

· 药理 ·

津力达颗粒对糖尿病前期大鼠内脏脂肪蓄积的影响

张少兰¹, 侯云龙^{2,3}, 马坤¹, 郝佳梦⁴, 李翠茹^{1,2,5}, 宋亚辉¹, 魏聪^{1,2,5*}

(1. 河北中医学院, 石家庄 050091; 2. 络病研究与创新中药国家重点实验室, 石家庄 050035;

3. 河北省络病重点实验室, 石家庄 050035; 4. 河北医科大学, 石家庄 050017;

5. 国家中医药管理局重点研究室(心脑血管络病), 石家庄 050035)

[摘要] 目的:研究津力达颗粒对糖尿病前期大鼠内脏脂肪蓄积及其引起的炎症反应的影响。方法:将SD大鼠随机分为正常组、模型组、津力达低剂量组(1.5 g·kg⁻¹)、津力达高剂量组(3.0 g·kg⁻¹)和阿托伐他汀组(10 mg·kg⁻¹)。采用高糖高脂联合小剂量链脲佐菌素(STZ)少量多次腹腔注射法建立糖尿病前期大鼠模型,造模8周后,给药干预13周。测定大鼠体质量、口服葡萄糖耐量(OGTT)、空腹血糖(FBG)、空腹胰岛素(FINS)、胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)。微型计算机断层成像技术(Micro-CT)观测内脏脂肪含量。苏木素-伊红(HE)染色观察脂肪组织病理变化。酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测大鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)含量。免疫荧光法和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测内脏脂肪中巨噬细胞标记物CD68表达情况。结果:与正常组比较,模型组大鼠OGTT、FBG、FINS、HOMA-IR、TC、LDL-C显著升高($P<0.01$),HDL-C显著降低($P<0.01$),体质量与内脏脂肪含量明显增加($P<0.05$, $P<0.01$),脂肪细胞异常肥大,CD68蛋白表达和TNF- α 、IL-6含量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,津力达各剂量组能够降低糖尿病前期大鼠OGTT、HOMA-IR、TC和LDL-C水平($P<0.05$, $P<0.01$),减轻糖尿病前期大鼠体质量和内脏脂肪含量($P<0.05$),减小脂肪细胞肥大,减少CD68蛋白表达和TNF- α 、IL-6的含量($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:津力达可以通过减少糖尿病前期大鼠的内脏脂肪蓄积及其引起的炎症反应,从而改善糖尿病前期大鼠的胰岛素抵抗,为津力达颗粒在糖尿病前期的临床治疗中提供新的药理依据。

[关键词] 津力达颗粒; 内脏脂肪; 微型计算机断层成像技术(Micro-CT); 胰岛素抵抗; 糖尿病前期

[中图分类号] R2-0;R33;R289;R587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)08-0037-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220839

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220228.1708.002.html>

[网络出版日期] 2022-03-02 20:14

Effect of Jinlida Granules on Visceral Fat Accumulation in Prediabetic Rats

ZHANG Shao-lan¹, HOU Yun-long^{2,3}, MA Kun¹, HAO Jia-meng⁴, LI Cui-ru^{1,2,5},
SONG Ya-hui¹, WEI Cong^{1,2,5*}

(1. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050091, China; 2. National Key Laboratory of Collateral Disease Research and Innovative Chinese Medicine, Shijiazhuang 050035, China;

3. Hebei Provincial Key Laboratory of Collateral Diseases, Shijiazhuang 050035, China;

4. Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 5. Key Laboratory of National Administration of Traditional Chinese Medicine (Cardio-Cerebral Vessel Collateral Disease), Shijiazhuang 050035, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Jinlida granules on visceral fat accumulation and its induced inflammatory response in prediabetic rats. **Method:** Male SD rats were randomly divided into normal

[收稿日期] 2021-12-13

[基金项目] 国家重点研发计划“中医药现代化研究”重点专项(2017YFC1700501);河北省络病实验室绩效后补助经费项目(20567627H)

[第一作者] 张少兰,在读硕士,从事糖尿病的理论及实验研究,E-mail:842780665@qq.com

[通信作者] *魏聪,博士,主任医师,硕士生导师,从事络病学研究,E-mail:weitem@163.com

group, model group, Jinlida low-dose group ($1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), Jinlida high-dose group ($3.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) and atorvastatin group ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). Prediabetic rat model was established using high-carbohydrate, high-fat diet combined with low-dose streptozotocin (STZ) by multiple small-dose intraperitoneal injections. After 8 weeks of modeling and drug intervention for 13 consecutive weeks, body weight, oral glucose tolerance test (OGTT), fasting blood glucose (FBG), fasting insulin (FINS), insulin resistance index (HOMA-IR), total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) were measured in each group of rats. The content of visceral fat was quantified by micro-computed tomography (Micro-CT). Hematoxylin-eosin staining (HE) was used to observe the pathological changes of fat cells. The levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in rat visceral fat and serum were determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The expression of macrophage marker CD68 in visceral fat was detected by immunofluorescence and Western blot. **Result:** Compared with normal group, model group had increased oral glucose tolerance, FBG, FINS, HOMA-IR, TC, LDL-C ($P < 0.01$), elevated body weight and visceral fat accumulation ($P < 0.05$, $P < 0.01$), enhanced CD68 protein expression and TNF- α and IL-6 levels ($P < 0.01$), decreased HDL-C ($P < 0.01$), and abnormal hypertrophy of adipocytes. Compared with model group, Jinlida high- and low-dose groups lowered oral glucose tolerance, HOMA-IR, TC and LDL-C ($P < 0.05$, $P < 0.01$), body weight and visceral fat accumulation ($P < 0.05$), and CD68 protein expression and TNF- α and IL-6 levels ($P < 0.05$, $P < 0.01$) and lessened hypertrophy of fat cells. **Conclusion:** Jinlida can improve the insulin resistance in prediabetic rats by reducing visceral fat accumulation and its induced inflammatory response, which provides a new pharmacological basis for clinical treatment of prediabetes by Jinlida granules.

