

板蓝根水提物对糖尿病大鼠早期肝损伤的影响

胡天骄^a, 姜振^a, 张文友^a, 李吉萍^{a*}, 刘墨祥^b (扬州大学, a.药理学教研室; b.天然药物化学研究室, 江苏 扬州 225001)

摘要: 目的 研究板蓝根水提物(water extract of Radix Isatidis, WERI)对糖尿病大鼠肝功能的影响。方法 采用链脲佐菌素诱导 Wistar 大鼠糖尿病模型, 随机分为模型组、罗格列酮组(0.3 mg·kg⁻¹)、WERI 高、中、低剂量组(100, 50, 25 mg·kg⁻¹), 并设正常对照组, 均采用灌胃给药。4 周后, 检测各组大鼠空腹血糖(FBG)、空腹胰岛素(FINS)、肝系数、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、游离脂肪酸(FFA)和血清脂联素(ADP), 并观察大鼠肝脏组织病理形态学变化。结果 与正常对照组比较, 模型组大鼠 FBG、FINS、肝系数、ALT、AST、FFA 水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 血清 ADP 含量显著降低($P<0.05$)。与模型组比较, WERI 高剂量组大鼠 FBG、FINS、肝系数、ALT、AST、FFA 水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 血清 ADP 含量升高($P<0.05$); 罗格列酮组与 WERI 高、中、低剂量组大鼠肝脏病理形态均显著改善。结论 WERI 对糖尿病大鼠的肝功能具有保护作用。

关键词: 板蓝根水提物; 糖尿病; 谷丙转氨酶; 谷草转氨酶; 游离脂肪酸; 脂联素; 肝组织病理

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2017)02-0196-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.02.010

Effect of Water Extract of Radix Isatidis on Early Liver Injury in Diabetes Mellitus Rats

HU Tianjiao^a, JIANG Zhen^a, Zhang Wenyou^a, LI Jiping^{a*}, LIU Moxiang^b (Yangzhou University, a.Department of Pharmacology; b.Laboratory of Natural Pharmaceutical Chemistry, Yangzhou 225001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To analysis the influence of water extract of Radix Isatidis(WERI) on liver in diabetic rats. **METHODS** Diabetic model of Wistar rats induced by streptozotocin. They were randomly divided into model group, rosiglitazone group (0.3 mg·kg⁻¹), WERI high, medium and low dose group(100, 50, 25 mg·kg⁻¹). And set up the normal control group, all the use of gastric administration. After 4 weeks, fasting blood glucose (FBG), fasting insulin (FINS), liver coefficient, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), free fatty acids (FFA), serum adiponectin (ADP) were measured, and pathological changes in liver tissues of rats were observed. **RESULTS** Compared with normal control group, FBG, FINS, the liver coefficient, ALT, AST, FFA levels of rats in the model group were increased($P<0.05$ or $P<0.01$); ADP content decreased ($P<0.05$). Compared with the model group, FBG, FINS, liver coefficient, ALT, AST, FFA levels of WERI high dose group rat were reduced ($P<0.05$ or $P<0.01$), ADP content was increased($P<0.05$), the difference was statistically significant. The liver of the rosiglitazone group and WERI high, medium and low dose group were significantly improved. **CONCLUSION** WERI has a protective effect on the liver function of diabetic rats.

KEY WORDS: water extract of Radix Isatidis; diabetic; alanine aminotransferase(ALT); aspartate aminotransferase(AST); free fatty acids; adiponectin; liver tissue pathology

随着科学发展, 人们生活水平和生活方式都发生了相应的改变, 糖尿病已严重影响人类的生活质量, 而 85%~90%糖尿病属于 2 型糖尿病, 一般可以预防^[1]。有文献指出, 肝脏疾病是 2 型糖尿病患者死亡的主要原因之一^[2]。糖尿病引起的高血糖常常累及肝脏器官, 但由于肝脏代偿功能较强且早期肝脏损伤不明显等因素, 糖尿病肝损伤不易引起人们的关注。糖脂代谢紊乱是糖尿病与肝脏相关代谢异常的主要表现。糖代谢紊乱容易导致高血糖症的发生, 引起糖原在肝脏堆积并引发

