

山茱萸联合番石榴叶提取物对小鼠 2 型糖尿病的抗氧化应激治疗机制研究

刘芸毓 牛新凯 宋 侨 陈语捷 朱思雅 张 杰*

长沙医学院 湖南长沙 410219

【摘要】目的：研究山茱萸与番石榴叶提取物联用对小鼠 2 型糖尿病的治疗机制。方法：选择 35 只 8 周龄 SPF 级 ICR 雄性小鼠，体质量 22~25 g，随机分为 3 组，空白对照组、2 型高血糖组、联合用药组。空白组 5 只，其余每组 15 只，除空白组外其余小鼠用高糖高脂饲料喂养一个月，一个月后禁食不禁水 12 h，连续注射 STZ 溶液（100~200mg·kg⁻¹）一周建立 2 型高血糖模型。山茱萸浓缩提取物与番石榴叶提取物按 20g/kg 剂量溶于生理盐水中，采取灌胃给药每日一次持续 4w，空白对照组与 2 型高血糖组采用灌胃给药注射同等容积的生理盐水 4w。记录小鼠一般体征，体重改变，血糖波动，糖耐量变化等情况。结果：与 2 型高血糖组比较，联合用药组小鼠一般体征显著改善，血糖明显降低（ $P < 0.05$ ），糖耐量明显改善（ $P < 0.05$ ），数据具有统计学意义。结论：山茱萸与番石榴叶提取物联用对小鼠 2 型糖尿病有一定治疗效果

【关键词】糖尿病(DM);氧化应激;葡萄糖耐量;山茱萸与番石榴叶提取物;联合治疗

糖尿病简称为 DM，是一种由多种病因引起，以慢性高血糖为表现，糖尿病患者的临床症状表现为三多一少，及体重下降，多饮、多食、多尿等，最明显的特点是血糖含量高^[1]。糖尿病主要分为 1 型糖尿病与 2 型糖尿病两类：其中 2 型糖尿病是 DM 患者中最主要的群体，主要发病原因是胰岛素抵抗及胰岛素分泌不足^[2]。传统 2 型糖尿病的治疗是控制饮食与服用药物结合，早期控制饮食与按时服用降糖药物十分关键，但现如今市面上西药普遍有一定的副作用。中医药在防治糖尿病的研究中具有明显优势，针对糖尿病本虚标实之病机，山茱萸补益收涩二法共奏，在治疗糖尿病中取得明确效果并被广泛应用^[3]。为此，本实验通过建立小鼠 2 型高血糖模型，设立对照组，将山茱萸和番石榴叶提取物联合用药作为 2 型糖尿病的治疗药物。通过观察小鼠 2 型糖尿病的抗氧化应激治疗机制及其胰岛素增敏效果，为临床提供实验参考依据。

1. 材料

1.1 动物

35 只 8 周龄 SPF 级 ICR 雄性小鼠购于湖南省长沙市天勤生物技术有限公司，许可证号：SCXK（湘）2022-0011。全部饲养于长沙医学院生命科技楼七楼实验室动物房，饲养环境湿度 60%~70%，温度 21~25℃，12 h 交替照明。小鼠体质量 22~25g，实验前小鼠在标准环境下给予普通饲料、自由饮水、分笼（4 笼）适应性饲养 1 w 后开始试验。目的为稳定血糖情况和代谢情况。后将健康清洁小鼠随机分为 3 组，即空白对照组、2 型高血糖组、联合用药组。空白组 5 只，其余每组 15 只。

1.2 试剂与药品

山茱萸浓缩提取物 20：1，500g，购于西安圣青生物科技有限公司，番石榴叶浓缩提取物 20：1，500g，购于宁陕国圣生物科技有限公司，苏木素伊红（HE）染色检测试剂盒，产品货号 G1120，购于北京索莱宝科技有限公司，血糖检测使用罗氏血糖仪，链脲佐菌素(STZ) 1g 科研试剂购于北京索莱宝科技有限公司。