[Keywords] Jinlida granules; visceral fat; micro-computed tomography (Micro-CT); insulin resistance; prediabetes

糖尿病前期是指血糖高于正常但达不到2型糖尿病(T2DM)诊断标准的一种病症^[1]。预计到2030年,全球糖尿病前期的人数将达到4.54亿^[2],这显著增加了罹患糖尿病和心血管疾病的风险^[1]。胰岛素抵抗是糖尿病前期和糖尿病的病理生理学基础,因此对胰岛素抵抗进行早期干预是预防糖尿病前期发生发展的关键^[3]。

内脏脂肪积累是导致胰岛素抵抗的重要因素之一^[4]。长期过量的营养摄入超过脂肪细胞储存能力时,脂肪细胞破裂导致其储存的大量脂肪酸释放,同时巨噬细胞浸润并分泌大量肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)等炎症因子,这些炎症因子随血液运输到全身各个组织,影响胰岛素与胰岛素受体亲和力,从而导致全身胰岛素抵抗^[5-7]。此外,释放出的脂肪酸沉积在其他对胰岛素敏感的器官(如肝脏、骨骼肌、胰腺)并产生“脂毒性”,加重胰岛素抵抗^[8]。因此,减少内脏脂肪的积累在改善胰岛素敏感性方面起着重要作用。

津力达颗粒是络病理理论指导下基于人用经验研制的创新中药,围绕消渴病从“脾”论治,以“益气养阴,健脾运津”为主要治则,其在改善胰岛素抵抗、调节糖脂代谢紊乱上有积极作用^[9-11],前期实验

证实津力达颗粒能够通过调节胆固醇、脂肪酸代谢基因,减少肝脏、骨骼肌、胰腺中的脂质沉积^[12-15],调节棕色脂肪粒体的合成和脂肪酸氧化代谢,增加棕色脂肪的产热和能量消耗来改善胰岛素抵抗^[16],但围绕内脏脂肪全面直观的研究尚有待深入。故本研究以高糖高脂饮食联合小剂量链脲佐菌素(STZ)少量多次腹腔注射建立糖尿病前期大鼠模型,使用微型计算机断层成像技术(Micro-CT),直观检测津力达颗粒对糖尿病前期大鼠内脏脂肪蓄积情况,通过研究脂肪细胞病理,巨噬细胞及炎症因子水平,以期揭示津力达颗粒调节内脏脂肪改善胰岛素抵抗的作用机制,为临床上应用津力达颗粒治疗糖尿病前期提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 采用SPF级SD雄性大鼠,体质量为130~150 g,50只,购买自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2016-0006,饲养于河北省中西医结合医药研究院新药安全评价研究中心,许可证号SYXK(冀)2020-003。在室温(23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,湿度(50 ± 10)%,12 h明暗交替条件下自由进食和饮水,实验前适应性喂养3 d。本研究经河北以岭医药研究院动物伦理委员会批准(批准编号

N2020179)。

1.2 药物与试剂 津力达干粉(石家庄以岭药业股份有限公司,批号B2012027,由人参、黄精、麸炒苍术、苦参、麦冬、地黄、制何首乌、山茱萸、茯苓、佩兰、黄连、知母、炙淫羊藿、丹参、粉葛、荔枝核、地骨皮组成);阿托伐他汀(美国辉瑞制药有限公司,批号DX4976);高糖高脂饲料(成都MolDiets公司,批号M18101801,起酥油质量分数为40%,胆固醇质量分数为2%,果糖质量分数为34.5%);STZ(北京索莱宝科技有限公司,批号S8050);大鼠超敏胰岛素酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(美国Alpco公司,批号80-INSRTU-E01);总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)(北京九强生物技术有限公司,批号分别为20-1202、20-0204、20-0213);BCA蛋白浓度测定试剂盒(北京赛文创新生物科技有限公司,批号SW101-02);兔抗CD68多克隆抗体、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体、山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G二抗(英国Abcam公司,批号分别为ab125212、ab8227、ab216773);柠檬酸钠-EDTA抗原修复液(40X),免疫荧光染色抗兔试剂盒Alexa Fluor 488(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为P0086、P0176);TNF- α ELISA试剂盒(美国Proteintech公司,批号KE20001-96T);IL-6 ELISA试剂盒(杭州联科生物技术股份有限公司,批号EK306-01);苏木素染色液、伊红染色液(珠海贝索生物技术有限公司,批号分别为C210305、C210202)。

1.3 仪器 Ultra Easy 稳豪倍易型血糖仪(美国强生公司);ME104E型分析天平(美国梅特勒托力多公司);PerkinElmer Quantum GX型Micro-CT小动物活体影像系统(上海珀金埃尔默仪器股份有限公司);TEC5型组织包埋机(日本樱花Tissue-Tek公司);RM2235型轮转式石蜡切片机、DM6000b型光学显微镜、LSM710型激光共聚焦荧光显微镜(德国Leica公司);7080型全自动生化分析仪(日本日立公司);Synergy4型多功能酶标仪(美国BioTek公司);Odyssey型双色红外激光扫描仪(美国LI-COR公司);HZ-2011KC型恒温摇床(太仓华利达实验设备有限公司)。

2 方法

2.1 动物模型制备及分组 SPF清洁级雄性SD大鼠随机抽取10只作为正常组,给予标准大鼠饲料21周;造模组大鼠参考文献[17]中方法及标准采用高糖高脂饲料喂养8周联合小剂量STZ少量多次腹腔

注射(每次 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,累计剂量 $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)诱导糖尿病前期模型,大鼠体质量、空腹血糖及糖耐量升高,认为糖尿病前期造模成功,筛选出造模成功的40只大鼠随机分为模型组、津力达低、高剂量组(1.5 、 $3.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、阿托伐他汀组($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),各10只,继续高糖高脂饲料喂养同时药物灌胃13周。

