

桂枝汤对自发性糖尿病大鼠炎症因子及心肌损伤的影响

姜萍, 李晓*, 姜月华

(1. 山东中医药大学附院内科, 济南 250011)

[摘要] 目的: 观察桂枝汤对自发性糖尿病大鼠(Goto-Kakizaki diabetes prone rat, GK大鼠)核因子- B (NF- B)、细胞间黏附分子-1(sICAM-1)、白介素-1(IL-1)、肿瘤坏死因子(TNF- α)、内皮素-1(ET-1)的影响, 及对心肌损伤的防治作用。方法: GK大鼠30只, 随机分为GK对照组、二甲双胍组、桂枝汤组, 另取正常大鼠10只作为正常对照组, 分别ig 12周, 测定各组心肌匀浆NF- B , sICAM-1, IL-1, TNF- α , ET-1含量。取心肌切片作HE染色。结果: 与GK对照组比较二甲双胍组血糖下降($P < 0.01$), 桂枝汤组轻度升高($P > 0.05$)。GK对照组NF- B , sICAM-1, IL-1, TNF- α , ET-1各炎症因子较正常大鼠明显升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。二甲双胍组IL-1, TNF- α 降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 桂枝汤组NF- B , IL-1, TNF- α , ET-1明显降低($P < 0.01$ ~ 0.05), 并且比二甲双胍降低程度大, 其中IL-1, TNF- α 具有显著性差异($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。HE染色染色示桂枝汤组心肌损伤明显减轻。结论: 桂枝汤可减少炎症因子蓄积, 防治糖尿病心肌损伤。

[关键词] 核因子- B ; 细胞间黏附分子-1; 白介素-1; 肿瘤坏死因子; 内皮素-1; 桂枝汤; 自发性糖尿病大鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)13-0116-04

Effect of Guizhi Decoction on Inflammatory Factors and Myocardial Damage in Spontaneous Diabetes Rats

JIANG Ping, LI Xiao*, JIANG Yue-hua

(Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250011, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Guizhi Decoction on nuclear factor- B (NF- B), soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1), interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor- α (TNF- α), endothelin-1 (ET-1) and the prevention and treatment of myocardial damage in spontaneous diabetes rats (Goto-Kakizaki diabetes prone rat). **Method:** Thirty Gk rats were divided randomly into three groups, namely, Gk control group, Metformin group and Guizhi Decoction group. Ten normal rats were as the control. The four groups were administered separately for 12 weeks. HE staining was used for myocardial section. Myocardial homogenate was prepared, and the content of NF- B , sICAM-1, IL-1, TNF- α and ET-1 was determined. **Result:** The blood glucose of Metformin group was decreased ($P < 0.01$), while Guizhi Decoction group increased without significance. The content of NF- B , sICAM-1, IL-1, TNF- α and ET-1 was increased significantly in Gk control group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). The content of IL-1, TNF- α of Metformin group was decreased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). In group of Guizhi Decoction, NF- B , IL-1, TNF- α and ET-1 were apparently decreased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), and had a larger degree compared to Metformin group, with markedly difference in IL-1, TNF- α ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). HE staining revealed the damage of myocardium was lightened significantly in Guizhi Decoction group. **Conclusion:** Guizhi Decoction could effectively prevent and treat myocardial damage in diabetes mellitus.

[Key words] nuclear factor- B ; soluble intercellular adhesion molecule-1; interleukin-1; tumor necrosis factor- α ; endothelin-1; Guizhi Decoction; Goto-Kakizaki diabetes prone rat

[收稿日期] 20100121(004)

[基金项目] 山东省优秀中青年科学家基金(博士基金)资助(2005BSB02023)

[第一作者] 姜萍, 医学博士, 副教授, 中医内科学, Tel: 0531-81122726, E-mail: ljy6617@163.com

[通讯作者] * 李晓, 医学博士, 副主任医师, 心血管疾病的中西医结合研究, Tel: 0531-66962517, E-mail: lixiao617@163.com

