

解毒扶阳方对 2 型糖尿病大鼠炎症因子的影响

黄江荣¹,李永发¹,杜亚明¹,黄蔚²,李祥华^{1*}

(1. 长江大学医学院,湖北 荆州 434023; 2. 荆州市中医医院,湖北 荆州 434000)

[摘要] 目的:探讨解毒扶阳方对 2 型糖尿病(T2DM)模型大鼠炎症因子的调节作用。方法:取雄性大鼠,随机分为正常对照组,高脂高糖模型(模型)组,模型+二甲双胍(降糖)组,模型+解毒扶阳(试药)高、中、低剂量组,共 6 组,除正常对照组外,其他各组按 60 mg·kg⁻¹剂量尾静脉一次性快速注射链脲佐菌素制备动物模型,并于模型制作当日各给药组大鼠分别 ig 给予药物治疗,每日 1 次,连续 12 周。每 10 d 称量各组动物体重 1 次;给药最后 1 d 取血测定空腹血糖;取血清采用酶联免疫吸附分析方法测定血清瘦素(LEP)、胰岛素(INS)、白细胞介素(IL)-1、IL-6、C-反应蛋白(CRP)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)水平,计算胰岛素敏感指数(ISI)。结果:实验结果显示,解毒扶阳方与模型组比较,低剂量组有显著差异。血清 LEP 与模型组比较,试药 3 个剂量组均显示有非常显著的差异。ISI 与模型对照组比较,3 个剂量组均有非常显著性的差异。与模型组比较,中剂量组 IL-1 具有显著差异,高剂量组具有非常显著性差异。解毒扶阳方对 TNF-α 含量有降低作用,与模型组比较,高、中、低 3 个剂量组均有非常显著差异。结果表明,对 CRP 也有调节作用,与模型组比较,高、中、低 3 个剂量组均具有非常显著的差异。结论:解毒扶阳方对 T2DM 所致血糖、LEP、INS、IL-1、IL-6、CRP、TNF-α 含量升高,均有一定调节作用,使之降到正常或接近正常水平。提示解毒扶阳方对 T2DM 所致炎症因子含量升高以及糖代谢紊乱,有调节作用。

[关键词] 2 型糖尿病;解毒扶阳方;炎症因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0214-04

[doi] 10.11653/syfy2013240214

[收稿日期] 20130411(016)

[基金项目] 湖北省卫生厅青年科技人才项目(QJX2012-20);荆州市医疗卫生科技发展计划项目(荆州技发[2012]16号)

[第一作者] 黄江荣,博士,副教授,从事中医药防治内分泌与代谢性疾病研究,Tel:0716-8061435,E-Mail:hjiangrong@126.com

[通讯作者] *李祥华,教授,从事中药对平滑肌的影响研究,Tel:0716-8062624,E-mail:yangtzeu_lxh@163.com

- [3] Miura T, Ichiki H, Iwamoto N, et al. Antidiabetic activity of the Rhizoma of *Anemarrhena asphodeloides* and active components, mangiferin and its glucoside [J]. Biol Pharm Bull, 24(9):1009.
- [4] 杨丽蓉. 知母的化学成分及药理作用研究进展[J]. 国外医学:中医中药分册, 2002, 24(4):207.
- [5] 徐建中, 陆敏, 日照格图, 等. 知母甙元 ZMS 对老龄大鼠学习、记忆的影响[J]. 中药药理与临床, 1995, 1(3):18.
- [6] 胡宇弛, 侯家玉. 知母、黄芪对小鼠实验性心肌肥厚及应激反应能力的影响[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(4):369.
- [7] 贾天柱. 中药炮制学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2008:196.
- [8] 高慧. 盐知母炮制原理研究[D]. 沈阳:辽宁中医药大学, 2010.
- [9] 杨梅香, 杨勇, 乔亭祥, 等. 龟板对“甲亢型阴虚证”大鼠的影响[J]. 中药药理与临床, 1987, 4(4):7.
- [10] 任汉阳, 薛春苗, 张瑜, 等. 黄精粗多糖对温热药致阴虚模型小鼠滋阴作用的实验研究[J]. 山东中医杂志, 2005, 24(1):36.
- [11] 陈奇. 中药药理实验方法[M]. 北京:人民卫生出版社, 2006:215.
- [12] 曲琰. 椴制人参炮制工艺研究[D]. 沈阳:辽宁中医药大学, 2008.
- [13] 刘婷, 侯连兵, 钟延松. 因宁片对甲状腺片诱导的甲亢阴虚型大鼠的影响研究[J]. 中草药, 2009, 28(11):1450.
- [14] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2002:1509.

