

原花青素长期干预对Ⅱ型糖尿病氧化应激水平的影响

姜燕飞, 张召锋, 鲍雷, 井路路, 丁叶, 戴小倩, 马小陶, 李宇杰, 蔡夏夏, 李勇*
(北京大学公共卫生学院营养与食品卫生学系, 北京 100191)

摘要: 目的: 观察Ⅱ型糖尿病大鼠经长期喂养后各组织氧化应激水平的改变情况及葡萄籽原花青素提取物(GSPE)长期干预对其的保护作用。方法: 将成功建立Ⅱ型糖尿病模型的48只SD大鼠随机分为4组: GSPE低、中、高剂量干预组(分别灌胃125、250、500mg/(kg·d))及糖尿病模型(DM)组; 另外12只基础饲料饲养的大鼠作为正常对照组。DM组和正常对照组灌胃等量蒸馏水。连续喂养24周后, 取血和脏器, 检测各组织的氧化应激指标(超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和丙二醛(MDA))。结果: 与正常对照组相比, DM组大鼠血清和肝脏组织中SOD的活性水平显著下降($P<0.05$), 肝脏和肌肉组织中GSH-Px的活性水平亦显著下降($P<0.05$), 脑组织中MDA含量明显增高($P<0.05$); 与DM组相比, GSPE血清、肝脏和脾脏组织中SOD的活性水平显著增加($P<0.05$), 血清、肝脏、肌肉和脾脏中GSH-Px的活性水平亦显著增加($P<0.05$), 脾、脑中MDA含量显著下降($P<0.05$)。结论: Ⅱ型糖尿病大鼠不同组织的氧化损伤程度不同, GSPE长期干预能够减轻各组织的氧化损伤。

关键词: 葡萄籽原花青素提取物; Ⅱ型糖尿病; 长期喂养; 超氧化物歧化酶; 谷胱甘肽过氧化物酶; 丙二醛

Effect of Long-Term Intervention with Proanthocyanidin on Oxidative Stress in Type II Diabetes

JIANG Yan-fei, ZHANG Zhao-feng, BAO Lei, JING Lu-lu, DING Ye, DAI Xiao-qian, MA Xiao-tao,
LI Yu-jie, CAI Xia-xia, LI Yong*
(Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Peking University, Beijing 100191, China)

Abstract: Objective: To observe the oxidative stress in Type II diabetic rats after long-term feeding of grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) and the effect of GSPE intervention on oxidative stress. Methods: Forty-eight Type II diabetic rats that were successfully induced were randomly divided into 4 groups: three GSPE-treated groups and one diabetic model group. Twelve rats fed on normal forage were served as normal control group. GSPE-treated groups were administered with GSPE by gavage at doses of 125, 250, 500 mg/(kg·d). Diabetic model group and normal control group were administered with deionized water also by gavage. After 24 weeks, all rats were killed and blood and organs were acquired. Oxidative indicators (SOD, GSH-Px and MDA) of all tissues were detected. Results: Compared with the normal control group, SOD activity in the serum and liver tissue of the diabetic model group was significantly decreased, so was the GSH-Px activity in liver and muscle tissue, but the amount of MDA in the brain of the diabetic model group was increased; compared with the diabetic model group, SOD activity in the serum, liver and spleen and GSH-Px activity in the serum, liver, muscle and spleen from the intervention groups was significantly increased ($P < 0.05$). Conclusion: The level of oxidative damage in different tissues from Type II diabetic rats is different. Long-term intervention with GSPE can reduce oxidative damage to tissues.

