

山楂叶总黄酮对链脲佐菌素诱导的糖尿病小鼠体内抗氧化酶活性及相关基因表达的影响

陈薇伊,徐兴军*,刘佳人,张伟伟,杨 焱,邵淑丽

齐齐哈尔大学生命科学与农林学院 抗性基因工程与寒地生物多样性保护黑龙江省重点实验室
寒区麻及制品教育部工程中心,齐齐哈尔 161006

摘要:糖尿病严重危害人类健康,其发病机制与氧化应激有关。山楂(*Crataegus pinnatifida* Bunge)作为药食兼用植物,其中的山楂叶总黄酮(total flavonoids from hawthorn leaf,TFHL)具有良好的抗氧化性。为了研究山楂叶总黄酮对糖尿病小鼠的抗氧化作用,以84只4周龄SPF级雄性ICR小鼠作为实验研究对象,将其随机分为空白对照组、模型对照组、DMSO模型对照组、山楂叶总黄酮高、中、低浓度组、阳性对照组,组间体质量差异不显著。各模型组小鼠以150 mg/kg一次性腹腔注射1%的链脲佐菌素(streptozotocin,STZ),构建STZ诱导的糖尿病小鼠模型,空白对照组注射等量的柠檬酸钠溶液。模型制备成功后,每天定时灌胃,灌胃28 d。试剂盒法检测小鼠血清和肝脏组织中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、总抗氧化能力(T-AOC)酶活性及丙二醛(MDA)含量,荧光定量PCR法测定抗氧化基因SOD-1、SOD-2、GPX-1、GPX-4表达量。结果表明:山楂叶黄酮能极显著提高糖尿病小鼠血清和肝脏中的SOD、T-AOC、GSH-PX酶活性($P < 0.01$),极显著降低MDA含量($P < 0.01$);并显著上调了糖尿病小鼠肝脏中SOD-1、SOD-2、GPX-1和GPX-4基因的表达。山楂叶黄酮能改善STZ诱导的糖尿病小鼠的氧化应激,提高其抗氧化能力。

关键词:山楂叶黄酮;糖尿病;抗氧化;基因表达

中图分类号:R285;R965.1

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2023)8-1314-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.8.004

Effect of total flavonoids from hawthorn leaf on antioxidant enzyme activity and related gene expression in streptozotocin-induced diabetic mice

CHEN Wei-yi, XU Xing-jun*,

LIU Jia-ren, ZHANG Wei-wei, YANG Ye, SHAO Shu-li

Department of Life Science and Agroforestry, Qiqihar University;

Key Laboratory of Resistance Genetic Engineering and Biodiversity Conservation in Cold Regions of Heilongjiang Province;
Engineering Center of Ministry of Education of Linen and Linen Products in Cold Regions, Qiqihar 161006, China

Abstract: Diabetes is a serious hazard to human health, and its pathogenesis is related to oxidative stress. Hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bunge) is a fruit-bearing shrub as a medicinal substance, in which total flavonoids from hawthorn leaf (TFHL) have favorable antioxidant properties. To explore the antioxidant effect of TFHL on diabetic mice, 84 four-week-old SPF male ICR mice were randomly divided into control group, model control group, DMSO model control group, model groups with high-, medium- and low-dose of TFHL and positive control group, there was no significant difference in body mass among all groups. The mice in each model group were intraperitoneally injected with 1% streptozotocin (STZ) at 150 mg/kg to construct STZ-induced diabetic mice, and the control group were injected with the same amount of sodium citrate solution. After the successful preparation of the model, the patients were given different concentrations of TFHL, or metformin hydrochloride or DMSO or water daily for 28 days. Then, enzyme activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-

PX), total antioxidant capacity (T-AOC) and malondialdehyde (MDA) content in serum and liver tissues of mice were measured by the reagent kit method; the expression of antioxidant genes *SOD-1*, *SOD-2*, *GPX-1* and *GPX-4* were detected by Real-time PCR. The results showed that TFHL significantly increased the activities of SOD, T-AOC and GSH-PX in the serum and liver of diabetic mice ($P < 0.01$), and reduced the content of MDA ($P < 0.01$). meanwhile the expression of *SOD-1*, *SOD-2*, *GPX-1* and *GPX-4* genes were increased in the liver of diabetic mice after treated with TFHL. These data suggested that TFHL can improve the oxidative stress in STZ-induced diabetic mice and enhance their antioxidant capacity.

