

地骨皮醇提物对糖尿病模型大鼠的保护作用

彭红兵*(中国葛洲坝集团中心医院药剂科,湖北宜昌 443002)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)27-2513-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.27.06

摘要 目的:研究地骨皮醇提物对糖尿病模型大鼠的保护作用。方法:高脂饲料喂养4周后腹腔注射链脲佐菌素以复制大鼠糖尿病模型。50只SD大鼠随机均分为正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组与地骨皮醇提物高、中、低剂量(40、20、10 g/kg)组,灌胃给药,每天1次,连续4周。测定超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、一氧化氮(NO)水平,观察大鼠主动脉血管形态学,实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)法测定诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)mRNA的表达。结果:与正常对照组比较,模型组大鼠SOD活性减弱,NO含量减少,MDA含量增加,ALT、AST活性增强,eNOS mRNA表达减弱,iNOS mRNA表达增强,差异有统计学意义($P<0.01$);大鼠主动脉血管形态学呈病理状态。与模型组比较,地骨皮醇提物高、中剂量组大鼠SOD活性增强,NO含量增加,MDA含量减少,ALT、AST活性减弱,iNOS mRNA表达减弱,eNOS mRNA表达增强,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$);大鼠主动脉血管形态学病理状态得到一定改善。结论:地骨皮醇提物对糖尿病模型大鼠有一定保护作用。

关键词 地骨皮;糖尿病;大鼠;丙氨酸氨基转移酶;天冬氨酸氨基转移酶;一氧化氮

Protective Effects of Lycii Cortex Ethanol Extract on Diabetic Model Rats

PENG Hong-bing(Dept. of Pharmacy, Central Hospital of China Gezhouba (Group) Corporation, Hubei Yichang 443002, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the protective effect of Lycii Cortex ethanol extract on diabetic model rats. METHODS: The diabetic rat model was established by intraperitoneal injection of STZ after 4 weeks of high fat diet. 50 SD rats were randomly divided into normal control group (constant volume normal saline), model group (constant volume normal saline) and ethanol extract of Lycii Cortex ethanol extract high-dose, medium-dose and low-dose groups(40, 20, 10 g/kg). They were given medicine intragastrically once a day for consecutive 4 weeks. The levels of SOD, MDA, ALT, AST and NOs were determined, and aortic vascular morphology of rats was observed. mRNA expression of iNOS, and eNOS gene were determined by RT-PCR. RESULTS: Compared with normal control group, the levels of SOD, NO level and mRNA expression of eNOS gene were decreased in model group, while MDA content, ALT, AST level and mRNA expression of iNOS gene were increased; aortic vascular morphology of rats was normal. Compared with model group, the levels of SOD and NO, mRNA expression of eNOS gene were increased in ethanol extract of Cortex Lycii high-dose and medium-dose groups, while MDA content, the levels of ALT and AST, mRNA expression of iNOS gene were decreased; aortic vascular morphology of rats was improved to some extent. CONCLUSIONS: Lycii Cortex ethanol extract has protective effect on diabetic rats.

KEYWORDS Lycii Cortex; Diabetes; Rats; ALT; AST; NO

地骨皮为茄科植物枸杞 *Lycium chinense* Mill. 或宁夏枸杞 *L. barbarum* L. 的干燥根皮。味甘、寒,归肺、肝、肾经,具有凉血除蒸、清肺降火之功效,用于阴虚潮热、骨蒸盗汗、肺热咳嗽、咯血、衄血等方面的治疗^[1]。现代药理研究表明,地骨皮具有降血压、抑菌、抗病毒、解热镇痛、增强免疫等药理活性^[2-5]。临床多用于治疗牙痛、疮疡、功能性低热、慢性荨麻疹、原疹、过敏性紫癜、高血压等,用于治疗糖尿病多以组方形式出现。但是,其是否具有独立改善糖尿病病理状态的作用还未可知。本研究以糖尿病模型大鼠为观察对象,验证地骨皮的药理作用,以为其组方治疗糖尿病提供依据。

1 材料

1.1 仪器

2100型分光光度计[尤尼柯(上海)仪器有限公司];

* 主管药师。研究方向:中药药理学。E-mail: 1153697299@qq.com

HT7700型透射电子显微镜(日本日立公司);实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)检测仪(德国Sigma公司)。

1.2 药材

地骨皮由中国葛洲坝集团中心医院药剂科提供,经笔者鉴定为真品。

1.3 药品与试剂

链脲佐菌素(STZ,美国Calbiochem公司);超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、一氧化氮(NO)、一氧化氮合酶(NOS)测试盒(南京建成生物工程研究所)。

