

山楂叶总黄酮对 2 型糖尿病大鼠血糖血脂和抗氧化能力的影响

周少英¹ 苏静² 阚敏宸¹ 史延卿¹ 梁伟¹

(1.邯郸市中心医院东区急诊科,河北邯郸 056001; 2.邯郸市鸡泽县医院内科,河北邯郸 056000)

摘要 目的:研究山楂叶总黄酮(Hawthorn Leaves Flavonoids,HLF)对 2 型糖尿病大鼠调节血脂和抗氧化能力的改善作用。方法:采用腹腔注射链脲佐菌素(STZ,60mg/kg)破坏胰岛 β 细胞的方法诱导制备实验性 2 型糖尿病大鼠模型,取 80 只模型大鼠根据血糖水平随机分为模型组、盐酸二甲双胍(200mg/kg)治疗组和 HLF 低、中、高剂量(50、100、200mg/kg)组,并另设正常对照组。认定造模成功后,各治疗组大鼠每天灌胃给药 1 次,疗程 6 周。给药前和给药后每 2 周测定血糖;6 周后,检测血清血脂指标;通过苏木精-伊红(HE)染色观察肝脏和心肌组织形态结构变化,测定肝脏和心肌组织中抗氧化酶活性和丙二醛(MDA)含量。结果:与模型组比较,治疗后 BLF 中、高剂量组大鼠空腹血糖水平显著降低($P<0.05$, $P<0.01$),血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL-C)含量明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),肝脏和心肌组织中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性明显提高($P<0.05$, $P<0.01$),MDA 含量明显降低($P<0.05$, $P<0.01$);治疗后 BLF 高剂量组大鼠血清高密度脂蛋白(HDL-C)含量显著升高($P<0.05$),肝脏和心肌组织中 GSH-Px 活性显著提高($P<0.05$);治疗后 HLF 各剂量组大鼠肝脏和心肌组织病变呈不同程度减轻,其中以 HLF 高剂量组效果最为显著。结论:HLF 能够有效改善 2 型糖尿病大鼠血糖血脂和抗氧化能力。

关键词 山楂叶总黄酮 2 型糖尿病 血脂 血糖 抗氧化酶活性 丙二醛 SD 大鼠 实验研究
中图分类号 R587.10.5 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2016)05-0079-04

糖尿病(Diabetes Mellitus,DM)是一种常见的具有遗传特征的慢性代谢系统疾病,其发病率已仅次于恶性肿瘤和心脑血管疾病居第三位^[1]。糖尿病晚期患者常伴有多个组织器官并发症,包括肝脏、心脏、肾脏等,极大地影响患者的生活质量,已引起广大医药工作者的广泛关注。近年来,随着病理学研究的深入,发现糖脂代谢异常以及氧自由基过剩而引发的氧化应激损伤是糖尿病及其并发症发生发展的重要病理机制^[2-3],其中肝脏和心脏组织对氧

化应激非常敏感^[4]。所以,糖尿病患者除了应注重控制血糖外,还应辅助调节血脂、抗氧化损伤,并关注肝功能和心功能。山楂叶总黄酮(Hawthorn leaves flavonoids,HLF)是指从山楂叶中提取的一类黄酮类化合物,具有明显的抗氧化、调节血脂、抗组织缺血等多种生物活性^[5-7]。本实验通过高脂高糖饮食加腹腔注射 STZ 破坏胰岛细胞的方法诱导制备的糖尿病大鼠模型,研究山楂叶总黄酮对糖尿病大鼠的降糖调脂和抗氧化作用。

dopamine D2-receptor mechanism acting in retina or pigmented epithelium[J].Vis Neurosci,1993,10(3):447.

- [10] 张厚亮,任惠民,王坚,等.光照对视网膜色素上皮细胞分泌多巴胺功能的影响[J].中国临床神经科学,2007,15(2):123.
- [11] 吴晓敏.光照时间和强度对小鼠眼球发育和屈光状态的影响[D].温州:温州医学院,2008.
- [12] 夏桂成.妇科方药临证心得[M].北京:人民卫生出版社,2006:13.
- [13] 刘安,郑永征,曹明芳,等.归芍地黄汤联合经瞳孔温热疗法对 MMP-2 和 MMP-9 抑制作用的实验研究[J].中国

中医眼科杂志,2008,18(6):317.

