

六味地黄丸基于 SIRT6/NF- κ B 信号通路对糖尿病伴肝损伤的保护作用

陆海英¹, 李志杰¹, 舒适², 张瑞义¹, 陶鹏宇¹, 张悦^{1*}

(1. 上海中医药大学, 上海 201203; 2. 上海市浦南医院, 上海 200125)

[摘要] **目的:**从炎症角度探讨六味地黄丸对糖尿病伴肝损伤的保护机制。**方法:**选取自发性 2 型糖尿病动物模型 db/db 雄性小鼠 18 只,按空腹血糖(FBG)随机分模型组、六味地黄丸组(9.75 g·kg⁻¹·d⁻¹,1 次/d)、白藜芦醇组(42.6 mg·kg⁻¹·d⁻¹,1 次/d);12 只同窝野生型 db/m 小鼠,按 FBG 随机分正常组和六味地黄丸对照组(9.75 g·kg⁻¹·d⁻¹,1 次/d),正常组和模型组等量蒸馏水灌胃,各组给药 16 周后内眦静脉取血后处死小鼠,检测 FBG,甘油三酯(TG)和丙氨酸氨基转移酶(ALT)等变化,苏木素-伊红(HE)染色观察肝组织病理改变,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肝组织沉默信息调节因子 6(SIRT6),核转录因子- κ B p65(NF- κ B p65),单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1),血管细胞黏附因子-1(VCAM-1)和细胞间黏附因子-1(ICAM-1)蛋白表达。**结果:**与正常组比较,模型组小鼠 FBG,TG 和 ALT 显著升高($P < 0.01$),NF- κ B p65,MCP-1,VCAM-1 和 ICAM-1 蛋白表达显著升高($P < 0.01$),SIRT6 蛋白表达显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,六味地黄丸组和白藜芦醇组血 FBG,TG 显著降低($P < 0.01$),NF- κ B p65,MCP-1 和 VCAM-1 蛋白表达明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),SIRT6 蛋白表达明显升高($P < 0.05$),改善小鼠肝组织的肝细胞脂肪变性及炎细胞浸润。**结论:**六味地黄丸对糖尿病小鼠伴肝脏损伤有保护作用,其机制与调节血脂代谢,抑制炎症反应有关。

[关键词] 六味地黄丸; 2 型糖尿病; 肝损伤; 沉默信息调节因子 6; 核转录因子- κ B p65

[中图分类号] R289;R587.1;R575.5;R972+.6;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)12-0028-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191237

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190304.1038.002.html>

[网络出版时间] 2019-03-05 15:18

Protective Effect of Liuwei Dihuangwan on Diabetes Mellitus with Liver Injury Based on SIRT6/NF- κ B Signaling Pathway

LU Hai-ying¹, LI Zhi-jie¹, SHU Shi², ZHANG Rui-yi¹, TAO Peng-yu¹, ZHANG Yue^{1*}

(1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

2. Shanghai Punan Hospital, Shanghai 200125, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective mechanism of Liuwei Dihuangwan on diabetes mellitus with liver injury in terms of inflammation. **Method:** The 18 db/db mice were selected from animal model of spontaneous type 2 diabetes, mice were randomly divided into model group, Liuwei Dihuangwan group (9.75 g·kg⁻¹·d⁻¹, once a day), resveratrol group (42.6 mg·kg⁻¹·d⁻¹, once a day) based on fasting blood-glucose (FBG). The 12 litter wild db/m mice were randomly divided into normal group, Liuwei Dihuangwan group (9.75 g·kg⁻¹·d⁻¹, once a day). The normal group and the model group were given the same amount of distilled water by gavage. The mice in each group were treated for 16 weeks. FBG, triglyceride (TG) and alanine aminotransferase (ALT) were examined. Histopathological changes were observed by liver biopsy hematoxylin-eosin

[收稿日期] 20181229(014)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81173406);上海中医药大学预算内项目(18LK023)