1.4 动物

清洁级SD大鼠,♂,体质量200~220 g,由三峡大学实验动物中心提供[实验动物使用许可证号:SCXK(鄂)2011-0012]。

2 方法

2.1 地骨皮醇提物的提取^[6]

10倍量乙醇(70%)回流提取,每次1h,提取3次,综合3次提取液,得地骨皮醇提物,质量浓度为3g/ml。

2.2 模型的复制

大鼠高脂饲料(含5%蛋黄粉、10%猪油、2%胆固醇、0.2%胆酸钠、20%白糖、62.8%基础饲料猪油)喂养4周后ip STZ(40mg/kg),筛选40只空腹血糖 ≥ 7 mmol/L者为糖尿病成功模型进行实验。正常对照大鼠喂饲普通饲料。

2.3 分组与给药

40只模型大鼠随机均分为4组,即模型(等容生理盐水)组与地骨皮醇提物高、中、低剂量(40、20、10g/kg)组,另设10只正常SD大鼠为正常对照(等容生理盐水)组。ig给药,每天1次,连续4周。

2.4 大鼠血液生化指标的测定

大鼠颈动脉取血4ml,常规分离血清,按测试盒方法测定SOD、MDA、ALT、AST、NO水平。

2.5 胸主动脉血管形态学观察

取血后,取出大鼠同一部位胸主动脉置戊二醛(2.5%)内固定,饿酸(1%)后固定,Epon812包埋,制成70nm切片,醋酸铀-柠檬酸铅双重染色,透射电镜观察。

2.6 PCR法检测诱导型NOS(iNOS)、内皮型NOS(eNOS)mRNA的表达

取大鼠主动脉匀浆,Trizol法提取总RNA,逆转录合成cDNA,取逆转录产物进行PCR循环。引物序列:eNOS(Genbank:AJ01116)上游:5'-TTCCGGCTGCCACCTGATCCT-AA-3',下游:5'-AACATGTGCTCTTGCTCGAGGCA-3',预扩增片段长度:341bp;iNOS(GenbankD:12520)上游:5'-GATCAATAACCTGAAGCCCG-3',下游:5'-GCCCTTTTTTGCTC-CATAGG-3',预扩增片段长度:578bp;磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH, Genbank: M16228)上游:5'-CTGAACCCTGTCTCTCTGCG-3',下游:5'-CTCGCCATAACAACACCAAG-3',预扩增片段长度:200bp。扩增程序分别为:eNOS mRNA:94℃3min预变性;94℃45s,58℃1min,72℃1min,循环35次;72℃延伸7min。iNOS mRNA:94℃3min预变性;94℃45s,50℃1min,72℃1min,循环36次;72℃延伸7min。GAPDH:94℃3min预变性;94℃45s,50℃1min,72℃1min,循环25次;72℃延伸7min。反应结束后,分析各组的基因和GAPDH的光密度值,以两者的比值作为目的基因的表达量。

3 结果

3.1 地骨皮醇提物对模型大鼠SOD、MDA、NO水平的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠SOD活性减弱,NO含量减少,MDA含量增加,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,地骨皮醇提物高、中剂量组大鼠SOD活性增强,NO含量增加,MDA含量减少,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。地骨皮醇提物对模型大鼠SOD、MDA、NO水平的影响见表1。

表1 地骨皮醇提物对模型大鼠SOD、MDA、NO水平的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Effects of Lycii Cortex ethanol extract on the levels of SOD, MDA and NO in model rats($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量,g/kg	n	SOD,U/ml	MDA, μ mol/L	NO,mmol/L
正常对照组		10	139.4 \pm 20.6	4.32 \pm 0.75	57.5 \pm 6.7
模型组		10	56.5 \pm 18.7*	9.86 \pm 2.41*	29.3 \pm 7.6*
地骨皮醇提物高剂量组	40	10	80.2 \pm 19.6**	4.98 \pm 1.47**	45.2 \pm 5.4**
地骨皮醇提物中剂量组	20	10	74.8 \pm 20.1*	6.21 \pm 1.88*	37.3 \pm 6.8*
地骨皮醇提物低剂量组	10	10	65.4 \pm 24.3	7.85 \pm 2.53	40.6 \pm 7.1

与正常对照组比较:* $P<0.01$;与模型组比较:** $P<0.05$,*** $P<0.01$
vs.normal control group: * $P<0.01$;vs.model group: ** $P<0.05$,*** $P<0.01$

