

## 山柰酚对2型糖尿病大鼠慢性并发症相关因子的影响

吴巧敏, 金雅美, 倪海祥

浙江省中医院, 浙江 杭州 310006

**摘要:** **目的** 观察山柰酚对2型糖尿病大鼠慢性并发症相关因子的影响。**方法** 通过高脂饲料喂养, 并 ip 30 mg/kg 链脲佐菌素 (STZ) 诱导制备2型糖尿病大鼠模型。山柰酚给药组分别 ig 给予 50、100、200 mg/kg 药物, 并设模型组、对照组和二甲双胍 (0.2 g/kg) 阳性对照组。给药 10 周后, 采用葡萄糖氧化酶法对各组大鼠血糖进行测定; 放射免疫分析法进行血清胰岛素 (INS) 的检测, 并计算胰岛素敏感指数 (ISI); 应用酶法对血清中三酰甘油 (TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、超氧化物歧化酶 (SOD)、醛糖还原酶 (AR)、白细胞介素-6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 的量进行测定; 用硫代巴比妥酸 (TBA) 法检测丙二醛 (MDA) 的量。**结果** 与对照组比较, 模型组大鼠血糖及血清 INS 水平显著升高 ( $P < 0.01$ ), ISI 显著降低 ( $P < 0.05$ ); 模型组大鼠血清 TG 和 LDL-C 水平明显升高 ( $P < 0.01$ ), HDL-C 水平显著降低 ( $P < 0.01$ ); 模型组大鼠血清 MDA、AR、IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平显著升高 ( $P < 0.01$ ), SOD 活性显著降低 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 山柰酚给药组可降低大鼠血糖水平 ( $P < 0.05$ 、0.01), 改善胰岛素抵抗, 恢复血脂至正常水平, 并伴随着 MDA、AR、TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平降低 ( $P < 0.05$ 、0.01), SOD 活性升高 ( $P < 0.05$ 、0.01)。**结论** 山柰酚可能是通过降低血糖、改善 ISI, 维持正常血脂水平, 通过抗氧化、抗炎、降低 AR 途径, 从而对2型糖尿病大鼠的慢性并发症起到保护作用。

**关键词:** 山柰酚; 2型糖尿病; 慢性并发症; 抗氧化; 抗炎; 醛糖还原酶

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2015)12-1806-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.12.018

## Effect of kaempferol on correlation factors of chronic complications of type 2 diabetic rats

WU Qiao-min, JIN Ya-mei, NI Hai-xiang

Zhejiang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310006, China

**Abstract: Objective** To observe the effect of kaempferol on the correlation factors of chronic complications of type 2 diabetic rats. **Methods** Feeding high-fat diet combined with ip injection of 30 mg/kg STZ in rats to make the model of type 2 diabetes. Rats in every administration group were given respective drug (50, 100, and 200 mg/kg), and set the model, normal control, and positive control (metformin hydrochloride 0.2 g/kg) groups. After 10 weeks, using glucose oxidase to measure blood glucose of rats in each group; Radioimmunoassay was used to measure INS and get ISI. Measuring the contents of TG, HDL-C, LDL-C, SOD, AR, IL-6, TNF- $\alpha$ , and MDA was detected by TBA. **Results** Compared with diabetic model group, kaempferol administration can reduce blood glucose and insulin resistance, restore normal blood lipid levels, along with reducing MDA, AR, TNF- $\alpha$ , and IL-6 levels and increasing SOD levels. **Conclusion** Kaempferol can prevent and treat the chronic complications of type 2 diabetic rats by reducing blood glucose, insulin resistance, reducing the AR pathway as well as anti-oxidation and anti-inflammation.

