

山楂叶总黄酮对糖尿病小鼠糖脂代谢的影响

叶希韵, 张 隆, 沈 菊, 王耀发

(华东师范大学生命科学学院, 上海 200062)

摘 要:目的 研究山楂叶总黄酮对糖尿病小鼠血糖和血脂等生化指标的影响。方法 采用四氧嘧啶(45 mg/kg)尾 iv 建立糖尿病小鼠模型, 并 ig 不同剂量的山楂叶总黄酮, 给药 30 d 后用生化方法检测相关指标。结果 山楂叶总黄酮可明显降低糖尿病小鼠血清中血糖、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、丙二醛(MDA)、果糖胺(FA)、山梨醇和大脑脂褐质水平($P < 0.01$), 升高血清高密度脂蛋白-胆固醇(HDL-C)水平($P < 0.05$), 呈剂量效应关系, 对由糖尿病引起的肝脏组织脂肪积累有一定的清除作用。结论 山楂叶总黄酮具有显著降低糖尿病小鼠血糖和血脂的作用, 并对糖尿病并发症和肝脏组织脂肪积累具有一定的防治作用。

关键词:山楂叶总黄酮; 糖尿病; 糖脂代谢; 血糖; 血脂

中图分类号: R286.72

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)11-1683-04

Effect of hawthorn leaf flavonoids on metabolism of glucose and lipids in diabetic mice

YE Xi-yun, ZHANG Long, SHEN Ju, WANG Yao-fa

(College of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Key words: hawthorn leaf flavonoids; diabetes mellitus; metabolism of glucose and lipid; blood glucose; blood lipid

糖尿病是一种常见多发的代谢疾病, 糖、脂代谢紊乱是糖尿病并发症的一个重要因素^[1,2]。因此, 深入研究糖尿病小鼠糖代谢与脂代谢之间的关系, 积极纠正糖尿病脂代谢异常对降低糖尿病的死亡率及改善患者生存质量是十分重要和必要的。目前有关山楂叶总黄酮在防治糖尿病及其并发症方面的研究尚未见报道, 山楂叶总黄酮在糖尿病动物糖、脂代谢方面的研究也尚未见报道。本实验通过建立糖尿病小鼠模型, 研究山楂叶总黄酮对其血糖、血脂等生化指标的影响, 以探讨山楂叶总黄酮纠正由糖尿病引发的糖脂代谢紊乱, 清除糖尿病引起的肝脏组织脂肪积累的作用, 同时探讨其对作为糖尿病并发症相关指标果糖胺和山梨醇的影响, 为进一步研究山楂叶总黄酮在糖尿病及其并发症的防治上提供一些实验依据。

1 材料

1.1 药品与试剂: 四氧嘧啶为 Sigma 产品, 购于华美生物公司; 葡萄糖、果糖胺(FA)、总胆固醇(TC)、血清高密度脂蛋白-胆固醇(HDL-C)、甘油三酯(TG)试剂盒均购于上海科欣生物技术研究; 山楂叶总黄酮(实验室自制, 含总黄酮 64%)。

1.2 仪器: TGL-16B 高速台式离心机; 722 分光光度计; Olympus 显微镜。

2 方法

2.1 分组及给药: 昆明种小鼠, 雄性, 体重(25±2)g, 共 90 只, 购于上海第二医科大学, 于本实验室饲养一周后开始实验。先随机挑选 10 只小鼠作为正常对照组(N组)。其余小鼠禁食 18 h 后, 尾 iv 四氧嘧啶(45 mg/kg), 96 h 后测空腹血糖值。选择血糖浓度在 25.00~30.00 mmol/L 的小鼠 40 只, 随机分为 4 组, 每组 10 只: 糖尿病模型组(M组)、山楂叶总黄酮低剂量组(HLF1组)、山楂叶总黄酮中剂量组(HLF2组)、山楂叶总黄酮高剂量组(HLF3组)。HLF1、HLF2 和 HLF3 各组分别 ig 给予 0.48、0.96、1.44 g/kg 山楂叶总黄酮 0.4 mL, 每天 1 次。N 和 M 组每天 ig 0.4 mL 生理盐水, 定期检测体重和血糖水平。实验 30 d 后, 眼球取血, 解剖取肝脏、脑组织待测。