Key words: total flavonoids from hawthorn leaf; diabetes mellitus; antioxidation; gene expression

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是一种以高血糖为特征的代谢性疾病,其患病率在全球逐年增长,现已成为第四位需要优先考虑的疾病^[1-3]。血糖浓度过高会引起机体代谢紊乱,导致组织损伤和功能障碍^[4]。这种疾病最常见的形式是1型和2型糖尿病^[5],这两种类型的特征是由于胰岛素产生不足(1型)^[6]或细胞对胰岛素敏感性的丧失而导致的高血糖被称为胰岛素抵抗(2型),虽然这两种糖尿病类型都有不同的病因,但它们都受到细胞氧化应激的影响。1型糖尿病发病的核心机制是遗传、环境、免疫因素交互作用导致的胰岛 β 细胞特异性损伤,造成胰岛素绝对不足^[7,8],目前治疗该病的药物主要是胰岛素,但由于胰岛素特殊的给药方式影响了患者的依从性和其自身的治疗效果,包括低血糖事件、体重增加以及酮症酸中毒等副作用,因此寻求胰岛素外的药物帮助1型糖尿病患者控制血糖具有重要的临床意义。

山楂(*Crataegus pinnatifida* Bunge)既可食用又可作为药用,山楂叶具有降血脂、降糖、降血压等多种药理活性,同时还具备抗氧化的作用。山楂叶中富含多种生物活性成分, Li等^[9]研究表明,山楂叶中的多糖类化合物具有清除DPPH和OH自由基的能力。Hu等^[10]研究表明,山楂叶黄酮可通过上调LDLR的表达,促进清除高脂血症小鼠肝脏中游离的胆固醇,从而改善小鼠脂质代谢紊乱。Zhang等^[11]研究表明,脊髓损伤大鼠通过腹腔注射山楂叶总黄酮可抑制细胞凋亡,促进运动功能恢复。Li等^[12]研究表明,山楂叶总黄酮可显著提升非酒精性脂肪肝病肝细胞中超氧化物歧化酶(speroxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-PX)水平,降低丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量,提升机体抗氧化能力,从而延缓或阻止非酒精性脂肪肝病的进展。

本试验首先通过注射链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)构建糖尿病小鼠模型,再将山楂叶黄酮

(total flavonoids from hawthorn leaf, TFHL)按照不同浓度灌胃建模成功的糖尿病小鼠,探究山楂叶黄酮对糖尿病小鼠的抗氧化作用,为山楂的开发利用以及糖尿病的预防和治疗提供借鉴和参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物与主要药物

研究对象购自吉林长春亿斯实验动物技术有限责任公司,合格证号:SCXK(吉)-2020-00 01。为84只4周龄SPF级雄性ICR小鼠(22.00 ± 2.00)g,并在齐齐哈尔大学生命学院动物生理学实验室进行了为期1周的适应性饲养。山楂叶黄酮购自成都埃法生物科技有限公司,纯度90%。本实验经过齐齐哈尔大学动物伦理委员会批准实施,伦理审批号:QiqiharUEC20220507。

1.2 糖尿病模型的制备

实验室适应性饲养1周后,测定小鼠血糖及体质量,按组间体质量差异不显著($P > 0.05$)随机选12只为空白对照组(control group, Con),其余72只均为模型组。各模型组小鼠一次性按150 mg/kg腹腔注射浓度为1%的链脲佐菌素,构建STZ诱导的糖尿病小鼠模型,空白对照组注射等量的配置链脲佐菌素溶液所使用的溶剂—柠檬酸钠。注射前禁食12 h,注射后可自由饮食、饮水,注射72 h后测定小鼠空腹血糖浓度。小鼠空腹血糖 ≥ 11.1 mmol/L,并表现出明显的多饮、多食、多尿症状,造模成功。

1.3 动物分组与给药方法

选取造模成功的小鼠72只,随机分为120 mg/(kg·d)的山楂叶黄酮高浓度组(high dose of total flavonoids from hawthorn leaf, TFHL-H)、60 mg/(kg·d)的山楂叶黄酮中浓度组(medium dose of total flavonoids from hawthorn leaf, TFHL-M)、30 mg/(kg·d)的山楂叶黄酮低浓度组(low dose of total flavonoids from hawthorn leaf, TFHL-L)、阳性对照组(positive control group, Pos)、模型组(model control group, Mod)和DMSO模型对照组(DMSO model control group, DMSO),每组数量为12只,空白组和模型

组灌胃蒸馏水,阳性对照组灌胃 300 mg/(kg·d) 的盐酸二甲双胍。各组小鼠自然光照,饮食、饮水,于室温下每天定时灌胃 4 周。

1.4 小鼠血糖及口服糖耐量的测定

利用血糖仪(GA-3 型)测定小鼠空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)浓度,采用剪尾取血法,将得到的血液滴到载玻片上并用血糖仪进行测量,操作前后均进行消毒。测定小鼠空腹血糖(0 min)后,小鼠按 2 g/kg 灌胃葡萄糖,进行尾尖采血,以血糖仪检测糖灌胃后 15、30、60、120 min 的血糖值为口服糖耐量(oral glucose tolerance test, OGTT)。

1.5 抗氧化酶活性测定

最后一次灌胃后,小鼠禁食 24 h,并通过断颈法

处死小鼠。将血液离心以制备血清。肝脏在低温条件下解剖,用预先冷却的生理盐水清洗,并在 -80 °C 下保存在冰箱中供日后使用。用试剂盒法测定 T-AOC、SOD、GSH-PX 酶活性和 MDA 含量。

