

桑寄生醇提物改善2型糖尿病模型小鼠血糖水平及其肝肾并发症的作用及机制研究[△]

罗泽萍^{1*}, 李丽², 潘立卫¹, 赖红芳^{1#} (1. 河池学院化学与生物工程学院, 广西河池 546300; 2. 广西中医药大学药学院, 南宁 530200)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)06-0796-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.06.15

摘要 目的: 研究桑寄生醇提物改善2型糖尿病(T2DM)模型小鼠血糖水平及其肝肾并发症的作用及机制。方法: 通过高糖高脂饲料喂养结合腹腔注射链脲佐菌素的方法建立小鼠T2DM模型。将T2DM模型小鼠60只随机分为模型对照组(生理盐水)、阳性对照组[二甲双胍, 150 mg/(kg·d)]和桑寄生醇提物高、中、低剂量组[30、15、7.5 g/(kg·d), 以生药量计], 每组12只; 另设正常小鼠12只为空白对照组(生理盐水)。连续给予小鼠相应药液或生理盐水28 d后, 检测其血清中空腹血糖(FBG)、空腹胰岛素(FINS)、白细胞介素2(IL-2)、IL-4、IL-12、 γ 干扰素(IFN- γ)、血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)、丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)的水平, 收集其24 h尿液并检测尿肌酐(Ucr)水平, 并计算胰岛素敏感指数(ISI)和胰岛素抵抗指数(HOMA-IR); 采用苏木精-伊红染色法, 观察肝细胞病理学变化; 检测肝组织中Bcl-2、Bax水平, 以及肾组织中Toll样受体4(TLR4)、核因子 κ B亚基p65和NF- κ B p65水平。结果: 与空白对照组比较, 模型对照组小鼠的血清FBG、FINS、IL-4、ALT、AST、BUN、Scr水平及HOMA-IR值均显著升高, Ucr、IL-2、IL-12、IFN- γ 水平及ISI值均显著降低($P < 0.01$); 肝组织细胞表现出明显病理变化; 肝组织中Bcl-2水平及Bcl-2/Bax比值均显著降低, Bax水平显著升高($P < 0.01$); 肾组织中TLR4、NF- κ B p65水平均显著升高($P < 0.01$)。与模型对照组比较, 桑寄生醇提物各剂量组的肝组织病理学变化明显减轻; 除桑寄生醇提物低剂量组血清中IFN- γ 水平和肾组织中NF- κ B p65水平无显著差异外, 上述其余各指标均显著改善($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结论: 桑寄生醇提物具有改善T2DM模型小鼠高血糖水平及肝肾并发症、保护肝肾功能的作用; 其机制可能与提高免疫功能、上调抗凋亡相关因子、下调促凋亡及促炎相关因子的表达, 从而维持肝细胞功能状态、减轻肾细胞受损程度有关。

关键词 桑寄生; 醇提物; 2型糖尿病; 并发症; 肝损伤; 肾损伤; 小鼠

Improvement Effects of Ethanol Extract from *Taxillus sutchuenensis* on Blood Glucose Level, Liver and Renal Complications in Type 2 Diabetes Mellitus Model Mice and Its Mechanism

LUO Zeping¹, LI Li², PAN Liwei¹, LAI Hongfang¹ (1. College of Chemical and Biological Engineering, Hechi University, Guangxi Hechi 546300, China; 2. College of Pharmacy, Guangxi University of TCM, Nanning 530200, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study improvement effects of ethanol extract from *Taxillus sutchuenensis* on blood glucose level, liver and renal complications in type 2 diabetes mellitus (T2DM) model mice and its mechanism. METHODS: T2DM model was established by high-glucose and high-fat feed combined with intraperitoneal injection of streptozotocin. Totally 60 T2DM model mice were randomly divided into model control group (normal saline), positive control group [metformin, 150 mg/(kg·d)] and *T. sutchuenensis* ethanol extract high-dose, medium-dose and low-dose groups [30, 15, 7.5 g/(kg·d), by crude drug], with 12 mice in each group. Other 12 normal mice were included in blank control group (normal saline). After given drug solution or normal saline for consecutive 28 d, the serum levels of FBG, FINS, IL-2, IL-4, IL-12, IFN- γ , Scr, BUN, ALT and AST were detected; 24 h urine was collected to detect the Ucr levels. The insulin sensitivity index (ISI) and insulin resistance index (HOMA-IR) were calculated. HE staining was used to observe the pathological change of hepatocytes. The levels of Bcl-2 and Bax in liver tissue as well as the levels of TLR4 and NF- κ B p65 in renal tissue were detected. RESULTS: Compared with blank control group, the serum levels of FBG, FINS, IL-4, ALT, AST, BUN, Scr and HOMA-IR value were increased significantly in model control group, while the levels of Ucr, IL-2, IL-12, IFN- γ and ISI value were decreased significantly ($P < 0.01$). The hepatocytes showed obvious pathological changes. Bcl-2 level and Bcl-2/Bax of liver tissue were decreased significantly, while Bax level was increased significantly ($P < 0.01$). The

