

多穗柯总黄酮对 db/db 小鼠胰高血糖素样肽-1 分泌的影响*

陈敬民¹, 李燕婧²

(1. 广西中医药研究院, 广西南宁 530022; 2. 广西中药质量标准研究重点实验室, 广西南宁 530022)

摘要: **目的** 探讨多穗柯总黄酮对 db/db 小鼠肠道胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 分泌的影响。**方法** 选取 db/db 雄性小鼠按空腹血糖值随机分组, 多穗柯总黄酮以 100、200 mg/kg 剂量灌胃给药 4 w, 进行糖负荷 GLP-1 分泌实验, 然后处死动物, 取回肠组织, 免疫荧光法检测分泌 GLP-1 的细胞情况, 测量食耗量、饮水量、空腹血糖值、血清 GLP-1 及分泌 GLP-1 细胞比例。**结果** 多穗柯总黄酮 100 或 200 mg/kg 剂量组均能显著减少 db/db 小鼠周食耗量 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)、周饮水量 ($P < 0.01$); 降低空腹血糖值 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 显著升高空腹 GLP-1 水平 ($P < 0.01$)。多穗柯总黄酮 200 mg/kg 剂量组能显著升高糖负荷后 30、60 min 的血清 GLP-1 水平 ($P < 0.05$); 增加分泌 GLP-1 的细胞比例 ($P < 0.01$)。**结论** 多穗柯总黄酮通过减少肠道 L 细胞损伤, 保护其分泌 GLP-1 的功能, 增加 GLP-1 的分泌, 发挥防治糖尿病作用。

关键词: 多穗柯总黄酮; 糖尿病; 胰高血糖素样肽-1

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-2349(2021)10-0079-04

DOI:10.16254/j.cnki.53-1120/r.2021.10.021

胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 是肠道 Langerhans 细胞分泌的肠肽类激素, GLP-1 能再生和修复胰岛 β 细胞, 增加 β 细胞数量并抑制其凋亡, 提高 β 细胞质量和数量, 改善 β 细胞功能^[1]。通过提高体内 GLP-1 水平改善胰岛 β 细胞功能, 进而提高胰岛素分泌水平, 从而达到防治糖尿病的目的, 是药物治疗糖尿病重要作用机制之一。

多穗柯是壳斗科植物木姜叶柯 *Lithocarpus litseifolius* (Hance) Chun. 的干燥嫩叶, 富含以根皮苷 (Phlorizoid-1), 三叶苷 (Trilobation-2), 3-羟基根皮苷 (3-hydroxy phlorizin-3) 为主的黄酮类物质^[2,3], 具有润肺镇咳、滋润肝肾、清热利尿等效用, 系广西瑶族地区常用于降血糖的民间草药。本课题组人员曾研究发现其在治疗糖尿病方面有显著的药理作用^[4], 本实验利用 db/db 小鼠糖尿病模型, 在考察糖负荷 GLP-1 变化基础上, 结合免疫荧光技术, 探讨多穗柯总黄酮防治糖尿病的作用机制。

1 材料

1.1 实验动物 SPF 级 C57、db/db 小鼠, 雄性, 购自常州卡文斯实验动物有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK(苏)2016-0010, 饲养于广西中医药研究院

动物房, 实验动物使用许可证号: SYXK 桂 2016-0006, 饲养温度 (22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, 环境相对湿度 (50 ± 5) %, 无菌水, 标准鼠料, 12 小时自由进食/12 小时禁食, 自由饮水。本实验遵守国家有关实验动物保护与使用准则。

1.2 药物与试剂 多穗柯来源于广西百色, 经广西中医药研究院饶伟源主任中药师鉴定为壳斗科植物木姜叶柯 *Lithocarpus litseifolius* (Hance) Chun. 的干燥嫩叶; 盐酸二甲双胍片 (批号: 190610), 北京京丰制药有限公司; 卓越金采血糖试纸, 罗氏血糖健康医护公司; 4% 多聚甲醛, 北京博奥拓达科技有限公司; 小鼠胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 酶联免疫检测试剂盒, 上海仁捷生物科技有限公司; Anti-GLP-1 Rabbit pAb 抗体, Cy3 标记山羊抗小鼠 IgG (红色), 细胞核染色剂 DAPI, 均购自武汉赛维尔生物科技有限公司。

1.3 主要仪器 卓越精采血糖仪 (罗氏血糖健康医护公司); Thermo 1510 酶标仪 (赛默飞世尔科技(中国)有限公司); Eclipse Ci-L 正置荧光拍照显微镜 (日本 Nikon 公司); Image-pro Plus 6.0 图片分析软件 (美国 Media Cybernetics 公司)。