1.6 抗氧化酶相关基因表达测定

根据小鼠 *SOD-1* (NM_011434.2)、*SOD-2* (NM_013671.3)、*GPX-1* (NM_008160.6)、*GPX-4* (NM_008162.4) 和 *GAPDH* (NM_001289726.1) 的基因序列设计引物,序列如表 1 所示。从小鼠肝脏样本中提取总 RNA,使用 Prime Script™ RT 试剂盒将总 RNA 反转录到 cDNA 中,使用逆转录合成的 cDNA 作为模板,内部参照 *GAPDH*,并使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 该方法计算基因的相对表达。

表 1 引物信息
Table 1 Primer information

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')	产物大小 Product size(bp)
<i>SOD-1</i>	F:5'-CTTCCACCATGCCATGCCAGAG-3' R:5'-AGCAACCGACCAACAAGCAAGG-3'	269
<i>SOD-2</i>	F:5'-TGAGGAGAGCAGCGGTCTG-3' R:5'-TCGGTGGCCTTGAGATTGTTTCAC-3'	344
<i>GPX-1</i>	F:5'-TGCCGAATGCCTTGCCAACAC-3' R:5'-AGCCACTAATCACCAAGCCAATGC-3'	261
<i>GPX-4</i>	F:5'-AGAAGAAGGTGTCTGGAGGTGAGG-3' R:5'-AACCACGCAGCCAACCATGTC-3'	247
<i>GAPDH</i>	F:5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3' R:5'-TGTAGACCATGTACTTGAGGTCA-3'	123

1.7 数据处理

采用 SPSS21.0 软件包对试验数据进行数据分析,Graphpad Prism 7.0 作图。试验结果数据均以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果与分析

2.1 山楂叶黄酮对 STZ 诱导的糖尿病小鼠血糖及口服糖耐量的影响

由表 2 可知,试验期间,空白对照组小鼠血糖呈

动态平衡,DMSO 对照组和水模型对照组小鼠血糖浓度持续上升,各黄酮试验组和阳性对照组总体呈下降趋势。试验结束后,各黄酮试验组小鼠血糖显著低于 DMSO 模型对照组 ($P < 0.05$),低酮组极显著低于 DMSO 模型对照组和水模型对照组 ($P < 0.01$),并且与阳性对照组相比组间差异不显著 ($P > 0.05$)。山楂叶黄酮可以降低糖尿病小鼠血糖浓度。

表 2 不同浓度山楂叶黄酮对糖尿病小鼠空腹血糖值的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 2 Effect of different concentrations of TFHL on fasting blood glucose in diabetic mice($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别 Group	空腹血糖值 Fasting blood glucose (mmol/L)				
	0 w	1 w	2 w	3 w	4 w
Con	5.23 ± 0.73 **	5.30 ± 0.36 **	5.27 ± 0.20 **	5.73 ± 0.24 **	5.43 ± 0.44 **
DMSO	14.57 ± 0.90	15.87 ± 0.9	17.07 ± 0.45	18.57 ± 0.69	19.43 ± 0.56
Mod	16.77 ± 1.04	15.80 ± 0.74	16.83 ± 1.16	17.20 ± 1.37	18.03 ± 0.64

续表 2 (Continued Tab. 2)

组别 Group	空腹血糖值 Fasting blood glucose (mmol /L)				
	0 w	1 w	2 w	3 w	4 w
Pos	15.93 ± 1.15	15.61 ± 1.21	7.57 ± 1.41 **	9.07 ± 2.53 **	9.50 ± 1.78 **
TFHL-H	15.53 ± 1.27	12.53 ± 1.81	10.20 ± 0.76 **	10.87 ± 1.75 *	14.57 ± 1.30 **
TFHL-M	15.13 ± 0.41	13.63 ± 0.32	12.73 ± 1.48 **	12.57 ± 1.51 **	15.03 ± 1.01 **
TFHL-L	14.13 ± 0.67	12.37 ± 0.50	11.47 ± 0.52	10.23 ± 0.49 **	11.40 ± 0.47 **

注:与 Mod 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。下同。

Note: Compared with Mod, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. The same below.