[△] 基金项目: 广西自然科学基金项目(No.2017GXNSFAA198118); 广西高校中青年教师基础能力提升项目(No.2017KY0581); 河池学院2018年高层次人才科研启动费项目(No.XJ2018GKQ012)

* 讲师, 硕士。研究方向: 中药药效及生化药理学。电话: 0778-3141892。E-mail: 516328522@qq.com

通信作者: 副教授, 硕士。研究方向: 天然产物提取及活性成分分析。电话: 0778-7921961。E-mail: 903760146@qq.com

levels of TLR4 and NF- κ B p65 in renal tissue were increased significantly ($P < 0.01$). Compared with model control group, histopathological changes of liver were relieved significantly in *T. sutchuenensis* ethanol extract groups. Except that there was no significant difference in serum level of IFN- γ and level of NF- κ B p65 in renal tissue in *T. sutchuenensis* ethanol extract low-dose group, other indexes were improved significantly ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). CONCLUSIONS: *T. sutchuenensis* ethanol extract can improve high blood glucose, liver and renal complications, and protect liver and renal function in T2DM model mice. The mechanism may be associated with improving immunofunction, up-regulating anti-apoptosis factors, down-regulating the expression of apoptosis-promoting and inflammation-promoting factors so as to maintain the functional status of hepatocytes and reduce the degree of renal cell damage.

KEYWORDS *Taxillus sutchuenensis*; Ethanol extract; Type 2 diabetes mellitus; Complication; Liver injury; Renal injury; Mice

2型糖尿病(T2DM)是一种以高血糖为临床特点,并与遗传、免疫功能及环境饮食因素等密切相关的内分泌代谢性疾病。糖尿病肾病、糖尿病肝病均为其常见并发症,且发病率在我国呈快速上升趋势^[1]。如果糖尿病并发肝肾损伤得不到有效治疗,将发展为不可逆的终末期器官病变,因此对糖尿病肝肾并发症进行及时有效的防治非常必要。降糖化学药种类繁多,疗效较为肯定,但未能有效控制并发症的发生,且多有毒副作用。因此,寻找安全、有效的降糖中药是目前的研究热点之一。研究发现,采用中药治疗糖尿病可有效降低患者的并发症发生率^[2]。中药包含多种活性成分,可通过多靶点、多环节、多途径干预疾病的发生、发展^[3]。因此,研究和开发降糖中草药用以降低血糖及改善糖尿病并发症有着重要意义和广阔前景。桑寄生[*Taxillus sutchuenensis* (Lecomte) Danser]为桑寄生科钝果寄生属植物,多寄生于桑树、梨树、李树、油茶、厚皮香、核桃等植物上;其性平、味苦,归肝、肾经,具有补肝肾、强筋骨、祛风湿、安胎等功效,常用于治疗风湿痹痛、腰膝酸软、筋骨无力、崩漏经多、妊娠漏血、胎动不安等症^[4-5]。药理学研究发现,桑寄生具有抗肿瘤、降血脂、抗炎、镇痛、抗氧化、治疗肾病蛋白尿及尿毒症等作用^[6]。目前仅有体外降血糖研究证实,其能加速肝脏的葡萄糖代谢,同时增强肝细胞对胰岛素的敏感性,从而降低血糖水平^[7]。而有关其体内降血糖作用及抗糖尿病并发症的研究鲜见国内外文献报道。因此,本课题组通过建立T2DM小鼠模型,考察桑寄生醇提物对模型小鼠的血糖调节作用、肝肾保护作用及机制,为其作为糖尿病及相关并发症防治中药的开发和利用提供参考。

1 材料

1.1 仪器

AUW220D型分析天平(日本 Shimadzu公司);XL-300型全自动生化分析仪(德国 ERBA公司);xMark型酶标仪(美国 Bio-Rad公司);DH-20F型台式高速冷冻离心机(长沙百诺克离心机仪器有限公司);HH-S4型数显恒温水浴锅(金坛市医疗仪器厂);BX51型通用荧光显微镜(日本 Olympus公司);Q-250A3型高速多功能粉碎机(上海冰都电器有限公司);RE-52型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);FD-1C-80型多歧管冷冻干燥机(北

