

蜂胶对 2 型糖尿病大鼠的治疗作用及机制研究

王瑶, 康炜, 李卓, 刘凯歌, 杨彪* (西安医学院第一附属医院, 西安 710077)

摘要: 目的 评价蜂胶对 2 型糖尿病的治疗作用并探讨其作用机制。方法 制备 2 型糖尿病大鼠模型, 成模后, 随机分为正常组、模型组、蜂胶高剂量组、蜂胶低剂量组、优降糖组, 每组各 10 只。给药组灌胃给药 4 周, 正常组、模型组同时灌服等剂量生理盐水。末次给药后禁食 12 h, 股动脉取血, 对空腹血糖(FPG)、血脂(TG, TC)、胰岛素、CRP、IL-6、TNF- α 进行检测, 取胸主动脉进行病理解剖。**结果** 通过高糖高脂饲养加链脲佐菌素诱导成功建立 2 型糖尿病动物模型, 造模组大鼠血糖、尿糖显著增高($P<0.01$); 与模型组比较, 蜂胶高、低剂量组大鼠的空腹血糖、血脂及胰岛素水平存在显著性差异($P<0.01$ 或 $P<0.05$), 其效果蜂胶高剂量组优于低剂量组, 接近优降糖组, 胸主动脉病变也有所改善; 治疗组大鼠的血清 CRP、IL-6、TNF- α 水平明显降低($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。结论 蜂胶有治疗 2 型糖尿病及并发症的作用; 机制与其影响血清炎症因子水平有关。

关键词: 蜂胶; 2 型糖尿病; 炎症因子

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)08-0679-04

Research on the Therapeutic Effect and Mechanism of Propolis in Rats with Type 2 Diabetes Mellitus

WANG Yao, KANG Wei, LI Zhuo, LIU Kaige, YANG Biao* (The First Affiliated Hospital of Xi'an Medical College, Xi'an 710077, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To assess the therapeutic effect of propolis in rats with type 2 diabetes mellitus and study the mechanism of its therapeutic effect. **METHODS** Prepare the model of type 2 diabetic rats. Then the rats were randomly divided into normal group, model group, propolis high dose group, propolis low dose group, glibenclamide group, each group with 10 rats. Treatment groups were orally administered for 4 weeks. At the same time, normal group and model group were treated with the same dose saline. After 12 h fasting, collect the blood from the femoral artery and detect blood of fasting plasma glucose(FPG), lipids(TG, TC) test, insulin(Ins) levels, C-reactive protein, IL-6, tumor necrosis factor α (TNF- α), and take pathological anatomy on the thoracic aortic. **RESULTS** By high-sugar and high-fat diet and the intraperitoneal injection of low-dose streptozotocin, type 2 diabetes rat model was established. The blood glucose and urine glucose in model group increased obviously($P<0.01$). The blood of fasting plasma glucose, lipids test, insulin levels in propolis high dose group and propolis low dose group were significantly different with model group($P<0.01$ or $P<0.05$). The effect of high dose group was better than the low dose group, closing to the glibenclamide group. Thoracic aortic lesions improved. The blood level of CRP, IL-6, TNF- α in treatment group decreased obviously($P<0.01$ or $P<0.05$). **CONCLUSION** Propolis can treat the type 2 diabetes and its complications. The therapeutic mechanism may be related to the impact of the level of serum inflammatory factors.

KEY WORDS: propolis; type 2 diabetes mellitus; inflammatory factor

蜂胶具有抗菌消炎、抗病毒、抗肿瘤、抗辐射、降血糖、调节血脂等药理作用。近年来国内外学者对蜂胶应用于糖尿病的预防及治疗进行了探索, 取得了一定进展, 但蜂胶对糖代谢的调节机制尚不明晰。结合目前最新的 2 型糖尿病发病的慢性炎症学说^[1], 提出蜂胶对 2 型糖尿病大鼠治疗作用及对血清 CRP、IL-6、TNF- α 的影响研究^[2-4], 为进一步揭示 2 型糖尿病的发病机制提供实验依据, 为寻找治疗 2 型糖尿病的天然产物奠定研究基础。

1 材料

1.1 动物

健康清洁级 SD 大鼠 70 只, δ , 体质量 180~220 g, 由西安交通大学医学院实验动物中心提供, 实验动物合格证号: SYXK(陕)2007-003。

1.2 药物及预处理

粗制蜂胶经冷冻后粉碎, 用 10 倍量的 75%乙醇搅拌提取 24 h, 过滤, 滤液在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻 10 h, 300 目滤布过滤除蜡, 在 -10 $^{\circ}\text{C}$ 重复 3 次冷冻除蜡工艺, 然后加温至 60 $^{\circ}\text{C}$, 加适量活化的活性炭

