

沙米总黄酮对1型糖尿病小鼠氧化应激的调节作用

刘晓霞¹, 周保成^{2*}, 杜发强¹, 郭振华¹, 郭佳丽³

(1. 甘肃医学院基础医学院, 平凉 744000; 2. 平凉市中医医院, 平凉 744000;
3. 甘肃医学院临床医学系, 平凉 744000)

摘要: **目的** 研究沙米总黄酮(total flavonoids of *Agriophyllum squarrosum*, ATF)对1型糖尿病(type 1 diabetes mellitus, T1DM)小鼠糖脂代谢和氧化应激作用。**方法** 采用单因素实验和响应面法优化 ATF 的最佳提取条件, 研究 ATF 体外抗氧化活性及其对 T1DM 小鼠糖脂代谢和氧化应激作用。**结果** 当乙醇浓度为 83%、液固比 34:1 (mL/g)、提取时间 65 min、提取温度 50℃, ATF 提取得率为(21.98±0.11) mg/g; ATF 在体外表现出良好的抗氧化能力, ATF 可显著降低 T1DM 小鼠总胆固醇(total cholesterol, TC)和甘油三酯(triglyceride, TG)水平, 肝和肾脏系数显著降低, 总超氧化物歧化酶(total superoxide dismutase, T-SOD)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)和过氧化氢酶(catalase, CAT)活性显著升高, 丙二醛(malonyldialdehyde, MDA)含量显著降低。**结论** ATF 可有效改善小鼠糖脂代谢、器官系数和抗氧化酶, 从而减少对肝组织的损伤。本研究结果可为沙米在开发辅助降糖功能食品和改善糖尿病方面的应用提供理论参考。

关键词: 沙米; 总黄酮; 降糖; 氧化应激

Regulatory effects of total flavonoids of *Agriophyllum squarrosum* on oxidative stress in type 1 diabetes mellitus mice

LIU Xiao-Xia¹, ZHOU Bao-Cheng^{2*}, DU Fa-Qiang¹, GUO Zhen-Hua¹, GUO Jia-Li³

(1. Basic Medical College, Gansu Medical College, Pingliang 744000, China; 2. Pingliang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Pingliang 744000, China; 3. Department of Clinical Medicine, Gansu Medical College, Pingliang 744000, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the effects of total flavonoids of *Agriophyllum squarrosum* (ATF) on glucose and lipid metabolism and oxidative stress in type 1 diabetes mellitus (T1DM) mice. **Methods** The single factor experiment and response surface methodology were used to optimize the optimal extraction conditions of ATF, and the antioxidant activity of ATF *in vitro* and its effects on glucose and lipid metabolism and oxidative stress in T1DM mice were studied. **Results** When ethanol concentration was 83%, liquid-solid ratio was 34:1 (mL/g), extraction time was 65 min, and extraction temperature was 50℃, the extraction yield of ATF was (21.98±0.11) mg/g; ATF showed good antioxidant capacity *in vitro*. ATF could significantly reduce the levels of total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) in T1DM mice, significantly reduce the liver and kidney coefficients, and significantly reduce

基金项目: 甘肃医学院校级科研项目(GY-2022ZK024)

Fund: Supported by the School Level Scientific Research Project of Gansu Medical College (GY-2022ZK024)

***通信作者:** 周保成, 副主任医师, 主要研究方向为代谢性疾病研究。E-mail: 54316538@qq.com

***Corresponding author:** ZHOU Bao-Cheng, Associate Professor, Pingliang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhongshan Street No.109, Kongtong District, Pingliang 744000, China. E-mail: 54316538@qq.com

the total superoxide dismutase (T-SOD), glutathione (GSH) and catalase (CAT) activities, and significantly reduce the content of malondialdehyde (MDA). **Conclusion** ATF can effectively improve glucose and lipid metabolism, organ coefficient and antioxidant enzymes in mice, thus reducing the damage to liver tissue. The results of this study can provide a theoretical reference for the application of *Agriophyllum squarrosum* in the development of functional food for assisting in reducing blood sugar and improving diabetes.

KEY WORDS: *Agriophyllum squarrosum*; total flavonoids; hypoglycemic; oxidative stress

0 引言

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是一种严重危害人类健康的慢性疾病,国际糖尿病联合会(International Diabetes Federation, IDF) 2021 年报告显示全球约有 5.37 亿 DM 患者,到 2045 年,这个数字预计增加到 6.93 亿^[1]。DM 是继心血管疾病和癌症两种疾病第 3 个威胁健康的疾病。研究发现,2019 年爆发新型冠状病毒(新冠肺炎)的患者中 1 型糖尿病(type 1 diabetes mellitus, T1DM)患病率在 0.15%~28.98%之间^[2]。高血糖是新冠肺炎相关并发症发生的重要因素。因此对 T1DM 的治疗尤为重要。目前,越来越多的研究主要通过饮食预防和治疗 DM^[3]。

作为我国沙区传统的野生食用植物之一,沙米为沙生植物沙蓬[*Agriophyllum squarrosum* (L) Moq.]的种子,含有黄酮、蛋白质、生物碱等活性成分,具有抗 DM、抗氧化、降血脂和保护心脑血管等功能^[4-8],研究表明,黄酮类化合物植物次级代谢,具有抗氧化、抗炎、抗菌、抗辐射、抗癌、抗病毒等活性^[9-13],因此,很有必要提取和利用沙米中黄酮类化合物。

氧化应激是 DM 发展的重要机制,它导致 DM 患者肝病的发病率更高,肝脏病变恶化。这主要归因于 DM 患者中活性氧种类和抗氧化防御机制之间的失衡^[14-15]。在 T1DM 中,通常会对 β 细胞产生一系列损伤,进而导致 β 细胞死亡,例如高糖环境通过直接诱导线粒体损伤导致 β 细胞过度死亡^[16-17]。DM 会加重氧化应激水平,氧化应激增强通过损伤胰岛 β 细胞和降低外周组织中的胰岛素敏感性导致 T1DM 的发展;胰岛 β 细胞对活性氧化物(reactive oxygen species, ROS)的损伤敏感,因其抗氧化酶的含量和活性相对较低,可直接损伤胰岛 β -细胞并激活许多氧化还原敏感的信号通路,主要是 TLRs/NF- κ B 和 Nrf2/Keap1/are,然后导致 T1DM 的发展;氧化应激主要影响胰腺 β 细胞的胰岛素分泌,并导致胰腺 β 细胞氧化还原稳态失衡身体,导致 T1DM 发展恶化。目前,对沙米的研究主要集中在栽培技术和食品加工方面^[18-20]。然而,其总黄酮提取工艺、体内外抗氧化活性以及降糖研究均未得到优化。