2.2 Micro-CT扫描 末次给药后,禁食12 h。异氟烷麻醉,Micro-CT进行扫描。扫描参数如下,X射线参数为电流90 kV、电压88 μA ,成像视野 $72\text{ mm}\times 72\text{ mm}$,探测器模式standard,扫描模式whole Body $2\text{ min}\times 3$ 。选取腰5水平作为横截面代表性图像,选取内脏脂肪组织作为感兴趣区域(ROI),使用Micro-CT自带的成像软件(Caliper Analyze)对ROI进行三维重建与体积测量^[18],所有体积参数针对总体质量进行标准化,即内脏脂肪体积指数=内脏脂肪体积(mm^3)/体质量(g)。

2.3 口服糖耐量实验 禁食不禁水12~14 h,各组大鼠口服灌胃葡萄糖($2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),用血糖仪分别在0、30、60、120 min测量大鼠尾静脉血糖值,并按照文献[19]方法计算糖耐量的曲线下面积。

2.4 样本采集 末次给药后,禁食不禁水12 h,腹腔注射2%戊巴比妥钠麻醉,腹主动脉取血, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min(离心半径2.05 cm),分离血清, $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱储存待测。选取附睾周围脂肪作为内脏脂肪代表^[20]。处死大鼠,迅速分离附睾周围脂肪并称质量,计算附睾周围脂肪指数,附睾周围脂肪指数=附睾周围脂肪湿重(mg)/体质量(g)。每只大鼠左侧附睾周围脂肪浸泡于10%甲醛溶液中固定,进行石蜡包埋、切片,用于苏木素-伊红(HE)和免疫荧光染色,右侧放置于冻存管中, $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱储存待测。

2.5 血清生化指标检测 末次给药后,检测大鼠空腹血糖(FBG),采用大鼠超敏胰岛素ELISA试剂盒检测血清中空腹胰岛素(FINS)水平,胰岛素抵抗指数(HOMA-IR): $\text{HOMA-IR}=\text{FINS}\times\text{FBG}/22.5$ 。采用全自动生化仪检测TC、LDL-C和HDL-C含量。

2.6 HE染色观察大鼠脂肪组织病理学形态变化 脂肪组织经10%甲醛溶液固定,常规石蜡包埋,制备成 $5\ \mu\text{m}$ 厚的切片。采用HE染色评估脂肪细胞的肥大程度,于显微镜下观察并拍照。

2.7 免疫荧光法(IF)检测大鼠脂肪组织CD68蛋白表达 组织切片脱蜡,放入柠檬酸盐-EDTA抗原修复液中进行微波炉加热修复,5%的牛血清白蛋白封闭15 min,抗CD68(1:500)抗体 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜;次

日,荧光二抗室温孵育1 h,采用含有DAPI的抗荧光淬灭剂封片,使用激光共聚焦显微镜获得图像。

2.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠脂肪组织中CD68蛋白表达 采用含有蛋白酶抑制剂的高效RIPA裂解缓冲液提取脂肪组织总蛋白,BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。4%~20%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分离蛋白,后转移至NC膜,使用快速封闭液封闭10 min,将膜分别与CD68抗体(1:5 000)、 β -actin(1:5 000)抗体4℃孵育过夜;次日,洗膜后加入二抗(1:1万)孵育1 h。Odyssey双色红外激光成像系统对膜进行扫描并分析。

2.9 ELISA检测TNF- α 及IL-6水平 采用ELISA

试剂盒检测大鼠血清及脂肪组织中TNF- α 及IL-6水平,严格遵循说明书进行操作。

2.10 统计学方法 应用SPSS 26.0软件对实验数据进行统计学分析,实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对糖尿病前期大鼠口服糖耐量的影响 与正常组比较,模型组大鼠在口服葡萄糖60 min后血糖显著升高($P < 0.01$),OGTT-AUC显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组口服葡萄糖60 min后血糖明显降低($P < 0.05, P < 0.01$),OGTT-AUC显著降低($P < 0.01$)。见表1。

表1 津力达对糖尿病前期大鼠口服糖耐量的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Effect of Jinlida on oral glucose tolerance in prediabetic rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	血糖/mmol·L ⁻¹				OGTT-AUC/mm ² ·h·L ⁻¹
		0 min	30 min	60 min	120 min	
正常组		5.58±0.89	8.25±0.91	9.68±1.24	7.10±1.25	16.33±1.44
模型组		6.30±0.51	9.67±1.65	13.60±2.91 ²⁾	10.23±0.76 ²⁾	21.73±1.91 ²⁾
津力达低剂量组	1.5	5.77±0.72	9.92±2.30	9.58±1.57 ⁴⁾	8.67±1.01 ³⁾	17.92±1.28 ⁴⁾
津力达高剂量组	3.0	6.12±0.74	9.53±1.81	9.38±1.37 ⁴⁾	7.92±0.99 ⁴⁾	17.29±1.82 ⁴⁾
阿托伐他汀组	0.01	6.20±0.47	10.25±2.60	10.22±1.46 ⁴⁾	8.78±1.06 ³⁾	18.73±2.56 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表2-表7同)

3.2 对糖尿病前期大鼠胰岛素抵抗的影响 与正常组比较,模型组FBG、FINS和HOMA-IR显著升高($P < 0.01$),表明模型组出现明显的胰岛素抵抗;与

模型组比较,各给药组有降低FBG趋势,津力达低、高剂量组和阿托伐他汀组可以显著降低FINS、HOMA-IR水平($P < 0.01$)。见表2。

表2 津力达对糖尿病前期大鼠胰岛素抵抗的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of Jinlida on insulin resistance in prediabetic rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	FBG/mm ² ·L ⁻¹	FINS/mU·L ⁻¹	HOMA-IR
正常组		5.18±0.71	42.30±16.68	10.07±4.91
模型组		6.50±0.96 ²⁾	132.81±26.12 ²⁾	39.01±12.37 ²⁾
津力达低剂量组	1.5	5.90±0.52	66.54±20.21 ⁴⁾	17.51±5.44 ⁴⁾
津力达高剂量组	3.0	5.67±0.63	53.57±21.21 ⁴⁾	13.70±6.55 ⁴⁾
阿托伐他汀组	0.01	5.75±0.82	72.64±18.52 ⁴⁾	18.69±6.05 ⁴⁾