* 基金项目: 广西科技基地和人才专项 (桂科 AD17195002)

第一作者简介: 陈敬民 (1970-), 男, 副主任药师, 研究方向: 中药药理研究。

1.4 统计学方法 用SPSS19.0软件进行统计分析,数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,组间进行LSD检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 方法

2.1 多穗柯总黄酮的制备 多穗柯药材粉碎,70%乙醇溶液以10:1液药比回流提取2次,每次2h,提取液滤过,浓缩成稠膏,用温蒸馏水稀释,上大孔树脂,水、乙醇梯度洗脱,收集50%醇洗脱部分,浓缩,冷冻干燥成粉末,284 nm处检测总黄酮含量为89%。

2.2 实验分组与给药^[5] 动物适应性饲养3d,C57小鼠为正常对照组,db/db小鼠尾静脉针刺取血,血糖仪测空腹血糖值,按血糖值随机分为模型组、二甲双胍83 mg/kg组、多穗柯总黄酮100和200 mg/kg组,每组8只,每笼2只分笼饲养。各给药组灌胃给药,给药体积为20 mL/kg,连续28d,正常对照组及模型组给予蒸馏水,每周均测量各鼠空腹血糖、食耗量及饮水量。

2.3 糖负荷 GLP-1 分泌实验^[6-7] 末次给药前尾静脉取血,给药1h后进行实验,各鼠分别按1 g/kg灌胃给予10%葡萄糖溶液,并于口服葡萄糖后30、

60、120 min尾静脉取血,血液3000 r/min离心10 min,分离血清,测量小鼠血清GLP-1含量,计算各组小鼠血清GLP-1的均数方差。

2.4 肠组织分泌GLP-1的L细胞检测^[8-10] 实验结束后禁食12h,脱颈椎处死小鼠,冰台上清理脂肪,迅速取回肠组织,4℃生理盐水清洗肠道,置4%多聚甲醛固定24h,进行修剪、脱水、包埋、切片、脱蜡、抗原修复、一抗孵育、二抗覆盖、DAPI复染,淬灭封片,荧光拍照显微镜下检查,每张切片选取3个目的区域200倍成像,拍摄GLP-1及DAPI荧光照片,使用图片分析软件分析回肠组织分泌GLP-1的L细胞及其他细胞数,计算分泌GLP-1的L细胞百分率。

L细胞百分率 = 回肠GLP-1染色区域面积 / (GLP-1及DAPI染色区域面积总和) × 100%

3 结果

3.1 对db/db小鼠食耗量和饮水量的影响 结果如表1、表2所示,与正常对照组比较,模型组小鼠周食耗量、周饮水量随时间进行性显著增多($P < 0.01$)。与模型组比较,多穗柯总黄酮100、200 mg/kg组的周食耗量、周饮水量显著减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表1 多穗柯总黄酮对db/db小鼠食耗量的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 (mg/kg)	周食耗量(g)				
		0 W	1 W	2 W	3 W	4 W
正常对照组	-	32.49 ± 2.61	32.12 ± 2.42	33.99 ± 2.53	31.50 ± 2.36	32.28 ± 2.57
模型组	-	43.63 ± 4.95 ^a	46.67 ± 4.13 ^a	48.73 ± 4.32 ^a	48.97 ± 3.79 ^a	49.67 ± 3.58 ^a
二甲双胍组	83	44.31 ± 4.66	41.22 ± 4.09 ^b	39.90 ± 4.27 ^c	35.95 ± 4.63 ^c	32.04 ± 3.75 ^c
多穗柯总黄酮组	100	44.11 ± 4.38	42.04 ± 4.39 ^b	39.82 ± 3.87 ^c	34.46 ± 3.65 ^c	33.21 ± 3.59 ^c
	200	43.86 ± 4.55	40.68 ± 4.32 ^b	36.56 ± 3.43 ^c	33.25 ± 3.59 ^c	30.29 ± 3.25 ^c