[第一作者] 陆海英,在读博士,副教授,从事中医药防治慢性肝肾疾病基础研究,E-mail:haiying0411@qq.com

[通信作者] *张悦,博士,教授,博士生导师,从事中医药防治慢性肝肾疾病基础研究,E-mail:zhangyue-42@163.com

(HE) staining. Silent information regulator 6 (SIRT6), nuclear factor- κ B p65 (NF- κ B p65), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the liver tissue were detected by Western blot. **Result:** Compared with normal group, FBG, TG and ALT in model group increased significantly ($P < 0.01$), protein expression levels of NF- κ B p65, MCP-1, VCAM-1 and ICAM-1 in model group were significantly up-regulated ($P < 0.01$), the protein expression level of SIRT6 in model group was significantly down-regulated ($P < 0.01$). Compared with model group, Liuwei Dihuangwan and resveratrol could significantly reduce the levels of serum FBG and TG ($P < 0.01$), the protein expression of SIRT6 was significantly increased ($P < 0.01$), NF- κ B p65, MCP-1 and VCAM-1 were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and liver steatosis and inflammatory cells infiltration were alleviated. **Conclusion:** Liuwei Dihuangwan can protect the diabetes mice from liver injury, and its mechanism is related to the improvement of lipid metabolism and the inhibition of inflammatory response.

[**Key words**] Liuwei Dihuangwan; type 2 diabetes mellitus; liver injury; silent information regulator 6; nuclear factor- κ B p65

糖尿病是常见的慢性非传染病,2017 年全球成年人中超过 4.51 亿人患有糖尿病,预计到 2045 年将增加至 6.93 亿^[1]。肝脏是胰岛素的主要靶器官,糖尿病血糖升高,血脂代谢紊乱,肝脏成为主要受损器官之一。非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 在 2 型糖尿病中普遍存在,寻求药物恢复血糖和调节脂代谢,改善肝脏炎症是目前越来越受到重视^[2]。

炎症在糖尿病和脂肪肝等代谢性疾病中被广泛重视,核转录因子- κ B (NF- κ B) 是炎症反应的重要转录因子,炎症刺激后,激活 NF- κ B 乙酰化,启动多个 NF- κ B 介导的下游促炎因子的转录,增加炎症介质如血管细胞黏附因子-1 (VCAM-1),白细胞介素-6 (IL-6) 和单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 的合成^[3]。沉默信息调节因子 2 (SIR2) 在人类和啮齿类动物有 7 种 SIR2 同源基因,分别为沉默信息调节因子 1~7 (SIRT1~7),在哺乳动物的所有器官上几乎都表达^[4]。SIRT6 是 NAD⁺-依赖的组氨酸去乙酰化酶,在糖尿病、肿瘤、衰老和肥胖等代谢性疾病中发挥作用^[5-6]。SIRT6 对 SIRT1 有协同作用,SIRT1 可与 NF- κ B 的 p65 亚单位结合,抑制其乙酰化水平,从而抑制 NF- κ B 的转录,下调炎症因子的表达^[7]。白藜芦醇是一种多酚类抗氧化剂,对糖尿病具有多靶点效应,是 SIRT1 的激动剂^[8]。

六味地黄丸出自宋代钱乙《小儿药证直诀》,具有滋阴补肾作用^[9]。近来研究表明,六味地黄丸辅助二甲双胍可有效降低 2 型糖尿病患者的血糖和血脂^[10],调节糖尿病动物模型的血糖、改善脂代谢,减轻肝脏脂毒性,延缓糖尿病肾病,保护肾功能^[11],在

辅助治疗糖尿病及其相关并发症方面有悠久历史和较好的疗效。课题组前期在六味地黄丸延缓大鼠糖尿病肾病方面作了较多探索^[9,11]。目前对于 SIRT6 对糖尿病伴肝损伤的研究较少,本研究通过 SIRT6/NF- κ B p65 信号通路探索在糖尿病伴肝损伤等相关疾病中的作用,观察六味地黄丸对 db/db 小鼠肝组织 SIRT6, NF- κ B p65 和下游促炎因子表达的影响,从炎症角度探讨六味地黄丸对糖尿病伴肝损伤的保护作用。

1 材料

1.1 动物 18 只 SPF 级基因突变自然发病型 2 型糖尿病动物模型 C57BL/KSJ-db/db 雄性小鼠,南京大学模式动物研究所提供,动物合格证号 SCXK (苏)2015-0001,6 周龄,体质量 35~40 g。12 只同屋野生型 SPF 级 C57BL/KSJ-db/m 雄性小鼠,南京大学模式动物研究所提供,6 周龄,体质量 18~21 g。饲养于上海中医药大学实验动物中心,温度维持在 22~24 ℃,相对湿度维持在 50%~70%,光照为 12 h/12 h 明暗周期。每日为动物提供充足的饲料和新鲜的饮用水,每 2~3 d 换 1 次垫料,每周灭菌处理饮水瓶 1 次。本实验获得上海中医药大学实验动物福利与伦理委员会批准(批号 PZSHUTCM190201001)。

