

黄连解毒汤对糖尿病大鼠肝脏核因子- B、 肿瘤坏死因子- 表达的影响

陈红, 孙明杰, 彭娟, 黄颖, 周艳华, 于友华*
(中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700)

[摘要] 目的: 研究黄连解毒汤对糖尿病大鼠肝脏核转录因子- B(NF- B), 肿瘤坏死因子- (TNF-) 表达的影响, 探讨黄连解毒汤治疗糖尿病的机制。方法: 实验采用高脂饮食加小剂量链脲佐菌素(STZ) 复制大鼠糖尿病模型, 连续给黄连解毒汤(11. 5, 5. 7, 2. 85 g·kg⁻¹) 8 周后测定空腹血糖(FGB)、总胆固醇(CHO)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDLC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDLC) 含量, 同时计算肝脏和胰腺质量指数; 采用免疫组织化学的方法检测大鼠肝脏中 NF- B, TNF- 含量。结果: 黄连解毒汤高剂量组能显著降低大鼠血清中 CHO, TG, LDLC 含量, 各剂量组均升高 HDLC 含量, 明显降低胰腺的质量指数; 大鼠肝脏 NF- B, TNF- 的表达明显低于模型组。结论: 黄连解毒汤对高脂饮食加小剂量 STZ 所致糖尿病大鼠有一定的治疗作用, 其机制可能是通过调节 NF- B, TNF- 蛋白的表达, 从而抑制了炎症信号的通路。

[关键词] 黄连解毒汤; 糖尿病; 核因子- B; 肿瘤坏死因子-

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)18-0153-04

Influence of Huanglian Jiedu Decoction on NF- B and TNF- of Liver in Diabetic Rats

CHEN Hong, SUN Ming-jie, PENG Juan, HUANG Ying, ZHOU Yan-hua, YU You-hua*
(Medical Experimental Center, China Academy of Chinese Medicinal Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] Objective: To study the influence of Huanglian Jiedu Decoction on NF- B, TNF- of liver in diabetic rats, explore therapeutic mechanism of Huanglian Jiedu Decoction on diabetes. **Method:** The rat diabetic model was made by high fat diet and small doze of streptozotocin (STZ) . After giving Huanglian Jiedu Decoction (11. 5, 5. 7, 2. 85 g·kg⁻¹) for 8 weeks, FGB, CHO, TG, LDLC and HDLC were measure, the liver and pancreas mass indexes were calculated. Using the immunohistochemical methods the contents of NF- B and TNF- in the liver of rats were determined. **Result:** High-dosage group and middle-dosage group of Huanglian Jiedu Decoction could significantly decrease the contents of CHO, TG, LDLC in rat serum, increase the contents of HDLC, lower the liver and pancreas mass indexes obviously. The expression of NF- B, TNF- in the liver was lower in the treatment groups compared with that in the model group. **Conclusion:** Huanglian Jiedu Decoction has therapeutic effect on diabetic rats induced by high fat diet and small doze of streptozotocin. The mechanism might be related to regulating the expression of NF- B, TNF- , inhibiting inflammatory signal pathway.

[Key words] Huanglian Jiedu Decoction; diabetes; NF- B ; TNF-

[收稿日期] 2010-03-31

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30873358); 中国中医科学院医学实验中心自主选题(ZZXT-2006-002)

[第一作者] 陈红, 硕士, Tel: 010-64014411-3339, E-mail: chenel_ch@ 126. com

[通讯作者] * 于友华, 研究员, Tel: 010-64014411-3320, E-mail: yuyh@ mail. cacms. ac. cn

2 型糖尿病(diabetes mellitus, T2DM) 是以胰岛素抵抗和胰岛素分泌相对不足为主要病理改变的疾病。现代研究认为 T2DM 是一种自身免疫和慢性炎症性疾病, 其主要病理生理途径包括氧化应激反应和炎症反应。NF- B(核转录因子- B) 是炎症启动

和调节的关键核因子, 激活的 NF- κ B 可诱导 TNF- α (肿瘤坏死因子- α)、黏附分子、白细胞介素等炎症因子的表达^[1-2]。TNF- α 具有干扰胰岛素信号转导、抑制葡萄糖转运的作用^[3]。本文通过观察黄连解毒汤治疗 T2DM 大鼠后肝脏中 NF- κ B, TNF- α 的表达来探讨黄连解毒汤治疗 T2DM 的作用靶点及机制。

