

芦丁对 1 型糖尿病小鼠肝功能及肝组织形态学的影响*

李聪伟¹, 李倩², 郭兰³, 吴爱萍³, 胡雷³, 白静^{3△}

1. 华北理工大学药学院(唐山 063200); 2. 华北理工大学医学实验研究中心(唐山 063200);
3. 华北理工大学基础医学院(唐山 063200)

【摘要】目的 探究芦丁对链脲佐菌素(STZ)诱导的 1 型糖尿病小鼠肝功能及肝脏组织形态的影响。**方法** 雄性昆明小鼠 60 只,选出 12 只作为正常组,余下小鼠腹腔注射 STZ,连续给药 5 d,建立 1 型糖尿病小鼠模型。成模小鼠随机划分为模型组与芦丁低、高剂量组。正常组与模型组给予羧甲基纤维素钠溶液,芦丁低、高剂量组分别按小鼠体质量予芦丁 50 mg/kg、100 mg/kg 灌胃,给药 8 周,每日 1 次。测定给药第 4 周,第 8 周小鼠餐后随机血糖,血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)、总蛋白(TP)和白蛋白(ALB)的含量。通过 HE、Masson 染色及透射电镜观察肝组织形态。**结果** 与正常组比,模型组小鼠血糖上升($P<0.01$),血清中 ALT、AST、LDH 含量增高,TP、ALB 含量降低($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比,芦丁组小鼠给药第 4 周血糖降低($P<0.05$),给药第 8 周血清 ALT、AST、LDH 含量下降,TP、ALB 含量升高,其中高剂量组作用更明显($P<0.05$, $P<0.01$)。形态学结果显示,模型组肝细胞增大变形,肝索排列紊乱,肝组织纤维化程度较高;芦丁低、高剂量组小鼠肝组织形态有所改善,高剂量组作用更明显。**结论** 芦丁可改善 STZ 诱导的 1 型糖尿病小鼠的肝功能,缓解糖尿病小鼠肝脏组织的损伤程度。

【关键词】 芦丁 1 型糖尿病 肝功能 形态学

Effect of Rutin on Liver Function and Morphology in Type 1 Diabetes Mice Induced by Streptozotocin LI Cong-wei¹, LI Qian², GUO Lan³, WU Ai-ping³, HU Lei³, BAI Jing^{3△}. 1. School of Pharmacy, North China University of Science and Technology, Tangshan 063200, China; 2. Medical Experimental Center, North China University of Science and Technology, Tangshan 063200, China; 3. School of Basic Medical Sciences, North China University of Science and Technology, Tangshan 063200, China

△ Corresponding author, E-mail: baijing7858@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of Rutin on the function and morphology of liver in type 1 diabetes mice induced by streptozotocin (STZ). **Methods** Type 1 diabetic mice model was established with the treatment of STZ by a 5 d intraperitoneal administration to male Kunming mice. Normal group had 12 mice without treatment of STZ, the mice with DM after STZ treated were randomly divided into DM group, low-dose(50 mg/kg) Rutin group and high-dose (100 mg/kg) Rutin group, each group had 12 mice. The mice in normal and DM group were given sodium carboxymethyl cellulose (10 mg/kg). Each mice was given above drugs by intragastric administration for 8 weeks. Postprandial random blood glucose was measured at 4 weeks and 8 weeks and the levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH), total protein (TP) and albumin (ALB) in serum were detected by automatic biochemical analyzer after 8 weeks. The morphology of liver was observed by HE and Masson staining. The ultrastructure of liver tissue was observed by electron microscope. **Results** After a continuous small-dose injection of STZ, the success rate of diabetes model mice were up to 98%. The blood glucose of the model group was significantly increased ($P<0.01$), and the levels of ALT, AST and LDH in serum were significantly higher, and TP and ALB were lower than those in normal group ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared to the DM group, the levels of blood glucose were lower ($P<0.05$) at 4 weeks and 8 weeks, the contents of ALT, AST and LDH were significantly decreased, and TP and ALB were improved in both Rutin dose group. High-dose group performed more obvious ($P<0.05$, $P<0.01$). Morphological observation showed the tissue morphology of Rutin treatment group were improved obviously, and the effect was more significant in high-dose Rutin group. **Conclusion** Rutin may improve the liver function and reduce the damage of liver tissue in STZ-induced type 1 diabetic mice.