因此,本研究采用响应面法优化沙米总黄酮(total flavonoids of *Agriophyllum squarrosum*, ATF)的最佳提取条件,评价其对 T1DM 小鼠的体外抗氧化活性及对糖脂代谢

和氧化应激的调节作用,以期沙米在开发辅助降糖功能食品和改善 DM 方面的应用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

沙米由鄂尔多斯市沃源生态建设有限责任公司提供。

2,2'-叠氮二铵-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸盐) [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ammonium salt, ABTS]、2,2-二苯基-1-苦酰肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)、抗坏血酸(分析纯,上海麦克林生化科技股份有限公司); 2,4,6-三吡啶基三嗪[2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine, TPTZ]、链脲佐菌素(streptozocin, STZ)、二甲双胍(分析纯,上海吉至生化科技有限公司); 三氯化铁(FeCl_3)、水杨酸、过氧化氢(H_2O_2)、醋酸、醋酸钠、柠檬酸、硫酸铁(FeSO_4)、过硫酸钾($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$)(分析纯,上海实验试剂有限公司); 总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、总超氧化物歧化酶(total superoxide dismutase, T-SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽(glutathione peroxidase, GSH)过氧化物酶检测试剂盒(上海酶联生物科技有限公司)。

1.2 仪器设备

CR21GIII 高速冷冻离心机(日本 Hitachi 公司); 756MC 菁华紫外可见分光光度计[迅特尔(南通)科学仪器有限公司]; FA2004 万分之一电子分析天平(杭州微米派科技有限公司); LD-96A 多功能酶标仪(山东莱恩德智能科技有限公司)。

1.3 单因素实验设计

以黄酮类化合物的提取得率作为评价指标,分别在不同条件下进行实验,即:乙醇浓度(50%、60%、70%、80%、90%)、液固比[10、20、30 和 40 (mL/g)]、提取时间(20、40、60、80、100 min)和提取温度(40、50、60、70 和 80℃)。采用硝酸铝显色法测定总黄酮含量^[21]。

根据提取液浓度、体积和所用粉末的质量(M , g)计算 ATF 得率(mg/g)如下:

$$Y = \frac{C \times V}{M} \quad (1)$$

其中, C 待测溶液中总黄酮的质量浓度, mg/mL; V 提取样品体积, mL; M 是样品质量, g; Y 是 ATF 得率, mg/g。

1.4 响应面实验设计

根据 1.3 实验结果, 采用 Design Expert 8.0.6 软件对乙醇浓度、液固比、提取温度和提取时间进行四因素三水平 Box-Behnken experimental 设计。实验因素和水平如表 1 所示。

表 1 响应面设计中因素与水平表

Table 1 Factors and levels of response surface methodology

因素/水平	-1	0	1
A 乙醇浓度/%	70	80	90
B 液固比(mL/g)	20:1	30:1	40:1
C 提取时间/min	40	60	80
D 提取温度/°C	40	50	60

1.5 体外抗氧化性能

以维生素 C (vitamin C, VC)作为阳性对照, 采用 DPPH 自由基、ABTS 自由基、OH 自由基清除能力和总抗氧化能力用于分析 ATF 抗氧化活性^[22-24]。

1.5.1 DPPH 自由基清除能力

VC 作为评价 ATF 清除 DPPH 自由基效率的参考。分别制备 ATF 和 VC 溶液质量浓度均为 0.3、0.6、0.9、1.2 和 1.8 mg/mL。将 2 mL VC 溶液和 2 mL 0.15 mmol/L DPPH 溶液混合均匀后, 在黑暗条件下反应 30 min, 测定反应混合物在 517 nm 处吸光度 A_i 。重复上述步骤, VC 采用 ATF 溶液代替后与 DPPH 混合, 测定其吸光度 A_b ; 蒸馏水与 DPPH 溶液反应, 测定吸光度 A_c , 计算公式如式(1)。

$$\text{DPPH 自由基清除率}/\% = (1 - \frac{A_i - A_b}{A_c}) \times 100\% \quad (1)$$

1.5.2 ABTS 自由基清除能力

将 7.00 mmol/L ABTS 溶液和 2.50 mmol/L $K_2S_2O_8$ 溶液均匀混合, 并在室温下的黑暗条件下孵育 12 h。然后, 用乙醇稀释混合物以制备 ABTS 工作溶液。然后, 向 1 mL ATF 溶液和 VC (0.2~1.2 mg/mL)中加入 1 mL ABTS 工作溶液, 混合均匀后在室温下静置 30 min, 并测定 734 nm 处的吸光度。按照公式(2)计算 ABTS 自由基清除能力。

$$\text{ABTS 自由基清除率}/\% = \frac{A_o - A}{A_o} \times 100\% \quad (2)$$

其中, A_o 为乙醇溶液与 ABTS 溶液混合后吸光度, A 为样品溶液与 ABTS 溶液混合后吸光度。

1.5.3 OH 自由基清除能力

将 10 mmol/L 的 $FeSO_4$ 溶液、10 mmol/L 水杨酸溶液、10 mmol/L H_2O_2 溶液和 ATF 溶液或 VC (0.3~1.8 mg/mL)均匀混合, 并在 37°C 下反应 30 min。OH 自由基清除率公式如式(3):

$$\text{OH 自由基清除率}/\% = (1 - \frac{A_i - A_b}{A_c}) \times 100\% \quad (3)$$

其中: A_i 为加样品的吸光度; A_c 为空白对照的吸光度; A_b 为

不加显色剂 H_2O_2 吸光度。

1.5.4 总抗氧化能力测定

将 0.2 mL 不同浓度 ATF 样品溶液、6 mL 铁离子还原/抗氧化能力 (ferric ion reducing antioxidant power, FRAP)工作液(0.3 mol/L 醋酸盐缓冲液、10 mmol/L TPTZ 溶液、20 mmol/L $FeCl_3$ 溶液按照体积比 10:1:1 配制)、0.6 mL 蒸馏水混合均匀, 37°C 条件下反应 10 min 于 593 nm 处测定吸光度。按照上述方法以 0.1~1.0 mmol/L $FeSO_4$ 的标准溶液代替样品绘制标准曲线, 得到线性方程: $Y=0.00378X+0.35$, $r^2=0.9997$ 。其中 Y 为 593 nm 处吸光度, X 为 $FeSO_4$ 浓度, mmol/L。

