

# 基于PPAR $\gamma$ 途径探讨桑叶总黄酮对妊娠期糖尿病模型大鼠糖脂代谢、炎症和氧化应激的改善作用<sup>A</sup>

史纪芳<sup>1\*</sup>, 潘佳琪<sup>1</sup>, 陈 梦<sup>1</sup>, 马 敬<sup>2</sup>, 王华伟<sup>3#</sup>(1.大理大学临床医学院, 云南 大理 671000; 2.昆明医科大学第一附属医院产科, 昆明 650032; 3.昆明医科大学第一附属医院生殖遗传科, 昆明 650032)

中图分类号 R714.7; R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)06-0671-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.06.07

**摘要** 目的: 研究桑叶总黄酮对妊娠期糖尿病(GDM)模型大鼠糖脂代谢、炎症和氧化应激的改善作用, 并探讨其可能机制。方法: 雌性SD大鼠连续喂养高脂饲料8周后, 将空腹血糖(FBG) < 6.67 mmol/L的雌鼠与雄性SD大鼠合笼; 将妊娠大鼠随机分为对照组、GDM组以及桑叶总黄酮低、中、高剂量组(50、100、200 mg/kg), 每组10只。除对照组外, 其余各组均单次腹腔注射链脲佐菌素25 mg/kg以复制GDM模型。于注射后, 各给药组大鼠均灌胃相应药物, 对照组和GDM组大鼠均灌胃生理盐水(10 mL/kg); 每日1次, 连续18 d。分别于孕第3、7、18天(G<sub>3d</sub>、G<sub>7d</sub>、G<sub>18d</sub>)检测其FBG水平; 于G<sub>18d</sub>检测其血脂[三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)]和血清炎症细胞因子[肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素6(IL-6)、IL-8]、氧化应激指标[丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH)、过氧化氢酶(CAT)]水平, 采用荧光定量聚合酶链反应法和Western blotting法分别检测其胎盘组织中过氧化物酶增殖体激活受体 $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )和核因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)蛋白及mRNA, AMP依赖的蛋白激酶(AMPK)mRNA以及磷酸化AMPK(p-AMPK)蛋白的表达情况。结果: 与对照组比较, GDM组大鼠FBG(G<sub>3d</sub>、G<sub>7d</sub>、G<sub>18d</sub>)、TG、TC、LDL-C、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8、MDA水平以及NF- $\kappa$ B蛋白及mRNA的表达量均显著升高, 而SOD、GSH、CAT水平以及PPAR $\gamma$ 蛋白及mRNA、AMPK mRNA、p-AMPK蛋白的表达量均显著降低( $P < 0.01$ )。与GDM组比较, 桑叶总黄酮中、高剂量组大鼠FBG(G<sub>3d</sub>、G<sub>7d</sub>、G<sub>18d</sub>)、TG、TC、LDL-C水平以及各剂量组TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8、MDA水平, NF- $\kappa$ B蛋白及mRNA的表达量均显著降低, 而桑叶总黄酮各剂量组大鼠SOD、GSH、CAT水平以及PPAR $\gamma$ 蛋白及mRNA、AMPK mRNA、p-AMPK蛋白的表达量均显著升高( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。结论: 桑叶总黄酮对GDM模型大鼠的糖脂代谢、炎症和氧化应激均具有一定的改善作用, 其机制可能与PPAR $\gamma$ 途径的激活有关。

**关键词** 妊娠期糖尿病; 桑叶总黄酮; 过氧化物酶增殖体激活受体 $\gamma$ ; 糖脂代谢; 炎症; 氧化应激; 大鼠

## Improvement Effects of Total Flavonoids from *Morus alba* on Glycolipid Metabolism, Inflammation and Oxidative Stress in Gestational Diabetes Mellitus Model Rats Based on PPAR $\gamma$ Pathway

SHI Jifang<sup>1</sup>, PAN Jiaqi<sup>1</sup>, CHEN Meng<sup>1</sup>, MA Jing<sup>2</sup>, WANG Huawei<sup>3</sup>(1. Clinical College, Dali University, Yunnan Dali 671000, China; 2. Dept. of Obstetrics, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, China; 3. Dept. of Reproductive Genetics, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the improvement effects of total flavonoids from *Morus alba* on glycolipid metabolism, inflammation and oxidative stress in gestational diabetes mellitus (GDM) model rats, and to investigate the potential mechanism. METHODS: After feeding high fat diet for 8 weeks, female SD rats with FBG < 6.67 mmol/L were caged with male SD rats. Pregnant female rats were randomly divided into control group, GDM group, *M. alba* total flavonoids low-dose, medium-dose and high-dose groups (50, 100, 200 mg/kg), with 10 rats in each group. Except for control group, other groups were given intraperitoneal injection of streptozotocin 25 mg/kg once to induce GDM model. After injection, rats in each administration group were given corresponding drugs intragastrically, control group and GDM group were given normal saline 10 mL/kg intragastrically, once a day, for consecutive 18 days. The levels of FBG were determined on the 3rd, 7th and 18th day of pregnancy (G<sub>3d</sub>, G<sub>7d</sub> and G<sub>18d</sub>); the levels of blood lipids (TG, TC, LDL-C, HDL-C) and inflammatory factors (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8), oxidative stress indicators (MDA, SOD, GSH, CAT) in serum were determined on G<sub>18d</sub>. The protein and mRNA expressions of PPAR $\gamma$  and NF- $\kappa$ B, the expression of AMPK mRNA and p-AMPK protein were measured by Real-time-PCR and Western blotting. RESULTS: Compared with control group, the levels of FBG (G<sub>3d</sub>, G<sub>7d</sub>, G<sub>18d</sub>), TG, TC, LDL-C, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 and MDA, protein and mRNA expression of NF- $\kappa$ B in GDM group were significantly increased, while the levels of SOD, GSH and CAT, the expressions

