

· 论 著 ·

5-HMF对早期2型糖尿病合并肝损伤小鼠糖脂代谢和肝功能影响的研究

鹿伟, 夏勇, 张世鑫, 宋燕华, 蔡德雷, 徐彩菊, 赵李丽

浙江省疾病预防控制中心理化与毒理检验所, 浙江 杭州 310051

摘要: **目的** 研究5-羟甲基-2-糠醛(5-HMF)对早期2型糖尿病(T2DM)合并肝损伤小鼠糖脂代谢和肝功能的影响。**方法** 设5-HMF低、中、高剂量组,模型对照组和正常对照组,每组10只雌性ICR小鼠。低、中、高剂量组每天按10 mL/kg体重分别给予0.27、0.80、2.67 mg/kg 5-HMF灌胃,模型对照组和正常对照组给予同体积去离子水,连续12周。各剂量组和模型对照组喂饲36%高脂高糖饲料,实验第10、11周腹腔注射四氧嘧啶60 mg/kg体重;正常对照组喂饲维持饲料。定期测定体重、血糖、血脂和肝功能。留取肝组织,肝糖原高碘酸-希夫染色,观察组织病理学变化。**结果** 模型对照组小鼠血糖(GLU)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)和乳酸脱氢酶(LDH)水平均高于正常对照组($P<0.05$)。低、高剂量组小鼠AST水平,低、中、高剂量组小鼠LDH水平均低于模型对照组($P<0.05$)。低、中、高剂量组小鼠GLU、总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、LDL-C、HDL-C和ALT水平与模型对照组比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。模型对照组小鼠肝组织可见中至重度肝细胞空泡变性,高剂量组小鼠仅见轻微至轻度空泡变性;高剂量组和模型对照组小鼠均有中等或大量肝糖原颗粒。**结论** 本实验条件下尚不能判断5-HMF对T2DM合并肝损伤小鼠有降血糖和降血脂作用,但可证明其对小鼠肝组织及功能有保护作用。

关键词: 5-羟甲基-2-糠醛; 2型糖尿病; 肝损伤; 血糖; 血脂; 肝功能

中图分类号: R992 文献标识码: A 文章编号: 2096-5087(2021)11-1109-04

Effects of 5-HMF on glycolipid metabolism and hepatic function in mice with diabetes and hepatic injury

LU Wei, XIA Yong, ZHANG Shixin, SONG Yanhua, CAI Delei, XU Caiju, ZHAO Lili

Department of Physicochemical and Toxicology, Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou, Zhejiang 310051, China

Abstract: Objective To observe the effect of 5-hydroxymethyl-2-furfural (5-HMF) on glycolipid metabolism and hepatic function in mice with type 2 diabetes mellitus (T2DM) and hepatic injury. **Methods** A low, a medium and a high 5-HMF dose group, a model group, and a control group were designed, with ten female ICR mice in each group. The low, medium and high dose group were given 0.27, 0.80 and 2.67 mg/kgbw 5-HMF, respectively, for 12 weeks; while the model group and the control group were given volume controlled deionized water. The model group and three dose groups were fed with high-fat and high-sugar food (36%), and the intraperitoneal injection of alloxan (60 mg/kgbw) was executed in the 10th and 11th week; the control group were fed with normal food. The body weight, blood glucose, blood lipid, and liver function of mice were determined regularly. The livers were stained by periodic acid Schiff and the changes in pathology were observed. **Results** Compared with the control group, the serum levels of glucose (GLU), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH) were significantly higher in the model group ($P<0.05$). Compared with the model group, the AST level in the low and high 5-HMF dose group, and the LDH level in the low, medium and high 5-HMF dose group, were significantly lower ($P<0.05$). There were no significant differences

DOI: 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2021.11.007

作者简介: 鹿伟, 硕士, 主管医师, 主要从事卫生毒理学研究工作

通信作者: 徐彩菊, E-mail: cjxu@cdc.zj.cn

in the levels of GLU, total cholesterol, LDL-C, triacylglycerol, HDL-C and ALT between the model group and the three dose groups ($P>0.05$). Moderate to severe vacuolar degeneration was observed in the model group, while mild vacuolar degeneration was observed in the high dose group. Medium or large amount of hepatic glycogen granules were observed in the high dose group and the model group. **Conclusion** Under the conditions of this experiment, 5-HMF does not show any obvious function of reducing blood glucose and lipid in the mice with T2DM and liver injury, but show some protective effects on liver function.

