文章编号:1000-5404(2013)23-2597-03

短篇论著

荞麦花叶黄酮对2型糖尿病大鼠血糖稳态的影响

韩淑英[1],张博男[1],张静怡[2],韩 婷[1],储金秀[1],白 静[1] (063000 河北 唐山,河北联合大学基础医学院药理学系[1];063000 河北 唐山,唐山工人医院心血管内科[2])

[摘要] **目的** 观察荞麦花叶黄酮(flavones of buckwheat flower and leaf, FBFL)对糖尿病大鼠血糖波动的影响。**方法** 以4-硝基苯-α-D-吡喃葡萄糖苷(PNPG)为底物,测定不同浓度FBFL对α-葡萄糖苷酶活性的影响;用高脂饲料和小剂量链脲佐菌素(STZ)建立2型糖尿病(T2DM)胰岛素抵抗(IR)大鼠模型,用不同剂量FBFL干预6周,测定大鼠随机血糖、餐后血糖的动态变化,禁食24 h内血糖波动及糖耐量情况。**结果** FBFL对α-葡萄糖苷酶活性有明显的抑制作用,IC_{50}为4.205 mg/L,与阿卡波糖(ACAR)的效价比约为15.24∶1;FBFL能降低糖尿病大鼠随机和餐后血糖值($P<0.05$),并改善糖耐量,有明显的剂量和时间依赖性。**结论** FBFL可降低糖尿病大鼠随机和餐后血糖值,对血糖波动有稳定作用,其机制可能是通过抑制α-葡萄糖苷酶活性实现的。

[关键词] 荞麦花叶黄酮;血糖稳态;T2DM;α-糖苷酶
[中图法分类号] R282.71; R285.5; R587.1 [文献标志码] A

荞麦花叶黄酮(flavones of buckwheat flower and leaf, FBFL)为甜荞麦花叶提取的黄酮类成分,具有改善胰岛素抵抗,降低血糖,抑制或延缓并发症发生、发展的作用[1-2]。课题组前期研究发现FBFL对α-葡萄糖苷酶活性有抑制作用,并能抑制餐后血糖的升高[3]。在前期研究[4]的基础上,本研究以4-硝基苯-α-D-吡喃葡萄糖苷(PNPG)为底物,进一步测定FBFL对α-葡萄糖苷酶活性的抑制作用及其强度,观察FBFL对糖尿病大鼠血糖波动的影响,并探讨其可能机制,为FBFL临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

荞麦花叶为甜荞麦子粒收割后自然干燥的花叶(采自内蒙古库伦旗,经本校生药学专家鉴定),阿卡波糖(拜尔医药保健有限公司,批号:20110802),α-葡萄糖苷酶(Sigma公司),PNPG(Merck公司),还原型谷胱甘肽(北京欣经科生物技术有限公司),链脲佐菌素(STZ,Sigma公司),血糖试剂盒(上海科华东菱诊断用品有限公司,批号:20081121)。X-22R低温离心机(德国BECKMAN公司),MH2000电子水浴恒温槽(北京医疗设备总厂),酶标仪(BIO-RAD),血糖检测仪及配套试纸(韩国唐博士),THZ-82B型汽浴恒温振荡器(江苏省金坛市医疗仪器厂)。

1.2 FBFL的制备

荞麦花叶粉碎后用蒸馏水加热提取2次,滤液浓缩,加分离剂(酸性壳聚糖)搅拌,趁热过滤,滤液静置沉淀,过滤得黄色沉淀物,为总黄酮(用紫外分光光度法,以芦丁为标准,测得黄色沉淀物中总黄酮含量达95%)。

