咖啡酸苯乙酯对糖尿病小鼠心脏的保护作用

龚频[1]，崔丹丹[1]，常相娜[1]，杨文娟[1]，陈福欣[2]
（1.陕西科技大学食品与生物工程学院，陕西西安 710021）（2.西安科技大学化学与化工学院，陕西西安 710054）

摘要：本文研究了咖啡酸苯乙酯(CAPE)对糖尿病小鼠心脏的保护作用及其作用机制。对小鼠采用皮下腹腔注射链脲佐菌素诱导及结合喂养高脂高糖饲料建立糖尿病模型。将各小鼠随机分为空白组，损伤组以及保护组。保护组用 CAPE 灌胃，其余 2 组用 0.9%生理盐水灌胃，测定小鼠心脏组织内各氧化指标变化来探讨摄入 CAPE 对其的保护。建模成功后，损伤组超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)、过氧化氢酶(CAT)的含量依次降低 0.00058 U/mg protein、0.0033 mg/mL tissue、20.95 U/mg protein；而给予 CAPE 保护后，保护组丙二醛(MDA)、蛋白羰基化程度(PCO)、一氧化氮(NO)的含量依次降低 0.126 mmol/mg protein、3.205 mmol/mg protein、0.5469 μmol/mg protein，说明高糖环境可加剧心脏发生氧化应激反应，诱导产生氧化损伤；而摄入 CAPE 后能降低各指标含量，减弱损伤程度。氧化应激增强可能发生糖尿病，摄入 CAPE 后对小鼠损伤程度减弱，抗氧活性增强，自由基清除能力得到提高，从而对其心脏起到保护作用。

关键词：糖尿病；咖啡酸苯乙酯；心脏；氧化应激反应
文章篇号：1673-9078(2019)010-1-5 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.10.001

Protective Effect of Caffeic Acid Phenylethyl Ester on Heart of Diabetic Mice

GONG Pin[1], CUI Dan-dan[1], CHANG Xiang-na[1], YANG Wen-juan[1], CHEN Fu-xin[2]
(1.School of Food and Biological Engineering, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021, China)
(2.School of Chemistry and Chemical Engineering, Xi'an University of Science and Technology, Xi'an 710054, China)

Abstract: The protective effect of caffeic acid phenylethyl ester (CAPE) on the heart of diabetic mice and its mechanism were investigated. Diabetes mellitus model was established in mice by subcutaneous intraperitoneal injection of streptozotocin and feeding high-fat and high-sugar diet. The mice were randomly divided into blank group, injury group and protection group. The protective group was given CAPE by gastric perfusion, the other two groups were given 0.9% saline by gastric perfusion. The changes of oxidative indexes in heart tissue of mice were detected to evaluate the protective effect of CAPE. After successful modeling, the contents of superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH), catalase (CAT) in the injured group decreased by 0.00058 U/mg protein, 0.0033 mg/mL tissue and 20.95 U/mg protein in turn, respectively. The contents of malondialdehyde (MDA), protein carbonylation (PCO), nitric oxide (NO) in the protected group decreased by 0.126 mmol/mg protein, 3.205 mmol/mg protein and 0.5469 μmol/mg protein in turn after CAPE protection, respectively. Results indicated that high glucose environment could aggravate oxidative stress and induce oxidative damage in the heart, while CAPE could reduce the content of various indicators and the degree of injury. Increased oxidative stress might lead to diabetes mellitus. After CAPE treatment, the degree of injury in mice decreased, the antioxidant activity and the free radical scavenging ability were improved, resulting in their hearts potection.