<sup>A</sup> 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81460240)

\* 副教授, 硕士。研究方向: 妇产科。E-mail: fcksjf@126.com

# 通信作者: 副研究员。研究方向: 医学遗传学。E-mail: wang-huawei99@163.com

of PPAR $\gamma$  protein and mRNA, AMPK mRNA and p-AMPK protein were significantly decreased ( $P < 0.01$ ). Compared with GDM group, the levels of FBG (G<sub>3d</sub>, G<sub>7d</sub>, G<sub>18d</sub>), TG, TC, LDL-C in *M. alba* total flavonoids medium-dose and

high-dose groups and the levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 and MDA, protein and mRNA expression of NF- $\kappa$ B in *M. alba* total flavonoids groups were significantly decreased; the levels of SOD, GSH and CAT, the expressions of PPAR $\gamma$  protein and mRNA, AMPK mRNA and p-AMPK protein were significantly increased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). CONCLUSIONS: Total flavonoids from *M. alba* can improve the glycolipid metabolism, inflammation and oxidative stress in GDM model rats, the mechanism of which may be related to the activation of PPAR $\gamma$  pathway.

**KEYWORDS** Gestational diabetes mellitus; Total flavonoids from *Morus alba*; PPAR $\gamma$ ; Glycolipid metabolism; Inflammation; Oxidative stress; Rat

妊娠期糖尿病(Gestational diabetes mellitus, GDM)为妊娠期的常见合并症,是指妊娠期首次发生或发现的糖代谢异常,可增加母胎风险<sup>[1]</sup>。胰岛素抵抗加重是GDM患者重要的病理生理特征<sup>[2]</sup>,但导致妊娠期胰岛素抵抗加重的因素尚未完全阐明。有研究指出,脂代谢紊乱、炎症和氧化应激反应的过度激活均有可能影响胰岛素信号的转导,进而诱导胰岛素抵抗的发生,上述因素可能与GDM的发生有关<sup>[3-5]</sup>。

桑叶是桑科桑属植物桑(*Morus alba* L.)的干燥叶。历代中医典籍中均记载该药可治疗消渴症。现代药理学研究证实,桑叶中的有效成分桑叶总黄酮无致畸作用,且具有降脂、降糖的作用,在2型糖尿病的治疗中具有一定价值<sup>[6-7]</sup>。由于GDM与2型糖尿病具有类似的病理生理特征(即胰岛素抵抗)<sup>[2]</sup>,故本课题组推测桑叶总黄酮可能对GDM具有一定的治疗作用。

过氧化物酶增殖体激活受体 $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )是细胞内调节炎症和氧化应激反应的重要分子,可通过抑制下游核因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)的活化来减轻炎症反应的程度,亦可通过促进下游腺苷一磷酸依赖的蛋白激酶(AMPK)的活化来减少氧化应激反应的发生<sup>[8]</sup>。已有研究报道,GDM患者胎盘中PPAR $\gamma$ 途径受到明显抑制,从而使得炎症细胞因子、氧化应激产物的释放增加,母体炎症反应和氧化应激反应被激活,最终导致母体糖脂代谢紊乱<sup>[9]</sup>。鉴于此,本研究以GDM模型大鼠为对象,基于胎盘中PPAR $\gamma$ 途径的改变来探讨桑叶总黄酮对大鼠糖脂代谢、炎症、氧化应激的改善作用,旨在挖掘桑叶总黄酮在GDM治疗中的潜在价值。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Selectra E型全自动生化分析仪(上海玉研科学仪器有限公司);Labserv K3型酶标仪(上海沃元科技有限公司);Veriti 96型荧光定量聚合酶链反应(PCR)仪(美国ABI公司);5200型蛋白电泳系统及凝胶成像仪(上海天能科技有限公司);卓越纤巧型血糖仪(瑞士Roche公司);X6型智能扫描紫外分光光度计(上海元析仪器有限公司);TGL-16K型台式离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);YM-T2000CT型超声仪(上海豫明仪器有限公司)。

