山楂叶总黄酮对2型糖尿病大鼠睾丸组织氧化应激的影响

阚敏宸[1] 贺静芝[1] 苏 静[2]
(1.邯郸市中心医院,河北邯郸 056001; 2.邯郸市鸡泽县医院,河北邯郸 056000)

摘 要 目的:研究山楂叶总黄酮(HLF)对2型糖尿病大鼠睾丸组织氧化应激的影响。方法:大鼠采用高脂高糖饮食8周后腹腔注射链脲佐菌素(STZ)的方法制备2型糖尿病大鼠模型。造模成功后的大鼠随机分为模型组和HLF低(50mg/kg)、中(100mg/kg)、高(200mg/kg)剂量组,每组16只,另取16只正常大鼠作为正常组。各组大鼠分别灌胃给予相应药物或生理盐水,每日1次,疗程6周。干预结束后,测定各组大鼠空腹血糖水平,称量体重并计算睾丸指数,测定血清睾酮含量;取睾丸组织测定酸性磷酸酶(ACP)、乳酸脱氢酶(LDH)和谷氨酰转肽酶(γ-GT)含量;测定睾丸组织中抗氧化酶[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)含量;末端标记法(TUNEL)观察睾丸组织细胞凋亡状况并计算凋亡指数(AI),Western blotting法测定睾丸组织中NF-κB蛋白表达。结果:与模型组比较,HLF中、高剂量组大鼠空腹血糖水平显著降低,睾丸指数和血清睾酮含量显著升高,睾丸组织中ACP、LDH、γ-GT含量显著升高,SOD、GSH-Px、CAT活性均显著升高且MDA含量显著降低,差异均具有统计学意义($P<0.05$,$P<0.01$)。模型组睾丸组织凋亡细胞数量较正常组明显增多,经HLF治疗后上述病理性变化和细胞凋亡状况均明显改善,其中以HLF高剂量组效果最为显著;与模型组比较,HLF中、高剂量组AI显著降低($P<0.05$,$P<0.01$),睾丸组织中NF-κB蛋白表达量显著下调($P<0.05$,$P<0.01$)。结论:HLF具有抑制2型糖尿病大鼠睾丸组织氧化应激损伤的作用,从而起到保护2型糖尿病大鼠睾丸组织的作用。

关键词 山楂叶总黄酮 糖尿病 睾丸 氧化应激 SD大鼠 雄性 实验研究
中图分类号 R587.105 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2016)08-0078-04

睾丸组织病变是糖尿病最常见的并发症之一,发病率是非糖尿病患者的10倍以上[1],严重影响着患者的生活质量。山楂叶为我国传统中药品种,在《本草经疏》及《本草通玄》等典籍中均有记载。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。以往的研究表明HLF具有抗氧化、降血脂等多种生物学活性[2],周少英等[3]和张鹏等[4]研究发现HLF能够通过抑制组织氧化应激损伤和细胞凋亡而起到保护2型糖尿病大鼠胰腺组织、脑组织等药理学作用,但HLF是否对2型糖尿病大鼠睾丸组织氧化应激损伤具有抑制作用尚未见文献报道。本实验通过制备2型糖尿病大鼠模型并灌胃给予HLF进行治疗,研究HLF对2型糖尿病大鼠睾丸组织应激损伤的影响,并探讨其可能的作用机制。

fibrosis[J].J Am Soc Nephrol,2005,16(8):2373.
[8] LAN H Y.Smad7 as a therapeutic agent for chronic kidney diseases[J].Front Biosci,2008,13:4984.
[9] DING Y,CHOI M E.Regulation of autophagy by TGF-β:emerging role in kidney fibrosis [J].Semin Nephrol,2014,34(1):62.
[10] RHYU D Y.Role of reactive oxygen species in TGF-β1-induced mitogen-activated protein kinase activation and epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells [J].Journal of the American Society of Nephrology,2005,16(3):667.
[11] SCHARPFENECKER M,FLOOT B,RUSSELL N S,et al.The TGF-β co-receptor endoglin regulates macrophage infiltration and cytokine production in the irradiated mouse kidney[J].Radiother Oncol,2012,105(3):313.
[12] 罗婷,程锦国,简怡娟,等.清化固肾排毒方对UUO大鼠上皮细胞转分化的影响[J].上海中医药杂志,2015,49(11):71.