1.3 FBFL体外对α-葡萄糖苷酶活性的影响

参照Matsui等[5]方法略作改进,以PNPG为底物测定FBFL对α-葡萄糖苷酶活性的影响。反应在96孔板上进行,分别向板孔中加入不同稀释度的FBFL和阿卡波糖(ACAR)100 μL(样品终浓度为0.01~100 mg/L)、50 μL还原型谷胱甘肽(1 g/L)及25 μL α-糖苷酶(10 U/L),37 ℃保温10 min,加入50 μL PNPG(40 mmol/L),37 ℃保温15 min,加入60 μL Na_2CO_3(2 mol/L)终止反应。酶标仪测定505 nm波长下光密度值[$D(505)$],同时设阳性酶和空白对照,每个样品作5复孔。计算药物对α-糖苷酶的抑制率。抑制率=[1-$D(505)_{药物}/D(505)_{阳性酶}$]×100%,并采用Bliss法计算α-糖苷酶半数抑制浓度(IC_{50})。

1.4 2型糖尿病模型的建立[6-7]与分组给药

SPF级雄性SD大鼠(北京维通利华动物有限公司)70只,7~8周龄,体质量(200±20) g,合格证号SCXK(京)2006-0009。取10只作为正常对照组,给予普通饲料。余60只高脂饲料喂养16周,之后空腹12 h尾静脉注射STZ 12.5 mg/kg,连续3次,每次间隔72 h。STZ临用前用柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液稀释。末次注射STZ 72 h后,用血糖仪测定随机血糖>11.1 mmol/L为成模标准,血糖不达标的重复上述步骤,2次仍不达标者剔除。正常对照组仅注射等量枸橼酸缓冲液。大鼠普通饲料和高脂饲料(北京华阜康生物科技股份有限公司提供)为^{60}Co照射,合格证号:SCXK(京)2009-0008。在河北联合大学实验动物中心屏障环境实验室喂养和实验。

大鼠成模56只,弃去血糖值过高的1只大鼠,余下55只按随机数字表法分5组,每组11只,加正常对照共6组:①正常组,灌胃纯净水10 mL/kg;②模型组,灌胃纯净水10 mL/kg;③ACAR组,灌胃ACAR 10 mg/kg;④~⑥荞麦花叶黄酮低

[基金项目] 河北省自然科学基金(C2010001795);唐山市重点实验室项目(12150226B)
[通信作者] 韩淑英,E-mail:shuyinghan59@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130914.1457.010.html(2013-09-14)

(L-FBFL)、中(M-FBFL)、高(H-FBFL)剂量组,分别灌胃 FBFL 100、200、400 mg/kg;大鼠每天灌胃给药1次,连续6周。各组大鼠开始给药时均改为普通饲料喂养。

1.6 FBFL 对糖尿病大鼠餐后血糖的影响

大鼠分组后首先进行餐后血糖观察,分别灌胃给药:①正常组,蒸馏水+麦芽糖(GLG,2 g/kg);②模型组,蒸馏水+GLG(2 g/kg);③ACAR 组,10 mg/kg ACAR+GLG 2 g/kg;④L-FBFL 组,100 mg/kg FBFL+GLG 2 g/kg;⑤M-FBFL 组,200 mg/kg FBFL+GLG 2 g/kg;⑥H-FBFL 组,400 mg/kg FBFL+GLG 2 g/kg。所有大鼠禁食12 h后,分别于给药0 h和1 h取尾尖血,用血糖仪测空腹和餐后血糖。

1.7 FBFL 对糖尿病大鼠随机血糖动态观察

分别于给药0、2、4、6周后测定各组大鼠随机血糖值:各组大鼠灌胃给药后2 h,在非禁食情况下用血糖仪测定各鼠的血糖值(NFBG)。

1.8 FBFL 对糖尿病大鼠血糖稳态的影响

给药6周后,各组大鼠禁食不禁水12 h,称体质量,灌胃给药同时给予20%麦芽糖2 g/kg,之后禁食24 h,用血糖仪检测给予麦芽糖后1、2、6、12、24 h各时间点血糖水平。

1.9 FBFL 对糖尿病大鼠糖耐量(OGTT)的影响

末次给药后,各组大鼠禁食12 h,灌胃20%葡萄糖溶液10 mL/kg,分别于0、0.5、1、2 h用血糖仪测定血糖值,并计算OGTT曲线下面积,以评价各组大鼠的胰岛素敏感性。