2. 实验方法

2.1 动物分组、造模，给药

将健康的 35 只清洁小鼠随机分为 3 组，分别为空白对照组、2 型高血糖组、联合用药组。空白组 5 只，其余每组 15 只。随机选取 35 只小鼠中的 5 只作为空白组，空白组 5 只小鼠给予每只小鼠每天 7g 普通饲料和洁净饮用水保证其正常生活。其余小鼠用高糖高脂饲料喂养一个月，一个月后禁食不禁水 12 h，诱导高血糖发生，将 STZ 药剂冷冻保存，避免失活，STZ 溶液的配制：使用 0.1mol/L 柠檬酸缓冲液（PH 值 4.2~4.5）溶解 STZ，配置为 2% 的 STZ 溶液（新鲜使用），为避免小鼠敏感度差，控制小鼠中单次高剂量的剂量范围为 100~200mg·kg⁻¹ 进行腹腔注射，高脂高糖喂养小鼠一个月后，连续注射 STZ 溶液一周，空白组小鼠采用腹腔给药注射同等容积的柠檬酸缓冲液。一周后可发现造模小鼠有多饮多食多尿等症状并对造模小鼠进行空腹状态下尾静脉采血，使用罗氏血糖仪测量血糖，血糖 > 16.7mmol/L 表示小鼠 2 型高血糖模型造模成功，继续高脂高糖饲料喂养小鼠 2w 并控制小鼠血糖在 16.7mmol/L~22.0 mmol/L

L 之内防止小鼠因血糖过高而死亡。使用造模成功的 30 只小鼠, 将其分为 2 型高血糖组和联合用药组, 每组各 15 只, 空白对照组给与正常饲料和饮水。2 型高血糖组和联合用药组给与高脂高糖饲料喂养并注意小鼠血糖波动, 此时可开始治疗实验。

2.2 给药方式

联合治疗组山茱萸浓缩提取物与番石榴叶提取物按 20g/kg 剂量溶解于生理盐水中, 采取灌胃给药每日一次持续 4w, 空白对照组与 2 型高血糖组采用灌胃给药注射同等容积的生理盐水 4w, 每天按时观察小鼠的健康状况。

3. 指标检测

3.1 动物动态症状学观察

末次给药后观察动物临床症状, 指标测定观察并记录小鼠一般状况, 包括小鼠的精神状态、饮水量、食量、大小便等。平均每周期称重并记录。

进行小鼠血糖检测(小鼠尾静脉采血, 葡萄糖氧化酶法测血糖)。

采用刘杨^[4]等人的对小鼠葡萄糖耐量的检测方法, 分组进行空腹血糖 OGTT 实验, 末次给药前禁食不禁水, 以葡萄糖 2.5 g/kg 的剂量经口灌胃, 小鼠眼眶静脉采血, 分别测定小鼠服糖后 0、0.5、2 h 的血糖值。实验结束时禁食 12 h。

3.1.1 数据处理

将实验所得的数据使用 SPSS 18.0 数据处理软件中展开数据统计处理, 多组间比较用方差分析, 实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 对所得的数据 $P < 0.05$ 有统计学意义。

4. 实验结果

4.1 小鼠一般体征变化观察

正常组小鼠生长发育良好, 皮肤光泽, 活动度无明显异常, 精神状态良好, 进食进水排尿排便无明显异常, 2 型高血糖组造模小鼠出现多饮多食多尿症状, 初期毛发较不光泽, 精神状态较差, 活动稍减弱。实验后期小鼠活动明显减弱, 精神萎靡, 毛色暗淡, 身形较正常组瘦小。与 2 型高血糖组相比较, 山茱萸联合番石榴叶组有明显改善, 后期小鼠活动增多, 毛发光泽度增加, 精神状态有明显改善。

4.2 山茱萸联合番石榴叶提取物对于小鼠体重的影响

采取给药前, 给药后 1w, 给药后 3w 的小鼠体重数据作比较, 比较空白对照组, 2 型高血糖组, 联合给药组的小鼠体重变化。见表 1, 可得知山茱萸联合番石榴叶提取物对于小鼠体重的影响所得的数据 ($P > 0.05$), 差异无统计学意义。

表 1 山茱萸联合番石榴叶提取物对于小鼠体重的影响($\bar{x} \pm s$)

分组	实验前 (g)	给药后 1w (g)	给药后 3w (g)
空白对照组	25.27 \pm 1.51	26.51 \pm 2.35	26.12 \pm 1.32
2 型高血糖组	26.89 \pm 3.09	25.65 \pm 2.79	25.45 \pm 1.45
联合给药组	25.33 \pm 1.78	24.12 \pm 2.13	24.35 \pm 2.04

4.3 山茱萸联合番石榴叶提取物对于小鼠血糖的影响(空腹状态下)