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$

表2 多穗柯总黄酮对db/db小鼠饮水量的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 (mg/kg)	周饮水量(mL)				
		0 W	1 W	2 W	3 W	4 W
正常对照组	-	39.52 ± 2.78	40.83 ± 2.78	41.67 ± 2.90	42.78 ± 2.65	40.89 ± 2.49
模型组	-	93.33 ± 5.49 ^a	97.83 ± 7.24 ^a	103.06 ± 6.54 ^a	101.11 ± 6.39 ^a	112.78 ± 6.78 ^a
二甲双胍组	83	90.58 ± 6.71	73.89 ± 6.85 ^c	70.00 ± 5.93 ^c	48.61 ± 5.34 ^c	44.72 ± 5.37 ^c
多穗柯总黄酮组	100	92.71 ± 6.05	75.83 ± 6.52 ^c	71.94 ± 7.09 ^c	64.17 ± 6.33 ^c	58.33 ± 5.91 ^c
	200	93.96 ± 5.03	70.00 ± 6.48 ^c	62.22 ± 5.49 ^c	56.39 ± 6.11 ^c	52.50 ± 5.47 ^c

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$

3.2 对db/db小鼠空腹血糖的影响 结果如表3所示,与正常对照组比较,模型组小鼠空腹血糖随时间进行性显著增高($P < 0.01$)。与模型组比

较,多穗柯总黄酮以100 mg/kg给药7、14d或以200 mg/kg给药均显著降低空腹血糖($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 3 多穗柯总黄酮对 db/db 小鼠空腹血糖的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 (mg/kg)	空腹血糖(mmol/L)				
		0 W	1 W	2 W	3 W	4 W
正常对照组	—	6.48 ± 0.51	6.75 ± 0.83	6.67 ± 0.77	6.28 ± 0.35	6.63 ± 0.71
模型组	—	17.22 ± 1.36 ^a	21.48 ± 1.88 ^a	24.77 ± 2.15 ^a	26.45 ± 2.48 ^a	27.43 ± 4.20 ^a
二甲双胍组	83	17.28 ± 1.49	19.22 ± 1.62 ^b	21.48 ± 1.87 ^c	23.88 ± 1.82 ^b	23.65 ± 2.29 ^b
多穗柯总黄酮组	100	16.93 ± 1.47	19.52 ± 1.42 ^b	22.07 ± 1.68 ^b	24.32 ± 2.59	25.97 ± 2.61
	200	17.05 ± 1.30	19.00 ± 1.24 ^c	21.68 ± 1.33 ^c	23.37 ± 2.09 ^b	23.73 ± 2.47 ^b

注: 与正常对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$

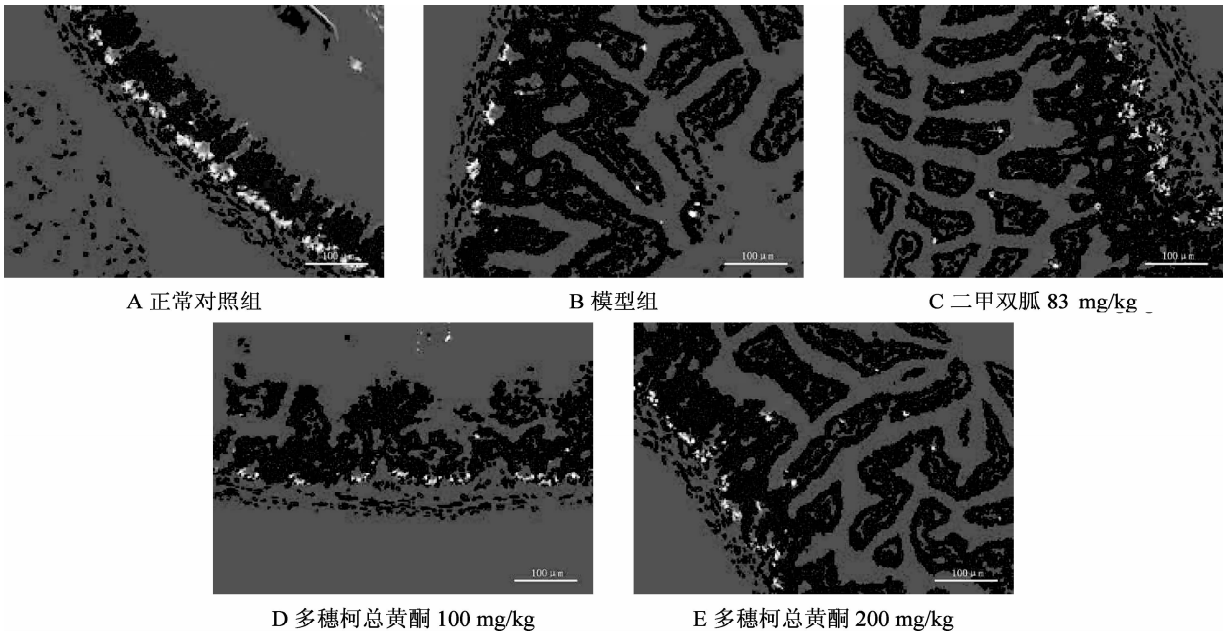
3.3 对 db/db 小鼠血清胰高血糖素样肽 1(GLP - 1) 的影响 结果如表 4 所示,与正常对照组比较,模型小鼠空腹、口服葡萄糖后血清 GLP - 1 含量明显降低($P < 0.01$)。与模型组比较,多穗柯总黄酮 100、200 mg/kg连续给药 28 d 显著升高空腹血清 GLP - 1 含量($P < 0.01$),多穗柯总黄酮 200 mg/kg 连续给药 28 d 能显著升高口服葡萄糖后 0.5、1.0 h 的血清 GLP - 1 含量($P < 0.05$)。

