

黄连温胆汤对IGT大鼠炎症反应与肝细胞焦亡的影响

李寒¹, 黄云蕾², 董婉茹³, 马伯艳^{4*}

(1. 什邡市人民医院, 四川 什邡 618400; 2. 空军航空大学, 长春 130000;

3. 黑龙江中医药大学 药物安全性评价中心, 哈尔滨 150040; 4. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的:探讨高脂饮食诱导糖耐量低减(IGT)大鼠是否存在炎症反应与细胞焦亡及黄连温胆汤对其干预作用。方法:健康雄性SD大鼠予45%脂肪含量饲料喂养20周复制IGT模型。将符合模型标准的大鼠随机分为3组,每组10只,另取10只空白鼠作为正常组。黄连温胆汤组予7.8 g·kg⁻¹·d⁻¹复方水煎液,阳性药组予盐酸二甲双胍水溶液0.05 g·kg⁻¹·d⁻¹,体积为10 mL·kg⁻¹·d⁻¹,正常组和模型组予以同体积蒸馏水。连续灌胃4周后,测体质量、体长、腹围,计算Lee's指数;测空腹血浆葡萄糖(FPG)及餐后2 h血糖(2 h PG)。酶联免疫吸附测定(ELISA)检测血清白介素-6(IL-6)含量;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)测肝组织核转录因子- κ B(NF- κ B),天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)及NOD样受体蛋白3(NLRP3) mRNA及蛋白表达;免疫荧光法测肝组织Caspase-1及NLRP3蛋白表达;苏木素-伊红(HE)染色观察肝组织形态。结果:与正常组比较,模型组大鼠体质量、腹围、体长及Lee's指数明显增长($P<0.05$, $P<0.01$),FPG及2 h PG水平均明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),血清中IL-6含量和肝组织NF- κ B, Caspase-1及NLRP3基因与蛋白表达均显著增加($P<0.01$),免疫荧光显示IGT大鼠肝组织Caspase-1和NLRP3表达明显上调,HE染色见IGT大鼠肝组织存在炎症细胞浸润;与模型组比较,黄连温胆汤和盐酸二甲双胍均可有效减轻IGT大鼠体质量($P<0.01$),腹型肥胖,纠正FPG和2 h PG水平($P<0.01$),同时能有效降低IGT大鼠血清IL-6含量和肝组织中NF- κ B, Caspase-1及NLRP3基因与蛋白表达,减轻肝组织炎症细胞浸润程度。结论:高脂饮食诱导IGT大鼠存在明显炎症反应及细胞焦亡,黄连温胆汤可明显减轻其炎症反应,缓解肝细胞焦亡。

[关键词] 黄连温胆汤; 肝细胞焦亡; 炎症反应; 糖耐量低减(IGT)

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)08-0025-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210507

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210226.1509.004.html>

[网络出版日期] 2021-2-26 16:56

Effect of Huanglian Wendantang on Inflammatory Response and Hepatocyte Burn Death in IGT Rats

LI Han¹, HUANG Yun-lei², DONG Wan-ru³, MA Bo-yan^{4*}

(1. Shifang People's Hospital, Shifang 618400, China; 2. Aviation University of Air Force, Changchun 130000, China; 3. Drug Evaluation Center of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 4. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate whether there is inflammatory reaction and cell pyroptosis in impaired glucose tolerance (IGT) rats induced by high-fat diet and the intervention effect of Huanglian Wendantang. **Method:** Healthy male SD rats were fed with 45% fat content diet for 20 weeks to replicate the IGT model. The rats in line with the model establish criteria were randomly divided into 3 groups, with 10 rats in each group, another 10 rats were selected as the blank control group. Huanglian Wendantang group was given

[收稿日期] 20201215(002)

[基金项目] 国家自然科学基金应急管理项目(81641145);国家自然科学基金面上项目(81873231)

