

五味子油对链脲佐菌素诱导的 2 型糖尿病大鼠的影响

安丽萍^{1,2}, 王英平³, 刘晓梅¹, 王春梅², 詹巾卓², 孙 汇², 李 娜², 王 拓², 杜培革^{2*}, 孙志伟^{1,4*}

1. 吉林大学公共卫生学院, 吉林 长春 130021

2. 北华大学药学院 微生物与生化药学教研室, 吉林 吉林 132013

3. 中国农业科学院特产研究所, 吉林 吉林 132019

4. 首都医科大学公共卫生学院, 北京 100069

摘要: 目的 研究五味子油对链脲佐菌素诱导的 2 型糖尿病大鼠血糖、胰岛细胞形态及功能影响。方法 高脂饲料联合 2 次 ip 小剂量链脲佐菌素 (STZ) 诱导建立 2 型糖尿病大鼠模型。糖尿病大鼠每天分别 ig 五味子油 0.25、0.5、1.0 mg/kg, 连续给药 6 周后检测大鼠空腹血糖、血清胰岛素水平; HE 染色法观察大鼠胰腺病理形态学改变; 免疫组织化学方法检测大鼠胰腺细胞胰岛素的表达; RT-PCR 法检测大鼠胰腺组织胰岛素和胰十二指肠同源盒因子 (PDX-1) mRNA 表达水平。结果 五味子油可显著降低糖尿病大鼠的血糖水平, 其高剂量组可使血糖恢复至正常水平; 提高胰岛素分泌水平, 显著提高胰岛素敏感指数, 改善胰岛素抵抗; 可减轻糖尿病大鼠胰腺病理学改变, 使变小的胰岛体积增大、胰岛 β 细胞数目增多、胰岛素表达提高; 还可提高糖尿病大鼠胰腺组织胰岛素和 PDX-1 mRNA 表达水平。结论 五味子油可以改善 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗, 减轻胰岛 β 细胞的损伤, 增加 β 细胞数量, 改善 β 细胞的功能缺陷, 提高胰岛素的分泌量, 增加胰岛素和 PDX-1 mRNA 表达, 从而产生降血糖作用。

关键词: 五味子油; 2 型糖尿病; 降血糖; 胰岛素; 胰岛 β 细胞

中图分类号: R282.710.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)03-0552-05

Effect of *Schisandrae Fructus* oil on type 2 diabetic rats induced by Streptozotocin

AN Li-ping^{1,2}, WANG Ying-ping³, LIU Xiao-mei¹, WANG Chun-mei², ZHAN Jin-zhuo², SUN Hui², LI Na², WANG Tuo², DU Pei-ge², SUN Zhi-wei^{1,4}

1. School of Public Health, Jilin University, Changchun 130021, China

2. Department of Microbiology and Biochemistry, School of Pharmacy, Beihua University, Jilin 132013, China

3. Institute of Special Animal and Plant Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Jilin 132019, China

4. School of Public Health and Family Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Key words: *Schisandrae Fructus* oil (SFO); type 2 diabetes; hypoglycemic; insulin; islet β cells

五味子是木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 或华中五味子 *Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils. 的干燥成熟果实, 是传统中药, 味酸、甘, 性温, 归肺、心、肾经, 有收敛固涩、益气生津、补肾宁心等功效^[1]。五味子中含有木脂素、多糖、挥发油、脂肪酸、维生素和氨基酸等成分^[2-3], 五味子油的主要成分为木脂素, 是五味子中最主要的活性成分之一。五味子油对四氧嘧啶诱导的 1 型糖尿病小鼠具有降血糖作用, 但具

体机制尚不清楚^[4-5], 而关于其对 2 型糖尿病大鼠的影响及机制研究国内鲜见报道。为此本实验研究五味子油对链脲佐菌素 (STZ) 诱导的 2 型糖尿病大鼠的降血糖作用及其机制, 为研发有效的治疗糖尿病药物提供依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

五味子为中国农业科学院特产研究所优选新品种 (拟名“优红 01”), 剥离果皮的种子用醋酸乙酯

收稿日期: 2012-01-03

基金项目: 吉林省科技发展计划重大项目 (20106041)

