

绿原酸对高血糖小鼠生长的影响及脏器的保护作用

袁 俊

(南京晓庄学院食品科学学院, 南京 211171)

摘 要: 为了探究绿原酸对高血糖小鼠的影响, 选用健康成年小鼠, 尾静脉注射四氧嘧啶建立高血糖小鼠模型。绿原酸分别采用高 ($2500 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)、中 ($250 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) 和低 ($25 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) 剂量组进行治疗, 降糖药格列美脲和生理盐水作为对照组。连续给药 6 d 后, 对比小鼠体重; 取小鼠脏器, 计算相应指数; 制作肝脏病理切片, 观察其变化。结果显示, 高血糖小鼠的体重增加不明显, 胸腺萎缩, 脾脏、肝脏发生肿大, 病变显著。经绿原酸给药后, 胸腺、脾脏指数均有所提高、肝脏的损伤也得到缓解。结果表明, 绿原酸对高血糖所致小鼠的各类脏器损伤具有一定的保护作用。这一作用可能是绿原酸能够促进体内能量代谢, 降低了小鼠体内血糖浓度, 从而减弱了高血糖对各类脏器的损伤。

关键词: 绿原酸; 小鼠; 高血糖

中图分类号: S865.13; Q591.4

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2016)06-0875-05

Effect of chlorogenic acid on the growth and organ protection of mice

YUAN Jun

(School of Food Science, Nanjing Xiaozhuang College, Nanjing 211171)

Abstract: To investigate the effect of chlorogenic acid on blood glucose concentration of mice, hyperglycemia mice models were set up by injection of alloxan through the healthy adult mice tail vein. Mice were randomly divided into 6 groups: chlorogenic acid high-dose group ($2500 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), medium-dose group ($250 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), low-dose group ($25 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), physiological saline group, model group and glimepiride group. The mouse weight in different groups was compared after continuous injections of alloxan for 6 days. Organ coefficients of the mice were calculated after sacrifice. The histopathology of the liver tissue was carried out. The experimental results showed that the body weight gain in the hyperglycemia group was not obvious, while the coefficients of thymus, spleen and liver in hyperglycemia mice were obviously higher than those in the control mice. However, the organ coefficient declined after chlorogenic acid treatment for 6 days. The liver injury of the mice was alleviated accordingly. In conclusion, chlorogenic acid has organ protection in mice, which might be achieved through the inhibition of the blood glucose concentration. This inhibition can weaken the organ damage of mice.

Key words: chlorogenic acid; mice; hyperglycemia

血糖是指血清中所含的糖, 绝大多数情况下指的是葡萄糖。葡萄糖为体内各种细胞组织器官的活动提供能量, 所以血糖必须稳定在正常水平才能维持机体正常的代谢。随着生活水平的提高, 人们的饮食习惯也有所改善, 对健康产生了一些有益的影响, 然而高血脂、高血糖、高血压也伴随而来, 越来越多地影响着人们的健康。糖尿病是一种代谢性疾病, 其最显著特征是血糖高。机体长期处于较高水平的血糖状态下, 会造成各种组织的损伤, 尤其

是对眼、肾、血管、心脏、神经以及内脏的慢性损伤以及功能性障碍, 对人体健康产生严重的危害^[1]。脾脏是人体最大的免疫器官, 胸腺是 T 淋巴细胞分化成熟的中枢器官, 都与免疫功能密切相关。相关研究表明, 高血糖对胸腺和脾脏的发育有一定影响, 会引起脾脏肿大, 胸腺萎缩, 而当免疫器官受到损伤时, 极易引发糖尿病的并发症, 因此糖尿病人应当重视胸腺指数和脾脏指数等重要指标^[2-3]。另外, 高血糖人群中约有 10%~30%会发生肝肿大、肝损

