DOI:10.3969/j. issn. 1000-9760. 2017. 04. 009

侧柏叶水煎液对糖尿病模型小鼠的治疗作用及作用机制探讨*

李　丽[1]　刘文彦[2]　王　青[3]

([1] 济宁医学院药学院,日照 276826;[2] 济宁医学院基础医学院,济宁 272067;[3] 日照市人民医院,日照 276826)

摘　要　目的　探讨侧柏叶水煎液对糖尿病模型小鼠的治疗作用及其机制。**方法**　健康成年昆明种小鼠随机分为正常对照组、糖尿病模型组和侧柏叶组。分别记录体重、饮水量、摄食量和粪尿量,血糖仪测定空腹血糖、ELISA 法测定血胰岛素水平、羟胺法和 TBA 法分别测定血清超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)的含量,并作肝脏病理形态学观察。**结果**　与正常对照组相比,糖尿病模型组灌胃 2 周生理盐水后体重明显减轻,饮水量、摄食量和粪尿量明显增加($P<0.05$)。与糖尿病模型对照组相比,小鼠灌胃 2 周侧柏叶水煎液后侧柏叶组体重明显升高,饮水量、摄食量和粪尿量明显降低($P<0.05$)。与正常对照组相比,糖尿病模型对照组灌胃 2 周生理盐水后空腹血糖、血胰岛素水平、胰岛素抵抗系数、血清 MDA 水平明显升高,血清 SOD 含量明显降低($P<0.05$),肝脏脂肪变性明显,但与糖尿病模型组相比,侧柏叶组空腹血糖、血胰岛素水平、胰岛素抵抗系数、血清 MDA 水平明显降低($P<0.05$),血清 SOD 水平明显升高($P<0.05$),肝脏脂肪变性程度明显减轻。**结论**　侧柏叶水煎液能明显减轻糖尿病小鼠的“三多一少”的症状,对糖尿病有一定的治疗作用,其机制与其抗氧化、降低胰岛素抵抗有关。

关键词　侧柏叶;糖尿病;治疗作用;抗氧化应激

中图分类号:R743.3　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1000-9760(2017)08-271-04

The therapeutic action of water decoction of platycladus orientalis on diabetes in mice and its related mechanism

LI Li, LIU Wenyan, WANG Qing

([1] *School of Pharmacy, Jining Medical University, Rizhao* 276826, *China*;

[2] *School of Basic Medicine, Jining Medical University, Jining* 272067, *China*;

[3] *People's Hospital of Rizhao, Rizhao* 276826, *China*)

Abstract: ***Objective***　To study the therapeutic action of water decoction of platycladus orientalis on diabetes in mice and its related mechanism. ***Methods***　Healthy adult Kunming mice were divided randomly into normal control group, diabetes model control group and platycladus orientalis group. In the mice of each group, the weight, amount of water intake, food intake, and excrement were recorded during study and the shape of hepatocytes was observed by HE staining. Fasting blood glucose (FBG) was measured by glucometer. Fasting blood insulin (FINS) was measured by ELISA method. The hydroxylamine method and TBA method were used respectively to measure the blood content of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA), respectively. ***Results***　Compared with normal control group, The weight of diabetes control group was lost obviously after gavage of normal saline for 2 weeks ($P<0.05$), and the amount of water intake, food intake and excrement were increased evidently ($P<0.05$). Compared to the diabetes model control group, the weight of platycladus orientalis group was increased obviously ($P<0.05$), and the amount of water intake, food intake and excrement were decreased evidently ($P<0.05$). Compared with the normal control group, FBG, FINS, insulin resistance index and blood MDA content of diabetes model control group

* [基金项目]济宁市科技局项目(2014jnyx02)

were increased evidently ($P<0.05$). The blood content of SOD was decreased obviously ($P<0.05$), and the liver fat degeneration occurred obviously. Compared with the diabetes model control group, FBG, FINS, insulin resistance index and blood MDA content of platycladus orientalis group were decreased evidently ($P<0.05$), and the blood content of SOD was increased apparently ($P<0.05$). The degree of liver fat degeneration was remitted evidently. ***Conclusion*** The water decoction of platycladus orientalis remitted the symptoms of "three polys and one little" obviously caused by diabetes. So it has therapeutic action to diabetes in mice and its mechanism may be related to its anti-oxidative stress and reducing the insulin resistance.

