

# 蛇葡萄素对 2 型糖尿病大鼠 NO/NOS 水平及抗氧化能力的影响

黄先菊<sup>1</sup>, 王文英<sup>1</sup>, 王贵林<sup>1</sup>, 杜亚明<sup>1</sup>, 张渊<sup>1</sup>, 严赞开<sup>2</sup>, 胡春菊<sup>2</sup> (1. 长江大学医学院药理教研室, 湖北 荆州 434000; 2. 韩山师范学院化学教研室, 广东 潮州 521041)

摘要: 目的 研究蛇葡萄素对 2 型糖尿病大鼠的降糖作用及 NO/NOS 水平和抗氧化能力的影响。方法 采用高糖高脂饲料饲养大鼠 1 个月, 再一次性腹腔注射小剂量链脲佐菌素, 建立 2 型糖尿病大鼠模型。观察高、低剂量蛇葡萄素对糖尿病大鼠的降糖作用, 并检测各组动物血清 NO/NOS 及肾脏组织 SOD, MDA, GSH-Px 含量。结果 高、低剂量蛇葡萄素均能降低 2 型糖尿

基金项目: 湖北省卫生厅基金项目 (JX2C27)

作者简介: 黄先菊, 女, 博士, 副教授, Tel: (0716) 8067977 E-mail: huangxj554@sohu.com

病大鼠的血糖水平,抑制糖尿病大鼠血浆 NO、iNOS水平,降低肾脏组织 MDA含量,提高 SOD、GSH-Px活性。与模型组比较差异显著 ( $P < 0.05$  或  $0.01$ )。结论 蛇葡萄素能够降低 2型糖尿病大鼠血糖,增强糖尿病大鼠机体抗氧化作用及抑制糖尿病大鼠血清 NO/iNOS水平。

关键词:糖尿病;蛇葡萄素;NO/NOS;抗氧化能力

中图分类号:R965.1;R977.15;TQ463.24 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2008)02-0095-04

## Influence of Ampelopsin on NO/NOS Level and Antioxidant Capability of Type 2 Diabetic Rats

HUANG Xian-ju<sup>1</sup>, WANG Wen-ying<sup>1</sup>, WANG Gu-li<sup>1</sup>, DU Ya-ming<sup>1</sup>, ZHANG Yuan<sup>1</sup>, YAN Zan-ka<sup>2</sup>, HU Chun-ju<sup>2</sup> (1. Department of Pharmacology, Medical School of Yangtze University, Jingzhou 434000, China; 2. Department of Chemistry, Hanshan Normal University, Chaozhou 521041, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To study the effect of Ampelopsin on blood sugar, NO/NOS activity and antioxidant capability of type 2 diabetic (T2DM) rats. **METHODS** Rats were intraperitoneal injected streptozotocin (STZ) after received high fat and high sucrose diet to induce T2DM. The effect of different dosage of Ampelopsin were observed to decide whether it could lower the blood sugar of diabetic rats. NO/NOS level in serum and SOD, MDA, GSH-Px contents in kidney were detected in every group of rats. **RESULTS** Different dosage of Ampelopsin can lower the blood sugar of diabetic rats, inhibit NO and iNOS activities in blood, depress MDA, SOD and GSH-Px contents in kidney. It had significant difference compared with the model group. **CONCLUSION** Ampelopsin can lower the blood sugar of diabetes rats, and enhance antioxidant capability and inhibit NO/iNOS activities of diabetic rats.

**KEY WORDS:** diabetes; Ampelopsin; NO/NOS; antioxidant

蛇葡萄素 (ampelopsin), 又名二氢杨梅素, 为 3, 5, 7, 3', 4', 5'-六羟基-2, 3-二氢黄酮醇 (dihydromyricetin, DMY), 是一种重要的黄酮类化合物, 存在于葡萄科、杨梅科、杜鹃科、藤黄科、大戟科及柳科等植物中, 在葡萄科植物如显齿蛇葡萄 *Ampelopsis grossedentata*、粤蛇葡萄 *Ampelopsis cantoniensis* (Hook. et Arn.) planch、大叶蛇葡萄 (*Ampelopsis megalophylla* Diels et Gilg) 中大量存在<sup>[1-3]</sup>。近几年来, 国内外学者对其生物活性进行了研究, 发现它具有保肝、降糖、抗氧化、抗肿瘤多种药理作用等<sup>[4]</sup>。

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 常导致心血管、肾脏和周围神经等组织器官结构和功能的病理改变, 是老年人甚至青年人致病、致残的主要疾病之一。我们采用链脲佐菌素 (Streptozotocin, STZ) 配合高脂高糖建立 2 型糖尿病大鼠模型, 并观察蛇葡萄素对糖尿病大鼠的降糖作用及对血液抗氧化指标及一氧化氮 (nitric oxide, NO)、一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 的影响。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 动物