京博医康实验仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

链脲佐菌素对照品(STZ,美国 Sigma公司,批号:S0130,纯度: $\geq 98\%$);盐酸二甲双胍片(北京京丰制药有限公司,批号:160943,规格:0.25 g);葡萄糖测定试剂盒、丙氨酸转氨酶(ALT)测定试剂盒、天冬氨酸转氨酶(AST)测定试剂盒(长春汇力生物技术有限公司,批号分别为2017033、2017022、2017007);尿素氮(BUN)测定试剂盒、肌酐测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为20171218、20171216);胰岛素试剂盒、白细胞介素2(IL-2)试剂盒、IL-4试剂盒、IL-12试剂盒、 γ 干扰素(IFN- γ)试剂盒、Bcl-2试剂盒、Bax试剂盒、Toll样受体4(TLR4)试剂盒、核因子 κ B亚基p65亲和肽(NF- κ B p65)试剂盒(上海优选生物科技有限公司,均为酶联免疫吸附检测试剂盒,批号均为201804);其余试剂均为国产分析纯或实验室常用规格;柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(0.1 mol/L柠檬酸溶液-0.1 mol/L柠檬酸钠溶液按体积比14:11混匀制得,临用现配)、生理盐水均为实验室自制,水为蒸馏水。

1.3 药材

桑寄生药材于2017年1月购自广西河池市中药材市场(产地:广西河池市宜州区),经河池学院化学与生物工程学院邓晰朝副教授鉴定为桑寄生科钝果寄生属植物桑寄生[*Taxillus sutchuenensis* (Lecomte) Danser]。

1.4 动物

SPF级昆明小鼠100只,雌雄各半,体质量为(20 \pm 2)g,由广西医科大学动物实验中心提供,动物生产许可证号:SCXK(桂)2014-0002。实验所用基础饲料购自沈阳市前民动物实验饲料厂;胆固醇、胆酸钠购自河南鸿鑫食品有限公司;蔗糖购自国药集团化学试剂有限公司;猪油为自炼。

2 方法

2.1 桑寄生醇提物浸膏制备

取桑寄生于50 $^{\circ}$ C烘干,粉碎成粗粉。取粗粉5 kg,依次用95%乙醇、60%乙醇室温渗漉提取(溶剂均为50 L,每次浸提时间为10 d)。收集渗漉液,减压回收乙醇,得乙醇提取物浸膏。浸膏冷冻干燥后,即得桑寄生醇提物(约587.4 g),于4 $^{\circ}$ C冰箱保存,备用。

2.2 造模、分组与给药

取小鼠88只,给予自制高糖高脂饲料(按1%胆酸钠、2.5%胆固醇、20%蔗糖、10%猪油、66.5%基础饲料进行配比)喂养6周后,腹腔注射STZ溶液(以柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液为溶剂)45 mg/(kg·d),qd,连续7 d。末次注射完毕第9天时,检测小鼠空腹血糖(FBG)水平,当FBG≥12 mmol/L则视为T2DM模型成功建立^[8-9]。成功建模的小鼠继续给予高糖高脂饲料喂养4周。

取成功造模的T2DM模型小鼠60只,随机分为模型对照组(生理盐水)、阳性对照组[二甲双胍,150 mg/(kg·d)]和桑寄生醇提取物高、中、低剂量组[30、15、7.5 g/(kg·d),以生药量计],每组12只;另取正常小鼠12只作为空白对照组。各组小鼠分别灌胃给予相应药液或生理盐水,灌胃体积均为0.2 mL/10 g,连续给药28 d。其中,二甲双胍片和“2.1”项下制备的桑寄生醇提取物浸膏均以水制成适当浓度的混悬药液后灌胃;给药剂量根据预实验及临床拟用药剂量换算所得。

2.3 血清/尿液相关指标测定

灌胃给药结束后,所有小鼠均禁食不禁水12 h,然后摘眼球取血并处死,立即解剖取肝脏、肾脏,用预冷(5℃)生理盐水冲洗3次,于-80℃保存,待测。处死前1天,采用代谢笼收集小鼠24 h尿液。按相应试剂盒说明书操作,检测小鼠血清中FBG、空腹胰岛素(FINS)、IL-2、IL-4、IL-12、IFN-γ、血肌酐(Scr)、BUN、ALT、AST水平;收集24 h尿液并检测尿肌酐(Ucr)含量。计算小鼠胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)、胰岛素敏感指数(ISI),计算公式分别为:HOMA-IR=FBG×FINS/22.5^[10];ISI=ln[1/(FBG×FINS)]^[11]。