收稿日期: 2016-06-22

基金项目: 江苏省高校自然科学基金项目 (13KJD180001) 资助。

作者简介: 袁 俊, 博士, 副教授。E-mail: yuanjun72@njxzc.edu.cn

伤,进而恶化为肝硬化、脂肪肝,对肝功能造成严重的伤害,而血糖能够控制良好的糖尿病患者,肝肿大发生率仅有9%^[4-5]。

绿原酸又名咖啡鞣酸,是植物在有氧呼吸过程中产生的一种由咖啡酸与奎尼酸组成的酯类物质,具有抗氧化、抗菌消炎、增加白血球、抗过敏、保肝利胆以及清除自由基等一系列作用,其应用已深入到生活的方方面面,例如,食品、日用化工和医药保健等等^[6-7]。绿原酸在植物中的存在十分广泛,不仅是金银花的主要成分之一,在杜仲叶、葵花籽、水果、蔬菜、咖啡、可可豆、大豆及小麦等植物中均有存在^[8-9]。由于它的存在范围广以及含有多种生物活性,近年来已被人们广泛关注。相关研究表明,绿原酸水解产物有抗氧化和增加白细胞的作用,其中抗氧化作用可用来预防和治疗高血糖的发生;作为6-磷酸葡萄糖移位酶体系的转移性抑制剂,绿原酸及其衍生物还可以降低糖原的分解代谢,帮助糖尿病患者降低其较高的肝糖排泄速度^[10-11]。

为研究绿原酸对高血糖所致脏器损伤的保护作用,本试验以健康成年小鼠为研究对象,采用尾静脉注射四氧嘧啶的方法,建立高血糖小鼠模型。以模型组为空白对照,生理盐水、格列美脲、绿原酸高、中、低剂量组分别给药6 d。给药结束后,称量体重^[12],解剖取得小鼠的胸腺、脾脏、肝脏并制作肝脏的病理切片,观察其变化,探究绿原酸是否对高血糖所致的脏器损伤有保护作用,以期绿原酸辅助治疗糖尿病作用提供一些理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验小鼠

健康ICR雄性小白鼠250只,由扬州大学比较医学中心提供,体重为18~22 g,实验动物生产许可证编号:SCXK2012-0004;实验鼠颗粒饲料,由南京市江宁区青龙山动物繁殖场提供(主要原料:小麦、麸皮、鸡蛋、鱼肝油、玉米、鱼粉、花生饼、大麦、复合多维、矿物质和各种氨基酸)。

1.2 试剂

四氧嘧啶(Sigma,批号:A7413);格列美脲片(江苏万邦生化医药股份有限公司,批号:H20010575);绿原酸(Sigma公司)。

1.3 仪器

5418R冷冻离心机(德国艾本德公司);AUY120型电子天平(日本岛津公司);722型紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);HH-4型数显恒温水浴锅(国华电器有限公司);京都血糖

仪。

1.4 试验设计

1.4.1 高血糖小鼠模型的建立 小鼠购进后分笼饲养,自由饮水和取食,室温25℃左右,观察1周后实验。小鼠禁食12 h,尾静脉注射法注入四氧嘧啶80 mg·kg⁻¹,72 h之后用京都血糖测试仪测量小鼠血糖,选取血糖浓度大于或等于16.67 mmol·L⁻¹的高血糖小鼠用于实验^[13]。取50只高血糖小鼠,按照血糖平均水平随机分为5组,分别是绿原酸高剂量组(2500 μg·g⁻¹)、绿原酸中剂量组(250 μg·g⁻¹)、绿原酸低剂量组(25 μg·g⁻¹)、格列美脲组(0.033 mg·kg⁻¹)和模型组,另选10只健康的成年小鼠为生理盐水对照组。各组每天灌胃给药不同剂量绿原酸1次,模型组和生理盐水组均每日给予等量的生理盐水,自由取食饮水,连续6 d。