2.2 检测指标: 血清中血糖、FA、TC、TG、HDL-C 采用相关试剂盒进行检测; 丙二醛(MDA)、山梨醇和大脑脂褐质, 按文献方法^[3]进行检测。

2.3 肝脏组织冰冻切片的光镜观察: 将肝组织加入

收稿日期: 2005-04-29

基金项目: 上海市科委基金资助项目(034958045)

作者简介: 叶希韵(1964—), 女, 浙江杭州人, 副教授, 博士, 1985 年本科毕业于华东师范大学生物系, 从事心血管细胞损伤与修复的研究。Tel: (021) 62232405 Fax: (021) 62233754 E-mail: xyue@bio.ecnu.edu.cn

10% 甲醛溶液中固定过夜,取出后分别加入 20%、30% 蔗糖 PBS 中至组织块下沉,取出后上冰冻切片机进行切片贴片,片子烘干后加入苏丹Ⅲ、Ⅳ混合液中染色 2~3 min,加入明矾苏木素中淡染 1 min,水洗干燥后用甘油明胶封片。

2.4 统计学分析:实验数据用 Excell 软件处理,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 t 检验。

3 结果

3.1 对糖尿病小鼠体重的影响:实验前各组小鼠体重无明显差异,在整个实验过程中 N 组小鼠体重不断增加,M 组小鼠体重则不断下降,糖尿病“三多一少”症状明显。山楂叶总黄酮各组小鼠体重在给药 7 d 时较实验前有所下降,给药 15 d 后小鼠体重下

降缓慢,给药 22 d 时体重有所回升,与 M 组比较差异显著 ($P < 0.05$),到给药 30 d 时与 M 组比较差异非常显著 ($P < 0.01$),“三多一少”症状明显减轻,用药各组呈剂量效应关系,见表 1。

3.2 对糖尿病小鼠血糖的影响:给药前,M 组与山楂叶总黄酮各组小鼠血糖无显著差异,但均与 N 组比较差异显著 ($P < 0.01$),说明糖尿病模型建立成功。给药后,山楂叶总黄酮各组随着实验时间的增加,血糖在逐渐下降,同时随着山楂叶总黄酮剂量的升高,血糖下降越来越明显,成一定的量效关系,与 M 组相比,差异显著 ($P < 0.01$),而 M 组小鼠血糖仍维持在较高的水平,说明山楂叶总黄酮具有显著降低血糖的作用,见表 2。

表 1 山楂叶总黄酮对糖尿病小鼠体重的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Effect of hawthorn leaf flavonoids on body weight in diabetic mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/ (g · kg ⁻¹)	体重/g				
		实验前	给药 7 d	给药 15 d	给药 22 d	给药 30 d
N	—	28.54 ± 0.73	31.08 ± 1.16	34.34 ± 1.27	37.11 ± 1.35	39.42 ± 1.22
M	—	29.17 ± 0.82	25.15 ± 2.73	22.65 ± 2.81 [△]	18.84 ± 2.57 ^{△△}	15.31 ± 2.06 ^{△△}
HLF1	0.48	29.23 ± 0.54	25.27 ± 1.54	23.74 ± 2.39 [△]	23.52 ± 3.42 [△]	24.78 ± 3.18 [*]
HLF2	0.96	28.66 ± 0.94	25.64 ± 2.33	24.15 ± 2.44 [△]	26.04 ± 2.71 [*]	29.31 ± 2.27 ^{**}
HLF3	1.44	28.81 ± 0.63	26.12 ± 3.68	25.84 ± 2.56 [△]	27.79 ± 2.63 [*]	31.86 ± 3.59 ^{**}