由表 3 可知,空白对照组、阳性对照组及中酮组均在 15 min 时有葡萄糖峰值,此时空白对照组血糖浓度为 15.00 ± 1.92 mmol/L,阳性对照组血糖浓度为 20.13 ± 1.88 mmol/L,中酮组血糖浓度为 22.90 ± 1.07 mmol/L。高酮组和低酮组在 30 分钟时有葡萄糖峰值,此时高酮组血糖浓度为 21.87 ± 0.32

mmol/L,低酮组血糖浓度为 19.50 ± 0.57 mmol/L。DMSO 模型对照组和水模型对照组在 60 分钟时有葡萄糖峰值,此时 DMSO 模型对照组血糖浓度为 27.40 ± 0.46 mmol/L,水模型对照组血糖浓度为 26.37 ± 0.48 mmol/L。山楂叶黄酮可以改善糖尿病小鼠葡萄糖峰值时间。

表 3 不同浓度山楂叶黄酮对糖尿病小鼠口服糖耐量的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)Table 3 Effect of different concentrations of TFHL on OGTT in diabetic mice($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别 Group	血糖值 Blood glucose (mmol /L)				
	0 min	15 min	30 min	60 min	120 min
Con	5.03 ± 0.15 **	15.00 ± 1.92 **	12.23 ± 0.87 **	10.80 ± 1.20 **	6.33 ± 0.90 **
DMSO	24.43 ± 0.55	25.50 ± 0.55 *	26.43 ± 0.32	27.40 ± 0.46	23.83 ± 1.24
Mod	23.40 ± 0.72	24.30 ± 0.42	25.60 ± 0.36	26.37 ± 0.48	23.57 ± 0.44
Pos	13.20 ± 3.11	20.13 ± 1.88 **	17.87 ± 1.64 **	17.87 ± 1.68 **	14.87 ± 2.68 **
TFHL-H	18.47 ± 0.54 **	16.57 ± 0.44 **	21.87 ± 0.32 **	19.57 ± 0.39 **	21.27 ± 0.50 **
TFHL-M	13.50 ± 1.16 **	22.90 ± 1.07	15.93 ± 0.67 **	21.30 ± 0.66 **	15.40 ± 0.45 **
TFHL-L	13.87 ± 0.78 **	14.43 ± 0.72 **	19.50 ± 0.57 **	17.90 ± 1.04 **	16.07 ± 0.91 **

2.2 山楂叶黄酮对 STZ 诱导的糖尿病小鼠胰岛素变化的影响

由图 1 可知,空白对照组小鼠胰岛素含量最高,水模型和 DMSO 对照组小鼠胰岛素含量最低,各试

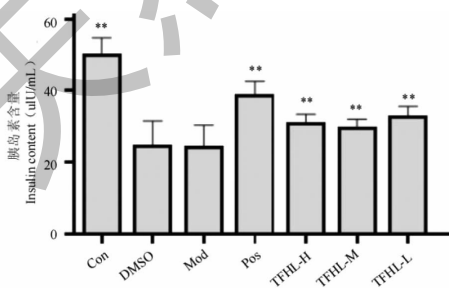


图 1 不同浓度山楂叶黄酮对糖尿病小鼠胰岛素变化的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Fig. 1 The effect of different concentrations of TFHL on insulin changes in diabetic mice($\bar{x} \pm s, n = 12$)

验组及阳性对照组胰岛素含量由大到小依次为阳性对照组、低酮组、高酮组、中酮组。其中 DMSO 对照组与水模型对照组比组间差异不显著 ($P > 0.05$);水模型对照组与高酮组、中酮组、低酮组相比组间差异均极显著 ($P < 0.01$)。山楂叶黄酮可增加糖尿病小鼠体内胰岛素含量。

2.3 山楂叶黄酮对 STZ 诱导的糖尿病小鼠血清中 SOD、T-AOC、GSH-PX 和 MDA 的影响

由表 4 可知,小鼠血清中,DMSO 模型对照组和水模型对照组的 T-AOC、SOD、GSH-PX 酶活性以及 MDA 含量差异不显著 ($P > 0.05$);水模型对照组 T-AOC、SOD 及 GSH-PX 酶活性极显著低于各黄酮实验组 ($P < 0.01$);水模型对照组 MDA 含量极显著高于各黄酮实验组 ($P < 0.01$)。山楂叶黄酮可提高糖尿病小鼠血清中 T-AOC、GSH-PX 以及 SOD 酶活性,降低 MDA 含量。

表 4 不同浓度山楂叶黄酮对糖尿病小鼠血清中 SOD、T-AOC、GSH-PX 和 MDA 的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)Table 4 Effect of different concentrations of TFHL on SOD, T-AOC, GSH-PX and MDA in serum of diabetic mice($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别 Group	SOD (U/mL)	T-AOC (U/mL)	GSH-PX (U/mL)	MDA (nmol/mL)
Con	7.37 ± 0.42 **	0.94 ± 0.01	25.01 ± 0.47 **	0.65 ± 0.01 **
DMSO	4.52 ± 0.17	0.93 ± 0.01	3.57 ± 0.17	6.61 ± 0.01
Mod	4.53 ± 0.22	0.93 ± 0.01	3.93 ± 0.17	6.63 ± 0.01
Pos	13.18 ± 0.95 **	0.98 ± 0.01 **	10.90 ± 0.17 **	1.42 ± 0.01 **
TFHL-H	7.57 ± 0.59 **	1.09 ± 0.01 **	9.65 ± 0.54 **	2.59 ± 0.01 **
TFHL-M	7.68 ± 0.34 **	1.07 ± 0.01 **	9.11 ± 0.54 **	3.19 ± 0.02 **
TFHL-L	6.23 ± 0.20 **	1.00 ± 0.01 **	8.58 ± 0.31 **	3.20 ± 0.01 **