[责任编辑 聂淑琴]

Effects of Jiedu Fuyang Fang on Inflammatory Factors in Type 2 Diabetic Rats

HUANG Jiang-rong¹, LI Yong-fa¹, DU Ya-ming¹, HUANG Wei², LI Xang-hua^{1*}

(1. Medical School of Yangtze University, Jingzhou 434023, China;

2. Jingzhou City Hospital of Traditional Chinese Medicine, Jingzhou 434000, China)

[**Abstract**] **Objective:** To study the effect of Jiedu Fuyang Fang on inflammatory factors in type 2 in diabetes mellitus (T2DM) rats. **Method:** The rat T2DM model was established by feeding of high fat and sugar diet and the intravenous injection of 60 mg·kg⁻¹ streptozotocin (STZ). The corresponding drugs were given for 12 weeks. The serum was collected for the determination of leptin (LEP) pigment, and insulin (INS), and white cell between pigment interleukin (IL)-1, and IL-6, and C-reactive protein (CRP), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) level, insulin sensitive index (ISI) was calculated. **Result:** Jiedu Fuyang Fang decreased inflammatory cytokines like IL-1, IL-6, CRP, TNF- α level, blood sugar, insulin and leptin content, and ISI. **Conclusion:** Jiedu Fuyang Fang has a impact on inflammatory factors in T2DM rise and regulate disorders of glucose metabolism.

[**Key words**] type 2 diabetes mellitus; Jiedu Fuyang Fang; inflammatory cytokines

最新研究显示,全球成年糖尿病患者人数已接近3.5亿,其中,2型糖尿病即非胰岛素依赖型糖尿病占糖尿病患者的90%以上^[1],且糖尿病不再是富贵病,已经成为全球性难题,给公共卫生带来了沉重的负担。胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)和胰岛素分泌不足是2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)发病的两个关键因素^[2],但其机制尚未明了。近年来炎症学说备受关注,认为T2DM是一种先天性免疫和低度慢性炎症性疾病^[3]。在T2DM的易感个体,随着老龄化和营养过剩等环境因素的作用,先天性免疫系统被激活,巨噬细胞、脂肪细胞等前哨细胞分泌C反应蛋白(C reactive protein, CRP)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素(IL)-1、IL-6等多种炎症因子,进而引起IR、胰岛素分泌功能障碍和代谢综合征的发生。由于T2DM严重威胁人类的健康,临床使用的各类降糖西药因不良反应和依从性差,使其应用受到一定局限。从中医药中寻找安全、有效、作用全面的中药方剂前景可观。本文在临床应用有效的基础上^[4],结合中医理论及现代医学“炎症学说”的认识,从理论上探讨解毒扶阳方治疗T2DM的作用机制。

1 材料

1.1 药物 解毒扶阳方由金银花12g,翻白草15g,黄连6g,淫羊藿15g,锁阳15g,巴戟天12g,甘草6g组成,经由荆州市药品监督管理局刘以民副主任药师鉴定,金银花为忍冬科多年生半常绿缠

绕性木质藤本植物 *Lonicera japonica* 的干燥花蕾,翻白草为蔷薇科植物 *Potentilla discolor* 的全草,黄连为毛茛科多年生草本植物 *Coptis chinensis* 的干燥根茎,淫羊藿为小檗科多年生草本植物 *Epimedium brevicornum* 的干燥地上部分,锁阳为多年生肉质寄生草本植物 *Cynomorium songaricum* 的干燥肉质茎,巴戟天为茜草科多年生藤本植物 *Morinda officinalis* 的根,甘草为豆科多年生草本植物 *Glycyrrhiza uralensis* 的干燥根及根茎,均为正品。其制剂由荆州市中医医院中药制剂室提供。将该方加8倍量的水浸泡30min后,煎煮40min,过滤,滤液另器保存,药渣再加6倍量水煎煮30min,过滤,将2次滤液合并,置于100℃水浴浓缩至1mL相当于原生药量的6g,如上浓缩药液置4℃冰箱中备用。