1.4.2 小鼠体重的称量 各组给药前以及最后一次给药2 h后,分别称量小鼠体重并记录数据,绘制小鼠体重变化图表。

1.4.3 小鼠胸腺、脾脏、肝脏指数的计算 最后一次给药2 h后,小鼠脱颈处死,解剖取胸腺、脾脏和肝脏,用生理盐水洗净,滤纸擦干,称重,分别计算胸腺、脾和肝脏指数,绘制图表。各脏器指数(%)=脏器质量(g)/动物质量(g)×100%。

1.4.4 肝脏病理切片的制作 小鼠脱颈处死后取肝脏,常规浓度福尔马林溶液固定,石蜡包埋、切片、HE染色制作肝脏病理切片,并在显微镜下观察肝脏的形态学变化。

1.4.5 数据处理 所有实验数据用SPSS 17.0软件进行分析,采用 t 检验进行均值间差异比较,数据统计均以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间差异采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有显著性差异, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 绿原酸对高血糖小鼠体重的影响

体重减轻是糖尿病的症状之一。由于胰岛素分泌不足,机体不能充分利用葡萄糖,使脂肪和蛋白质分解加速来补充能量和热量。其结果使体内碳水化合物、脂肪及蛋白质被大量消耗,再加上水分的丢失,导致病人体重减轻形体消瘦,病情越重,消瘦也就越明显。从表1可知,给药前注射四氧嘧啶小鼠的体重明显低于正常生理盐水对照组,并且存在显著性差异,符合糖尿病的“三多一少”的症状。给药后,高血糖模型组小鼠体重继续下降,而格列美脲组,绿原酸高、中剂量组体重开始增加,6 d

后与高血糖模型组比较, 格列美脲组, 绿原酸高剂量组存在极显著性差异, 绿原酸中剂量组差异显著。以上结果表明, 一定剂量的绿原酸可以缓解由高血

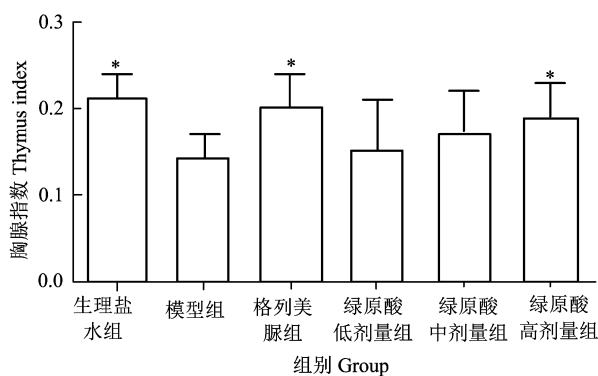
糖代谢导致的体重降低, 其效果略低于降糖药物格列美脲, 提示绿原酸可能对糖尿病的治疗有一定的效果。

表 1 绿原酸对高血糖小鼠体重的影响
Table 1 Effect of chlorogenic acid on the weight of hyperglycemic mice

组别 Group	剂量/mg·kg ⁻¹ Dosage	体重/g Weight	
		0 d	6 d
生理盐水组 Normal saline group	-	24.62±1.54	31.23±1.85
模型组 Model group	-	20.72±0.67 ^c	18.86±1.57
格列美脲组 Glimperiride group	0.033	20.62±1.54 ^c	26.32±2.34 ^a
绿原酸高剂量组 High-dose chlorogenic acid group	2500	20.86±1.46 ^c	25.87±1.72 ^a
绿原酸中剂量组 Middle-dose chlorogenic acid group	250	20.93±0.89 ^c	23.08±0.76 ^b
绿原酸低剂量组 Low-dose chlorogenic acid group	25	20.79±0.85 ^c	19.96±1.29

注: a.与模型组对照差异极显著 ($P<0.01$), $n=10$; b.与模型组对照差异显著($P<0.05$), $n=10$; c.与生理盐水组对照差异极显著($P<0.01$), $n=10$ 。

Note: the data followed with letter a, b and c mean extremely significant differences ($P<0.01$) and significant differences ($P<0.05$) as compared with the model group, respectively, $n=10$; the data followed with letter c mean extremely significant differences ($P<0.01$) as compared with the saline group, $n=10$.