Key words: grape seed proanthocyanidin extract; Type II diabetes; long-term feeding; superoxide dismutase; glutathione peroxidase; malonaldehyde

中图分类号: 151.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)07-0262-04

糖尿病是由遗传和环境因素共同作用而引起的一组以糖代谢紊乱为主要表现的内分泌代谢疾病, 其中Ⅱ型糖尿病占95%以上^[1]。糖尿病病人体内的糖、脂肪和蛋白

质代谢紊乱可诱导体内氧化应激水平增加, 致各种器官生理功能障碍和结构损伤, 免疫功能下降, 最终导致并发症的发生。因此阻止糖尿病不同脏器的氧化损伤对于

收稿日期: 2011-12-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(81072293)

作者简介: 姜燕飞(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为营养与疾病。E-mail: tangxiaodou@126.com

*通信作者: 李勇(1958—), 男, 教授, 博士, 研究方向为营养与疾病。E-mail: liyong@bjmu.edu.cn

预防糖尿病并发症发生有非常重要的意义。

葡萄籽原花青素提取物(*grape seed proanthocyanidin extracts*, GSPE)是由儿茶素、表儿茶素及其没食子酸酯这3种单体通过C4—C6或C4—C8键共价相连组成的多聚体。由于GSPE分子中具有多电子的羟基,决定了它有较强的抗氧化、清除自由基的能力^[2]。基于糖尿病并发症的氧化应激机制与GSPE的抗氧化、清除自由基能力,推测GSPE对II型糖尿病并发症的发生具有一定的预防和缓解作用。本实验旨在探讨II型糖尿病大鼠各组织器官的氧化损伤情况以及GSPE对II型糖尿病大鼠各组织器官氧化损伤的改善作用,为GSPE防治糖尿病并发症的发生提供参考。

1 材料与方法

1.1 动物、材料、试剂与仪器

SPF级雄性SD大鼠,体质量200~250g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。饲养环境为SPF级,饲养间温度22~24℃,相对湿度55%~65%,照明采用12h:12h明暗交替光照,自由摄食和饮用去离子水。

高脂饲料(配方为66%基础饲料、15%猪油、10%蔗糖、6%酪蛋白、3%蛋黄) 北京科澳协力饲料有限公司; GSPE(纯度96.64%, HPLC级, 低聚体占86.93%) 天津市尖峰天然产物研究开发有限公司; 无水葡萄糖(分析纯, 批号20090106) 国药集团化学试剂有限公司; SOD活性测定试剂盒、MDA测定试剂盒、GSH-Px活性测定试剂盒、BCA蛋白分析试剂盒 南京建成生物工程研究所; 链脲佐菌素(STZ) 美国Sigma公司; 磷酸盐缓冲液 自行配制。

Thermo-MK3型酶标仪 美国赛默飞世尔公司; Adventurer™通用型分析天平 美国Ohaus公司; Eppendorf高速冷冻离心机 德国Eppendorf公司; UV7512GD型紫外-可见分光光度计 上海欣益仪器仪表有限公司; YT-IMS-70型制冰机 北京亚泰科隆仪器有限公司; 数显电热恒温水浴箱 上海跃进医疗器械厂; 低温冰箱(-80℃) 日本Sanyo公司; 冰箱(4℃、-20℃) 海尔集团; 微量血糖仪 美国强生公司。

1.2 II型糖尿病大鼠模型的建立

大鼠适应性喂养1周,经高脂饲料喂养4周后,腹腔注射链STZ(0.01mol/L pH4.2~4.5柠檬酸钠-柠檬酸缓冲液配制, 30mg/kg以体质量计),注射2次。用微量血糖仪监测空腹血糖,达到11.1mmol/L以上,并稳定1周者确定为II型糖尿病模型。

1.3 剂量分组及干预时间

将造模成功的48只大鼠随机分为:糖尿病模型(DM)组, GSPE低、中、高剂量干预组,每组12只;另外12只基础饲料饲养的大鼠作为正常对照组。DM组和正常对

照组灌胃蒸馏水; GSPE低、中、高剂量组每天分别灌胃125、250、500mg/(kg·d)(以体质量计)GSPE水溶液,连续饲养24周。

1.4 指标的测定

1.4.1 血糖测定

干预第0周和第24周分别剪尾取血,用微量血糖仪检测空腹血糖。

1.4.2 氧化应激指标检测

用南京建成试剂盒测定血清和各组织中丙二醛(MDA)的水平、超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性水平。