[第一作者] 李寒, 硕士, 从事温病学研究, E-mail: 871550867@qq.com

[通信作者] * 马伯艳, 博士, 教授, 从事温病学理法方药对代谢类疾病的防治研究, E-mail: zymaboyan@163.com

7.8 g·kg⁻¹·d⁻¹ compound decoction of Huanglian Wendantang, and the positive control group was given 0.05 g·kg⁻¹·d⁻¹ aqueous solution of metformin hydrochloride, with the dose volume of 10 mL·kg⁻¹·d⁻¹. The blank group and the model group were given the same volume of distilled water. After continuous intragastric administration for 4 weeks, the body weight, body length and abdominal circumferences were measured, the Lee's obesity index was calculated, and the levels of fasting plasma glucose (FPG) and 2-hour plasma glucose (2 h PG) were detected in each group. Serum interleukin-6 (IL-6) content was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA and protein expressions of nuclear factor kappa B (NF-κB), cysteinyl aspartate specific proteinase-1 (Caspase-1) and NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) in liver tissues were detected by Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot. Immunofluorescence was used to detect the expression of Caspase-1 and NLRP3 in rat liver. Hematoxylin and eosin (HE) staining was used to observe the morphology of liver tissue. **Result:** Compared with blank group, the body weight, abdominal circumference, body length and Lee's index in model group were significantly increased ($P<0.05$, $P<0.01$), the levels of FPG and 2 h PG were significantly increased ($P<0.05$, $P<0.01$), serum IL-6 content and NF-κB, Caspase-1 and NLRP3 gene and protein expressions in liver tissue were significantly increased ($P<0.01$), immunofluorescence technique showed that Caspase-1 and NLRP3 expressions increased obviously in IGT rat model's liver tissues, and inflammatory cells infiltration was observed obviously in HE stained rat liver tissue model. Compared with model group, Huanglian Wendantang and metformin hydrochloride groups could effectively reduce the body weight of IGT rats ($P<0.01$) and abdominal obesity, and correct the levels of FPG and 2 h PG ($P<0.01$), while effectively reducing serum IL-6 content and gene and protein expressions of NF-κB, Caspase-1 and NLRP3 in liver tissues of IGT rats, and alleviating inflammatory cell infiltration. **Conclusion:** Inflammatory response exists in IGT model rats induced by high-fat diet. Huanglian Wendantang can obviously reduce its inflammatory response and alleviate liver cell pyroptosis.

[Key words] Huanglian Wendantang; hepatocyte burn death; inflammatory response; impaired glucose tolerance (IGT)

糖耐量低减(IGT)是正常糖耐量向2型糖尿病(T2DM)转化的一种过渡状态,几乎所有T2DM发病都会经过IGT。流行病学调查显示,截至2019年,中国约有1.16亿糖尿病患者,位居全球第一,已然成为“糖尿病大国”^[1]。IGT经过恰当干预治疗可被逆转,因此,防治IGT应是T2DM及其并发症防治的重要前沿环节。而其发病机制复杂,目前已发现炎症反应是多种慢性代谢性疾病发生的“共同土壤”,在肥胖-胰岛素抵抗-糖代谢异常病因链中发挥了重要作用^[2-3]。T2DM的慢性低度炎症与NOD样受体蛋白3(NLRP3)炎症小体活化及细胞焦亡密切相关^[4-7]。NLRs炎症小体突变或持续的炎症反应刺激可能引起过度细胞焦亡,促使局部组织和器官产生炎症反应,如通过影响靶器官脂肪、肝脏以及骨骼肌引起胰岛素抵抗(IR),最终引发代谢紊乱及其并发症。