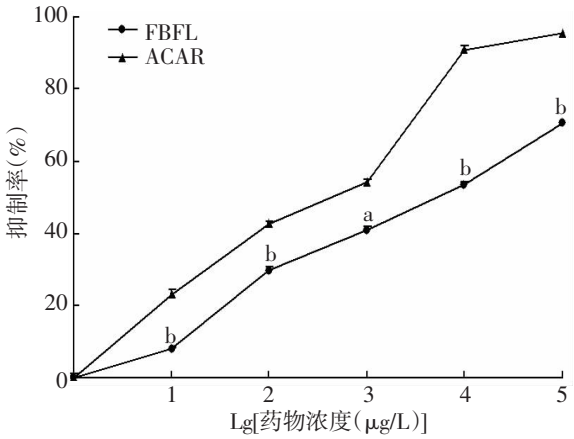
1.10 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 15.0 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 FBFL 对 α-糖苷酶活性的影响

图1显示,随着 FBFL 浓度的增加,其对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用也增加,有良好的浓度相关性,但弱于 ACAR。FBFL 对 α-糖苷酶的 IC_{50} 为 4.205 mg/L,ACAR 的 IC_{50} 为 0.276 mg/L,二者对酶抑制率达到50%时的效价比约为 15.24:1。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 ACAR 比较

图1 FBFL 和 ACAR 对 α-糖苷酶活性的抑制作用

2.2 FBFL 对糖尿病大鼠餐后血糖的影响

正常组大鼠餐后1 h血糖升高程度不明显,但糖尿病大鼠血糖明显升高,以模型组最高;与模型组比较,各剂量的 FBFL 均不同程度地抑制灌胃麦芽糖后血糖的升高($P<0.05$),对血糖升高的抑制率以 ACAR 最高,高剂量 FBFL 次之,但与 ACAR 组相比无明显差异,见表1。

表1 FBFL 对糖尿病大鼠餐后血糖的影响($\bar{x} \pm s$,mmol/L)

组别	n	餐前	餐后1 h	餐后1 h−餐前	抑制率(%)
正常组	10	4.48±0.51	7.06±2.09	2.58±1.12	
模型组	11	11.56±3.45[a]	21.14±3.58[a]	9.58±2.36[a]	
ACAR 组	11	11.79±2.54[a]	15.47±3.42[b]	3.68±1.26[b]	61.59
L-FBFL 组	11	11.38±3.01[a]	18.19±3.50	6.81±2.37	28.92
M-FBFL 组	11	11.44±2.82[a]	17.68±4.04[b]	6.24±2.51	34.86
H-FBFL 组	11	11.57±2.70[a]	16.02±3.16[b]	5.05±1.17[b]	53.56

a:$P<0.05$,与正常组比较;b:$P<0.05$,与模型组比较

2.3 FBFL 对糖尿病大鼠随机血糖影响的动态观察

模型组大鼠各时间点随机血糖值无明显变化,均显著高于正常组($P<0.05$);各剂量 FBFL 组大鼠随机血糖值均有不同程度的降低,随着给药时间的延长,其随机血糖降低更明显($P<0.05$),有明显的时间和剂量依赖性,M-FBFL 和 H-FBFL 作用与 ACAR 相近。见表2。

表2 各组大鼠随机血糖动态变化($\bar{x} \pm s$,mmol/L)