Keywords: 5-hydroxymethyl-2-furfural; type 2 diabetes mellitus; hepatic injury; blood glucose; blood lipid; hepatic function

5-羟甲基-2-糠醛 (5-hydroxymethyl-2-furfural, 5-HMF) 存在于多种药品和食品中^[1]。在药品和食品加工储存过程中, 糖类物质的热降解反应和美拉德反应可能生成 5-HMF^[2]。有研究表明, 5-HMF 在较高浓度时对人类和动物表现出有害效应^[3-4]; 但在一定剂量下具有降血糖、抗氧化和改善急性肝损伤作用^[5-6]。本研究采用高脂高糖饮食和低浓度四氧嘧啶诱导 ICR 小鼠建立 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 合并肝损伤模型, 观察 5-HMF 对早期 T2DM 合并肝损伤模型小鼠糖脂代谢的影响和肝功能的保护作用。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂 TBA-40FR 型全自动生化分析仪 (日本东芝公司); PL1001-L 电子天平 (梅特勒-托利多公司); DM2000 型显微图像分析系统 (德国徕卡公司); GT-1970 血糖仪及其试纸 (爱科来医疗科技有限公司); 5810R 低温高速离心机 (德国 Eppendorf 公司); 高碘酸-希夫 (periodic acid Schiff, PAS) 染色试剂盒 (南京森贝伽公司); 总胆固醇 (TC)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、三酰甘油 (TG) 和高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 测定试剂盒 (上海长征复星医学科学有限公司); 血糖 (GLU)、谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 和乳酸脱氢酶 (LDH) 测定试剂盒 (德国德赛诊断系统有限公司)。5-HMF (淡黄色粉末; CAS 号: 67-47-0; 批号: Lot.No.20200723; 含量 99%; 2~8 °C 保存; 国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 实验动物 实验用 ICR 小鼠由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 实验动物生产许可证号为 SCXK (沪) 2017-0005, 清洁级, 雌性, 体重为 (20±2) g。实验动物 36% 脂肪供能高脂高糖饲料由杭州赛洛进生物科技有限公司提供, 维持饲料由江苏省协同医药生物工程有限责任公司提供, 生产许可证号为苏饲证 (2019) 01008。实验动物处于屏障环境中, 自由饮水、进食, 饲养温度为 20~24 °C, 相对

湿度为 40%~70%, 适应 5 d 后用于实验。实验动物使用许可证号为 SYXK (浙) 2018-0018。

1.3 方法

1.3.1 实验分组与处理 实验设 5-HMF 低、中、高剂量组, 正常对照组和模型对照组, 每组 10 只雌性 ICR 小鼠。低、中、高剂量组每天按 10 mL/kg 体重分别给予 0.27、0.80 和 2.67 mg/kg 5-HMF 灌胃, 模型对照组和正常对照组给予相同体积的去离子水灌胃, 连续 12 周。剂量组和模型对照组 36% 高脂高糖饲料喂饲, 正常对照组维持饲料喂饲。实验第 10 和 11 周, 模型对照组和剂量组禁食 16 h (不禁水), 腹腔注射四氧嘧啶 60 mg/kg 体重, 注射量 1 mL/100 g 体重。

1.3.2 体重和 GLU 监测 每周测量 1 次体重。每隔 2 周 9:30 开始禁食 4 h, 13:30 采尾血测定空腹 GLU, 第 12 周 GLU 于实验结束前 3 天测定。

1.3.3 生化指标检测 试验结束第 12 周时各组小鼠 17:00 开始禁食 16 h, 第 2 天 9:00 眼眶静脉丛采血 0.5~1.0 mL, 静置凝固后以半径 9.5 cm, 2 500 r/min 离心 10 min, 取上层血清。采用 TBA-40FR 型全自动生化分析仪检测 GLU、TC、LDL-C、TG、HDL-C、ALT、AST 和 LDH。