1.2 药物及试剂 六味地黄丸由熟地黄、山萸肉、牡丹皮、山药、茯苓和泽泻组成,为中成药,由北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂提供,批号 14071875;白藜芦醇(威海森川生物科技有限公司,批号 160328);蛋白酶、磷酸酶、苯甲基磺酰氟三联装(上海威奥生物科技有限公司,批号 WB0122);BCA 蛋白定量试剂盒(上海碧云天生物技术有限

公司,批号 P0015);山羊抗兔 SIRT6, NF- κ B p65, MCP-1, VCAM-1 抗体,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国 CST 公司,批号分别为 2029S, 3034, 2029S, 14694S, 2118S);山羊抗兔 ICAM-1 抗体(美国 Abcam 公司,批号 124760);辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G 二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 ZS-257780);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号 16CM44);空腹血糖(FBG),甘油三酯(TG),血清总胆固醇(TCH)和丙氨酸氨基转移酶(ALT)试剂盒(上海华臣生物试剂有限公司,批号分别为 01GLU160829, 02TG160920, 01CHOL1)。

1.3 仪器 7080 型全自动生化分析仪(日本 Hitachi 公司);ACCU-CHEK 型罗氏全活力型血糖检测系统和试纸(德国罗氏公司);Multifuge 1S-R 型高速冷冻离心机(美国 Thermo 公司);PowerWave XS2 型酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);ML-10689-00 型超声波破碎仪(日本 Tayasaf 公司);1658001 型电泳仪, 1658051 型转膜仪(美国 Bio-Rad 公司);Syngene G: BOX Chemi HR16 型自动荧光成像系统(英国 HR16 公司);Axio Lab A1 型正置显微镜(德国 Zeiss 公司);RM2135 型切片机, ASP200S 型脱水机, EG1150H 型包埋机, Autostainer XL 型染色机(德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 动物分组和给药 SPF 级 6 周龄雄性糖尿病模型 db/db 小鼠和同窝野生型 db/m 小鼠,适应性饲养 2 周后,按空腹血糖随机分正常组(db/m 小鼠 6 只)、模型组(db/db 小鼠 6 只)、六味地黄丸组(db/db 小鼠 6 只)、白藜芦醇组(db/db 小鼠 6 只)和六味地黄丸对照组(db/m 小鼠 6 只)。根据《药理与中药药理实验》大鼠和小鼠药物剂量折算^[12],六味地黄丸($9.75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)蒸馏水浸泡后碾成混悬液,配置成 $0.975 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,按 $0.01 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 小鼠体质量计算小鼠灌胃量^[11]。配置 3.5% 乙醇,白藜芦醇($42.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),以 $0.01 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 小鼠体质量计算灌胃量,现配现用,避光^[13]。正常组和模型组小鼠按等量蒸馏水同时灌胃。普通饲料正常喂养,禁食不禁水 12 h,小鼠尾静脉采血测量 FBG,血糖值 $>11.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 被认定为 2 型糖尿病小鼠^[14]。

给药 16 周后分别摘眼球取血后处死小鼠,取血清,测生化指标,其余血清 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冻存。小鼠仰卧

位固定,打开腹腔,观察肝脏的色、质、形态、体积、腹腔等情况。取肝脏,称肝重,每组取肝右叶组织作光镜检查用,其余肝组织分装,液氮低温速冻后 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冻存。

2.2 一般情况和生化指标测定 观察各组小鼠体质量、精神状态、活动度等变化。给药后 16 周后摘眼球取血测 FBG, TG, TCH 和 ALT。给药 16 w 末取肝脏称重,计算肝系数,肝系数 = $100 \times$ 肝脏质量(g)/体质量(g)。

2.3 HE 染色观察肝组织病理形态学变化 冰上取右肝组织经 10% 中性甲醛固定 24 h 后,不同浓度的乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,制成 $3 \mu\text{m}$ 厚的切片。常规 HE 染色,中性树胶封片,光镜下观察肝组织形态学改变。