黄连温胆汤是由温胆汤加黄连而成,首见于清代陆廷珍《六因条辨》^[8]。近年来,该方及温胆汤原

方、温胆汤其他加减方被广泛应用于糖尿病、肥胖及高血压等代谢类疾病的防治^[9-11]。在国家自然科学基金等支持下,课题组长期从事温胆汤、黄连温胆汤防治代谢类疾病的实验及临床研究,发现其可较好防治“痰湿郁/瘀热”证型IGT及T2DM的糖脂代谢紊乱。前期研究已确定了黄连温胆汤防治T2DM黄连与温胆汤原方的最佳用药剂量,即采用温胆汤原剂量(法半夏10g,竹茹10g,枳实10g,陈皮15g,茯苓7.5g,炙甘草5g,生姜5g,大枣5g)加10g黄连为其最佳参考剂量^[12]。以此为基础,结合现代医学防治代谢性疾病的新思路——炎症反应与细胞焦亡,课题组拟从抑制NLRP3炎症小体活化及天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)依赖的细胞焦亡角度,进一步开展黄连温胆汤防治IGT IR的系列研究。本文仅从肝细胞焦亡经典途径入手,探讨高脂饮食诱导IGT与炎症反应及细胞焦亡间的关系,进一步探讨黄连温胆汤干预IGT大鼠IR靶器官的部分作用机制,对发挥中医“治未病”

优势逆转 IGT, 控制 T2DM 及其并发症具良好的现实作用。

1 材料

1.1 动物 7~8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只, 体重(200±20) g, 由辽宁长生生物技术股份有限公司提供, 合格证号 SCXK(辽)2015-0001。本实验经黑龙江中医药大学实验动物伦理委员会批准, 编号 2018121012。

1.2 药物及试剂 盐酸二甲双胍片(中美上海施贵宝制药有限公司, 批号国药准字 H20023370), 规格: 0.5 g/片。黄连温胆汤由黄连 10 g, 法半夏 10 g, 竹茹 10 g, 枳实 10 g, 陈皮 15 g, 茯苓 7.5 g, 炙甘草 5 g, 生姜 5 g, 大枣 5 g 组成, 所用中药饮片均购自北京同仁堂, 经黑龙江中医药大学药学院王振月教授鉴定, 符合 2020 年版《中华人民共和国药典》相关规定。根据《人和动物间按体表面积折算的等效剂量比值表》及参考课题组前期研究^[12], 盐酸二甲双胍按成人起始剂量 0.5 g/次(成人体质量按 60 kg 计), 2 次/日, 计算出大鼠给药剂量为 0.05 g·kg⁻¹·d⁻¹, 将其溶于一定比例蒸馏水制备混悬液, 4 °C 保存备用; 黄连温胆汤中各药材加 12 倍蒸馏水, 浸泡 60 min 后加热至沸腾, 继续微沸煎煮 40 min, 过滤煎液后再加 8 倍蒸馏水, 煎煮如前, 滤出煎液。合并 2 次滤液浓缩至含生药质量浓度为 0.78 g·mL⁻¹ 药液, 4 °C 保存备用, 并计算出大鼠给药剂量为 7.8 g·kg⁻¹·d⁻¹。乌拉坦, DAPI(上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 批号分别为 U299635, D106471-5mg); 葡萄糖(南京甘汁园糖业有限公司, 批号 SC10732011500067); 大鼠白细胞介素-6(IL-6)酶联免疫吸附测定(ELISA)检测试剂盒(武汉优尔生科技股份有限公司, 批号 SEA133Ra); RIPA 裂解液(强), 苯甲基磺酰氟(PMSF), 聚氧基丙烯酸正丁酯(BCA)蛋白浓度测定试剂盒, 30% Acr-Bis(29:1), 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)蛋白上样缓冲液, Cy3 标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G 荧光二抗, Cy3 标记山羊抗小鼠 IgG 荧光二抗(碧云天生物技术有限公司, 批号分别为 P0013B, ST506, P0009, ST003, P0015, A0516, A0521); 增强化学发光(ECL)发光液(英国七海公司, 批号 E003); 核转录因子-κB(NF-κB)(p50/p105), 内参抗体 β-肌动蛋白(β-actin), 羊抗兔 IgG, 羊抗小鼠 IgG, Caspase-1 荧光抗体(武汉三鹰生物技术有限公司, 批号分别为 14220-1-AP, 60008-1-Ig, SA00001-2, SA00001-1, 22915-1-AP); Caspase-1(p20)抗体(Wnleibio 公司,