2.4 山楂叶黄酮对 STZ 诱导的糖尿病小鼠肝脏中 SOD、T-AOC、GSH-PX 和 MDA 的影响

由表 5 可知,小鼠肝脏中,DMSO 模型对照组和水模型对照组 SOD 酶活性显著低于各黄酮实验组 ($P < 0.05$),而 MDA 含量极显著高于各黄酮实验组

($P < 0.01$);各黄酮实验组 T-AOC 和 GSH-PX 酶活性极显著高于 DMSO 模型对照组和水模型对照组 ($P < 0.01$)。山楂叶黄酮可提高糖尿病小鼠肝脏中 T-AOC、GSH-PX 以及 SOD 酶活性,降低 MDA 含量。

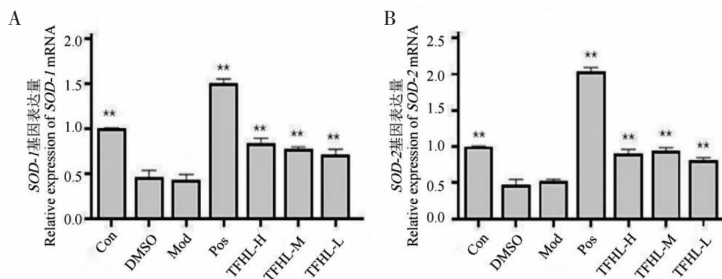
表 5 不同浓度山楂叶黄酮对糖尿病小鼠肝脏中 SOD、T-AOC、GSH-PX 和 MDA 的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)Table 5 Effect of different concentrations of TFHL on SOD, T-AOC, GSH-PX and MDA in the liver of diabetic mice($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别 Group	SOD (U/mg. prot)	T-AOC (U/mg. prot)	GSH-PX (U/mg. prot)	MDA (nmol/mg. prot)
Con	4.17 ± 0.08 **	0.44 ± 0.01	36.09 ± 0.47 **	0.13 ± 0.01 **
DMSO	2.35 ± 0.11	0.45 ± 0.01	10.54 ± 0.36	1.27 ± 0.06
Mod	2.40 ± 0.14	0.45 ± 0.01	10.36 ± 0.18	1.28 ± 0.06
Pos	6.23 ± 0.02 **	0.53 ± 0.01 **	31.98 ± 0.47 **	0.31 ± 0.04 **
TFHL-H	3.24 ± 0.11 **	0.73 ± 0.01 **	24.83 ± 0.47 **	0.52 ± 0.01 **
TFHL-M	3.18 ± 0.14 **	0.71 ± 0.01 **	24.30 ± 0.18 **	0.66 ± 0.02 **
TFHL-L	2.96 ± 0.05 **	0.58 ± 0.01 **	21.62 ± 0.47 **	0.64 ± 0.01 **

2.5 山楂叶黄酮对 STZ 诱导的糖尿病小鼠体内抗氧化基因相对表达量的影响结果

由图 2、3 可知,小鼠肝脏中各黄酮实验组 SOD-1、SOD-2、GPX-1、GPX-4 基因的表达量均极显著高于 DMSO 模型对照组和水模型对照组 ($P < 0.01$),

其中各黄酮实验组 GPX-4 基因表达量与阳性对照组相比差异不显著 ($P > 0.05$)。糖尿病小鼠经山楂叶黄酮灌胃 4 周后,肝脏中 SOD-1、SOD-2、GPX-1 及 GPX-4 四种抗氧化基因的表达量均有极显著提升。

图 2 不同浓度山楂叶黄酮对糖尿病小鼠 SOD-1 基因 (A) 和 SOD-2 基因 (B) 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)Fig. 2 Effect of different concentrations of TFHL on SOD-1 gene (A) and SOD-2 (B) gene expression in diabetic mice($\bar{x} \pm s, n = 12$)

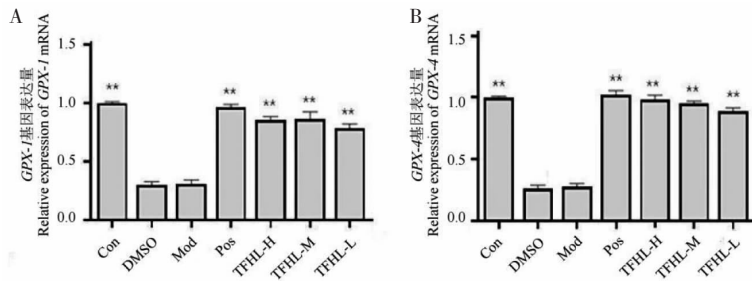


图3 不同浓度山楂叶黄酮对糖尿病小鼠 *GPX-1* 基因 (A) 和 *GPX-4* 基因 (B) 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Fig. 3 Effect of different concentrations of TFHL on *GPX-1* gene (A) and *GPX-4* gene (B) expression in diabetic mice ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