Keywords: Water decoction of platycladus orientalis; Diabetes; Therapeutic action; Anti-oxidative stress

糖尿病是以高血糖为特征的慢性代谢性疾病[1]。2012 年，Banting 奖获得者 Corkey 提出：在糖尿病管理中，抗氧化应激治疗是改善患者近、远期转归的重要方面之一，是糖尿病治疗中必须考虑的问题[2]。因此，寻找一种既能抗氧化又能降血糖的药物对糖尿病的治疗具有重要意义。研究表明，侧柏叶黄酮类、萜类化合物及挥发油均具有较强的抗氧化活性[3-4]。侧柏叶中黄酮类成分对 α-葡萄糖苷酶有明显的抑制作用[5]，从而降低餐后血糖。上述结果提示：侧柏叶既能抗氧化，又能降血糖。因此我们推测侧柏叶水煎液应是治疗糖尿病的理想药物。

目前有关侧柏叶对糖尿病治疗作用的研究鲜有报道。本文以体重、饮水量、摄食量和粪尿量、空腹血糖（fasting blood glucose, FBG）、空腹血胰岛素（fasting blood insulin, FINS）水平、胰岛素抵抗系数、肝细胞形态、血清超氧化物歧化酶（superoxide dismutase, SOD）和丙二醛（malondialdehyde, MDA）含量为指标，探讨侧柏叶水煎液对糖尿病模型小鼠的治疗作用及其作用机制。

1　材料与方法

1.1　实验动物

健康成年昆明种小鼠，体重 21g ±，雌雄不限。由山东大学实验动物中心提供。

1.2　主要试剂

侧柏叶取自济宁医学院日照校区本草园，除枝干，留针尖叶。丙基硫氧嘧啶（购自精华制药集团股份有限公司。批号：31131202）；链脲佐菌素（购自大连美仑生物技术有限公司。批号：18883-66-4）。血糖仪购自三诺生物传感股份有限公司。SOD（批号：GD-G12115）、MDA（批号：GD-S3119-J）、胰岛素（批号：GD-JX2123）试剂盒由上海古朵生物科技有限公司提供。

1.3　动物分组

适应性喂养小鼠 3d 后，随机抽取 8 只作为正常对照组，并给予基础饲料喂养。其余小鼠在接受基础饲料喂养的同时，于每日 8Am 灌胃脂肪乳剂[6]（0.2ml/10g）1 次，连续 4 周。然后禁食、不禁水 12h，腹腔注射 1% 链脲佐菌素溶液（130mg/kg）。正常对照组小鼠则注射等体积的柠檬酸缓冲溶液。注射 5d 后，禁食、不禁水 6h，测随机血糖，若血糖值≥11.1mmol/L，表明糖尿病小鼠模型制备成功。血糖值 <11.1mmol/L 小鼠不作为入选对象，造模成功率为 72%。将建模成功鼠随机分为糖尿病模型组和侧柏叶组各 8 只。3 组小鼠分别每日 8Am 灌胃 1 次，糖尿病模型对照组和正常对照组灌胃生理盐水，侧柏叶组则灌胃等体积的侧柏叶水煎液（50mg/kg），连续 2 周。

1.4　观察指标

1.4.1　体重、饮水量、摄食量和粪尿量　将 3 组小鼠编号后分盒饲养，每日更换干净垫料，分别记录体重、饮水量、摄食量和粪尿量。

1.4.2　FBG、FINS 和胰岛素抵抗系数　3 组小鼠灌胃 2 周后，禁食 6h，用血糖仪测定 FBG。眼球取血法取血约 0.5ml，待血液自然凝固，3000r/min 离心 15min，取上清，用 Elisa 法测定 FINS 含量。并运用稳态模型（HOMA）计算胰岛素抵抗（insulin resistance, IR）系数。HOMA-IR = FBG × FINS / 22.5，HOMA-IR 值越大表明胰岛素抵抗越强。

1.4.3　血清 SOD 和 MDA 含量　采用上述相似步骤，分别应用羟胺法和 TBA 法，按照试剂盒要求测定血清 SOD 和 MDA 含量。

1.4.4　肝细胞形态学观察　将各组小鼠处死后，采集肝脏，置于 4% 的中性甲醛溶液中固定。依次将标本冲洗、脱水透明、石蜡包埋、切片、HE 染色。行病理形态学观察。

1.5　统计学方法

所有统计数据均由 SPSS17.0 分析软件完成。

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，计量资料符合正态分布，组间比较采用方差分析，两两比较采用 LSD-t 检验，以 $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组小鼠体重、饮水量、摄食量和粪尿量比较

与正常对照组相比，糖尿病模型组体重明显减轻，饮水量、摄食量和粪尿量明显增加（$P<0.05$）。与糖尿病模型组相比，侧柏叶组体重明显升高，饮水量、摄食量和粪尿量明显降低（$P<0.05$），提示侧柏叶能明显减轻糖尿病模型小鼠的“三多一少”的症状。见表 1。