2.4 肝组织病理学变化观察

取“2.3”项下肝脏部分组织,于福尔马林液中固定24 h后,常规石蜡包埋,连续切片(厚度4 μm),苏木精-伊红(HE)染色,在光学显微镜下观察组织病理学变化。

2.5 肝、肾组织相关指标测定

取“2.3”项下肝脏、肾脏部分组织,以预冷(5℃)生理盐水制成匀浆后,按相应试剂盒说明书操作,检测肝组织中细胞凋亡相关因子Bcl-2、Bax的表达水平,测定肾组织中炎症相关因子NF-κB p65、TLR4的表达水平。

2.6 统计学方法

采用SPSS 13.0软件对数据进行统计分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 桑寄生醇提取物对T2DM模型小鼠血糖和胰岛素相关指标的影响

与空白对照组比较,模型对照组小鼠的血清FBG、FINS水平及HOMA-IR值均显著升高,ISI值显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。与模型对照组比较,

阳性对照组和桑寄生醇提取物各剂量组小鼠的血清FBG、FINS水平及HOMA-IR值均显著降低,ISI值显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),详见表1(注:在28 d给药期间,除空白对照组外其余组均有小鼠死亡,因此数量上有不同程度的减少;以下各表同)。

表1 各组小鼠血糖水平和胰岛素相关指标检测结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Results of blood glucose and insulin-related indexes in mice of each group($\bar{x} \pm s$)

组别	n	FBG,mmol/L	FINS,mIU/L	ISI	HOMA-IR
空白对照组	12	1.842±0.662	12.895±1.783	-3.100±0.353	1.048±0.356
模型对照组	8	25.402±2.810**	24.371±1.835**	-6.419±0.153**	27.582±4.045**
阳性对照组	9	18.528±3.975**	16.580±1.868**	-5.699±0.230**	13.622±3.140**
桑寄生醇提取物高剂量组	10	17.892±4.840**	18.309±1.386**	-5.751±0.292**	14.555±3.912**
桑寄生醇提取物中剂量组	11	19.117±6.133**	19.785±1.981**	-5.881±0.370**	16.970±5.830**
桑寄生醇提取物低剂量组	9	21.514±3.720*	21.639±2.138*	-6.126±0.193*	20.731±4.312*

注:与空白对照组比较,** $P < 0.01$;与模型对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note: vs. blank control group: ** $P < 0.01$; vs. model control group, * $P < 0.05$,** $P < 0.01$

3.2 桑寄生醇提取物对T2DM模型小鼠血清细胞因子的影响

与空白对照组比较,模型对照组小鼠血清中IL-2、IL-12、IFN-γ水平均显著降低,IL-4水平显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。与模型对照组比较,阳性对照组和桑寄生醇提取物各剂量组小鼠血清中IL-2、IL-12、IFN-γ水平均显著升高,IL-4水平显著降低,除桑寄生醇提取物低剂量组的IFN-γ外,其余指标差异均有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),详见表2。

表2 各组小鼠血清细胞因子水平检测结果($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

Tab 2 Results of serum levels of cytokines in mice of each group($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	n	IL-2	IL-4	IL-12	IFN-γ
空白对照组	12	108.085±13.375	12.404±1.743	30.260±5.361	24.216±5.910
模型对照组	8	48.975±10.132**	50.198±7.679**	15.990±4.071**	15.693±3.524**
阳性对照组	9	74.901±21.996**	23.851±2.829**	24.860±2.665**	21.910±4.115**
桑寄生醇提取物高剂量组	10	72.418±16.951**	29.662±5.390**	23.420±5.859**	20.123±5.219*
桑寄生醇提取物中剂量组	11	68.336±17.138**	31.245±6.712**	25.672±7.104**	19.562±4.039*
桑寄生醇提取物低剂量组	9	60.970±11.596*	35.482±3.857**	20.472±4.566*	17.617±2.026

注:与空白对照组比较,** $P < 0.01$;与模型对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note: vs. blank control group: ** $P < 0.01$; vs. model control group, * $P < 0.05$,** $P < 0.01$

3.3 桑寄生醇提取物对T2DM模型小鼠肝组织病理学变化、血清中肝功能指标及肝组织中Bcl-2、Bax水平的影响

3.3.1 肝组织病理学变化 空白对照组小鼠肝组织细胞结构完整、分界清晰、大小均匀,细胞核完整;模型对照组小鼠肝组织出现大量空泡,有细胞核减少、肝细胞坏死及纤维化现象;阳性对照组和桑寄生醇提取物各剂量