1.6 动物实验

1.6.1 T1DM 小鼠模型建立

雄性 C57BL/6 小鼠(18~20 g, 6~7 周龄)[购自甘肃中医药大学实验动物中心,合格证号 SCXK(甘)2015-0002]适应性饲养 7 d 后, 小鼠在无水的禁食 12 h 后测量并记录其空腹血糖(fasting plasma glucose, FBG), 第 2 d 继续禁食 12 h。连续 4 d 腹腔注射低剂量[50 mg/(kg·BW)] STZ, 在第 5 d 腹腔注射高剂量[100 mg/(kg·BW)] STZ。注射 1 h 后恢复进食。一周后, $FBG \geq 11.1$ mmol/L 被认为是一种成功的模型。建模期间无小鼠死亡, 共成功建造了 36 个模型, 随机分成 6 组注射不同药物, 具体见表 2。

表 2 建模小鼠分组及药物灌胃情况

Table 2 Grouping of model mice and intragastric administration of drugs

分组	药物均灌胃 7 周
空白对照组(BC)	200 mg/(kg·BW)生理盐水
阴性对照组(NC)	200 mg/(kg·BW)柠檬酸缓冲溶液 (0.1 mol/L, pH 4.5)
阳性对照组(PC)	200 mg/(kg·BW)二甲双胍
低剂量 ATF 组(AL)	50 mg/(kg·BW) ATF
中剂量 ATF 组(AM)	100 mg/(kg·BW) ATF
高剂量 ATF 组(AH)	200 mg/(kg·BW) ATF

1.6.2 小鼠各种指标的测定

测定小鼠的初始体重, 开始灌胃后, 每天上午 9 点测量并记录水和食物的摄入量及测量体重, 实验结束前测定最终体重。从眼球中抽取血液, 以 3000 r/min 离心 10 min 获得的上清液为血清样品, 在-20°C 保存备用。取心脏、肝脏、脾脏和肾脏, 用盐水冲洗。然后称重并计算器官系数。在实验结束前对小鼠进行口服葡萄糖耐量实验(oral glucose tolerance test, OGTT)。小鼠禁食过夜 12 h。口服灌胃 40%葡萄糖溶液, 剂量为 200 mg/(kg·BW)。在 30、60、90 和 120 min 时从尾静脉采集血液以测量血糖值。通过颈椎脱臼处死小鼠, 收集血液和器官。测定 TC、TG 含量, T-SOD、MDA、GSH 和 CAT 水平。

1.7 统计分析

使用 Orgin 2019b 和 Design Expert 8.0.6 软件绘制统计分析图, 数据表示为平均值±标准偏差。通过 SPSS 23.0 软件分析多重显著性差异, $P<0.05$ 表示显著差异。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

当乙醇浓度为 80% 时, ATF 得率达到最大值; 乙醇浓度继续增加时呈下降趋势, 可能是 ATF 与 80% 乙醇极性最为相似, 因此其得率最高; ATF 得率随液固比增加呈现先升高后下降的趋势, 在 30:1 (mL/g) 时, 最大为 19.85 mg/g, 可能是当液固比为 30:1 (mL/g) 时, ATF 达到饱和, 继续增加液固比导致结构性质类似物质被溶解^[25-26]; 随着提取时间延长, ATF 得率在 60 min 时达到最大值, 继续延长提取时间, 得率下降。温度是影响黄酮提取效果重要因素之一, 对其结构有一定破坏; 温度为 50℃ 时, 总黄酮得率达到最大值。因此, 从提取效果和节能的角度来看, 80% 乙醇浓度、液固比 30:1 (mL/g)、提取时间 60 min 和温度 50℃ 为最佳提取参数。

2.2 响应面方法优化 ATF 提取条件

2.2.1 实验设计和结果

采用 Box-Behnken 中心组合研究 4 个因素在 3 个水平的影响, 取决于 ATF 的产率, 共进行 29 组实验, 其中包含 5 个重复的中心组合, 实验设计和结果如表 3 所示。

表 3 Box-Behnken 实验设计和结果
Table 3 Box-Behnken experimental design and results

实验号	A-乙醇 浓度/%	B-液固比 (mL/g)	C-提取 时间/min	D-提取 温度/℃	Y-黄酮提取 得率/(mg/g)
1	-1	-1	0	0	18.96
2	1	-1	0	0	18.53
3	-1	1	0	0	17.45
4	1	1	0	0	21.25
5	0	0	-1	-1	17.10
6	0	0	1	-1	19.10
7	0	0	-1	1	18.94
8	0	0	1	1	18.43
9	-1	0	0	-1	15.59
10	1	0	0	-1	19.10
11	-1	0	0	1	17.56
12	1	0	0	1	18.12
13	0	-1	-1	0	18.77
14	0	1	-1	0	19.45
15	0	-1	1	0	19.21
16	0	1	1	0	20.56
17	-1	0	-1	0	16.20
18	1	0	-1	0	16.58
19	-1	0	1	0	18.26

表 3(续)