基金项目: 西安医学院第一附属医院科研基金(XYFY 10-20)

作者简介: 王瑶, 女, 硕士, 检验技师 Tel: (029)84277794
E-mail: yangbiao@126.com

E-mail: wangyao@qq.com

*通信作者: 杨彪, 男, 硕士, 主治医师

Tel:

搅拌 1 h 脱铅, 真空浓缩脱去水分, 冷却后得精制固体状蜂胶, 经测定蜂胶提取含量 45%, 总黄酮含量 12%, 符合 2009 年《蜂胶国家标准》(标准编号为 GB/T24283-2009)。用前取固体蜂胶以 10 倍量的生理盐水于 60 °C 水浴加温溶解充分并震荡摇匀使用。

1.3 仪器

CS501 型超级恒温水浴箱(上海浦东荣丰科学仪器有限公司); TGL-16G 低温离心机(上海安亭科学仪器厂); 超越 JPS-5 型血糖仪(北京怡成生物电子有限公司); AU640 全自动生化仪(日本 OLYMPUS 公司); RT-6000 酶标仪(上海科华生物工程股份有限公司); HPIAS-1000 彩色病理图文分析系统(同济医科大学千屏影像公司)。

1.4 试剂

链脲佐菌素(批号: 100115, 美国 Sigma 公司); 胆固醇(批号: 100723, 郑州利伟生物实业有限公司); 胆酸钠(批号: 100715, 郑州利伟生物实业有限公司); 柠檬酸钠(批号: 100825, 天津东丽区天大化学试剂厂); 优降糖(批号: 100519, 天津太平洋制药有限公司)。

2 方法

2.1 动物模型的建立

70 只大鼠随机分为 2 组, 正常 10 只, 喂以标准饲料; 造模 60 只给予高糖高脂饲料(猪油 10%, 蔗糖 20%, 胆固醇 2.5%, 胆酸盐 1%, 常规饲料 66.5%)喂养。8 周后, 造模大鼠空腹 12 h 腹腔注射小剂量链脲佐菌素 40 mg·kg⁻¹(用前以 pH 4.2 的 0.1 mol·L⁻¹ 柠檬酸钠缓冲液配成 1% 的浓度), 正常组腹腔注射等量的柠檬酸钠缓冲液。72 h 后尾静脉取血, 测血糖 ≥ 16.7 mmol·L⁻¹、尿糖 +++~++++, 确定为糖尿病大鼠(尿糖“+”记为 1 分, “++”记为 2 分, “+++”记为 3 分, “++++”记为 4 分)。

2.2 分组及给药

成模后, 随机分为正常组、模型组、蜂胶高

剂量组(以蜂胶提取物量 250 mg·kg⁻¹)、蜂胶低剂量组(以蜂胶提取物量 125 mg·kg⁻¹)、优降糖组(0.78 mg·kg⁻¹), 每组各 10 只, 不成模及未入组者弃去不用。实验期间, 大鼠自由进食饮水, 给药组灌胃给药 4 周, 正常组、模型组同时灌服等剂量生理盐水。

2.3 标本收集

大鼠末次给药后禁食 12 h, 尾静脉取血检测空腹血糖(FPG), 股动脉取血全自动生化仪检测血脂(TG, TC)、FPG、CRP, 酶标法检测 Ins、IL-6、TNF-α, 取胸主动脉进行病理解剖, HE 染色观察。

2.4 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 14.0 软件统计分析, 组间差异采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为显著性差异, *P* < 0.01 为高显著性差异。

3 结果

3.1 2 型糖尿病大鼠模型的建立

2 型糖尿病大鼠造模组通过高糖高脂饲养加链脲佐菌素诱导造模后, 除去死亡的大鼠外, 剩余大鼠的空腹血糖和尿糖均明显升高, 体质量有所下降, 毛发无光泽, 反应迟缓, 提示造模成功。结果见表 1。

表 1 造模后正常组与造模组空腹血糖、尿糖、体质量比较
Tab 1 Comparison of fasting plasma glucose, urine glucose and weight between the normal group and the model group

组别	血糖/mmol·L ⁻¹	尿糖/分	体质量/g
正常组(n=10)	4.85±1.38 ¹⁾	0.40±0.51 ¹⁾	325.9±32.9
模型组(n=40)	18.24±3.22	3.20±1.03	293.4±26.0