第一作者:吴小燕(1990—),女,硕士研究生,中西医结合肾病专业。
通讯作者:董飞侠,医学博士,主任中医师,教授,硕士研究生导师。cgrsfhtd@163.com

收稿日期:2016-05-10
编辑:吴 宁

1 实验材料

1.1 实验动物 SPF级健康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,动物批次号:201505013。于邯郸市中心医院实验中心动物房(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);酸性磷酸酶(ACP)、乳酸脱氢酶(LDH)、谷氨酰转肽酶(γ-GT)、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)、丙二醛(MDA)、睾酮检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;TUNEL检测试剂盒购自北京博奥森生物工程有限公司。

2 实验方法

2.1 造模、分组与给药 实验用SD大鼠经高糖高脂饲料喂养8周后,腹腔注射STZ(60mg/kg)破坏胰岛β细胞以制备糖尿病大鼠模型,24h和72h后分别检测空腹血糖水平稳定在16.7mmol/L以上即认定为造模成功。取造模成功的大鼠采用随机数字表法分为模型组和HLF低(50mg/kg)、中(100mg/kg)、高(200mg/kg)剂量组,每组16只,另取16只血糖正常的大鼠作为正常组。HLF各组分别灌胃相应剂量的山楂叶总黄酮,模型组和正常组同步给予等体积的生理盐水,每日1次,疗程6周。

2.2 观察指标

2.2.1 空腹血糖、体重及睾丸指数 治疗完成后,各组大鼠由尾静脉取血以测定空腹血糖水平并记录;称量体重;麻醉后取左侧睾丸组织,冲洗干净并用滤纸拭干后称重,计算睾丸指数:睾丸指数(%)=(睾丸重量/体质量)×100%。

2.2.2 睾酮含量 麻醉后经腹主动脉取血并离心取血清,参照试剂盒操作步骤,通过放射免疫法平行测定各组大鼠血清中睾酮含量。

2.2.3 睾丸组织中ACP、LDH、γ-GT含量 取右侧睾丸组织,剪碎后行研磨匀浆,按照各试剂盒操作步骤进行处理,然后通过酶标仪平行测定各组大鼠睾丸组织中ACP、LDH、γ-GT含量水平。

2.2.4 睾丸组织中抗氧化酶活性和MDA含量 取2.2.3项下制备的睾丸组织匀浆液,3000r/min低温(4℃)离心10min后取上清液,根据试剂盒操作步骤,通过紫外-可见分光光度计平行测定各组大鼠胰腺组织中抗氧化酶(SOD、GSH-Px、CAT)活性和MDA含量。

2.2.5 睾丸组织细胞凋亡状况及凋亡指数(Apoptosis Index,AI) 取称重后的左侧睾丸组织,经4%多聚甲醛溶液固定、石蜡包埋、切片(厚度为5μm)和展片处理后,遵照TUNEL试剂盒操作方法步骤进行染色处理,然后通过光学显微镜观察各组大鼠睾丸组织细胞凋亡状况。每张染色切片随机选取5个视野,分别计数细胞总数和凋亡细胞数,各组分别取平均值,然后计算凋亡指数(AI):AI(%)=(凋亡细胞数/总细胞数)×100%。

2.2.6 睾丸组织中NF-κB蛋白表达 取2.2.3项下制备的睾丸组织匀浆液,经12000r/min低温(4℃)离心10min后取上清液,经BCA法蛋白定量后,行变性、上样,经电泳、转膜、春红溶液染色后,室温下5%脱脂奶粉封闭2h,一抗(NF-κB,β-actin)4℃过夜;洗膜,二抗室温摇床上孵育1h后经ECL显色,实验结果运用Quantity One软件进行分析。

2.3 统计学方法 所有数据运用SPSS15.0软件进行统计分析,计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,组间均数比较采用One-way ANOVA进行分析;计数资料采用χ^2检验;$P<0.05$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、体质量、睾丸指数及血清睾酮含量比较 见表1。