2.4 Western blot 检测肝组织 SIRT6, NF- κ B p65, MCP-1, VCAM-1 和 ICAM-1 蛋白的表达 提取肝组织总蛋白,按 BCA 蛋白浓度定量的试剂盒进行蛋白定量。SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜至 PVDF 膜上,5% 牛血清室温封闭 1 h,加入 SIRT6, NF- κ B p65, MCP-1, VCAM-1 和 ICAM-1 一抗(1:1 000)和 GAPDH 一抗(1:5 000), $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜,二抗(1:5 000),室温孵育 2 h。二抗孵育结束后,HRP-ECL 化学发光显影,采用 rotor-gene6 Version 6.0 紫外与可见分析装置图像分析系统成像,标定 marker 并分析扫描和拍摄图片,运用 GeneSnap from synGene 软件系统,计算目的蛋白条带与同一样品 GAPDH 条带的相对灰度值。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 16.0 软件进行数据统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间数据比较采用 One-way ANOVA,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对 db/db 糖尿病小鼠表征指标的影响 正常组小鼠反应敏捷,皮毛光滑,摄食量少,饮水量少,垫料干燥。模型组小鼠精神萎靡,肥胖,活动迟缓,对外界刺激反应迟钝,摄食量多,饮水量多,垫料潮湿明显,需勤换垫料。实验过程中灌胃 1 周内 db/db 小鼠死亡 2 只,考虑灌胃引起的应激性损伤所致,备用 db/db 小鼠加入组内,其余小鼠均按计划处死。

3.2 对 db/db 糖尿病小鼠体质量、肝系数和空腹血糖的影响 与正常组比较,模型组小鼠的肝系数显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,六味地黄丸组和白藜芦醇组小鼠的肝系数无显著性差异。给药

16 周,六味地黄丸组小鼠空腹血糖低于同期模型组,无统计学差异。见表 1。

表 1 六味地黄丸对 db/db 小鼠体质量,肝系数和 FBG 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of Liuwei Dihuangwan on body weight, liver index and FBG of mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	体质量 /g	肝系数	FBG /mmol·L ⁻¹
正常	-	24.05 ± 1.19	18.93 ± 1.01	4.52 ± 1.16
模型	-	57.33 ± 3.59 ¹⁾	36.52 ± 2.02 ¹⁾	25.26 ± 3.10 ¹⁾
六味地黄丸	9.75	57.52 ± 3.77	36.57 ± 1.34	18.6 ± 6.04
白藜芦醇	0.042 6	52.07 ± 2.28	35.75 ± 3.56	18.85 ± 5.95
六味地黄丸对照	9.75	25.17 ± 0.81	20.15 ± 1.54	4.01 ± 0.71

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 对 db/db 糖尿病小鼠血清 TG, TCH 和 ALT 含量的影响 与正常组比较,模型组小鼠血清 TG 显著增高 ($P < 0.01$), TCH, ALT 显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较,六味地黄丸组和白藜芦醇组小鼠血清 TG 显著降低 ($P < 0.01$), 各治疗组间小鼠 TCH, ALT 没有统计学差异。见表 2。

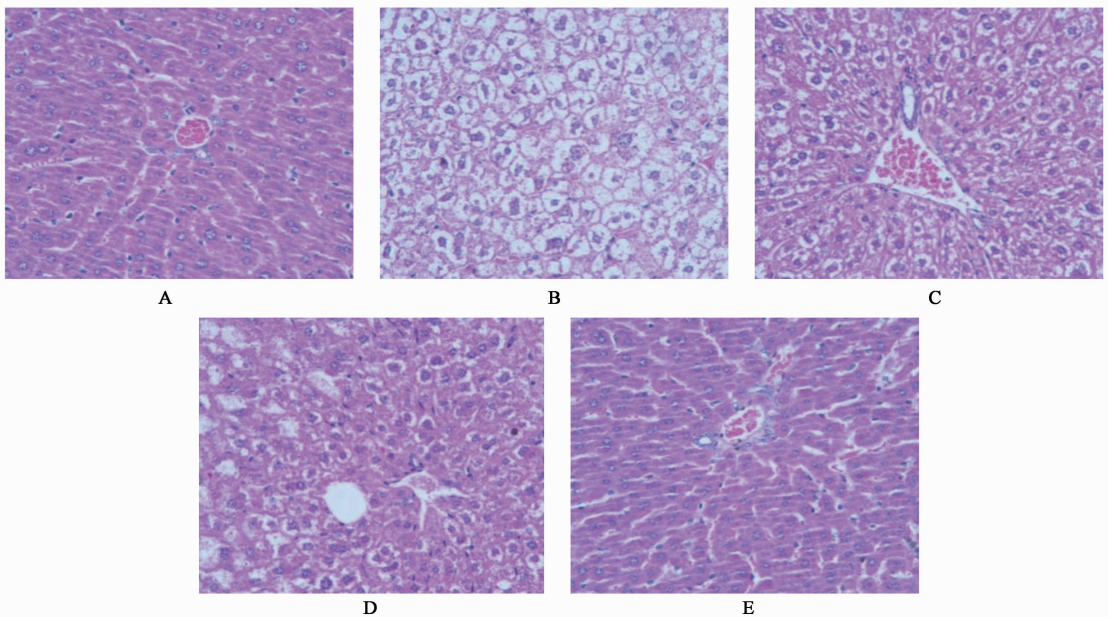
表 2 六味地黄丸对 db/db 小鼠血清 TG, TCH 和 ALT 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of Liuwei Dihuangwan on expressions of TG, TCH and ALT levels in serum of db/db mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	TG /mmol·L ⁻¹	TCH /mmol·L ⁻¹	ALT /U·L ⁻¹
正常	-	0.79 ± 0.05	2.48 ± 0.18	44.33 ± 7.26
模型	-	1.27 ± 0.09 ¹⁾	5.53 ± 0.57 ¹⁾	178.33 ± 64.4 ¹⁾
六味地黄丸	9.75	1.10 ± 0.08 ²⁾	4.46 ± 0.70	176.71 ± 41.3
白藜芦醇	0.042 6	1.01 ± 0.05 ²⁾	4.69 ± 0.36	165.67 ± 62.35
六味地黄丸对照	9.75	0.88 ± 0.12	2.46 ± 0.35	47.33 ± 14.43