与 N 组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$; 与 M 组比较: $^* P < 0.05$ $^{**} P < 0.01$

$\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs group N; $^* P < 0.05$ $^{**} P < 0.01$ vs group M

表 2 山楂叶总黄酮对糖尿病小鼠血糖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 2 Effect of hawthorn leaf flavonoids on blood glucose in diabetic mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/ (g · kg ⁻¹)	血糖值/(mmol · L ⁻¹)			
		给药前	给药 10 d	给药 20 d	给药 30 d
N	—	6.75 ± 0.82	7.66 ± 0.93	7.85 ± 0.72	7.81 ± 0.67
M	—	26.78 ± 1.94 ^{△△}	29.23 ± 2.24 ^{△△}	32.29 ± 1.06 ^{△△}	33.26 ± 3.68 ^{△△}
HLF1	0.48	27.15 ± 1.78 ^{△△}	25.74 ± 1.06 ^{△△}	24.11 ± 2.56 ^{△△*}	21.71 ± 2.89 ^{△△**}
HLF2	0.96	26.82 ± 1.57 ^{△△}	24.91 ± 2.15 ^{△△*}	21.87 ± 2.29 ^{△△**}	18.51 ± 3.26 ^{△△**}
HLF3	1.44	27.33 ± 2.12 ^{△△}	23.34 ± 2.62 ^{△△*}	20.54 ± 2.87 ^{△△**}	17.22 ± 3.45 ^{△△**}

与 N 组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$; 与 M 组比较: $^* P < 0.05$ $^{**} P < 0.01$

$\Delta\Delta P < 0.01$ vs group N; $^* P < 0.05$ $^{**} P < 0.01$ vs group M

3.3 对糖尿病小鼠血脂的影响:动物实验 30 d 后检测糖尿病小鼠血清 TC、TG、HDL-C。与 N 组相比,M 组血清 TC、TG 水平显著升高 ($P < 0.01$),而 HDL-C 明显下降 ($P < 0.05$),说明糖尿病小鼠的血脂水平明显比正常组高;山楂叶总黄酮各组与 M 组相比 TC、TG 水平逐渐下降,HDL-C 水平逐渐升高,且随着山楂叶总黄酮剂量的升高,降血脂作用越来越明显,成一定的量效关系,说明山楂叶总黄酮具有显著降低血脂的作用,见表 3。

3.4 对糖尿病小鼠血清 MDA、FA、山梨醇和大脑脂褐质水平的影响:与 N 组相比,M 组血清中 MDA、FA、山梨醇和大脑脂褐质水平均显著升高

表 3 山楂叶总黄酮对糖尿病小鼠 TC、TG 和 HDL-C 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 3 Effect of hawthorn leaf flavonoids on TC, TG, and HDL-C in diabetic mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/ (g · kg ⁻¹)	TC/ (mmol · L ⁻¹)	TG/ (mmol · L ⁻¹)	HDL-C/ (mmol · L ⁻¹)
N	—	4.12 ± 0.34	1.42 ± 0.32	2.97 ± 0.67
M	—	6.43 ± 0.77 ^{△△}	2.88 ± 1.41 ^{△△}	2.08 ± 0.58 [△]
HLF1	0.48	5.81 ± 0.65 ^{△△}	2.12 ± 0.25 [△]	2.37 ± 0.66 [△]
HLF2	0.96	5.74 ± 0.81 ^{△△*}	2.04 ± 0.46 [*]	2.41 ± 0.44 [*]
HLF3	1.44	5.05 ± 0.97 ^{△△**}	1.98 ± 0.82 ^{**}	2.52 ± 0.53 [*]

与 N 组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$

与 M 组比较: $^* P < 0.05$ $^{**} P < 0.01$

$\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs group N

$^* P < 0.05$ $^{**} P < 0.01$ vs group M

($P < 0.01$), 说明糖尿病小鼠机体内脂质过氧化产物增多, 形成糖尿病并发症的危险因子 FA 和山梨醇的水平也在升高。与 M 组相比, 山楂叶总黄酮各组随着剂量的升高, 降低血清 MDA、FA、山梨醇和大脑脂褐质水平的作用越来越明显, 成一定的量效