1 材料及方法

1.1 动物及饲料 健康雄性 SD 大鼠 80 只, 体重 (100 \pm 20) g, 清洁级, 购自中国药品生物制品检定所, 许可证号 SCXK(京) 2005-0004; 高糖高脂饲料 (猪油 18%, 蔗糖 20%, 蛋黄 3%, 基础饲料 59%), 中国药品生物制品检定所实验中心制作。

1.2 药物与试剂 黄连解毒汤 (HL) 药液由物质检测室提供, 含生药 1.15 g \cdot mL⁻¹; 盐酸吡格列酮, 北京太洋药业有限公司; STZ, Sigma 产品, 货号 S0130; CHO, TG, LDLC, HDLC, GLU 试剂盒, 北京北化康泰临床试剂有限公司; 兔抗大鼠 NF- κ B p65 多克隆抗体, Abcam 产品; 兔抗大鼠 TNF- α 多克隆抗体, Santa 产品; 羊抗兔二抗试剂盒, 天津市灏洋生物制品科技有限责任公司。

1.3 仪器 HEA-215 型欧姆龙血糖检测仪及配套血糖试纸; Synergy 2 多功能酶标仪; 奥林巴斯显微镜 BX51 (Image-Pro Plus 6.0 图象分析软件)。

2 方法

2.1 造模 动物适应性喂养 3 d, 留空白组 10 只给予普通饲料, 造模动物 70 只给予高糖高脂喂养, 5 周后尾 iv STZ 30 mg \cdot kg⁻¹, 空白组 iv 同等量枸橼酸钠缓冲液, 72 h 后测随机血糖, 大于 16.0 mmol \cdot L⁻¹ 为造模成功, 纳入试验。

2.2 分组及给药 大鼠随机分为 6 组。空白组 ($n=10$): ig 蒸馏水; 模型组 ($n=12$): ig 蒸馏水; 阳性药组 ($n=12$): 盐酸吡格列酮 4.3 mg \cdot kg⁻¹; HL 高剂量组 ($n=12$): 11.5 g \cdot kg⁻¹; HL 中剂量组 ($n=12$): 5.7 g \cdot kg⁻¹; HL 低剂量组 ($n=10$): 2.85 g \cdot kg⁻¹。每天上午 10:00 按 10 mL \cdot kg⁻¹ ig, 空白组给予普通饲料, 其他各组继续以高脂饲料喂养。连续给药 8 周, 末次给药 2 h 后 10% 乌拉坦 ip 麻醉, 腹主动脉取血 10 mL, 3 000 r \cdot min⁻¹ 分离血清, 分装后于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存; 摘取肝脏和胰腺称重后迅速放入液氮于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存, 待用。

2.3 血脂检测 采用酶法检测血清中 CHO, TG 含量, 用选择沉淀法检测 LDLC, HDLC 含量, 具体操作

按说明书(略)。

2.4 肝脏免疫组织化学测定 肝组织于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱取出后取大叶切成 1.5 mm \times 1.5 mm \times 1 mm 的块状, 用 OCT 包埋剂包埋, 在 -20 $^{\circ}$ C 切成 8 μ m 厚, 贴于免疫组化专用防脱片上, 晾干后丙酮固定, 于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

2.4.1 肝组织 NF- κ Bp65 蛋白表达的检测 采用免疫组织化学 SP 法, 一抗为兔抗大鼠 NF- κ Bp65 (工作浓度 1:100), 二抗为山羊抗兔 IgG, 生物素标记来自抗兔辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素 SP 试剂盒。具体操作步骤: 冰冻切片水化后滴加 0.3% H₂O₂ 消除内源性过氧化物酶活性, PBS 冲洗 3 min \times 3 次, 后滴加稀释后的一抗于 4 $^{\circ}$ C 过夜, PBS 冲洗 5 min \times 3 次, 后滴加二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, PBS 冲洗 3 min \times 3 次, 最后加入 DAB 显色, 脱水、封片。