3.2 地骨皮醇提物对模型大鼠ALT、AST活性的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠ALT、AST活性增强,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,地骨皮醇提物高、中剂量组大鼠ALT、AST活性减弱,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。地骨皮醇提物对模型大鼠ALT、AST活性的影响见表2。

表2 地骨皮醇提物对模型大鼠ALT、AST活性的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Effects of Lycii Cortex ethanol extract on the activities of ALT and AST in model rats($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量,g/kg	n	ALT,U/L	AST,U/L
正常对照组		10	47.5 \pm 2.6	94.7 \pm 3.2
模型组		10	94.6 \pm 5.3*	138.5 \pm 6.4*
地骨皮醇提物高剂量组	40	10	72.4 \pm 4.8*	108.3 \pm 4.1*
地骨皮醇提物中剂量组	20	10	80.3 \pm 5.1*	124.9 \pm 5.4*
地骨皮醇提物低剂量组	10	10	91.4 \pm 5.5	130.2 \pm 5.8

与正常对照组比较:* $P<0.01$;与模型组比较:** $P<0.05$
vs.normal control group: * $P<0.01$;vs.model group: ** $P<0.05$

3.3 地骨皮醇提物对模型大鼠胸主动脉血管形态学的影响

正常对照组大鼠胸主动脉内膜表面平滑,内皮细胞多扁平,可见细胞核,染色质较均匀;内皮细胞下有薄的疏松结缔组织,含少量胶原纤维、弹力纤维;内膜中的内弹力膜连续、完整,较平滑、略呈波浪形;中膜中的数层弹性膜连续、无断裂,近平行排列,层次清晰;平滑肌细胞呈单层排列,几层细胞间平行排列较规则,核多见;弹性膜与平滑肌细胞层间可见一些簇状分布的胶原纤维。模型组大鼠胸主动脉内膜表面可见多个内皮细胞局部胞质向血管腔突起,核不规则,异染色质大多聚集于核膜下,部分核孔扩张,核仁偶见;可见内皮细胞肿胀,广泛空泡变性,甚至坏死脱落;内皮细胞下疏松结缔组织中见一些胶原纤维;内弹力膜较薄或厚薄不一,部分区域断裂、缺失;中膜中的弹力膜缺失较多,或厚薄不均、层次不明;平滑肌细胞层,宽窄不一,排列较不平行,常见多支性平滑肌细胞。弹性膜与平滑肌细胞层间胶原纤维增多,呈纤维化。地骨皮醇提物高、中剂量组大鼠胸主动脉内膜表面较平滑,未见明显突起,内皮细胞扁平,有较少轻度空泡,可见细胞核,细胞紧贴下方含有少量胶原纤维的薄层疏松结缔组织;内膜中的内弹力膜连续、无断裂,较平滑而略有起伏;中膜中

的几层弹性膜连续,厚薄接近,近平行排列,层次较清晰分明;管腔侧的平滑肌细胞层连续、较完整;弹性膜与平滑肌细胞层见少量簇状分布的胶原原纤维;其中地骨皮醇提取物高剂量组改善状况最好。

3.4 地骨皮醇提取物对模型大鼠 iNOS、eNOS mRNA 表达的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠 iNOS mRNA 表达增强, eNOS mRNA 表达减弱,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,地骨皮醇提取物高、中剂量组大鼠 iNOS mRNA 表达减弱, eNOS mRNA 表达增强,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。地骨皮醇提取物对模型大鼠 iNOS、eNOS mRNA 表达的影响见表 3。

表 3 地骨皮醇提取物对模型大鼠 iNOS、eNOS mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Effects of Lycii Cortex ethanol extract on mRNA expression of iNOS and eNOS in model rats($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量, g/kg	n	iNOS	eNOS
正常对照组		10	0.23 ± 0.08	0.94 ± 0.07
模型组		10	0.84 ± 0.19*	0.37 ± 0.16*
地骨皮醇提取物高剂量组	40	10	0.42 ± 0.13**	0.78 ± 0.12**
地骨皮醇提取物中剂量组	20	10	0.65 ± 0.17*	0.62 ± 0.15*
地骨皮醇提取物低剂量组	10	10	0.76 ± 0.19	0.85 ± 0.22

与正常对照组比较: * $P < 0.01$; 与模型组比较: ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$
vs. normal control group: * $P < 0.01$; vs. model group: ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

4 讨论

SOD 是一种内生性氧自由基清除剂,是机体免受氧自由基损害的主要防御酶。MDA 可直接反映体内自由基多少、脂质过氧化程度并间接反映细胞损伤的程度。NO 主要由内皮细胞产生,在维持血管内皮功能方面有重要作用。目前认为糖尿病血管病变与内皮功能受损密切相关,NO 在其中起重要作用^[7]。本研究中,高、中剂量地骨皮醇提取物可增强糖尿病模型大鼠 SOD 活性,增加 NO 含量,减少 MDA 含量,对体内抗氧化系统有促进作用。