关系, 说明山楂叶总黄酮具有显著的抗脂质过氧化的作用, 且对作为糖尿病并发症相关指标的果糖胺和山梨醇水平有明显的降低作用, 提示山楂叶总黄酮在一定程度上可能具有抗糖尿病并发症的作用, 见表 4。

表 4 山楂叶总黄酮对糖尿病小鼠血清 MDA、FA、山梨醇及大脑脂褐质水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 4 Effect of hawthorn leaf flavonoids on MDA, FA, sorbitol levels in serum, and brain lipofuscin of diabetic mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g · kg ⁻¹)	MDA/(mmol · L ⁻¹)	FA/(mmol · L ⁻¹)	山梨醇/(mmol · L ⁻¹)	大脑脂褐质/(mmol · L ⁻¹)
N	—	1.34 ± 0.44	1.49 ± 0.34	0.57 ± 0.04	42.33 ± 3.25
M	—	2.77 ± 0.56 ^{△△}	4.65 ± 0.57 ^{△△}	0.95 ± 0.06 ^{△△}	87.45 ± 6.41 ^{△△}
HLF1	0.48	2.09 ± 0.72 ^{△△}	2.57 ± 0.48 [*]	0.83 ± 0.03 [*]	63.92 ± 5.87 [*]
HLF2	0.96	1.88 ± 0.56 [*]	2.24 ± 0.35 [*]	0.80 ± 0.07 ^{**}	58.43 ± 9.82 ^{**}
HLF3	1.44	1.76 ± 0.83 ^{**}	1.87 ± 0.68 ^{**}	0.72 ± 0.04 ^{**}	53.12 ± 7.67 ^{**}

与 N 组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$; 与 M 组比较: $* P < 0.05$ $** P < 0.01$

$\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs group N; $* P < 0.05$ $** P < 0.01$ vs group M

3.5 对糖尿病小鼠肝脏组织切片的病理观察: 光镜下观察可见: N 组肝小叶排列整齐规则, 肝细胞没有肿胀, 细胞中几乎没有染上红色的脂质颗粒; 与 N 组相比, M 组肝细胞肿胀, 空泡较多, 脂肪颗粒增多, 整个肝脏组织染色呈深红色, 表明有大量的脂质积累; 山楂叶总黄酮高剂量组与 M 组相比, 肝小叶损伤区域缩小, 肝小叶排列较为整齐, 肝细胞中脂肪颗粒明显减少, 整个肝脏组织染色后颜色明显比模型组淡, 说明肝组织脂质积累明显减少。结果表明, 山楂叶总黄酮对由糖尿病引起的肝组织脂肪积累有一定的减轻作用, 对肝脏有明显的保护作用。

4 讨论

在糖尿病发病过程中, 由于胰岛素分泌绝对或相对不足, 使体内糖、脂等多种代谢紊乱, 进而导致多种并发症的发生, 如冠心病、肾病、神经病变等, 严重危害人们的身心健康。糖尿病患者比非糖尿病患者更易患动脉硬化性疾病的原因除了与糖尿病症状本身如高血糖、肥胖、高血压、高胰岛素血症、胰岛素抵抗等因素有关外, 糖脂代谢紊乱也是一个明确而重要的因素^[1,2]。糖代谢和脂代谢之间有着密切联系, 两者关系中, 高糖血症为原发性改变, 高脂血症为继发性改变, 因此纠正糖脂代谢紊乱是治疗糖尿病及其并发症的重要手段。