1.5 数据分析

应用SPSS 软件进行数据处理和分析,所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。各指标组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 大鼠空腹血糖变化

表1 各组大鼠空腹血糖($\bar{x} \pm s$, $n=12$)
Table 1 Fasting blood glucose of rats($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

mmol/L		
组别	第0周	第24周
正常对照组	5.81 ± 1.13	5.91 ± 1.04
DM组	15.98 ± 2.41 [#]	20.61 ± 3.14 [#]
GSPE低剂量组	15.90 ± 2.94 [#]	18.72 ± 5.36 [#]
GSPE中剂量组	15.97 ± 2.23 [#]	18.20 ± 4.26 [#]
GSPE高剂量组	15.23 ± 2.15 [#]	19.15 ± 4.63 [#]

注: #. 与正常对照组相比, 有显著性差异($P < 0.05$)。下同。

48只糖尿病大鼠均出现多饮、多食、多尿、体质量减轻的症状。从表1可以看出,干预第0周,DM组、GSPE各剂量组空腹血糖与正常对照组相比明显增高,有显著性差异($P < 0.05$),且DM组、GSPE各剂量组之间差异无显著性差异($P < 0.05$)。第24周DM组、GSPE各剂量组大鼠血糖均有所升高,且4组之间血糖相比较无显著性差异($P > 0.05$),但可以看出GSPE各剂量组较DM组偏低。

2.2 GSPE对II型糖尿病大鼠各组织SOD活性水平的影响

表2 GSPE对II型糖尿病大鼠各组织SOD活性水平的影响
($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Table 2 Impact of GSPE on SOD activity in different tissues of Type II diabetic rats ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

U/mg pro					
组别	血清	肝脏	肌肉	脾脏	脑
正常对照组	108.47 ± 8.87	226.56 ± 45.88	50.10 ± 6.21	38.63 ± 9.05	47.52 ± 4.50
DM组	79.97 ± 6.82 [#]	97.68 ± 27.30 [#]	54.14 ± 6.29	32.63 ± 3.86	43.18 ± 5.87
GSPE低剂量组	96.35 ± 11.03 [*]	189.24 ± 23.32 [*]	53.89 ± 5.53	30.88 ± 7.69	42.24 ± 6.89
GSPE中剂量组	96.30 ± 13.42 [*]	176.14 ± 34.52 [*]	60.79 ± 6.81	49.06 ± 11.58 [*]	52.66 ± 11.38
GSPE高剂量组	101.03 ± 12.53 [*]	163.43 ± 24.25 [*]	54.67 ± 7.80	31.29 ± 12.86	44.06 ± 11.09

注: *. 与DM组相比, 有显著性差异($P < 0.05$)。下同。

从表2可以看出,与正常对照组比较,DM组血清和肝脏组织SOD的活性水平明显下降,具有显著性差异($P<0.05$);其他各组织SOD的活性水平均不具有显著性差异。与DM组比较,GSPE各剂量组血清和肝脏组织中SOD的活性水平均显著增高($P<0.05$),GSPE中剂量组脾脏SOD的活性水平显著增高($P<0.05$),其他组织均无显著性差异。

2.3 GSPE对Ⅱ型糖尿病大鼠各组织GSH-Px活性水平的影响

表3 GSPE对Ⅱ型糖尿病大鼠各组织GSH-Px活性水平的影响
($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 3 Impact of GSPE on GSH-Px activity in different tissues of Type II diabetic rats ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	U/mg pro				
	血清	肝脏	肌肉	脾脏	脑
正常对照组	371.95±47.77	1191.1±58.18	67.68±3.36*	126.51±4.46	10.64±2.09
DM组	360.98±34.39	759.1±33.63 ^a	44.13±2.44 ^a	115.30±5.29	9.98±1.97
GSPE低剂量组	472.93±39.07*	1141.6±47.51*	44.62±2.04	127.16±5.28	10.79±2.15
GSPE中剂量组	468.29±63.31*	907.25±57.89	59.24±2.45*	220.2±6.39*	11.36±1.98
GSPE高剂量组	441.95±50.75*	911.70±49.88	46.80±0.91	203.17±5.41*	8.99±2.43