3.3 对糖尿病前期大鼠血脂水平的影响 与正常组比较,模型组大鼠血清TC和LDL-C含量显著升高($P < 0.01$),HDL-C含量显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,津力达低、高剂量组和阿托伐他汀组可以明显降低血清TC和LDL-C含量($P < 0.05, P < 0.01$)。见表3。

3.4 对糖尿病前期大鼠体质量及附睾周围脂肪指数的影响 治疗前,与正常组比较,模型组大鼠体

质量显著升高($P < 0.01$),与模型组比较,其他各组大鼠体质量差异无统计学意义;治疗结束后,与正常组比较,模型组大鼠体质量显著增加($P < 0.01$),与模型组比较,津力达高剂量组和阿托伐他汀组可明显降低体质量($P < 0.05$)。与正常组比较,模型组附睾周围脂肪指数显著增加($P < 0.01$),与模型组比较,津力达高剂量组与阿托伐他汀组可以明显降低附睾周围脂肪指数($P < 0.05$)。见表4。

表 3 津力达对糖尿病前期大鼠血脂水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	TC	LDL-C	HDL-C
正常组		1.51±0.52	0.26±0.07	0.75±0.27
模型组		2.59±0.46 ²⁾	0.74±0.17 ²⁾	0.42±0.09 ²⁾
津力达低剂量组	1.5	2.15±0.38 ³⁾	0.61±0.15 ³⁾	0.38±0.09
津力达高剂量组	3.0	1.76±0.39 ⁴⁾	0.46±0.11 ⁴⁾	0.46±0.22
阿托伐他汀组	0.01	1.92±0.42 ⁴⁾	0.53±0.15 ⁴⁾	0.42±0.87

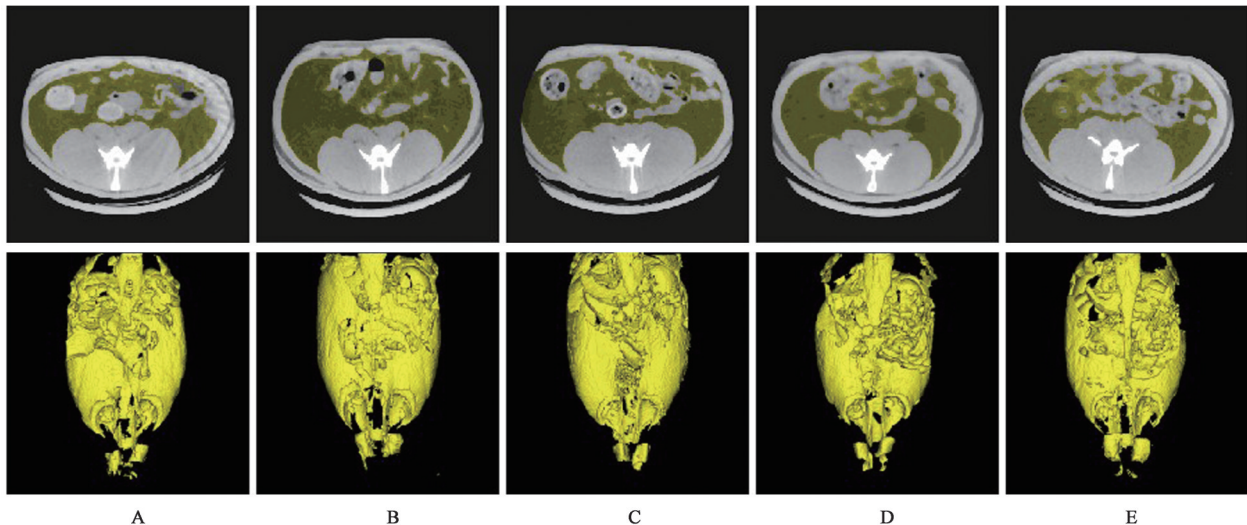
表 4 津力达对糖尿病前期大鼠体重及附睾周围脂肪指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	治疗前体质量/g	治疗后体质量/g	治疗前后体质量差值/g	附睾周围脂肪指数/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
正常组		437.40±47.02	567.20±69.29	129.80±28.68	15.94±3.00
模型组		537.40±55.66 ²⁾	706.40±72.26 ²⁾	169.00±28.67 ¹⁾	21.70±3.01 ²⁾
津力达低剂量组	1.5	539.60±40.56	677.50±61.85	137.90±41.62	20.81±4.69
津力达高剂量组	3.0	531.60±62.68	630.20±88.15 ³⁾	98.60±43.85 ⁴⁾	16.69±5.68 ³⁾
阿托伐他汀组	0.01	530.00±53.77	632.70±67.44 ³⁾	102.70±28.13 ⁴⁾	17.17±5.40 ³⁾

3.5 对糖尿病前期大鼠内脏脂肪积累的影响

Micro-CT使大鼠的内脏脂肪可视化,黄色部分代表内脏脂肪。与正常组比较,模型组内脏脂肪含量明显升高,与模型组比较,津力达低、高剂量组和阿托伐他汀组可明显减少内脏脂肪含量,且津力达的

作用呈剂量依赖性。Caliper Analyze 软件量化了内脏脂肪的体积。与正常组比较,模型组大鼠内脏脂肪体积指数明显增加($P<0.05$),与模型组比较,津力达低、高剂量组与阿托伐他汀组可明显降低内脏脂肪体积指数($P<0.05, P<0.01$)。见图 1、表 5。