1.2 动物 SPF级Wistar雄性大鼠,体重(220±10)g,购自湖北省实验动物中心,实验动物质量合格证号4200600603。实验动物许可证号SCXK(鄂)2008-0005。

1.3 药品试剂 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ,美国Sigma公司,批号SLBB7526V)。胰岛素(insulin, INS),瘦素(leptin, LEP),白细胞介素(IL)-1, IL-6, 肿瘤坏死因子- α (TNF- α), C-反应蛋白(CRP)酶联免疫试剂盒(均为自美国R&D公司,批号201212)。二甲双胍(中美上海施贵宝制药有限公司,批号1109124)。

1.4 仪器 LD4-8离心机(北京医用离心机厂);

Leica DMLB2 电子显微照相机(德国); ThermoLabsystems Multiskan MK3 酶标分析仪(芬兰); VEX380 型-80℃低温冰箱(日本)。

2 方法

2.1 动物分组及模型制备^[5] 取雄性大鼠,随机分为正常对照组,高脂高糖模型(模型)组,模型+二甲双胍(降糖)组,模型+解毒扶阳(试药)高、中、低剂量组,共6组,除正常对照组外,其他各组按60 mg·kg⁻¹剂量尾静脉快速1次性注射STZ制备动物模型,并检查血糖,符合造模标准的可选为实验动物。均以高脂(49%猪油)高糖(10%食用糖)饲料(由长江大学实验动物中心配制)喂养,各组并饮用蒸馏水,连续喂养12周。并于模型制作当日各给药组大鼠分别ig给予药物治疗,每日1次,连续12周,其中降糖组给予二甲双胍670 mg·kg⁻¹,试药高剂量组给予解毒扶阳浓缩液18,12,6 g·kg⁻¹。正常对照组、模型组给予同样量的生理盐水。

2.2 血糖、血清胰岛素、瘦素的测定及胰岛素敏感指数的计算 于末次给药后1h,20%乌拉坦5 mL·kg⁻¹ ip麻醉大鼠,立即分离颈动脉取血8 mL,静置2 h,以3 000 r·min⁻¹的速度离心15 min,取血清,将血清冻存管中,-70℃冻存备用,以检测血糖、血清胰岛素、瘦素,计算胰岛素敏感指数(insulin sensitive index,ISI),(ISI=1/空腹葡萄糖×空腹胰岛素)。

2.3 血清IL-1,IL-6,TNF-α,CRP的测定 于末次给药后1h,20%乌拉坦5 mL·kg⁻¹ ip麻醉大鼠,立即分离颈动脉取血8 mL,静置2 h,以3 000 r·min⁻¹的速度离心15 min,取血清,备用。血清IL-1,IL-6,TNF-α和CRP酶联免疫分析按照试剂盒,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)方法,应用双抗体夹心法测定标本中大鼠IL-1,IL-6,TNF-α,CRP含量。用酶标仪在450 nm波长下测定吸光度(A)。各步骤严格

按照说明书操作。

2.4 统计学处理 所得数据经统计学软件SPSS 13.0进行分析。各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料样本均数间多重比较用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对T2MD大鼠血糖、血清胰岛素、胰岛素敏感指数的影响 与正常组比较,模型组GLU、INS、LEP均有显著差异($P < 0.01$),说明造模成功。与模型组比较,解毒扶阳方低剂量组有显著差异($P < 0.05$),高、中剂量组均有非常显著差异($P < 0.01$)。血清瘦素与正常对照组比较,中、低剂量组有显著性差异($P < 0.05$),高剂量组有非常显著性差异($P < 0.01$);与模型组比较,试药3个剂量组均显示有非常显著的差异($P < 0.01$)。胰岛素敏感指数与正常对照组比较,除低剂量组有显著性差异($P < 0.05$)外,其他各组均无显著差异;与模型对照组比较,解毒扶阳方3个剂量组均有非常显著性的差异($P < 0.01$)。见表1。