从表3可以看出,与正常对照组比较,DM组肝脏和肌肉组织GSH-Px的活性水平明显下降,具有显著性差异($P<0.05$),其他组织GSH-Px的活性水平均无显著性差异。与DM组比较,各个剂量组血清、低剂量组肝脏、中剂量组肌肉、中及高剂量组脾脏GSH-Px的活性水平均显著增高,具有显著性差异($P<0.05$),其余各组无显著性差异。

2.4 GSPE对Ⅱ型糖尿病大鼠各组织MDA含量的影响

表4 GSPE对Ⅱ型糖尿病大鼠各组织MDA含量的影响($\bar{x} \pm s, n=12$)
Table 4 Impact of GSPE on the amount of MDA in different tissues of Type II diabetic rats ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	nmol/mg pro				
	血清	肝脏	肌肉	脾脏	脑
正常对照组	10.32±1.95	1.53±0.32	3.44±0.49	3.01±0.48	5.85±1.37
DM组	9.10±1.14	1.43±0.53	3.57±0.48	3.11±0.41	8.91±1.65 ^a
GSPE低剂量组	11.88±1.75	1.37±0.17	3.35±0.40	2.99±0.40	8.2±1.10
GSPE中剂量组	8.74±2.12	1.50±0.24	3.48±0.39	2.51±0.28*	7.2±1.25*
GSPE高剂量组	9.46±1.11	1.52±0.20	3.59±0.33	3.08±0.37	7.51±0.80*

从表4可以看出,与正常对照组比较,DM组脑组织MDA含量显著增高,具有显著性差异($P<0.05$);其他组织差异均未见显著性。与DM组比较,GSPE中剂量组脾脏和中及高剂量组脑组织MDA含量显著下降($P<0.05$)。

3 讨论

随着病情的进展,糖尿病并发症可累及全身各个器官, Brownlee等^[3-4]提出的糖尿病并发症统一学说中认为,高糖引发的氧化应激是诱发全身并发症的中心。

事实上,这种氧化应激在不同组织影响程度并不完全相同,而原花青素对于氧化损伤的保护作用在各个组织中也并非完全相同,这一点在本研究中得到证实。本研究结果显示糖尿病对于脾脏的氧化应激影响相对较小,但 Manna 等^[5]研究发现STZ注射后大鼠脾脏SOD、GSH-Px的活性水平明显较正常组降低,而MDA含量较正常组明显增多,这与本研究结果并不完全一致,出现这种差异的原因很可能是其所造模型为Ⅰ型糖尿病模型,注射STZ量较大,故对大鼠脾脏损伤更显著。脾脏在体内活化B淋巴细胞,产生抗体,对机体免疫非常重要。而糖尿病并发症发生感染病变时,免疫缺陷特别是细胞免疫的缺陷被认为是主要原因之一^[6]。保护脾脏、防止脾脏损伤对于糖尿病病情控制非常必要,本研究发现中剂量的原花青素对糖尿病引起的脾脏的氧化损伤有明显的保护作用,能够显著提高SOD和GSH-Px的活性水平,并能有效地降低MDA的量。这对于维持糖尿病后期免疫系统的稳定,防止发生糖尿病的感染病变有一定的意义。关于糖尿病引发的肝损伤方面,国外的动物实验和人群实验证实^[7-8]:糖尿病与非酒精性脂肪肝之间存在强相关性,而将这种相关性联系在一起的中心就是氧化应激,同时在非酒精性脂肪肝病理生理过程中氧化应激被认为是主要驱动力,本研究关于糖尿病对肝脏组织氧化损伤的影响的结果为糖尿病引起肝脏组织SOD和GSH-Px的活性水平下降,与国外研究结果一致^[9]。在本研究中原花青素能够提高肝组织中SOD和GSH-Px的活性水平,从而有效的降低由于糖尿病而引起的氧化损伤,说明其很有可能在预防糖尿病引起的非酒精性慢性肝病方面起到一定的作用。根据实验结果可以看出原花青素能够显著地提高由于糖尿病而引起的血清中SOD和GSH-Px的活性水平下降。以往研究中Ⅱ型糖尿病与心血管疾病的相关性已被证实^[10],氧化应激在其中起重要作用,原花青素增强抗氧化酶的活性对Ⅱ型糖尿病氧化损伤而引起的心血管疾病有一定的预防作用。本研究关于糖尿病机体肌肉组织氧化应激的影响结果显示,糖尿病对SOD的活性水平和MDA含量影响不大,但其能显著降低GSH-Px的活性水平,这与国外报道并不完全一致^[11]。中剂量的原花青素能够显著改善糖尿病造成的肌肉组织GSH-Px的活性水平降低。关于脑组织,本研究发现糖尿病引起脑组织MDA含量增加(自由基攻击细胞膜时,多不饱和脂肪酸发生过氧化反应,就会形成脂质过氧化物如MDA,因此测定MDA含量可反映机体内脂质过氧化程度,同时间接地反映出细胞损伤的程度)说明糖尿病导致脑组织发生脂质过氧化。近几年的研究认为^[12-13],脂质过氧化会导致细胞膜的流动性降低从而影响神经传导是糖尿病引起中枢神经病变的主要原因。分析脑组织MDA的量增加较其他组织明显的原因,可能与其在脑组织脂肪含量相对较高