组小鼠肝组织空泡现象减轻,细胞核数量增多,肝细胞坏死及纤维化现象较模型对照组均明显改善。各组小鼠肝组织病理学变化显微图见图1。

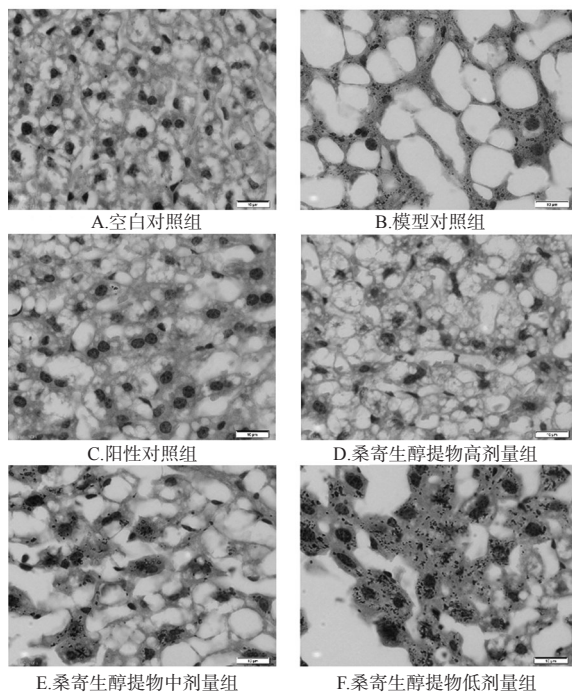


图1 各组小鼠肝组织病理学变化显微图(HE染色, ×100)

Fig 1 Microscopic changes of liver histopathology in mice of each group (HE staining, ×100)

3.3.2 血清中肝功能指标 与空白对照组比较,模型对照组小鼠血清中ALT、AST水平均显著升高,差异均有

统计学意义($P < 0.01$)。与模型对照组比较,阳性对照组和桑寄生醇提物各剂量组小鼠血清中ALT、AST水平均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$),详见表3。

3.3.3 肝组织中Bcl-2、Bax水平 与空白对照组比较,模型对照组小鼠肝组织中Bcl-2水平及Bcl-2/Bax比值均显著降低,Bax水平显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。与模型对照组比较,阳性对照组和桑寄生醇提物各剂量组小鼠肝组织中Bcl-2水平及Bcl-2/Bax比值均显著升高,Bax水平均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),详见表3。

3.4 桑寄生醇提物对T2DM模型小鼠肾功能指标和肾组织中TLR4、NF- κ B p65水平的影响

3.4.1 肾功能指标 与空白对照组比较,模型对照组小鼠血清中BUN、Scr水平均显著升高,Ucr水平显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。与模型对照组比较,阳性对照组和桑寄生醇提物各剂量组小鼠血清中BUN、Scr水平均显著降低,Ucr水平均显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$),详见表4。

3.4.2 肾组织中TLR4、NF- κ B p65水平 与空白对照组比较,模型对照组小鼠肾组织中TLR4、NF- κ B p65水平均显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。与模型对照组比较,阳性对照组和桑寄生醇提物各剂量组小鼠肾组织中TLR4、NF- κ B p65水平显著降低,除桑寄生醇提物低剂量组的NF- κ B p65之外,其余指标差异均有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),详见表4。

表3 各组小鼠血清肝功能指标和肝组织中Bcl-2、Bax水平测定结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Results of liver function indexes in serum and the levels of Bcl-2 and Bax in liver tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ALT, U/L	AST, U/L	Bcl-2, pg/mL	Bax, pg/mL	Bcl-2/Bax 比值
空白对照组	12	19.324 ± 2.461	27.974 ± 4.080	319.295 ± 51.810	3.722 ± 1.082	96.414 ± 46.550
模型对照组	8	50.979 ± 6.836**	60.669 ± 4.825**	184.146 ± 33.178**	9.724 ± 2.246**	19.390 ± 3.887**
阳性对照组	9	31.610 ± 5.036##	38.998 ± 3.743##	291.647 ± 70.824##	5.927 ± 1.866##	48.624 ± 11.735##
桑寄生醇提物高剂量组	10	33.060 ± 5.086##	40.497 ± 4.058##	342.749 ± 54.631##	6.222 ± 1.945##	60.370 ± 22.480##
桑寄生醇提物中剂量组	11	34.562 ± 3.156##	42.875 ± 4.662##	292.382 ± 70.580##	7.110 ± 2.015#	45.334 ± 19.965##
桑寄生醇提物低剂量组	9	38.779 ± 6.849##	45.644 ± 5.426##	280.955 ± 58.904##	7.451 ± 1.871#	40.596 ± 14.357##

注:与空白对照组比较,** $P < 0.01$;与模型对照组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, ** $P < 0.01$; vs. model control group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