**Key words:** kaempferol; type 2 diabetes; chronic complications; antioxidation; anti-inflammation; aldose reductase

糖尿病作为一种十分常见的内分泌代谢性疾病,常同时引发心、脑血管疾病等各种慢性并发症,现已严重威胁到人类的健康,甚至造成人类死亡。控制相关并发症,也成为糖尿病防治的重点和难点。2型糖尿病患者表现为以脂质、胰岛素等升高的代谢紊乱综合征,一旦发生代谢紊乱,则会降低胰岛

素敏感指数 (ISI),同时通过氧化应激、炎症反应、醛糖酶途径等机制导致各种慢性并发症的发生。其中,抗氧化、阻断醛糖酶途径成为目前治疗的新靶点。自2型糖尿病存在着炎症因子介导反应假说以来,糖尿病慢性并发症的炎症发病学说也一度成为研究热点。化学药虽然具有明显降血糖的优势,但

收稿日期: 2015-02-11

作者简介: 吴巧敏 (1974—), 浙江省中医院内分泌科主治医师, 主要从事糖尿病及甲状腺疾病临床研究。E-mail: katewu2003@126.com

是对糖尿病所引发的并发症的靶器官的保护作用却很弱。然而,中药不仅在对糖尿病慢性并发症的治疗方面具有一定作用,在改善全身整体状况方面也同样具有一定的优势。因过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) 能够提高胰岛素的敏感性、增强脂肪组织和骨骼肌储运葡萄糖的能力,从而被临床广泛地应用于治疗糖尿病。作为 PPAR $\gamma$  激动剂的山柰酚为黄酮类化合物,其主要来源于姜科 (Zingiberaceae) 植物山柰 *Kaempferia galanga* L. 的根茎。研究表明,山柰酚具有防癌、抗癌、抗氧化、抗炎、抗病毒以及抗菌等多种功效<sup>[2]</sup>。已有研究证明山柰酚可以有效降低空腹血糖和胰岛素抵抗,从而改善糖脂代谢紊乱<sup>[3]</sup>。但其对 2 型糖尿病引发的各种慢性并发症的具体作用及其机制鲜有研究。本实验从中药预防糖尿病慢性并发症的重要靶点出发,探讨山柰酚对 2 型糖尿病大鼠慢性并发症相关因子的影响,为 2 型糖尿病的治疗提供新思路。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量 200~250 g,购于第三军医大学医学实验动物中心,合格证号为 SCXK (渝) 2007-0005。

### 1.2 主要药物与试剂

山柰酚 (HPLC 测定质量分数  $\geq 99.0\%$ ,批号 96353) 和链脲佐菌素 (STZ, HPLC 测定质量分数  $\geq 98.0\%$ ,批号 S0130) 均由美国 Sigma 公司提供;二甲双胍为上海信宜制药厂产品;超氧化物歧化酶 (SOD) 和醛糖还原酶 (AR) 试剂盒由南京建成生物工程研究所提供;肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6 (IL-6) 试剂盒均由北京科美东雅生物技术有限公司提供。

### 1.3 仪器

全自动生化分析仪由日本的 Hitachi 公司提供;721 型分光光度计由上海精密科学仪器有限公司提供;酶标分析仪由上海赛默生物科技有限公司提供。

## 2 方法

### 2.1 2 型糖尿病大鼠模型的建立

从 90 只雄性大鼠中随机抽取 15 只,给予标准饲料喂养,作为对照组;其余 75 只大鼠则给予高热量饲料 (在标准饲料基础上加 1.5 : 1 : 1 比例的胆固醇、猪油和蛋黄)。4 周后,75 只大鼠 ip 30 mg/kg 的 STZ (临用前,将其溶解在 pH 4.0 的 0.1 mmol/L 的柠檬酸缓冲液中),每天 1 次,连续 2 d,对照组则 ip 等量的柠檬酸缓冲液。2 d 后禁食 1 d,检测大