作者简介: 安丽萍 (1973—), 女, 吉林省吉林市人, 讲师, 吉林大学公共卫生学院在读博士, 主要从事生物化学与分子生物学研究。

*通讯作者 孙志伟 Tel: (0431)85619458 E-mail: zwsun@hotmail.com

杜培革 Tel: (0432)64608278 E-mail: dupeige2001@126.com

提取, 低温浓缩油状物质即为五味子油 (含五味子醇甲 2.344%、五味子乙素 1.480%、五味子醇乙 0.810%、五味子甲素 0.522%、五味子乙素 0.160%)。百泌达 (Exenatide), 美国 Baxter Pharmaceutical Solutions LLC, 批号 H20090382。链尿佐菌素 (STZ), Sigma 公司; 血糖试剂盒, 北京康化公司; 胰岛素试剂盒, 天津九鼎生物技术有限公司。

1.2 动物

Wistar 大鼠, 雄性, 体质量 200~250 g, 购自吉林大学基础医学院实验动物中心, 合格证号 2007-003。大鼠正常饲料含有 53%碳水化合物、5%脂肪、23%蛋白; 高脂饲料含 48%碳水化合物、22%脂肪、20%蛋白。

1.3 主要仪器

酶标仪, TECAN 公司; GC-2100 型 γ 放射免疫计数仪, 中国科大中佳公司产品。

2 方法

2.1 模型制备^[6]

Wistar 大鼠适应性饲养 1 周后, 随机抽取 8 只作为对照组, 以普通饲料喂养, 其余大鼠以高脂饲料喂养 4 周后, ip 小剂量 STZ 30 mg/kg, 共给药 2 次, 2 次给药间隔 1 周。并于 STZ 诱导并继续喂饲高脂饲料 2 周后检测空腹血糖, 以空腹血糖 ≥ 7.8 mmol/L 作为模型成功的判断标准。

2.2 分组与给药

将模型制备成功的大鼠按血糖水平 (7.8~16.0 mmol/L) 分为 5 组, 每组 8 只, 分别为模型组、百泌达阳性对照组和五味子油高、中、低剂量组。在喂饲高脂饲料的同时, 阳性对照组每日 ip 百泌达 1.1 μ g/kg, 五味子油 3 个剂量组分别 ig 五味子油 1.0、0.5、0.25 mg/kg, 每日 1 次, 连续给药 6 周。

2.3 血清生化指标检测

给药 6 周后, 大鼠禁食不禁水 12~16 h, ip 乌拉坦 100 mg/kg 麻醉, 腹主动脉取血约 4~5 mL 并处死动物。血样于 3 500 r/min 离心 10 min, 分离血清, 分装于 EP 管内, -70 $^{\circ}$ C 冻存待测。血糖水平检测按试剂盒说明书操作; 放免法检测血清胰岛素水平, 并计算胰岛素敏感指数 [ISI, $ISI = \ln (FBG \times FINS)^{-1}$, FBG 为空腹血糖水平, FINS 为空腹胰岛素水平]。

2.4 胰腺形态学观察

将胰腺剥取后立即置于 10% 福尔马林固定液中固定 24 h, 再于 0.01 mol/L 的 PBS 溶液中浸泡 12 h,

梯度乙醇脱水 (梯度乙醇脱水后, 用二甲苯置换组织切片中的乙醇), 石蜡包埋, 切片 4 μ m, HE 染色。中性树胶封片, 光学显微镜下 ($\times 200$) 观察、拍照。