2.4.2 肝组织 TNF- α 蛋白表达的检测 采用免疫组织化学 SP 法, 一抗为山羊抗大鼠 TNF- α (工作浓度 1:50), 二抗为兔抗山羊 IgG, 生物素标记来自抗兔的辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素 SP 试剂盒。具体操作步骤按说明书。

在 400 倍显微镜下, 细胞核或细胞浆呈棕黄色颗粒视为阳性表达, 每张切片随机选 10 个视野, 用图像分析软件计算阳性颗粒表达面积。

2.5 统计学处理 采用统计分析软件进行单因素方差分析检验, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 HL 对模型大鼠血脂、血糖的影响 各造模组动物与正常组比较各指标均有显著性差异 ($P < 0.01$)。与模型组相比, HL 高剂量组, CHO, TG, LDLC 均显著降低 ($P < 0.01$), 中剂量组 TG 降低 ($P < 0.05$), HL 各组 HDLC 明显增高 ($P < 0.01$), 高、中剂量 FBG 下降 ($P < 0.05$), 且高剂量组优于对 TG, HDLC 的改善作用吡格列酮组, 见表 1。提示黄连解毒汤有一定的降糖、降脂作用, 与之前学者的研究结果一致。

3.2 HL 对模型大鼠肝脏和胰腺质量指数影响 模型组大鼠肝脏和胰腺质量比空白组增加显著, 治疗后 HL 组胰腺指数明显低于模型组, 差异有统计学意义, 其中以胰腺更为明显, HL 高剂量组基本降到正常水平 ($P < 0.01$), 肝脏指数 HL 各组有降低趋势, 见表 2。提示黄连解毒汤在降低糖尿病大鼠胰

腺的质量方面有一定疗效。

表 1 HL 对模型大鼠血脂、血糖水平的影响(均±s)

mmol·L⁻¹

分组	剂量/g·kg ⁻¹	n	CHO	TG	LDLC	HDLC	FBG
正常	-	10	0.811 ±0.165 ²⁾	1.69 ±0.39 ²⁾	0.40 ±0.01 ²⁾	0.11 ±0.01 ²⁾	3.51 ±0.32 ²⁾
模型	-	12	2.34 ±0.39	5.44 ±3.61	0.56 ±0.06	0.14 ±0.01	13.47 ±1.64
吡格列酮	4.3 ×10 ⁻³	12	1.65 ±0.43 ²⁾	3.98 ±2.58	0.48 ±0.06 ²⁾	0.15 ±0.01 ¹⁾	12.8 ±2.16
HL	11.5	12	1.49 ±0.45 ²⁾	1.83 ±0.71 ^{2,3)}	0.47 ±0.04 ²⁾	0.16 ±0.01 ^{2,3)}	9.84 ±5.56 ¹⁾
	5.7	12	2.22 ±0.65	2.71 ±0.59 ¹⁾	0.56 ±0.1	0.17 ±0.03 ²⁾	8.72 ±5.73 ¹⁾
	2.85	10	1.93 ±0.58	5.44 ±1.99	0.53 ±0.12	0.18 ±0.04 ²⁾	12.90 ±3.72

注:与模型组比较¹⁾ P<0.05, ²⁾ P<0.01; 与吡格列酮比较³⁾ P<0.05(表 2~3 同)。

3.3 HL 对模型大鼠 NF- Bp65 蛋白含量表达的影响 模型组大鼠肝组织细胞核内棕黄色颗粒明显比其他组增多且着色深,以肝窦和汇管区明显;HL 治疗后肝组织内棕黄色颗粒较模型组明显减少且棕黄色颗粒颜色明显变浅,见图 1。图像分析结果显示:模型组肝脏 NF- Bp65 蛋白的面积值明显高于空白组且差异显著,HL 各组肝脏 NF- Bp65 的蛋白表达明显低于模型组,差异显著,见表 3,图 1。

窦和汇管区明显;给药组棕黄色颗粒较模型组明显减少且棕黄色颗粒颜色明显变浅,以 HL 高剂量组最为明显,见图 2。图像分析结果显示:模型组肝脏 TNF- 蛋白的面积明显高于空白组且差异显著,HL 各组肝脏 TNF- 的面积明显低于模型组,差异显著,以高剂量组最为明显,见表 3,图 2。