组别	n	第0周	第2周	第4周	第6周
正常组	10	5.26±0.53	5.37±0.47	5.61±0.64	5.58±0.81
模型组	11	17.14±3.31[a]	18.14±4.13[a]	19.80±3.91[a]	18.96±4.51[a]
ACAR 组	11	13.85±4.05[a]	10.72±3.59[b]	9.61±3.94[b]	10.27±3.47[b]
L-FBFL 组	11	16.32±4.72[a]	15.73±3.19[c]	14.65±4.25[bc]	13.58±4.14[bc]
M-FBFL 组	11	15.89±3.72[a]	14.56±4.63	13.97±3.47[bc]	11.44±2.80[b]
H-FBFL 组	11	14.67±3.83[a]	14.15±4.45[b]	13.24±3.27[b]	12.36±3.71[b]

a:$P<0.05$,与正常组比较;b:$P<0.05$,与模型组比较;c:$P<0.05$,与 ACAR 组比较

2.4 FBFL 对糖尿病大鼠血糖稳态的影响

正常组大鼠24 h内血糖波动幅度不大。各组糖尿病大鼠24 h血糖波动明显,尤其是模型组大鼠随着空腹时间的延长,其血糖与餐后1 h血糖的差值也显著增加;不同剂量 FBFL 治疗组大鼠随着空腹时间的延长,其血糖与餐后1 h血糖的差值也增加,但增加的幅度小于模型组。各组糖尿病大鼠空腹24 h血糖波动幅度最低者为 ACAR 组,其次为 H-FBFL 组,最大者为模型组。见表3。

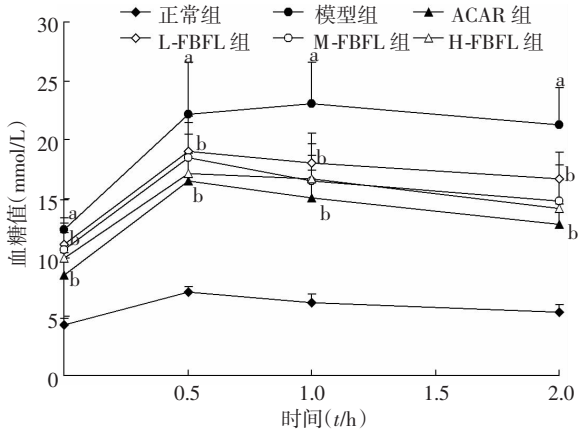
表3 FBFL 对糖尿病大鼠血糖稳态的影响($\bar{x} \pm s$,mmol/L)

组别	n	1 h	2 h	6 h	12 h	24 h
正常组	10	7.57±0.84	6.63±0.85	5.27±0.57	5.14±0.46	4.58±0.81
模型组	11	20.63±5.47	20.13±5.78[a]	16.59±4.23[a]	14.26±4.68[a]	5.36±1.86[a]
ACAR 组	11	11.46±4.58	10.47±5.63[a]	7.36±2.79[b]	6.67±2.63[b]	5.46±2.16[b]
L-FBFL 组	11	14.74±5.36	14.28±5.38[a]	12.64±3.26[c]	10.64±3.84[bc]	8.57±2.11[bc]
M-FBFL 组	11	12.75±4.27	12.85±4.52[a]	10.73±3.85	8.85±3.01[bc]	8.32±2.35[b]
H-FBFL 组	11	12.03±3.71	11.77±4.46[a]	10.24±3.68[b]	9.26±3.11[b]	8.35±2.46[b]

a:$P<0.05$,与正常组比较;b:$P<0.05$,与模型组比较;c:$P<0.05$,与 ACAR 组比较

2.5 FBFL对糖尿病大鼠OGTT的影响

图2显示,模型组大鼠糖耐量各点血糖值均明显高于正常组($P<0.05$)。FBFL组大鼠各点血糖值及血糖升高速度和幅度均明显低于模型组,特别是FBFL中、高剂量组作用更明显($P<0.05$),与ACAR组相近。