- [14] 白玉兰.傅老“二方”当今活用[J].黄河医学,1994,3(1):29.
- [15] 赵颖熙,陈露,瞿小妹.光照度对豚鼠屈光发育的影响[J].中国实验动物学报,2011,19(5):400

第一作者:宗霞(1990—),女,医学硕士,中医眼科专业。

通讯作者:王育良,医学博士,教授,博士研究生导师。wyl0601@126.com

收稿日期:2015-11-20

编辑:吴宁

1 实验材料

1.1 实验动物 SPF级SD大鼠(雄性,7周龄,180~220g),由河北省实验动物中心提供,许可证号:SCXK(冀)2013-1-003,动物合格证号:20150319。于我院实验中心动物房(室温23~25℃,相对湿度65%~70%,光照周期12h:12h)饲养并造模研究。

1.2 药物与试剂 山楂叶总黄酮(长春三九生物制药,批号:20140213);盐酸二甲双胍(河北天成药业股份有限公司,批号:20140817);总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL-C)、高密度脂蛋白(HDL-C)试剂盒购自深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司;超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)活性和丙二醛(MDA)试剂盒购自北京博奥森生物工程有限公司;链脲佐菌素(STZ)购自美国Sigma公司。

1.3 主要仪器 UV-1200型紫外-可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司);卓越310型全自动生化分析仪(武汉精诚伟业医疗设备有限公司);石蜡切片机(德国SLEE公司)。

2 实验方法

2.1 造模与分组、给药 实验用大鼠经适应性喂养1周后禁食24h,腹腔注射STZ(60mg/kg)破坏胰岛β细胞制备实验用2型糖尿病大鼠模型,72h后测定空腹血糖水平高于16.7mmol/L即认定造模成功^[9]。取其中80只模型大鼠根据血糖水平随机分为模型组、盐酸二甲双胍(200mg/kg)治疗组和HLF低、中、高剂量(50、100、200mg/kg)组,并另取16只同龄正常大鼠设为正常对照组。认定造模成功后,各治疗组大鼠分别每天灌胃给药1次,正常对照组和模型组分别给予等体积生理盐水,疗程均为6周。

2.2 血糖水平检测 给药前和给药后第14、28、42天通过尾静脉采血,然后通过血糖仪平行测定各组大鼠空腹血糖水平并记录。

2.3 血脂指标的测定 腹腔注射乌拉坦实施麻醉,开腹经腹主动脉取血,1500r/min离心10min后取血清,然后通过全自动生化分析仪测定各组大鼠血清中血脂(TC、TG、LDL-C、HDL-C)含量。

2.4 肝脏组织和心肌组织病理性形态学变化的观察 取血完毕后,各组分别随机选取8只大鼠,实施麻醉后开腹取肝脏组织,开胸取心脏组织,于4%多聚甲醛溶液中固定,石蜡包埋,切片和展片处理后,行常规HE染色,通过倒置光学显微镜观察各组大鼠肝脏组织和心肌

组织病理性形态学变化。

2.5 肝脏组织和心肌组织中抗氧化酶活性及MDA含量的检测 取各组剩余的8只大鼠,同2.4项下方法取肝脏和心脏组织,分别加入适量冷裂解液,剪碎后进行研磨匀浆,3000r/min离心10min后取上清液,通过紫外-可见分光光度计分别测定肝脏组织和心肌组织中抗氧化酶(SOD、GSH-Px、CAT)活性及MDA含量。

2.6 统计学方法 运用软件SPSS17.0进行统计分析,计量资料均以($\bar{x} \pm s$)形式表示;组间均数比较采用one-way ANOVA分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义, $P < 0.01$ 表示具有极显著性差异。