Key words: diabetes, caffeic acid phenethyl ester, heart, oxidative stress

糖尿病是由多病因引起的以慢性高血糖为特征的终身性代谢疾病，患者往往有胰岛素抵抗伴胰岛素分泌进行性减少的表现，该病长期代谢失衡可直接或间接造成人体损伤，已成为我国居民死亡的主要危害因素之一。常见并发症有：糖尿病心血管病等[1,2]。其中大血管系统（心脏）并发症是糖尿病患者主要的死亡原因。与非糖尿病患者相比，有心脏病病史的糖尿病患者发生心血管事件的危险更高、发病更早[3]。DM 对心脏损伤的病理过程复杂多样，如高血糖可使机体内部血糖持续增高进而加剧氧化应激的反应程度和大量活性氧簇（ROS）聚积，使得心脏处于氧化应激状

收稿日期：2019-05-24
基金项目：陕西省科技厅一般项目-农业领域（2017NY-103）；农业部农产品加工重点实验室开放基金项目（2017KF-07）；陕西省重点研发计划项目(2017NY-146)；国家自然科学基金项目(31760016)；陕西省留学人员科技活动择优资助项目(2017032)
作者简介：龚频(1983-)，女，博士，副教授，研究方向：药理生理学
通讯作者：陈福欣(1981-)，男，博士，副教授，研究方向：药理学

态[4]，极易激活多个损伤机制并对其结构和功能造成破坏[5]，使其舒张功能下降。目前，相关报道有利用抗氧化物质红皮云杉球果对高脂饲料诱导的高血脂小鼠进行探究，其结果显示抗氧化物质有良好的降血脂和抗氧化功能；同时，也有研究发现抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸（NAC）对 STZ 糖尿病模型小鼠心肌和血管损伤也可起到保护作用。

目前，被誉为“天然抗氧剂”的咖啡酸苯乙酯（CAPE）因具有较强的抗炎、抗氧化等活性[6,7]，成为当今研究的热点。其起到抗氧化作用的原因是在其分子结构中与双键共轭的苯环 3、4 位各有一个酚羟基，该结构能终止自由基链式反应，进而形成比较稳定的苯氧自由基[8,9]。有研究表明，CAPE 可阻止一氧化氮（NO）的产生，其主要机制可能与核因子 NF-*k*B 位点有关，抑制诱导型一氧化氮合酶（iNOS）的合成，导致 NO 含量减少[10]。此外，CAPE 还可利用本身能减轻自由基所致的氧化应激反应，清除氧化物质；以及抑制黄嘌呤氧化酶和一氧化氮合酶（NOS）活性的性质，减少对 SOD 的消耗，在一定程度上增强 SOD 的活性，减轻脂质过氧化程度，从而起到抗氧化作用[11-15]。而心脏作为调节机体血糖平衡的重要器官，受到损伤后会使机体血糖水平失衡，进而造成机体代谢紊乱。目前在国内外的一些文献中已有报道 CAPE 不仅可保护肾、心等组织以及细胞，避免发生氧化损伤，而且对氧化损伤所致的糖尿病、心血管疾病等病理过程具有保护作用[16]。但 CAPE 抗氧化作用是否会因机体内过多氧化自由基所致的氧化应激反应而对心脏造成危害国内外鲜有报道。为此本研究通过建立糖尿病小鼠模型，探讨 CAPE 的保护作用机制，为后期的进一步开发提供数据支持和理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物及饲料

动物：雄性昆明小鼠 30 只，购自西安交大医学院实验动物中心，SPF 级，选用 6~8 周，体重(20±2) g，动物生产许可证号：SCXK(陕)2012-2003。试验期间对实验用鼠的喂养及后期一系列操作均符合伦理会的管理规定。

高脂高糖饲料：普通饲料 40%、熟猪油 20%、粗盐 5%、白砂糖 26%、生鸡蛋 9%。

试剂与仪器：链脲佐菌素，美国 Sigma 公司；5,5-二硫代-2-硝基苯甲酸，CAPE 试剂（纯度≥98%），硫代巴比妥酸（TBA），2,4-二硝基苯肼（DNPH），均购自 Alfa Aesar 公司；从瑞士阿达玛斯公司购买考马斯亮蓝 G-250；罗氏罗康全活力型血糖试纸，罗氏罗康全活力型血糖测量仪，其余的试剂均是分析纯。

1.2 动物分组及模型构建[17]