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

3.4 对 db/db 糖尿病小鼠肝脏病理形态的影响 小鼠肝组织 HE 染色,光镜下观察正常组小鼠肝小叶结构清晰,肝细胞以中央静脉为中心,呈放射状排列整齐,胆管结构正常,中央静脉、汇管区血管结构正常,肝细胞大小形态一致。模型组小鼠的肝组织着色较浅,肝小叶破坏严重,肝细胞呈弥漫性肿胀,出现大小不等的空泡,肝细胞脂肪变性明显,部分细胞核偏向细胞一侧,小叶和肝窦伴有大量炎性细胞浸润。各治疗组肝细胞脂肪变性明显,但较模型组明显好转,炎性细胞浸润也明显减少。见图 1。



A. 正常组;B. 模型组;C. 六味地黄丸组;D. 白藜芦醇组;E. 六味地黄丸对照组(图 2 同)

图 1 六味地黄丸对小鼠肝组织病理学的影响 (HE, ×400)

Fig. 1 Effect of Liuwei Dihuangwan on pathological changes of liver of rats (HE, ×400)

3.5 对 db/db 小鼠肝组织 SIRT6, NF- κ B p65, MCP-1, VCAM-1 和 ICAM-1 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组小鼠肝组织 SIRT6 蛋白表达显著

降低 ($P < 0.01$), NF- κ B p65, MCP-1, VCAM-1 和 ICAM-1 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,六味地黄丸组和白藜芦醇组小鼠肝组织 SIRT6

蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$), NF- κ B p65, MCP-1 和 VCAM-1 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$)。见图 2 和表 3。

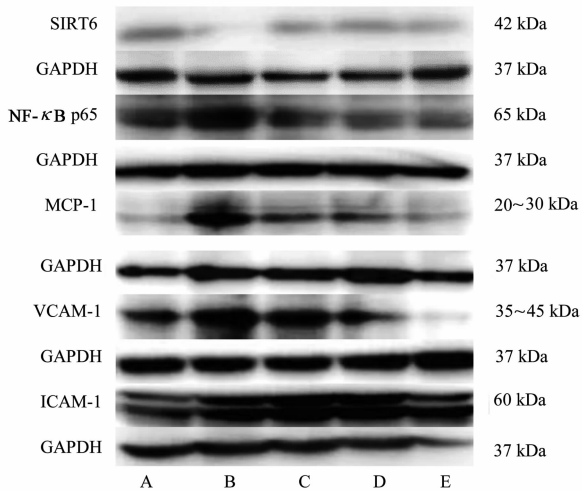


图 2 小鼠肝组织 SIRT6, NF- κ B p65, MCP-1, VCAM-1 和 ICAM-1 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of protein expression of SIRT6, NF- κ B p65, MCP-1, VCAM-1 and ICAM-1 in liver of db/db mice