### 1.2 药材与试剂

桑叶饮片(批号:20170937)购自四川省中药饮片有限责任公司,经昆明医科大学第一附属医院生殖遗传科

王华伟副研究员鉴定为桑科桑属植物桑(*M. alba* L.)的叶。

链脲佐菌素(STZ,美国Sigma公司);pH 4.5的枸橼酸缓冲液(青岛捷世康生物科技有限公司,批号:T2607);肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )(批号:ml002859)、白细胞介素6(IL-6)(批号:ml028583)、IL-8(批号:ml028580)酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒均购自上海酶联生物科技有限公司;丙二醛(MDA)硫代巴比妥酸法试剂盒(批号:A003-1-1)、超氧化物歧化酶(SOD)羟胺法试剂盒(批号:A001-1-2)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH)微板法试剂盒(批号:A006-2-1)、过氧化氢酶(CAT)可见光法试剂盒(批号:A007-1-1)均购自南京建成生物工程研究所;超纯RNA提取试剂盒(批号:CW0597)、SuperRT cDNA第一链合成试剂盒(批号:CW0741)、UltraSYBR Mixture试剂盒(批号:CW2601S)均购自北京康为世纪生物科技有限公司;RIPA裂解液(批号:P0013E)、BCA蛋白定量试剂盒(批号:P0012)、上样缓冲液(批号:P0015L)均购自上海碧云天生物技术有限公司;兔源PPAR $\gamma$ 一抗(批号:ab23673)、兔源NF- $\kappa$ B一抗(批号:ab32360)、兔源AMPK一抗(批号:ab80039)、兔源磷酸化AMPK(p-AMPK)一抗(批号:ab133448)、兔源 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)一抗(批号:ab8827)、Alexa Fluor<sup>®</sup>488标记的山羊抗兔IgG二抗(批号:ab150081)、ECL化学发光试剂(批号:ab65223)均购自美国Abcam公司;D101型大孔吸附树脂(0.3~1.2 mm,上海颖心实验室设备有限公司);63428-84-2型聚酰胺(60~80目,上海萌芽生物科技有限公司);生理盐水(本实验室自制);其余试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

### 1.3 动物

SPF级雌、雄性SD大鼠,6周龄,体质量120~150 g,由北京维通利华实验动物公司提供,动物使用许可证号:SYXK(京)2017-0022。高脂饲料(含标准饲料59.8%、白糖15%、猪油10%、食盐2%、胆固醇0.2%、酪蛋白7%、蛋黄粉5%)购自上海睿安生物科技有限公司。

## 2 方法

### 2.1 桑叶总黄酮的制备

取桑叶饮片500 g,加入25倍量(g/mL)70%乙醇浸泡1 h,超声(功率:1 200 W,频率:20 kHz)处理30 min后,加热回流提取1.5 h,滤过,药液减压回收至无醇味。将上述提取物经70%乙醇稀释后,用聚酰胺和大孔吸附树脂进行联合精制,依次以水、20%乙醇洗脱后,再以

80%乙醇洗脱,得桑叶总黄酮[经紫外分光光度法以紫外分光光度计测得其含总黄酮含量为58.7 g/L(以生药量计)],于4℃保存,备用。

## 2.2 GDM模型制备

雌性SD大鼠连续喂养高脂饲料8周后,禁食、不禁水12 h,以血糖仪测定其空腹血糖(FBG)水平,剔除FBG $\geq$ 6.67 mmol/L者;剩余雌性SD大鼠按2:1的比例与雄性大鼠合笼,次日常阴道涂片镜检,发现有精子的雌性SD大鼠即认定为妊娠,并记为孕第0天(G<sub>0</sub>)。妊娠大鼠禁食、不禁水12 h后,单次腹腔注射STZ(25 mg/kg)以复制GDM模型,于G<sub>3d</sub>同法检测其FBG水平,若为6.67~16.67 mmol/L则判定为GDM模型复制成功<sup>[10]</sup>。

## 2.3 分组与给药

将妊娠大鼠随机分为对照组、GDM组以及桑叶总黄酮低、中、高剂量组,每组10只。对照组大鼠予高脂饲料并于G<sub>0</sub>时腹腔注射等剂量枸橼酸缓冲液;其余各组大鼠按“2.2”项下方法复制GDM模型,并于STZ注射后灌胃相应药物,给药剂量参考穆晓燕等<sup>[7]</sup>的研究,低、中、高剂量分别为50、100、200 mg/kg(以桑叶总黄酮提取物质量计);对照组和GDM组大鼠分别灌胃生理盐水(10 mL/kg);每日1次,连续18 d。分别于G<sub>3d</sub>、G<sub>7d</sub>、G<sub>18d</sub>时,空腹采集尾尖血,采用血糖仪测定其FBG水平。

## 2.4 标本采集

于G<sub>18d</sub>测定FBG水平后,腹腔注射3%戊巴比妥钠溶液进行麻醉,经大鼠心脏取血,以3 000 r/min离心15 min,分离血清,置于-80℃冰箱中保存,备用;采血后处死各组大鼠,取胎盘组织适量,经生理盐水反复清洗后,放入液氮中短暂冻存20~30 min,随后置于-80℃冰箱中保存,备用。

## 2.5 血清指标检测

取“2.4”项下血清适量,采用全自动生化分析仪检测各组大鼠血清中三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)的水平,采用试剂盒检测各组大鼠血清中TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8、MDA、SOD、GSH、CAT的水平,均严格按照试剂盒说明书方法操作。

## 2.6 PPAR $\gamma$ 、NF- $\kappa$ B、AMPK mRNA表达检测

采用荧光定量PCR法。取“2.4”项下胎盘组织适量,剪碎后采用超纯RNA提取试剂盒分离组织中的总RNA,采用SuperRT cDNA第一链合成试剂盒将RNA反转录为cDNA,使用UltraSYBR Mixture试剂盒配制反应体系(共20  $\mu$ L),即cDNA模板1  $\mu$ L,试剂盒内的反应混合液10  $\mu$ L,5  $\mu$ mol/L的上、下游引物各0.5  $\mu$ L,去离子水8  $\mu$ L。引物序列:PPAR $\gamma$ 上、下游引物分别为5'-ATGC-TATAGTCTATGCTACT-3'、5'-GCTAGCTAGTAGCTAG-CTGA-3',NF- $\kappa$ B上、下游引物分别为5'-TAGCGATTAG-CTTACGTAG-3'、5'-TAGCTAGCTAGCTACGTAC-3',AMPK上、下游引物分别为5'-GCTAGCTAGCTAGC-