实验前先将小鼠适应性喂养 7 d，期间取食饮水自由。构建模型前称取小鼠体重，按体重差异，将小鼠随机分为空白组，损伤组及空白组并对小鼠进行编号，每组 10 只。模型构建：(1)空白组：普通饲料喂养 6 周后，等体积腹腔注射 pH=4.4 的柠檬酸缓冲液和灌胃 0.9%生理盐水 6 周；(2)损伤组：给予高脂高糖饲料喂养 6 周，一次性腹腔注射链脲佐菌素 STZ 30 mg/kg (溶于 0.1 mmol/L 柠檬酸缓冲液 pH=4.4)和灌胃 0.9%生理盐水 6 周；(3)保护组：高脂高糖饲料喂养 6 周，一次性腹腔注射链脲佐菌素 STZ 30 mg/kg(溶于 0.1 mmol/L 柠檬酸缓冲液 pH=4.4)和灌胃 CAPE 6 周，CAPE 灌胃计量按 0.1 mL/10 g 进行灌胃，连续注射链脲佐菌素一周后，尾端取血测量血糖值，血糖值达到 13.5 mmol/L 可看作糖尿病建模成功。末次注射禁食 12 h，称重，颈椎脱臼法处死小鼠，解剖并取心脏样品放于 EP 管内，置于-80 ℃冰箱保存备用。

1.3 指标测定及方法

取各组心脏组织约 0.1 g，制备 10%的组织匀浆，利用联苯三酚自氧化法测超氧化物歧化酶（SOD）活性，考马斯亮蓝法[18]测定蛋白，钼酸铵显色法测定过氧化氢酶（CAT）的活性，硫代巴比妥酸法[19]测定丙二醛（MDA）的含量，2,4-二硝基苯肼法[20]测定心脏蛋白羰基化程度（PCO）。5,5-二硫代-2-硝基苯甲酸（DTNB）法测定还原型谷胱甘肽（GSH），NO 含量采用 Griess 反应来测定．测定最终结果用全波长扫描式多功能读数仪（型号：Varioskanflash，生产厂商：赛默飞世尔科技有限公司）。

1.4 统计学方法

所有的数据均 mean±SE（标准误差）表示。平均值用单向方差分析法（ANOVA）和相应的 Student's *t*-test 进行统计学分析，统计学上 $p<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 CAPE 对糖尿病小鼠 MDA 及 PCO 的影响

如图 1 所示，损伤组小鼠体内 MDA 含量是空白组的 1.46 倍，显著高于空白组小鼠含量（$p<0.001$），给予 CAPE 保护后，小鼠体内 MDA 含量是损伤组的

77.43%，相比于损伤组有下降趋势（p<0.01）。MDA 是脂质过氧化的最终产物，是反映机体氧化应激的重要指标。实验结果表明，高糖环境加剧了小鼠心脏发生脂质过氧化反应的程度，使得小鼠体内 MDA 含量增多，心脏受损严重。而 CAPE 加入可减少小鼠心脏氧化应激程度，降低 MDA 含量，小鼠体内代谢恢复正常进而减少对其心脏的损伤。