表 3 六味地黄丸对 db/db 小鼠肝组织 SIRT6, NF- κ B p65, MCP-1, VCAM-1 和 ICAM-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of Liuwei Dihuangwan on expressions of SIRT6, NF- κ B p65, MCP-1, VCAM-1 and ICAM-1 proteins in liver of db/db mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	SIRT6/GAPDH	NF- κ B p65/GAPDH	MCP-1/GAPDH	VCAM-1/GAPDH	ICAM-1/GAPDH
正常	-	0.86 \pm 0.10	0.82 \pm 0.12	0.45 \pm 0.22	0.35 \pm 0.04	2.24 \pm 0.35
模型	-	0.19 \pm 0.00 ¹⁾	1.56 \pm 0.20 ¹⁾	2.67 \pm 0.41 ¹⁾	1.35 \pm 0.14 ¹⁾	3.75 \pm 0.04 ¹⁾
六味地黄丸	9.75	0.59 \pm 0.07 ²⁾	0.75 \pm 0.06 ³⁾	0.55 \pm 0.22 ³⁾	0.71 \pm 0.10 ³⁾	4.01 \pm 0.27 ¹⁾
白藜芦醇	0.042 6	0.61 \pm 0.09 ²⁾	0.64 \pm 0.05 ³⁾	0.47 \pm 0.08 ³⁾	0.77 \pm 0.11 ³⁾	4.06 \pm 0.23 ¹⁾
六味地黄丸对照	9.75	0.48 \pm 0.18	0.63 \pm 0.06	0.47 \pm 0.10	0.17 \pm 0.01	3.80 \pm 0.44

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ 。

过表达 SIRT6 可降低低密度脂蛋白水平和相关肥胖引起的生理性损伤^[24]。SIRT6 通过去乙酰化 PGC-1 α , 能增强小鼠脂肪细胞的适应性产热, 从而促进能量消耗, 参与调控糖脂代谢^[25]。SIRT6 通过抑制 c-JUN 依赖的促炎基因的表达发挥抗炎作用, SIRT6 缺乏激活 c-JUN 依赖的转录, 促进炎症基因在免疫细胞的表达, 导致小鼠肝脏的慢性炎症和纤维化, 激活 c-JUN/AP-1 促进下游促炎因子如 MCP-1, IL-6^[26-27]。NF- κ B 是存在于多种细胞中的一种转录因子, 参与多种免疫调控, 促进炎症细胞的增殖, 具有多向转录调节作用, 影响多种炎症的形成和发展, 是炎症发生发展的关键调节剂^[28]。通过调节 NF- κ B 的转录活性, 导致下游炎症因子如 MCP-1, VCAM-1

4 讨论

糖尿病是脂肪肝的常见病因之一, 美国糖尿病人群中约 49.6% ~ 74% 合并脂肪肝^[15]。2 型糖尿病患者发生脂肪肝大多以胰岛素抵抗为基础, 而氧化应激、高血糖和细胞因子共同参与脂肪肝的发生与发展^[16]。糖尿病合并肝损伤主要表现为肝功能受损和形态学表现^[17]。db/db 小鼠因瘦素受体基因一个核苷酸的改变, 导致瘦素受体蛋白缺陷发生肥胖, 是自发性 2 型糖尿病小鼠, 是国际公认的 2 型糖尿病动物模型^[18]。六味地黄丸由熟地黄、山萸肉、山药、泽泻、牡丹皮、茯苓组成, 本方“三补”配伍“三泻”, 以补为主; 肝、脾、肾三阴并补, 以滋补肾之阴精为主^[19-21]。六味地黄丸在阿霉素肾病模型中能调节血脂代谢^[22]。过度进食、代谢减慢、胰岛素抵抗导致血中脂肪酸水平增加, 脂肪酸进入肝细胞, 促进甘油三酯的积聚, 激活 ROS, 引起脂毒性和炎症反应^[23]。

SIRT6 位于细胞核中的线粒体核转录蛋白, 在肝脏中 SIRT6 缺乏, 导致血清胆固醇水平提高, 小鼠

基因表达的水平。模型组小鼠肝组织的 NF- κ B 蛋白表达都有显著升高, 模型组小鼠肝组织的 MCP-1, VCAM-1 和 ICAM-1 蛋白的表达显著升高, 提示与脂质代谢紊乱, 氧化应激反应等密切相关。肝脏在维持血糖水平和调节胆固醇和脂质代谢方面都具有重要作用。NF- κ B 是炎症反应的重要的转录因子, 炎症刺激后, 通过 p38 MAPK 信号通路的磷酸化, 可激活 NF- κ B 乙酰化, 启动 NF- κ B 介导的多个促炎因子的转录。本实验六味地黄丸和白藜芦醇都抑制肝组织 NF- κ B p53 的蛋白表达, 抑制下游靶基因的表达, 抑制炎症反应, 保护肝组织的损害。NF- κ B 广泛存在于真核生物中, 是多功能的核转录因子。NF- κ B p53 激活后刺激细胞因子, 黏附因子和其他炎症因