注: A. 正常组; B. 模型组; C. 津力达低剂量组; D. 津力达高剂量组; E. 阿托伐他汀组(图 2-图 4 同)

图 1 糖尿病前期大鼠内脏脂肪的 Micro-CT 成像

Fig. 1 Micro-CT imaging of visceral fat in prediabetic rats

表 5 津力达对糖尿病前期大鼠内脏脂肪体积指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	内脏脂肪体积指数/ $\text{mm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$
正常组		63.82±15.13
模型组		81.90±12.63 ¹⁾
津力达低剂量组	1.5	66.67±9.98 ³⁾
津力达高剂量组	3.0	62.31±12.21 ³⁾
阿托伐他汀组	0.01	60.11±11.75 ⁴⁾

3.6 对糖尿病前期大鼠脂肪组织的病理形态学变化的影响 HE 染色结果显示,在相同放大倍数下,与正常组比较,模型组大鼠脂肪细胞明显增大,脂肪细胞数量每 200 倍视野明显减少;与模型组比较,津力达高剂量组和阿托伐他汀组大鼠脂肪细胞明显变小,脂肪细胞数目每 200 倍视野明显增多。结果表明津力达可明显降低脂肪细胞体积。见图 2。

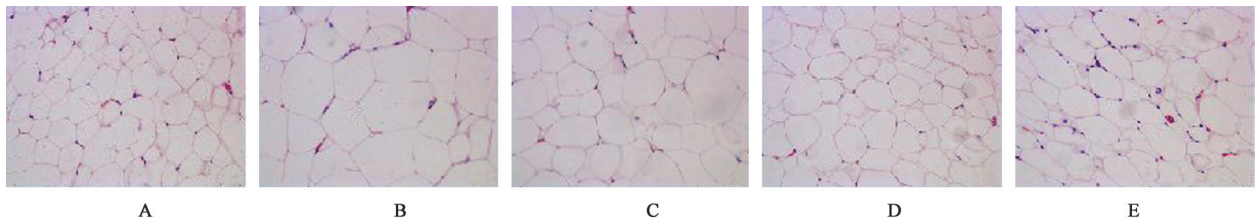


图2 津力达对糖尿病前期大鼠脂肪组织病理形态的影响(HE, ×200)

Fig. 2 Effect of Jinlida on pathological morphology of adipose tissue in prediabetic rats (HE, ×200)

3.7 对糖尿病前期大鼠脂肪组织中CD68表达的影响 CD68是巨噬细胞的表面标志物^[21]。IF和Western blot结果显示,与正常组比较,模型组CD68

蛋白表达显著升高($P < 0.01$),津力达低、高剂量组和阿托伐他汀组可明显降低CD68蛋白表达水平($P < 0.05, P < 0.01$)。见图3和图4、表6。

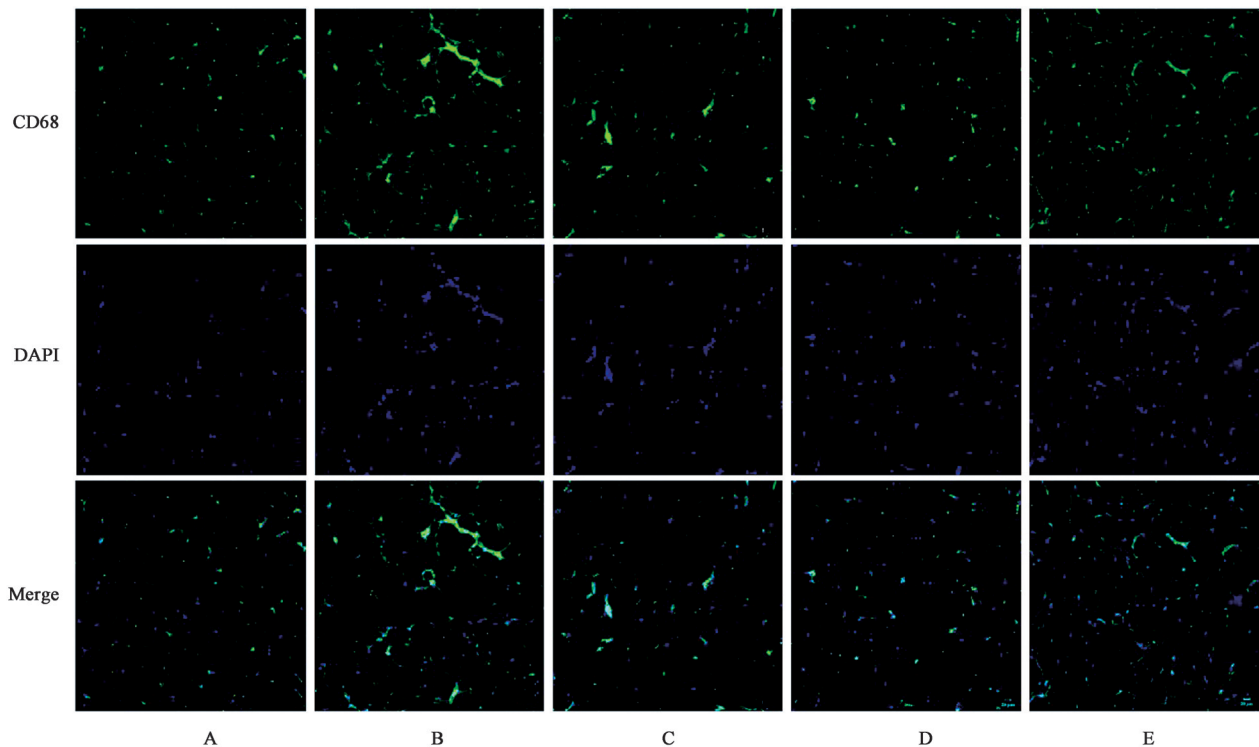


图3 各组大鼠脂肪组织中巨噬细胞CD68蛋白的表达(免疫荧光, ×100)