肝脏微血管病变, 损伤肝功能^[3]。多数 2 型糖尿病患者都会存在胰岛素抵抗, 导致其周围组织的脂肪分解增加, 分解后产生过多的游离脂肪酸进入肝脏, 使肝脏的清除能力超负荷。脂质大量聚集在肝脏, 会对肝功能造成损伤, 从而形成脂肪肝。出现肝功能损伤后会加重胰岛素抵抗, 导致糖脂代谢紊乱和糖尿病的病情加重^[4]。大多数口服降糖药物对肝脏都有不同程度的损害作用^[5], 因此, 肝损伤的出现会进一步加大糖尿病治疗的难度, 并影响糖尿病的治疗及预后。若能加强对糖尿病肝

基金项目: 江苏省科技发展计划(苏北星火带科技攻关)项目(BE2004339)

作者简介: 胡天骄, 女, 硕士 Tel: 15252571662 E-mail: 511986408@qq.com
13815833998 E-mail: jipingli2005@126.com

*通信作者: 李吉萍, 女, 硕士, 副教授 Tel:

损伤发病机制的研究, 尽早发现和预防糖尿病的肝损伤, 对提高糖尿病患者的生活质量具有重要的意义。

根据本研究室前期的研究发现, 板蓝根水提取物(water extract of Radix Isatidis, WERI)具有预防肥胖, 调节血脂和降低糖尿病大鼠血糖的作用^[6-7]。本研究通过观察板蓝根水提取物对糖尿病大鼠早期肝功能的影响, 探讨板蓝根水提取物改善糖尿病大鼠肝功能的作用。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 Wistar 大鼠, ♂, 体质量为 150~180 g, 扬州大学比较医学实验中心, 动物生产许可证号: SCXK(苏)2012-0004, 使用许可证号: SYXK(苏)2012-0029。

1.2 药品及试剂

板蓝根水提取物由扬州大学药物研究所天然药物化学研究室提供, 原药材产地为安徽亳州; 链脲佐菌素(北京索莱宝科技有限公司, 批号: S8050); 马来酸罗格列酮(上海源叶生物科技有限公司, 批号: 155141-29-0); 血清脂联素 ELISA 试剂盒(Bio-Swamp, 批号: 201407)。

1.3 仪器

SF-400 型电子天平(江苏索菲电子秤); DK-S24 型恒温水浴锅(杭州汇尔仪器); 日立 HITACHI7060 型全自动生化分析仪(日本日立产业株式会社); 5702R 型高速冷冻离心机(Eppendorf 公司); 3120000.224 型移液枪(德国 Eppendorf); M5 多功能读板机(美国 MOLECULAR)。

2 方法

2.1 2 型糖尿病大鼠模型的建立、分组与给药

Wistar 大鼠 48 只, 随机取 8 只为正常对照组, 40 只为造模组。正常对照组给予普通饲料, 造模组给予高糖高脂饲料。8 周后, 禁食 12 h, 造模组大鼠腹腔注射 $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的链脲佐菌素, 正常对照组仅注射枸橼酸缓冲液。1 周后检测血糖, 以空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)值 $\geq 14\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为造模成功。糖尿病大鼠随机均分为 5 组, 每组 8 只。正常对照组和模型组给予 0.9% NaCl 溶液灌胃, 罗格列酮组给予 $0.3\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 马来酸罗格列酮, WERI 高、中、低剂量组分别给 100, 50, $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 WERI, 连续给药 4 周。