批号 WL03450); NLRP3 抗体, NLRP3 荧光抗体(美国 ABclonal 公司, 批号均为 A12694); trizol(北京百泰克生物技术有限公司, 批号 RP1001); Super M-MLV 反转录酶, RNase inhibitor, 2×Power Taq PCR MasterMix(美国 BioTek 公司, 批号分别为 PR6502, RP5602, PR1702); 山羊血清, 抗荧光淬灭剂, 苏木素(北京索莱宝科技有限公司, 批号分别为 SL038, S2100, H8070); 醇溶性伊红 Y[生工生物工程(上海)股份有限公司, 批号 A600190]。

1.3 仪器 血糖仪及配套血糖试纸(三诺集团, 湘械注准 20162400157); NW10LVF 型超纯水系统(力康生物医疗科技控股有限公司); DW HL-668 型-70 °C 超低温冰箱(中科菱菱低温科技有限责任公司); ELX-800 型酶标仪(美国 BioTek 公司); H-2050R 型超速冷冻离心机(湖南湘仪动力测试仪器有限公司); DYY-7C 型电泳仪及 DYCZ-40D 型转移槽(北京市六一仪器厂); NANO 2000 型紫外分光光度计(美国 Thermo 公司); Exicycler 96 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(韩国 Bioneer 公司); BX53 型显微镜(日本 Olympus 公司); RM2235 型石蜡切片机(德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 模型建立及评价标准 根据前期研究^[13], 以高脂饮食长程喂养复制 IGT 大鼠模型, 成模率为 75%。将大鼠适应性喂养 1 周, 结合 5.0 mmol·L⁻¹ ≤ 空腹血浆葡萄糖(FPG) ≤ 5.6 mmol·L⁻¹ 区间, 根据体质量区域性将大鼠随机分为正常组 20 只和高脂饲料组 40 只。高脂饲料组给予 45% 脂肪热能高脂饲料(含蛋白质 24 g 和 20 kcal; 碳水化合物 41 g 和 35 kcal; 脂肪 24 g 和 25 kcal); 正常组给予 10% 脂肪热能普通饲料(含蛋白质 19.2 g 或 20 kcal; 碳水化合物 67.3 g 或 70 kcal; 脂肪 4.3 g 或 10 kcal), 每日固定时间投食、给水, 连续喂养 20 周。高脂饲料组大鼠 FPG < 5.6 mmol·L⁻¹, 2 h 血糖(2 h PG) 于 7.8~11.1 mmol·L⁻¹ 之间, 即 IGT 造模成功; 正常组 FPG < 5.6 mmol·L⁻¹, 2 h PG < 7.8 mmol·L⁻¹, 则符合正常血糖标准^[13]。

2.2 动物分组及给药 将符合模型评价标准的 30 只大鼠, 采取体质量区域性随机分为模型组、盐酸二甲双胍组及黄连温胆汤组, 每组 10 只; 另选取 10 只正常组大鼠作为正常组纳入后续实验。正常组继续饲以普通饲料, 其余各组均饲以高脂饲料, 所有大鼠自由饮水、饮食。黄连温胆汤组给予 7.8 g·kg⁻¹·d⁻¹ 黄连温胆汤复方水煎液, 阳性药组给予盐酸二甲双胍水溶液 0.05 g·kg⁻¹·d⁻¹。给药体积

为 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 正常组和模型组予以同体积蒸馏水, 连续灌胃4周。

2.3 取材方法

2.3.1 血液样本制备 末次给药后, 大鼠禁食不禁水10 h, 采用10%乌拉坦 $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射麻醉大鼠, 迅速以颈部锁骨下静脉取血5~8 mL, 静置1~2 h后离心取上清液(10 min, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 离心半径8.3 cm), 分装于1.5 mL冻存管, $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

2.3.2 肝脏组织取材 取血后, 迅速取肝脏称质量。剪取肝脏中叶分成小块放入冻存管, $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

2.4 指标检测

2.4.1 体质量、体长及腹围测定 普通称量法称取体质量; 麻醉状态下测得鼻到肛门的长度体长; 测得剑突与后肢正中腹部一圈的长度为腹围。根据公式计算 Lee's 肥胖指数: Lee's 指数 = 体质量(g) $^{1/3} \times 10^3$ / 体长(cm)。