本实验建立的四氧嘧啶糖尿病小鼠模型在出现高血糖症状后, 也表现出高脂血症及明显的肝脏脂肪堆积现象。说明糖脂代谢关系极为密切, 高血糖可以引起脂代谢紊乱, 因为糖脂代谢是相通的, 糖酵解的中间产物转变成甘油可合成脂肪, 由脂肪分解而来的甘油也可转变成磷酸二羟丙酮, 循糖酵解或异生途径合成葡萄糖或糖原。因此, 血糖水平不仅取决

于糖代谢的调节, 脂代谢水平对此有很大的影响。糖尿病小鼠长期在高糖状态下所致的糖激化作用使体内自由基生成增多, 加之血液中抗氧化剂浓度降低, 这样就造成了糖尿病小鼠体内脂质过氧化产物积累, 表现在小鼠血液中 MDA 和大脑脂褐质水平明显增加。在糖尿病小鼠血清中葡萄糖发生非酶促反应形成具有酰胺键的糖化血清蛋白, 又称果糖胺 (FA)。FA 在血清中的浓度比较稳定, 可反映 2~3 周内的平均血糖水平。用 FA 测定糖尿病的控制情况具有快速、简便、精确度高、影响因素少等优点^[4]。研究证实多元醇通路的激活参与糖尿病并发症如神经病变、肾病等的发生发展^[5]。山梨醇是多元醇通路的特异产物, 其水平的高低可反映多元醇通路的代谢情况^[6]。目前认为果糖胺和山梨醇是检测糖尿病并发症的重要指标之一, 它们与糖尿病及其并发症的关系非常密切。

本实验发现给糖尿病小鼠 ig 不同剂量的山楂叶总黄酮 30 d 后, 对动物血糖变化进行动态观察, 与糖尿病小鼠模型组相比, 其糖尿病小鼠的血糖、TC、TG、MDA、FA、山梨醇和大脑脂褐质的水平均显著降低, HDL-C 水平明显上升, 且呈剂量效应关系, 说明山楂叶总黄酮具有一定的降血糖和降血脂作用, 对由高血糖引起的糖、脂代谢紊乱具有较好的改善效果, 还具有一定的抗脂质过氧化能力和改善糖尿病并发症的可能性。

综上所述, 四氧嘧啶可诱导小鼠糖尿病的形成, 高血糖可引起体内糖代谢和脂代谢的紊乱, 并导致脂类在肝脏中堆积, 同时造成果糖胺、山梨醇水平升高, 脂质过氧化程度加剧。山楂叶总黄酮对四氧嘧啶引起的糖尿病小鼠有明显的治疗作用, 能明显降低

糖尿病小鼠血糖水平,改善糖尿病小鼠血清脂质异常,具有降血脂和减少脂质过氧化形成的作用,减少由于糖尿病引起的动物肝脏中脂质的积累。尤其是具有降低果糖胺和山梨醇水平的作用,这些作用无疑对防治糖尿病及其并发症的发生具有积极的意义,本实验结果为山楂叶总黄酮将来进一步在糖尿病及其并发症的防治研究提供了一定的实验依据。

References:

- [1] Fara J M, Lu H L, Cianflone K. Diabetes, lipids, and adipocyte secretagogues [J]. *Biochem Cell Biol*, 2004, 82 (1): 170-190.
- [2] Lawrence J M, Reid J, Taylor G J, et al. The effect of high dose atorvastatin therapy on lipids and lipoprotein subfractions in overweight patients with type 2 diabetes [J]. *Atherosclerosis*, 2004, 174(1): 141-149.
- [3] Wang S X, Wen G B, Cao R X, et al. Activation of polyol pathway and its mechanisms induced by glucose in human vascular endothelial cells [J]. *Chin J Arterioscler* (中国动脉硬化杂志), 2002, 10(3): 214-216.
- [4] Li X W, Chen J W, Yang P. Detection of serum fructosamine and its diagnostic value in type 2 diabetes [J]. *J Bengbu Med Coll* (蚌埠医学院学报), 2001, 26(2): 159-160.
- [5] Dunlop M. Aldose reductase and the polyols pathway in diabetic nephropathy [J]. *Kidney Int*, 2000, 58 (Suppl 77): 3-12.
- [6] Fang Z H, Zhang X P, Bao D L, et al. Effects of Shendan Jianyi Capsule on aldose reductase activity of kidney in diabetic rats [J]. *J Chin Integr Med* (中西医结合学报), 2004, 2(2): 126-128.