2.2 指标检测与方法

2.2.1 FBG 与空腹胰岛素(fasting insulin, FINS)的检测 采用葡萄糖氧化酶法检测各组大鼠血清 FBG, 放射免疫法检测各组大鼠血清中 FINS 的含量。

2.2.2 肝系数的检测 大鼠解剖后, 取肝脏用 0.9% NaCl 漂洗, 擦干, 称肝质量, 按公式计算肝系数, 肝系数($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)=肝质量/体质量。

2.2.3 血清中 ALT、AST 的检测 大鼠处死后, 心脏取血, $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 取上清液。全自动生化分析仪测定 ALT、AST 的浓度。

2.2.4 血清中游离脂肪酸(free fat acid, FFA)的检测 取大鼠血清, 采用全自动生化分析仪测定 FFA 的浓度。

2.2.5 血清脂联素(adiponectin, ADP)含量的检测 取大鼠血清, 用 ELISA 检测试剂盒测定血清 ADP 的含量。

2.2.6 肝脏组织的 HE 染色 取肝脏切片固定后脱水透明, 使用浸蜡包埋, 切片贴片后用苏木精-伊红脱蜡染色。

2.3 数据处理

本实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素方差分析, 比较组间差异性。

3 结果与分析

3.1 WERI 对大鼠血清 FBG、FINS 的影响

与正常对照组比较, 模型组大鼠血清 FBG、FINS 水平显著升高($P<0.01$); 与模型组比较, WERI 各剂量组大鼠血清 FBG、FINS 显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见表 1。

3.2 WERI 对大鼠肝系数和血清 ALT、AST 的影响

与正常对照组比较, 模型组大鼠肝系数和血清 ALT、AST 水平显著升高($P<0.01$)。与模型组比较, WERI 高、中剂量组大鼠肝系数和血清 ALT、AST 水平显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见表 2。

3.3 WERI 对大鼠血清 FFA 的影响

与正常对照组比较, 模型组大鼠血清 FFA 浓度显著升高($P<0.01$)。与模型组大鼠比较, 罗格列酮组和 WERI 各剂量组大鼠血清 FFA 显著降低($P<0.01$)。结果见表 3。

3.4 WERI 对大鼠血清 ADP 的影响

与正常对照组比较, 模型组大鼠血清 ADP 浓度显著降低($P<0.05$)。与模型组大鼠比较, 罗格列酮组和 WERI 各剂量组大鼠血清 ADP 显著升高

($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见表 3。

表 1 各组大鼠血清 FBG、FINS 的比较($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Comparison of serum FBG, FINS in rats of each group($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

组别	FBG/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	FINS/ $\text{mU} \cdot \text{L}^{-1}$
正常对照组	8.09 ± 1.89	41.82 ± 7.20
模型组	$25.54 \pm 5.40^{2)}$	$61.02 \pm 6.46^{2)}$
罗格列酮组	$18.37 \pm 6.51^{23)}$	$37.27 \pm 7.34^{4)}$
WERI 高剂量组	$13.14 \pm 5.52^{14)}$	$39.21 \pm 6.62^{4)}$
WERI 中剂量组	$16.26 \pm 5.43^{23)}$	$42.87 \pm 10.70^{4)}$
WERI 低剂量组	$20.89 \pm 6.18^{23)}$	$47.00 \pm 10.65^{13)}$

注: 与正常对照组比较, $^1)P<0.05$, $^2)P<0.01$; 与模型组比较, $^3)P<0.05$, $^4)P<0.01$ 。

Note: Compared with normal control group, $^1)P<0.05$, $^2)P<0.01$; compared with model group, $^3)P<0.05$, $^4)P<0.01$.