表 1 3 组小鼠体重、饮水量、摄食量和粪尿量比较（$n=8, \bar{x} \pm s$）

组别	体重(g)	摄水量(ml)	摄食量(g)	粪尿量(g)
正常对照组	24.75 ± 3.41	4.22 ± 0.47	5.66 ± 0.47	4.26 ± 0.31
糖尿病模型组	15.25 ± 3.09*	5.46 ± 0.38*	6.49 ± 0.44*	5.61 ± 0.25*
侧柏叶组	21.47 ± 3.02#	4.65 ± 0.25#	5.85 ± 0.43#	4.55 ± 0.26#
F 值	16.04	5.23	4.77	5.65
P	<0.01	<0.05	<0.05	<0.05

与正常对照组相比，* $P<0.05$；与糖尿病模型组相比，# $P<0.05$

2.2 3 组小鼠 FBG、FINS 和胰岛素抵抗系数比较

与正常对照组相比，糖尿病模型组 FBG、FINS 和胰岛素抵抗系数均明显升高（$P<0.05$）。侧柏叶组上述各指标均明显低于糖尿病模型组（$P<0.05$）。提示本模型所致的血糖升高主要是由胰岛素抵抗引起，而侧柏叶能明显减轻胰岛素抵抗而发挥降糖作用。见表 2。

表 2 3 组小鼠 FBG、FINS 和胰岛素抵抗系数比较（$n=8, \bar{x} \pm s$）

组别	FBG(mmol/L)	FINS(mIU/L)	胰岛素抵抗系数
正常对照组	3.76 ± 0.99	14.72 ± 4.17	2.38 ± 0.59
糖尿病模型组	17.76 ± 2.17*	28.13 ± 4.29*	20.64 ± 9.21*
侧柏叶组	8.77 ± 1.85#	19.16 ± 3.73#	10.56 ± 4.58#
F 值	22.78	16.44	44.79
P	<0.01	<0.01	<0.01

与正常对照组相比，* $P<0.05$；与模型对照组相比，# $P<0.05$

2.3 3 组小鼠血清 SOD 和 MDA 测定结果比较

与正常对照组相比，糖尿病模型组血清 SOD 水平明显降低（$P<0.05$），MDA 水平明显升高（$P<0.05$）。与糖尿病模型组相比，侧柏叶组血清 SOD 水平明显升高（$P<0.05$），血清 MDA 水平明显降低（$P<0.05$）。提示侧柏叶有明显的抗氧化作用。见表 3。

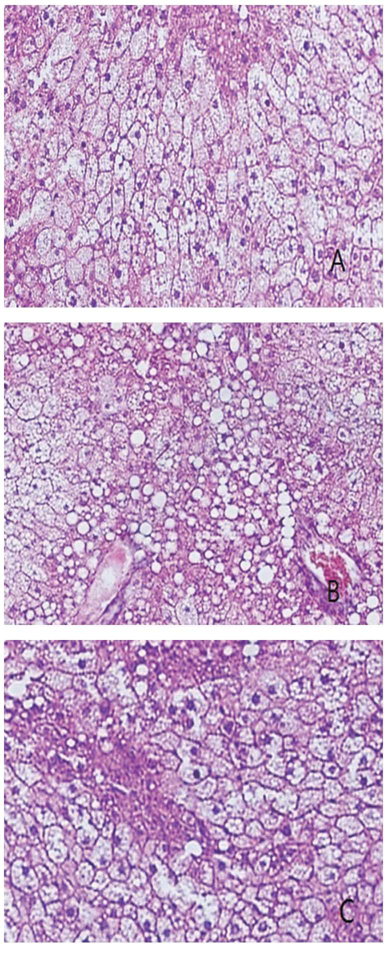
表 3 3 组小鼠血 SOD 和 MDA 结果比较（$n=8, \bar{x} \pm s$）

组别	SOD(u/ml)	MDA(nmol/ml)
正常对照组	307.58 ± 33.29	6.44 ± 1.55
糖尿病模型组	271.33 ± 24.66*	11.13 ± 1.62*
侧柏叶组	304.33 ± 24.57#	8.61 ± 1.44#
F 值	7.55	13.26
P	<0.01	<0.01