3.2 对T2MD大鼠血清IL-1,IL-6,TNF-α,CRP含量的影响 与正常组比较,模型组IL-1,IL-6,TNF-α,CRP值均有显著差异($P < 0.01$),说明造模成功。解毒扶阳方不同剂量,对由T2DM所致IL-1,IL-6的升高,均有调节作用。与模型组比较,中剂量组IL-1具有显著差异($P < 0.05$),高剂量组具有非常显著性差异($P < 0.01$)。解毒扶阳方对TNF-α含量有降低作用,与正常对照组比较,低剂量组有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,高、中、低3个剂量组均有非常显著差异($P < 0.01$)。结果表明,对CRP也有调节作用,与正常组比较,低剂量组有显著差异($P < 0.05$);与模型组比较,高、中、低3个剂量组均具有非常显著的差异($P < 0.01$)。见表2。

表1 解毒扶阳方对T2MD大鼠血糖、血清胰岛素、胰岛素敏感指数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	GLU/mmol·L ⁻¹	INS/mU·L ⁻¹	LEP/mU·L ⁻¹	ISI
正常对照	-	8.66 ± 1.79	0.68 ± 0.32	0.52 ± 0.10	0.028 2 ± 0.009 1
模型	-	10.48 ± 1.73 ¹⁾	0.93 ± 0.36 ²⁾	0.83 ± 0.18 ²⁾	0.002 1 ± 0.001 0 ²⁾
二甲双胍	0.670	9.95 ± 2.01	0.67 ± 0.22 ⁴⁾	0.39 ± 0.11 ^{2,4)}	0.013 8 ± 0.004 3
解毒扶阳方	6	8.82 ± 1.23 ³⁾	0.69 ± 0.14 ⁴⁾	0.41 ± 0.15 ^{1,4)}	0.017 6 ± 0.003 2 ^{1,4)}
	12	8.43 ± 0.95 ⁴⁾	0.67 ± 0.11 ⁴⁾	0.40 ± 0.09 ^{1,4)}	0.025 2 ± 0.002 6 ⁴⁾
	18	8.35 ± 1.21 ⁴⁾	0.63 ± 0.13 ⁴⁾	0.32 ± 0.12 ^{2,4)}	0.028 0 ± 0.003 6 ⁴⁾

注:与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表2同)。

表2 解毒扶阳方对T2MD大鼠血清IL-1,IL-6,TNF- α ,CRP的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-1/pg·L ⁻¹	IL-6/pg·L ⁻¹	TNF- α /pg·L ⁻¹	CRP/mg·L ⁻¹
正常对照	-	93.12 ± 22.12	91.23 ± 21.65	0.75 ± 0.15	4.57 ± 0.85
模型	-	126.51 ± 21.43 ²⁾	132.11 ± 22.23 ²⁾	1.87 ± 0.22 ²⁾	10.53 ± 0.65 ²⁾
二甲双胍	0.670	112.60 ± 19.55 ^{1,3)}	116.32 ± 13.02 ⁴⁾	0.90 ± 0.25 ^{1,4)}	6.35 ± 0.69 ^{1,4)}
解毒扶阳	6	119.33 ± 20.17 ¹⁾	110.21 ± 10.97 ^{1,3)}	0.87 ± 0.22 ^{1,4)}	6.23 ± 0.76 ^{1,4)}
	12	105.83 ± 15.76 ^{1,3)}	98.76 ± 16.54 ⁴⁾	0.84 ± 0.30 ⁴⁾	5.56 ± 0.53 ⁴⁾
	18	98.52 ± 12.58 ⁴⁾	92.87 ± 17.23 ⁴⁾	0.76 ± 0.25 ⁴⁾	4.76 ± 0.65 ⁴⁾