Fig. 3 Expression of macrophages CD68 protein in adipose tissue of rats in each group (IF, ×100)

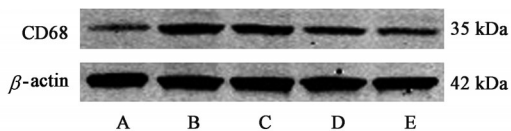


图4 各组大鼠脂肪组织CD68蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of CD68 protein expression in adipose tissue of rats in each group

3.8 对糖尿病前期大鼠炎症因子的影响 与正常组比较,模型组大鼠血清和脂肪组织中TNF- α 含量显著升高($P < 0.01$),脂肪组织中IL-6显著升高, ($P < 0.01$);与模型组比较,津力达低、高剂量组及阿托伐他汀组均可明显减少TNF- α 、IL-6含量,差异具有明显统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$)。见表7。

表6 津力达对糖尿病前期大鼠脂肪组织CD68蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 6 Effect of Jinlida on CD68 protein in adipose tissue of prediabetic rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	CD68/ β -actin
正常组		1.00±0.00
模型组		2.39±0.26 ²⁾
津力达低剂量组	1.5	1.36±0.52 ³⁾
津力达高剂量组	3.0	1.07±0.35 ⁴⁾
阿托伐他汀组	0.01	1.02±0.69 ³⁾

4 讨论

糖尿病前期是T2DM发展的重要风险因素,每

表7 津力达对糖尿病前期大鼠炎症因子的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 7 Effect of Jinlida on inflammatory factors in prediabetic rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	血清 TNF-α/ng·L ⁻¹	组织 TNF-α/ng·g ⁻¹	组织 IL-6/ng·g ⁻¹
正常组		7.57±1.78	43.25±14.57	1.02±0.33
模型组		16.58±1.97 ²⁾	160.67±46.24 ²⁾	2.06±0.72 ²⁾
津力达低剂量组	1.5	9.56±2.19 ⁴⁾	94.50±43.30 ⁴⁾	1.42±0.28 ³⁾
津力达高剂量组	3.0	8.82±1.38 ⁴⁾	71.26±35.70 ⁴⁾	1.21±0.64 ⁴⁾
阿托伐他汀组	0.01	10.32±3.20 ⁴⁾	91.97±25.87 ⁴⁾	1.26±0.20 ⁴⁾

年有5%~10%的患者发展成T2DM^[22]。然而糖尿病前期是可逆的,减肥、改变生活方式和药物治疗是治疗糖尿病前期的主要手段^[23]。临床上常用的治疗药物包括二甲双胍、利拉鲁肽、吡格列酮等,然而这些药物容易引起不良心血管事件、肝脏毒性、水肿等多种不良反应^[23]。中医药在防治糖尿病前期方面具有多成分、多靶点的优势,临床应用前景广阔,已成为治疗糖尿病前期疾病的重要热点^[24]。

津力达颗粒是依据通脾络、运脾津法研制出的创新中药,以人参为君药补脾益气,黄精滋养脾阴,苍术燥湿健脾,苦参清热燥湿共为臣药,麦门冬生津止渴,生地黄壮水滋阴,何首乌补肝肾阴精,山茱萸补肾涩精共佐黄精滋脾阴,茯苓健脾利水渗湿,佩兰化湿醒脾共佐苍术化脾湿,知母滋阴降火,地骨皮清虚火共佐苦参泻脾热,再加以淫羊藿补肾阳而温脾土,丹参活血通络,葛根引津上行及荔枝核调畅气机,诸药合用,脾运得健,则津液自生,消渴病诸证得以悉除。既往研究发现,津力达在调节脂代谢过程中具有明显优势,津力达可以通过调节肝脏脂质合成与代谢过程相关的脂肪酸转位酶(FAT/CD36)、乙酰辅酶A羧化酶(ACC)、肉毒碱棕榈酰基转移酶1(CPT1)等蛋白表达,减轻肝脏脂肪变性程度,减少肝细胞损伤,通过激活成纤维细胞生长因子21(FGF21)/磷酸腺苷活化蛋白激酶(AMPK)信号通路,改善肝脏脂质代谢紊乱,上调肝脏磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路减轻肝脏氧化应激过程,改善肝脏功能从而调节糖脂代谢过程^[12, 25-28],亦有研究发现津力达可以通过激活肥胖小鼠棕色脂肪中解偶联蛋白1(UCP1)、过氧化物酶体增殖物激活受体γ辅助活化因子-1α(PGC-1α)及氧化磷酸化(OXPHOS)等产热蛋白的表达增加棕色脂肪的产热和能量消耗,调节能量代谢过程^[16],前期研究已对肝脏、棕色脂肪进行了较为深入的探讨,因此本研究重点关注津力达对内脏脂肪组织的调节。

糖尿病前期被定义为糖耐量受损(IGT)和(或)轻度空腹血糖受损(IFG)^[29]。胰岛素抵抗先于IGT和T2DM的发展,是治疗糖尿病前期的关键,该阶段常伴随糖脂代谢紊乱与体质量增加^[3, 17]。本研究采用高糖高脂联合小剂量STZ少量多次腹腔注射诱导的大鼠糖尿病前期模型,结果发现模型组大鼠FBG、OGTT-AUC、FINS、HOMA-IR、TC、LDL-C水平明显升高,HDL-C水平明显降低,体质量明显增加,提示模型组大鼠发生了胰岛素抵抗,出现了IGT、IFG症状和脂代谢紊乱,但未达到T2DM诊断标准,这表明糖尿病前期大鼠模型建立成功^[30]。给予津力达颗粒治疗后,FINS、HOMA-IR、TC、LDL-C水平明显降低、体质量明显减轻,与前期研究结果一致^[12],说明津力达颗粒可以有效改善糖尿病前期症状,减轻胰岛素抵抗和糖脂代谢紊乱,且津力达改善胰岛素抵抗的作用略优于阿托伐他汀组。