“*”表示与模型组比较差异显著 ($P<0.05$, $n=10$)。下同
“*” means significant difference ($P<0.05$) as compared with the model group, the same below

图 1 绿原酸对高血糖小鼠胸腺指数的影响

Figure 1 Effect of chlorogenic acid on thymus of hyperglycemic mice

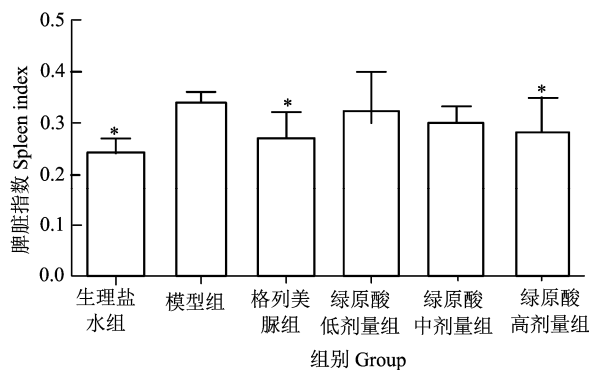


图 2 绿原酸对高血糖小鼠脾脏指数的影响

Figure 2 Effect of chlorogenic acid on spleen of hyperglycemic mice

2.2 绿原酸对高血糖小鼠胸腺指数的影响

胸腺是机体的免疫器官, 受到损伤时, 胸腺会发生萎缩。由图 1 可以看出, 模型组小鼠胸腺指数明显下降, 说明胸腺器官萎缩, 免疫功能有所下降。格列美脲组和绿原酸高剂量组可以显著地提高胸腺指数, 与模型组比较差异显著 ($P<0.05$), 但绿原酸中、低剂量组的治疗效果不明显。以上结果表明, 高浓度的绿原酸对高血糖造成的小鼠胸腺损伤可能具有一定的修复作用。