糖尿病是冠心病的等危证,高血糖导致的免疫炎症反应可造成心肌损伤^[1],从中医病因病机学说可概括归纳为:糖毒脂毒蕴结,热毒耗伤心络营卫,营卫不和,心体失养。

自发性糖尿病大鼠(Goto-Kakizaki diabetes prone rat, GK 大鼠)比目前常用的链脲佐菌素模型更能符合人类 2 型糖尿病特点,本实验采用 GK 大鼠,主要观察桂枝汤对自发性糖尿病大鼠心肌炎症因子及损伤的影响,为防治糖尿病心肌病变提供新思路 and 证据。

1 材料

1.1 动物及分组 GK 大鼠 30 只(中国科学院上海实验动物中心,批号 0005569),3 月龄,雄性,体重 210 ~300 g。随机分为 3 组:桂枝汤组、二甲双胍组、GK 对照组。另取普通级 Wister 大鼠 10 只作为正常对照组,4 月龄,雄性,体重 330 ~410 g。(山东大学新药评价中心提供,动物合格证号 200203)。

1.2 药品及试剂 实验用药:按照桂枝汤原方比例制备水煎剂,浓缩至 1g 生药/mL(山东中医药大学附属医院制剂室完成),将二甲双胍等配制合适悬浊液。试剂:goat anti Nuclear factor- κ B 酶联免疫试剂盒(美国 adlitteram diagnostic laboratories INC, ADL CD A-011, LOT RT110371); 细胞间黏附分子(sICAM-1)酶联免疫试剂盒(美国 R&D Systems Inc, Cat No: SXR060 Lot No.: 0701120, 中国尚柏公司代理); 白介素-1(IL-1)酶联免疫试剂盒(美国 R&D Systems Inc, Cat No: SXR019 Lot No.: 0701119, Sun Biomedical Technology Co., Ltd 中国尚柏公司代理); 肿瘤坏死因子(TNF- α)放射免疫试剂盒、内皮素(ET-1)放射免疫试剂盒(北京普尔伟业生物科技有限公司,原北京东亚免疫技术研究所)。

1.3 仪器 匀浆机(IKA-ULTRA-TURRAX T 25 basic); ELx808 酶标仪(美国 BIO-TEK

INSTRUMENTS, INC)。GMJ 型全自动放射免疫计数器(江苏省医疗电子研究所)。DDL-5 冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂)。

2 方法

2.1 分组用药 给药剂量相当于人口服 10 倍量。各组按以下方式饲养及 ig 给药 12 周。各组给予正常饲料喂养的同时分组给药,中药组给予桂枝汤水煎剂 4.0 g·kg⁻¹·d⁻¹,西药组给予二甲双胍 0.125 g·kg⁻¹·d⁻¹,正常对照组和 GK 对照组分别给予生理盐水 2 mL·kg⁻¹·d⁻¹。

2.2 标本处理及制作 按上述方法 ig 12 周,因动物 ig 等死亡,各组动物数量均为 8 只。禁食不禁水 12 h,行氯胺酮腹腔麻醉,解剖,腹主动脉取血,采用强生公司 One Touch Profile 血糖仪测定血糖。取心脏,立即用预冷的生理盐水冲洗,在冰上操作,沿左心室方向解剖,用 4% 多聚甲醛固定,连续作病理切片,片厚 5 μ m,行 HE 染色。取新鲜心肌组织,每克心肌组织加 5 mL 生理盐水置匀浆机上 10 000 r·min⁻¹ 10 s \times 3 次,制备 20% 组织匀浆,4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液 -60 $^{\circ}$ C 保存待测。

2.3 观察项目及检测方法 NF- κ B, sICAM-1, IL-1 采用酶标双抗体夹心法测定,根据曲线方程计算各样品浓度。TNF- α , ET-1 采用放免法测定,由仪器自动计算各样品含量。取各组心肌 HE 染色切片光镜下观察。

2.4 统计学处理 所有数据均由 SPSS 统计软件包处理。各组均数以 $\bar{x} \pm s$ 表示。进行方差齐性检验后,采用方差分析,均值间两两比较用 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组动物血糖及心肌匀浆中炎症因子的含量 计算各组动物血糖及心肌匀浆中 NF- κ B, sICAM-1, IL-1, TNF- α , ET-1 等炎症因子含量,如表 1 ~2 示。