白色脂肪是具有内分泌功能的储能器官,不仅影响着能量代谢,同时还与炎症和胰岛素抵抗有关,白色脂肪在体内的分布,特别是内脏脂肪组织的积累与胰岛素抵抗的发展关系密切^[4],内脏脂肪被定义为腹膜内测量到的脂肪,其围绕胃、肠、肝脏、肾脏等内脏器官分布。内脏脂肪的积累主要归因于异常分化引起的脂肪细胞肥大和细胞增生^[31]。大量研究表明减少糖尿病前期患者或小鼠内脏脂肪积累可有效改善胰岛素敏感性^[32-33]。CT是测量内脏脂肪含量的金标准^[34],既往研究表明Micro-CT测出的脂肪体积与脂肪质量之间有非常高的相关性,能准确测量出内脏脂肪的含量,是一种可靠、非侵入性的活体成像技术^[35],此方法可有效减少取材过程中全面剥离脂肪产生的人为误差,因此本研究采用Micro-CT方法对内脏脂肪进行了量化分析,并使用Micro-CT对内脏脂肪进行三维重建,使大鼠内脏脂肪积累情况更加直观。本研究结果发现,与正常组比较,模型组大鼠附睾周围脂肪指数、内脏脂肪体积指数及CT图像显示内脏脂肪含量增加,提

示糖尿病前期大鼠出现了内脏脂肪过度蓄积,与模型组比较,津力达颗粒可不同程度降低上述指标,说明津力达可以有效改善糖尿病前期大鼠内脏脂肪蓄积的情况,且呈剂量依赖性。此外,本研究病理结果显示,模型组大鼠脂肪细胞明显增大,津力达颗粒低、高剂量组可以改善脂肪细胞异常肥大。综上,津力达不仅可以有效改善糖尿病前期大鼠内脏脂肪的蓄积情况,还可以改善脂肪组织形态。

脂肪组织中的慢性低度炎症是导致胰岛素抵抗的重要影响因素^[36]。巨噬细胞的激活和浸润在脂肪组织炎症中起着核心作用^[37]。长期过量营养摄入会使肥大的脂肪细胞超负荷而死亡,巨噬细胞募集在死亡或将死细胞周围^[38],并产生大量的炎症因子,如 TNF- α 、IL-6 等。大量研究证明,TNF- α 和 IL-6 可通过影响核转录因子- κ B(NF- κ B) 和 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)、细胞因子信号传导抑制蛋白-3(SOCS-3)等多条信号通路阻断胰岛素与胰岛素受体间的相互作用,从而促进胰岛素抵抗^[39-40]。本研究显示,模型组内脏脂肪中 CD68、TNF- α 和 IL-6 升高,血清 TNF- α 升高,给予津力达颗粒治疗后可以降低 CD68 蛋白表达,降低 TNF- α 和 IL-6 水平,表明津力达减轻了脂肪组织中巨噬细胞浸润及其引起的炎症反应。综上,津力达颗粒改善胰岛素抵抗的作用与减轻脂肪组织中的慢性炎症有关。

综上所述,津力达可以有效改善糖尿病前期大鼠的胰岛素抵抗、糖脂代谢紊乱,其机制可能与其减轻内脏脂肪蓄积,减轻巨噬细胞浸润和炎症反应有关。这为中医药治疗糖尿病前期及延缓糖尿病进程方面提供了新的科学依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] ASSOCIATION A D. 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetes-2021[J]. *Diabetes Care*, 2021, doi: 10. 2337/dc19-S002.
- [2] SAEEDI P, PETERSOHN I, SALPEA P, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the international diabetes federation diabetes atlas, 9th edition [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2019, 157: 107843.
- [3] KHAN R, CHUA Z, TAN J C, et al. From pre-diabetes to diabetes: Diagnosis, treatments and translational research[J]. *Medicina (Kaunas)*, 2019, doi: 10. 3390/medicina55090546.

- [4] LEVELT E, PAVLIDES M, BANERJEE R, et al. Ectopic and visceral fat deposition in lean and obese patients with type 2 diabetes[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2016, 68(1):53-63.
- [5] ENGIN A B. What is lipotoxicity?[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 960:197-220.
- [6] KIRAN S, KUMAR V, MURPHY E A, et al. High fat diet-induced CD8(+) T cells in adipose tissue mediate macrophages to sustain low-grade chronic inflammation[J]. *Front Immunol*, 2021, 12:680944.
- [7] CHEN F C, SHEN K P, CHEN J B, et al. PGBR extract ameliorates TNF- α induced insulin resistance in hepatocytes[J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2018, 34(1): 14-21.
- [8] REN X, CHEN N, CHEN Y, et al. TRB3 stimulates SIRT1 degradation and induces insulin resistance by lipotoxicity via COP1[J]. *Exp Cell Res*, 2019, 382(1): 111428.
- [9] PAN J, XU Y, CHEN S, et al. The effectiveness of traditional Chinese medicine Jinlida granules on glycemic variability in newly diagnosed type 2 diabetes: A double-blinded, randomized trial [J]. *J Diabetes Res*, 2021, 2021:6303063.
- [10] LIAN F, TIAN J, CHEN X, et al. The efficacy and safety of Chinese herbal medicine Jinlida as add-on medication in type 2 diabetes patients ineffectively managed by metformin monotherapy: A double-blind, randomized, placebo-controlled, multicenter trial[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6):e0130550.
- [11] SHI Y L, LIU W J, ZHANG X F, et al. Effect of Chinese herbal medicine Jinlida granule in treatment of patients with impaired glucose tolerance[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2016, 129(19):2281-2286.
- [12] 孙颖. 2型糖尿病(消渴)从“脾”论治理论探讨与实验研究[D]. 南京:南京中医药大学, 2015.
- [13] 金鑫, 张彦芬, 秘尧, 等. 津力达对高脂诱导的胰岛素抵抗 ApoE^{-/-}小鼠骨骼肌胆固醇相关基因的影响[J]. *中国药理学通报*, 2014, 30(11):1600-1604.
- [14] ZANG S S, SONG A, LIU Y X, et al. Chinese medicine Jinlida (JLD) ameliorates high-fat-diet induced insulin resistance in rats by reducing lipid accumulation in skeletal muscle [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(3):4620-4634.
- [15] WANG D, TIAN M, QI Y, et al. Jinlida granule inhibits palmitic acid induced-intracellular lipid accumulation and enhances autophagy in NIT-1 pancreatic β cells through AMPK activation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 161:99-107.
- [16] ZHANG H, HAO Y, WEI C, et al. Chinese medicine