TAGCAT-3'、5'-AGCTACGTACGTAGCTAGCT-3', $\beta$ -actin上、下游引物分别为5'-CGATGCTAGCTAGCTACGAT-3'、5'-ATGCTAGCTAGCTAGCATGC-3'。反应条件:95℃预变性3 min,95℃变性30 s,30℃退火30 s,72℃延伸60 s,共35个循环。使用Bio-Rad iQ5 V2.1.97软件绘制循环曲线并计算循环阈值(Ct,即每个样品的荧光信号到达设定阈值时所经历的循环数);并以 $\beta$ -actin为内参,按2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>法计算PPAR $\gamma$ 、NF- $\kappa$ B、AMPK mRNA的表达量。

## 2.7 PPAR $\gamma$ 、NF- $\kappa$ B、p-AMPK蛋白表达检测

采用Western blotting法。取“2.4”项下胎盘组织适量,剪碎后加入RIPA裂解液,充分裂解后,于4℃下以12 000 r/min离心15 min,收集上清液后以BCA蛋白定量试剂盒测定总蛋白含量。取蛋白30  $\mu$ g,与上样缓冲液混合后,行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),并于电泳后转移至硝酸纤维素酶(NC)膜上,以5%脱脂牛奶室温封闭2 h,加入相应一抗(PPAR $\gamma$ 、NF- $\kappa$ B、AMPK、p-AMPK的稀释度均为1:1 000, $\beta$ -actin的稀释度为1:5 000),于4℃孵育过夜;用三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(TBST)溶液清洗10 min $\times$ 3次,加入相应二抗(稀释度为1:2 000),室温孵育1 h;用TBST溶液清洗10 min $\times$ 3次,以ECL化学发光试剂显色后置于蛋白电泳系统及凝胶成像仪上成像,使用Image J v1.8.0软件处理,以PPAR $\gamma$ 、NF- $\kappa$ B与内参 $\beta$ -actin条带灰度值的比值作为PPAR $\gamma$ 、NF- $\kappa$ B蛋白的表达量,以p-AMPK与AMPK条带灰度值的比值作为p-AMPK蛋白的表达量。

## 2.8 统计学方法

采用SPSS 22.0软件对数据进行统计分析。计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,经Levene法检验后,方差齐的数据的多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验;方差不齐的组间比较采用非参数秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 各组大鼠糖脂代谢指标比较

G<sub>0</sub>时,各组大鼠FBG水平组间比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。与对照组比较,GDM组大鼠G<sub>3d</sub>、G<sub>7d</sub>、G<sub>18d</sub>时的FBG水平均显著升高( $P < 0.01$ )。与GDM组比较,桑叶总黄酮中、高剂量组大鼠G<sub>3d</sub>、G<sub>7d</sub>、G<sub>18d</sub>时的FBG水平均显著降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ );而桑叶总黄酮低剂量组大鼠上述时间点FBG水平与GDM组比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),详见表1。

G<sub>18d</sub>时,与对照组比较,GDM组大鼠血清中TG、TC、LDL-C水平均显著升高( $P < 0.01$ );而HDL-C水平与对照组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与GDM组比较,桑叶总黄酮中、高剂量组大鼠血清中TG、TC、LDL-C水平均显著降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ );而桑叶总黄酮低剂量组TG、TC、LDL-C以及各给药组HDL-C水平与GDM组比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),详

见表2。

表1 各组大鼠FBG水平比较( $\bar{x} \pm s, n=10, \text{mmol/L}$ )

Tab 1 Comparison of FBG levels of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n=10, \text{mmol/L}$ )

组别	G <sub>0</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	G <sub>3</sub>
对照组	4.94±0.78	5.23±0.86	5.31±0.76	5.18±0.92
GDM组	5.11±0.94	14.85±2.12**	17.72±3.09**	16.92±2.86**
桑叶总黄酮低剂量组	5.02±0.91	14.41±2.26	17.14±2.88	16.49±2.72
桑叶总黄酮中剂量组	5.20±0.92	12.85±1.94 <sup>#</sup>	12.25±1.87 <sup>#</sup>	11.95±1.85 <sup>#</sup>
桑叶总黄酮高剂量组	5.03±1.09	12.03±2.09 <sup>#</sup>	10.91±2.24 <sup>##</sup>	9.24±1.74 <sup>##</sup>

注:与对照组比较,\*\* $P<0.01$ ;与GDM组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>##</sup> $P<0.01$

Note: vs. control group, \*\* $P<0.01$ ; vs. GDM group, <sup>#</sup> $P<0.05$ , <sup>##</sup> $P<0.01$

表2 各组大鼠血清中TG、TC、LDL-C、HDL-C水平比较( $\bar{x} \pm s, n=10, \text{mmol/L}$ )

Tab 2 Comparison of serum levels of TG, TC, LDL-C and HDL-C of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n=10, \text{mmol/L}$ )