表 2 HL 对模型大鼠脏器指数的影响(均±s)

分组	剂量/g·kg ⁻¹	肝脏指数 /g·(100g) ⁻¹	胰腺指数 /g·(100g) ⁻¹
正常	-	2.74 ±0.22 ²⁾	0.133 ±0.036 ¹⁾
模型	-	4.28 ±0.42	0.167 ±0.021
吡格列酮	4.3 ×10 ⁻³	3.74 ±0.56	0.132 ±0.017 ²⁾
HL	11.5	3.807 ±0.29	0.130 ±0.024 ²⁾
	5.7	3.807 ±0.47	0.137 ±0.026 ¹⁾
	2.85	4.099 ±0.47	0.141 ±0.039 ¹⁾

表 3 对模型大鼠肝脏 NF- Bp65 和 TNF- 表达面积的影响(均±s)
×10⁵ μm²

分组	剂量/g·kg ⁻¹	NF- B	TNF-
正常	-	1.22 ±0.41 ²⁾	1.10 ±0.3 ²⁾
模型	-	2.61 ±0.26	2.86 ±0.44
吡格列酮	4.3 ×10 ⁻³	1.23 ±0.21 ²⁾	1.47 ±0.34 ²⁾
HL	11.5	1.30 ±0.23 ²⁾	1.61 ±0.26 ²⁾
	5.7	1.22 ±0.15 ²⁾	2.05 ±0.37 ²⁾
	2.85	1.34 ±0.27 ²⁾	1.79 ±0.66 ²⁾

3.4 HL 对模型大鼠肝脏 TNF- 蛋白含量表达的影响 空白组肝组织内有少量棕黄色颗粒;模型组肝组织细胞核和细胞浆内棕黄色颗粒明显增多,以肝

4 讨论

现代研究认为,糖尿病时高血糖可通过多种途径激活机体的炎症反应。肝是炎症介导物的重要靶器官,糖尿病时肝脏 NF- B 活性明显增高说明糖尿病可引起肝脏的炎症损伤。NF- B 是一种普遍存在