3 实验结果

3.1 各组大鼠空腹血糖水平比较 模型组大鼠空腹血糖水平较正常对照组显著升高($P < 0.01$);治疗第14、28天,HLF高剂量组、盐酸二甲双胍治疗组大鼠空腹血糖明显低于模型组($P < 0.05, P < 0.01$);治疗6周,HLF中、高剂量组和盐酸二甲双胍治疗组大鼠空腹血糖明显低于模型组($P < 0.05, P < 0.01$);治疗第14、28、42天,盐酸二甲双胍治疗组大鼠空腹血糖明显低于HLT低、中剂量组($P < 0.05, P < 0.01$),而与HLT高剂量组比较无统计学差异($P > 0.05$)。见表1。

3.2 各组大鼠治疗后血脂含量比较 模型组大鼠血清中TC、TG、LDL-C含量较正常对照组显著升高($P < 0.01$),HDL-C水平显著降低($P < 0.05$)。与模型组比较,HLF中、高剂量组大鼠治疗后血清TC、TG、LDL-C含量显著降低($P < 0.05, P < 0.01$),HLF高剂量组大鼠HDL-C含量显著升高($P < 0.05$),盐酸二甲双胍治疗组大鼠血清TC含量显著降低($P < 0.05$);与盐酸二甲双胍治疗组比较,HLF高剂量组大鼠TG含量显著降低($P < 0.05$)。见表2。

3.3 各组大鼠肝脏组织病理性形态学变化 观察病理染色切片发现,正常对照组大鼠肝脏组织结构和肝细胞形态均未见异常;肝窦内皮结构完整,脉管系统形态和肝细胞形态正常;模型组大鼠肝脏组织和肝细胞均出现显著的病理性形态学变化;肝小

表1 各组大鼠治疗各时期空腹血糖水平比较($\bar{x} \pm s$) mmol/L

组别	动物数(只)	剂量(mg/kg)	给药前	第14天	第28天	第42天
正常对照组	16		5.98±0.76	6.04±0.81	6.01±0.79	5.99±0.83
模型组	16		17.0±2.1 ^{△△}	16.8±1.8 ^{△△}	17.0±2.0 ^{△△}	16.8±1.9 ^{△△}
HLF低剂量组	16	50	17.1±1.9	16.2±2.4 [#]	15.8±2.3 [#]	16.0±2.5 [#]
HLF中剂量组	16	100	16.9±2.2	15.1±2.2 [#]	14.2±2.6 [#]	12.7±2.3 [#]
HLF高剂量组	16	200	16.9±2.0	13.2±2.8 [*]	9.9±2.5 ^{**}	9.1±2.2 ^{**}
盐酸二甲双胍治疗组	16	200	17.0±1.9	11.5±2.1 ^{**}	9.5±2.0 ^{**}	9.3±2.4 ^{**}

注:与正常对照组比较,△△ $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与盐酸二甲双胍治疗组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

叶结构轮廓不清,肝细胞肿胀,胞核固缩,充斥大量脂肪,呈嗜酸性病变;而经 HLF 各剂量或盐酸二甲双胍治疗 6 周能够不同程度减轻 2 型糖尿病大鼠肝脏组织病变,以 HLF 高剂量效果最为显著且其效果优于盐酸二甲双胍。见图 1。

3.4 各组大鼠心肌组织病理学形态学变化 观察病理染色切片发现,正常对照组大鼠心肌纤维平行排列,细胞均匀分布、形态正常,未见异常;模型组大鼠心肌组织和心肌细胞结构均呈现明显的病理性形态学变化:心肌纤维排列紊乱、断裂,心肌细胞呈空泡变性,胞核固缩、深染,胞质着色不均;经 HLF 各剂量或盐酸二甲双胍治疗 6 周能够不同程度改善 2 型糖尿病大鼠心肌组织病理性形态学变化,以 HLF 高剂量效果最为显著,且 HLF 高剂量治疗效果优于盐酸二甲双胍。见图 2。