组别	TG	TC	LDL-C	HDL-C
对照组	0.61±0.09	1.15±0.22	0.68±0.09	0.89±0.12
GDM组	1.74±0.24**	3.22±0.62**	1.26±0.20**	0.84±0.15
桑叶总黄酮低剂量组	1.69±0.22	3.08±0.57	1.19±0.17	0.85±0.14
桑叶总黄酮中剂量组	1.25±0.19 <sup>##</sup>	2.58±0.41 <sup>##</sup>	1.02±0.15 <sup>#</sup>	0.91±0.17
桑叶总黄酮高剂量组	1.12±0.16 <sup>##</sup>	2.27±0.41 <sup>##</sup>	0.87±0.12 <sup>##</sup>	0.92±0.12

注:与对照组比较,\*\* $P<0.01$ ;与GDM组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>##</sup> $P<0.01$

Note: vs. control group, \*\* $P<0.01$ ; vs. GDM group, <sup>#</sup> $P<0.05$ , <sup>##</sup> $P<0.01$

### 3.2 各组大鼠血清中TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8水平比较

与对照组比较,GDM组大鼠血清中TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8水平均显著升高( $P<0.01$ )。与GDM组比较,桑叶总黄酮各剂量组大鼠上述指标水平均显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),详见表3。

表3 各组大鼠血清中TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8水平比较( $\bar{x} \pm s, n=10, \text{ng/mL}$ )

Tab 3 Comparison of serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n=10, \text{ng/mL}$ )

组别	TNF- $\alpha$	IL-6	IL-8
对照组	50.29±8.79	109.39±16.85	25.93±4.58
GDM组	79.31±11.23**	141.24±20.19**	38.18±6.64**
桑叶总黄酮低剂量组	72.28±10.74 <sup>#</sup>	133.85±17.68 <sup>#</sup>	33.58±5.62 <sup>#</sup>
桑叶总黄酮中剂量组	70.03±9.18 <sup>##</sup>	129.03±15.50 <sup>##</sup>	30.12±4.77 <sup>##</sup>
桑叶总黄酮高剂量组	63.57±8.89 <sup>##</sup>	121.37±14.85 <sup>##</sup>	28.39±4.23 <sup>##</sup>

注:与对照组比较,\*\* $P<0.01$ ;与GDM组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>##</sup> $P<0.01$

Note: vs. control group, \*\* $P<0.01$ ; vs. GDM group, <sup>#</sup> $P<0.05$ , <sup>##</sup> $P<0.01$

### 3.3 各组大鼠血清中MDA、SOD、GSH、CAT水平比较

与对照组比较,GDM组大鼠血清中MDA水平显著升高,SOD、GSH、CAT水平均显著降低( $P<0.01$ )。与GDM组比较,桑叶总黄酮各剂量组大鼠血清中MDA水平均显著降低,SOD、GSH、CAT水平均显著升高( $P<$

0.05或 $P<0.01$ ),详见表4。

表4 各组大鼠血清中MDA、SOD、GSH、CAT水平比较( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Tab 4 Comparison of serum levels of MDA, SOD, GSH and CAT of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	MDA, nmol/L	SOD, U/L	GSH, U/L	CAT, U/L
对照组	2.83±0.52	89.93±12.84	62.39±9.39	35.61±6.97
GDM组	4.77±0.71**	60.57±8.93**	41.37±7.64**	23.82±5.23**
桑叶总黄酮低剂量组	4.02±0.58 <sup>#</sup>	68.14±9.12 <sup>##</sup>	49.31±9.78 <sup>#</sup>	27.07±5.71 <sup>#</sup>
桑叶总黄酮中剂量组	3.69±0.47 <sup>##</sup>	74.12±9.84 <sup>##</sup>	53.28±8.15 <sup>##</sup>	29.49±4.95 <sup>##</sup>
桑叶总黄酮高剂量组	3.34±0.41 <sup>##</sup>	80.42±10.96 <sup>##</sup>	57.62±7.79 <sup>##</sup>	31.27±5.08 <sup>##</sup>

注:与对照组比较,\*\* $P<0.01$ ;与GDM组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>##</sup> $P<0.01$

Note: vs. control group, \*\* $P<0.01$ ; vs. GDM group, <sup>#</sup> $P<0.05$ , <sup>##</sup> $P<0.01$

### 3.4 各组大鼠胎盘组织中PPAR $\gamma$ 、NF- $\kappa$ B、AMPK mRNA表达量比较

与对照组比较,GDM组大鼠胎盘组织中PPAR $\gamma$ 、AMPK mRNA的表达量均显著降低,NF- $\kappa$ B mRNA的表达量显著升高( $P<0.01$ )。与GDM组比较,桑叶总黄酮各剂量组大鼠胎盘组织中PPAR $\gamma$ 、AMPK mRNA的表达量均显著升高,NF- $\kappa$ B mRNA的表达量均显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),详见表5。