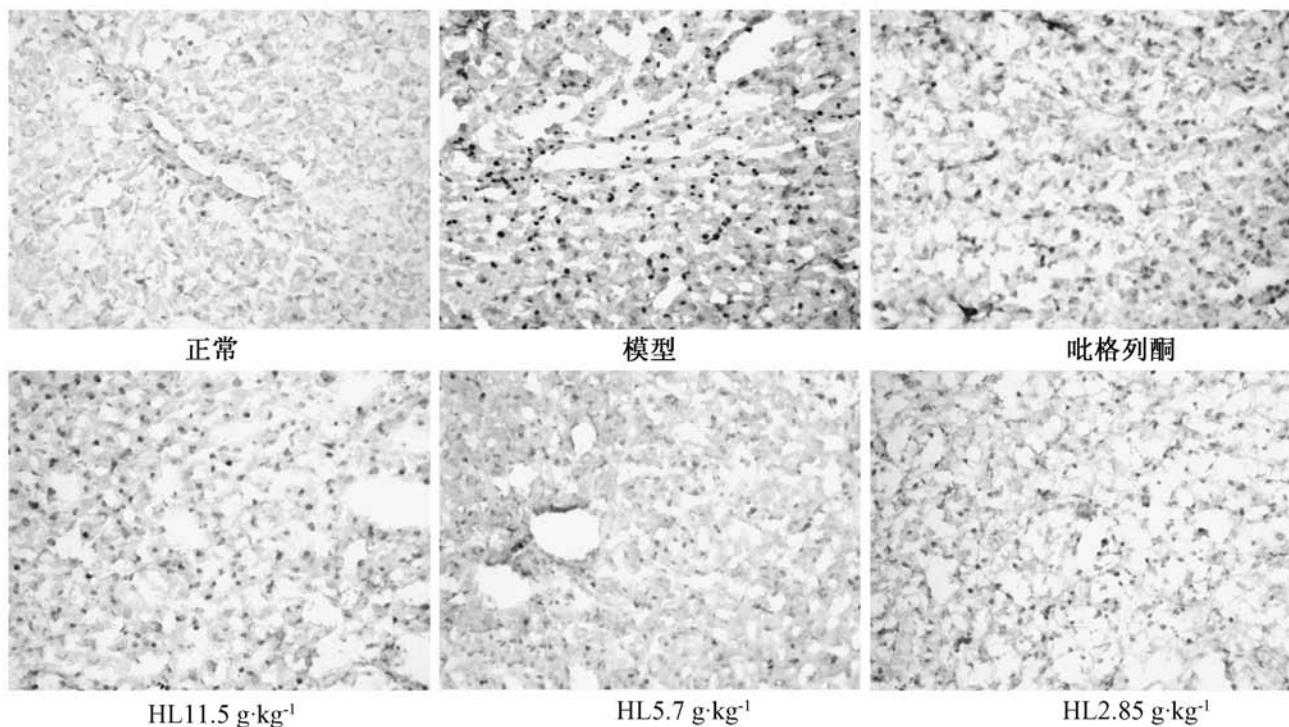


图 1 HL 对模型大鼠肝脏 NF- Bp65 表达的影响(免疫组织化学染色, ×400)

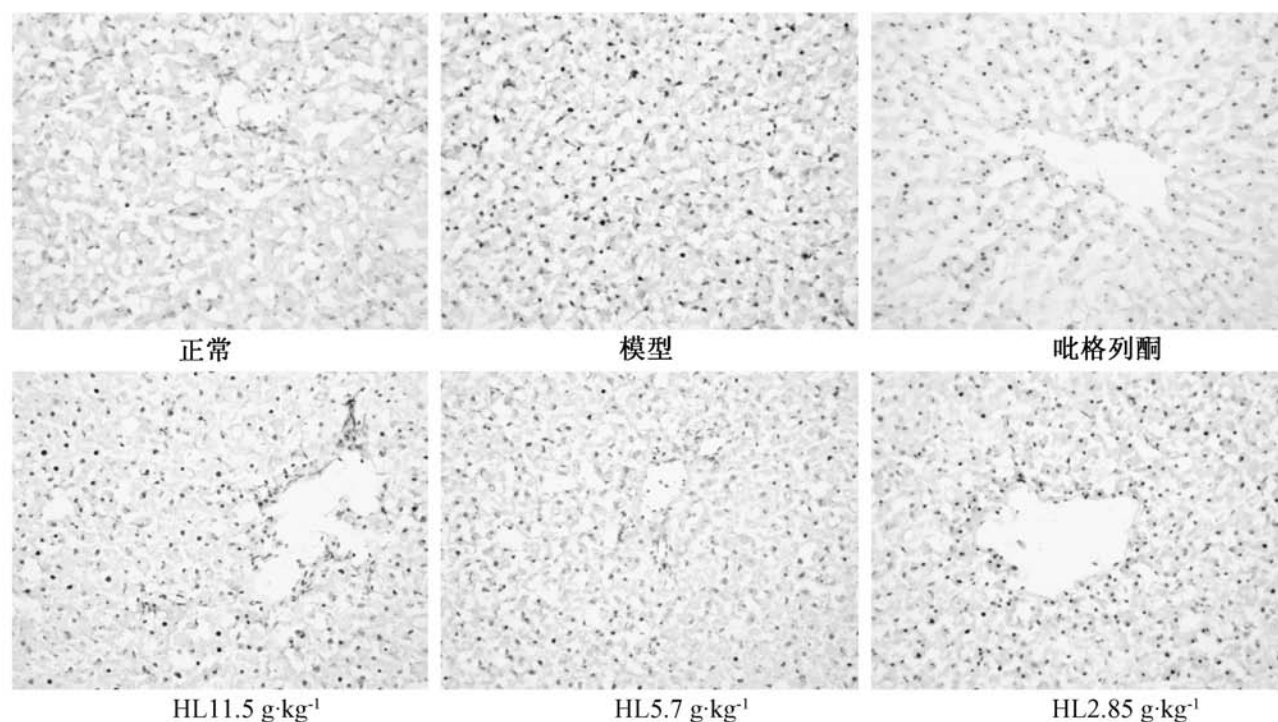


图 2 HL 对模型大鼠肝脏 TNF- α 表达的影响(免疫组织化学染色, $\times 400$)