2.4.2 FPG 及 2 h PG 含量测定 剪尾取血, 微量血糖仪测定 FPG 及 2 h PG 值。

2.4.3 ELISA 检测血清中 IL-6 水平 将收集好的 5 mL 全血低温高速离心机 $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min (离心半径 8.3 cm)。以蒸馏水进行大鼠血清对倍稀释, 作为待测样品。实验严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作。在 450 nm 波长测定吸光度 A , 最后根据标准曲线计算出各样本浓度。

2.4.4 Real-time PCR 技术检测肝组织 NF- κ B, Caspase-1 及 NLRP3 mRNA 表达水平 剪取肝脏组织 150~200 mg, 液氮中研磨成粉后加入 TRIpure 裂解液 1 mL; 加入三氯甲烷 200 μL 离心取无色水相后, 再加入等体积异丙醇混匀, 过夜 15 h 后 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ $1 \text{ 万} \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 弃上清; 加入 75% 乙醇 1 mL, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ $3\ 400 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min 弃上清, 加 30 μL RNase-free ddH₂O 混匀溶解, 得样本总 RNA。紫外分光光度计 NANO 2000 测定各样本中 RNA 浓度。将所得到的 RNA 样本进行反转录以得到对应 cDNA。取无核酸酶离心管, 加入 RNA 样本, 再加入 oligo (dT) 1 μL 和 random 1 μL , ddH₂O 补齐; 加热 ($70 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 min) 后冰上冷却 2 min; 离心收集反应液, 加入 dNTP ($2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 2 μL , $5 \times$ Buffer 4 μL 和 Rnase inhibitor 0.5 μL ; 加 (200 U) M-MLV 1 μL 混匀。温浴 2 次 ($25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min; $42 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 50 min), $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min 终止反应, 即得到 cDNA 样本。本实验采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行实时荧光定量分析。反应条件为

$94 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min, $94 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s, $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 20 s, $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, 循环 40 次, $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min 30 s, $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min 30 s, $60 \sim 94 \text{ }^{\circ}\text{C}$ $1 \text{ s} \cdot \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$, $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 1~2 min。采用 β -actin 表达量作为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算目的基因相对表达量。引物由金斯瑞生物科技有限公司合成, 引物设计见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

引物	序列(5'-3')	长度/bp
NF- κ B	上游 GCATTCTGACCTTGCTATC	182
	下游 CCAGTCTCCGAGTGAAGC	
Caspase-1	上游 CCTTCCTGTATTTCATGTCTCA	152
	下游 GATAACCTTGGGCTTGCTT	
NLRP3	上游 GCCTTGAAGAGGAGTGGATAG	175
	下游 TGGGTGTAGCGTCTGTTGAG	
β -actin	上游 GGAGATTACTGCCCTGGCTCTAGC	155
	下游 GGCCGGACTCATCGTACTCTGCTT	

2.4.5 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测肝组织 NF- κ B, Caspase-1, NLRP3 蛋白表达水平 将肝脏组织充分裂解后提取肝脏总蛋白 ($12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 离心半径 8.5 cm, 分离上清)。BCA 试剂盒测定蛋白浓度后, 将蛋白样品加入上样孔, 分别进行电泳分离, 转膜, 封闭。将封闭好的 PVDF 膜置于 5% 脱脂奶粉稀释后的一抗 (NF- κ B, 1:1 000; Caspase-1, 1:500; NLRP3, 1:2 000) 中, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜; 取出并浸入 TBST 缓冲液中摇床摇动 5 min; 与二抗 (1:1 万) 工作液一起放入杂交袋并封口, 进行 45 min 抗体孵育; 再次取出 PVDF 膜浸入 TBST 缓冲液中摇床摇动 5 min; 按 1:1 体积混合 A, B 两种 ECL 化学发光试剂, 取出 PVDF 膜进行显色曝光。扫描胶片, 用 Gel-Pro-Analyze 软件分析目标条带灰度值。