表4 各组小鼠肾功能指标和肾组织中TLR4、NF- κ B p65水平检测结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 4 Results of renal function indexes and the levels of TLR4 and NF- κ B p65 in renal tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	BUN, mmol/L	Scr, μ mol/L	Ucr, μ mol/L	TLR4, pg/mL	NF- κ B p65, ng/L
空白对照组	12	3.678 ± 0.983	21.554 ± 6.993	2.877 ± 0.784	66.578 ± 19.688	0.834 ± 0.448
模型对照组	8	11.832 ± 3.906**	38.791 ± 6.548**	0.407 ± 0.092**	144.786 ± 23.696**	1.306 ± 0.156**
阳性对照组	9	5.836 ± 1.506##	26.754 ± 4.749##	0.672 ± 0.238##	92.654 ± 37.046##	1.030 ± 0.219##
桑寄生醇提物高剂量组	10	6.016 ± 2.798##	27.891 ± 6.078##	0.692 ± 0.317##	98.319 ± 21.035##	0.982 ± 0.231##
桑寄生醇提物中剂量组	11	7.115 ± 3.217#	29.510 ± 8.885*	0.689 ± 0.331##	106.898 ± 26.200##	1.114 ± 0.213#
桑寄生醇提物低剂量组	9	8.205 ± 2.761#	30.355 ± 9.841*	0.572 ± 0.215*	114.123 ± 18.168#	1.237 ± 0.218

注:与空白对照组比较,** $P < 0.01$;与模型对照组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, ** $P < 0.01$; vs. model control group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

4 讨论

随着社会经济水平的提高,我国糖尿病的发病率也明显升高,其与血糖升高及胰岛素抵抗密切相关,若不及时治疗可诱发机体代谢功能紊乱,最终引起严重的脏器及心血管损伤。二甲双胍是临床应用最广泛的降糖药,可通过提高胰岛素的敏感性来降低糖尿病患者的血糖水平,由于其无肝肾毒性、偶见消化道不良反应、罕见乳酸中毒^[12],因此本研究以其作为阳性对照药。结果显示,二甲双胍对T2DM模型小鼠表现出肝肾保护作用,可能与其能纠正小鼠血糖紊乱,从而减少高血糖引起肝肾并发症的发生有关。

胰岛素抵抗是指各种原因引起的胰岛素促进葡萄糖摄取和利用的能力下降,使靶器官对胰岛素所产生的生理效应低于正常水平,导致机体代偿性地分泌过多胰岛素而产生高胰岛素血症以维持血糖稳定的现象^[13]。其易导致代谢综合征,后者是T2DM发病的主要机制和始动因素。因此,降低血糖水平并改善其胰岛素抵抗状态是治疗T2DM的重要途径。HOMA-IR和ISI是评价胰岛素抵抗的两个重要指标,当胰岛素抵抗发生时,HOMA-IR值升高、ISI值降低^[10]。本研究发现,桑寄生醇提物能明显降低T2DM模型小鼠的FBG、FINS水平及HOMA-IR值,升高ISI值,表明其具有明显的降血糖、提高胰岛素敏感性及改善胰岛素抵抗的作用。

T2DM患者同时伴有明显的细胞免疫或体液免疫异常,Th1值及Th1/Th2比值异常降低是其主要表现。Th细胞也叫辅助性T细胞,主要分为Th1细胞与Th2细胞:前者的减少会导致机体免疫功能下降,引起高血糖的发生;后者的增加将导致胰岛B细胞分泌功能下降,使胰岛素分泌不足,影响机体血糖调节功能^[14]。IFN- γ 、IL-2、IL-12等均为Th1细胞分泌的炎症因子,IL-4则为Th2细胞分泌的炎症因子^[14]。本研究发现,桑寄生醇提物能显著升高T2DM模型小鼠血清中IL-2、IL-12、INF- γ 水平,降低IL-4水平,提示其能提高小鼠免疫功能。

ALT、AST主要存在于肝细胞中,当肝脏受到损伤或者出现功能障碍时,会释放入血,导致其血清水平升高^[15],因此常用于评价肝功能。Bcl-2、Bax作为细胞凋亡因子,分别发挥抗凋亡和促凋亡作用,两者的平衡决定着细胞是否会发生凋亡^[16]。本研究发现,桑寄生醇提物能改善T2DM模型小鼠肝细胞空泡、坏死及纤维化等病理症状,显著降低其血清中ALT、AST水平,同时能显著升高其肝组织中Bcl-2水平及Bcl-2/Bax比值、降低Bax水平,表明该醇提物对模型小鼠的肝功能损伤具有一定保护作用,且这一作用与上调抗凋亡相关因子、下调促凋亡相关因子从而维护肝细胞功能状态有关。