3.2 各组大鼠睾丸组织ACP、LDH、γ-GT含量比较 见表2。

表1 各组大鼠空腹血糖水平、体质量、睾丸指数及血清睾酮含量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	空腹血糖(mmol/L)	体重(g)	睾丸指数(%)	睾酮(nmol/L)
正常组	16	6.3±0.9	371.4±25.0	0.46±0.09	23.0±1.8
模型组	16	17.2±2.4△△	169.7±18.2△△	0.27±0.06△△	16.2±1.6△△
HLF低剂量组	16	16.2±2.4	183.5±19.1	0.30±0.07	17.3±2.2
HLF中剂量组	16	13.9±1.5**	214.6±20.8**	0.39±0.11*	19.5±1.9**
HLF高剂量组	16	11.8±1.1*	240.3±23.2*	0.43±0.12*	21.7±2.1*

注:与正常组比较,△△$P<0.01$;与模型组比较,*$P<0.05$,**$P<0.01$。

表2 各组大鼠睾丸组织中ACP、LDH、γ-GT含量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	ACP(U/g pro)	LDH(U/g pro)	γ-GT(U/g pro)
正常组	16	190.4±27.5	2704.5±269.3	178.2±19.0
模型组	16	118.2±16.0△△	1281.7±208.1△△	89.5±16.3△△
HLF低剂量组	16	125.6±19.7	1837.2±246.3**	126.7±19.8**
HLF中剂量组	16	152.7±20.8**	1792.6±237.5**	148.3±18.7*
HLF高剂量组	16	159.1±22.3*	2309.0±258.4*	150.9±21.6*

注:与正常组比较,△△$P<0.01$;与模型组比较,*$P<0.05$,**$P<0.01$。

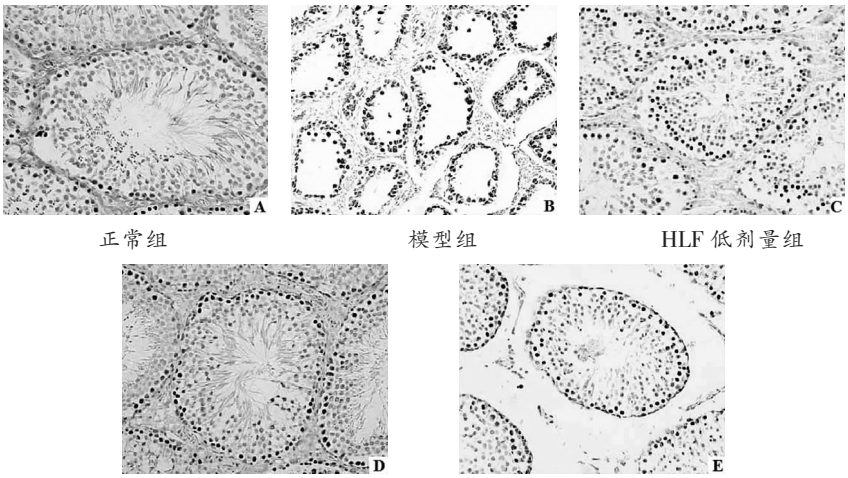
3.3 各组大鼠睾丸组织中抗氧化酶活性和 MDA 含量比较 见表 3。

3.4 各组大鼠睾丸组织细胞凋亡状况及 AI 比较 模型组睾丸组织凋亡细胞数量较正常组明显增多；而与模型组比较，HLF 各组大鼠睾丸组织凋亡细胞数量呈不同程度减少，其中以 HLF 高剂量组效果最为显著。见图 1。计算并比较 AI 发现：正常组 AI 为(2.4±0.8)%，模型组为(47.5±6.1)%，HLF 低剂量组为(38.9±6.4)%，HLF 中剂量组为(29.0±5.2)%，HLF 高剂量组为(24.3±4.8)%。模型组大鼠 AI 较正常组显著升高($P<0.01$)，而 HLF 中、高剂量组 AI 较模型组显著降低($P<0.05$，$P<0.01$)。