1.3.4 肝糖原染色检测 正常对照组、模型对照组、高剂量组小鼠眼眶静脉丛采血后颈椎脱臼法处死, 解剖留取肝组织, 10% 中性甲醛固定液固定, 石蜡包埋, 切片后进行肝糖原 PAS 染色, 显微镜下观察组织病理学变化程度和肝糖原含量。肝脏病理变化程度与等级标准: 未见肝细胞空泡变性等级为-; 极少量肝细胞轻微空泡变性等级为±; 少量肝细胞轻度空泡变性等级为+; 较多肝细胞中度空泡变性等级为++; 大量肝细胞重度空泡变性等级为+++^[7]。肝糖原含量与等级评价: 少量肝糖原颗粒, 散在分布等级为+; 中等数量肝糖原颗粒, 局灶性分布等级为++; 大量肝糖原颗粒, 弥漫性分布等级为+++。结果均以“等级符号, 本组该等级动物数/本组动物总数”描述。

1.4 统计分析 采用 SPSS 19.0 软件统计分析。定量资料服从正态分布, 采用均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 描

述,多组间比较满足方差齐性的采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 Dunnet-*t* 检验;不满足方差齐性的采用 Kruskal-Wallis *H* 检验,进一步两两比较采用 Dunn 检验。连续测量的体重和 GLU 采用重复测量资料的方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 各组小鼠基本状况和体重变化 实验结束时,各组小鼠生存状况良好,无多饮、多食、多尿等糖尿病症状,实验期间无动物死亡。各组小鼠体重均随实验时间延长而增加 ($F_{\text{时间}}=386.351, P<0.001$),组间差异无统计学意义 ($F_{\text{组间}}=0.961, P=0.438$),时间与组间存在交互作用 ($F_{\text{时间*组间}}=2.617, P=0.010$)。见表 1。

表 1 各组小鼠体重 ($n=10, \bar{x}\pm s, g$)

组别	第0周	第4周	第8周	第12周
正常对照组	21.71±1.40	28.42±1.25	30.90±1.85	32.88±1.75
模型对照组	22.06±1.35	29.38±3.21	33.49±3.78	36.36±5.87
低剂量组	22.52±1.68	28.44±2.13	32.09±2.92	34.45±3.28
中剂量组	22.80±0.90	27.71±1.77	31.01±2.90	33.74±4.03
高剂量组	21.97±0.98	28.87±1.93	31.64±2.55	33.18±2.97

2.2 各组小鼠 GLU 水平比较 实验过程中,各组小鼠 GLU 水平均随实验时间延长而升高 ($F_{\text{时间}}=19.041, P<0.001$),组间差异有统计学意义 ($F_{\text{组间}}=3.264, P=0.020$),时间与组间不存在交互作用 ($F_{\text{时间*组间}}=0.725, P=0.825$)。进一步两两比较结果显示:模型对照组小鼠 GLU 水平高于正常对照组小鼠 ($P=0.006$);中剂量组小鼠 GLU 水平低于模型对照组 ($P=0.006$),低、高剂量组小鼠 GLU 水平与模型对照组比较,差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 2。

实验结束后,各组小鼠 GLU 水平差异有统计学意义 ($P<0.05$)。进一步两两比较结果显示:模型对照组小鼠 GLU 水平高于正常对照组 ($P<0.05$);低、中、高剂量组小鼠 GLU 水平与模型对照组比较,差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 3。

表 2 各组小鼠 GLU 水平 ($n=10, \bar{x}\pm s, mmol/L$)

组别	第0周	第4周	第8周	第12周
正常对照组	5.11±0.58	5.41±0.59	5.51±0.62	5.51±0.54
模型对照组	5.14±0.72	5.92±0.78	6.16±0.68	6.31±0.32
低剂量组	5.13±0.69	5.58±0.70	6.04±0.51	5.87±0.43
中剂量组	5.01±0.55	5.28±0.64	5.58±0.53	5.67±0.31
高剂量组	5.38±0.73	5.64±0.59	6.02±0.45	6.00±0.60

表 3 各组小鼠血糖、血脂和肝功能指标比较 ($n=10, \bar{x}\pm s$)