实验号	A-乙醇 浓度/%	B-液固比 (mL/g)	C-提取 时间/min	D-提取 温度/℃	Y-黄酮提取 得率/(mg/g)
20	1	0	1	0	19.25
21	0	-1	0	-1	17.90
22	0	1	0	-1	18.50
23	0	-1	0	1	18.56
24	0	1	0	1	19.14
25	0	0	0	0	22.13
26	0	0	0	0	21.74
27	0	0	0	0	21.13
28	0	0	0	0	22.43
29	0	0	0	0	21.96

四因素(A、B、C、D)与评价指标 Y 之间的二次多项式方程为:

$$Y=21.88+0.73A+0.37B+0.65C+0.29D+1.06AB+0.15AC-0.74AD+0.17BC-5.000E-003BD-0.63CD-2.27A^2-0.84B^2-1.65C^2-2.12D^2$$

响应面二次模型的方差分析如表 4 所示。模型 $P<0.0001$, 极显著, 表明实验设计合理。失拟项 $P>0.05$, 不显著。结果表明, 该模型在实验范围内很好地拟合了实验数据。拟合系数的 R^2 值为 0.9344, 可以假设模型解释了 93.44% 的响应值变化。各实验因子的显著性分析表明: A、C、AB、AD、 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 极显著。总之, ATF 得率和提取条件之间不存在简单的线性关系。可以得到, 该模型可用于预测 ATF 提取得率。

表 4 响应面二次模型的方差分析

Table 4 Analysis of variance for response surface quadratic model

来源	平方和	自由度	均方和	F	P
模型	81.45	14	5.82	14.24	<0.0001
A	6.47	1	6.47	15.83	0.0014
B	1.63	1	1.63	3.98	0.0658
C	5.03	1	5.03	12.31	0.0035
D	1.00	1	1.00	2.44	0.1405
AB	4.47	1	4.47	10.95	0.0052
AC	0.09	1	0.09	0.23	0.6406
AD	2.18	1	2.18	5.32	0.0368
BC	0.11	1	0.11	0.27	0.6084
BD	0.00	1	0.00	0.00	0.9877
CD	1.58	1	1.58	3.85	0.0698
A^2	33.44	1	33.44	81.84	<0.0001
B^2	4.60	1	4.60	11.25	0.0047
C^2	17.57	1	17.57	42.99	<0.0001
D^2	29.21	1	29.21	71.47	<0.0001
残差	5.72	14	0.41		
失拟项	4.77	10	0.48	2.00	0.2632
纯误差	0.95	4	0.24		
总和	87.17	28			

2.2.2 响应面图分析

三维响应面说明了自变量和因变量之间的关系。如图1所示,曲面图的陡度表明两个变量之间的相互作用的显著性。图1A的曲面图对ATF提取是陡峭的,乙醇浓度和固液比之间存在显著的相互作用。图1B的曲面图是陡峭的,乙醇浓度和提取时间存在显著的相互作用。

2.2.3 验证实验分析

采用模型优化提取条件为:乙醇浓度82.66%、液固比34.09:1(mL/g)、提取时间64.66 min、提取温度49.87℃,ATF提取得率为22.13 mg/g。根据实验实际条件进行修正:乙醇浓度为83%、液固比34:1(mL/g)、提取时间65 min、提取温度50℃,在此条件下,进行3次实验,测定ATF提取得率为 (21.98 ± 0.11) mg/g,与所建模型的分析值相差不大,表明模型适用于ATF提取。

2.3 体外抗氧化活性

从图2A~C可以看出,在一定范围内,随着ATF质量浓度增加,体外抗氧化能力逐渐增强。在1.8 mg/mL的质量浓度下,ATF和VC对DPPH自由基的清除率分别为 $81.26\% \pm 1.51\%$ 和 $97.88\% \pm 1.73\%$,对OH自由基清除率分别为 $78.56\% \pm 1.41\%$ 和 $98.45\% \pm 1.78\%$;其中,VC的半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC_{50})为0.34 mg/mL,ATF的 IC_{50} 为0.78 mg/mL。与VC相比,ATF对OH自由基的清除能力较弱。当ATF质量浓度为1.2 mg/mL时,ABTS自由基的清除率分别为 $94.58\% \pm 1.78\%$ 和 $97.56\% \pm 1.56\%$;图2D显示了ATF的总抗氧化能力与浓度范围呈正相关。在测量范围内,ATF和VC的FRAP值分别为 (0.28 ± 0.019) mmol/L和 (0.31 ± 0.018) mmol/L。由此推测,ATF具有一定体外抗氧化活性和总抗氧化能力。