3 讨论及结论

血糖是身体细胞、组织、器官重要的能量来源^[13]。口服糖耐量试验能够对机体胰岛 β 细胞功能、糖代谢状况进行评估^[14]。Huang 等^[15]研究表明,鱼腥草总黄酮能降低 1 型糖尿病小鼠的血糖。上述研究表明黄酮类化合物对糖尿病的治疗有积极作用。本试验结果显示,山楂叶黄酮可降低糖尿病小鼠血糖浓度并改善葡萄糖峰值时间,与上述研究结果相一致。胰岛素是体内唯一降糖激素^[16],通过其含量可判断糖尿病病变程度。本试验结果显示,山楂叶黄酮可增加小鼠体内胰岛素含量,降低糖尿病小鼠血糖浓度,这与 Zeng 等^[17]研究桑叶黄酮可显著降低糖尿病小鼠血糖水平,改善其糖代谢的结果相一致。在本试验结果中,低剂量山楂叶黄酮降低血糖的效果最好,这可能是由于低剂量山楂叶黄酮会首先作用于胰腺,促进胰岛素的分泌进而使血糖降低,而高剂量山楂叶黄酮会首先作用于肝脏,修复肝脏的损伤,使相应的基因表达增强。这与 Zhang^[18]、Lu^[19] 等的研究结果一致。

目前研究显示,糖尿病发病机制复杂,其重要的发病机制为活性氧自由基积累使机体抗氧化能力下降^[20,21]。Liu 等^[22]研究表明,准噶尔山楂叶中三种黄酮成分均有清除自由基的功能;根据本次实验,由各组数据显示,发现山楂叶黄酮能显著提高血清和肝脏中抗氧化酶活性,并使 MDA 含量降低,可能有以下几个方面的原因,一是由于半甙式自由基其性质较稳定,而在体内的自由基能与山楂叶黄酮中的酚羟基发生反应,生成稳定的半甙式自由基,从而终止了自由基链式反应,链式反应终止使机体抗氧化能力提高。二是 MDA 的含量可以因为脂质过氧化反应而增加,机体过量的自由基会导致此反应产生。山楂叶黄酮可以抑制脂质过氧化,血清和肝脏中

MDA 含量不会因此增加,机体抗氧化能力也就随之增强。三是山楂叶黄酮中黄酮种类较多,当 B 环存在邻羟基时,2,3 位双键对 B 环失去电子后自旋产生稳定的自由基,4 位羰基能和邻羟基生成氢键,使得自由基中间体更加平稳。此外,在细胞中存在 Fenton 反应 ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \cdot\text{OH} + \cdot\text{OH}^-$),牡荆素可与 Fe^{2+} 发生络合反应,络合位点在 4-羰基-5-羟基之间,络合 Fe^{2+} 可有效减少 $\cdot\text{OH}$ 的生成,形成络合物沉淀,减少自由基,提高机体抗氧化能力。山楂叶黄酮可提高 1 型糖尿病小鼠肝脏和血清中抗氧化酶的活性,降低 MDA 含量,使机体抗氧化能力得到增强。抗氧化基因的表达与抗氧化酶的抗氧化作用密切相关。

当机体氧化程度超出氧化物清除能力,氧化和抗氧化系统稳定性被破坏,造成氧化损伤^[23]。低水平氧化应激状态下机体的抗氧化蛋白在抗氧化反应元件 (antioxidant-response element, ARE) 或亲电反应元件 (electrophilic response element, EpRE) 的顺式作用元件介导下被激活^[24]。ARE 可从转录水平上调控抗氧化酶对机体氧化应激状态下的反应^[25]。正常生理情况下,核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid-2 related factor 2, Nrf2) 与 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1 (epoxy chloropropane kelch sample related protein-1, Keap1) 相结合于胞浆中,活性被抑制,在泛素蛋白酶作用下降解,以保持生理状态下 Nrf2 的低转录活性^[26],当细胞处于氧化应激状态下时,原本相结合的 Nrf2 与 Keap1 解偶联,活化了的 Nrf2 进入细胞核后与小 Maf 蛋白形成二聚体,进而识别并结合 ARE 元件,启动下游基因转录,机体抗氧化酶的转录活性因此被提高,故而平衡机体氧化损伤^[27]。