【Key words】 Rutin Type 1 diabetes Liver function Morphology

* 河北省自然科学基金(No. H2014209194)资助

△ 通信作者, E-mail: baijing7858@163.com

1型糖尿病是由 β 细胞受损所引起胰岛素绝对缺乏的自身免疫性疾病,伴有多种并发症,糖尿病性肝病属于其慢性并发症。据报道,糖尿病人群中肝病发病率约50%^[1]。由于肝脏代偿作用较强,早期糖尿病并发肝损伤不明显,其累积效应会导致肝功能丧失而危及生命^[2]。中医研究表明1型糖尿病并发症病机在于素体阴虚,厥阴生热,引起五脏亏虚^[3];现代医学研究表明糖尿病性肝病病因与高糖诱导的氧化应激异常有关^[4],引起机体特异性免疫反应,以致糖脂代谢紊乱、微血管病变及微循环障碍。目前临床只能通过注射胰岛素缓解高糖及其并发症,尚无有效治疗药物。

芦丁(又名芸香苷、紫槲皮苷,络通)是槐米、荞麦等黄酮类药用植物主要活性成分^[5],《齐民要术杂说》中对其活性有所记载,可清肝泻火,健胃顺气^[6],现代研究证实芦丁具有消除氧化自由基、抗炎、舒张血管、参与调节血糖血脂及免疫反应等多种药理活性^[7-10],这为1型糖尿病性肝病的防治提供了研究思路。但目前对芦丁相关治疗作用的研究,尚无文献报道。本课题组建立了1型糖尿病小鼠模型,通过对肝功能指标及肝脏形态组织的观察,探究芦丁对1型糖尿病性肝病肝损伤的改善作用,发掘芦丁在此临床应用的新领域。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 雄性昆明小鼠60只,SPF级,体重(35±10)g,购自军事医学科学院卫生学环境医学研究所,合格证号:0000349。

1.1.2 实验仪器 Chemray240型全自动生化分析仪,美国Rayto公司生产;BX-53型光学显微镜,日本OLYMPUS公司制造;低温高速离心机,德国Eppendorf公司制造;HITACHI H-7650透射电子显微镜,日本HITACHI公司制造;RM2245型全自动石蜡切片机,德国LEICA公司制造。

1.1.3 实验试剂 链脲佐菌素(STZ, Lot No. WXBC0477V),德国VETEC公司生产;羧甲基纤维素钠(Lot No. 20140122),国药集团化学试剂有限公司生产;芦丁试剂(Lot GR198228-2),英国Abcam公司生产;Masson三色染色试剂盒(Lot No. 20110357),北京Solarbio公司生产。

1.2 方法

1.2.1 模型建立及分组给药 小鼠进行适应性饲养1周后,随机挑选出12只作为正常组,余下小鼠

按小鼠体质量腹腔注射STZ 62.5 mg/(kg·d),连续给药5 d。72 h后尾静脉取血,采用血糖仪测定,视血糖浓度 ≥ 16.6 mmol/L的小鼠为成功模型。造模成功后,将成模小鼠随机分为模型组,芦丁低、高剂量组,每组12只。正常组与模型组以10 mg/kg给予羧甲基纤维素钠溶液(1 g/L)灌胃,芦丁低、高剂量组分别以50 mg/kg、100 mg/kg芦丁灌胃,每日1次,连续给药8周。

1.2.2 标本处理及生化指标检测 给药前及给药后第4周、8周尾静脉取血,测定各组小鼠餐后随机血糖。8周给药完成后,各组小鼠禁食12 h,用恩氟烷麻醉后,眼内眦取血,所取血液进行4℃下10 min,3 000 r/min离心,取上清进行血生化分析,分别检测血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)、总蛋白(TP)和白蛋白(ALB)的含量。颈椎脱臼法处死小鼠,取下肝脏,冰上洗净去筋膜,取肝组织小米粒大小浸入戊二醛(电镜专用,25 ml/L),4℃保存,供电镜观察;余下部分浸入40 ml/L多聚甲醛保存,供切片备用。

1.2.3 切片的制备、染色及形态观察 取4℃甲醛保存48 h后的组织,置流水下冲洗6 h后依次进行梯度酒精脱水,二甲苯透明,浸蜡,包埋,随后制作5 μ m石蜡切片。各组切片脱蜡后分别进行HE染色及Masson三色染色,树胶封固干燥后置光镜下观察染色结果。取出4℃下25 mL/L戊二醛保存的肝组织,通过透射电镜观察各组肝脏超微结构。