表 4 多穗柯总黄酮对 db/db 小鼠血清 GLP - 1 的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 (mg/kg)	GLP - 1(pg/mL)			
		0 min	30 min	60 min	120 min
正常对照组	—	154.06 ± 13.39	156.70 ± 14.33	172.55 ± 7.99	156.72 ± 9.04
模型组	—	108.45 ± 5.81 ^a	126.63 ± 13.58 ^a	145.22 ± 10.76 ^a	143.25 ± 11.62 ^a
二甲双胍组	83	124.48 ± 5.47 ^c	147.94 ± 13.67 ^c	160.05 ± 11.62 ^b	147.36 ± 11.72
多穗柯总黄酮组	100	120.99 ± 7.92 ^c	132.59 ± 18.80	151.62 ± 15.14	142.76 ± 16.31
	200	123.81 ± 6.85 ^c	143.42 ± 15.22 ^b	158.38 ± 9.34 ^b	150.31 ± 8.58

注: 与正常对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$

3.4 对 db/db 小鼠分泌 GLP - 1 细胞的影响 结果如表 5 所示,与正常对照组比较,模型组小鼠回肠分泌 GLP - 1 的 L 细胞数明显减少,肠组织细胞中的比例显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,多穗柯总黄酮 200 mg/kg 连续给药 28 d 明显增加回肠分泌 GLP - 1 的 L 细胞数,肠组织细胞中的比例显著增加($P < 0.01$)。肠组织免疫荧光检查结果如图 1 所示,正常对照组肠组织分泌 GLP - 1 的 L 细胞层连续光滑、致密,模型组小鼠肠组织分泌 GLP - 1 的 L 细胞层断续、离散,多穗柯总黄酮 100、200 mg/kg 连续给药 28 d 能使 db/db 小鼠分泌 GLP - 1 细胞层形态连续性、致密度明显优于模型组。



注: 白色, GLP - 1 阳性(分泌 GLP - 1 细胞); 深黑色, DAPI 细胞核
图 1 多穗柯总黄酮对 db/db 小鼠分泌 GLP - 1 细胞的影响(×200)

表5 多穗柯总黄酮对 db/db 小鼠分泌 GLP-1 细胞的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(mg/kg)	GLP-1(%)
正常对照组	-	4.64 ± 1.02
模型组	-	1.13 ± 0.70 ^a
二甲双胍组	83	3.76 ± 0.78 ^c
多穗柯总黄酮组	100	1.90 ± 0.89
	200	3.17 ± 0.70 ^c

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^c $P < 0.01$

4 讨论

db/db 小鼠是 C57 小鼠 4 号染色体瘦素受体基因定向敲除引起的一种自发性 2 型糖尿病模型小鼠,具有和人类 2 型糖尿病相似的临床症状,有多饮、多食、多尿、肥胖、高血糖、高胰岛素血症、胰岛素抵抗等特征,是理想 2 型糖尿病模型^[11]。与正常对照组比较,模型组食耗量、饮水量及空腹血糖值显著增高($P < 0.01$);与模型组比较,多穗柯总黄酮连续给予 28 d,db/db 小鼠多饮多食的糖尿病症状明显改善($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),表明多穗柯总黄酮能较好改善 db/db 小鼠糖尿病症状的作用。

GLP-1 受进食、胃肠神经等影响,糖类、脂肪营养物质刺激肠组织增加 GLP-1 分泌,使外周血 GLP-1 浓度增高,发挥“肠促胰岛素”作用,并促进胰腺葡萄糖依赖性胰岛素释放,调节体内餐后葡萄糖达到稳态^[12-14]。本实验开展口服糖负荷实验,与正常对照组比较,模型组糖后血清 GLP-1 含量明显降低($P < 0.01$);与模型组比较,多穗柯总黄酮连续给药 28 d 能显著增加小鼠空腹及糖后血清的 GLP-1 含量($P < 0.05$)。表明多穗柯总黄酮通过提高分泌 GLP-1 基础值来发挥 GLP-1 的降糖作用。

