

清润方对糖尿病大鼠炎症反应及氧化应激的影响

付莹坤,倪青,林兰*

(中国中医科学院广安门医院,北京 100053)

[摘要] 目的:研究清润方对 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)大鼠氧化应激及炎症反应的影响。方法:采用尾静脉注射链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)加高糖高脂饲料饲养建立大鼠 T2DM 模型,将大鼠随机分为空白对照组、模型组、清润方大、中、小剂量组(0.5, 1, 2 g·kg⁻¹·d⁻¹)、二甲双胍组(150 mg·kg⁻¹·d⁻¹),各治疗组分别 ig 给予相应药物治疗。干预治疗 4 周后检测各组大鼠空腹血糖(FBG)、血清胰岛素水平;肝脏组织丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性;血清白细胞介素 6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α(TNF-α)含量,观察清润方对糖尿病大鼠氧化应激及炎症反应的影响。结果:与模型组比较,清润方各剂量组 TNF-α 水平降低($P < 0.05$),中、小剂量组 IL-6 水平、肝脏 MDA 含量降低($P < 0.05$);中、大剂量组肝脏组织的 SOD 活性提高($P < 0.05$)。结论:清润方对糖尿病大鼠的抗氧化应激及减轻炎症反应作用可能是其发挥治疗作用的机制。

[关键词] 清润方;糖尿病大鼠;氧化应激;炎症反应

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)07-0202-04

Effect of Qingrun Formula on Inflammation and Oxidative Stress in Rat with Diabetes Mellitus

FU Ying-kun, NI Qing, LIN Lan*

(Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Qingrun formula on inflammation and oxidative stress of rat with diabetes mellitus. **Method:** The rats with diabetes mellitus were induced by intraperitoneal injection of streptozotocin and feeding with high sugar and high fat for 4 weeks. Rats with diabetes were randomly divided into five groups, three Qingrun formula groups, metformin group and model group. Other ten normal rats were made as control group. After 4 weeks, fasting blood-glucose and fasting insulin, level of serum tumor necrosis factor-α (TNF-α) and interleukin-6 (IL-6) of rats, the values of malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) were tested when the experiment finished. **Result:** Compared with the model group, the levels of TNF-α were decreased in the three Qingrun formula dosage groups ($P < 0.05$); the contents of IL-6 and MDA were decreased in the low and middle dosage groups ($P < 0.05$); the activity of SOD were increased in the middle and high dosage groups ($P < 0.05$). **Conclusion:** Qingrun formula has improvement effect on blood sugar level in rats with type 2 diabetes mellitus, which may be related to decreasing levels of cytokines and inhibit oxidative stress of the liver in rats with type 2 diabetic.

[Key words] Qingrun formula; rat with diabetes mellitus; oxidative stress; inflammation

[收稿日期] 20120224(002)

[基金项目] 北京市科技计划项目(D08050703020802)

[第一作者] 付莹坤,博士,从事中医药防治糖尿病研究, Tel: 64014411, E-mail: fyk0317@126.com

[通讯作者] *林兰,教授,从事中医药防治内分泌疾病研究, Tel: 83123311, E-mail: linlan05@163.com

目前我国糖尿病患者人数逐年增加,据 2010 年的最新统计,我国糖尿病患者人数已达 9 200 万,还有 1.48 亿患者属糖尿病前期,已经超越印度成为全球糖尿病患者人数最多的国家^[1]。虽然糖尿病的发病机制尚未完全阐明,但因为氧化应激、微炎症反应与糖尿病发病密切相关,已成为糖尿病防治研究中的热点。本文中的清润方(由黄柏、酒大黄、知母等组

成)乃中国中医科学院广安门医院林兰教授历经40余年临床与科研创立的糖尿病中医三型辨证中阴虚热盛型的适用方,以滋阴清热法治疗糖尿病早期阴虚热盛患者临床疗效显著^[2]。本研究旨在观察清润方对糖尿病大鼠的治疗作用,并从炎症反应和氧化应激的角度分析其作用机制。

1 材料

1.1 动物 健康清洁级雄性SD大鼠90只,体重(200±20)g。购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2006-0009。

1.2 药物 清润方颗粒剂5g/袋,主要由黄柏、酒大黄、知母等药材组成,北京三九药业有限公司生产(批号0908021);盐酸二甲双胍片,0.5g/片,中美上海施贵宝有限公司生产(批号1104094)。

1.3 试剂 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ),购自Sigma公司(批号B57218);血糖仪,血糖试纸,德国罗氏诊断有限公司;¹²⁵I胰岛素放射免疫分析药盒,北京市华埠力特生物技术研究所。MDA测试盒(批号20111102),SOD测试盒(批号20111108),均为南京建成生物工程研究所;白细胞介素-6(IL-6,美国R&D),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)ELISA试剂盒,北京晶美生物工程公司。