雄性 SD 大鼠, 体重 150 ~ 250 g, 购于华中科技大学同济医学院实验动物中心。动物分笼单只饲养, 自由饮水和摄食, 室温 (22 ± 1) °C, 相对湿度 (60 ± 5) %。

#### 1.2 样品

蛇葡萄素为淡黄色针状结晶, 系长江大学化学与环境工程学院提纯并鉴定; 盐酸二甲双胍 (上海医药有限公司信谊制药总厂, 批号: 041103); 链脲佐菌素 (美国 Sigma 公司产品, 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 的枸橼酸缓冲液溶解, pH = 4.2)。

组织蛋白含量 (考马斯亮蓝染色法, 批号: 20060409)、血

清一氧化氮 (20060522)、一氧化氮合酶 (NOS) (分型, 批号: 20060624)、丙二醛 (MDA) 含量 (批号: 20060621)、超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒 (批号: 20060731)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性试剂盒 (批号: 20060625)、葡萄糖检测试剂盒 (批号: 20060301), 均购自南京建成生物工程研究所。

#### 1.3 实验方法<sup>[5]</sup>

健康大鼠 40 只, 适应性饲养 5 d 后, 随机分成五组: 正常对照组 8 只, 糖尿病对照组 8 只, 二甲双胍组、蛇葡萄治疗组、高、低剂量组各 8 只。后 4 组喂以高糖高脂饲料 (饲料组成: 10% 猪油, 20% 蔗糖, 2.5% 胆固醇, 1% 胆酸盐, 66.5% 常规饲料) 1 个月, 诱发胰岛素抵抗, 糖尿病组和药物治疗组大鼠在禁食 12 h 后按 25 mg · kg<sup>-1</sup> 腹腔注射链脲佐菌素, 注射 72 h 测血糖, 空腹血糖值 ≥ 13.8 mmol · L<sup>-1</sup> 为模型成功, 对照组腹腔注射等容积枸橼酸缓冲液。二甲双胍组灌胃给予二甲双胍 0.25 g · kg<sup>-1</sup>, 高、低剂量药物组分别灌胃给予蛇葡萄素 0.25 和 0.125 g · kg<sup>-1</sup>, 每日一次, 其余二组腹腔注射 0.25 g · kg<sup>-1</sup> 的生理盐水, 连续给药 3 周。

#### 1.4 检测指标

分别于给药后 1 周、2 周、3 周采尾血测定空腹血糖后, 给药完毕, 乙醚麻醉, 心脏采血, 离心分离血清待测 NO、总的 NOS (tNOS)、诱导型 NOS (inducible NOS, iNOS) 活性; 并迅速分离两侧肾脏, 冷生理盐水漂洗, 用滤纸拭干, 准确称重后, 将肾脏按组织块重量与冷生理盐水体积比 = 1: 9, 冰水浴中制备成 10% 的组织匀浆, 3 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 取上清液测定组织蛋白和 SOD, MDA, GSH-Px 等各指标。

统计分析: 数值以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 10.0 统计软件进行统计分析, 多组比较用单因素方差分析; 两组比较用  $t$

检验。

## 2 结果

### 2.1 蛇葡萄素对糖尿病大鼠血糖的影响

与对照组相比,模型组血糖水平显著升高 ( $P < 0.01$ )。

表 1 蛇葡萄素对糖尿病模型大鼠血糖的影响 ( $n = 8, \bar{x} \pm s$ )

Tab 1 Effect of ampelopsin on blood sugar of type 2 diabetic rats ( $n = 8, \bar{x} \pm s$ )

Group	Dose /g·kg <sup>-1</sup>	Blood Sugar/mm ol·L <sup>-1</sup>			
		0 week	1 week	2 week	3 week
Normal		7.58 ± 2.03	7.32 ± 1.99	6.05 ± 1.85	5.49 ± 1.58
Model		14.32 ± 3.52 <sup>1)</sup>	15.66 ± 4.17 <sup>1)</sup>	16.86 ± 4.32 <sup>1)</sup>	18.29 ± 4.66 <sup>1)</sup>
Dimethylbiguanide	0.25	14.61 ± 3.73 <sup>1)</sup>	15.07 ± 3.82 <sup>1)</sup>	13.21 ± 3.86 <sup>1)3)</sup>	11.32 ± 3.01 <sup>1)3)</sup>
Ampelopsin	0.125	14.47 ± 3.28 <sup>1)</sup>	14.82 ± 3.69 <sup>1)</sup>	14.55 ± 4.01 <sup>1)2)</sup>	12.65 ± 3.47 <sup>1)3)</sup>
Ampelopsin	0.25	14.05 ± 2.84 <sup>1)</sup>	15.22 ± 3.91 <sup>1)</sup>	16.18 ± 4.45 <sup>1)</sup>	15.76 ± 4.12 <sup>1)2)</sup>