1.2.4 统计学方法 数据结果均以 $\bar{x} \pm s$ 来表示。采用ANOVA(单因素方差分析)进行多组间差异比较,采用 t 检验进行两组间比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 给药前后各组小鼠血糖值变化

正常组给药前及给药第4周、第8周血糖值均正常;与正常组比较,模型组小鼠血糖于给药第4周、第8周后均明显增高($P < 0.01$);与模型组比较,给药第4周芦丁低、高剂量组小鼠血糖均降低($P < 0.05$),但低、高剂量组间差异无统计学意义($P > 0.05$),给药第8周低、高剂量组与模型组比较血糖差异均无统计学意义,低、高剂量组间差异亦无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

2.2 芦丁对各组小鼠肝功能指标的影响

与正常组相比,模型组血清中ALT、AST、

LDH 的含量均增加($P<0.05$, $P<0.01$),而 TP、ALB 的含量下降($P<0.05$);与模型组相比,给药第 8 周后,芦丁低、高剂量组各指标含量均有不同程度

改善($P<0.05$, $P<0.01$);与芦丁低剂量组比较,芦丁高剂量组对 LDH、TP 的作用更显著($P<0.05$),见表 2。

表 1 给药前后各组小鼠血糖值变化/(mmol/L), $n=12$
Table 1 The changes of blood glucose in each group before and after administration/(mmol/L), $n=12$

Group	0 week	4 weeks	8 weeks
Normal control	7.41±0.11	5.12±0.80	6.88±1.50
Model	22.74±5.93*	25.07±3.23*	24.40±2.63*
Low-dose rutin	19.56±2.34*	19.47±2.58*·△	21.64±1.43*
High-dose rutin	18.87±5.88*	19.98±2.86*·△	22.10±1.73*

* $P<0.01$, vs. normol control group; △ $P<0.05$, vs. model group

表 2 芦丁对各组小鼠肝功能指标的影响/(U/L), $n=12$
Table 2 Effect of rutin on the renal function index of mice/(U/L), $n=12$

Group	ALT	AST	LDH	TP	ALB
Normal control	43.6±11.1	108.7±16.9	194.1±35.2	52.4±3.6	36.3±1.8
Model	86.9±17.4**	250.2±32.8**	336.5±105.3**	42.7±2.3*	30.1±1.2*
Low-dose rutin	67.3±13.6*·△	157.4±20.4*·△△	307.5±92.3*·△	46.2±4.4*·△	32.5±1.2
High-dose rutin	66.7±10.7*·△	154.8±16.1*·△△	268.3±78.5*·△△▲	49.1±1.4△▲	33.8±1.3△

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, vs. normol control group; △ $P<0.05$, △△ $P<0.01$, vs. model group; ▲ $P<0.05$, vs. low-dose rutin group. ALT: Alanine amiotransferase; AST: Aspartate aminotransferase; LDH: Lactic dehydrogenase; TP: Total protein; ALB: Albumin

2.3 HE 染色下观察肝脏组织形态改变

给药 8 周后各组肝脏组织 HE 染色,见图 1。正常组肝脏组织结构清楚,细胞大小正常,胞核明显,肝门静脉、肝汇管及肝血窦清晰可见,肝索排列整齐;与正常组相比,模型组肝细胞肿大,肝血窦扩张,肝索排列紊乱;而芦丁低、高剂量组上述情况均

明显改善。

2.4 Masson 染色下观察肝脏组织纤维化程度

给药 8 周后各组肝脏组织 Masson 染色,见图 2。正常组小鼠肝门静脉清晰,肝脏汇管处仅有少量纤维化,纤维化程度极低;与正常组相比,模型组小鼠肝脏汇管区可见明显胶原纤维增生,组织纤维化