表 2 各组大鼠血清 ALT、AST 和肝系数的比较($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Comparison of liver coefficient, serum ALT, AST in rats of each group($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

组别	肝系数/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	ALT/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	AST/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$
正常对照组	23.43 ± 1.31	35.00 ± 6.21	49.75 ± 15.40
模型组	$33.90 \pm 1.69^{2)}$	$126.38 \pm 17.79^{2)}$	$128.50 \pm 15.57^{2)}$
罗格列酮组	$31.14 \pm 5.19^{2)}$	$34.50 \pm 14.40^{4)}$	$44.88 \pm 10.19^{4)}$
WERI 高剂量组	$29.18 \pm 2.96^{24)}$	$30.88 \pm 14.34^{4)}$	$50.13 \pm 11.46^{4)}$
WERI 中剂量组	$29.55 \pm 4.06^{13)}$	$33.00 \pm 13.22^{4)}$	$63.25 \pm 14.87^{4)}$
WERI 低剂量组	$32.83 \pm 2.90^{2)}$	$32.00 \pm 7.50^{4)}$	$75.38 \pm 13.80^{24)}$

注: 与正常对照组比较, $^1)P<0.05$, $^2)P<0.01$; 与模型组比较, $^3)P<0.05$, $^4)P<0.01$ 。

Note: Compared with normal control group, $^1)P<0.05$, $^2)P<0.01$; compared with model group, $^3)P<0.05$, $^4)P<0.01$.

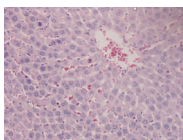
表 3 各组大鼠血清 FFA 和 ADP 的比较($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Comparison of FFA and ADP in rats of each group($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

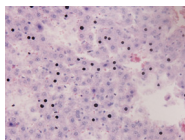
组别	FFA/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	ADP/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$
正常对照组	721.25 ± 101.61	1.70 ± 0.29
模型组	$1\ 268.00 \pm 126.56^{2)}$	$1.23 \pm 0.46^{1)}$
罗格列酮组	$787.37 \pm 118.65^{4)}$	$1.62 \pm 0.12^{3)}$
WERI 高剂量组	$809.63 \pm 124.53^{4)}$	$1.61 \pm 0.09^{3)}$
WERI 中剂量组	$902.50 \pm 148.44^{14)}$	$1.66 \pm 0.17^{3)}$
WERI 低剂量组	$921.25 \pm 142.04^{24)}$	$1.58 \pm 0.17^{4)}$

注: 与正常对照组比较, $^1)P<0.05$, $^2)P<0.01$; 与模型组比较, $^3)P<0.05$, $^4)P<0.01$ 。

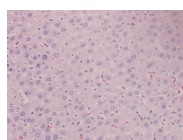
Note: Compared with normal control group, $^1)P<0.05$, $^2)P<0.01$; compared with model group, $^3)P<0.05$, $^4)P<0.01$.



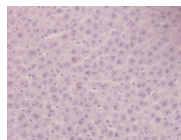
正常对照组



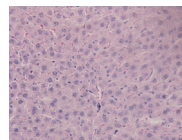
模型组



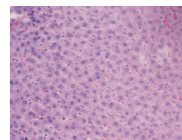
罗格列酮组



WERI 高剂量组



WERI 中剂量组



WERI 低剂量组

图 1 各组大鼠肝脏的病理形态

Fig. 1 Pathological morphology of liver in each group

3.5 WERI 对大鼠肝脏病理形态的影响

正常对照组肝组织结构完整, 肝细胞以中央静脉为中心向四周呈条索状、放射状整齐排列, 肝小叶结构完整肝细胞分界清楚, 大小较一致, 呈圆形, 位于细胞中央, 胞质丰富, 肝窦排列规则, 汇管区清晰。模型组大鼠大部分肝细胞肿胀, 胞质中出现大小不等的脂滴空泡, 细胞界限不清, 肝窦狭窄, 炎性细胞浸润, 可见肝细胞点状或灶状坏死。罗格列酮组和 WERI 各剂量组大鼠细胞胞质内脂滴较少, 肝索排列较正常, 未见炎性细胞浸润。大鼠肝脏的病理形态结果见表 4 和图 1。

表 4 WERI 对各组大鼠肝脏病理变化的影响($n=8$)

Tab. 4 Pathological changes of rats in each group($n=8$)