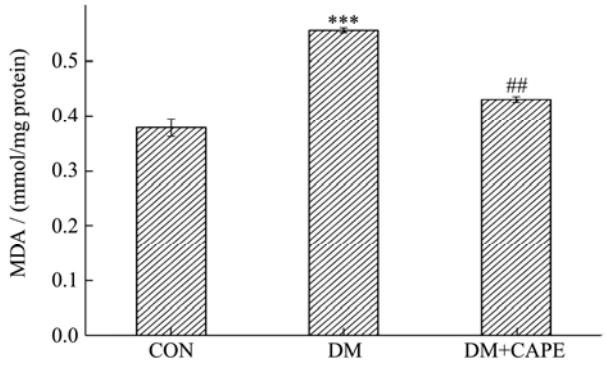


图 1 DM 小鼠心脏损伤的脂质过氧化程度

Fig.1 Degree of lipid peroxidation in DM mouse heart injury

注：“CON”代表空白组；“DM”代表损伤组；“DM+CAPE”代表保护组；与空白组相比，***p<0.001；与损伤组相比，##p<0.01。

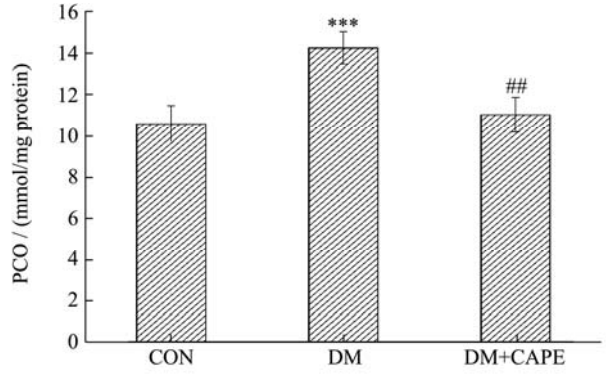


图 2 DM 小鼠心脏损伤蛋白羰基化程度

Fig.2 The degree of protein carbonylation in DM mice

注：“CON”代表空白组；“DM”代表损伤组；“DM+CAPE”代表保护组；与空白组相比，**p<0.01；与损伤组相比，##p<0.01。

如图 2 所示，损伤组小鼠 PCO 的含量是空白组的 1.34 倍，含量显著高于空白组（p<0.01）。给予 CAPE 保护后，小鼠 PCO 程度是损伤组的 77.48%，程度明显降低（p<0.01）。受活性氧攻击的蛋白质易发生氧化损伤，损伤程度利用羰基化反应进行判断。研究表明，自由基能与主要蛋白质中的巯基发生结合反应，致使体内大多数酶活性降低有些甚至失去活性，因此，当小鼠心脏受到损伤，损伤组 PCO 含量显著增加，而加入 CAPE 保护后，体内 PCO 含量降低，心脏的损伤程度减弱。

2.2 CAPE 对糖尿病小鼠心脏 CAT 及 SOD 的影响

如图 3 所示，与空白组相比，损伤组小鼠心脏 CAT 含量约为空白组的 79.07%，CAT 活性明显降低（p<0.05），在得到 CAPE 保护后，小鼠体内 CAT 含量是损伤组的 1.16 倍，含量减少得到缓解（p<0.05）。链脲佐菌素诱导的糖尿病中，双氧水可能是组织损伤的主要能源物质[21]。实验表明，糖尿病小鼠心脏中可能含有大量裸露在外的双氧水，导致 CAT 含量降低，心脏抗氧化能力减弱，产生的有害物质对小鼠心脏产生一定的损伤，而摄入 CAPE 能有效提高机体 CAT 含量，发挥抗氧化应激作用，在一定程度上对心脏起到保护作用。