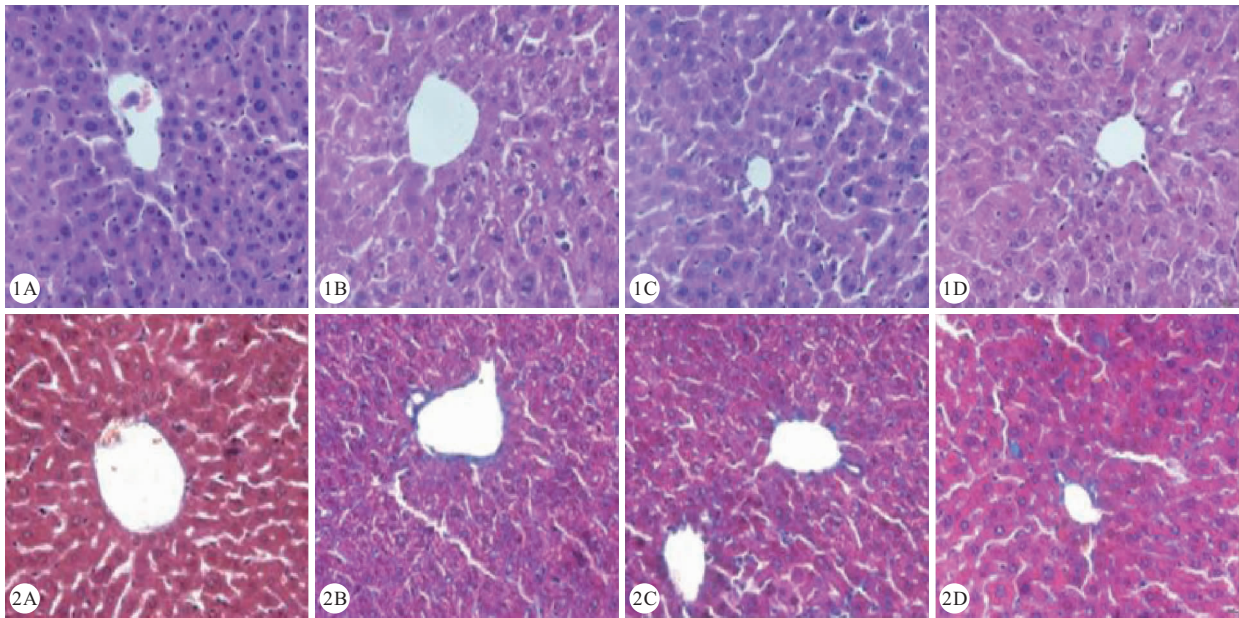


图 1 给药 8 周后下肝组织的形态。HE 染色 ×400

图 2 给药 8 周后肝组织的 Masson 染色。×400

Fig 1 Morphology of liver tissues at 8 weeks. HE staining ×400

Fig 2 Masson staining of liver tissues at 8 weeks, ×400

A: Normal control group; B: Model group; C: Low-dose rutin group; D: High-dose rutin group

程度严重；与模型组比较，芦丁低、高剂量组小鼠纤维化程度均有不同程度的改善。

2.5 电镜下肝脏组织超微结构观察

给药 8 周后各组肝脏组织超微结构，见图 3。正常组小鼠肝细胞大小正常，线粒体形态正常，组织内

无明显纤维化现象；与正常组比较，模型组小鼠出现肝脏纤维化的病理变化：肝血窦边缘及肝汇管区胶原纤维增生，汇管区血管内皮细胞线粒体肿胀、嵴模糊缺失，线粒体空泡样变，间质胶原纤维增多；与模型组相比，芦丁低、高剂量组上述现象均不同程度改善。

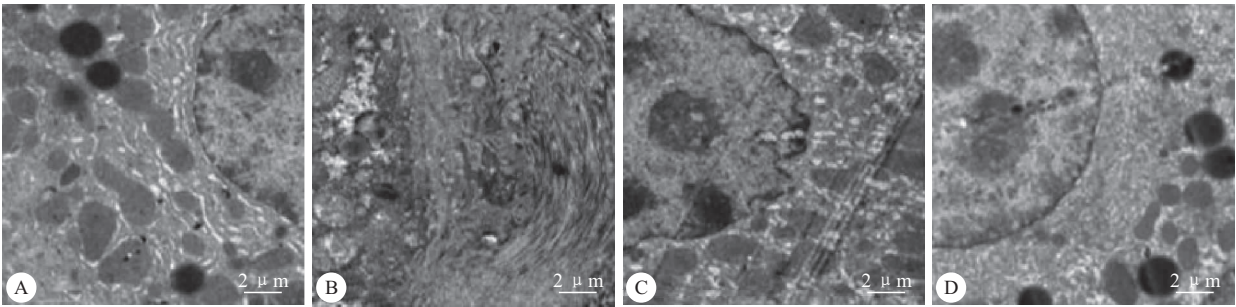


图 3 给药 8 周后透射电镜下肝脏组织的超微结构。×10 000

Fig 3 Ultrastructures of liver tissues under transmission electron microscopy. ×10 000

A: Normal control group; B: Model group; C: Low-dose rutin group; D: High-dose rutin group