3.5 各组大鼠肝脏、心肌组织中抗氧化酶活性及 MDA 含量比较 模型组大鼠肝脏、心肌组织中 SOD、GSH-Px、CAT 活性显著降低且 MDA 含量显著升高 ($P<0.01$)。与模型组比较,HLF 中、高剂量组大鼠治疗后肝脏、心肌组织中 SOD、CAT 活性明显升高,MDA 含量明显降低 ($P<0.05$, $P<0.01$);HLF 高剂量组大鼠肝脏、心肌组织中 GSH-Px 活性显著升高 ($P<0.05$);盐酸二甲双胍治疗组大鼠肝脏组织中 SOD 活性明显升高 ($P<0.05$),肝脏、心肌组织 MDA 含量显著降低 ($P<0.05$)。与盐酸二甲双胍治疗组比较,HLT 高剂量组大鼠肝脏、心肌组织中 SOD 活性显著升高 ($P<0.05$),心肌组织中 CAT 活性显著升高 ($P<0.05$)。见表 3、表 4。

4 讨论

近年来,糖尿病患病率逐

表 2 各组大鼠治疗后血脂指标比较 ($\bar{x}\pm s$) mmol/L

组别	动物数(只)	剂量(mg/kg)	TC	TG	LDL-C	HDL-C
正常对照组	16		1.18±0.27	0.54±0.14	0.68±0.15	0.87±0.23
模型组	16		3.25±0.63 ^{△△}	1.46±0.49 ^{△△}	1.20±0.28 ^{△△}	0.59±0.16 ^{△△}
HLF 低剂量组	16	50	3.08±0.78	1.29±0.45	1.07±0.36	0.63±0.25
HLF 中剂量组	16	100	2.65±0.70 [*]	1.03±0.34 ^{**}	1.00±0.28 [*]	0.70±0.30
HLF 高剂量组	16	200	2.29±0.58 ^{**}	0.95±0.28 ^{**#}	0.91±0.24 ^{**}	0.81±0.27 [*]
盐酸二甲双胍治疗组	16	200	2.71±0.66 [*]	1.26±0.42	1.09±0.32	0.66±0.25

注:与正常对照组比较,△△ $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$;与盐酸二甲双胍治疗组比较,[#] $P<0.05$ 。

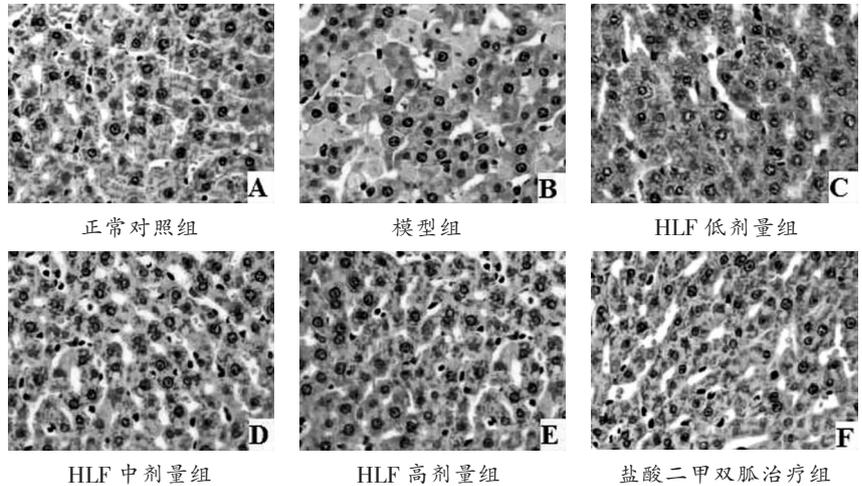


图 1 各组大鼠肝脏组织病理性形态学变化(HE,×400)