鼠空腹血糖,血糖水平高于 16.7 mmol/L 则视为模型成功<sup>[4]</sup>,成功后各组均给予普通饲料喂养。

### 2.2 分组及给药

将 75 只成模大鼠按照数字表法随机分为 5 组:模型组,山柰酚低、中、高剂量 (50、100、200 mg/kg) 组,二甲双胍 (0.2 g/kg) 阳性对照组。另取未建模的 15 只大鼠则为对照组。其中山柰酚各剂量组大鼠 ig 给予山柰酚 (使用前先用植物油将其配成相应的浓度),每天 1 次,连续 10 周;阳性对照组 ig 给予规定量的二甲双胍;对照组和模型组则以相同的方式给予等量的植物油。在长达 10 周的给药过程中,有少量大鼠因给药操作不当而死亡,最后进行指标检测前,每组统计 12 只动物。

### 2.3 指标检测

**2.3.1 血糖检测** 采用葡萄糖测定试剂盒 (货号 GAGO20-1KT, Sigma),通过葡萄糖氧化酶法对各组大鼠血糖进行测定。

**2.3.2 胰岛素检测** 采用 <sup>125</sup>I 胰岛素放射免疫分析试剂盒 (上海瑞齐生物科技有限公司) 进行血清胰岛素 (INS) 检测,计算 ISI。

$$ISI = \ln[1/(\text{空腹血糖} \times \text{空腹胰岛素})]$$

**2.3.3 血脂指标检测** 按照试剂盒 (南京建成生物工程研究所提供) 说明书进行血清中三酰甘油 (TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 的测定,并运用全自动生化分析仪对其吸光度进行分析。

**2.3.4 血清中抗氧化指标检测** 用硫代巴比妥酸 (TBA) 法进行血清中丙二醛 (MDA) 量的测定。根据试剂盒说明书操作酶免法 ELISA 法进行 SOD 和 AR 活性的测定。

**2.3.5 血清中炎症相关因子的测定** 按照试剂盒方法应用 ELISA 法测定各组大鼠血清 IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平,并进行分析。

### 2.4 数据统计与分析

数据分析处理均采用 SPSS 18.0 统计软件包。计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间的比较应用单因素方差分析。

## 3 结果

### 3.1 各组大鼠血糖与血清 INS 的检测结果分析

与对照组比较,模型组大鼠血糖与血清 INS 均明显升高 ( $P < 0.01$ ), ISI 则明显降低 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,山柰酚各剂量组及二甲双胍阳性对照组大鼠血糖、血清 INS 均显著降低 ( $P < 0.05$ 、0.01), ISI 均显著升高 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 各组大鼠血糖、血清 INS、ISI 和血脂水平比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 1 Comparison on blood glucose, INS, and ISI levels in serum of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	血糖/ (mmol·L <sup>-1</sup> )	INS/ (ng·L <sup>-1</sup> )	ISI	TG/ (mmol·L <sup>-1</sup> )	LDL-C/ (mmol·L <sup>-1</sup> )	HDL-C/ (mmol·L <sup>-1</sup> )
对照	—	4.27±0.21	31.76±0.02	-4.32±0.21	4.78±0.13	0.69±0.12	1.58±0.26
模型	—	18.92±0.15 <sup>△△</sup>	81.96±0.31 <sup>△△</sup>	-8.43±0.34 <sup>△</sup>	19.23±2.27 <sup>△△</sup>	4.28±0.15 <sup>△△</sup>	0.97±0.41 <sup>△△</sup>
山柰酚	50	13.52±0.04 <sup>**</sup>	21.87±0.22 <sup>*</sup>	-6.94±0.15 <sup>*</sup>	11.24±0.36 <sup>**</sup>	2.99±0.29 <sup>*</sup>	1.14±0.34 <sup>*</sup>
	100	11.07±0.19 <sup>*</sup>	17.24±0.17 <sup>**</sup>	-6.38±0.47 <sup>*</sup>	10.27±1.18 <sup>*</sup>	2.16±0.20 <sup>**</sup>	1.27±0.07 <sup>*</sup>
	200	8.48±0.11 <sup>**</sup>	11.42±0.43 <sup>**</sup>	-6.01±0.07 <sup>*</sup>	9.64±1.21 <sup>**</sup>	1.98±0.34 <sup>**</sup>	1.38±0.18 <sup>*</sup>
二甲双胍	200	7.17±0.08 <sup>*</sup>	9.89±0.21 <sup>**</sup>	-5.09±0.01 <sup>*</sup>	7.21±0.13 <sup>**</sup>	1.78±0.13 <sup>**</sup>	1.31±0.09 <sup>*</sup>