3 讨论

糖尿病本身危害有限，但长期高血糖导致的相关并发症是影响患者生存质量的主要原因，各种肝病在糖尿病中有较高发病率。肝脏作为血糖累积的靶器官，代偿力较强，早期病变不明显，继而发展为非酒精性肝病、肝纤维化最终导致肝硬化而危及生命。其机制与糖尿病高糖诱导氧化应激异常相关，导致糖脂代谢紊乱并引起微血管病变及微循环障碍。芦丁作为黄酮类典型成分，广泛存在于槐米、荞麦等药用植物中，其抗氧化、调节糖脂代谢及血管保护作用的优势，为糖尿病肝病的防治提供了思路。本实验研究了芦丁对 1 型糖尿病小鼠肝功能及肝形态学改变的影响。

本实验 1 型糖尿病小鼠模型通过连续 5 d 腹腔注射小剂量的 STZ 建立^[11]，成模率高达 98%。STZ 能在葡萄糖转运蛋白 2 (GLUT2) 转运作用下，特异性地作用于胰岛 β 细胞，导致其结构破坏^[12]。而小剂量的 STZ 可通过改变胰岛 β 细胞表面抗原，引起自身免疫应答损伤胰岛 β 细胞，从而形成 1 型糖尿病。

成模小鼠因高血糖并发一系列疾病，其中包括糖尿病性肝损伤。结果显示，芦丁给药 4 周后小鼠血糖较模型组降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，但在给药后 8 周差异无统计学意义，表明芦丁在 1 型糖尿病早期具有一定的降糖作用。糖脂代谢紊乱诱发肝糖原堆积及微血管病变，表现为肝脏功能学及组织形

态学的异常。肝细胞受损时，细胞中存在的 ALT、AST、LDH 含量迅速增加并进入血清，可根据其含量判断肝细胞受损程度；当肝脏合成功能下降时，TP、ALB 合成减少，在血清中的含量也下降，其降低程度与肝脏合成功能损害程度呈正相关。实验结果显示，与正常组相比，模型组 ALT、AST、LDH 含量升高而 TP、ALB 含量均有所下降 ($P < 0.05$)，标志着肝损伤的发生；而芦丁组的上述各项指标与模型组比较均有改善 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，提示芦丁对肝功能具有保护作用。这与 MOHAMED 等^[13]报道的芦丁对大鼠的肝损害具有保护作用相一致。形态学改变是组织受损病变最直观的体现，本实验通过 HE 染色及经典 Masson 三色染色观察肝组织基本形态及纤维化情况，透射电镜观测肝组织超微结构变化。与正常组相比，HE 染色下可清晰观察肝细胞结构，模型组肝细胞肿大，肝血窦扩展，肝索排列紊乱；Masson 染色观察到小鼠肝脏纤维化程度，模型组小鼠的纤维化尤为明显，大量的蓝色纤维充斥于肝汇管内与肝门静脉附近；在电镜超微结构下，可观察到模型组小鼠肝血窦边缘及肝汇管区胶原纤维的增生，汇管区血管内皮细胞线粒体肿胀、空泡样变；芦丁低、高剂量组上述形态均有所改善，其中高剂量组改善作用更为明显。表明芦丁可改善高糖引发的肝组织的形态病变。

综上所述，芦丁可降低 1 型糖尿病小鼠血糖水平，改善肝功能及肝组织形态，降低肝组织纤维化程度，抑制 1 型糖尿病小鼠肝损伤进 (下转第 424 页)