L 细胞是肠道分泌 GLP-1 的内分泌细胞,2 型糖尿病 GLP-1 分泌水平下降与肠道 L 细胞受损有关^[15-16]。本实验对肠组织进行 GLP-1 免疫荧光分析,正常对照组小鼠分泌 GLP-1 的 L 细胞层连续、光滑、致密、比例高;与正常对照组比较,模型组小鼠分泌 GLP-1 的 L 细胞层断续、疏散、比例低($P < 0.01$);与模型组比较,多穗柯总黄酮连续给药 28 d 后,db/db 小鼠分泌 GLP-1 的 L 细胞连续性较好、比例明显增多($P < 0.01$)。表明多穗柯总黄酮能提高 L 细胞分泌 GLP-1 的能力,减少糖尿病小鼠 L 细胞的损伤。

综上所述,多穗柯总黄酮能显著改善 db/db 小鼠多饮多食的糖尿病症状,降低空腹血糖值,提高空腹或餐后血清 GLP-1 水平,减少分泌 GLP-1 的肠组织 L 细胞的损伤,表明多穗柯总黄酮通过减少肠道 L

细胞损伤,保护其分泌 GLP-1 的功能,增加 GLP-1 的分泌,发挥多穗柯总黄酮防治糖尿病的作用。

参考文献:

- [1] 李晓倩,沈山梅. 中药干预对胰高血糖素样肽-1 水平影响的研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2012,14(4): 257-259.
- [2] 饶伟源,冉国粮,邱宏聪,等. 多穗柯质量标准研究[J]. 中南药学,2017,15(6): 814-817.
- [3] 李胜华,伍贤进,杨青丹,等. 多穗柯化学成分研究[J]. 中药材,2010,33(4): 549-551.
- [4] 韦宝伟,刘布鸣,曾宪彪,等. 木姜叶柯总黄酮对大小鼠血糖和糖耐量的影响[J]. 现代药物与临床,2012,27(1): 19-22.
- [5] 唐思梦,李红枝,陈伟强,等. 黄芩多糖与二甲双胍干预 2 型糖尿病大鼠的对比研究[J]. 中医药导报,2017,23(22): 12-16.
- [6] 李云鹏,郝二伟,白钢,等. 复方青芒降糖饮调节血糖的作用及其机制研究[J]. 中药材,2019,42(10): 2409-2414.
- [7] 魏世超,徐丽君,邹欣,等. 黄连有效成分及其组合物对荷糖小鼠胰岛素和胰高血糖素样肽 1(GLP-1)分泌影响的初步研究[J]. 中国医院药学杂志,2017,37(14): 1343-1347.
- [8] 杨雪蓉,张振华,徐杰,等. 健胰方通过调控胰高血糖素样肽-1 表达改善糖尿病大鼠胰岛细胞功能的研究[J]. 广州中医药大学学报,2017,34(2): 213-218.
- [9] 蔺晓源,邓娜,蔡莹. 四磨汤有效成分对慢性应激小鼠 Obestatin 及 GLP-1 的影响[J]. 中医药导报,2015,21(13): 44-51.
- [10] 王力. MYDGF 对 2 型糖尿病小鼠肠道 L 细胞分泌 GLP-1 的影响及机制研究[D]. 广州: 南方医科大学,2019.
- [11] 刘静,陆洁,裴天仙,等. 基因缺陷型 2 型糖尿病模型动物 db/db 小鼠早期生物学特性研究[J]. 药物评价研究,2013,36(1): 8-12.
- [12] Everard A PD can. Gut microbiota and GLP-1[J]. Rev Endoer Metab Disord,2014,15(3): 189-196.
- [13] Ezcurra M, Reimann F, Gribble FM, et al. Molecular mechanisms of incretin hormone secretion[J]. Curr Opin Pharmacol,2013,13(6): 922-927.
- [14] 严淋,罗和生. 胰高血糖素样肽-1 在胃肠道中的作用及机制的研究进展[J]. 胃肠病学和肝病杂志,2017,26(8): 944-947.
- [15] 李静,张振,姜新魁,等. 糖基化终末产物对肠道 L 细胞株胰高血糖素肽-1 分泌水平及 L 细胞凋亡的影响[J]. 广东医学,2015(7): 1013-1016.
- [16] Schonhoff S E, Giel molonev M, Leiter A B. Minireview: development and differentiation of gut endocrine cells[J]. Endocrinology,2004,145(6): 2639-2644.

(收稿日期:2021-07-16)