a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与正常组比较;b:$P<0.05$,与模型组比较比较

图2 FBFL对糖尿病大鼠糖耐量的影响

3 讨论

越来越多研究发现,糖尿病患者血糖波动越大,慢性并发症发生率越高、预后越差,血糖的高波动性对于死亡的影响要大于单纯性高血糖[8]。随着人们对血糖波动重要性的认识,学者们也越来越关注血糖稳态药物的开发与治疗研究[9]。本实验发现FBFL在体外对α-葡萄糖苷酶的活性有明显的抑制作用,并呈浓度依赖性。文献报道用高脂饲料喂养大鼠1~8周,STZ腹腔注射15~60 mg/kg建立大鼠2型糖尿病模型。本研究在参考文献[6-7]基础上加以改进,用高脂饲料喂养大鼠16周,并且12.5 mg/kg STZ尾静脉注射3次,成模率高,死亡率低,血糖稳定,模型大鼠随机血糖动态值均大于11.1 mmol/L。用FBFL干预糖尿病大鼠,结果表明:FBFL可不同程度地抑制糖尿病大鼠餐后血糖的升高($P<0.05$),高剂量抑制作用更明显,与阿卡波糖相近。对2型糖尿病大鼠随机血糖和餐后血糖动态观察表明,FBFL对餐后血糖有降低作用,且有剂量和时间依赖性。测定禁食24 h后血糖稳态及糖耐量结果表明:模型组大鼠随着空腹时间的延长,餐后血糖与空腹血糖的变异度也显著增加,FBFL组大鼠不仅随机血糖低于模型组,而且随着禁食时间的延长,特别是禁食12 h以后血糖降低的幅度明显低于模型大鼠;同时糖耐量结果也显示,FBFL组大鼠血糖升高的速度和幅度均低于模型组,表明FBFL对糖尿病大鼠血糖波动起稳定作用。

综上所述,FBFL调节血糖稳态的作用机制可能是抑制α-葡萄糖苷酶的活性和改善胰岛素抵抗,延缓糖的吸收,抑制餐后血糖的升高及夜间低血糖的发生,达到消峰去谷的作用,从而维持血糖的平稳。至于如何改善胰岛素抵抗,可能是通过抑制PTP1B表达[4]等多途径实现的,确切机制有待进一步研究。荞麦资源丰富,特别是从被废弃的荞麦花叶提取有效成分黄酮,研究开发保健食品或药品意义深远,值得深入研究。

参考文献:

[1] 韩淑英, 王志路, 储金秀, 等. 荞麦花叶黄酮对2型糖尿病大鼠胰岛素抵抗及肝组织PTP1B的影响[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(23): 3114-3118.

[2] 白静, 姜妍, 韩婷, 等. 荞麦花叶黄酮对2型糖尿病C57小鼠糖脂代谢及胰岛素抵抗的影响[J]. 广东医学, 2012, 33(13): 1876-1879.

[3] 朱丽艳, 郭兰, 王瑞雪, 等. 荞麦花总黄酮和槲皮素对α-葡萄糖苷酶活性的影响[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(5): 1135-1136.

[4] Gou X B, Han S Y, Xu J M, *et al*. Effect of total flavones of buckwheat flowers and leaves on protein tyrosine phosphatase 1B expression in type 2 diabetic rats[J]. Lat Am J Pharm, 2011, 30(7): 1377-1382.

[5] Matsui T, Ebuchi S, Fukui K, *et al*. Caffeoylsophorose, a new natural alpha-glucosidase inhibitor, from red vinegar by fermented purple-fleshed sweet potato[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2004, 68(11): 2239-2246.

[6] 杨架林, 李果, 刘优萍, 等. 长期高脂饮食加小剂量链脲佐霉素建立人类普通2型糖尿病大鼠模型的研究[J]. 中国实验动物学报, 2003, 11(3): 138-141.

[7] 陈健, 王沛坚, 马丽群, 等. 膳食辣椒素预防高脂饮食诱导的小鼠胰岛素抵抗[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(7): 585-588.

[8] 周健, 喻明, 贾伟平, 等. 应用动态血糖监测系统评估2型糖尿病患者日内及日间血糖波动幅度[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2006, 22(3): 286-288.

[9] Lamont B J, Drucker D J. Differential antidiabetic efficacy of incretin agonists versus DPP-4 inhibition in high fat fed mice[J]. Diabetes, 2008, 57(1): 190-198.

(**收稿**:2013-06-07;**修回**:2013-07-27)

(编辑 张 维)