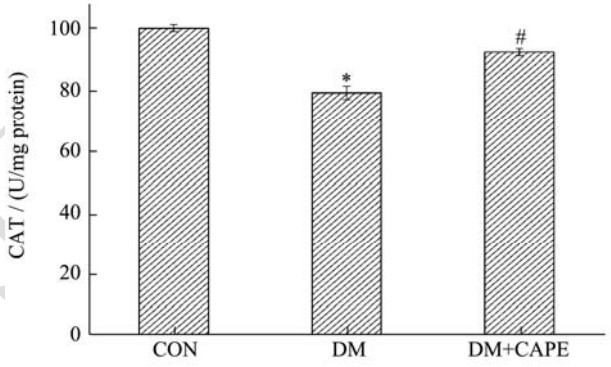


图 3 DM 小鼠心脏损伤过氧化氢酶活性水平

Fig.3 Levels of catalase activity in heart injury of DM mice

注：“CON”代表空白组；“DM”代表损伤组；“DM+CAPE”代表保护组；与空白组相比，*p<0.05；与损伤组相比，#p<0.05。

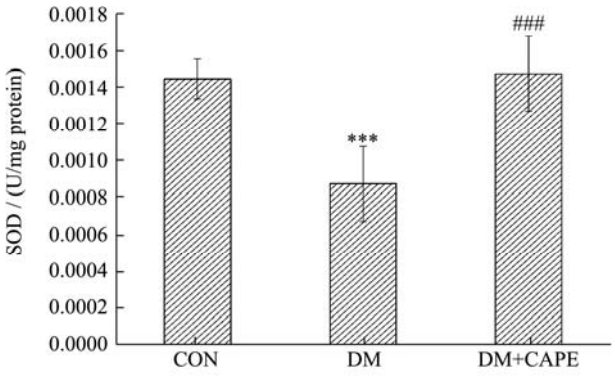


图 4 DM 小鼠心脏损伤超氧化物歧化酶活性水平

Fig.4 Superoxide dismutase activity levels in DM mouse heart injury

注：“CON”代表空白组；“DM”代表损伤组；“DM+CAPE”代表保护组；与空白组相比，*** p<0.001；与损伤组相比，###p<0.001。

如图 4 所示，和空白组相比，损伤组小鼠心脏 SOD 活性为空白组的 60.24%，SOD 活性降低（p<0.001），

给予 CAPE 保护后，小鼠体内 SOD 活性为损伤组的 1.68 倍，活性显著增强（p<0.001），实验表明，由于小鼠体内本身存在有一种自我调节反应，所以高脂高糖环境下 SOD 活性减弱。经过含有清除自由基 CAPE 保护后，体内 SOD 活性增强，提高了糖尿病小鼠心脏的抗氧化能力，进而对其具有保护及预防作用。

2.3 CAPE 对糖尿病小鼠 NO 及 GSH 的影响

如图 5 所示，与空白组相比，糖尿病小鼠心脏约为空白组的 1.72 倍，NO 含量的降低（p<0.01），在得到 CAPE 保护后，小鼠体内 NO 含量是损伤组的 63.01%，含量减少得到缓解（p<0.05）。NO 的合成主要依靠 iNOS 的参与，机体发生氧化应激反应时使其过量表达，产生大量 NO，诱导脂质过氧化[22]。实验表明，高脂高糖环境下 NO 含量明显增加，对小鼠心脏损害严重，加入保护剂 CAPE 后 NO 含量下降，减少了对心脏的损伤。

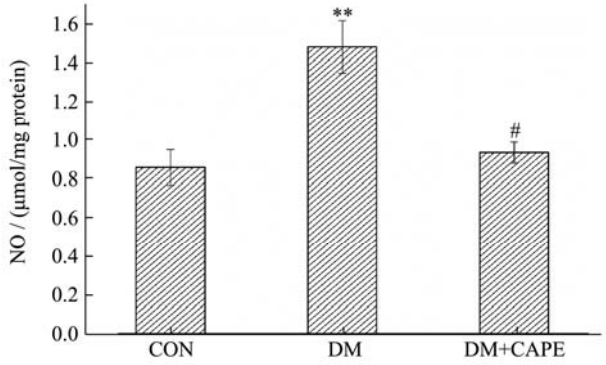


图 5 DM 小鼠心脏损伤一氧化氮含量

Fig.5 Nitric oxide content in heart injury of DM mice

注：“CON”代表空白组；“DM”代表损伤组；“DM+CAPE”代表保护组；与空白组相比，**p<0.01；与损伤组相比，#p<0.05。

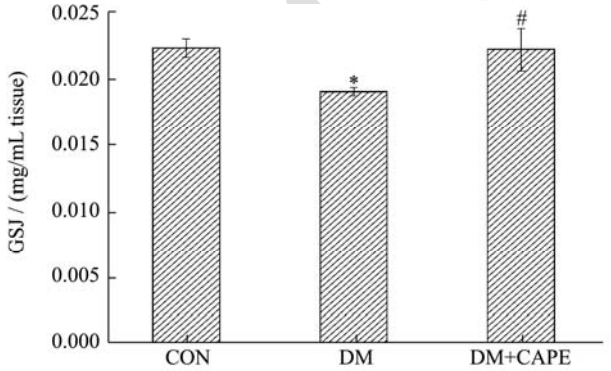


图 6 DM 小鼠损伤和 CAPE 保护对心脏中 GSH 的影响

Fig.6 Effect of DM mouse injury and protection of phenethyl caffeate on GSH in heart