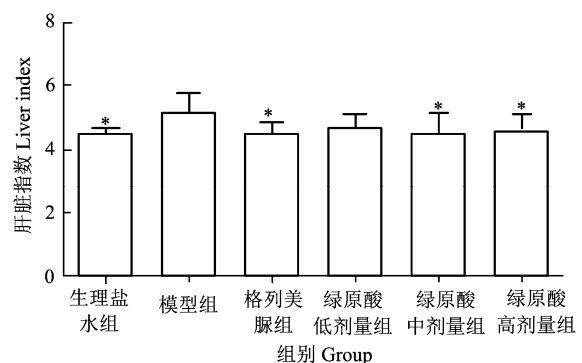


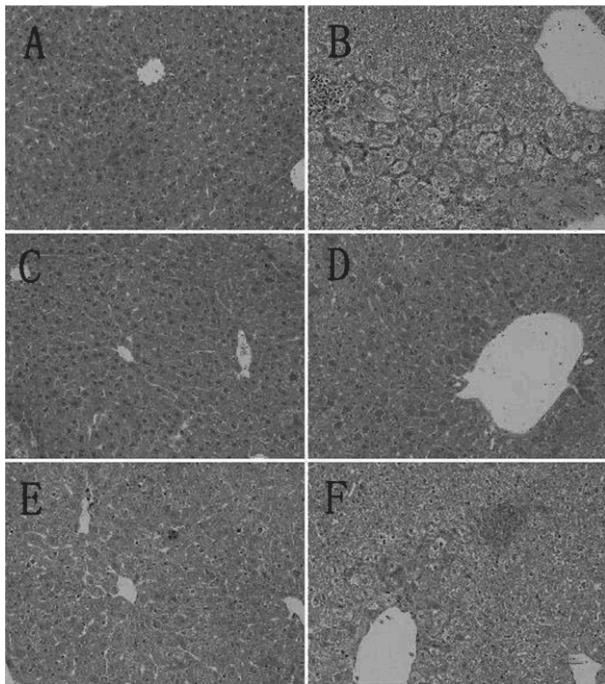
图 3 绿原酸对高血糖小鼠肝脏指数的影响

Figure 3 Effect of chlorogenic acid on liver of hyperglycemic mice

2.3 绿原酸对高血糖小鼠脾脏指数的影响

由图 2 可以看出, 模型组小鼠的脾脏指数增大, 提示该器官可能出现充血、水肿或增生肥大等症状; 格列美脲和绿原酸高剂量组的脾脏指数下降, 与模型组比较差异显著 ($P<0.05$); 绿原酸中、低剂量

组与模型组比较无显著性差异,但脾脏指数仍然低于模型组。以上结果表明,绿原酸可能对高血糖引起的小鼠脾脏肿大有抑制作用,且浓度越大,抑制作用越明显。



A.生理盐水组 Normal saline group(control group); B.模型组 Model group; C.格列美脲组 Glimepiride group; D.绿原酸高剂量组 High-dose chlorogenic acid group; E.绿原酸中剂量组 Middle-dose group of chlorogenic acid group; F.绿原酸低剂量组 Low-dose chlorogenic acid group

图 4 小鼠肝脏病理组织切片

Figure 4 Histopathology of the liver tissue of mice

2.4 绿原酸对小鼠肝脏指数的影响

由图 3 可以看出,模型组的小鼠肝脏指数上升,提示肝脏可能发生了肿大及其他病变;格列美脲和绿原酸高、中剂量组的肝脏指数下降,与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$);绿原酸低剂量组与模型组比较无显著性差异,但肝脏指数仍然低于模型组。以上结果表明,绿原酸可能对高血糖引起的小鼠肝脏受损有抑制作用,且浓度越大,抑制作用越明显。

2.5 小鼠肝脏病理组织学观察

从图 4 可以看出,生理盐水组小鼠的肝细胞形状规则无异变,结构完整,并且细胞均匀无缝隙地排列在中央静脉周围,呈放射状,肝细胞中的胞浆均匀,可以清晰的观察到细胞核,没有出现细胞异常及变异的现象(图 4-A)。四氧嘧啶造模成功后的鼠肝脏细胞与生理盐水组相比有明显区别,主要表现为:细胞排列杂乱无序,浊肿变形,胞浆发生疏松样变性,气球样变,多点灶状坏死;中央静脉

区与汇管区肝细胞坏死,细胞核发生浓缩,碎裂,溶解等病理性核分裂象(图 4-B)。格列美脲组治疗组肝组织基本正常,肝细胞发生了少量炎细胞的浸润,有一些散在的水样变性,嗜酸性变(图 4-C)。绿原酸高剂量组肝组织结构基本正常,肝细胞部分发生浊肿变形,存在有少量的嗜酸性变、水样变性(图 4-D)。绿原酸中剂量组肝组织发生轻度浊肿变形,有散在嗜酸性变,肝组织有点状坏死(图 4-E)。绿原酸低剂量组肝细胞存在普遍的浊肿变形,肝细胞发生多灶性坏死,有散在嗜酸性变,汇管区发现有少量炎细胞的浸润(图 4-F)。以上结果表明,体内高血糖对肝脏造成了损伤,而绿原酸对高血糖引起的肝细胞损伤有一定的治疗效果,并且高剂量组治疗效果要好于低剂量组。

3 讨论与结论

随着经济的发展,人们生活水平也在不断地提高,然而高油脂和高脂肪食物的摄入,导致越来越多的人患有高血压、高血脂和高血糖等“富贵病”,使人们的身体健康受到了新的挑战^[14]。其中糖尿病的高发性,使其成为人类健康的共同话题,预计至 2030 年全球糖尿病的发病率将达到 4.39 亿^[15]。糖尿病是一种代谢性疾病,其最显著的特点是高血糖。人体长期处于较高水平的血糖状态下,会造成各种组织的损伤,尤其是对眼、肾、血管、心脏、神经以及肝脏的慢性损伤以及功能性障碍,对人体的健康产生严重的危害。