2.4.6 免疫荧光技术检测肝组织 Caspase-1, NLRP3 蛋白表达水平 将固定并冲洗好的肝脏组织进行乙醇逐级脱水, 石蜡包埋, 切片 ($5 \mu\text{m}$)。用免疫组化笔在脱蜡冲洗后的切片组织周围画圈, 防止液体外溢; 滴加山羊血清 (室温 15 min); 滴加稀释一抗 (1:100), $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜; 取出切片并浸泡于 PBS, 每次 5 min, 洗 3 次; 滴加荧光二抗 (1:200), 室温孵育 60 min, 浸泡于 PBS 中每次 5 min, 洗 3 次; 滴加 DAPI 以复染核; 取出并浸泡在 PBS 中每次 5 min, 洗 3 次; 滴加抗荧光淬灭剂, 封片。于荧光显微镜下观察染色效果并拍照。

2.4.7 苏木素-伊红 (HE) 染色观察肝脏组织形态

将固定后的肝脏组织修块并冲洗,按HE染色常规方法进行。乙醇逐级脱水,石蜡包埋,切成5 μm薄片;将切片浸泡于苏木素溶液中,染色5 min。取出冲洗后放入伊红染液复染3 min并冲洗;进行脱水,透明,封片,晾干。最后将HE染色后的切片置于显微镜下,观察肝脏组织结构及细胞形态并采集图像。

2.5 统计学方法 采用SPSS 21.0软件进行统计学分析,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较采用

One-way ANOVA 进行分析, $P < 0.05$ 表示差异有显著统计学意义。

3 结果

3.1 对 IGT 大鼠体质量、腹围、体长及 Lee's 指数的影响 给药4周后,与正常组比较,模型组体质量、腹围、体长及 Lee's 指数数值明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$);与模型组比较,黄连温胆汤组和盐酸二甲双胍组体质量、腹围、体长及 Lee's 指数水平明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表2。

表2 黄连温胆汤对 IGT 大鼠体质量、腹围、体长及 Lee's 指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of Huanglian Wendantang on body weight, abdominal circumference, body length and Lee's index in IGT rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	体质量/g	腹围/cm	体长/cm	Lee's 指数
正常		394.85±33.04	15.64±0.85	25.82±0.88	284±8.67
模型		535.20±26.62 ²⁾	19.47±0.98 ²⁾	26.97±1.69 ¹⁾	302±14.83 ²⁾
黄连温胆汤	7.8	419.02±23.55 ⁴⁾	17.16±0.67 ⁴⁾	25.87±1.03 ³⁾	289±8.33 ³⁾
盐酸二甲双胍	0.05	432.03±24.91 ⁴⁾	17.44±0.62 ⁴⁾	25.86±1.04 ³⁾	292±7.14 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 对 IGT 大鼠 FPG 及 2 h PG 水平的影响 与正常组比较,模型组 FPG 及 2 h PG 水平均明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$);与模型组比较,黄连温胆汤组和盐酸二甲双胍组 FPG 水平有下降趋势,但差异无统计学意义,2 h PG 水平显著降低 ($P < 0.01$)。见表3。

表3 黄连温胆汤对 IGT 大鼠 FPG 及 2 h PG 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Effect of Huanglian Wendantang on FPG and 2 h PG in IGT rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	FPG	2 h PG
正常		4.95±0.38	5.04±0.36
模型		5.30±0.34 ¹⁾	10.01±0.60 ²⁾
黄连温胆汤	7.8	5.11±0.20	7.51±0.69 ³⁾
盐酸二甲双胍	0.05	5.14±0.31	7.10±0.57 ³⁾

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

3.3 对 IGT 大鼠血清中 IL-6 水平的影响 与正常组比较,模型组血清中 IL-6 水平显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,黄连温胆汤组与盐酸二甲双胍组显著降低血清中 IL-6 水平 ($P < 0.01$)。见表4。