- [15] YIN J, ZENG F, WU N, *et al.* Interleukin-8 promotes human ovarian cancer cell migration by epithelial-mesenchymal transition induction in vitro. *Clin Transl Oncol*, 2015, 17(5): 365-370.
- [16] ACLOQUE H, THIERY JP, NIETO MA. The physiology and pathology of the EMT. Meeting on the epithelial-mesenchymal transition. *EMBO Rep*, 2008, 9(4): 322-326.
- [17] TAMURA S, SHIOZAKI H, MIYATA M, *et al.* Decreased E-cadherin expression is associated with haematogenous recurrence and poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Br J Surg*, 1996, 83(11): 1608-1614.
- [18] ZHANG Y, AN J, LV W, *et al.* miRNA-129-5p suppresses cell proliferation and invasion in lung cancer by targeting microspherule protein 1, E-cadherin and vimentin. *Oncol Lett*, 2016, 12(6): 5163-5169.
- [19] VILLA GUZMAN J C, ESPINOSA J, CERVERA R, *et al.* Gastric and colon metastasis from breast cancer: case report, review of the literature, and possible underlying mechanisms. *Breast Cancer (Dove Med Press)*, 2017, 9: 1-7.
- [20] CHOI SH, KWON OJ, PARK JY, *et al.* Inhibition of tumour angiogenesis and growth by small hairpin HIF-1 α and IL-8 in hepatocellular carcinoma. *Liver Int*, 2014, 34(4): 632-642.
- [21] WU S, SHANG H, CUI L, *et al.* Targeted blockade of interleukin-8 abrogates its promotion of cervical cancer growth and metastasis. *Mol Cell Biochem*, 2013, 375(1-2): 69-79.
- [22] PINE SR, MECHANIC LE, ENEWOLD L, *et al.* Increased levels of circulating interleukin 6, interleukin 8, C-reactive protein, and risk of lung cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2011, 103(14): 1112-1122.
- [23] YIN J, YU C, YANG Z, *et al.* Tetramethylpyrazine inhibits migration of SKOV3 human ovarian carcinoma cells and decreases the expression of interleukin-8 via the ERK1/2, p38 and AP-1 signaling pathways. *Oncol Rep*, 2011, 26: 671-9.
- [24] YIN J, ZENG F, WU N, *et al.* Interleukin-8 promotes human ovarian cancer cell migration by epithelial-mesenchymal transition induction in vitro. *Clin Transl Oncol*, 2015, 17(5): 365-370.

(2017-10-21 收稿, 2018-03-23 修回)

编辑 别明江

(上接第 387 页)

程, 从而对糖尿病肝损伤具有保护作用。该研究主要从肝功能指标及组织形态学方面初步考察了芦丁对糖尿病肝病小鼠的保护作用, 下一步将进行其分子机制的研究。

参 考 文 献

- [1] 蔡祥增, 李红宁, 章 雯, 等. 糖尿病性肝病的临床特点分析. *实用糖尿病杂志*, 2014, 10(1): 42-43.
- [2] 吴 悠, 丛晓东, 张 云. 糖尿病肝损伤相关机制及中药干预. *中国民族民间医药*, 2011, 20(21): 16-17.
- [3] 杨景锋, 任艳芸. 从《金匱要略》谈糖尿病及其并发症的辨治. *四川中医*, 2008, 26(1): 40-42.
- [4] GIACCO F, BROWNEE WM. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*, 2010, 107(9): 1058-1070.
- [5] ZHANG BN, HAN SY, WANG ZL, *et al.* Protective effects of rutin from buckwheat flowers and leaves on diabetic cardiomyopathy. *Lat Am J Phar*, 2013, 32(5): 674-678.
- [6] 赵进喜, 王世东, 黄为钧. 中医药防治糖尿病及其并发症研究述评. *世界中医药*, 2017, 12(1): 10-15.
- [7] HABTEMARIAM S, LENTINI G. The therapeutic potential of rutin for diabetes: an update. *Mini Rev Med Chem*, 2015, 15(7): 524-528.
- [8] HOSSEINZADEH H, NASSIRI-ASL M. Review of the protective effects of rutin on the metabolic function as an important dietary flavonoid. *J Endocrinol Invest*, 2014, 37(9): 783-788.
- [9] 李光民, 储金秀, 韩淑英. 荞麦花叶中芦丁调节糖脂代谢的作用及机制. *华西药理学杂志*, 2010, 25(4): 426-428.
- [10] HABTEMARIAM S. Rutin as a natural therapy for Alzheimer's disease: insights into its mechanism of action. *Curr Med Chem*, 2016, 23(9): 860-873.
- [11] 刘 倩, 李霞辉, 张学梅. 2 型糖尿病小鼠模型的研究进展. *中国临床药理学与治疗学*, 2013, 18(10): 1196-1200.
- [12] 张 琪, 刘亚千, 陈 华. 小剂量链脲佐菌素致大鼠 Beta 细胞损伤模型探讨. *解放军医学院学报*, 2014, 35(6): 611-613.
- [13] MOHAMED MH, NAIF OA, ALI RA, *et al.* Hepato-protective effect of rutin via IL-6/STAT3 pathway in CCl₄-induced hepatotoxicity in rats. *Biol Res*, 2015, 48(1): 30-36.

(2017-10-30 收稿, 2018-02-28 修回)

编辑 吕 熙