组别	肝脏病变分级			
	-	+	++	+++
正常对照组	8	0	0	0
模型组	0	1	5	2
罗格列酮组	4	3	1	0
WERI 高剂量组	3	3	1	1
WERI 中剂量组	3	2	2	1
WERI 低剂量组	2	2	3	1

4 讨论

肝脏作为主要代谢器官之一, 是糖尿病对人体造成慢性损害的靶器官^[8]。糖尿病肝损伤表现为肝形态及肝功能的变化, 病理学特征表现为脂肪变性, 炎细胞浸润及纤维化等^[9]。根据实验结果可知, 糖尿病大鼠血糖升高, 出现脂质代谢紊乱、胰岛素抵抗等症状, 且糖尿病大鼠血清 ALT、AST 和肝系数水平升高; 肝脏病理观察发现, 肝细胞明显肿胀, 呈点状或灶状坏死, 肝小叶中肝窦狭窄, 出现炎性细胞浸润, 表明糖尿病性肝脏损伤模型复制成功。

本实验发现, 板蓝根水提物可以降低糖尿病肝损伤大鼠的肝脏指数及血清 FFA、ALT、AST 浓度, 升高 ADP 含量; 肝细胞水肿、炎症细胞浸润、点状或灶状坏死等也有不同程度的改善。表明板蓝根水提物能够改善糖尿病大鼠的肝损伤。

糖尿病常伴随着胰岛素抵抗,胰岛素对脂肪代谢的调节作用降低,甘油三酯脂肪酶的活性增强,增加脂肪动员,致使游离脂肪酸浓度显著增加,过量的游离脂肪酸进入肝脏^[10]。此时,脂肪酸的氧化被抑制,游离脂肪酸大量输入远超过肝细胞的氧化能力,造成大量 TG 蓄积沉着在肝脏,形成脂肪肝^[11];同时,游离脂肪酸增多可抑制胰岛素释放、干扰胰岛素对血糖及酪氨酸磷酸化的调节,出现丝/苏氨酸磷酸化非信号转导异常而加重胰岛素抵抗^[12]。胰岛素在肝损伤中的作用与调节脂肪生成的转录因子有关,其过度表达会让调节肝脏脂肪合成有关酶的 mRNA 水平上升,使 TG 含量升高,导致脂肪变性^[13]。由此可见,胰岛素抵抗及脂质代谢紊乱会导致肝损伤,而肝损伤又会引起胰岛素抵抗及脂质代谢紊乱。

脂联素是脂肪组织分泌的细胞因子,可以增加游离脂肪酸的氧化,增强胰岛素受体的信号传导,从而减少糖异生^[14]。机体的脂肪含量与脂联素水平呈负相关,具有提高胰岛素对脂肪组织、肝脏及骨骼肌的敏感性,在肝损伤时发挥保护肝脏及预防纤维化的作用^[15]。有研究表明,脂联素可使炎症程度降低,分泌且刺激抗炎因子(如 NF- κ B、白介素-10 等),使白介素-6、肿瘤坏死因子等炎症因子释放减少,增加过氧化物酶增殖物激活受体的表达,进而起保护肝功能的作用^[16]。此外,脂联素能通过作用于肝星状细胞脂联素受体,活化肝脏磷酸腺苷蛋白激活酶通路,起抗肝脏纤维化的作用^[17]。

有研究显示,脂联素与 AST、ALT 呈负相关。血清 AST、ALT 等酶的活性灵敏地反映了肝细胞坏死及损伤程度的大小,ALT 活性标志着肝细胞浆膜损伤,而 AST 活性则标志线粒体损伤^[18]。

本实验结果显示,WERI 具有保护肝脏、改善肝脏组织病理形态学的作用,可能与其能够调节血脂,提高脂联素水平有关。因此推断 WERI 是一个防治糖尿病性肝病的潜在药物,具有一定的应用价值。