与对照组比较: <sup>△</sup>P<0.05 <sup>△△</sup>P<0.01; 与模型组比较: <sup>\*</sup>P<0.05 <sup>\*\*</sup>P<0.01, 下同  
<sup>△</sup>P<0.05 <sup>△△</sup>P<0.01 vs control group; <sup>\*</sup>P<0.05 <sup>\*\*</sup>P<0.01 vs model group, same as below

### 3.2 各组大鼠血脂的检测结果分析

与对照组比较, 模型组大鼠血清 TG 与 LDL-C 水平均明显升高 (P<0.01), HDL-C 水平则明显降低 (P<0.01); 与模型组比较, 山柰酚各剂量组及二甲双胍阳性对照组大鼠血清 TG 与 LDL-C 水平明显降低 (P<0.05、0.01), HDL-C 水平明显升高 (P<0.05), 见表 1。

### 3.3 各组大鼠血清 MDA、SOD 及 AR 水平的比较

与对照组比较, 模型组大鼠血清 MDA、AR 水

平显著升高 (P<0.01), SOD 活性明显下降 (P<0.01); 与模型组比较, 山柰酚各剂量组大鼠血清 MDA、AR 水平降低 (P<0.05、0.01), SOD 活性升高 (P<0.05、0.01), 其中以山柰酚高剂量组效果更为明显。见表 2。

### 3.4 各组大鼠 IL-6 和 TNF-α 水平的比较

模型组大鼠血清 IL-6 和 TNF-α 水平均高于对照组 (P<0.01), 给予山柰酚治疗后, 大鼠血清 IL-6 和 TNF-α 水平均显著降低 (P<0.05、0.01)。见表 2。

表 2 各组大鼠血清 MDA、SOD、AR、IL-6 和 TNF-α 水平的比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 2 Comparison on levels of MDA, SOD, AR, IL-6, and TNF-α in serum of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	MDA/(mmol·L <sup>-1</sup> )	SOD/(U·mL <sup>-1</sup> )	AR/(U·L <sup>-1</sup> )	IL-6/(μg·L <sup>-1</sup> )	TNF-α/(ng·mL <sup>-1</sup> )
对照	—	11.89±0.42	80.23±0.15	2.48±0.24	19.23±0.43	0.18±0.07
模型	—	27.53±0.37 <sup>△△</sup>	53.26±0.21 <sup>△△</sup>	6.23±0.31 <sup>△△</sup>	45.68±0.28 <sup>△△</sup>	0.82±0.15 <sup>△△</sup>
山柰酚	50	15.79±0.29 <sup>**</sup>	58.32±0.11 <sup>*</sup>	4.97±0.18 <sup>*</sup>	37.98±0.47 <sup>*</sup>	0.61±0.21 <sup>*</sup>
	100	13.42±0.25 <sup>*</sup>	64.58±0.18 <sup>*</sup>	4.08±0.26 <sup>**</sup>	33.67±0.41 <sup>**</sup>	0.52±0.19 <sup>*</sup>
	200	12.11±0.17 <sup>**</sup>	74.11±0.41 <sup>**</sup>	3.21±0.17 <sup>**</sup>	30.09±0.32 <sup>**</sup>	0.47±0.11 <sup>**</sup>
二甲双胍	200	13.11±0.09 <sup>**</sup>	69.34±0.21 <sup>*</sup>	3.01±0.02 <sup>**</sup>	27.11±0.27 <sup>**</sup>	0.68±0.21 <sup>*</sup>