4 讨论

“炎症与2型糖尿病”已成为全球内分泌学者共同关注的热点^[6]。IL-1,IL-6,IL-10,TNF- α ,CRP作为最具代表性的细胞因子,在炎症和免疫反应中起核心调节作用^[7]。炎症因子的长期过度分泌,可能是导致胰岛 β 细胞分泌胰岛素功能受损及产生IR的主要因素^[8]。有研究发现糖尿病前期患者血清IL-6,TNF- α 和超敏C反应蛋白(HsCRP)增高。有研究也证实了2型糖尿病大鼠存在着慢性炎症状态,其血清CRP,IL-1,IL-6,TNF- α 等炎症因子异常表达^[9]。干预炎症过程、改善IR将成为治疗糖尿病和动脉硬化、代谢综合征等炎症性疾病的切入点。

血糖控制不良的T2DM型糖尿病患者的胰岛 β 细胞可表达IL-1,IL-1可介导葡萄糖诱导的核因子- κ B的活性增加及Fas的表达,进而致胰岛 β 细胞凋亡。此外,IL-1还可通过诱导氮氧化物(NO)的形成,对 β 细胞起到破坏作用。本实验结果表明,解毒扶阳方对T2DM所引起的IL-1升高有降低作用。

IL-6,TNF- α 来源于巨噬细胞、脂肪细胞或内皮细胞,是多功能炎性细胞因子,参与机体免疫反应和炎症反应。IL-6通过刺激Fas基因转录,诱导 β 细胞凋亡,还可与其他细胞因子共同作用,对 β 细胞产生细胞毒作用。TNF- α 可通过调节 β 细胞的胰岛素信号通路,促进T2DM的发展。TNF- α 通过损伤胰岛素信号通路,影响 β 细胞的生长和增殖,对T2DM的发展起重要作用。本实验结果表明,解毒扶阳方对IL-6和TNF- α 的升高均有一定的调节作用。

CRP是机体组织受到各种损伤或炎症刺激后肝脏产生的一种急性期蛋白,被认为是预测T2DM发病的危险因子^[10]。本实验结果表明,解毒扶阳方对CRP的升高也有显著的抑制作用。

在笔者的研究中发现,解毒扶阳方存在剂量差异。结果显示其治疗作用与剂量密切相关,剂量大比剂量小的效果好。提示在用本方治疗时用药剂量

也是需要考虑的因素。

综上所述,解毒扶阳方对T2DM中炎症标志物,如IL-1,IL-6,TNF- α 和CRP等的增高均有调节作用,说明解毒扶阳方治疗T2DM,调节炎症因子可能是其重要原因之一。

[参考文献]

- [1] Tobias M. Global control of diabetes: information for action[J]. Lancet,2011, 378 (9785):3.
- [2] Srinivasan B T, Jarvis J, Khunti K, et al. Recent advances in the management of type 2 diabetes mellitus a review[J]. Postgrad Med J, 2008, 84(996):524.
- [3] Carvalho M H, Colaco A L, Fortes Z B. Cytokines, endothelial dysfunction, and insulin resistance [J]. Arq Bras Endocrinol Metabol, 2006, 50(2):304.
- [4] 黄江荣,黄蔚,黄祥武运用解毒扶阳法治疗2型糖尿病经验[J]. 湖北中医杂志,2013,35(2):38.
- [5] 徐叔云,卞如谦,陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社,2003:1519.
- [6] De Muynck L, Van Damme P. Cellular effects of progranulin in health and disease[J]. J Mol Neurosci, 2011,45(3):549.
- [7] Kern P A, Ranganathan S, Li C, et al. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001,280(5):745.
- [8] Carey A L, Lamont B, Andropoulos S, et al. Interleukin6 gene expression is increased in insulin resistant rat skeletal muscle following insulin stimulation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 302(4):837.
- [9] 陈利平,朱章志,刘梅. 健脾益气方对脾气虚证2型糖尿病大鼠血清炎症因子的影响[J]. 中药新药与临床药理,2009,20(1):36.
- [10] 邹大进,李慧. 肥胖、炎症与胰岛素抵抗[J]. 国外医学:内分泌分册,2004,24(4):附录2.

[责任编辑 聂淑琴]