子的转录,这些炎症因子的过表达在糖尿病并发症中起重要作用。在糖尿病肾病中,MCP-1 表达增加,可能是糖尿病肾病早期的炎症反应。在系膜细胞中高糖通过激活 NF- κ B p53,刺激 MCP-1 的表达^[29]。SIRT6 与 NF- κ B 亚单位 RelA 结合,促进 NF- κ B 靶基因启动子 H3K9 脱乙酰作用,抑制 NF- κ B 转录活性,延缓退行性变化^[30]。SIRT6 是调控细胞寿命的关键蛋白,通过抑制 NF- κ B 调控端粒非依赖的有机体细胞的衰老。

本研究在动物实验过程中,给予正常饮食,正常组小鼠的体质量增长趋势稳定,而模型组小鼠在 8 周龄时已有明显差别,随着造模时间的延长,小鼠的体质量呈明显的增高趋势,并维持在高水平状态,给药 16 周后体质量约是正常组的 2 倍。血清学检测模型组小鼠甘油三酯等血脂指标明显升高,空腹血糖明显升高,肝脏质量明显增大,肝系数明显高于正常组。肉眼观察,模型组小鼠肝脏表面可以看到大量弥漫性颗粒状白色斑点,HE 染色光镜下观察到肝细胞高度肿胀,大量的脂肪细胞变性。以上提示该模型组小鼠出现明显的血糖升高、血脂异常,肥胖,多饮多食类似 2 型糖尿病的临床症状,并出现肝功能 TG, TCH 和 ALT 升高,肝肿大,肝组织明显病理损伤,本实验成功建立小鼠糖尿病伴肝损伤模型。

本实验中,六味地黄丸在调节 db/db 小鼠的脂代谢,延缓肝组织的脂肪变性,调节 NF- κ B p53 和 MCP-1 的蛋白水平方面有明显的成效。六味地黄丸可能通过促进 SIRT6 表达,抑制 NF- κ B 蛋白表达,抑制下游靶基因的表达,抑制炎症反应,延缓肝组织的损害。SIRT6 在脂肪代谢中起着关键作用,可作为治疗脂肪肝的治疗靶点^[31]。六味地黄丸在改善糖尿病特异性症状优于单纯西医,值得推广^[32]。后续将进一步从细胞水平探索在高糖、高脂刺激下 SIRT6 与 NF- κ B p53 及下游蛋白 MCP-1, VCAM-1 等的相互影响,探索中医药治疗 2 型糖尿病合并肝损伤的研究,以期更好发挥中医药综合调治的优势。

[参考文献]

[1] Cho N H, Shaw J E, Karuranga S, et al. IDF diabetes atlas: global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2018, 138(4):271-281.
[2] Cusi K. Treatment of patients with type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease: current approaches and future directions [J]. *Diabetologia*, 2016, 59 (6): 1112-1120.

[3] Prattichizzo F, Giuliani A, Ceka A, et al. Epigenetic mechanisms of endothelial dysfunction in type 2 diabetes [J]. *Clin Epigenetics*, 2015, 7(5):56.
[4] Roberto C. Metabolic actions of hypothalamic [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2012, 23(4):179-185.
[5] Tasselli L, ZHENG W, Chua K F. SIRT6: novel mechanisms and links to aging and disease [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2017, 28(3):168-185.
[6] Vitiello M, Zullo A, Servillo L, et al. Multiple pathways of SIRT6 at the crossroads in the control of longevity, cancer, and cardiovascular diseases [J]. *Ageing Res Rev*, 2017, 35(5):301-311.
[7] Matsushita T, Sasaki H, Takayama K, et al. The overexpression of sirt1 inhibited osteoarthritic gene expression changes induced by interleukin-1 β in human chondrocytes [J]. *J Orthop Res*, 2013, 31 (4): 531-537.
[8] Kitada M, Kume S, Takeda-wetanabe A, et al. Sirtuins and renal diseases: relationship with aging and diabetic nephropathy [J]. *Clin Sci*, 2013, 124(3):153-164.
[9] 李志杰,张悦,刘煜敏,等. 六味地黄丸防治大鼠糖尿病肾病的实验研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2011, 29 (8): 1728-1731, 1929.
[10] 何珂,朱丽华,陆西宛. 六味地黄丸联合二甲双胍片治疗 2 型糖尿病临床疗效观察 [J]. *中成药*, 2016, 38 (1): 50-52.
[11] 李志杰,张悦,陆海英,等. 六味地黄丸对糖尿病肾病大鼠肾组织 TGF- β_1 -smad 通路的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2017, 28(8):1811-1814.
[12] 张大方,金若敏. 药理与中药药理实验 [M]. 3 版. 上海:科学技术出版社, 2013:106.
[13] 黄新忠,温东海,张敏,等. 白藜芦醇对慢性肾衰竭大鼠肾脏的保护作用和相关机制 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2013, 29(2):114-118.
[14] 刘芳,杨华,周文江,等. 诱发性 2 型糖尿病小鼠模型与自发性 db/db 小鼠特性的比较 [J]. *中国实验动物学报*, 2014, 22(6):54-59, 74.
[15] 陈曦阳光,吴君. 中国糖尿病人群合并肝损伤相关危险因素 Meta 分析 [J]. *肝脏*, 2017, 22(9):800-805.
[16] Bazick J, Donithan M, Neuschwander-Tetri B A, et al. Clinical model for NASH and advanced fibrosis in adult patients with diabetes and NAFLD: guidelines for referral in NAFLD [J]. *Diabetes Care*, 2015, 38 (7): 1347-1355.
[17] Maximos M, Bril F, Portillo S P, et al. The role of liver fat and insulin resistance as determinants of plasma aminotransferase elevation in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Hepatology*, 2015, 61(1):153-160.