表 3 各组大鼠睾丸组织抗氧化酶活性和 MDA 含量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	SOD (U/mg prot)	GSH-Px (U/mg prot)	CAT (U/g prot)	MDA (nmol/mg prot)
正常组	16	108.7±9.2	113.4±10.7	506.4±34.1	9.5±3.1
模型组	16	45.8±6.5△△	39.1±5.8△△	239.0±25.8△△	26.4±5.7△△
HLF 低剂量组	16	57.4±8.0	48.6±7.3	307.5±31.4	18.2±4.3**
HLF 高剂量组	16	65.2±7.7**	54.8±8.1**	349.3±32.6**	18.5±4.1**
HLF 中剂量组	16	81.9±8.9*	70.5±9.2*	422.7±36.8*	14.0±3.6*

注：与正常组比较，△△$P<0.01$；与模型组比较，*$P<0.05$，**$P<0.01$。



正常组 模型组 HLF 低剂量组

HLF 中剂量组 HLF 高剂量组

图 1 各组大鼠睾丸组织细胞凋亡情况(TUNEL，×400)

3.5 各组大鼠睾丸组织 NF-κB 蛋白表达比较 与正常组比较，模型组大鼠睾丸组织中 NF-κB 蛋白表达显著上调($P<0.01$)；与模型组比较，HLF 中、高剂量组大鼠睾丸组织中 NF-κB 蛋白表达显著下降($P<0.05$，$P<0.01$)。见图 2、表 4。

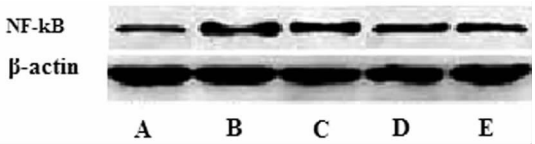


图 2 各组大鼠睾丸组织 NF-κB 蛋白表达比较(Western blotting)

注：A-正常组；B-模型组；C-HLF 低剂量组；D-HLF 中剂量组；E-HLF 高剂量组。

表 4 各组大鼠睾丸组织 NF-κB 蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	NF-κB/β-actin
正常组	16	0.13±0.05
模型组	16	0.42±0.11△△
HLF 低剂量组	16	0.37±0.14
HLF 中剂量组	16	0.28±0.09**
HLF 高剂量组	16	0.21±0.06*

注：与正常组比较，△△$P<0.01$；与模型组比较，*$P<0.05$，**$P<0.01$。

4 讨论

流行病学研究资料显示，近年来糖尿病已经逐渐发展成为仅次于恶性肿瘤和心脑血管疾病的第三大非传染性疾病，严重危害着人类的身体健康和生活质量。长期血糖控制不佳的糖尿病患者往往并发多个组织器官损伤，是糖尿病患者致残，甚至致死的主要原因。其中，高血糖所致生殖系统损伤发病率高达 50%左右，严重影响着糖尿病患者的生活质量。赵茜等[5]和刘英姿等[6]研究发现，糖脂代谢紊乱导致氧自由基大量生成与过剩，引发广泛的氧化应激损伤，继而引发的细胞凋亡是睾丸组织并发症发生发展的重要病理机制。

睾丸重量及睾丸指数是反映睾丸组织状态的重量指标，乳酸脱氢酶(LDH)、酸性磷酸酶(ACP)和谷氨酰转肽酶(γ-GT)含量是临床上监测睾丸组织功能的三种标志酶，其中 LDH 与生精上皮的成熟密切相关，ACP 参与睾丸内蛋白质合成，γ-GT 促进精子成熟[6]。睾酮是维持雄性生殖功能最重要的雄激素，制约着睾丸生精功能，对促进精子发生及成熟意义重大。杜静等[7]和王伟超等[8]研究发现，糖尿病可诱导睾丸萎缩、睾酮水平降低，且睾酮水平与血糖水平呈明显负相关。本研究结果显示，经 HLF 100~200mg/kg 治疗 6 周能够显著降低糖尿病模型大鼠空腹血糖水平，提高睾丸重量和睾丸指数，提高睾丸组织中 LDH、ACP、γ-GT 含量，提高睾酮水平，提示山楂叶总黄酮具有保护睾丸组织结构、改善睾丸组织功能的作用。

生理状态下，体内生成的氧自由基(ROS)能够在 SOD 催化作用下还原生成过氧化氢[9]，并在GSH-Px

或CAT的催化作用下进一步还原生成对人体无害的水和氧[10],所以SOD、GSH-Px、CAT的活性能够反映机体抗氧化能力,睾丸组织中脂质过氧化终产物丙二醛(MDA)水平能够间接反映睾丸细胞氧化应激损伤程度。本实验结果表明,经HLF 100~200mg/kg治疗6周能够显著提高睾丸组织中抗氧化酶(SOD、GSH-Px、CAT)活性,降低MDA含量,提示山楂叶总黄酮对实验性糖尿病大鼠睾丸组织氧化应激损伤具有抑制作用。