2.5 免疫组织化学法检测胰腺胰岛素表达

采用免疫组织化学 S-P (链霉素抗生物素蛋白-一过氧化物酶) 法, 按试剂盒说明书检测胰腺胰岛素表达。

2.6 RT-PCR 检测胰腺组织胰岛素和胰十二指肠同源盒因子-1 (PDX-1) mRNA 表达

从 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中取出胰腺组织标本约 100 mg 置入研钵内, 液氮研磨, 加入 1 mL Trizol, 充分裂解, 离心后加入 200 μ L 氯仿, 振荡混匀, 室温放置 15 min, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min。吸取上层水相, 加入 0.5 mL 异丙醇混匀, -20 $^{\circ}$ C 放置 30 min, 离心弃上清, RNA 沉于管底, 75% 乙醇洗沉淀 2 次, 用 35 μ L 氨基甲烷+乙二胺四乙酸缓冲液 (TE 缓冲液) 溶解 RNA 样品。逆转录反应: RNA 3 μ L, 5 $\times$ 缓冲液 4 μ L, 10 $\times$ dNTP 2 μ L, Oligo (dT) 1 μ L, 逆转录酶 0.5 μ L, 焦碳酸二乙酯 (DEPC) H_2O 9.5 μ L。反应程序: 42 $^{\circ}$ C、60 min, 95 $^{\circ}$ C、5 min, 4 $^{\circ}$ C、1~5 min。PCR 反应: cDNA 1 μ L, 引物 F (20 pmol/ μ L) 0.5 μ L, 引物 R (20 pmol/ μ L) 0.5 μ L, 2 $\times$ Mix 12.5 μ L, 重蒸水 10.5 μ L。扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 35 个循环。胰岛素引物序列: 正向引物 5'-ACCTTTGTGGTCCTCACCTG-3', 反向引物 5'-GTGCAGCACTGATCCACAAT-3', 扩增片段长度为 205 bp。PDX-1 引物序列: 正向引物 5'-GGCTTAACTAAACGCCACA-3', 反向引物 5'-CAGTTGGGAGCCTGATTCTC-3', 扩增片段长度为 212 bp。 β -actin 引物序列: 正向引物 5'-AGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3', 反向引物 5'-GGAAGGTGGACAGTGAGGC-3', 扩增片段长度为 444 bp。用胰岛素或 PDX-1 与内参 β -actin 的积分吸光度比值表示胰岛素或 PDX-1 mRNA 的表达量。

2.7 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 对 2 型糖尿病大鼠一般状态和空腹血糖的影响

对照组大鼠精神状态良好, 皮毛光泽, 体质量持续、稳定上升。模型组大鼠给予 STZ 后, 进食量、饮水量增加, 消瘦, 精神萎靡, 毛发稀落欠光泽,

动作迟缓。五味子油各剂量组大鼠给药 6 周后,一般状态好转,糖尿病症状明显减轻。与对照组相比,模型组大鼠空腹血糖水平明显上升 ($P<0.05$);与模型组相比,五味子油高、中剂量组均可降低空腹血糖水平 ($P<0.05$),其中高剂量组可使糖尿病大鼠空腹血糖恢复正常。结果见表 1。

表 1 五味子油对 2 型糖尿病大鼠空腹血糖的影响
($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Effects of SFO on fasting blood glucose in rats with type 2 diabetes ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组 别	剂量 / ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	空腹血糖 / ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	
		给药前	给药后
对照	—	4.43 ± 0.36	4.52 ± 0.42
模型	—	$13.08 \pm 0.82^*$	$17.06 \pm 1.57^*$
五味子油	1.0	$13.51 \pm 0.46^*$	$6.82 \pm 0.35^\Delta$
	0.5	$13.68 \pm 0.86^*$	$8.34 \pm 0.46^\Delta$
	0.25	$12.85 \pm 0.58^*$	14.67 ± 0.46
百泌达	0.001 1	$13.82 \pm 0.64^*$	$5.86 \pm 0.49^{\Delta\Delta}$

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

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

3.2 对糖尿病大鼠胰岛素水平和 ISI 的影响

与对照组比较,模型组大鼠血清胰岛素水平明显降低 ($P<0.05$),ISI 明显下降 ($P<0.05$);与模型组相比,五味子油高剂量组大鼠在给药 6 周后,血清胰岛素水平明显升高 ($P<0.05$),ISI 显著提高 ($P<0.05$)。结果见表 2。