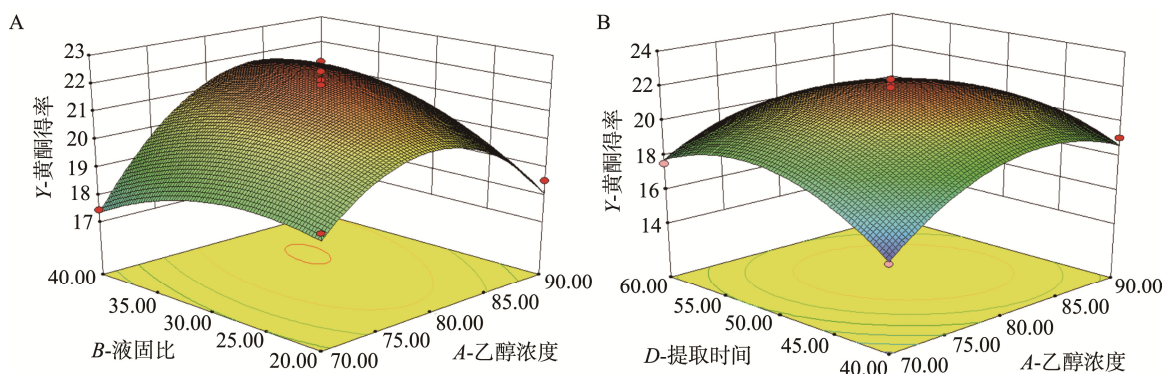


图1 各因素交互作用响应面图

Fig.1 Response surface graph of interaction among various factors

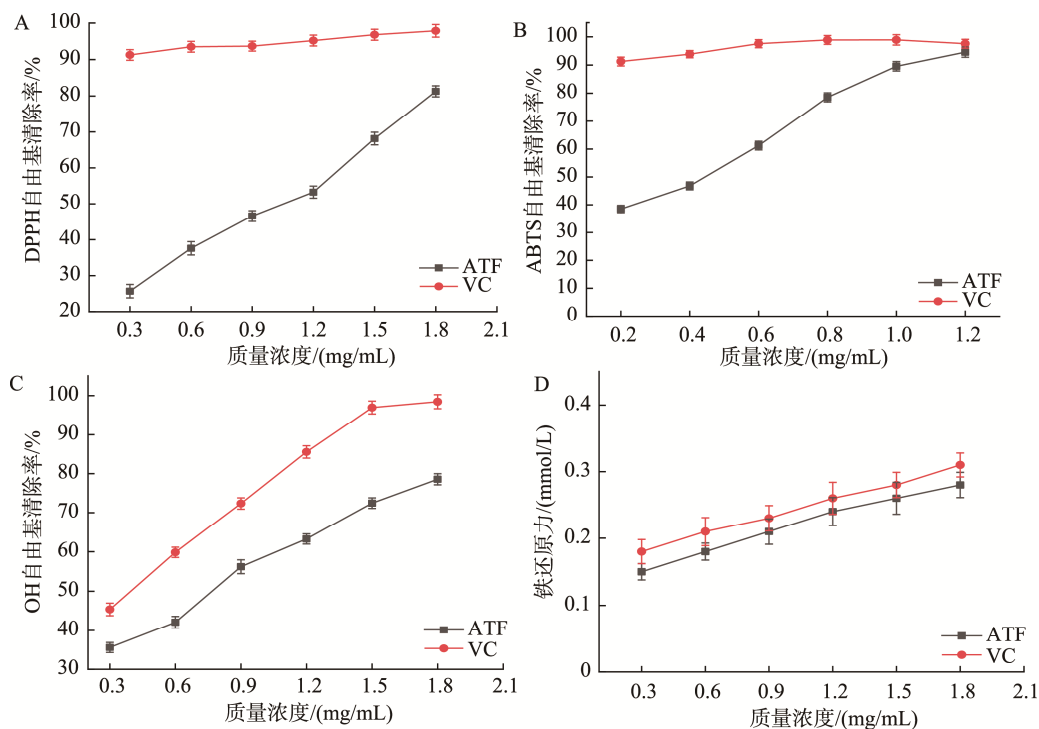


图2 ATF体外抗氧化活性($n=3$)

Fig.2 *In vitro* antioxidant activities of ATF ($n=3$)