1.4 仪器 Sn-69513型免疫计数器(上海核所日环光电仪器有限公司),HITACHI7080全自动生化分析仪(日本日立),80-2型低速离心机(上海手术器械厂),SK-1混匀器(常州国华电器有限公司),UNICO 7200分光光度计[尤尼柯(上海)仪器有限公司]。

2 方法

2.1 动物模型的制备与分组 大鼠标准饲料适应性喂养1周后,随机选出10只大鼠标准饲料喂养,自由进食、进水作为正常组,标准饲料由中国中医科学院中医基础理论研究所实验动物中心提供。剩余的80只大鼠按30 mg·kg⁻¹剂量尾静脉注射1%链脲佐菌素溶液诱导糖尿病,72 h后尾静脉取血,血糖仪测定随机血糖,以大于16.7 mmol·L⁻¹作为模型成功大鼠。根据血糖选取60只造模成功大鼠随机分为模型组、清润方小剂量组、清润方中剂量组、清润方大剂量组、二甲双胍组,高脂高糖饲料喂养(蔗糖20%,猪油18%,蛋黄3%,基础饲料59%)。

2.2 动物处理 清润方小、中、大剂量组分别按照0.5,1,2 g·kg⁻¹·d⁻¹ig清润方颗粒剂混悬液;二甲双胍组按150 mg·kg⁻¹·d⁻¹的剂量给大鼠ig二甲双胍混悬液;正常组和模型组每日以生理盐水溶液ig;

每天给药1次,连续给药4周。

2.3 标本收集 大鼠治疗4周后处死取样,血清封存-80℃冰箱,用于检测各项指标。取血后,各组随机选取6只大鼠剥离出完整肝脏组织,用预冷生理盐水洗净血液,滤纸吸干组织表面水分,再用无菌锡箔纸包裹后置于液氮中冷冻,保存于-70℃冰箱中。

2.4 观察指标及测定方法

2.4.1 体重及一般状况 观察大鼠的食欲,运动状态,毛发及死亡情况。

2.4.2 检测指标 葡萄糖氧化酶法测定空腹血糖(FBG)、放免法测定血清胰岛素水平、用酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA)的方法检测各组大鼠血清IL-6和TNF- α 的水平、黄嘌呤氧化酶法(羟胺法)测定肝脏组织SOD活力、硫代巴比妥酸比色法测定肝脏组织中MDA水平。

2.5 统计学方法 数据采用SPSS 18.0统计软件分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较用方差分析,两两比较方差齐时用LSD检验,方差不齐时用Dunnett's T₃检验, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

3 结果

3.1 一般状态观察 正常组大鼠状态良好,活动正常,反应灵敏,动作敏捷,毛色有光泽;糖尿病大鼠在造模后的第2天出现明显的多饮、多食及多尿症状,活动减少,动作迟缓,被毛不光洁。

3.2 血糖及血清胰岛素水平 与正常组比较,造模组大鼠FBG明显升高,与模型组比较,清润方中、大剂量有降低糖尿病大鼠FBG作用($P < 0.05$),二甲双胍组降糖作用略强于清润方各组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。模型组大鼠血清胰岛素水平升高,与模型组比较,清润方小、中剂量能有效降低糖尿病大鼠的血清胰岛素水平,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

表1 清润方对糖尿病大鼠FBG、血清胰岛素水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	FBG /mmol·L ⁻¹	血清胰岛素水平 /mU·L ⁻¹
正常	-	8.27 ± 1.10	15.22 ± 1.76
模型	-	22.53 ± 0.86 ¹⁾	17.98 ± 1.08 ¹⁾
清润方	0.5	22.04 ± 1.01 ^{1,3)}	14.99 ± 1.71 ²⁾
	1.0	21.81 ± 1.26 ^{1,2,3)}	13.78 ± 1.89 ^{1,2,3)}
	2.0	20.09 ± 1.35 ^{1,2)}	18.78 ± 1.08 ^{1,3)}
二甲双胍	0.15	20.61 ± 1.71 ^{1,2)}	15.54 ± 1.87 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$;与二甲双胍组比较³⁾ $P < 0.05$ (表2~3同)。

3.3 对炎症反应的影响 与正常组比较,模型组大鼠 IL-6, TNF- α 水平明显升高,清润方小、中、大剂量及二甲双胍均有降低糖尿病大鼠 IL-6, TNF- α 水平的作用,但清润方中剂量组 IL-6 水平与模型组比较无统计学差异。见表 2。

表 2 清润方对血清 IL-6 和 TNF- α 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$) $\text{pg} \cdot \text{mg}^{-1}$