BUN是血浆中除蛋白质以外的另一种含氮化合物,Scr是肌肉在体内的代谢产物,两者均主要由肾小球滤过排出体外。根据BUN、Scr、Ucr水平的变化可判断肾

小球功能的受损害程度:在肾功能不全失代偿期,血清中BUN、Scr水平会上升,尿Ucr水平会下降,表明有害毒素在体内蓄积^[17]。在高血糖状态下,TLR4作为机体炎症反应链的启动蛋白,会促进炎症反应的发生从而导致细胞受损、凋亡及功能障碍^[18];NF- κ B是一个转录因子蛋白家族,包括5个亚单位(Rel、p65、RelB、p50、p52),其与糖尿病患者胰岛细胞的增殖和凋亡关系密切,其中p65蛋白作为NF- κ B通路蛋白家族的重要组成,能加速炎症因子的表达^[19]。本研究发现,桑寄生醇提物能显著降低T2DM模型小鼠血清BUN、Scr水平,升高尿Ucr水平,同时能显著降低肾组织中TLR4、NF- κ B p65的水平,表明其对模型小鼠的肾功能损伤具有一定保护作用,且这一作用与下调促炎相关因子的表达从而减轻肾细胞受损程度有关。

综上所述,桑寄生提取物具有改善T2DM模型小鼠的血糖水平、胰岛素抵抗、肝肾并发症及保护肝肾功能的作用;其机制可能与提高小鼠免疫功能、上调抗凋亡相关因子、下调促凋亡及促炎相关因子的表达,从而维护肝细胞功能状态、减轻肾细胞受损程度有关。

参考文献

- [1] 刘东伟,潘少康,刘章锁.糖尿病肾病的临床危险因素[J].中国实用内科杂志,2017,37(3):189-191.
- [2] 薛勇.中药治疗糖尿病及其并发症的应用分析[J/CD].中西医结合心血管病电子杂志,2018,6(19):145-148.
- [3] 史秀明,徐国良,黎宇,等.中药治疗糖尿病的研究进展[J].江西中医药,2015,46(5):64-70.
- [4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:299-300.
- [5] 中国植物志编委会.中国植物志:第24卷[M].北京:科学出版社,1988:129-130.
- [6] 朱开昕,苏本伟,李永华,等.桑寄生药理作用及临床应用研究进展[J].现代医学与健康研究电子杂志,2018,2(12):189-190.
- [7] 汪宁,朱荃,周义维,等.桑寄生对培养的人HepG2细胞葡萄糖消耗作用的影响[J].中医药学刊,2006,24(3):442-443.
- [8] 袁芳,刘映红,田俊玮,等.脂联素对糖尿病大鼠的肾脏保护作用及其抗氧化机制探讨[J].南方医科大学学报,2010,30(3):426-430.
- [9] 丁婷.抑制神经酰胺合成对内质网应激通路所致糖尿病大鼠肝脏脂肪变性的影响[D].长沙:中南大学,2014.
- [10] 张明丽,陈吉全,周新强.泽泻多糖对2型糖尿病大鼠胰岛素抵抗及脂代谢紊乱的改善作用及机制研究[J].中国药房,2018,29(1):42-45.
- [11] KURUP S, BHONDE RR. Combined effect of nicotinamide and streptozotocin on diabetic status in partially pancreatectomized adult BALB/c mice[J]. *Horm Metab Res*,2000,32(8):330-334.
- [12] 刘云,孙增先.二甲双胍治疗非糖尿病疾病的国外研究进展[J].中国药房,2018,29(24):3451-3456.
- [13] 齐刚,王继锋,齐凤军,等.黄连多糖联合甘精胰岛素治疗

铁皮石斛多糖对人脐静脉内皮细胞基因表达谱的影响研究^Δ

王瑞君^{1*}, 谢 兰^{2,3}, 冯 娟^{2,3}, 赵文龙^{2,3}, 郭志方^{2,3}, 乔连生^{2,3}, 宋维芳^{1#}[1.山西医科大学汾阳学院病理生理学教研室,山西汾阳 032200;2.清华大学医学院医学系统生物学研究中心,北京 100084;3.生物芯片北京国家工程研究中心(博奥生物),北京 102206]

中图分类号 R966 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)06-0801-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.06.16