细胞凋亡是一种由多种基因参与调控的程序化死亡过程,是一种可由多种因素诱发的继发性行为,其中氧化应激损伤是其非常重要的诱发因素之一[11]。NF-κB为多效能核转录因子,被称为连接氧化应激损伤和细胞凋亡的"桥梁"[12]。Zhang Q等[13]研究发现,受ROS攻击而活化的NF-κB能够促进巨噬细胞活化和浸润,诱导促凋亡信号释放而导致细胞凋亡。本实验研究发现,经HLF 100~200mg/kg治疗6周能够显著下调促凋亡NF-κB蛋白表达,提示HLF可能通过降低氧化应激损伤并下调NF-κB蛋白表达而对2型糖尿病大鼠睾丸组织细胞凋亡起到抑制作用。

总之,HLF能够有效降低2型糖尿病大鼠空腹血糖水平,提高睾丸指数、血清睾酮含量,改善睾丸组织生化指标,改善抗氧化酶活性,降低氧化应激损伤,抑制细胞凋亡,提示HLF具有抑制2型糖尿病大鼠睾丸组织氧化应激损伤的作用,从而起到保护2型糖尿病大鼠睾丸组织并改善其功能的作用。糖脂代谢异常所致炎症反应也是糖尿病所致多器官并发症发生发展的重要病理机制,我们将以抑制炎症反应为切入点,进一步探讨HLF保护2型糖尿病大鼠睾丸组织可能的作用机制。

参考文献

[1] KANTER M,AKTAS C,ERBOGA M.Protective effects of quercetin against apoptosis and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rat testis [J]. Food Chem Toxicol,2012,50(3-4):719.

[2] 张鹏,张培新.山楂叶总黄酮对2型糖尿病大鼠的保护作用[J].中药药理与临床,2015,31(4):114.

[3] 周少英,苏静.山楂叶总黄酮对2型糖尿病大鼠脑组织的保护作用[J].医学研究杂志,2015,44(12):104.

[4] 张鹏,张培新.山楂叶总黄酮对2型糖尿病大鼠胰腺组织保护作用的研究[J].中药药理与临床,2015,31(5):72.

[5] 赵茜,李红梅,常越,等.氟伐他汀对糖尿病大鼠睾丸组织氧化应激水平的影响[J].宁夏医学杂志,2015,37(8):673.

[6] 刘英姿,刘浩然,周源,等.山茱萸总皂苷对糖尿病大鼠睾丸病变的改善作用[J].中国现代医学杂志,2012,22(22):10.

[7] 杜静,周钧,杨超,等.他汀改善实验性糖尿病内皮细胞功能的研究[J].中国实验诊断学,2009,13(5):584.

[8] 王伟超,张洁,刘宽芝,等.氟伐他汀对1型糖尿病大鼠血液、尿液结缔组织生长因子表达与肾脏病变干预作用的研究[J].中国现代医学杂志,2009,19(24):3740.

[9] 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.

[10] 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.

[11] 陈良金,石孟琼,贺海波,等.珠子参总皂苷对H2O2诱导新生大鼠心肌细胞凋亡的抑制作用[J].中国临床药理学与治疗学,2012,17(8):860.

[12] 杨帆,王永青,彭余江,等.NF-κB在颅脑损伤后继发氧化应激及细胞凋亡之间的关系研究[J].浙江创伤外科,2014,19(6):899.

[13] ZHANG Q,HUANG W D,LV X Y,et al. Ghrelin protects H9c2 cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis through NF-κB and mitochondria-mediated signaling[J]. Eur J Pharmacol,2011,654(2):142.

第一作者:阚敏宸(1973—),男,医学博士,副主任医师,主要从事急诊内科疾病研究。kanminchen666@163.com

收稿日期:2016-03-12

编辑:吴　宁

江苏中医药信息网(www.jstcm.com)

——做最专业的中医药网络传媒!