注: 与模型组比较, ¹⁾*P* < 0.01

Note: Compared with model group, ¹⁾*P* < 0.01

3.2 对 2 型糖尿病的治疗作用

3.2.1 大鼠空腹血糖、血脂、胰岛素变化 与模型组比较, 蜂胶高、低剂量组大鼠的空腹血糖、血脂、胰岛素水平均显著降低(*P* < 0.01 或 *P* < 0.05), 接近正常组和优降糖组, 其效果蜂胶高剂量组优于低剂量组, 结果见表 2。

表 2 各组大鼠 FPG、TG、TC、Ins 比较(n=10)

Tab 2 The comparison of fasting plasma glucose, blood lipid and insulin(n=10)

组别	FPG/mmol·L ⁻¹	TG/mmol·L ⁻¹	TC/mmol·L ⁻¹	Ins/μIU·mL ⁻¹
正常组	5.01±1.36 ²⁾	0.95±0.19 ²⁾	1.68±0.16 ²⁾	35.91±3.57 ²⁾
模型组	17.39±3.24	1.71±0.25	2.54±0.21	82.65±11.37
优降糖组	6.35±1.51 ²⁾	1.21±0.17 ²⁾	1.95±0.18 ²⁾	40.13±4.61 ²⁾
蜂胶高剂量组	9.68±1.01 ²⁾	1.55±0.18 ¹⁾	2.11±0.17 ²⁾	51.64±5.22 ²⁾
蜂胶低剂量组	14.73±2.98 ¹⁾	1.59±0.26 ¹⁾	2.29±0.23 ¹⁾	66.86±7.89 ²⁾

注: 与模型组比较, ¹⁾*P* < 0.05, ²⁾*P* < 0.01

Note: Compared with model group, ¹⁾*P* < 0.05, ²⁾*P* < 0.01

3.2.2 大鼠胸主动脉变化 镜下可见正常组大鼠胸主动脉内膜光滑完整, 主要由单层排列的内皮细胞组成, 中膜平滑肌斜形排列, 外膜看见少量平滑肌细胞和神经、血管等; 模型组大鼠胸主动脉内皮细胞排列较疏松, 中膜纤维组织及平滑肌细胞有不同程度增生, 胞内可见散在的脂肪空泡; 蜂胶高剂量组大鼠胸主动脉病变与模型组比较有所减轻。结果见图 1。

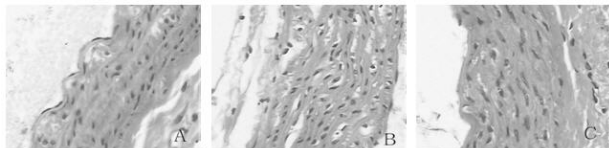


图 1 各组动物胸主动脉病理学改变(200×)

A-正常组; B-模型组; C-蜂胶高剂量组

Fig 1 Pathological changes in thoracic aortic (200×)

A-normal group; B-model group; C-propolis high dose group

3.2.3 机制相关指标和变化 与模型组比较, 蜂胶高、低剂量组大鼠的 CRP、IL-6、TNF- α 水平均显著降低($P<0.01$ 或 $P<0.05$), 接近正常组和优降糖组, 结果见表 3。

表 3 各组大鼠 CRP、IL-6、TNF- α 比较($n=10$)

Tab 3 The comparison of CRP, IL-6 and TNF- α ($n=10$)

组别	CRP/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	IL-6/ $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$	TNF- α / $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$
正常组	6.28±2.21 ²⁾	1.57±0.18 ²⁾	24.96±2.56 ²⁾
模型组	18.96±4.62	2.01±0.24	60.13±5.19
优降糖组	8.35±1.95 ²⁾	1.77±0.19 ¹⁾	29.65±2.51 ²⁾
蜂胶高剂量组	10.72±2.61 ²⁾	1.79±0.20 ¹⁾	35.16±2.92 ²⁾
蜂胶低剂量组	11.57±1.98 ²⁾	1.82±0.26 ¹⁾	41.84±3.84 ²⁾

注: 与模型组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$

Note: Compared with model group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$

4 讨论

糖尿病是一类因胰岛素分泌不足、胰岛素作用低下或胰岛素抵抗所引起的糖代谢紊乱, 继发脂肪和蛋白质代谢障碍的疾病^[5]。高血糖可降低细胞的趋化功能、黏附功能和吞噬作用, 干扰线粒体的代谢途径, 使机体的免疫功能降低。糖尿病的急性并发症一般包括: 糖尿病酮症酸中毒、非酮症性高渗性昏迷、糖尿病乳酸性酸中毒等。严重高血糖可使细胞内严重脱水, 导致癫痫样抽搐、意识障碍、颅内出血和中枢性高热等神经系统损伤^[6]。本实验结果显示: 蜂胶提取物能显著降低血糖值, 其作用弱于优降糖组。本实验选用优降糖做为对照, 优降糖为第二代磺脲类降糖药物, 具有吸收速度快、降糖作用强、应用范围广等优点,