注：“CON”代表空白组；“DM”代表损伤组；“DM+CAPE”代表保护组；与空白组相比，*p<0.05；与损伤组相比，#p<0.05

如图 6 所示，与空白组比较，DM 小鼠心脏谷胱甘肽含量约是空白组的 85.32%，含量显著下降（p<0.05），加入 CAPE 保护，GSH 的含量约为损伤组的 1.12 倍，GSH 含量增加（p<0.05），实验表明，作为机体内主要的活性物质 GSH，其含量增多会让蛋白质发生变性。高糖环境下小鼠体内 GSH 减少，自由基清除能力受到限制，使得大量自由基被聚集而导致 GSH 活性下降，对心脏造成氧化损伤，加入 CAPE 进行保护后，保护组 GSH 活性增强，减弱了心脏的氧化损伤程度。

3 结论

3.1 本实验建立 DM 小鼠模型来研究 CAPE 对糖尿病小鼠心脏的损伤起保护作用。实验结果中 CAT 和 SOD 的活性增强以及 GSH 数量的降低，可能是由于 CAPE 本身具有清除自由基和抗氧化的作用，使得体内聚集的大量自由基被逐渐清除，进而保证了小鼠心脏内的抗氧化系统接近正常状态。本研究中，小鼠长期处于高脂高糖的环境中，会打破其正常代谢过程中氧抑制剂和氧自由基两者之间的动态平衡状态，从而增强发生氧化应激反应的可能性，致使体内自由基大量聚集，从而产生过量脂质过氧化物使细胞内外存在浓度差而破坏了原先的平衡。同时，有文献报道，长期高血糖可使 $CD3^+$、B 细胞、NK 细胞等显著减低，机体免疫功能下降，从而引起糖尿病并发症如糖尿病性心肌病等疾病的发生[23]，该结论也侧面证实了本研究中高脂高糖的环境更有利于糖尿病模型的建立以及较易诱发心脏损伤的结果。

3.2 本次结果证实，高脂高糖喂养和链脲佐菌素诱导是导致正常小鼠患糖尿病和引发其心脏损伤的主要原因。本文以研究 MDA、PCO 以及 NO 等氧化因子为对象，结合 CAPE 的抗氧化能力，发现摄入 CAPE 后对小鼠由自由基造成的心脏损伤起保护作用，原因可能是由于 CAPE 清除过量自由基及减少氧化压力造成的，但因其作用机制较为复杂，还需要更深入的研究。

参考文献

[1] 张争辉,薛爱芹,于兰.糖尿病相关研究进展[J].世界最新医学信息文摘,2019,19(20):145,149
ZHANG Zheng-hui, XUE Ai-qin, YU Lan. Progress in diabetes related research [J]. World Medical Information Digest, 2019, 19(20): 145, 149

[2] 王志富,朱苗霞,王治平.2 型糖尿病患者血糖波动与血管并发症关系的研究进展[J].心血管病学进展,2018,39(6):196-200
WANG Zhi-fu, ZHU Miao-xia, WANG Zhi-ping. Research

progress on the relationship between blood glucose fluctuation and vascular complications in patients with type 2 diabetes [J]. Advances in Cardiovascular Diseases, 2018, 39(6): 196-200

[3] 林乐乙.糖尿病患者心脏相关并发症的管理[J].糖尿病天地(临床),2014,8(5):232-238
LIN Le-yi. Management of cardiac-related complications in diabetic patients [J]. Diabetes World (Clinical), 2014, 8(5): 232-238

[4] Rajesh. Xanthine oxidase inhibitor allopurinol attenuates the development of diabetic cardiomyopathy [J]. Cell Mol Med, 2009, 13(8B): 2330-2341

[5] Takeda. Cellular interplay between cardiomyocytes and nonmyocytes in cardiac remodeling [J]. Inflam, 2011, 2: 535241

[6] Weimin WU, Liang LU, Long Y. Free radical scavenging and antioxidative activities of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and its related compounds in solution and membranes: A structure-activity insight [J]. Food Chemistry, 2007, 105(1): 107-115