相关, 因其组织脂肪含量相对较高故更容易发生脂质过氧化。在原花青素中、高剂量干预, 糖尿病大鼠脑组织MDA含量能够显著减少, 因此推断原花青素对于保持细胞膜流动性、维持正常的神经传导、保护中枢神经系统稳定有一定的作用。通过本研究, 可以初步确定在Ⅱ型糖尿病长期进展过程中, 其对于不同组织的氧化损伤不同, 而原花青素的干预对糖尿病引起的氧化损伤具有一定的保护作用。

综合比较本研究与其他关于糖尿病对机体各组织氧化损伤的研究发现, 研究结果存在一定差异, 出现这种差异的原因可能与采用的动物种类不同, 糖尿病造模STZ用量不同、动物的喂养周期差异以及实验条件不同等各种因素相关。与以往关于原花青素对糖尿病及其并发症改善作用的研究相比^[14-17], 本研究的创新点在于: 1) 本研究采用Ⅱ型糖尿病模型, 目前从人群患病率上考虑, Ⅱ型糖尿病占90%~95%, 因此本研究对将来原花青素用于对Ⅱ型糖尿病的并发症防治上更具有现实意义, 而之前有关原花青素的研究大多采用Ⅰ型糖尿病模型, 从Ⅰ型糖尿病推演到Ⅱ型糖尿病具有一定的局限性。2) 本研究长期喂养Ⅱ型糖尿病大鼠24周, 以往糖尿病模型的原花青素干预实验中动物喂养周期大多不超过12周, 这种短周期研究的弊端在于可能实验结束时, 糖尿病并发症还没有完全显现。而本实验通过长期喂养Ⅱ型糖尿病大鼠24周, 造成糖尿病氧化损伤, 并发症的出现, 并长期喂养原花青素进行干预, 避免此问题, 这对于指导原花青素用于Ⅱ型糖尿病并发症的防治上有重要意义。

本研究的局限性在于, 研究原花青素最终目的是将原花青素应用到人, 本研究的研究对象是动物, 从动物推演到人还需要大量的研究作进一步进行验证, 另外, 虽然抗氧化治疗是目前防治糖尿病并发症广泛采取的方法之一^[18-19], 抗氧化指标也是评价药物对于糖尿病并发症的预防和改善的重要指标, 但综合评价原花青素对糖尿病并发症作用, 抗氧化指标只能作为其中一个方面, 还有其他方面的衡量指标需要进一步讨论研究。