- Jinlida granules improve high-fat-diet induced metabolic disorders via activation of brown adipose tissue in mice[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 114: 108781.
- [17] BARRIÈRE D A, NOLL C, ROUSSY G, et al. Combination of high-fat/high-fructose diet and low-dose streptozotocin to model long-term type-2 diabetes complications[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):424.
- [18] LIU X J, DUAN N N, LIU C, et al. Characterization of a murine nonalcoholic steatohepatitis model induced by high fat high calorie diet plus fructose and glucose in drinking water[J]. *Lab Invest*, 2018, 98(9): 1184-1199.
- [19] TIAN X, ZHANG Y, LI H, et al. Palmatine ameliorates high fat diet induced impaired glucose tolerance[J]. *Biol Res*, 2020, 53(1):39.
- [20] TAKEI R, INOUE T, SONODA N, et al. Bilirubin reduces visceral obesity and insulin resistance by suppression of inflammatory cytokines[J]. *PLoS One*, 2019, 14(10):e0223302.
- [21] PERDICARO D J, RODRIGUEZ LANZI C, GAMBARTE TUDELA J, et al. Quercetin attenuates adipose hypertrophy, in part through activation of adipogenesis in rats fed a high-fat diet[J]. *J Nutr Biochem*, 2020, 79: 108352.
- [22] TWOHIG H, HODGES V, MITCHELL C. Prediabetes: Opportunity or overdiagnosis? [J]. *Br J Gen Pract*, 2018, 68(669):172-173.
- [23] KHETAN A K, RAJAGOPALAN S. Prediabetes [J]. *Can J Cardiol*, 2018, 34(5):615-623.
- [24] PANG B, LIAN F M, ZHAO X Y, et al. Prevention of type 2 diabetes with the traditional Chinese patent medicine: A systematic review and meta-analysis [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2017, 131:242-259.
- [25] 周梦夏. 津力达对高脂喂养诱导胰岛素抵抗 ApoE^{-/-}小鼠肝脂肪酸代谢的影响[D]. 石家庄:河北医科大学, 2015.
- [26] 陈琼. 津力达改善2型糖尿病大鼠糖脂代谢异常及胰岛素抵抗的研究[D]. 武汉:华中科技大学, 2013.
- [27] 刘妍, 李翠茹, 常丽萍, 等. 津力达颗粒对高脂饮食诱导的肥胖小鼠代谢紊乱及 FGF21/AMPK 信号通路的影响[J]. *中草药*, 2021, 52(5):1351-1359.
- [28] LIU Y, SONG A, ZANG S, et al. Jinlida reduces insulin resistance and ameliorates liver oxidative stress in high-fat fed rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 162: 244-252.
- [29] TABAK A G, HERDER C, RATHMANN W, et al. Prediabetes: A high-risk state for diabetes development [J]. *Lancet*, 2012, 379(9833):2279-2290.
- [30] SUN W, ZHANG B, YU X, et al. Oroxin A from *Oroxylum indicum* prevents the progression from prediabetes to diabetes in streptozotocin and high-fat diet induced mice[J]. *Phytomedicine*, 2018, 38:24-34.
- [31] GHABEN A L, SCHERER P E. Adipogenesis and metabolic health[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(4):242-258.
- [32] SANTILLI F, SIMEONE P G, GUAGNANO M T, et al. Effects of liraglutide on weight loss, fat distribution, and β -cell function in obese subjects with prediabetes or early type 2 diabetes[J]. *Diabetes Care*, 2017, 40(11):1556-1564.
- [33] LIU A W, SONG S O, HAYASHI T, et al. Change in CT-measured abdominal subcutaneous and visceral but not thigh fat areas predict future insulin sensitivity[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2019, 154:17-26.
- [34] WAJCHENBERG B L. Subcutaneous and visceral adipose tissue: Their relation to the metabolic syndrome [J]. *Endocr Rev*, 2000, 21(6):697-738.
- [35] JUDEX S, LUU Y K, OZCIVICI E, et al. Quantification of adiposity in small rodents using micro-CT[J]. *Methods*, 2010, 50(1):14-19.
- [36] KUNZ H E, HART C R, GRIES K J, et al. Adipose tissue macrophage populations and inflammation are associated with systemic inflammation and insulin resistance in obesity [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2021, 321(1):E105-E121.
- [37] BOUTENS L, HOOIVELD G J, DHINGRA S, et al. Unique metabolic activation of adipose tissue macrophages in obesity promotes inflammatory responses[J]. *Diabetologia*, 2018, 61(4):942-953.
- [38] LINDHORST A, RAULIEN N, WIEGHOFER P, et al. Adipocyte death triggers a pro-inflammatory response and induces metabolic activation of resident macrophages[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(6):579.
- [39] SON M, WU J. Egg white hydrolysate and peptide reverse insulin resistance associated with tumor necrosis factor- α (TNF- α) stimulated mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in skeletal muscle cells[J]. *Eur J Nutr*, 2019, 58(5):1961-1969.
- [40] BU L, CAO X, ZHANG Z, et al. Decreased secretion of tumor necrosis factor- α attenuates macrophage-induced insulin resistance in skeletal muscle[J]. *Life Sci*, 2020, 244:117304.

[责任编辑 孙丛丛]