表 2 五味子油对 2 型糖尿病大鼠胰岛素水平和 ISI 的影响
($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Effects of SFO on insulin and ISI in rats with type 2 diabetes ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组 别	剂量 / ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	胰岛素 / ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	ISI
对照	—	0.83 ± 2.46	-4.19 ± 0.13
模型	—	$0.59 \pm 3.42^*$	$-5.22 \pm 0.07^*$
五味子油	1.0	$0.77 \pm 4.56^\Delta$	$-4.83 \pm 0.11^\Delta$
	0.5	0.65 ± 3.32	$-4.89 \pm 0.11^\Delta$
	0.25	0.61 ± 4.65	-5.24 ± 0.18
百泌达	0.001 1	0.78 ± 3.73	$-4.57 \pm 0.15^\Delta$

与对照组比较: $^*P<0.05$; 与模型组比较: $^\Delta P<0.05$

$^*P<0.05$ vs control group; $^\Delta P<0.05$ vs model group

3.3 对糖尿病大鼠胰腺形态学的影响

对照组和百泌达组大鼠胰岛呈圆形或椭圆形团索状,边界清晰,胰岛内 β 细胞分布均匀,排列紧密,胞浆丰富。模型组大鼠胰岛数量减少,体积变小,边界模糊,胰岛内 β 细胞排列稀疏,细胞明显减少,细胞肿胀、坏死,并可见空泡变性。五味子油各剂量组胰岛相对完整,胰岛边界较清晰, β 细胞数目增加,细胞形态较好,无明显的肿胀及坏死。结果见图 1。

3.4 对糖尿病大鼠胰腺细胞胰岛素表达的影响

对照组和百泌达组大鼠胰岛结构完整、体积较

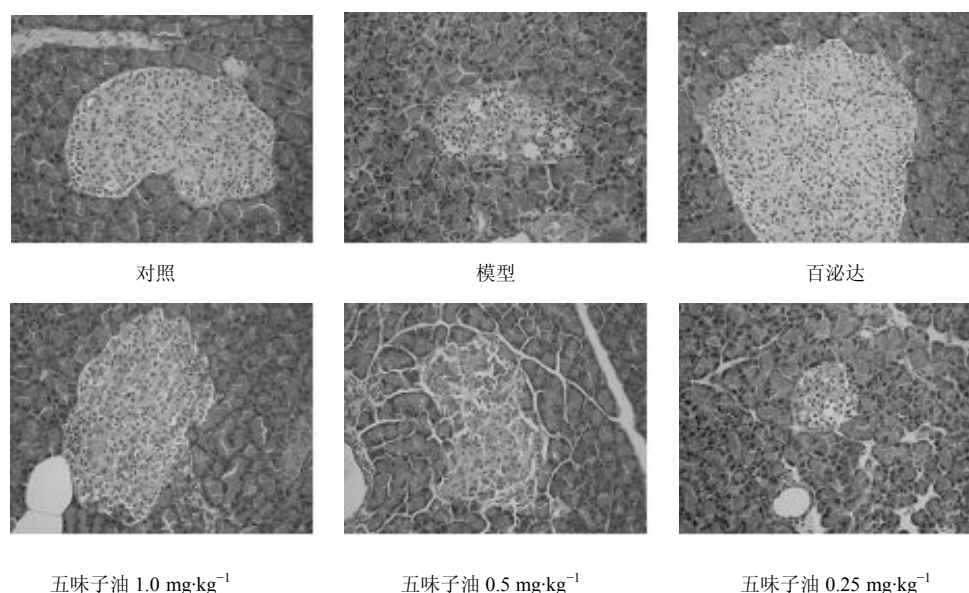


图 1 各组大鼠胰腺组织 HE 染色形态学观察

Fig. 1 Morphology of pancreatic tissues in every group of rats by HE staining

大、边界清晰,胰岛素阳性颗粒染色后为棕色,在胰岛内广泛分布。模型组大鼠胰岛大小不一,大部分胰岛小、边界不清晰,胰岛素阳性颗粒染色浅、数量较少。与模型组比较,五味子油各剂量组胰岛体积增大,胰岛内阳性染色颗粒明显增加。结果见图 2。