- [18] Hummel K P, Dickie M M, Coleman D L. Diabetes, a new mutation in the mouse [J]. *Science*, 1966, 153 (3740):1127-1128.
- [19] 徐小倩,朱谊,王晓华. 六味地黄丸(汤)研究进展[J]. *哈尔滨医药*, 2016, 36 (4):484-486.
- [20] 崔勇,王艳杰,赵丹玉,等. 六味地黄丸对 APP/PS1 小鼠学习记忆能力及胆碱能系统的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(3):148-151.
- [21] 易华,苏俊芳,李雪,等. 基于 Cx32 探讨六味地黄丸增效自杀基因抗肝癌的缝隙连接机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(1):76-81.
- [22] 张瑞义,舒适,李志杰,等. 六味地黄丸对阿霉素肾病小鼠足细胞 nephrin 和 podocin 表达的影响[J]. *数理医药学杂志*, 2017, 30(6):795-798.
- [23] Ashraf N U, Altaf M. Epigenetics: an emerging field in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Mutat Res*, 2018, 778(10):1-12.
- [24] Elhanati S, Kanfi Y, Varvak A, et al. Multiple regulatory layers of SREBP1/2 by SIRT6 [J]. *Cell Rep*, 2013, 4 (5):905-912.
- [25] 韩在祺,崔佰吉,冯波,等. SIRT6 对小鼠米色脂肪细胞适应性产热功能的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(10):1827-1833.
- [26] XIAO C, WANG R, Lahusen T J, et al. Progression of chronic liver inflammation and fibrosis driven by activation of c-JUN signaling in sirt6 mutant mice [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(50):41903-41913.
- [27] Schonhaler H B, Guinea-Viniegra J, Wagner E F. Targeting inflammation by modulating the Jun/AP-1 pathway [J]. *Ann Rheum Dis*, 2011, doi: 10.1136/ard.2010.140533.
- [28] ZHENG X, ZHU S, CHANG S, et al. Protective effects of chronic resveratrol treatment on vascular inflammatory injury in streptozotocin-induced type 2 diabetic rats: role of NF-kappa B signaling [J]. *Eur J pharmacol*, 2013, 720(10):147-157.
- [29] WEI M, LI Z, XIAO L, et al. Effects of ROS-related NF- κ B signaling on high glucose-induced TLR4 and MCP-1 expression in podocyte injury [J]. *Mol Immunol*, 2015, doi:10.1016/j.molimm.2015.09.002.
- [30] KANG L, HU J, WENG Y, et al. Sirtuin 6 prevents matrix degradation through inhibition of the NF- κ B pathway in intervertebral disc degeneration [J]. *Exp Cell Res*, 2017, 352(2):322-332.
- [31] Kim H S, XIAO C, WANG R H, et al. Hepatic-specific disruption of SIRT6 in mice results in fatty liver formation due to enhanced glycolysis and triglyceride synthesis [J]. *Cell Metab*, 2010, 12(3):224-236.
- [32] 邓小敏,唐丽丽,陆斌,等. 生脉散合六味地黄丸治疗 2 型糖尿病气阴两虚证[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(11):192-194.

[责任编辑 孙丛丛]