绿原酸作为一种生理活性物质,与人类的健康有着极其紧密的联系。相关研究结果显示,它具有抗肿瘤、抗菌、利胆、抗过敏、抗氧化、增高白细胞、抗致畸、预防心血管疾病、促进糖类和脂质代谢等作用,毒性小、药理性强,因此被人们广泛应用于医药、食品、化妆品和农业等各个领域^[16]。本文在研究中尾静脉注射四氧嘧啶构建高血糖小鼠模型,结果发现模型组小鼠均发生了生长受限,胸腺萎缩,脾脏、肝脏肿大的现象,而脾脏和胸腺是体内十分重要的淋巴器官,与免疫功能密切相关^[17]。以上结果表明高血糖确实对小鼠的生长发育、脾脏和胸腺功能产生了一定影响;而经绿原酸给药后,小鼠生长基本正常,脏器损伤较轻,基本没有发生胸腺萎缩,脾脏、肝脏肿大的现象。这表明绿原酸可保护高血糖小鼠的免疫器官,增加小鼠的免疫能力。已有研究显示,糖尿病与氧化应激有着密切联系,氧化应激可造成胰岛细胞功能障碍、胰岛素抵抗,在糖尿病及其并发症的发生、发展过程中

起着关键的作用^[18]。绿原酸是一种由咖啡酸与奎尼酸组成的酯类物质,其结构中的邻二酚羟基可通过抑制细胞的氧化应激来抑制疾病的发生,所以绿原酸降低血糖,对脏器损伤的保护作用可能与此有关^[19]。

病理组织切片可以在细胞水平上反映疾病是否对器官造成了损伤。为研究绿原酸可能对肝损伤的保护作用,我们取处死后各组小鼠的肝脏,制作肝脏病理切片,并在显微镜下观察肝脏的形态学变化。本实验中,四氧嘧啶造模成功后,小鼠肝细胞排列杂乱无序,浊肿变形,胞浆发生疏松样变性,气球样变,多点灶状坏死;经高、中剂量绿原酸给药后,肝细胞损伤有所改变,表现为肝组织结构基本正常,肝细胞浊肿变形、嗜酸性变、水样变性减少。相关报导表明由于糖尿病人的微血管发生病变以及微循环障碍,导致机体肝脏缺血缺氧,引起肝脏内的二氧化碳积累,供氧量减少,酸中毒,消耗氧量增加,引起胆红素代谢紊乱,转氨酶的活性增加,严重者还会引起肝脏的坏死^[20]。而绿原酸可改善血液状况,减少肝细胞线粒体中的自由基和抗氧化,从而起到较好的抗肝损伤作用^[7]。本研究结果提示绿原酸对于高血糖引起的肝损伤有一定的治疗效果,并且高剂量组的治疗效果要好于低剂量组。

绿原酸广泛存在于各种植物中,例如,金银花,杜仲科植物杜仲的叶,蔷薇科植物英国山楂的果实,忍冬科植物忍冬、红腺忍冬、千屈菜科植物千屈菜花,十字花科植物卷心菜茎、叶,无患子科植物坡柳,菊科植物牛蒡的叶和根以及茜草科植物小果咖啡、中果咖啡及大果咖啡的种子等。绿原酸能否为人类在糖尿病的治疗上提供药用价值还不十分确定,但是他对糖尿病的预防和辅助治疗应当是具有重要意义的。当今社会,人们对食品的要求不再单单是提供新陈代谢和机体生长所必需的营养物质,而是更加关注食品在调节身体机能,促进身体健康等方面的作用。现代科技的发展促进了功能性食品的诞生,本研究为绿原酸治疗糖尿病的可行性提供了新思路,即使绿原酸不能作为药物应用于临床,也可以为与糖尿病相关的一些功能性食品的研发提供相关的理论依据。