可以明显从数据中得出相比较于空白对照组的正常血糖范围, 2 型高血糖组的血糖与联合对照组的血糖明显升高, 说明造模较成功, 属于糖尿病的范畴, 且 2 型高血糖组与联合治疗组的血糖明显高于空白对照组 ($P < 0.05$), 说明该数据具有统计学的意义。同时在给药之后, 联合治疗组空腹状态下血糖值明显降低, 与正常对照组相比较无统计学意义 ($P > 0.05$), 而 2 型高血糖组的空腹血糖值无明显变化, 跟联合治疗组、空白对照组相比具有统计学意义 ($P < 0.05$)。据表 2, 这说明了山茱萸联合番石榴叶提取物对于小鼠 2 型高血糖组有着治疗作用, 降糖效果较为显著。

表 2 山茱萸联合番石榴叶提取物对于小鼠血糖的影响($\bar{x} \pm s$)

分组	用药前	用药后
空白对照组	7.51 \pm 1.08	7.05 \pm 1.12
2 型高血糖组	16.71 \pm 2.36	15.89 \pm 0.87
联合给药组	16.49 \pm 1.71	7.44 \pm 1.29 [*]

注: 与空白对照组相比较^{*} ($P < 0.05$)

4.4 山茱萸联合番石榴叶提取物对于小鼠糖耐量的影响($\bar{x} \pm s$)

2 型高血糖组的血糖高于空白对照组, $P < 0.05$, 表明有统计学意义, 联合用药组在 0h, 0.5h, 2h 的血糖值均与 2 型高血糖组相比有统计学差异, 治疗后的糖耐量反映机体糖代谢时胰岛素分泌情况, 表明联合提取物可促进胰岛素分泌, 具备胰岛素增敏作用。见表 4

表 4 山茱萸联合番石榴叶提取物对于小鼠糖耐量的影响($\bar{x} \pm s$)

分组	0h	0.5h	2h
空白对照组	4.45 \pm 0.87	4.64 \pm 0.72	4.56 \pm 1.01
2 型高血糖组	7.56 \pm 1.23	18.82 \pm 2.79	15.54 \pm 2.81
联合给药组	4.66 \pm 1.69 [*]	7.80 \pm 1.17 [*]	7.56 \pm 1.53 [*]

注: 与 2 型高血糖组比较^{*} ($P < 0.05$)

5. 讨论

糖尿病会导致人体长期的碳水化合物以及脂肪、蛋白质代谢紊乱, 引起人体的多系统损害。目前无论是我国国内还是世界上糖尿病患者

数和发病率总体呈现单调上升态势。国际 DM 联盟公布的数据表明, 2017 年全球约有 4.25 亿成年人患 DM。我国是 DM 第一人口大国, DM 患者总数约 1.14 亿, 约占全球 DM 总人口的 1/4^[5]。随着经济与社会的高速发展, 人民生活方式的改变, 我国 DM 患病率呈现一个飙升状态, 18 岁及以上成年人的患病率从 1980 年的 0.67% 至 2013 年的 10.4%^[6], 再至 2019 年的 11.9%^[6]。我国糖尿病以 T2DM 为主且国内 T2DM 发病趋势逐年升高, 发病机制主要为患者自身胰岛素分泌受限^[7], 并伴胰岛素抵抗。

现代研究表明, 山茱萸具有肝肾保护作用, 抗糖尿病, 抗氧化, 抗衰老, 神经保护, 抗肿瘤活性和调节毛发生长等生物活性^[8]。番石榴叶有生物碱, 类胡萝卜素, 多糖, 维生素, 精油, 类黄酮等物质, 黄酮类化合物羟基化可以提高其抗氧化活性, 而羟基结构被糖基化则明显降低其抗氧化能力^[9]。番石榴叶总黄酮能够促进高糖环境下胰岛 β 细胞的增殖, 多糖能促进胰岛素的分泌, 同时可以增强胰岛素敏感性^[10]。本实验中山茱萸和番石榴叶提取物含有类黄酮, 多糖等物质, 在降血糖的同时对糖尿病小鼠胰岛素抵抗有一定治疗作用, 提高葡萄糖耐量。同时类黄酮等物质因其具有抗氧化性, 可通过防止大量自由基产生, 进一步避免氧化对细胞的损伤。控制糖尿病患者体内的氧化应激水平使之处于正常状态, 防止进一步细胞退变, 缓解氧化应激的进展。番石榴叶联合山茱萸提取物通过抑制氧化应激的产生, 提高糖耐量, 增敏胰岛素, 起到降血糖作用, 这对于糖尿病治疗起到一定作用。