组别	GLU (mmol/L)	TC (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)	LDH (U/L)
正常对照组	6.94±0.86	2.78±0.48	0.29±0.04	1.23±0.21	2.07±0.37	31.40±4.01	109.10±44.28	590.30±110.16
模型对照组	8.74±1.10	3.44±0.44	0.39±0.07	1.45±0.26	2.52±0.32	46.30±9.71	158.30±36.37	864.40±153.91
低剂量组	8.10±0.62	3.53±1.03	0.38±0.07	1.42±0.37	2.38±0.35	36.70±15.68	102.00±17.38	572.10±146.15
中剂量组	7.87±0.73	3.20±0.67	0.34±0.05	1.23±0.31	2.20±0.21	48.50±20.62	130.40±21.78	699.70±84.07
高剂量组	8.27±1.18	3.57±0.58	0.41±0.07	1.37±0.47	2.56±0.38	46.50±19.70	118.70±31.97	661.90±75.94
F/χ^2 值	5.336	2.319	5.977	1.017	3.881	13.341 ^a	4.799	9.708
<i>P</i> 值	0.001	0.071	0.001	0.409	0.009	0.010	0.003	<0.001

注: a表示采用 Kruskal-Wallis *H* 检验。

2.3 各组小鼠血脂水平比较 各组小鼠 LDL-C 和 HDL-C 水平差异均有统计学意义 ($P<0.05$); TC 和 TG 水平差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。进一步两两比较结果显示:模型对照组小鼠 LDL-C 和 HDL-C 水平均高于正常对照组 ($P<0.05$);低、中、高剂量组小鼠血清 LDL-C 和 HDL-C 水平与模型对照组比较,差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 3。

2.4 各组小鼠肝功能指标比较 各组小鼠 ALT、AST 和 LDH 水平差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。进一步

两两比较结果显示:模型对照组小鼠血清 ALT、AST 和 LDH 水平均高于正常对照组 ($P<0.05$);低、高剂量组小鼠 AST 水平和低、中、高剂量组小鼠 LDH 水平均低于模型对照组 ($P<0.05$);中剂量组小鼠 AST 水平和低、中、高剂量组小鼠 ALT 水平与模型对照组比较,差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 3。

2.5 肝糖原 PAS 染色结果 小鼠肝组织病理变化分级:正常对照组 (-, 9/10; ±, 1/10),多数肝细胞未见空泡变性;模型对照组 (±, 1/10; +, 3/10; ++,

5/10; +++, 1/10), 肝细胞轻微至重度空泡变性; 高剂量组 (\pm , 5/10; +, 5/10), 肝细胞轻微至轻度空泡变性。

正常对照组、模型对照组和高剂量组均有肝糖原颗粒, 肝糖原含量分级: 正常对照组 (+, 5/10; ++, 5/10), 少量或中等数量肝糖原颗粒; 模型对照组 (+ +, 5/10; +++, 5/10), 中等或大量肝糖原颗粒; 高剂量组 (+ +, 6/10; +++, 4/10), 中等或大量肝糖原颗粒。

3 讨论

本研究选择的 5-HMF 低剂量水平在人估计日摄入量 [0.07~0.50 mg/(kg 体重·d)]^[8-9] 范围内, 高剂量水平是人估计日摄入量上限 [0.50 mg/(kg 体重·d)] 的 5 倍, 比急性与亚急性动物实验未观察到有害作用的最大剂量下限 [(80 mg/kg 体重·d)]^[4, 9] 低 30 倍, 对小鼠具有安全性。与常用方法^[10-14] 比较, 采用高脂高糖饮食和四氧嘧啶诱导, 延长高脂高糖饲料饲喂时间, 降低四氧嘧啶的使用剂量, 能较好地观察 5-HMF 对小鼠的影响。

本研究结果显示, 模型对照组小鼠 GLU 水平高于正常对照组, 低、中、高剂量组小鼠 GLU 水平与模型对照组比较差异均无统计学意义, 高剂量组小鼠肝糖原含量较模型对照组无明显变化, 表明 5-HMF 不能完全预防高脂高糖饮食和低浓度四氧嘧啶诱导的小鼠 GLU 水平升高。同时, 模型对照组小鼠 LDL-C 和 HDL-C 水平均高于正常对照组, 模型对照组小鼠 TC、TG 水平与正常对照组比较差异均无统计学意义, 5-HMF 对高脂高糖饮食和低浓度四氧嘧啶诱导的 T2DM 小鼠降血脂作用有待进一步研究。