组别	剂量 $/\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	IL-6	TNF- α
正常	-	37.45 \pm 5.51	17.21 \pm 4.19
模型	-	96.08 \pm 31.65 ¹⁾	44.55 \pm 4.68 ¹⁾
清润方	0.5	55.67 \pm 8.36 ²⁾	26.33 \pm 5.37 ^{1,2)}
	1.0	78.02 \pm 14.05 ^{1,3)}	35.46 \pm 9.20 ^{1,2)}
	2.0	69.91 \pm 11.12 ^{1,2)}	32.42 \pm 9.11 ^{1,2)}
二甲双胍	0.15	52.66 \pm 9.61 ²⁾	29.37 \pm 7.23 ^{1,2)}

3.4 对氧化应激的影响 与正常组比较,模型组大鼠 MDA 水平升高 ($P < 0.05$)、SOD 活性降低,但无显著性差异;与模型组比较,清润方小、中、大剂量及二甲双胍均有降低 MDA 水平的作用 ($P < 0.05$),清润方中、大剂量有增强糖尿病大鼠 SOD 活性的作用 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 清润方对肝组织 MDA 水平及 SOD 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 $/\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	MDA $/\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$	SOD $/\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$
正常	-	0.56 \pm 0.04	144.46 \pm 6.59
模型	-	0.61 \pm 0.05 ¹⁾	139.53 \pm 6.22
清润方	0.6	0.45 \pm 0.05 ^{1,2,3)}	143.33 \pm 5.20
	1.0	0.49 \pm 0.06 ^{1,2)}	156.84 \pm 5.62 ^{1,2)}
	2.0	0.57 \pm 0.05 ³⁾	157.47 \pm 5.41 ^{1,2,3)}
二甲双胍	0.15	0.49 \pm 0.04 ^{1,2)}	138.73 \pm 5.55 ¹⁾

4 讨论

有文献报道大鼠尾静脉大剂量 ($> 45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 注射 STZ 将导致对胰腺 β 细胞的严重损伤,模型接近 1 型糖尿病^[3]。运用高糖高脂饲料导致胰岛素抵抗同时给予小剂量的 STZ 导致胰岛素分泌的中度损伤造成的糖尿病大鼠模型特点更像 2 型糖尿病^[6]。本研究根据文献报道及前期的预实验结果^[4],采用 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量尾静脉注射 1% 链脲佐菌素溶液辅以高糖高脂饲料诱导 2 型糖尿病,较之普遍采用的腹腔注射链脲佐菌素造模的方法对造模者的技术要求更高,操作难度加大,但此种方法一次成模,大鼠间的均一性更好,能够提供理想的糖尿病大鼠模型。

2 型糖尿病是一种低度炎症反应性疾病^[5],高血糖也可能通过诱导如单核细胞、脂肪细胞等多种细胞分泌细胞因子而促进炎性反应^[6]。细胞因子介导的炎症反应在胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞损伤的发生过程中起至关重要的作用。生理情况下,胰岛素信号转导过程需要胰岛素受体底物的酪氨酸磷酸化。炎性因子(如 IL-6, TNF- α) 激活的一系列酶会阻碍胰岛素受体底物正常的酪氨酸磷酸化,从而干扰胰岛素信号通路的下传,引起胰岛素抵抗。炎性因子还作用于胰岛素受体底物,使其丝氨酸、苏氨酸磷酸化后加速胰岛素受体底物的降解,促进胰岛 β 细胞的凋亡。另外,炎性反应还可触发氧化应激,导致胰岛 β 细胞的凋亡。炎性因子 IL-6 和 TNF- α 有引发胰岛素抵抗的共同作用机制,即通过干扰胰岛素的生物信号传导来抑制其生物学作用和通过影响 GLUT-4 的合成来降低葡萄糖转运功能^[7]。本研究中清润方及二甲双胍都显示了在降低糖尿病大鼠血清 IL-6 和 TNF- α 水平的作用,对糖尿病大鼠低度炎症的治疗作用可能是清润方改善胰岛素抵抗降低血糖的作用机制之一。