随着中医药领域的研究的进展, 中医药在 2 型糖尿病的治疗方面有其独特的方法, 不仅可以有效地改善各种症状, 还可降低副作用的产生, 从而提高患者的生活水平^[11]。本实验就是基于山茱萸对人体的补益收涩二法为基础, 探究中药对于糖尿病治疗的关键作用。结果发现山茱萸联合番石榴叶提取物可改善 STZ 诱导的 2 型糖尿病小鼠模型的多饮多食症状, 对小鼠 2 型糖尿病起到显著降低血糖的作用, 对糖耐量的异常也有改善。这与国内外报道的研究结果类似。这说明山茱萸, 番石榴叶可有效降低血糖, 提高葡萄糖耐量, 改善胰岛素抵抗^[12-13]。因此, 本项目结论在于可以通过山茱萸和番石榴叶的药理作用机制为 2 型糖尿病提供临床上的治疗思路, 完善治疗体系与方案。

参考文献:

- [1] 郝军, 孙喜爱, 李居. 空腹血糖、血脂和糖耐量对糖尿病患者生化检验价值及结果分析 [J]. 糖尿病新世界, 2023, 26(4): 63-66.
- [2] 孙颖, 邵丹青. 成人糖尿病分型及健康管理应用 [J]. 慢性病学杂志, 20

23,24(02):214-219.DOI:10.16440/J.CNKI.1674-8166.2023.02.11

[3] 柳洋, 王丽. 山茱萸治疗糖尿病肾病研究概况 [J]. 中医临床杂志, 2022, 34(09):1778-1782.DOI:10.16448/j.cjctcm.2022.0946

[4] 刘扬, 庞妮燕, 苏东月等. 葛根素对实验性 2 型糖尿病小鼠血糖的影响 [J]. 中国现代药物应用, 2011, 5(17):52-53.DOI:10.14164/j.cnki.cn11-5581/r.2011.17.018

[5] 牛兴和, 陈历水, 应剑. 血糖调控食品 [M]. 北京: 科学出版社, 2020:1-7.

[6] 国家卫生健康委疾病预防控制局. 中国居民营养与慢性病状况报告(2020 年) [J]. 营养学报, 2020, 42(6):521.

[7] 全美英, 潘韦韦, 崔镇海. 基于网络药理学探讨白芍治疗 2 型糖尿病的作用机制 [J]. 中国医药科学, 2021, 11(23): 35-38, 69.

[8] 范倩, 陈雪冰; 茉莉, 张翠仙广州中医药大学中药学院, 山茱萸化学成分、生物活性、复方应用及质量控制研究进展

[9] 王露, 番石榴叶活性多酚组分快速鉴别及发酵释放与转化机制 2018-04-13

[10] 闫小光; 孙文; 刘铜华; 徐敬海; 郭璇; 吴丽丽; 穆晓红; 郭翔宇; 段颖, 番石榴叶总黄酮对胰岛 β 细胞胰岛素抵抗影响的实验研究 2015-06-20

[11] LIU X J, HU X K, YANG H, et al. A review of traditional Chinese medicine on treatment of diabetic nephropathy and the involved mechanisms [J]. Am J Chin Med, 2022, 50(7):1739 - 1779.

[12] Han Y, Jung H W, Park Y K. Selective therapeutic effect of comus officinalis fruits on the damage of different organs in STZ-induced diabetic rats [J]. American Journal of Chinese Medicine, 42(05):1450073-.

[13] 成金燕, 李乐愚, 林泽宏等. 复方番石榴制剂联合西药治疗 2 型糖尿病合并代谢综合征临床观察 [J]. 深圳中西医结合杂志, 2021, 31(11):50-52. DOI:10.16458/j.cnki.1007-0893.2021.11.021

第一作者: 刘芸毓 (2002.05-), 男, 汉族, 重庆涪陵, 本科在读, 医学影像学专业;

*通讯作者: 张杰 (1995.10-), 女, 汉族, 湖南常德, 讲师, 研究方向: 医学影像。

项目基金: 长沙医学院大学生创新创业训练计划项目: 长医教 [2023] 51 号-151