注:与正常对照组相比,<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型对照组相比,<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup>  $P < 0.01$

Note: Compared with control,<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; Compared with model,<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup>  $P < 0.01$

### 2.2 蛇葡萄素对糖尿病大鼠血清 NO/NOS水平影响

糖尿病大鼠血浆 NO、iNOS水平显著高于对照组 ( $P <$

与模型组相比,二甲双胍可显著降低给药后 2周、3周的血糖值 ( $P < 0.05$  或  $0.01$ ),对 1周的血糖值无明显影响;大剂量蛇葡萄素可明显降低 2周、3周血糖值,有降低 1周血糖值的趋势,结果见表 1。

0.01),二甲双胍及蛇葡萄素组大鼠血浆 NO、iNOS水平与模型对照组相比有明显降低 ( $P < 0.05$  或  $0.01$ )。结果见表 2。

表 2 蛇葡萄素对糖尿病大鼠血清 NO/NOS水平影响 ( $n = 8, \bar{x} \pm s$ )

Tab 2 Effect of ampelopsin on NO/NOS activities in the serum of type 2 diabetic rats ( $n = 8, \bar{x} \pm s$ )

Group	Dose /g·kg <sup>-1</sup>	NO/ $\mu$ mol·L <sup>-1</sup>	iNOS/ $\mu$ mol·L <sup>-1</sup>	iNOS/ $\mu$ mol·L <sup>-1</sup>
Normal		61.36 ± 8.77	25.64 ± 4.34	16.11 ± 3.29
Model		75.77 ± 8.95 <sup>2)</sup>	30.34 ± 5.01 <sup>2)</sup>	23.42 ± 3.86 <sup>2)</sup>
Dimethylbiguanide	0.25	66.34 ± 7.68 <sup>1)4)</sup>	27.98 ± 4.52 <sup>1)4)</sup>	19.43 ± 3.42 <sup>2)4)</sup>
Ampelopsin	0.125	71.22 ± 8.05 <sup>2)3)</sup>	29.11 ± 4.37 <sup>2)3)</sup>	20.71 ± 3.55 <sup>2)4)</sup>
Ampelopsin	0.25	67.39 ± 8.43 <sup>2)4)</sup>	26.75 ± 4.27 <sup>4)</sup>	21.22 ± 3.46 <sup>2)3)</sup>

注:与正常对照组相比,<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型对照组相比,<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup>  $P < 0.01$

Note: Compared with control,<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; Compared with model,<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup>  $P < 0.01$

### 2.3 蛇葡萄素对糖尿病大鼠肾脏组织 SOD, MDA, GSH-Px含量的影响

糖尿病大鼠肾脏 MDA含量明显升高, SOD活性明显下降, GSH-Px活性反应升高,与正常组大鼠比较差异均有统计

学意义 ( $P < 0.01$ )。蛇葡萄素高、低剂量组大鼠肾脏组织的 SOD, GSH-Px活性较糖尿病组明显升高, MDA含量明显降低,与模型组比较,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$  或  $0.01$ )。结果见表 3。

表 3 蛇葡萄素对糖尿病大鼠肾脏组织 SOD, MDA, GSH-Px含量的影响 ( $n = 8, \bar{x} \pm s$ )

Tab 3 Effect of ampelopsin on SOD, MDA, GSH-Px contents in kidneys of type 2 diabetic rats ( $n = 8, \bar{x} \pm s$ )

Group	Dose /g·kg <sup>-1</sup>	SOD/U·mg <sup>-1</sup> (protein)	MDA/nmol·mg <sup>-1</sup> (protein)	GSH-Px/U·g <sup>-1</sup> (protein)
Normal		259.06 ± 34.62	1.62 ± 0.32	15.85 ± 3.89
Model		184.37 ± 25.77 <sup>2)</sup>	3.81 ± 0.87 <sup>2)</sup>	6.64 ± 1.34 <sup>2)</sup>
Dimethylbiguanide	0.25	201.22 ± 27.94 <sup>2)3)</sup>	2.96 ± 0.65 <sup>2)4)</sup>	8.12 ± 2.10 <sup>2)3)</sup>
Ampelopsin	0.125	224.58 ± 30.42 <sup>1)4)</sup>	3.15 ± 0.71 <sup>2)3)</sup>	9.07 ± 2.66 <sup>2)4)</sup>
Ampelopsin	0.25	254.76 ± 31.79 <sup>4)</sup>	2.54 ± 0.54 <sup>2)4)</sup>	13.88 ± 3.09 <sup>4)</sup>

注:与正常对照组相比,<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型对照组相比,<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup>  $P < 0.01$

Note: Compared with control,<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; Compared with model,<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup>  $P < 0.01$