## 4 讨论

山柰酚是一种黄酮醇类物质, 也是一种天然的 PPARγ 激动剂<sup>[5]</sup>。PPARγ 激动剂已经成为了治疗脂质代谢异常及 2 型糖尿病的常用药物<sup>[6-7]</sup>。也有研究结果发现, 山柰酚可以降低大鼠的血糖和胰岛素抵抗, 同时, 能维持血脂的稳定<sup>[8-9]</sup>。但是目前对于山柰酚是如何起作用的, 是如何防止糖尿病慢性并发症的, 却鲜有报道。

糖尿病常同时引发心、脑血管疾病等各种慢性并发症, 现已严重威胁到人类的健康, 甚至造成人类死亡。研究表明 2 型糖尿病的初始环节为炎症反

应和氧化应激<sup>[10]</sup>。MDA 作为氧化应激的标志物, 且具有细胞毒性, 其在机体内量的多少可反映出细胞损伤的程度。而 SOD 作为一种体内天然具有能够催化超氧化物的酶, 起到强大的抗氧化作用, 从而保护机体。AR 作为体内多元醇通路的关键酶, 可以催化血液中的葡萄糖, 大量生产山梨醇, 而山梨醇作为一种不易透过细胞膜的物质, 会造成肾损伤等严重并发症。TNF-α 是一种重要的炎症因子, IL-6 是一种重要的促炎细胞因子, 抑制炎症因子的释放, 可以防止炎症反应发生。

本研究不但通过实验数据证明了山柰酚能够

降低血糖,改善胰岛素抵抗;降低TG和LDL-C水平,升高HDL-C水平,维持脂质平衡,这与文献报道<sup>[8-9]</sup>相吻合。结果还表明山柰酚,特别是高剂量(200 mg/kg)时,能降低MDA、AR水平,升高SOD水平,降低IL-6、TNF- $\alpha$ 水平,结果具有显著性差异。以上实验结果提示,山柰酚可能是通过降低血糖、改善ISI,维持正常血脂水平,抗氧化、抗炎、降低AR途径,从而对2型糖尿病大鼠的慢性并发症产生保护作用。

#### 参考文献

- [1] Miura A, Ishizuka T, Kanoh Y, *et al.* Effect of tumor necrosis factor $\alpha$  on insulin signal transduction in rat adipocytes: relation to PKC  $\beta$  zeta translocation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 499(3): 227-238.
- [2] 陈育华,周克云,袁汉尧. 山柰酚药效的研究进展 [J]. 广东医学, 2010, 31(8): 1064-1066.
- [3] 刘贵波,刘跃光,孙成,等. 山柰酚对2型糖尿病大鼠糖脂代谢及胰岛素抵抗的影响 [J]. 实用临床医学杂志, 2012, 16(9): 1-3.
- [4] 燕娟,郭巍伟,梁执群,等. 2型糖尿病大鼠模型的建立及其验证 [J]. 临床和实验医学杂志, 2009, 8(4): 5-6.
- [5] Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, *et al.* Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease [J]. *Circ Res*, 2001, 89(1): E1-E7.
- [6] Bermudez V, Finol F, Parna N, *et al.* PPAR- $\gamma$  agonists and their role in type 2 diabetes mellitus management [J]. *Am J Ther*, 2010, 17(3): 274-282.
- [7] 靳广,魏枫. PPAR $\gamma$ 激动剂罗格列酮钠对2型糖尿病大鼠肾保护作用的实验研究 [J]. 中国临床研究, 2010, 23(10): 845-849.
- [8] 刘贵波,刘跃光,孙成,等. 山柰酚对2型糖尿病大鼠糖脂代谢及胰岛素抵抗的影响 [J]. 实用临床医药杂志, 2012, 16(9): 1-3.
- [9] 刘贵波,刘跃光,孙成,等. PPAR- $\gamma$ 激动剂山柰酚对2型糖尿病大鼠视网膜病变作用研究 [J]. 实用临床医药研究, 2012, 16(11): 4-7.
- [10] 孟宪中,曹俊明,申勇,等. 颈前路植骨块过高对颈椎曲度及轴性症状的远期影响 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2009, 23(8): 899-903.