参考文献:

- [1] 潘长玉, 金文胜. 2型糖尿病流行病学[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2005, 21(5): 1-5.
- [2] BAGCHI D, GARG A, KROHN R L, et al. Oxygen free radical scavenging abilities of vitamin C and vitamin E, and a grape seed proanthocyanidins extract *in vitro*[J]. Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology, 1997, 95(2): 179-189.
- [3] BROWNLEE M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism[J]. Diabetes, 2005, 54(6): 1615-1625.
- [4] BROWNLEE M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications[J]. Nature, 2001, 414: 813-820.
- [5] MANNA P, GHOSH J, DAS J, et al. Streptozotocin induced activation of oxidative stress responsive splenic cell signaling pathways: protective role of arjunolic acid[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2010, 244(2): 114-129.
- [6] GEERLINGS S E, HOEPELMAN A I. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM)[J]. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 1999, 26: 259-265.
- [7] CHALASANI N, DEEG M, CRAB D. Systemic levels of lipid peroxidation and its metabolic and dietary correlates in patients with non-alcoholic steatohepatitis[J]. Am J Gastroenterol, 2004, 99: 1497-1502.
- [8] YESILOVA Z, YAMAN H, OKTENLI C, et al. Systemic markers of lipid peroxidation and antioxidants in patients with non-alcoholic fatty liver disease[J]. Am J Gastroenterol, 2005, 100: 850-855.
- [9] ROBERTA S, LUCIANE B P, NAIARA S, et al. Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Biochimie, 2011, 94: 374-383.
- [10] SCHULMAN I H, ZHOU Mingsheng. Vascular insulin resistance: a potential link between cardiovascular and metabolic diseases[J]. Curr Hypertens Rep, 2009, 11: 48-55.
- [11] GUMIENICZEK A, HOPKALA H, WOJTOWICZ Z, et al. Differences in antioxidant status in skeletal muscle tissue in experimental diabetes[J]. Clinica Chimica Acta, 2001, 314: 39-45.
- [12] BIESSELS G J, VAN DER HEIDE L P, KAMAL A, et al. Ageing and diabetes: implications for brain function[J]. Eur J Pharmacol, 2002, 441: 1-14.
- [13] SIDDIQUI M R, TAHA A, MOORTHY K, et al. Amelioration of altered antioxidant status and membrane linked functions by vanadium and trigonella in alloxan diabetic rat brains[J]. Journal of Biosciences, 2005, 30: 483-490.
- [14] LI Baoying, CHENG Mei, GAO Haiqing, et al. Back-regulation of six oxidative stress proteins with grape seed proanthocyanidin extracts in rat diabetic nephropathy[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2008, 104(2): 668-679.
- [15] 周雁, 高海青, 由倍安, 等. 原花青素提取物对糖尿病大鼠氧化应激的影响[J]. 中国老年学杂志, 2005(10): 1189-1190.
- [16] 涂献玉, 张道明, 王文英, 等. 低聚原花青素对1型糖尿病小鼠抗氧化能力的作用[J]. 长江大学学报医学卷, 2007, 4(4): 328-330.
- [17] PINENT M, BLAY M, BLADE M C, et al. Grape seed-derived procyanidins have an anti-hyperglycemic effect in streptozotocin-induced diabetic rats and insulin mimetic activity in insulin-sensitive cell lines[J]. Endocrinology, 2004, 145(11): 4985-4990.
- [18] LI Lanfang, LI Jian. Link between oxidative stress and insulin resistance [J]. Chinese Medical Sciences Journal, 2007, 22(4): 254-259.
- [19] SARAH A, SRIKANTH B, HELEN R G. Dietary antioxidant interventions in type 2 diabetes patients: a meta-analysis[J]. British Journal of Diabetes & Vascular Disease, 2011, 11(2): 62-68.