参考文献:

- [1] 陈伟平, 谢园沁, 胡金鹿, 等. 紫心甘薯对四氯化碳、卡介苗加脂多糖诱发小鼠肝损伤的保护作用[J]. 食品与生物技术学报, 2011, 30(6): 887-893.
- [2] 王爱华, 李继连, 张斌. 苏丹红 I 对小鼠血液和脏器系数的影响[J]. 食品科学, 2010, 31(5): 279-282.
- [3] 李怡, 陈湘宏. 青海椴木提取物对糖尿病小鼠 SOD、MDA 及脾脏和胸腺指数的影响[J]. 中国民族民间医药, 2015, 24(22): 19-20.
- [4] 袁俊, 吴雨龙, 阴玉洁, 等. 绿原酸对小鼠血糖浓度的影响[J]. 西北农业学报, 2015, 24(11): 35-40.
- [5] 李勇猛, 牟新利, 肖中平, 等. 降糖致亚比提片对糖尿病小鼠肝脏的影响[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(6): 976-978.
- [6] 龙文静. 咖啡豆中咖啡因与绿原酸的研究进展[J]. 广西轻工业, 2010, 26(1): 1-2.
- [7] 史秀玲, 高银辉. 绿原酸对小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19): 199-202.
- [8] 贾桂燕, 鲁巍巍, 郑毅男. 咖啡中咖啡因和绿原酸的含量测定[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2008, 20(3): 64-67.
- [9] 罗晓燕, 吴九九, 温艳梅, 等. 高效液相色谱法同时测定绿原酸及其五种主要代谢产物[J]. 食品工业科技, 2013, 34(4): 66-68.
- [10] HEMMERLE H, BURGER H J, BELOW P, et al. Chlorogenic acid and synthetic chlorogenic acid derivatives: novel inhibitors of hepatic glucose-6-phosphate translocase[J]. J Med Chem, 1997, 40(2): 137-145.
- [11] VAN DIJK T H, VAN DER SLUIJS F H, WIEGMAN C H, et al. Acute inhibition of hepatic glucose-6-phosphatase does not affect gluconeogenesis but directs gluconeogenic flux toward glycogen in fasted rats. A pharmacological study with the chlorogenic acid derivative S4048[J]. J Biol Chem, 2001, 276(28): 25727-25735.
- [12] 谢婧雯, 王焯, 朱明, 等. 多形拟杆菌对糖尿病模型小鼠的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2013, 25(8): 869-873.
- [13] MCCARTY M F. Nutraceutical resources for diabetes prevention-an update[J]. Med Hypotheses, 2005, 64(1): 151-158.
- [14] WANG Z F, FANG S Z, HU X S. Effective diffusivities and energy consumption of whole fruit chinese jujube (*Zizyphus jujuba miller*) in microwave drying [J]. Drying Technology, 2009, 27(10): 1097-1104.
- [15] SHAW J E, SICREE R A, ZIMMET P Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2010, 87(1): 4-14.
- [16] 席利莎, 木泰华, 孙红男. 绿原酸类物质的国内外研究进展[J]. 核农学报, 2014, 28(2): 292-301.
- [17] 叶绍凡. 黄精多糖对力竭运动小鼠胸腺胸腺指数、脾脏指数、T 淋巴细胞亚群、巨噬细胞吞噬功能的影响[J]. 基因组学与应用生物学, 2015, 34(1): 60-65.
- [18] 刘莹莹. 2 型糖尿病患者血清锌离子水平与氧化应激及内皮损伤的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2015.
- [19] 史秀玲, 高银辉. 绿原酸对小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19): 199-202.
- [20] 赵旭敏, 李社莉. 胰岛素抵抗与 2 型糖尿病肝损伤的研究进展[J]. 心血管康复医学杂志, 2015, 24(1): 113-116.