近年来的研究表明,ALT 和 AST 可代表肝细胞损害程度^[8]。本研究中,高、中剂量地骨皮醇提取物可降低糖尿病模型大鼠 ALT 和 AST 活性,对肝脏起到一定保护作用。

高血糖状态下氧自由基、干扰素和肿瘤坏死因子等产生增多,可刺激 iNOS 基因过度表达,导致 NO 合成亢进^[9]。过高

的 NO 作为氧自由基发挥细胞毒作用,对血管内皮造成严重危害。iNOS 和 eNOS 基因表达的失衡,参与了糖尿病动脉内皮病变的发生发展^[10]。本研究中,高、中剂量地骨皮醇提取物可降低糖尿病模型大鼠 iNOS 过度表达,增强 eNOS 表达,对维持动脉血管内皮平衡起到一定作用。

本研究表明,地骨皮醇提取物可通过增强 SOD 活性,增加 NO 含量,减少 MDA 含量,减弱 ALT、AST 活性,减弱 iNOS mRNA 表达,增强 eNOS mRNA 表达,对糖尿病模型大鼠起到保护作用。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 115.
- [2] 付建峰, 曹红卫, 龙宇鹏, 等. 地骨皮提取物 CL-5 拮抗内毒素的实验研究[J]. 创伤外科杂志, 2008, 10(3): 260.
- [3] 李志勇, 刘洪超, 周凤琴. 地骨皮治疗小鼠皮肤烫伤的药效学研究[J]. 中药材, 2011, 34(8): 1 266.
- [4] 赵新泉. 单味地骨皮饮治疗功能性发热[J]. 医学创新研究, 2007, 4(23): 30.
- [5] 王迎昌, 叶真. 地骨皮提取液对 H₂O₂ 诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡的影响[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(7): 1 405.
- [6] 曾向总, 赵琳. 中药地骨皮有效部位提取工艺研究[J]. 辽宁中医杂志, 2007, 34(12): 1 778.
- [7] Xu B, Chibber R, Ruggiero D, et al. Impairment of vascular endothelial nitric oxide synthase activity by advanced glycation and products[J]. *FASEB J*, 2003, 17(10): 1 289.
- [8] Nakanishi N, Suzuki K, Tatara K. Serum - glutamyl transferase and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes in middle-aged Japanese men[J]. *Diabetes Care*, 2004, 27(4): 1 427.
- [9] 郑建普, 卞卡, 可燕. Murad Ferid1 内皮型一氧化氮合酶脱偶联的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(6): 659.
- [10] 王珊, 江俊麟, 贾素洁, 等. 罗格列酮对糖尿病大鼠血管内皮损伤的保护作用与一氧化氮合酶抑制物的关系[J]. 中南药学, 2005, 3(3): 131.

(收稿日期: 2014-03-18 修回日期: 2014-05-30)

国家卫生和计划生育委员会主任李斌赴安徽调研医改工作

本刊讯 国家卫生和计划生育委员会主任李斌一行于 2014 年 6 月 8—10 日赴安徽省调研医改工作, 先后实地考察了马鞍山市人民医院、雨山区佳山社区卫生服务中心, 芜湖市第二人民医院、六郎镇卫生院、肥东县人民医院和安徽医科大学第一附属医院, 每到一处都认真听取医务人员对深化医改的意见和建议, 与患者进行亲切交流, 仔细询问患者看病费用和就医感受。调研期间, 李斌召开了 3 次医改座谈会, 听取了安徽省深化医药卫生体制改革全省试点情况的汇报, 并与地方政府、相关部门负责人, 公立医院院长, 医务人员代表等进行深入交流讨论, 广泛听取对公立医院改革的意见、建议。

李斌充分肯定了安徽省医改工作取得的显著成绩。她强调, 2014 年是深化医改的关键一年, 各地、各有关部门要把公立医院改革作为重中之重, 坚持保基本、强基层、建机制, 按照“三医联动、上下联动、内外联动、区域联动”的要求, 着力推动“完善医疗卫生服务体系规划, 破除以药补医、建立科学补偿机制, 构建分级诊疗制度, 建立符合行业特点的人事薪酬制度, 改革医保支付制度, 积极推进社会办医”等方面改革取得突破; 同时, 扎实有序做好单独两孩政策、机构改革、基本公共卫生服务均等化、加强卫生信息化以及夏季传染病防治等工作。