模型对照组小鼠血清 ALT、AST 和 LDH 水平均明显高于正常对照组; 低、高剂量组小鼠 AST 水平和低、中、高剂量组小鼠 LDH 水平均低于模型对照组; 高剂量组小鼠肝组织病变程度较模型对照组轻。这与既往研究结果^[6] 一致。提示 5-HMF 对高脂高糖饮食和低浓度四氧嘧啶诱导的小鼠肝组织及功能具有明显的保护作用。

综上所述, 在本实验条件下, 尚不能判断 5-HMF 对 T2DM 合并肝损伤小鼠有降血糖和降血脂作用, 但可证明 5-HMF 对小鼠的肝组织和功能有保护作用。可调整实验动物模型, 观察 5-HMF 对 T2DM 进

一步发展过程的影响和对高脂血症动物血脂水平的影响。同时, 也可对多种含 5-HMF 中药服用剂型中的 5-HMF 含量进行检测, 验证中药功效与 5-HMF 含量之间的关系, 指导中药质量控制。

参考文献

- [1] 关责彬, 张瑜, 刘迪, 等. 中药与食品中共性成分 5-羟甲基-2-糠醛的生物活性及其安全性研究进展 [J]. 中国药师, 2018, 21 (8): 1456-1459.
- [2] 徐芳辉, 胡志成, 易新宜, 等. 5-羟甲基糠醛在中药质量标准中的应用现状 [J]. 中国医药导报, 2017, 14 (15): 47-50.
- [3] FARAG M R, ALAGAWANY M, BIN-JUMAH M, et al. The toxicological aspects of the heat-borne toxicant 5-hydroxymethylfurfural in animals: a review [J]. *Molecules*, 2020, 25 (8): 1-13.
- [4] U.S. Department of Health and Human Services. NTP Technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of 5-(hydroxymethyl)-2-furfural (CAS No. 67-47-0) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies) [R/OL]. [2021-09-10]. http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/TL_rpts/TR554.pdf
- [5] 张欣, 廖祥伟, 吴松, 等. 5-羟甲基-2-呋喃甲醛衍生物的合成及降血糖活性评价 [J]. 中国药物化学杂志, 2012, 22 (5): 349-355.
- [6] 丁霞, 王明艳, 余宗亮, 等. 山茱萸中 5-羟甲基糠醛的分离鉴定及生物活性研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33 (4): 392-396, 484.
- [7] 裴天仙, 郭景明, 王春雨, 等. 6 种 2 型糖尿病动物模型中生化 and 病理改变的比较 [J]. 药物评价研究, 2020, 43 (9): 1740-1746.
- [8] GEMA A, FRANCISCO J M. Estimation of dietary intake of 5-hydroxymethylfurfural and related substances from coffee to Spanish population [J]. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48 (2): 644-649.
- [9] KLAUS A, RAINER G, KATHARINA B, et al. Toxicology and risk assessment of 5-hydroxymethylfurfural in food [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2011, 55 (5): 667-678.
- [10] 李丹丹, 刘佳佳, 吴玉泓, 等. 黄芪多糖联合二甲双胍对衰老 2 型糖尿病模型小鼠肝脏糖脂代谢的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2019, 26 (2): 47-51.
- [11] 许芳芳, 王楠, 李刚强, 等. 2 型糖尿病小鼠模型的建立与评价 [J]. 中国医学科学院学报, 2017, 39 (3): 324-329.
- [12] 吴胜, 蔡双鹏, 李小枫, 等. 丹参酮 I 对 2 型糖尿病 ICR 小鼠抗糖作用的研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51 (9): 1286-1291.
- [13] 刘安军, 王秀丽, 陈影, 等. 胶原蛋白多肽-铬 (III) 螯合物对四氧嘧啶致小鼠肝脏损伤的保护作用 [J]. 营养学报, 2006, 28 (6): 487-489, 493.
- [14] 严峻, 夏勇, 张世鑫, 等. 金樱子、枳椇子、牛磺酸混合物对小鼠酒精性肝损伤的保护作用研究 [J]. 预防医学, 2020, 32 (9): 968-970.

收稿日期: 2021-06-30 修回日期: 2021-09-10 本文编辑: 田田