表5 各组大鼠胎盘组织中PPAR $\gamma$ 、NF- $\kappa$ B、AMPK mRNA表达量比较( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Tab 5 Comparison of mRNA expression of PPAR $\gamma$ , NF- $\kappa$ B and AMPK in placenta tissue of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	PPAR $\gamma$	NF- $\kappa$ B	AMPK
对照组	0.98±0.14	0.96±0.15	1.03±0.18
GDM组	0.42±0.08**	1.97±0.32**	0.50±0.08**
桑叶总黄酮低剂量组	0.60±0.07 <sup>#</sup>	1.62±0.19 <sup>#</sup>	0.64±0.06 <sup>#</sup>
桑叶总黄酮中剂量组	0.69±0.09 <sup>##</sup>	1.44±0.20 <sup>##</sup>	0.72±0.11 <sup>##</sup>
桑叶总黄酮高剂量组	0.81±0.13 <sup>##</sup>	1.31±0.17 <sup>##</sup>	0.78±0.15 <sup>##</sup>

注:与对照组比较,\*\* $P<0.01$ ;与GDM组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>##</sup> $P<0.01$

Note: vs. control group, \*\* $P<0.01$ ; vs. GDM group, <sup>#</sup> $P<0.05$ , <sup>##</sup> $P<0.01$

### 3.5 各组大鼠胎盘组织中PPAR $\gamma$ 、NF- $\kappa$ B、p-AMPK蛋白表达量比较

与对照组比较,GDM组大鼠胎盘组织中PPAR $\gamma$ 、p-AMPK蛋白的表达量均显著降低,NF- $\kappa$ B蛋白的表达量显著升高( $P<0.01$ )。与GDM组比较,桑叶总黄酮各剂量组大鼠胎盘组织中PPAR $\gamma$ 、p-AMPK蛋白的表达量均显著升高,NF- $\kappa$ B蛋白表达量均显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),详见图1、表6。

## 4 讨论

GDM的病理生理特征与2型糖尿病相似,主要表现为明显的胰岛素抵抗以及胰岛素分泌相对不足,该病的发生虽受脂代谢紊乱、炎症和氧化应激反应异常激活的

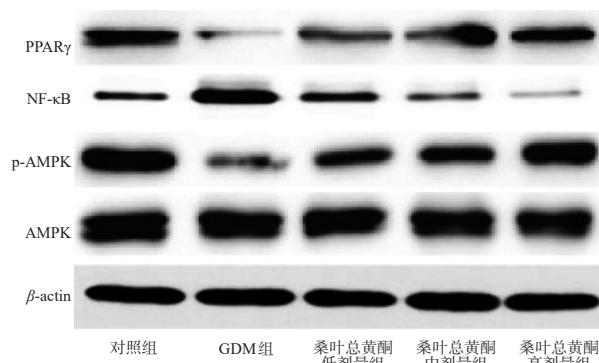


图1 各组大鼠胎盘组织中PPAR $\gamma$ 、NF- $\kappa$ B、AMPK、p-AMPK蛋白表达的电泳图

Fig 1 Electrophoregrams of protein expression of PPAR $\gamma$ , NF- $\kappa$ B, AMPK and p-AMPK in placenta tissue of rats in each groups

表6 各组大鼠胎盘中PPAR $\gamma$ 、NF- $\kappa$ B、p-AMPK蛋白表达量比较( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Tab 6 Comparison of protein expression of PPAR $\gamma$ , NF- $\kappa$ B and p-AMPK in placenta tissue of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	PPAR $\gamma$	NF- $\kappa$ B	p-AMPK
对照组	0.96 $\pm$ 0.13	0.47 $\pm$ 0.08	0.93 $\pm$ 0.14
GDM组	0.30 $\pm$ 0.07**	0.89 $\pm$ 0.13**	0.37 $\pm$ 0.05**
桑叶总黄酮低剂量组	0.48 $\pm$ 0.05*	0.64 $\pm$ 0.07**	0.58 $\pm$ 0.07**
桑叶总黄酮中剂量组	0.57 $\pm$ 0.07**	0.45 $\pm$ 0.06**	0.62 $\pm$ 0.06**
桑叶总黄酮高剂量组	0.73 $\pm$ 0.12**	0.33 $\pm$ 0.04**	0.84 $\pm$ 0.13**

注:与对照组比较,\*\* $P<0.01$ ;与GDM组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$

Note: vs. control group, \*\* $P<0.01$ ; vs. GDM group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$

影响,但具体机制仍未完全阐明<sup>[2]</sup>。临床上治疗GDM的主要方式包括生活方式干预和胰岛素注射,而口服降糖药由于存在潜在的致畸风险,故并不适用于GDM的治疗<sup>[11]</sup>。桑叶具有治疗消渴症的作用,桑叶总黄酮是该药材中主要的活性成分,可用于2型糖尿病的治疗,并可改善机体糖脂代谢,增加胰岛素敏感性,同时也具有抗炎和抗氧化的作用<sup>[6-7,12]</sup>。鉴于此,本研究初步考察了桑叶总黄酮对GDM模型大鼠糖脂代谢、炎症、氧化应激的影响。由于口服降糖药大多存在致畸风险,故本研究暂未设置阳性对照组。

本研究通过高脂饲料喂养及STZ腹腔注射的方式建立GDM大鼠模型。结果发现,GDM组大鼠FBG( $G_{3d}$ 、 $G_{7d}$ 、 $G_{18d}$ 时)以及TC、TG、LDL-C( $G_{18d}$ 时)水平均显著升高,这一结果与既往研究<sup>[3-4]</sup>基本一致。在给予桑叶总黄酮干预后,中、高剂量组大鼠FBG( $G_{3d}$ 、 $G_{7d}$ 、 $G_{18d}$ 时)以及TC、TG、LDL-C水平均显著降低,提示桑叶总黄酮可明显改善GDM模型大鼠的糖脂代谢。