## 3 讨论

糖尿病是一种常见的内分泌代谢性疾病,主要分为 1型和 2型糖尿病。前者由胰岛  $\beta$  细胞破坏而导致胰岛素绝对缺乏所引起,后者胰岛素相对不足所致。临床上以 2型糖尿病居多 (90%以上)。本实验以高糖高脂饲料饲养大鼠 1个月,使其产生胰岛素抵抗,再一次性小剂量腹腔注射 STZ,可选择性破坏大鼠的  $\beta$  细胞,制备慢性 2型 DM模型,更接近临床疾病的实际发病情况,故而对药物作用研究更有意义。

抗氧化酶如 GSH-Px, Catalase等,能清除体内过高浓度

的氧自由基和其他自由基,来维持体内的氧化抗氧化动态平衡和免疫动态平衡<sup>[6]</sup>。本实验中,糖尿病大鼠出现了明显的高血糖,血清 MDA含量显著升高, SOD, GSH-Px活性明显降低,表明其体内过氧化反应增强,抗氧化能力降低。

在糖尿病的发生、发展过程中涉及众多的体液因子,由 NOS催化生成的 NO是其中之一。在糖尿病早期,肾脏 iNOS mRNA的表达明显增多<sup>[7]</sup>。而 iNOS一旦被激活,则可导致 NO的持续生成,直到底物耗竭<sup>[8]</sup>。NOS活性的激活可能与糖尿病时心肌细胞、胰岛  $\beta$  细胞等细胞膜 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶、

$\text{Ca}^{2+}$  细胞膜内外交换异常, 导致细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  蓄积有关<sup>[9-10]</sup>。研究表明, 糖尿病模型大鼠肾脏组织 NO 及 iNOS 表达均增加。

蛇葡萄素能明显降低模型大鼠血糖水平, 减少糖尿病大鼠血清 MDA 含量, 提高 SOD, GSH-PX 活性。说明蛇葡萄素能够清除体内产生的过多自由基, 增强 DM 大鼠血液的抗氧化能力, 有效对抗自由基引发的脂质过氧化损伤。保护和恢复胰岛  $\beta$  细胞的功能。蛇葡萄素可以显著降低糖尿病大鼠肾脏组织中 NO 含量及 tNOS, iNOS 活性, 其机制有待进一步研究。

## REFERENCES

- [1] ZHANG Y S, YANG W L, XIONG H P. Basic constituent of ampelopsis grossedentata[ J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2001, 13(5): 46-48.
- [2] CHEN Z G, WANG M X, CAI P X, *et al.* Determination of ampelopsin and myricetin in ampelopsis cantoniensis[ J]. J Chin Med Mater(中药材), 1997, 20(1): 56-59.
- [3] ZHANG H P, LING Z Q, QUAN X Y, *et al.* Studies on the chemical constituents of ampelopsis megalophylla diels et. gilg[ J]. Acta Uni Med Tangji(同济医科大学学报), 1998, 27(4): 267-269.
- [4] DONG Q Q, CHEN L F. Progress on pharmacological studies of

dihydromyricet[ J]. Cent South Pharm(中南药学), 2005, 3(5): 295-298.

- [5] ZHOU Y S, GAO Y, LI B, *et al.* A rat model of type 2 diabetes mellitus induced by high fat chow and low dose streptozotocin injection[ J]. Acta Lab Anim Sci Sin(中国实验动物学报), 2006, 22(3): 267-269.
- [6] BASSIRAT M, KHALIL Z. Endothelin and free radicals modulate microvascular responses in streptozotocin-induced diabetic rats[ J]. Microvasc Res, 2000, 59(1): 88-89.
- [7] QI Z H, LIN S Y. Increasing renal inducible nitric oxide synthase expression in early diabetic rats[ J]. Chin J Endocrinol Metab(中华内分泌代谢杂志), 1998, 14(1): 41-44.
- [8] GUO G Q, ZHA C H, SHEN W Z. The relation between nitric oxide and atherosclerosis[ J]. Adv Cardiovasc Dis(心血管病学进展), 2001, 22(3): 178-180.
- [9] GOLFMAN L, DIXONI M, TAKEDA N, *et al.* Cardiac sarcolemmal  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchange and  $\text{Na}^{+}$ - $\text{K}^{+}$  ATPase activities and gene expression in alloxan-induced diabetes in rats[ J]. Mol Cell Biochem, 1998, 188(1-2): 91-101.
- [10] KOMATSU M, YAJIMA H, YAMADA S, *et al.* Augmentation of  $\text{Ca}^{2+}$ -stimulated insulin release by glucose and long-chain fatty acids in rat pancreatic islets: free fatty acids mimic ATP-sensitive  $\text{K}^{+}$  channel-independent insulinotropic action of glucose[ J]. Diabetes, 1999, 48(8): 1543-1549.

收稿日期: 2006-11-23