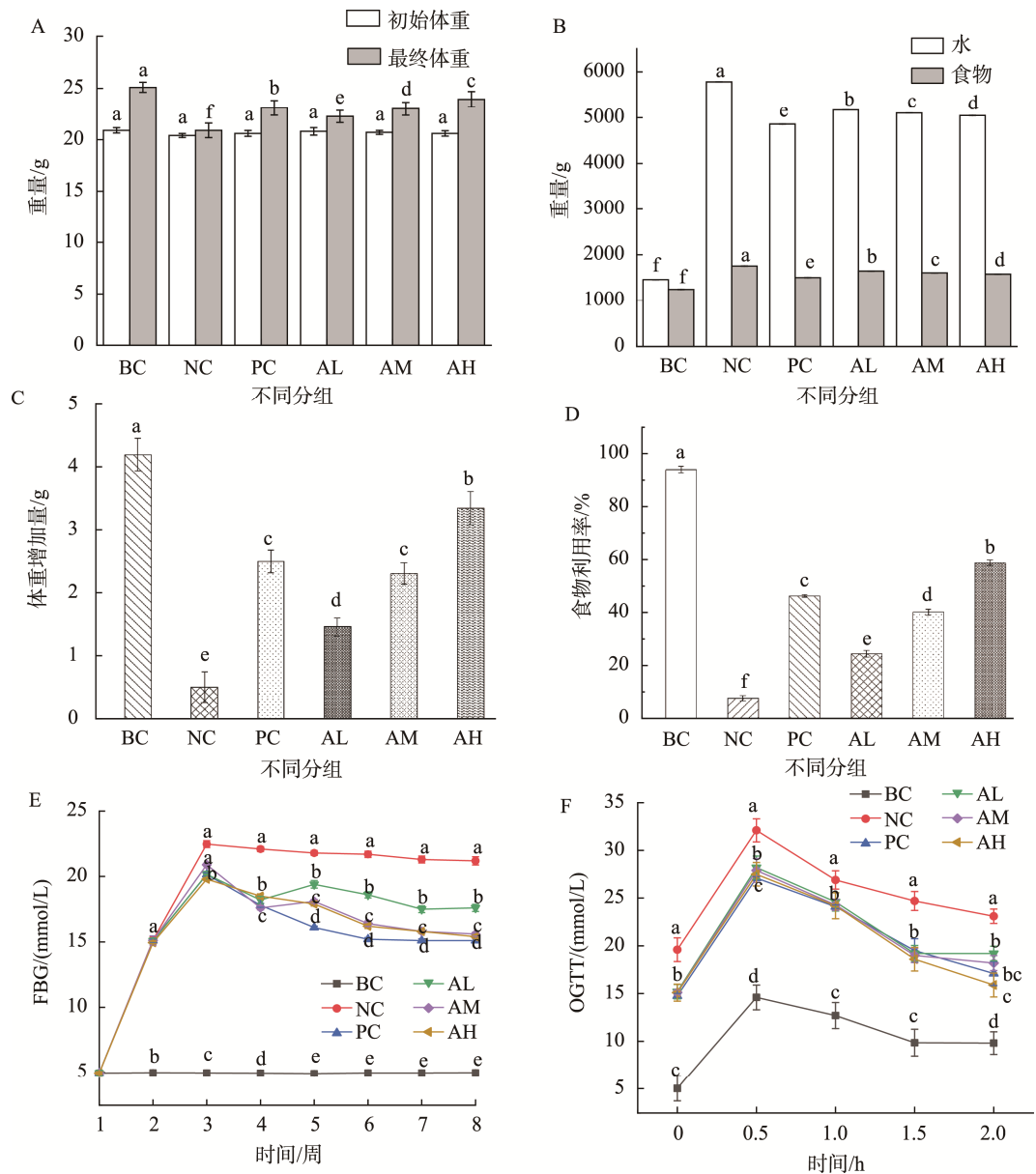
2.4 ATF 对小鼠基础指数的影响

在实验第 8 周(灌胃第 7 周),对实验前后各组小鼠的体重变化、食物和水摄入量、食物利用率进行统计。如图 3A~D 所示,实验结束前,PC、AH、AM 和 AL 组小鼠的最终体重显著高于 NC 组($P<0.05$)。与 NC 组相比,治疗组的水和食物总摄入量均有不同程度的降低。NC 组的增重显著低于其他组($P<0.05$)。AL、AM 和 AH 组的食物效力存在剂量依赖性。这表明 ATF 可以显著恢复 T1DM 小鼠的体重,有效提高 T1DM 小鼠的食物利用率。小鼠的体重和饮食状况都有所改善。如图 3E 所示,在小鼠成型之前,

各组之间的 FBG 没有显著差异($P>0.05$)。模型组的 FBG 在第 3 周达到最高值。ATF 灌胃 7 周后,AM 组和 AH 组的 FBG 显著低于 NC 组($P<0.05$)。如图 3F 所示,与 NC 组相比,给药组 OGTT 水平显著降低,表明 ATF 可以调节 T1DM 小鼠的糖代谢。

2.5 ATF 对小鼠脏器系数的影响

ATF 对小鼠脏器系数的作用如表 5 所示,NC 组的肝脏和肾脏增大,NC 组的肝和肾脏系数均明显较高,ATF 治疗组的两个脏器系数显著降低,表明其器官的状态已明显缓解。



注:不同小写字母表示显著性差异($P<0.05$),图4同。
图3 ATF对T1DM小鼠体重变化(A)、食物和水的摄入(B)、体重增加(C)、食物利用率(D)、空腹血糖(E)和OGTT(口服葡萄糖耐量实验)(F)影响($n=6$)

Fig.3 Effects of STF on basic indicators of T1DM mice body weight (A), food and water intake (B), body weight gain (C), food titer (D), fasting blood glucose (FBG) (E), OGTT (oral glucose tolerance test) (F) ($n=6$)

表 5 ATF 对小鼠脏器系数影响(n=6)				
Table 5 Effects of STF on organ coefficient of mice (n=6)				
分组	脏器系数/%			
	心脏	肝脏	脾脏	肾脏
BC	0.61±0.02 ^a	4.27±0.02 ^e	0.23±0.01 ^a	1.25±0.02 ^e
NC	0.55±0.01 ^{bc}	5.82±0.02 ^a	0.20±0.01 ^{ab}	1.71±0.02 ^a
PC	0.52±0.03 ^c	5.51±0.01 ^d	0.23±0.02 ^a	1.46±0.02 ^d
AL	0.58±0.02 ^{ab}	5.69±0.01 ^b	0.20±0.02 ^{ab}	1.61±0.02 ^b
AM	0.58±0.02 ^{ab}	5.61±0.02 ^c	0.23±0.02 ^a	1.62±0.01 ^b
AH	0.57±0.03 ^{ab}	5.52±0.01 ^d	0.19±0.01 ^b	1.53±0.02 ^c

注: 同列不同小写字母表示显著性差异(P<0.05)。

2.6 ATF 对小鼠脂质代谢、氧化应激的影响

T1DM 小鼠并发症的主要因素是高水平的 TC 和 TG。

如图 4A 所示,NC 组 TC 和 TG 水平显著升高(P<0.05)。然而,ATF 可以显著降低 TC 和 TG 水平(P<0.05),表明 ATF 可以改善 T1DM 小鼠的异常脂质代谢。小鼠胰岛 β 细胞损伤是由于 STZ 诱导所致从而形成 DM。活性氧的产生降低了抗氧化酶如 SOD、GSH 和 CAT 的水平,并诱导氧化应激。MDA 是脂质过氧化的产物。由 4B~C 图中可以看出,与 BC 组相比,NC 组的 T-SOD、GSH 和 CAT 活性显著降低(P<0.05),MDA 含量显著升高(P<0.05)。这表明 T1DM 小鼠体内组织细胞氧自由基清除能力下降、抗氧化反应降低、损伤加重。与 NC 组相比,PC 组、AL 组和 AM 组的 T-SOD、GSH 和 CAT 活性显著升高(P<0.05),MDA 含量显著降低(P<0.05)。结果表明,ATF 可提高 T1DM 小鼠 CAT、T-SOD 和 GSH 的活性,降低 MDA 的产生,降低 TC 和 TG 的水平。表明 ATF 可以增强 CAT、T-SOD 和 GSH 活性,减少氧化应激。若出现脂质代谢紊乱,且未及时治疗,肝纤维化和肝炎将进一步发展。在严重情况下,会出现肝硬化或肝癌。