表 1 各组动物血糖及心肌匀浆 NF- κ B, sICAM-1 的含量($\bar{x} \pm s$, *n* = 8)

组别	剂量 / g·kg ⁻¹	血糖 / mmol·L ⁻¹	NF- κ B / μ g·L ⁻¹	sICAM-1 / μ g·L ⁻¹
正常大鼠	-	4.27 \pm 0.88 ²⁾	236.2 \pm 53.7 ²⁾	306.2 \pm 58.6 ²⁾
GK 对照	-	8.72 \pm 0.73	609.8 \pm 49.4	501.9 \pm 75.7
二甲双胍	0.125	6.14 \pm 0.9 ²⁾	601.0 \pm 154.9	423.0 \pm 129.3
桂枝汤	4.0	9.1 \pm 3.1 ³⁾	585.14 \pm 60.6 ¹⁾	460.5 \pm 60.0

注:与 GK 对照组比较¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01; 与二甲双胍组比较³⁾ *P* < 0.05, ⁴⁾ *P* < 0.01 (表 2 同)。

表 2 各组动物心肌匀浆 IL-1, TNF- α , ET-1 含量($\bar{x} \pm s$ $n=8$)

ng · L⁻¹

组别	剂量 /g · kg ⁻¹	IL-1	TNF- α	ET-1
正常大鼠	-	81.3 \pm 47.8 ¹⁾	350.6 \pm 31.3 ²⁾	48.1 \pm 3.7 ²⁾
GK 对照	-	96.8 \pm 31.4	833.1 \pm 31.6	160.0 \pm 7.3
二甲双胍	0.125	75.8 \pm 11.5 ¹⁾	776.3 \pm 15.9 ²⁾	141.7 \pm 28.7
桂枝汤	4.0	57.7 \pm 17.9 ^{2,4)}	654.0 \pm 34.9 ^{2,4)}	129.3 \pm 8.8 ²⁾

由表 1 可见,与正常对照组比较,GK 对照组血糖明显升高。与 GK 对照组比较二甲双胍组下降,有非常显著性差异($P < 0.01$),桂枝汤组轻度升高,但无明显差异。

心肌匀浆 NF- κ B, sICAM-1, IL-1, TNF- α , ET-1 含量:由表 1 ~2 可见,与正常对照组比较,GK 对照组各炎症因子明显升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。与 GK 对照组比较,二甲双胍组 IL-1, TNF- α 降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),桂枝汤组 NF- κ B, IL-1, TNF- α , ET-1 明显降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),桂枝汤组 NF- κ B, IL-1, TNF- α , ET-1 比二甲双胍下降程度大,其中 IL-1, TNF- α 具有显著性差异($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。

3.2 组织切片 正常大鼠:心肌纤维清晰可见,心肌排列规则,未见变性坏死和炎细胞浸润,(图 1A)。GK 对照组:可见部分心肌纤维呈灶性肥大,并见较多细小空泡,心肌细胞变大变宽,核偏向一侧,部分

心肌纤维横纹消失,部分心肌呈蜂窝状仅存肌膜,心肌间质纤维结缔组织增生,(图 1B)。二甲双胍组:部分心肌纤维呈灶性肥大,心肌细胞变大变宽,核偏向一侧,程度有所减轻,部分心肌间质纤维结缔组织增生,(图 1C)。桂枝汤组:病变的心肌纤维程度明显减轻,仅见个别心肌细胞肥大,核偏位,(图 1D)。

4 讨论

糖尿病性心肌病变的发病机制涉及糖基化终产物(AGEs)形成、多元醇通路活跃、氧化应激增加、己糖通路活跃、蛋白激酶 C(PKC) 激活等等^[2]。在上述机制中,高血糖可增强氧化应激,氧化应激可激活几乎所有已知的有关的信号传导通道,通过激活核因子- κ B(NF- κ B) 上调黏附分子及炎症因子基因转录^[3]。NF- κ B 在多种免疫应答、炎症反应、细胞黏附等过程起着中心调控作用^[4]。NF- κ B 的活化能引起一系列参与炎症和免疫反应基因的表达增加,如