与正常对照组相比，* $P<0.05$；与糖尿病模型组相比，# $P<0.05$

2.4 肝细胞形态学观察

结果显示，糖尿病模型组肝性胞内脂肪空泡明显增加，且有少量炎细胞浸润，呈现脂肪变性。而侧柏叶组肝细胞内脂肪空泡明显减少，也少见炎细胞浸润。见图 1。



A. 正常对照组；B. 糖尿病模型组；C. 侧柏叶组

图 1 各组小鼠肝组织 HE 染色结果（×200）

3　讨论

糖尿病是一种常见的慢性疾病。目前,我国糖尿病患者总数已超过 9000 万,且近年来其发病率有逐年上升的趋势[7],因此寻求安全有效的治疗糖尿病的药物具有重要意义。本文结果显示,侧柏叶水煎液能明显减轻糖尿病模型小鼠“三多一少”的症状,降低其空腹血糖,减轻肝组织的脂肪变性,提示侧柏叶水煎液对糖尿病模型小鼠具有确切的治疗作用。

目前认为糖尿病的发病原因与氧化应激有关,在本研究中侧柏叶能明显提高血清 SOD 水平,降低血清 MDA 水平,提示侧柏叶具有明显的抗氧化作用。丁航等[8]研究表明,侧柏叶中的黄酮能明显抑制 H2O2 诱发的 RBC 溶血,且溶血度和丙二醛含量均下降,提示侧柏叶中的黄酮有较好的体外抗氧化作用。顾君等[9]研究发现,侧柏叶的醇提取液也有较强的体外抗氧化活性,且其活性明显大于乙酸乙酯部位,提示侧柏叶的多种成分都具有抗氧化作用。研究表明,氧化应激和胰岛素抵抗之间有明显的相关性,氧化应激的代谢产物-细胞内活性氧族(ROS)可通过激活 JNK/SAPK、P38MAPK、NF-κB 等通路,阻断胰岛素信号传导通路,引起胰岛素抵抗[10]。本文结果显示,糖尿病模型小鼠血糖明显升高,但血胰岛素水平也明显升高,提示本模型虽用 STZ 损伤了部分胰岛细胞,但血糖升高主要是由胰岛素抵抗所引起。侧柏叶能降低糖尿病模型小鼠血胰岛素水平、降低胰岛素抵抗系数,提示侧柏叶可能通过抗氧化来减轻胰岛素抵抗,从而发挥治疗糖尿病的作用。

综上所述,侧柏叶既能缓解糖尿病模型小鼠的症状,又能降低血糖,还能抗氧化,改善胰岛素抵抗,故对糖尿病具有较好的治疗作用,因此,本研究为糖尿病的临床治疗提供了更为广阔的思路和应用前景。然而侧柏水煎液是多种有效成分的混合物,未来我们可以致力于提取分离侧柏叶中对糖尿病具有治疗作用的有效成分,同时可对侧柏叶治疗糖尿病的机制做更为深入的研究。

参考文献:

[1] 袁晓丹,楼青青,张丹毓,等.糖尿病个案管理模式的研究进展[J].中华护理杂志,2013,(1):84-86.

[2] CORKEY BE. Banting lecture 2011: hyperinsulinemia: cause or consequence[J]. Diabetes, 2012, 61(1): 4-13. DOI:10.2337/db11-1483.

[3] 陈兴芬,单承莺,马世宏,等.侧柏叶化学成分、生理活性及防脱发功能研究进展[J].中国野生植物资源,2010,29(3):1-5. DOI:10.3969/j.issn.1006-9690.2010.03.001.

[4] 潘宪伟,赵余庆.侧柏叶和果实中黄酮类和萜类物质的现代药学研究进展[J].中草药,2012,43(8):1641-1646.

[5] 王莲萍.侧柏叶黄酮的提取分离及其对α-葡萄糖苷酶的抑制作用[D].长春:吉林农业大学,2012.

[6] 刘明,董超仁,苏静怡.一种简便实用的大鼠高脂血症模型[J].中国药理学通报,1989,5(2):119-121.

[7] 安琳.糖尿病个案管理模式的研究进展[J].检验医学,2016,31:215-216.

[8] 丁航,刘慧明,梁统,等.侧柏叶中黄酮类化合物对H2O2诱导的人红细胞氧化作用的影响[J].实用临床医学,2003,4(3):23-24. DOI:10.3969/j.issn.1009-8194.2003.03.010.

[9] 顾君,孙怡.侧柏叶不同提取部位抑制胰脂肪酶及抗氧化活性筛选[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(14):141-144.

[10] 刘颐轩,宋桉,王芸,等.氧化应激在肥胖及胰岛素抵抗中的作用研究进展[J].解放军医药杂志,2014,26(1):99-101. DOI:10.3969/j.issn.2095-140X.2014.01.030.

(收稿日期　2017-05-15)
(本文编辑:林琳)