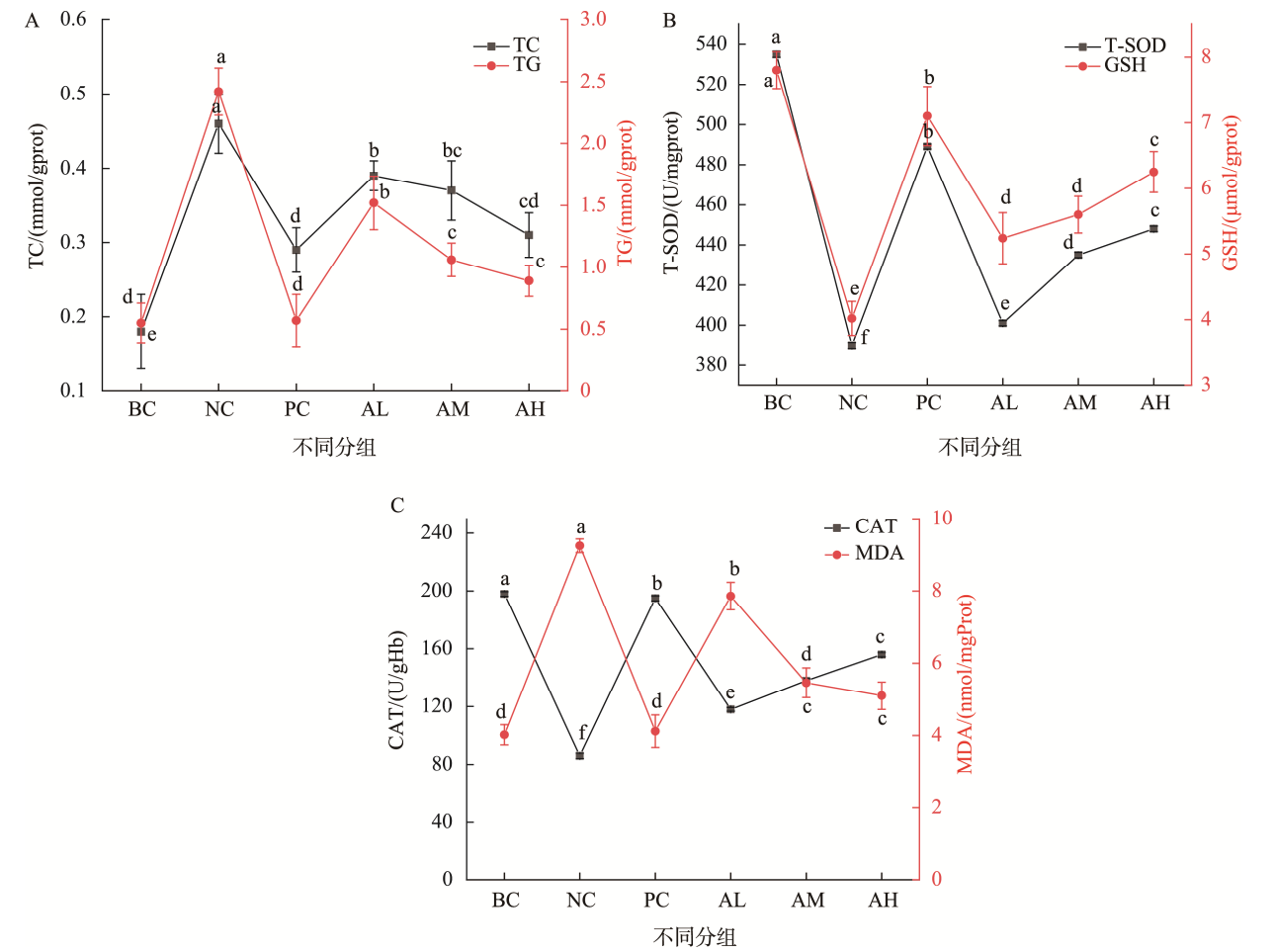


图 4 ATF 对 T1DM 小鼠脂质代谢和氧化应激的影响(n=6)

Fig.4 Effects of ATF on lipid metabolism, oxidative stress in T1DM mice (n=6)

3 结 论

沙米含有多糖、黄酮等有效成分,具有抗菌、抗炎、消肿和解毒作用等功效;目前,对沙米的活性成分尤其是黄酮类化合物的深入研究较少,其降糖作用的潜在机制尚不清楚。DM 可以导致氧化应激的发生。胰岛 β 细胞的保护可通过黄酮类化合物减弱氧化应激来实现^[27-28],且 DM 引起的肝损伤可以通过抑制氧化应激来逆转^[29]。预防 DM 的机制可能是上调肝脏中的 SOD 和 GSH 酶活性以及抑制 MDA 活性^[30]。本研究结果表明,ATF 干预后体内氧化还原酶水平的改善呈剂量依赖性,GSH、SOD 和 CAT 的恢复以及 MDA 降低是 ATF 保护作用的重要依据。STZ 通过 ATF 治疗诱导的 T1DM 氧化应激症状明显改善。沙米是一种无毒的药用和食用草本植物。除了常规治疗 DM 的药物外,补充 ATF 可能是对抗高血糖的新策略之一。因此,采用 ATF 预防和治疗 DM 是一种较有前景的方法之一,其是一种既能降糖又能降低 DM 引起氧化应激作用的药物。