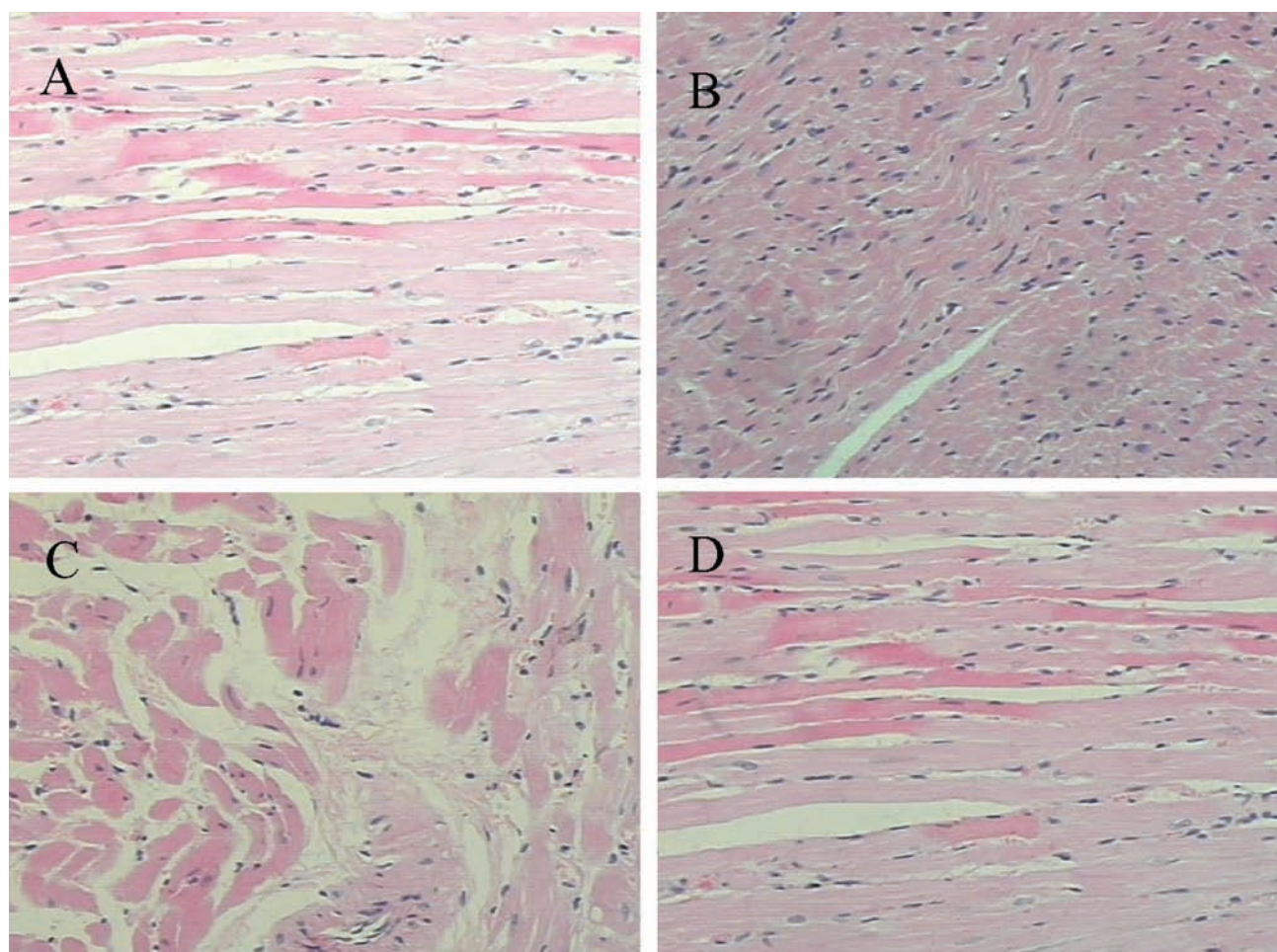


图 1 各组大鼠心肌组织切片的变化(HE 染色, $\times 100$)