REFERENCES

- [1] ZACCARDI F, WEBB D R, YATES T, et al. Pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus: a 90-year perspective [J]. *Postgrad Med J*, 2015, 92(1084): 63-69.
- [2] GARCÍA-COMPEÁN D, GONZÁLEZ-GONZÁLEZ J A, LAVALLE-GONZÁLEZ F J, et al. Current concepts in diabetes mellitus and chronic liver disease: clinical outcomes, hepatitis cvirus association, and therapy [J]. *Digest Dis Sci*,

- 2015, 61(2): 1-10.
- [3] DHAROD M V, AMARAPURKAR D N. Diabetes: Its impact on liver diseases [J]. *J Clin Exper Hepatol*, 2013, 3(1): S122-S123.
- [4] GRANCINI V, TROMBETTA M, LUNATI M E, et al. Contribution of β -cell dysfunction and insulin resistance to cirrhosis-associated diabetes: role of severity of liver disease [J]. *J Hepatol*, 2015, 63(6): 1484-1490.
- [5] DE VRIES MCCLINTOCK H F, MORALES K H, SMALL D S, et al. Patterns of adherence to oral hypoglycemic agents and glucose control among primary care patients with type 2 diabetes [J]. *Behav Med*, 2014, 42(2): 63-71.
- [6] SUN T T, YUAN Y, YU Y H, et al. Effect and mechanism of active component of isatidis radix in obesity prevention[J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2013, 30(1): 10-15.
- [7] HU T J, JIANG Z, LI J P, et al. Hypoglycemic effect of active component of Isatidis Radix on diabetes mellitus rats [J]. *Chin J New Drugs Clin Rem*(中国新药与临床杂志), 2015, 34(9): 703-706.
- [8] KONSTANTINOS T, ATHYROS V G, ASTERIOS K. Non-alcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes: pathogenesis and treatment options [J]. *Curr Vascular Pharmacol*, 2012, 10(2): 162-172.
- [9] WILLIAMS K H, RIBEIRO A J V D, PRAKOSO E, et al. Circulating dipeptidyl peptidase-4 activity correlates with measures of hepatocyte apoptosis and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes mellitus and obesity: A dual cohort cross-sectional study [J]. *J Diabetes*, 2015, 7(6): 809-819.
- [10] WANG S, ZHANG H L, TONG B, et al. Body mass index is a risk factor for new-onset non-alcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Chin J Hepatol*, 2015, 23(10): 754-759.
- [11] BODEN G, SHULMAN G I. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction [J]. *Europ J Clin Invest*, 2002, 32(3): 14-23.
- [12] JACQUES D, CHRISTOPHE M. Free fatty acids and insulin resistance [J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2007, 10(2): 142-148.
- [13] POLI G, ALBANO E, DIANZANI M U. The role of lipid peroxidation in liver damage [J]. *Chem Phys Lipids*, 1987, 45(2-4): 117-142.
- [14] KRZYŻANOWSKA K, MITTERMAYER F W, RODEN M, et al. Adiponectin concentrations increase during acute FFA elevation in humans treated with rosiglitazone [J]. *Horm Metab Res*, 2007, 39(10): 769-772.
- [15] MOJTABA E, TAGHI G M, DAVOOD K, et al. Relationship of serum adiponectin and beta-cell function in obese males with type 2 diabetes [J]. *Asian J Pharm Biol Res*, 2012, 2(2): 40.
- [16] KADOWAKI T, YAMAUCHI T, KUBOTA N, et al. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome [J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(7): 1784-1792.
- [17] TOMITA K, OIKE Y, TERATANI T, et al. Hepatic AdipoR2 signaling plays a protective role against progression of nonalcoholic steatohepatitis in mice [J]. *Hepatology*, 2008, 48(2): 458-473.
- [18] ARANETA M R, BARRETT-CONNOR E. Grand multiparity is associated with type 2 diabetes in Filipino American women, independent of visceral fat and adiponectin [J]. *Diabetes Care*, 2010, 33(2): 385-389.

收稿日期: 2016-06-19