的转录因子,是多种信号转导途径的汇聚点,亦是炎症的启动因子,参与许多炎症因子(如: TNF- α , IL-6, CRP 等)基因的表达调控^[4],同时亦有研究证明其是高血糖和氧化应激的主要靶点,而糖尿病与多种细胞因子 TNF- α , IL-6, CRP 等之间存在必然的联系^[5-6]。由 NF- κ B 调节的产物 TNF- α 和 IL-1 等又能反过来激活 NF- κ B,从而加重糖尿病症状。TNF- α 可导致胰岛素抵抗,其机制为 TNF- α 干扰胰岛素信号转导,抑制葡萄糖转运;亦能促进脂肪细胞的脂肪分解及 FFA 的释放,参与和介导肝及外周组织的 IR;还能降低 PPAR 的 mRNA 表达,减少 PPAR 的产生从而引起 IR^[7]。由上可知 NF- κ B 和 TNF- α 在糖尿病的发生发展过程中起着重要作用。

糖尿病属中医“消渴”病范畴,阴虚火旺,下焦湿热为其基本证候。黄连解毒汤是清热解毒的代表方,方中黄连自古以来就有治疗糖尿病的记载,如《本草纲目》载“黄连主消渴尿多”,“治消渴用酒蒸黄连”;《名医别录》载“黄连止消渴”;《肘后方》治消渴尿多用黄连作蜜丸服等。现代有文献报道黄连解毒汤可降低糖尿病大鼠血糖血脂,能有效降低血液中 TNF- α , IL-6, CRP 等细胞因子含量,从而改善糖尿病症状^[8-9]。本研究结果显示黄连解毒汤可使 CHO, TG, LDLC, FBG 显著降低, HDLC 明显增高,以 CHO 和 TG 最为明显,与以前报道结果一致;该方能明显降低模型大鼠肝脏和胰腺质量指数,有可能与其改善脏器炎症水肿,减轻两脏器纤维化有关,以上研究提示黄连解毒汤对糖尿病有一定的治疗作用。免疫组织化学的方法观察糖代谢重要器官肝脏中 NF- κ B, TNF- α 的表达,结果显示黄连解毒汤组比模

型组大鼠蛋白表达量明显降低,提示黄连解毒汤有可能通过调节 NF- κ B, TNF- α 蛋白的表达,从而抑制炎症信号通路以改善糖尿病症状,此研究为黄连解毒汤治疗糖尿病提供一定的科学依据。

[参考文献]

- [1] 于淼,朴春丽,南征,等. 2 型糖尿病胰岛素抵抗的肝内炎症发病机制与毒损肝络病机制论的相关性探讨[J]. 中国中西医结合杂志, 2006, 26(11): 1032.
- [2] Cardozo A K, Heimbeig H, Heremans Y, et al. A comprehensive analysis of cytokine-induced and nuclear factor-kappa B-dependent genes in primary rat pancreatic beta-cells[J]. J Biol Chem, 2001, 276: 304.
- [3] 王战建,张耀,苏杰英,等. TNF- α 在饮食诱导糖尿病大鼠肝脏的表达及罗格列酮的干预研究[J]. 河北医药, 2007, 29(1): 33.
- [4] 王扬天,王坚,马驰原. 核因子- κ B 与糖尿病的关系[J]. 医学研究生学报, 2007, 20(3): 310.
- [5] Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, et al. Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation[J]. Circulation, 2005, 111(11): 1448.
- [6] 叶丹,李红. 炎症反应相关因子与 2 型糖尿病[J]. 国外医学·内分泌学分册, 2003, 23(5): 312.
- [7] 王战建,张耀,李梅轻等. 高糖高脂饮食诱导的 2 型糖尿病大鼠肝脏 TNF- α 的表达[J]. 肝脏, 2005, 10(4): 284.
- [8] 谭,陆付耳,徐丽君,等. 黄连解毒汤对 2 型糖尿病大鼠血清炎性介质和标志物水平的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2005, 25(12): 1113.
- [9] 冷三华,陆付耳,屠庆年,等. 黄连解毒汤对 2 型糖尿病大鼠血糖和血脂代谢的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2003, 9(4): 43.

[责任编辑 何伟]