 2。

3.3 葛根素对妊娠期糖尿病大鼠肝脏组织中 SOD、CAT 活性和 MDA 含量的影响

妊娠对照组、非妊娠对照组大鼠肝脏组织中 SOD、CAT 活性和 MDA 含量均无显著性差异; 与妊娠对照组比较, 模型组大鼠 SOD、CAT 活性显著降低, 但 MDA 含量显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 葛根素 80、160 mg/kg 组 SOD 活性显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01), MDA 含量显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01); 葛根素 160 mg/kg 组 CAT 活性显著升高 ($P < 0.01$), 见表 3。

表 1 葛根素对妊娠期糖尿病大鼠空腹血糖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 1 Effects of puerarin on level of fasting blood sugar in gestational diabetic rats ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	空腹血糖/(mmol·L ⁻¹)		
		治疗前	第 7 天	第 14 天
非妊娠对照	—	5.4±0.5	5.3±0.6	5.3±0.5
妊娠对照	—	5.9±0.6	5.7±0.6	5.8±0.7
模型	—	16.2±1.3**	15.7±1.0**	15.9±1.1**
葛根素	40	16.0±1.1	15.2±1.1	15.1±1.1
	80	15.9±1.2	13.6±1.2	13.1±1.0
	160	16.1±1.2	12.1±0.9 [△]	11.8±0.7 ^{△△}

与妊娠对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs gestation control group; [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs model group

表 2 葛根素对妊娠期糖尿病大鼠血清中 ALT、AST、ALP、MDA 和 T-AOC 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 2 Effects of puerarin on ALT, AST, ALP, and MDA in serum and of T-AOC in gestational diabetic rats ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	ALP/(U·L ⁻¹)	MDA/(nmol·mg ⁻¹)	T-AOC/(U·L ⁻¹)
非妊娠对照	—	107±21	43.0±5.7	121±14	7.3±1.2	14.4±2.5
妊娠对照	—	110±28	45.9±7.9	126±22	7.9±1.4	15.2±2.8
模型	—	978±242**	96.3±16.4**	158±21**	12.9±2.7**	8.4±1.8**
葛根素	40	947±236	91.9±15.2	155±19	12.1±2.8	8.8±1.7
	80	875±192 [△]	88.6±16.1 [△]	148±20	11.6±2.9 [△]	9.3±2.1
	160	704±186 ^{△△}	77.2±17.3 ^{△△}	135±18 ^{△△}	10.8±2.4 ^{△△}	10.7±2.3 [△]

与妊娠对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs gestation control group; [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs model group

表3 葛根素对妊娠期糖尿病大鼠肝脏组织中SOD、CAT和MDA的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 3 Effects of puerarin on SOD, CAT, and MDA in hepatic tissue of gestational diabetic rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)	CAT/(U·mg ⁻¹)	MDA/(nmol·mg ⁻¹)
非妊娠对照	—	13.7±1.5	4.10±0.65	3.21±0.73
妊娠对照	—	13.1±1.8	3.99±0.86	3.37±0.83
模型	—	9.5±1.2**	2.63±0.63**	6.00±1.04**
葛根素	40	10.2±1.2	2.71±0.71	5.91±0.98
	80	10.9±1.5 [△]	2.88±0.86	5.67±1.15 [△]
	160	11.6±1.6 ^{△△}	3.19±1.24 ^{△△}	4.98±1.02 ^{△△}

与妊娠对照组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: [△] $P<0.05$ ^{△△} $P<0.01$

** $P<0.01$ vs gestation control group; [△] $P<0.05$ ^{△△} $P<0.01$ vs model group

3.4 葛根素对妊娠期糖尿病大鼠肝脏组织病理学改变的影响

通过 HE 染色, 然后在光镜显微镜下观察, 妊娠对照组、非妊娠对照组大鼠肝脏组织结构均未见异常; 模型组大鼠肝小叶、肝窦组织结构紊乱, 肝细胞出现空泡样变性, 胞核固缩、深染等病理学改变; 葛根素组大鼠肝脏组织病理形态学改变明显减轻, 见图1。

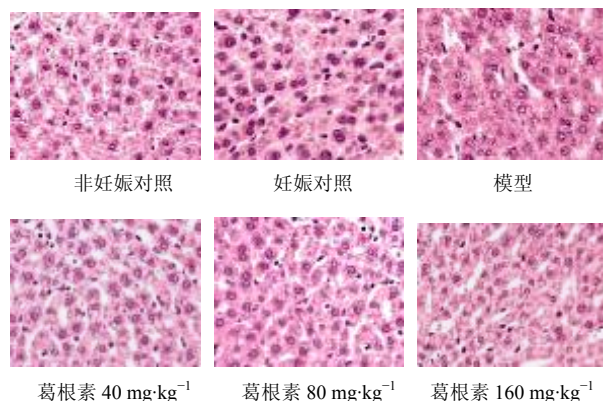


图1 葛根素对妊娠期糖尿病大鼠肝脏组织病理形态学改变的影响

Fig. 1 Effects of puerarin on histopathological changes of hepatic tissue in gestational diabetic rats