A. 正常对照组; B. GK 对照组; C. 二甲双胍 0.125 g · kg⁻¹ · d⁻¹组; D. 桂枝汤 4.0 g · kg⁻¹ · d⁻¹组

TNF- α , IL-1, sICAM-1, ET-1, 血管细胞黏附分子、选择素等。作用于微血管内皮细胞或血细胞, 导致局部炎症的发生, 微血管、心肌损伤, 导致糖尿病心肌病变。因此糖尿病心肌病变是一种轻度的亚急性或慢性炎症性病变^[5]。

对上述炎症因子导致糖尿病心肌、微血管损伤的病理生理机制进行中医理论的探索和挖掘, 我们认为可概括归纳为: 糖毒蕴结, 热毒耗伤心络营卫, 营卫不和, 心体失养。《内经》云“损其心者, 调其营卫”。心主血脉, 营行脉中, 卫行脉外, 营气主静主阴, 可濡养全身脏腑肌腠; 卫气主动主阳, 能温分肉, 充皮肤, 肥腠理。营卫和谐, 循脉相偕而行, 方能发挥渗灌血气、濡养脏腑之功能。对糖尿病造成的心肌损伤, 我们推测调和营卫可能是有效的治疗方法。

我们既往的临床及实验研究^[6]显示以清热解毒、调和营卫为治法的调心饮对不稳定心绞痛有确切疗效, 可降低患者、动脉粥样硬化家兔模型中有关炎症因子含量及抑制心肌组织中 NF- κ B 的表达等作用。桂枝汤是上述方剂的组成成分, 是调和营卫的基本方剂和代表方剂。有学者研究显示桂枝汤具有解热抗炎、增加心肌血流量的作用^[7-9]。鉴于糖尿病的慢性炎症病理特点, 我们进一步探讨桂枝汤对糖尿病心肌病变的防治作用。

本实验检测 GK 大鼠心肌匀浆中有关炎症因子含量, 二甲双胍能显著降低 IL-1, TNF- α , 其原因可能与降低血糖有关。桂枝汤虽然不能降低血糖, 仍然能显著降低 NF- κ B, IL-1, TNF- α , ET-1 等炎症因子含量, 并且在降低 IL-1, TNF- α 方面优于二甲双胍, 病理检测显示能够减轻和改善心肌损伤。心肌损伤的原因较为复杂, 从本实验结果看, 其作用机制有可能是通过调和营卫, 改善微循环, 改善血流郁滞, 减少炎症因子蓄积, 从而达到保护心肌的作用。

本实验在以往研究基础上, 进一步证明了桂枝

汤能够抑制多种炎症因子产生, 并对心肌损伤有改善作用, 为糖尿病心肌病变的治疗提供了新证据、新思路。

[参考文献]

- [1] 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.
- [2] 邱春光, 卢长青. 糖尿病微血管病变发生机制研究现状[J]. 心血管病学进展, 2007, 28(1): 13.
- [3] Nishikawa T, Edelstein D, Du X L. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage [J]. Nature, 2000, 404 (6779): 787.
- [4] Goebeler M, Gillitzer R, Kilian K, et al. Multiple signaling pathways regulates NF-kappa B-dependent transcription of the monocyte chemoattractant protein-1 gene on primary endothelial cell [J]. Blood, 2001, 97(1): 46.
- [5] Cao D S Yuan M S Frantz D F, et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappa B [J]. Nature Med, 2005, 11 (2): 183.
- [6] 姜萍. 调心饮防治冠心病免疫炎症损伤的临床研究 [J]. 中华中医药杂志, 2005, 20(11): 698.
- [7] 富杭育, 周爱香, 郭淑英, 等. 桂枝汤对白细胞介素 1、干扰素、肿瘤坏死因子所致发热的作用 [J]. 中药药理与临床, 1994(3): 1.
- [8] 李沧海, 周军, 霍海如, 等. 桂枝汤对发热及低体温大鼠下丘脑可溶性一氧化氮合酶的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2003(2): 31.
- [9] 戴敏, 刘青云, 丁伟, 等. 桂枝汤对家兔心肌血流量的影响 [J]. 中国中药杂志, 1995(7): 4314.

[责任编辑 聂淑琴]