在本试验中,糖尿病小鼠经山楂叶黄酮灌胃 4

w 后,肝脏中 *SOD-1*、*SOD-2*、*GPX-1* 及 *GPX-4* 四种抗氧化基因的表达量均有极显著提升,其原因可能有两方面,一方面可能由于糖尿病小鼠体内氧化应激较为严重,使得机体抗氧化系统无法平衡自由基进攻,从而造成细胞的严重氧化损伤并且机体内源性抗氧化系统无法消除自由基,山楂叶黄酮不但可消除体内自由基,亦可与金属离子发生络合作用,减少自由基和金属离子对细胞的氧化损伤,促进 Nrf2 的核内转位,增加 Nrf2 的表达,进而增加糖尿病小鼠肝脏中 *SOD-1*、*SOD-2*、*GPX-1* 及 *GPX-4* 基因的表达量。另一方面可能由于糖尿病小鼠体内抗氧化酶活性降低,导致体内自由基增加,造成细胞氧化损伤,引起线粒体系统供能不足以及 DNA、RNA 转录受阻,使患病小鼠肝脏中抗氧化基因的表达量极显著降低。由于山楂叶黄酮均有清除体内自由基的作用,灌胃后,小鼠细胞中 DNA、RNA 转录得到改善,使糖尿病小鼠肝脏中 *SOD-1*、*SOD-2*、*GPX-1* 及 *GPX-4* 基因的表达量得到提高。Deng 等^[28] 研究表明,槲皮素可激活乙醇孵育的人原代肝细胞中 Nrf2 的核转位表达。Ganesan^[29]、Zhang^[30] 等的研究表明,牡荆素通过激活 β 细胞调节凋亡的关键蛋白,包括 NF- κ B 和 Nrf2,从而改善胰岛素分泌。均与本试验结果相一致。

结果表明,山楂叶黄酮可使 MDA 含量极显著降低,并极显著提高 STZ 诱导的糖尿病小鼠血清和肝脏中 T-AOC、SOD 以及 GSH-PX 酶活性。山楂叶黄酮可显著上调 STZ 诱导的糖尿病小鼠肝脏中 *SOD-1*、*SOD-2*、*GPX-1*、*GPX-4* 基因的表达量。综上所述,山楂叶黄酮可改善糖尿病氧化损伤,具有良好的抗氧化作用,在对于糖尿病的治疗与相关药物研发上具有良好的发展前景。

参考文献

- 1 Yao WL, Yan Y, Qu DQ, et al. Research progress on the relationship between triacylglycerol/high-density lipoprotein cholesterol ratio and complications of diabetes [J]. *Chin Gen Pract* (中国全科医学), 2021, 24: 2232-2237.
- 2 Guan ZA. *Modern Diabetes (现代糖尿病学)* [M]. Tianjin: Tianjin Science and Technology Press, 2000.
- 3 Fan LF. Nursing progress of diabetes [J]. *Chin J Nurs* (中华护理杂志), 1997, 32: 613-617.
- 4 Qian RL. New diagnostic criteria and classification of diabetes [J]. *Chin J Diabetes* (中国糖尿病杂志), 2000, 8: 5-6.
- 5 Guo XH. Diabetes patients should pay attention to weight change [J]. *Diabetes New World* (糖尿病新世界), 2010, 7: 20.
- 6 Huang XJ. Correlation between body fat content and vascular complications in type 1 diabetes patients [J]. *Nurs Pract Res* (护理实践与研究), 2020, 17: 27-29.
- 7 Gao XJ, Luo SY, Tang KJ, et al. Preliminary study on the effect of hawthorn crude glycoprotein on reducing lipid and antioxidation in hyperlipidemic mice [J]. *Food Ferment Ind* (食品与发酵工业), 2021, 47: 138-142.
- 8 Wang DM. Experimental Study on the Effect of Hawthorn Extract on Regulating Blood Lipid [J]. *Clin J Tradit Chin Med* (中医药临床杂志), 2012, 24: 1147-1148.
- 9 Li Z, Li NN, Wang YB, et al. Effect of different extraction methods on extraction rate and antioxidant activity of hawthorn leaf polysaccharide [J]. *J Henan Univ Sci Technol: Nat Sci* (河南科技学院学报: 自科版), 2020, 48: 37-44.
- 10 Hu HM, Guan Y, Weng JJ, et al. Effect of hawthorn leaf flavone on regulating lipid and protecting liver in hyperlipidemic mice and on the expression of HMGCR and LDLR in liver tissue [J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药学), 2020, 37: 2599-2604.
- 11 Zhang Q, Xiong Y, Li B, et al. Total flavonoids of hawthorn leaves promote motor function recovery via inhibition of apoptosis after spinal cord injury [J]. *Neural Regen Res*, 2021, 16: 350-356.
- 12 Li CY, Wang Y, Deng D, et al. Antioxidant effect of total flavones from hawthorn leaves on hepatocytes in patients with nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Chin J Integr Tradit West Med Liver Dis* (中西医结合肝病杂志), 2019, 29: 54-56.
- 13 Zhang XY, Zhang HH, Liu HL, et al. Effects of different copper sources on production performance, serum biochemical indexes and liver related gene expression of raccoon dog in winter wool period [J]. *Chin J Anim Nutr* (动物营养学报), 2020, 32: 5884-5892.
- 14 Huang CH, Lv Y. Effect of different doses of 50% glucose injection on the results of oral glucose tolerance test [J]. *Drug Eval* (药品评价), 2020, 17: 7-8.
- 15 Huang CS, Zhang JW, Zhao S, et al. Effects of total flavonoids of *Houttuynia cordata* Thunb on blood glucose and serum SOD level in type 1 diabetes mice [J]. *Jiangsu Med J* (江苏医药), 2020, 46: 873-876.
- 16 Fu XR, Fan Y, Li X, et al. The Mechanism of astragalus flavone and saponins on regulating insulin secretion in diabetes rats based on pancreatitis factors [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm* (中华中医药杂志), 2019, 34: 4345-4349.
- 17 Zeng ZL, Zhou JY, Liu KH, et al. Regulation of myocardial mitochondrial function and fibrosis progression in diabetic