虽然它具有增加胰岛细胞分泌负担等副作用, 但仍可为新降糖药物基础及临床试验较为理想的对照药物。

胰岛素是由胰岛 β 细胞受内源性或外源性物质, 如葡萄糖、乳糖、核糖、精氨酸、胰高血糖素等的刺激而分泌的一种蛋白质激素。胰岛素是机体内唯一降低血糖的激素, 同时促进糖原、脂肪、蛋白质合成。早期胰岛 β 细胞高能代偿性地增加胰岛素分泌以弥补其效应的不足, 但久而久之胰岛素 β 细胞的功能会逐渐衰竭, 导致糖耐量异常和糖尿病的发生。本实验中, 各治疗组的胰岛素水平均明显升高, 其机制可能是通过抑制糖异生和促进糖酵解产生的降糖作用, 增加胰岛素的生物活性, 促进胰岛 β 细胞再生及功能恢复^[7]。

糖尿病患者常伴有脂代谢紊乱, 本实验结果显示: 各给药组均能显著降低 TG 和 TC 水平, 其作用蜂胶高剂量组略优于低剂量组。蜂胶的降脂作用可能是因其升高肝脏超氧化物歧化酶活性, 降低肝脏过氧化脂质水平, 提高机体抗氧化及清除自由基能力, 促进了脂类的代谢^[8]。

糖尿病患者易伴高脂血症, 长期高脂血症易加速动脉粥样硬化, 产生心脑血管疾病、外周血管型疾病、高血压等。蜂胶提取物可改善动脉病变, 其机制可能是因其促进了脂类的分解代谢, 从而使动脉粥样硬化从源头上得到控制。

许多研究支持 2 型糖尿病是一种慢性低度炎症状态的假说, 2 型糖尿病常伴有血液急性期反应标志物浓度升高。IL-6 是一种多功能的细胞因子, 在免疫和炎症反应中有重要作用, 是发展为 2 型糖尿病的危险因素。IL-6 是急性时相反应的始发因子和主要物质, 也是促进肝脏合成急性时相蛋白的主要细胞因子。肥胖、高血糖均可使 IL-6 分泌增加, 致使肝细胞处于应激状态而大量分泌急性时相蛋白, 使纤维蛋白原、CRP 等升高^[9-10]。

TNF- α 主要由激活的单核-巨噬细胞系统产生, 近年来发现许多非免疫细胞如脂肪细胞、骨骼肌细胞也分泌 TNF- α 。TNF- α 通过作用于胰岛素信号通路来调节胰岛素作用, 抑制胰岛素信号转导。这一细胞因子通过 IRS21 丝氨酸磷酸化, 抑制 IRS21 酪氨酸磷酸化, 抑制 PI32K 活性而损害胰岛素信号通路, 从而达到治疗 2 型糖尿病的目的^[11-12]。

CRP 是机体组织受到各种损伤或炎症刺激后

由肝脏产生的一种急性期蛋白, 由脂肪细胞分泌的细胞因子 IL-6 和 TNF- α 是刺激肝脏合成 CRP 的主要细胞因子^[13-14]。所以蜂胶降低血清 CRP 水平可能是通过降低 IL-6 及 TNF- α 等来实现的。

Leinonen 等^[15]通过试验证明 2 型糖尿病患者的 CRP、IL-6 等炎症因子水平较正常对照组明显升高。2002 年, Freeman 等^[16]提出, 在中年男性中 CRP 是独立于糖尿病其它危险因素的预测糖尿病发生的物质。本实验中, 模型组伴随 IL-6、TNF- α 、CRP 水平显著升高, 而各治疗组血清中的炎症因子水平与模型组比较均显著降低。提示蜂胶可能是通过降低血清中一系列炎症因子的水平, 从而达到降低血糖的目的, 炎性标志物能够预测 2 型糖尿病的发生。

2 型糖尿病的发病机制在国际上一直存在较多争议, 炎症因子在其中的所占比例尚不清楚, 控制了炎症因子是否就可以预防糖尿病的发生还有待于大规模的临床研究。

REFERENCES

[1] HU F B, MEIGS J B, LI T Y. Inflammatory markers and risks of developing type 2 diabetes in women [J]. *Diabetes*, 2004, 53(3): 693-700.

[2] SUN F, PENG J R, SUN B L. C-reactive protein change with type 2 diabetes complications [J]. *J Microcirc(微循环学杂志)*, 2004, 14(3): 92.