[7] Feng Y, Lu YW, Xu PH. Caffeic acid phenethyl ester and its related compounds limit the functional alterations of the isolated mouse brain and liver mitochondria submitted to *in vitro* anoxia-reoxygenation: Relationship to their antioxidant activities [J]. BBA-General Subjects, 2008, 1780(4): 659-672

[8] Wuwm, Lu, Long Y. Free radical scavenging and antioxidative activities of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and its related compounds in solution and membranes: A structure-activity insight [J]. Food and Chemistry, 2007, 105(1): 107

[9] Luearini M, Mugnainiv, Pedulli G F. Bond dissociation enthalpies of polyphenols: The importance of cooperative effects [J]. Jornal of Organic Chemistry, 2002, 67: 928

[10] 王秀芳,翟嵩,党双锁.CAPE 的药理作用及机制研究进展[J].国外医学(医学地理分册),2010,31(3):187-190
WANG Xiu-fang, ZHAI Song, DANG Shuang-suo. Advances in pharmacological effects and mechanisms of phenethyl caffeate [J]. Foreign Medical Sciences (Medical Geography), 2010, 31(3): 187-190

[11] 包伊凡,沈新春,汪芳.咖啡酸及其主要衍生物的研究进展及开发前景[J].天然产物研究与开发,2018,30:1825-1833
BAO Yi-fan, SHEN Xin-chun, WANG Fang. Research progress and development prospects of caffeic acid and its main derivatives [J]. Natural Product Research and Development, 2018, 30: 1825-1833

[12] 俞斌.蜂胶活性成分抗肝细胞氧化损伤及凋亡机制研究[D].福州:福建农林大学,2015
YU Bin. Study on anti-hepatocyte oxidative damage and apoptosis mechanism of propolis active ingredients [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2015

[13] Lee Ik, Han Ms, Kimdw. Phenylpropanoid acid esters from Korean propolis and their antioxidant activities [J]. Bioorganic Medicinal Chemistery Letters, 2014, 24(5): 3503-3505

[14] 杨九凌,祝晓琳,李成文.咖啡酸及其衍生物咖啡苯乙酯药理作用研究进展[J].中国药学杂志,2013,48(8):577-582
YANG Jiu-ling, ZHU Xiao-lin, LI Cheng-wen. Research progress in pharmacological effects of caffeic acid and its derivatives of caffeic phenethyl ester [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2013, 48(8): 577-582

[15] Sochar, Galkowskad, Buqajm. Phenolic composition and antioxidant activity of propolis from various regions of Poland [J]. Natural Product Research, 2014, 4: 1-7

[16] Bakır S, Özbay M, Gün R. The protective role of caffeic acid phenethyl ester against streptomycin ototoxicity [J]. American Journal of Otolaryngology, 2012, 34(1): 16-21

[17] 陈福欣,龚频,周安宁.CAPE 对肥胖小鼠氧化应激状态调节作用研究[J].安徽农业科学,2012,12:7164-7167
CHEN Fu-xin, GONG Pin, ZHOU An-ning. Regulatory effect of phenethyl caffeate on oxidative stress in obese mice [J]. Anhui Agricultural Sciences, 2012, 12: 7164-7167

[18] 蒋大程,高珊,高海伦.考马斯亮蓝法测定蛋白质含量中的细节问题[J].实验科学与技术,2018,16(3):119-124
JIANG Da-cheng, GAO Shan, GAO Hai-lun. Details of the determination of protein content by Coomassie brilliant blue method [J]. Experiment Science and Technology, 2018, 16(3): 119-124

[19] 张琪,方虹霞,张慧丽.硫代巴比妥酸多晶型的太赫兹光谱和 DFT 理论分析[J].光谱学与光谱分析,2017,37(12):3677-3682
ZHANG Qi, FANG Hong-xia, ZHANG Hui-li. Terahertz spectroscopy and DFT theoretical analysis of thiobarbituric acid polymorphs [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2017, 37(12): 3677-3682

（下转第 195 页）