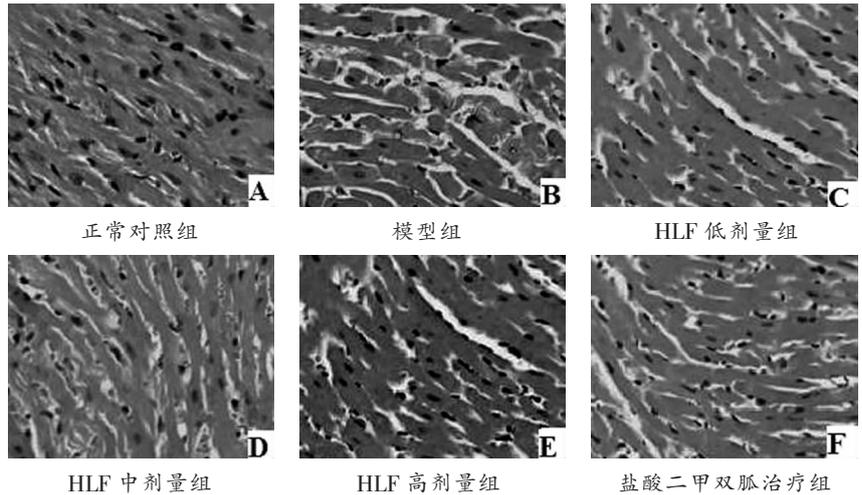


图 2 各组大鼠心肌组织病理性形态学变化(HE,×400)

表 3 各组大鼠肝脏组织中抗氧化酶活性及 MDA 含量比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	剂量(mg/kg)	SOD (U/mg prot)	GSH-Px (U/mg prot)	CAT (U/mg prot)	MDA (mmol/mg prot)
正常对照组	8		13.23±1.61	17.41±2.26	4.15±0.87	3.24±0.75
模型组	8		8.47±1.52 ^{△△}	11.39±1.83 ^{△△}	2.49±0.82 ^{△△}	5.61±1.36 ^{△△}
HLF 低剂量组	8	50	9.03±1.85	11.64±2.42	2.76±0.79	5.23±1.28
HLF 中剂量组	8	100	9.84±2.01 [*]	12.57±2.96	3.31±0.94 [*]	5.01±1.04 [*]
HLF 高剂量组	8	200	11.27±2.38 ^{**#}	13.72±3.05 [*]	3.82±1.02 ^{**}	4.73±0.86 ^{**}
盐酸二甲双胍治疗组	8	200	9.55±1.74 [*]	12.41±2.76	3.14±0.87	5.12±0.95 [*]

注:与正常对照组比较,△△ $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$;与盐酸二甲双胍治疗组比较,[#] $P<0.05$ 。

年升高,已经发展成为严重影响人类生命健康的常见疾病之一,引起了广大医药工作者广泛关注。有研究发现,胰岛素分泌相对不足导致糖脂代谢紊乱,氧自由基代谢过剩,继而引发的氧化应激损伤是糖尿病及其并发症损伤发生发展的重要病理通路之一^[2-3],这也为我们研发抑制糖尿病损伤的新型药物提供了新的思路。

山楂叶总黄酮(HLF)是一类具有多种生物学活性的黄酮类化合物。杨宇杰等^[4]通过动物实验研究发现 HLF 能够显著改善高脂血症大鼠脂肪代谢,降低机体血脂水平;高东雁等^[5]和李红等^[6]研究发现 HLF 具有抗氧化酶活性,能降低氧化应激损伤。本研究结果表明,HLF 干预 6 周能够显著降低 2 型糖尿病大鼠空腹血糖水平,降低血清中 TC、TG、LDL-C 水平并提高 HDL-C 水平,上述指标变化以 HLF 高剂量组最为显著。二甲双胍是临床上降糖调脂的一线用药,本研究发现 HLF 高剂量降血糖作用与二甲双胍相当,且降 TG 作用优于二甲双胍。此研究结果与 Khaki A 等^[7]和 Haskins K 等^[8]实验报道基本一致,提示 HLF 具有剂量依赖性地改善糖尿病大鼠血糖血脂的作用。

正常生理状态下,体内生成的氧自由基(ROS)能够被 SOD 催化还原生成 H₂O₂^[9],并在 GSH-Px 或 CAT 的催化作用下进一步还原生成 H₂O 和 O₂^[10],从而阻断氧化应激损伤。当胰岛素分泌相对不足而导致糖脂代谢异常时,ROS 大量产生且抗氧化酶活性受到抑制而使 ROS 过剩,继而诱发广泛的氧化应激损伤。不饱和脂肪酸是细胞膜的主要组分之一,其极易受 ROS 攻击而发生脂质过氧化损伤,因此脂质过氧化终产物 MDA 的含量能够间接反映机体氧化应激损伤程度。本实验研究发现,HLF 能够显著改善 2 型糖尿病大鼠抗氧化酶(SOD、GSH-P、CAT)活性,降低 MDA 含量,改善心肌组织和肝脏组织病变,其中以 HLF 高剂量效果最为显著,且 HLF 高剂量组肝组织 SOD 活性以及心肌组织 SOD、CAT 活性明显高于二甲双胍治疗组,提示 HLF 具有剂量依赖性地改善糖尿病大鼠抗氧化能力的作用。