[3] CHEN H L, XIE Z D, LEI M X, et al. Plasma TNF- α levels and insulin resistance in the patients with type 2 diabetes [J]. *J Chin Phys(中国医师杂志)*, 2003, 5(10): 1358-1359.

[4] KLEBANOVA E M, BALABOLKIN M I, KREMINSKAIA V M. The role of the fat tissue and its hormones in the mechanisms of insulin resistance and the development of type 2 diabetes mellitus [J]. *Klin Med*, 2007, 85(7): 20-27.

[5] DU Z H, CHEN J G. Diabetes mellitus drug therapy [J]. *China Pharm(中国药师)*, 2008, 11(7): 782-787.

[6] WU X X. Propolis on sugar metabolism regulating mechanism

and clinical application [J]. *China Mod Doctor(中国现代医生)*, 2009, 47(28): 18-19.

[7] SHI H, LIN Y, YU W Z, et al. Experimental study of dendrobium compound(DC) on relieving the insulin resistance(IR) in model rats [J]. *J Fujian Coll Tradit Chin Med(福建中医学院学报)*, 2004, 14(6): 24-27.

[8] LI Y J, HU F L, CHEN M L. Advances in studies on regulation effects and mechanisms of propolis on glycometabolism and lipid metabolism [J]. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2007, 38(10): 1593-1596.

[9] SPRANGER J, KROKE A, MOHLIG M, et al. Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes:results of the prospective populationbased European prospective investigation into cancer(EPIC) and nutrition potsdam study [J]. *Diabetes*, 2003, 52(3): 812-817.

[10] STEER S A, SCARIM A L, CHAMBERS K T, et al. Interleukin-1 stimulates beta-cell necrosis and release of the immunological adjuvant HMGB1 [J]. *PLoS Med*, 2006, 3(2): 17.

[11] WULLAERT A, HEYNINCK K, BEYAERT R, et al. Mechanisms of crosstalk between TNF 2 induced NF- κ B and JNK activation in hepatocytes [J]. *Biochem Pharmacol*, 2006, 72(9): 1090-1101.

[12] TILL A, ROSENSTIEL P, KRIPPNER H A, et al. The Met2196 \rightarrow Arg variation of human tumor necrosis factor receptor 2(TNFR2) affects TNF-alpha induced apoptosis by impaired NF-kappaB signaling and target gene expression [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(7): 5994-6004.

[13] NIE X Q, CHEN H H, BIAN K. Role of inflammatory markers C-reactive protein, high sensitivity C-reactive protein in diabetes and its cardiovascular complications [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2011, 28(1): 26-30.

[14] YE X W, YU X M, XIE H B. The relationship between serum Hs-CRP, insulin resistance in type II diabetes [J]. *Prev Treat Cardio Cereb Vasc Dis(心脑血管病防治)*, 2006, 6(3): 151-154.

[15] LEINONEN E, HURT-CAMEJO E, WIKLUND O, et al. Insulin resistance and adiposity correlate with acute-phase reaction and soluble cell adhesion molecules in type 2 diabetes [J]. *Atherosclerosis*, 2003, 166(2): 387-394.

[16] FREEMAN D J, NORRIE J, CASLAKE M J, et al. C-reactive protein is an independent predictor of risk for the development of diabetes in the west of Scotland Coronary prevention study [J]. *Diabetes*, 2002, 51(5): 1596-1600.

收稿日期: 2011-10-23

8-甲氧补骨脂素对对乙酰氨基酚致小鼠急性肝损伤的保护作用

魏鹏, 刘伟霞, 贾凤兰, 阮明, 张宝旭* (北京大学公共卫生学院毒理学系, 国家中医药管理局中药配伍减毒重点实验室, 北京 100191)

摘要: 目的 研究 8-甲氧补骨脂素(8-methoxypsoralen, 8-MOP)对对乙酰氨基酚(acetaminophen, APAP)致小鼠急性肝损伤的保护作用。方法 采用对乙酰氨基酚所致小鼠急性肝损伤模型。24 h 后, 检测小鼠血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)和乳酸脱氢酶(LDH); 留取肝脏组织, 常规石蜡包埋切片, HE 染色, 光镜观察肝脏组织病理变化; 制备肝匀浆, 测定肝中还原型谷胱甘肽(GSH)、氧化型谷胱甘肽(GSSG)和丙二醛(MDA)的含量。结果 与正常对照

作者简介: 魏鹏, 男, 硕士 E-mail: 0629wp@163.com *通信作者: 张宝旭, 男, 博士, 教授 Tel: (010)82801527 E-mail: bxzhang@bjmu.edu.cn