升麻提取物对去卵巢所致大鼠骨质疏松症的作用

李春梅^{1,2}, 刘志峰^{1,2}, 李 敏¹, 高永林², 韩 兵², 刘 珂^{1,2*}

(1. 烟台大学药学院 基础医学教研室, 山东 烟台 264005; 2. 山东省天然药物工程技术研究中心, 山东 烟台 264003)

毛茛科升麻属多种植物的根茎在我国传统中药中作为治疗妇女崩漏、子宫下垂等症的妇科良药。在欧洲, 升麻属植物总状升麻 *Cimicifuga racemosa* (Turcz.) Maxim. 也用于治疗妇女更年期综合征, 其提取物制成的产品已在欧美上市^[1]。最近研究发现其中的三萜类成分具有抗骨质疏松活性。本实验利用去卵巢诱导大鼠骨质疏松症模型, 研究升麻提取物(含升麻三萜苷 71.2%)对去卵巢致骨质疏松大鼠股骨生物力学及血清雌二醇(E_2)水平的影响, 以探讨其作用机制, 为开发防治骨质疏松的药物提供理论依据。

1. 材料与方法

1.1 药材、试剂及仪器: 升麻提取物(山东省天然药物工程技术研究中心提供, 为从总状升麻 *C. racemosa* (Turcz.) Maxim. 中提取得到的有效部位, 含升麻三萜苷 71.2%, 用羧甲基纤维素钠制成混悬液); 龙牡壮骨颗粒(武汉健民药业股份有限公司生产, 批号 0312322); E_2 测定试剂盒(德国罗氏公司)。Elecsys107 电发光免疫分析仪(德国罗氏公司产品); BP210S 型电子分析天平(Sartorius 公司生产); CSS-1101C 电子万能试验机(长春试验机研究所生产); Norland XR-36 型双能 X 线骨密度

测定仪(美国)。

1.2 动物: 普通级 SD 大鼠, 雌性, 6 月龄, 体重(300±30)g, 由山东绿叶天然药物研究开发有限公司动物实验中心提供。

1.3 方法

1.3.1 分组及给药: 动物随机分为 6 组, 即假手术组, 骨质疏松模型组, 升麻提取物低、中、高剂量(15、30、60 mg/kg)组, 阳性对照药物龙牡壮骨颗粒(5 000 mg/kg)组, 每组 10 只。其中除假手术组外均按文献方法做卵巢摘除手术^[2]。术后 3 个月, 各组分别按上述剂量 ig 给药, 每日 1 次。假手术组和模型组给予等体积的羧甲基纤维素钠(10 mL/kg)。3 个月后, 大鼠以 10% 水合氯醛(3 mL/kg, ip)麻醉, 腹主动脉采血, 分离血清, 采用 Elecsys107 电发光免疫分析仪测定血清 E_2 水平; 称子宫质量, 计算子宫指数(子宫质量/大鼠体重×100)。取左侧股骨, 剔除肌肉和周围组织, 用 Norland XR-36 型双能 X 射线骨密度仪扫描其股骨干骺端 10 mm 区域, 分析其骨密度。

1.3.2 大鼠股骨生物力学的测定: 取大鼠右侧股骨, 剔除肌肉和周围组织, 用浸有生理盐水的纱布数层包裹, 装入样品袋, 置冰箱 0℃ 保存, 7 d 之内测

收稿日期: 2005-03-13

作者简介: 李春梅(1978—), 女, 硕士, 助教, 山东龙口人, 主要从事药理学研究。

* 通讯作者 刘 珂 Tel: (0535) 6717618-8058 E-mail: liuke@luye-pharm.com