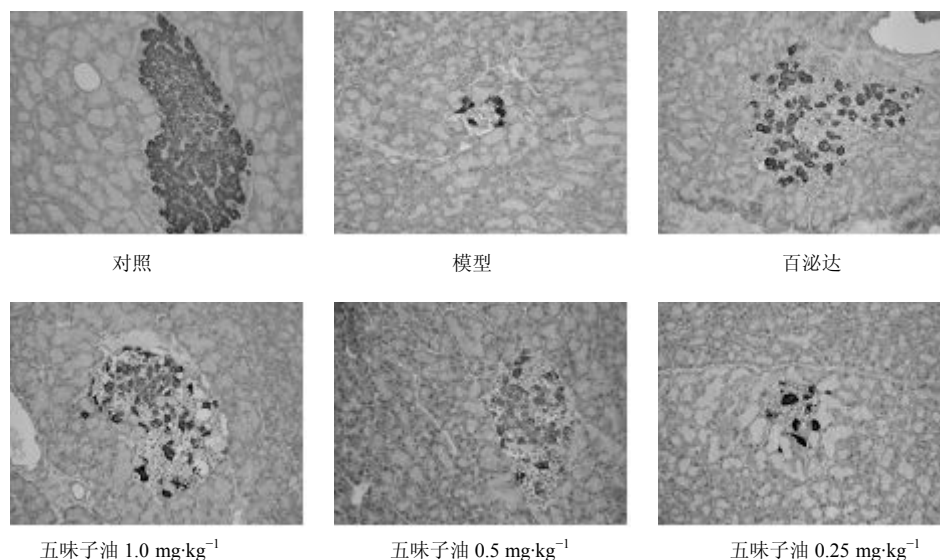


图 2 各组大鼠胰腺组织胰岛素表达观察

Fig. 2 Insulin expression of pancreatic islet tissues in every group of rats

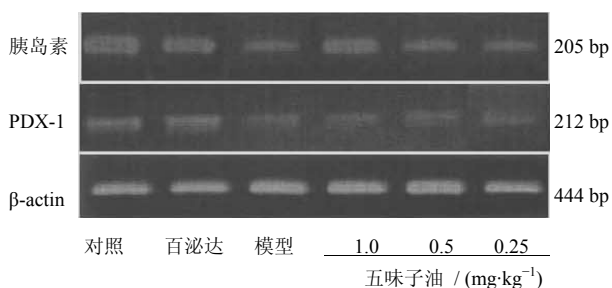


图 3 五味子油对 2 型糖尿病大鼠胰腺组织胰岛素和 PDX-1 mRNA 表达的影响

Fig. 3 Effect of SFO on mRNA expression of insulin and PDX-1 in pancreatic tissues of rats with type 2 diabetes

4 讨论

2 型糖尿病是与环境 and 遗传相关的复杂疾病,发病机制不清。在 2 型糖尿病发病过程中,持续高血糖是代谢严重紊乱的主要表现之一,因此高血糖是糖尿病控制不良的标志,糖毒性可导致胰岛素的合成与分泌减少^[7-8]。短期高血糖能促进胰岛 β 细胞内 PDX-1 与胰岛素基因的結合,使胰岛素 mRNA 表达增加;但在长期高血糖作用下,PDX-1 和胰岛

3.5 对糖尿病大鼠胰腺组织胰岛素和 PDX-1 mRNA 表达的影响

与对照组相比,模型组大鼠胰岛素和 PDX-1 mRNA 表达明显下降 ($P<0.05$)。与模型组相比,五味子油高剂量给药 6 周后显著增加糖尿病大鼠胰岛素和 PDX-1 mRNA 表达 ($P<0.05$)。结果见图 3 和表 3。