虽然目前GDM的发病机制仍未完全阐明,但已有多项研究证实,母体炎症反应和氧化应激反应的过度激

活能够影响自身胰岛素信号的转导,引发胰岛素抵抗,继而导致糖脂代谢紊乱<sup>[13-15]</sup>。TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8是炎症反应中具有促炎作用的炎症细胞因子,可在炎症局部召集多种炎症细胞,并介导炎症反应级联放大,从而使多种炎症细胞因子呈瀑布式释放;与此同时,大量释放进入母体血液循环中的炎症细胞因子可进一步拮抗胰岛素的生物学作用,最终引发胰岛素抵抗<sup>[16-17]</sup>。此外,有研究指出,持续高胰岛素血症以及炎症反应的刺激能够使自由基生成增多,后者可造成全身多处脏器发生氧化应激损伤,进而产生脂质过氧化产物MDA并消耗抗氧化酶SOD、GSH、CAT<sup>[18-19]</sup>。本研究结果显示,GDM组大鼠血清中TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8、MDA水平均显著升高,而SOD、GSH、CAT水平均显著降低,提示GDM模型大鼠体内存在炎症反应和氧化应激因子的过度激活。桑叶总黄酮的抗炎和抗氧化作用已经在2型糖尿病模型大鼠中得以证实<sup>[12,20]</sup>。鉴于此,本研究使用桑叶总黄酮对GDM模型大鼠进行干预,以观察炎症和氧化应激反应相关因子的变化情况。结果显示,桑叶总黄酮各剂量组大鼠血清中TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8、MDA水平均显著降低,而SOD、GSH、CAT水平均显著升高,提示桑叶总黄酮具有一定的抗炎和抗氧化应激作用。

胎盘作为妊娠过程中的特殊器官,在GDM患者胰岛素抵抗的发生中具有重要作用;且胎盘娩出后,约超过50%的GDM患者的胰岛素抵抗明显减轻<sup>[21]</sup>。胎盘不仅具有母胎间物质交换的功能,同时还具有强大的内分泌作用,能够释放多种炎症细胞因子、自由基等进入母体血液循环并参与胰岛素抵抗的发生<sup>[21]</sup>。其中,PPAR $\gamma$ 是胎盘中物质代谢以及炎症反应、氧化应激反应的重要调节因子。一方面,其可通过抑制NF- $\kappa$ B的活化来减少炎症细胞因子的表达和释放,进而减轻炎症反应的程度<sup>[22-23]</sup>;另一方面,PPAR $\gamma$ 可通过促进下游AMPK的活化来增加多种抗氧化酶的表达,进而加快自由基的清除并减轻氧化应激反应<sup>[24]</sup>。有研究指出,胎盘中PPAR $\gamma$ 表达明显下调、联合使用PPAR $\gamma$ 激动药罗格列酮均与GDM模型大鼠糖脂代谢、炎症和氧化应激反应的改善密切相关<sup>[25]</sup>。本研究结果显示,GDM组大鼠胎盘组织中PPAR $\gamma$ 蛋白及mRNA、AMPK mRNA(mRNA检测无法区分总蛋白及磷酸化产物)以及p-AMPK蛋白的表达量均显著降低,NF- $\kappa$ B蛋白及mRNA的表达量均显著增加,提示GDM模型大鼠的PPAR $\gamma$ 途径受到了抑制,与相关研究的结果<sup>[9]</sup>一致。经桑叶总黄酮干预后,各给药组大鼠胎盘组织中PPAR $\gamma$ 蛋白及mRNA、AMPK mRNA以及p-AMPK蛋白的表达量均显著升高,NF- $\kappa$ B蛋白及mRNA的表达量均显著降低,提示桑叶总黄酮能够促进PPAR $\gamma$ 途径的激活,这可能是桑叶总黄酮发挥抗炎和抗氧化应激作用的可能机制之一。

综上所述,桑叶总黄酮对GDM模型大鼠的糖脂代谢、炎症和氧化应激均具有一定的改善作用,其机制可

能与激活PPAR $\gamma$ 途径有关。本研究首次阐明了桑叶总黄酮用于治疗GDM的价值,为该症的防治提供了新思路。本课题组后续将在应用桑叶总黄酮的基础上联合PPAR $\gamma$ 抑制剂,以进一步验证桑叶总黄酮通过激活PPAR $\gamma$ 途径来改善GDM的作用机制。