总之,HLF 具有调节 2 型糖尿病大鼠血脂和抗氧化能力的作用,其作用机制可能与 HLF 能够有效降低血糖、改善抗氧化酶活性有关。长期血糖控制不佳将诱发心、脑、肾等多个组织器官并发症的发生,其危害往往较糖尿病本身更加严重,接下来我

表 4 各组大鼠心肌组织中抗氧化酶活性及 MDA 含量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	剂量(mg/kg)	SOD(U/mg prot)	GSH-Px(U/mg prot)	CAT(U/mg prot)	MDA(nmol/mg prot)
正常对照组	8		12.4±2.1	20.4±2.9	2.23±0.40	3.52±0.64
模型组	8		9.2±1.9 ^{△△}	13.5±2.8 ^{△△}	1.35±0.24 ^{△△}	5.40±0.87 ^{△△}
HLF 低剂量组	8	50	9.7±2.3	14.7±3.1	1.52±0.31	5.23±1.05
HLF 中剂量组	8	100	11.1±2.8 [*]	15.2±3.5	1.67±0.30 [*]	4.86±0.97 [*]
HLF 高剂量组	8	200	11.8±2.5 ^{**}	16.4±3.7 [*]	1.85±0.42 ^{**}	4.35±1.02 ^{**}
盐酸二甲双胍治疗组	8	200	10.3±2.0	14.5±2.9	1.50±0.29	4.90±0.93 [#]

注:与正常对照组比较,△△ $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与盐酸二甲双胍治疗组比较,# $P<0.05$ 。

们将进一步研究山楂叶总黄酮是否对糖尿病诱发的心、脑、肾等脏器组织并发症损伤具有保护作用。

参考文献

- [1] NEWSHOLME P, HABER E P, HIRABARA S M, et al. Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity[J]. J Physiol(Lond), 2007, 583(Pt 1): 9.
- [2] KHAKI A, KHAKI A A, HAJHOSSEINI L, et al. The anti-oxidant effects of ginger and cinnamon on spermatogenesis dys-function of diabetes rats[J]. Afr J Tradit Complement Altern Med, 2014, 11(4): 1.
- [3] HASKINS K, BRADLEY B, POWERS K, et al. Oxidative stress in type 1 diabetes[J]. Ann N Y Acad Sci, 2003, 1005(11): 43.
- [4] STENTX F B, UMPIERREZ G E, CUERVO R, et al. Proinflammatory cytokines, markers of cardiovascular risks, oxidative stress, and lipid peroxidation in patients with hyperglycemic crises[J]. Diabetes, 2004, 53(8): 2079.
- [5] 杨宇杰, 林静, 王春民, 等. 山楂叶总黄酮对大鼠高脂血症早期干预的实验研究[J]. 中草药, 2008, 39(12): 1848.
- [6] 高东雁, 刘健, 李卫平, 等. 山楂叶总黄酮对大鼠心肌缺血性损伤的保护作用及机制研究[J]. 中药药理与临床, 2012, 28(5): 64.
- [7] 李红, 张爽, 纪影实, 等. 山楂叶总黄酮不同给药途径对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(5): 995.
- [8] LARTIGUE A, BURLAT B, COUTARD B, et al. The megavirus chilensis Cu,Zn-superoxide dismutase: the first viral structure of a typical cellular copper chaperone-independent hyperstable dimeric enzyme[J]. J Virol, 2015, 89(1): 824.
- [9] YOON G A, PARK S. Antioxidant action of soy isoflavones on oxidative stress and antioxidant enzyme activities in exercised rats[J]. Nutr Res Pract, 2014, 8(6): 618.

第一作者:周少英(1975—),男,本科学历,副主任医师,主要从事急诊科疾病研究工作。hdzxy zhshy@163.com

收稿日期:2015-12-22

编辑:吴宁