- model[J]. Prog Mod Biomed(现代生物医学进展), 2022, 22:1234-1238.
- 18 Zhang SQ, Qin CQ, Wang QQ, et al. Effect of capsaicin on glucose metabolism in type 1 diabetic rats[J]. Acta Nutr Sin(营养学报), 2017, 39:76-80.
- 19 Lu MT, Ren TY, Yang J, et al. Effect of pepper essential oil on glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetic mice[J]. Food Sci(食品科学), 2021, 42:115-122.
- 20 Liu Y, Zhao MY. Effect of metformin combined with insulin intervention on pregnancy outcome in patients with gestational diabetes[J]. J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 2021, 38:192-196.
- 21 Liu T, Hu J, Zuo Y, et al. Identification of microRNA-like RNAs from *Curvularia lunata* associated with maize leaf spot by bioinformation analysis and deep sequencing[J]. Mol Genet Genomics, 2016, 291:587-596.
- 22 Liu W, Ou YY, He XX, et al. Study on extraction, determination and antioxidant activity of total flavonoids from the leaves of *Junggar hawthorn*[J]. J Yili Norm Univ: Nat Sci(伊犁师范学院学报: 自科版), 2016, 10:59-64.
- 23 Huang XJ, Xu XL, Yang QY, et al. Efficacy and biological safety of lopinavir/ ritonavir based anti-retroviral therapy in HIV-1-infected patients: ameta-analysis of randomized controlled trials[J]. Sci Rep, 2015, 5:8528-8536.
- 24 Hu LF, Wang Y, Ren RJ, et al. Antioxidant stress and its regulatory mechanism of Keap1-Nrf2/ARE signal pathway[J]. J Int Pharm Res(国际药学研究杂志), 2016, 43:146-152.
- 25 Nguen T, Sherratt PJ, Pickett CB. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2003, 43:233-260.
- 26 Liu Z, Xiang Y, Sun G. The KCTD family of proteins structure, function, and disease relevance[J]. Cell Biosci, 2013, 3:45-49.
- 27 Yan XJ, Qi PZ, Guo BY, et al. Research progress of Nrf2 involved in the regulation of oxidative stress in aquatic animals[J]. Oceanol Limnol Sin(海洋与湖沼), 2021, 52:799-812.
- 28 Deng Y, Jie QF, Hao LP, et al. Quercetin antagonizes alcoholic oxidative damage in human hepatocytes by promoting Nrf2 translocation[J]. Acta Nutr Sin(营养学报), 2010, 32:532-535.
- 29 Ganesan K, Ramkumar KM, Xu BJ. Vitexin restores pancreatic β -cell function and insulin signaling through Nrf2 and NF- κ B signaling pathways[J]. Eur J Pharmacol, 2020, 888:173606.
- 30 Zhang ZP, Xu XJ, Liu JR, et al. Effects of vitexin on antioxidant enzyme activity and related gene expression in type 1 diabetic mice[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2022, 34:623-629.

《天然产物研究与开发》青年编委会

青年编委(以姓氏笔划为序)

Members

王 扣	王红兵	戈惠明	尹文兵	尹 胜	吕兆林
WANG Kou	WANG Hongbing	GE Huiming	YIN Wenbing	YIN Sheng	LYU Zhaolin
刘相国	孙昊鹏	孙桂波	李良成	李国友	邱 莉
LIU Xiangguo	SUN Haopeng	SUN Guibo	LI Liangcheng	LI Guoyou	QIU Li
汪海波	沐万孟	张炳火	张德武	陈益华	林昌俊
WANG Haibo	MU Wanmeng	ZHANG Binghuo	ZHANG Dewu	CHEN Yihua	LIN Changjun
欧阳杰	易华西	罗应刚	周 文	胡友财	袁 涛
OUYANG Jie	YI Huaxi	LUO Yinggang	ZHOU Wen	HU Youcai	YUAN Tao
夏永刚	高慧敏	唐金山	黄胜雄	韩秀珍	韩淑燕
XIA Yonggang	GAO Huimin	TANG Jinshan	HUANG Shengxiong	HAN Xiuzhen	HAN Shuyan
曾克武	蓝蔚青	廖晨钟	薛永波		
ZENG Kewu	LAN Weiqing	LIAO Chenzhong	XUE Yongbo		