4 讨论

妊娠期糖尿病是指在妊娠期发生或首次发现的糖尿病或糖耐量受损, 目前临床上主要以胰岛素和口服降糖药为主, 长期应用对母体和胎儿均有一定的危害^[14]。经病理生理学研究发现, 氧自由基过剩及其所诱发的细胞膜脂质过氧化损伤是导致妊娠期糖尿病损伤的主要原因。并且肝脏组织是对氧化应激反应非常敏感的器官^[15], 因此妊娠期糖尿病患者除了很好地控制血糖外, 还应注意抑制氧化应激反

应并关注肝功能。

葛根素是一种异黄酮类化合物, 具有多种活性。本实验采用一次性腹腔注射链脲佐菌素的方法制备妊娠期糖尿病大鼠模型进行研究, 发现葛根素能够有效降低妊娠期糖尿病大鼠血糖、抑制肝组织病变、改善肝功能, 提示葛根素对链脲佐菌素诱导妊娠期糖尿病大鼠具有保护作用。

不饱和脂肪酸是细胞膜主要构成成分之一, 非常容易受到氧自由基的攻击而发生脂质过氧化损伤, 该过程生成的终产物 MDA 的含量能够间接反映机体过氧化损伤程度。血清中 T-AOC 能够反映机体整体抗氧化能力。超氧化物歧化酶 SOD 是机体防御氧自由基损伤的第一道屏障, 能够提供氢原子配体而促使氧自由基还原生成过氧化氢, 被称为氧自由基的“清道夫”^[16]。而且生成的过氧化氢能够在 CAT 的催化作用下进一步还原生成对人体无害的 H₂O₂ 和 O₂^[17]。因此 SOD 和 CAT 的活性能够反映机体的抗氧化能力。

综上所述, 葛根素能够有效地降低妊娠期糖尿病大鼠血糖水平, 改善氧化酶活性, 降低氧自由基损伤, 改善肝功能, 抑制肝组织病变, 提示葛根素对妊娠期糖尿病大鼠氧化应激损伤具有保护作用。

参考文献

- [1] Poolsup N, Suksomboon N, Amin M. Effect of treatment of gestational diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e92485.
- [2] 邓新娥. 妊娠期糖尿病的病因研究进展 [J]. 右江民族医学院学报, 2008(2): 301-303.
- [3] Orhan H, Onderoglu L, Yücel A, *et al.* Circulating biomarkers of oxidative stress in complicated pregnancies [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2003, 267(4): 189-195.
- [4] Karowicz-Bilińska A. Lipid peroxidation in women with

- gestational hypertension complicated by asymmetric intrauterine growth retardation [J]. *Ginekol Pol*, 2006, 77(6): 435-440.
- [5] Pasiński J, Swierczewski A, Estenberg D, *et al*. The influence of vitamin C and E use on concentration of endothelin-1 and lipid peroxides in the serum of pregnant women with arterial hypertension [J]. *Ginekol Pol*, 2013, 84(1): 32-37.
- [6] She S, Liu W, Li T, *et al*. Effects of puerarin in STZ-induced diabetic rats by oxidative stress and the TGF- β 1/Smad2 pathway [J]. *Food Funct*, 2014, 5(5): 944-950.
- [7] Tang L, Liu D, Yi X, *et al*. The protective effects of puerarin in cardiomyocytes from anoxia/reoxygenation injury are mediated by PKC ϵ [J]. *Cell Biochem Funct*, 2014, 32(4): 378-386.
- [8] Wei S Y, Chen Y, Xu X Y. Progress on the pharmacological research of puerarin: a review [J]. *Chin J Nat Med*, 2014, 12(6): 407-414.
- [9] Singh A K, Jiang Y, Gupta S, *et al*. Anti-inflammatory potency of nano-formulated puerarin and curcumin in rats subjected to the lipopolysaccharide-induced inflammation [J]. *J Med Food*, 2013, 16(10): 899-911.
- [10] Zhou Y X, Zhang H, Peng C. Puerarin: a review of pharmacological effects [J]. *Phytother Res*, 2014, 28(7): 961-975.
- [11] 李 娟, 胡永华. 葛根素对人小细胞肺癌 H446 细胞周期和相关周期蛋白表达的影响 [J]. *中草药*, 2008, 39(10): 1535-1537
- [12] John C M, Ramasamy R, Al Naqeeb G, *et al*. Nicotinamide supplementation protects gestational diabetic rats by reducing oxidative stress and enhancing immune responses [J]. *Curr Med Chem*, 2012, 19 (30): 5181-5186.
- [13] 陈秀芳, 雷康福, 董 敏, 等. 葛根素对糖尿病大鼠心肌损伤的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2010, 26(4): 650-655.
- [14] Kim-Cohen J, Caspi A, Taylor A, *et al*. MAOA, maltreatment, and gene-environment interaction predicting children's mental health: new evidence and a meta-analysis [J]. *Mol Psychiatry*, 2006, 11(10): 903-913.
- [15] 刘晓庆, 甄永占, 郝晓方, 等. 赖氨大黄酸对糖尿病大鼠肝脏的保护作用及其机制 [J]. *吉林大学学报: 医学版*, 2014, 40(3): 499-503.
- [16] Li P, Zhang L, Tian X, *et al*. Docosahexaenoic acid has an anti-diabetic effect in streptozotocin-induced diabetic mice [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7(9): 3021- 3029.
- [17] Syed S N, Rizvi W, Kumar A, *et al*. *In vitro* antioxidant and *in vivo* hepatoprotective activity of leave extract of *Raphanus sativus* in rats using CCl₄ model [J]. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 2014, 11(3): 102-106.