### 参考文献

- [1] LAW KP, ZHANG H. The pathogenesis and pathophysiology of gestational diabetes mellitus: deductions from a three-part longitudinal metabolomics study in China[J]. *Clin Chim Acta*, 2017. DOI:10.1016/j.cca.2017.02.008.
- [2] CHATUPHONPRASERT W, JARUKAMJORN K, ELLINGER I. Physiology and pathophysiology of steroid biosynthesis, transport and metabolism in the human placenta[J]. *Front Pharmacol*, 2018. DOI:10.3389/fphar.2018.01027.
- [3] WHITE SL, PASUPATHY D, SATTAR N, et al. Metabolic profiling of gestational diabetes in obese women during pregnancy[J]. *Diabetologia*, 2017, 60(10):1903–1912.
- [4] TASCHEREAU-CHARRON A, DA SILVA MS, BILODEAU JF, et al. Alterations of fatty acid profiles in gestational diabetes and influence of the diet[J]. *Maturitas*, 2017. DOI:10.1016/j.maturitas.2017.01.014.
- [5] SKÓRZYŃSKA-DZIDUSZKO KE, KIMBER-TROJNAR Ź, PATRO-MAŁYSZA J, et al. An interplay between obesity and inflammation in gestational diabetes mellitus[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2016, 17(7):603–613.
- [6] 孙鑫, 马志, 孟庆海, 等. 桑酮碱对2型糖尿病db/db小鼠血糖及肝脏胰岛素抵抗的影响[J]. *中成药*, 2017, 39(5):885–890.
- [7] 穆晓燕, 李李佳. 桑叶总黄酮对2型糖尿病大鼠胰岛B细胞的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(11):213–216.
- [8] GAO Y, SHE R, SHA W. Gestational diabetes mellitus is associated with decreased adipose and placenta peroxisome proliferator-activator receptor  $\gamma$  expression in a Chinese population[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(69):113928–113937.
- [9] KNABL J, HÜTTENBRENNER R, HUTTER S, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR $\gamma$ ) is down regulated in trophoblast cells of gestational diabetes mellitus (GDM) and in trophoblast tumour cells BeWo in vitro after stimulation with PPAR $\gamma$  agonists[J]. *J Perinat Med*, 2014, 42(2):179–187.
- [10] 汤梦雨, 徐文婷, 王彩红, 等. 高脂饲料联合链脲佐菌素诱导妊娠期糖尿病大鼠模型的优化方案[J]. *江苏大学学报(医学版)*, 2018, 28(5):393–396.
- [11] 中华医学会妇产科学分会产科学组, 中华医学会围产医学分会妊娠合并糖尿病协作组. 妊娠合并糖尿病诊治指南:2014[J]. *中华妇产科杂志*, 2014, 49(8):561–569.
- [12] 刘冬恋, 凌保东, 谭林, 等. 桑叶总黄酮对2型糖尿病大鼠肝脏过氧化物酶体增殖物激活受体 $\alpha$ 和腺苷酸活化蛋白激酶 $\alpha$ 2蛋白表达的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(22):5521–5523.
- [13] KHAMBULE L, GEORGE JA. The role of inflammation in the development of GDM and the use of markers of inflammation in GDM screening[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019. DOI:10.1007/978-3-030-12668-1-12.
- [14] JONES ML, BUHIMSCHI IA, ZHAO G, et al. Acute glucose load, inflammation, oxidative stress, nonenzymatic glycation, and screening for gestational diabetes[J]. *Reprod Sci*, 2019. DOI:10.1177/1933719119831772.
- [15] ZAMBON M, MANDÒ C, LISSONI A, et al. Inflammatory and oxidative responses in pregnancies with obesity and periodontal disease[J]. *Reprod Sci*, 2018. DOI:10.1177/1933719117749758.
- [16] SIWETZ M, BLASCHITZ A, El-Heliebi A, et al. TNF- $\alpha$  alters the inflammatory secretion profile of human first trimester placenta[J]. *Lab Invest*, 2016, 96(4):428–438.
- [17] KHOSROWBEYGI A, REZVANFAR MR, AHMADVAND H. Tumor necrosis factor- $\alpha$ , adiponectin and their ratio in gestational diabetes mellitus[J]. *Caspian J Intern Med*, 2018, 9(1):71–79.
- [18] ZHANG C, YANG Y, CHEN R, et al. Aberrant expression of oxidative stress related proteins affects the pregnancy outcome of gestational diabetes mellitus patients[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(1):269–279.
- [19] MAGED AM, TORKY H, FOUAD MA, et al. Role of antioxidants in gestational diabetes mellitus and relation to fetal outcome: a randomized controlled trial[J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2016, 29(24):4049–4054.
- [20] CAI S, SUN W, FAN Y, et al. Effect of mulberry leaf (Folium Mori) on insulin resistance via IRS-1/PI3K/Glut-4 signalling pathway in type 2 diabetes mellitus rats[J]. *Pharm Biol*, 2016, 54(11):2685–2691.
- [21] WEI J, LI X, GAO J. Insulin secretion and tolerance of women with different gestational glucose regulation one year postpartum[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(4):6384–6387.
- [22] ZHANG Y, HUANG X, ZHOU J, et al. PPAR $\gamma$  provides anti-inflammatory and protective effects in intrahepatic cholestasis of pregnancy through NF- $\kappa$ B pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 504(4):834–842.
- [23] PHAM J, ARUL NAMBI RAJAN K, LI P, et al. The role of Sirtuin1-PPAR $\gamma$  axis in placental development and function[J]. *J Mol Endocrinol*, 2018, 60(4):R201–R212.
- [24] KOHAN-GHADR HR, KILBURN BA, KADAM L, et al. Rosiglitazone augments antioxidant response in the human trophoblast and prevents apoptosis[J]. *Biol Reprod*, 2019, 100(2):479–494.
- [25] 徐梦, 马艳玲, 赵奇红, 等. PPAR $\gamma$ 激动剂对妊娠期糖尿病小鼠氧化应激和炎症水平的影响[J]. *中华疾病控制杂志*, 2018, 22(2):195–198.

(收稿日期:2019-06-21 修回日期:2020-01-06)

(编辑:张元媛)