参考文献

- [1] GÓMEZ-PERALTA F, ABREU C, COS X, *et al.* When does diabetes start? Early detection and intervention in type 2 diabetes mellitus [J]. *Rev Clin Esp (Eng Ed)*, 2020, 220(5): 305–314.
- [2] NASSAR M, NSO N, BARAKA B, *et al.* The association between COVID-19 and type 1 diabetes mellitus: A systematic review [J]. *Diabetes Metab Syndr*, 2021, 15(1): 447–454.
- [3] MARUNAKA Y, NIISATO N, ZOU X, *et al.* Food intake targeting and improving acidity in diabetes and cancer [J]. *Food Front*, 2020, 1(1): 9–12.
- [4] WANG Y, ZHAO P, LI Q, *et al.* Evaluation on nutritional composition of *Agriophyllum squarrosum* of tengger desert [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2009, 30: 286–288.
- [5] 张德魁, 马全林, 魏林源, 等. 沙米的主要营养成分及应用价值研究进展[J]. *现代农业科技*, 2019, 16: 185–186.
ZHANG DK, MA QL, WEI LY, *et al.* Main nutritional components and application value of *Agriophyllum squarrosum* [J]. *Mod Agric Sci Technol*, 2019, 16: 185–186.
- [6] MUTHA RE, TATIYA AU, SURANA SJ. Flavonoids as natural phenolic compounds and their role in therapeutics: An overview [J]. *Future J Pharm Sci*, 2021, 7(1): 1–13.
- [7] YIN X, YAN X, QIAN C, *et al.* Comparative transcriptome analysis to identify genes involved in terpenoid biosynthesis in *Agriophyllum squarrosum*, a folk medicinal herb native to Asian temperature deserts [J]. *Plant Biotechnol Rep*, 2021, 15(3): 369–387.
- [8] ZHOU S, YANG J, QIAN C, *et al.* Organic acid metabolites involved in local adaptation to altitudinal gradient in *Agriophyllum squarrosum*, a desert medicinal plant [J]. *J Plant Res*, 2021, 134(5): 999–1011.
- [9] SONG Y, KANG L, TIAN S, *et al.* Study on the anti-hepatocarcinoma effect and molecular mechanism of *Prunella vulgaris* total flavonoids [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 273: 113891.
- [10] SAVYCH A, MILIAN I. Total flavonoid content in the herbal mixture with antidiabetic activity [J]. *Pharmacologyonline*, 2021, 2: 68–75.
- [11] LING Y, SHI Z, YANG X, *et al.* Hypolipidemic effect of pure total flavonoids from peel of Citrus (PTFC) on hamsters of hyperlipidemia and its potential mechanism [J]. *Exp Gerontol*, 2020, 130: 110786.
- [12] KARAK P. Biological activities of flavonoids: An overview [J]. *Int J Pharm Sci Res*, 2019, 10(4): 1567–1574.
- [13] DIAS MC, PINTO DCGA, SILVA AMS. Plant flavonoids: Chemical characteristics and biological activity [J]. *Molecules*, 2021, 26(17): 5377.
- [14] IGHODARO OM. Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus [J]. *Biomed Pharm*, 2018, 108: 656–662.
- [15] AN HJ, LEE B, KIM SM, *et al.* A PPAR pan agonist, MHY2013 alleviates age-related hepatic lipid accumulation by promoting fatty acid oxidation and suppressing inflammation [J]. *Biol Pharm Bull*, 2018, 41(1): 29–35.
- [16] BOTERO SCS, MERINO-CHAVEZ H, RAJAGOPALAN K, *et al.* Aging and redox pathways in diabetes [Z].
- [17] BAIRD L, YAMAMOTO MJ. The molecular mechanisms regulating the KEAP1-NRF2 pathway [J]. *Mol Cell Biol*, 2020, 40(13): e00099–e120.
- [18] 马小飞, 燕霞, 钱朝菊, 等. 作物的从头驯化: 原理, 进展及挑战——以野生植物沙米的驯化为例[J]. *南通大学学报(自然科学版)*, 2021, 20(2): 19–30.
MA XF, YAN X, QIAN CJ, *et al.* De novo domestication of crops: Principles, progress and challenges—An example from *Agriophyllum squarrosum* [J]. *J Nantong Univ (Nat Sci Ed)*, 2021, 20(2): 19–30.
- [19] 李文婷, 彭菁, 孙旭阳, 等. 双螺杆挤压对沙米复合粉理化及糊化特性的影响[J]. *中国粮油学报*, 2019, 34(4): 112–117.
LI WT, PENG J, SUN XY, *et al.* Effects of twin-screw extrusion on physicochemical and pasting properties of sand rice composite powder [J]. *J Chin Cere Oil Assoc*, 2019, 34(4): 112–117.
- [20] 聂峰杰, 甘晓燕, 张丽, 等. 沙米种子营养成分及沙米粉理化性质分析[J]. *宁夏农林科技*, 2021, 62(9): 47–51.
NIE FJ, GAN XY, ZHANG L, *et al.* Analysis of nutrients of *Agriophyllum squarrosum* seed and physical characteristics of *Agriophyllum squarrosum* Flour [J]. *Ningxia J Agric Fores Sci Technol*, 2021, 62(9): 47–51.
- [21] ZHANG J, CHEN X, MU X, *et al.* Protective effects of flavonoids isolated

- from *Agrocybe aegirita* on dextran sodium sulfate-induced colitis [J]. eFood, 2021, 2: 288–295.
- [22] MA Y, LI J, TONG F, *et al.* Optimization of microwave-assisted extraction using response surface methodology and the potential anti-diabetic efficacy of *Nigella glandulifera* Freyn determined using the spectrum-effect relationship [J]. Ind Crop Prod, 2020, 153: 112592.
- [23] ZHU F, LI J, MA Z, *et al.* Structural identification and *in vitro* antioxidant activities of anthocyanins in black chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) [J]. eFood, 2021, 2(4): 201–208.
- [24] RE R, PELLEGRINI N, PROTEGGENTE A, *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay [J]. Free Rad Biol Med, 1999, 26(9–10): 1231–1237.
- [25] HUANG Y, GUO J, ZHANG J. Physicochemical and antioxidant properties of *Potentilla anserina* L. polysaccharides affected by ultrasonication [J]. Appl Sci, 2020, 10(13): 4510.
- [26] HAFSA J, HAMMI KM, LE CD, *et al.* Characterization, antioxidant and antiglycation properties of polysaccharides extracted from the medicinal halophyte *Carpobrotus edulis* L. [J]. In J Biol Macromol, 2018, 107: 833–842.
- [27] YANG X, BAI ZF, ZHANG Y, *et al.* Flavonoids-rich extract from *Bidens bipinnata* L. protects pancreatic β -cells against oxidative stress-induced apoptosis through intrinsic and extrinsic pathways [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 275: 114097.
- [28] MOHAN S, NANDHAKUMAR L. Role of various flavonoids: Hypotheses on novel approach to treat diabetes [J]. J Med Hypotheses Ideas, 2014, 8(1): 1–6.
- [29] MATOUK AI, AWAD EM, EL-TAHAWY NFG, *et al.* Dihydromyricetin alleviates methotrexate-induced hepatotoxicity via suppressing the TLR4/NF- κ B pathway and NLRP3 inflammasome/caspase 1 axis [J]. Biomed Pharm, 2022, 155: 113752.
- [30] CHEN L, FAN X, LIN X, *et al.* Phenolic extract from *Sonchus oleraceus* L. protects diabetes-related Liver injury in rats through TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. eFood, 2020, 1(1): 77–84.

(责任编辑: 于梦娇 韩晓红)

作者简介



刘晓霞, 硕士, 讲师, 主要研究方向为代谢与营养生理学研究。
E-mail: lxx13693333498@163.com



周保成, 副主任医师, 主要研究方向为代谢性疾病研究。
E-mail: 54316538@qq.com