表 3 五味子油对 2 型糖尿病大鼠胰腺组织胰岛素和 PDX-1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effect of SFO on mRNA expression of insulin and PDX-1 expression in pancreatic tissues of rats with type 2 diabetes ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组 别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	胰岛素 / β-actin	PDX-1 / β-actin
对照	—	0.54 ± 0.06	0.561 ± 0.07
模型	—	0.33 ± 0.07*	0.36 ± 0.03*
五味子油	1.0	0.46 ± 0.06 [▲]	0.48 ± 0.05 [▲]
	0.5	0.43 ± 0.04 [▲]	0.43 ± 0.06 [▲]
	0.25	0.35 ± 0.09	0.38 ± 0.08
百泌达	0.001 1	0.50 ± 0.05 ^{▲▲}	0.55 ± 0.05 ^{▲▲}

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

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

素表达水平平均下降^[9]。Alquobaili 等^[10]研究也表明,持续高血糖能抑制 PDX-1 基因和胰岛素基因表达,PDX-1 蛋白与胰岛素基因启动子的結合也受到抑制,从而使胰岛素的合成及分泌下降,胰岛 β 细胞功能障碍。合适的实验动物模型是研究 2 型糖尿病发病机制和药疗的生物医学基础。能体现因膳食改

变引起的肥胖,进而出现糖尿病综合征特点的动物模型是比较符合人糖尿病自然发病机制的模型^[11]。

本实验以大鼠 ip STZ 2 次制备 2 型糖尿病模型,结果显示,五味子油有很好的降血糖、促进胰岛素分泌的作用,尤其是高剂量组可恢复糖尿病大鼠血糖至正常水平,血清胰岛素分泌水平与对照组无明显差异;五味子油还可使胰腺病理学改变减轻,胰岛体积变大,胰岛 β 细胞数目增多,胰岛素表达增加,胰岛素和 PDX-1 mRNA 表达水平明显升高。提示五味子油对 2 型糖尿病大鼠治疗作用机制可能是通过缓解高糖对 PDX-1 和胰岛素基因表达的抑制作用,增加 PDX-1 与胰岛素基因的结合,促进胰岛素基因表达,增强胰岛 β 细胞功能,增加胰岛素分泌,改善胰岛素抵抗,从而产生降血糖疗效。五味子油降血糖的作用机制可能是多方面的,值得进一步深入研究。

参考文献

- [1] 范美华. 五味子的研究新进展 [J]. 西北药学杂志, 2007, 22(5): 281-282.
- [2] 黄鑫, 宋凤瑞, 刘志强, 等. 现代质谱及其联用技术在中药五味子研究中的应用 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2009, 11(1): 115-119.
- [3] 史琳, 王志成, 冯叙桥. 五味子油化学成分与药理作用的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(3): 208-212.
- [4] 柴可夫, 覃志成, 王亚丽. 北五味子油对糖尿病小鼠胰岛细胞形态及功能的影响 [J]. 中国中医药科技, 2007, 14(3): 177-178.
- [5] 柴可夫, 覃志成, 王亚丽. 北五味子油对糖尿病小鼠抗氧化及葡萄糖转运蛋白 4 mRNA 表达的影响 [J]. 中医药学刊, 2006, 24(7): 1199-1200.
- [6] Zhang M, Lv X Y, Li J, *et al.* The characterization of high-fat diet and multiple low-dose streptozotocin induced type 2 diabetes rat model [J]. *Exp Diabetes Res*, 2009, doi: 10.1155/2008/704045.
- [7] Srinivasan K, Ramarao P. Animal models in type 2 diabetes research: an overview [J]. *Indian J Med Res*, 2007, 125: 451-472.
- [8] Poirout V, Robertson R P. Glucolipotoxicity: Fuel excess and B-cell dysfunction [J]. *Endoc Rev*, 2008, 29(3): 351-366.
- [9] Jun H S. *In vivo* regeneration of insulin-producing beta-cells [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2010, 654: 627-640.
- [10] Alquobaili Q F, Montenarh M. Pancreatic duodenal homeobox factor-1 and diabetes mellitus type 2 [J]. *Int J Mol Med*, 2008, 21 (4): 399-404.
- [11] Poirout V, Amyot J, Semache M, *et al.* Glucolipotoxicity of the pancreatic beta cell [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1801(3): 289-298.