摘要 目的:探讨铁皮石斛多糖对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)基因表达谱的影响。方法:以HUVEC为对象,采用MTS法检测不同剂量铁皮石斛多糖(50、100、200、400、800 μg/mL)对HUVEC细胞增殖活性的影响,并计算30%细胞生长抑制浓度(IC₃₀)以筛选后续试验剂量;采用基因表达谱芯片技术检测铁皮石斛多糖作用24 h后HUVEC细胞基因表达谱的变化情况,筛选差异表达基因;利用DAVID生物信息学资源数据库对差异表达前5位的基因进行GO富集分析和KEGG通路富集分析;以免疫相关差异表达基因为对象,采用实时荧光定量聚合酶链反应法(qRT-PCR)对芯片检测结果进行验证。结果:经100、200、400、800 μg/mL铁皮石斛多糖作用后,HUVEC细胞的存活率均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);IC₃₀值为408 μg/mL。经400 μg/mL(据IC₃₀值确定)铁皮石斛多糖作用后,HUVEC细胞中共有差异表达基因91个,其中表达上调的有84个、表达下调的有7个。上、下调表达差异前5位的基因分别为SELE、CCL2、CXCL6、IL8、ICAM1以及VWCE、CPT1A、CLU、CCL14、CINS4,主要与免疫调节、炎症反应等有关。HUVEC细胞中的差异表达基因主要分布于胞外区域,富集于细胞因子的产生及反应、刺激反应等生物学过程,发挥趋化因子及其受体活性等分子功能;其中上调表达基因SELE、ICAM1、CXCL2等主要富集于肿瘤坏死因子(TNF)信号通路、甲型H1N1流感、单纯疱疹病毒感染等通路,下调表达基因CCL14主要富集于趋化因子信号通路。qRT-PCR验证结果显示,ICAM1基因的相对表达量显著升高,CCL14基因的相对表达量显著降低($P < 0.05$),与芯片检测结果一致。结论:经铁皮石斛多糖处理后,HUVEC细胞共有91个基因表达差异明显,且以表达上调为主。表达差异基因可能通过TNF信号通路、甲型H1N1流感、单纯疱疹病毒感染等通路参与机体免疫调节。

关键词 铁皮石斛多糖;人脐静脉内皮细胞;基因表达谱;免疫调节

Effects of *Dendrobium officinale* Polysaccharides on Gene Expression Profile of HUVEC

WANG Ruijun¹, XIE Lan^{2,3}, FENG Juan^{2,3}, ZHAO Wenlong^{2,3}, GUO Zhifang^{2,3}, QIAO Liansheng^{2,3}, SONG Weifang¹[1. Dept. of Pathophysiology, Fenyang College, Shanxi Medical University, Shanxi Fenyang 032200, China; 2. Medical System Biology Research Center, Tsinghua University School of Medicine, Beijing 100084, China; 3. National Engineering Research Center for Beijing Biochip Technology (CapitalBio), Beijing 102206, China]

- 2型糖尿病胰岛素抵抗[J].中医学报,2018(10):1899-1903.
- [14] 韩伟,崔秀琴,李振魁,等.肺结核伴糖尿病患者Th1/Th2细胞因子水平及意义[J].临床肺科杂志,2018,23(2):239-241.
- [15] 傅晔柳,诸梦露,楼霆.白头翁汤对链脉佐菌素诱导的糖尿病肝损伤的保护作用研究[J].药物评价研究,2018,41(8):1430-1435.
- [16] ZHU L, HAO J, CHENG M, et al. Hyperglycemia-induced Bcl-2/Bax-mediated apoptosis of Schwann cells via mTORC1/S6K1 inhibition in diabetic peripheral neuropathy[J]. *Exp Cell Res*, 2018, 367(2):186-195.
- [17] 沈艳,闫海洋,徐殿琴,等.2型糖尿病患者发生肾功能异常与其甲状腺功能的的关系研究[J].中国实用内科杂志,2018,38(7):644-648.
- [18] YIN H, HUANG L, OUYANG T, et al. Baicalein improves liver inflammation in diabetic db/db mice by regulating HMGB1/TLR4/NF-κB signaling pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2018. DOI: 10.1016/j.intimp.2017.12.002.
- [19] LV J, WANG Z, WANG Y, et al. Renoprotective effect of the Shen-Yan-Fang-Shuai Formula by inhibiting TNF-α/NF-κB signaling pathway in diabetic rats[J]. *J Diabetes Res*, 2017. DOI: 10.1155/2017/4319057.

Δ 基金项目:北京市科学技术委员会优秀人才培养资助工作青年拔尖个人项目(No.2017000021223K30);中国肝炎防治基金会天晴肝病研究基金科研课题(No.TQGB20120013)

* 硕士研究生。研究方向:中药治疗肝病药理基础(免疫方向)。E-mail:841684901@qq.com

通信作者:副教授,硕士。研究方向:肝病。电话:0358-2892011。E-mail:bsswf@163.com

(收稿日期:2018-10-04 修回日期:2019-01-23)
(编辑:段思怡)