氧化应激是指体内活性氧(ROS)的产生和抗氧化防御体系之间失衡,而导致组织损伤的一种状态。在正常生理条件下,氧化应激产生的 ROS,能迅速被体内抗氧化系统如超氧化物歧化酶所清除,但高血糖引起血管内皮细胞线粒体的 ROS 生成过多,使细胞中氧化应激反应过剧。SOD 作为机体主要抗氧化剂之一,普遍存在于有代谢的细胞中。研究已证实 2 型糖尿病患者体内 SOD 存在代谢失常而导致抗过氧化能力减弱,自由基生成增多^[8]。由于抗氧化能力下降,氧自由基通过与细胞膜不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应,破坏细胞的结构与功能,并同时形成 MDA。MDA 作为其代谢终末产物成为测定脂质过氧化物方便而敏感的指标,MDA 的含量可以间接地反映体内氧自由基的量。肝脏组织作为药物代谢的主要场所,测定肝脏组织的 MDA 和 SOD 可反映药物对机体氧化应激程度的影响。本研究中清润方(小、中剂量)及二甲双胍均有降低 MDA 水平的作用,清润方(中、大剂量)能够提高糖尿病大鼠肝脏组织的 SOD 活性。

综上所述,清润方对糖尿病大鼠的微炎症状态及氧化应激有积极的治疗作用,可能是其降低糖尿病大鼠血糖改善胰岛素抵抗的作用机制之一,但不同剂量对特定指标的作用不尽一致,与剂量并没有正相关关系,究竟是何原因造成此种结果还有待进

甘松对动物行为绝望模型的影响

武姣姣¹, 石晋丽^{1*}, 唐民科¹, 赵保胜¹, 郭建友², 游杰舒¹

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 中国科学院心理研究所, 北京 100101)

[摘要] 目的: 观察甘松95%乙醇提取物及其不同极性部位对动物行为绝望模型的影响。方法: ICR小鼠, 雌雄兼用, 分为两批, 每批均设正常组和5个治疗组。第1批, 治疗组连续10 d, ig给予甘松95%乙醇提取物(14.7, 29.3, 48.8, 146.5 mg·kg⁻¹)和阳性药氢溴酸西酞普兰(10.0 mg·kg⁻¹); 第2批, 治疗组连续10 d, ig给予甘松的4个极性部位(均为48.8 mg·kg⁻¹)和阳性药氢溴酸西酞普兰(10.0 mg·kg⁻¹)。末次给药后1 h, 用小鼠悬尾及强迫游泳实验进行行为学观察。结果: 甘松95%乙醇提取物(29.3, 48.8, 146.5 mg·kg⁻¹)能显著降低小鼠悬尾不动时间及强迫游泳不动时间($P < 0.05$)。在甘松4个极性部位中, 乙酸乙酯部位与正丁醇部位均能显著降低小鼠悬尾不动时间及强迫游泳不动时间($P < 0.05$)。结论: 甘松95%乙醇提取物有一定的抗实验性抑郁的作用, 其活性部位可能为乙酸乙酯部位与正丁醇部位。

[关键词] 甘松; 抗抑郁; 悬尾实验; 强迫游泳实验

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)07-0205-03

Effects of Nardostachyos Radix et Rhizoma on the Despair Animal Models

WU Jiao-jiao¹, SHI Jin-li^{1*}, TANG Min-ke¹, ZHAO Bao-sheng¹, GUO Jian-you², YOU Jie-shu¹

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. Institute of Psychology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of ethanol extract and its four fractions from Nardostachyos Radix et Rhizoma on the despair animal models of depression. **Method:** ICR mice were divided into two batches,

[收稿日期] 20111128(003)

[基金项目] “重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09103-381); 国家科技基础条件平台工作项目(2005DKA21000)

[第一作者] 武姣姣, 在读硕士研究生, 从事中药药效物质基础与中药新药源的开发利用研究; E-mail: underbigtree@sina.com

[通讯作者] *石晋丽, 教授, E-mail: shijl@vip.sina.com

进一步的深化研究。

[参考文献]

[1] Wenying Yang, Juming Lu, Jianping Weng, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China [J]. N Engl J Med, 2010, 362(12): 1090.

[2] 林兰. 现代中医糖尿病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008, 729.

[3] Rerup C C. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells[J]. Pharmacol Rev, 1970, 22(4): 485.

[4] Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, et al. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological

screening[J]. Pharmacol Res 2005, 52(4): 313.

[5] 李秀钧, 邬云红. 糖尿病是一种炎性反应性疾病? [J]. 中华内分泌代谢杂志, 2003, 19(4): 251.

[6] 李宏亮, 余叶蓉. 2型糖尿病患者血管内皮细胞功能异常及其机理研究[J]. 中华糖尿病杂志, 2004, 12(2): 146.

[7] Senn J J, Klover P J, Nowak I A, et al. Interleukin induces cellular insulin resistance in hepatocytes [J]. Diabetes, 2002, 51(12): 3391.

[8] Djordjevic A, Spasic S, Jovanovic-Galovic A, et al. Oxidative stress in diabetic pregnancy: SOD, CAT and GSH-Px activity and lipid peroxidation products [J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2004, 16(6): 367.

[责任编辑 聂淑琴]