3.4 对 IGT 大鼠肝组织中 NF-κB, Caspase-1 及 NLRP3 mRNA 表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠肝组织中 NF-κB, Caspase-1 及 NLRP3 mRNA 表达量均显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,黄连温胆汤组与盐酸二甲双胍组显著降低大鼠肝组织中 NF-κB, Caspase-1 及 NLRP3 mRNA 表达量 ($P < 0.01$)。见表5。

表4 黄连温胆汤对 IGT 大鼠血清中 IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 4 Effect of Huanglian Wendantang on IL-6 in serum of IGT rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-6
正常		19.84±3.27
模型		90.79±18.43 ¹⁾
黄连温胆汤	7.8	50.12±12.78 ²⁾
盐酸二甲双胍	0.05	39.96±7.10 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ (表5,6同)。

表5 黄连温胆汤对 IGT 大鼠肝组织中 NF-κB, Caspase-1 及 NLRP3 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Huanglian Wendantang on NF-κB, Caspase-1 and NLRP3 mRNA in liver tissue of IGT rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	NF-κB	Caspase-1	NLRP3
正常		1.00±0.05	1.00±0.03	1.00±0.04
模型		3.20±0.06 ¹⁾	3.17±0.11 ¹⁾	3.74±0.17 ¹⁾
黄连温胆汤	7.8	1.69±0.06 ²⁾	2.01±0.10 ²⁾	1.89±0.10 ²⁾
盐酸二甲双胍	0.05	1.31±0.07 ²⁾	1.80±0.07 ²⁾	1.67±0.10 ²⁾

3.5 对 IGT 大鼠肝组织中 NF-κB, Caspase-1 及 NLRP3 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠肝组织中 NF-κB, Caspase-1 及 NLRP3 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,黄连温胆汤组与盐酸二甲双胍组显著降低大鼠肝组织中 NF-κB, Caspase-1 及 NLRP3 蛋白表达 ($P < 0.01$)。见图1,表6。

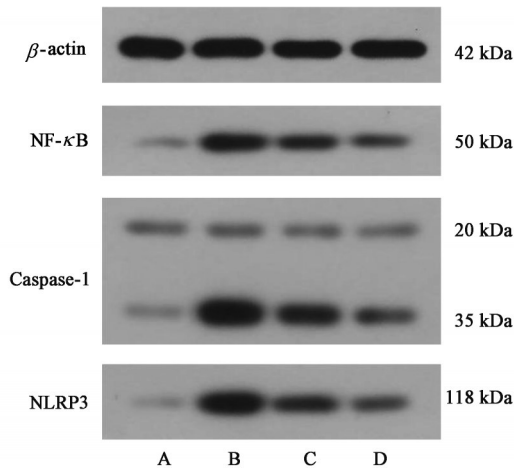


图1 各组大鼠肝组织中NF-κB, Caspase-1, NLRP3蛋白表达电泳
Fig. 1 Electrophoresis NF-κB, Caspase-1 and NLRP3 protein expression in liver tissue of each groups rats

表6 黄连温胆汤对IGT大鼠肝组织中NF-κB, Caspase-1及NLRP3蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Effect of Huanglian Wendantang on NF-κB, Caspase-1 and NLRP3 protein in liver tissue of IGT rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	NF-κB /β-actin	Caspase-1 /β-actin	NLRP3 /β-actin
正常		1.00±0.02	1.00±0.02	1.00±0.07
模型		3.77±0.06 ¹⁾	4.83±0.05 ¹⁾	5.13±0.06 ¹⁾
黄连温胆汤	7.8	2.48±0.05 ²⁾	3.23±0.06 ²⁾	3.54±0.04 ²⁾
盐酸二甲双胍	0.05	1.94±0.05 ²⁾	2.04±0.05 ²⁾	2.06±0.08 ²⁾

3.6 对IGT大鼠肝组织中Caspase-1及NLRP3蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠肝脏组织中Caspase-1阳性数显著增加,细胞膜表面NLRP3表达明显增多;与模型组比较,黄连温胆汤组大鼠肝脏组织中Caspase-1及NLRP3阳性数均显著减少。见图2,3。

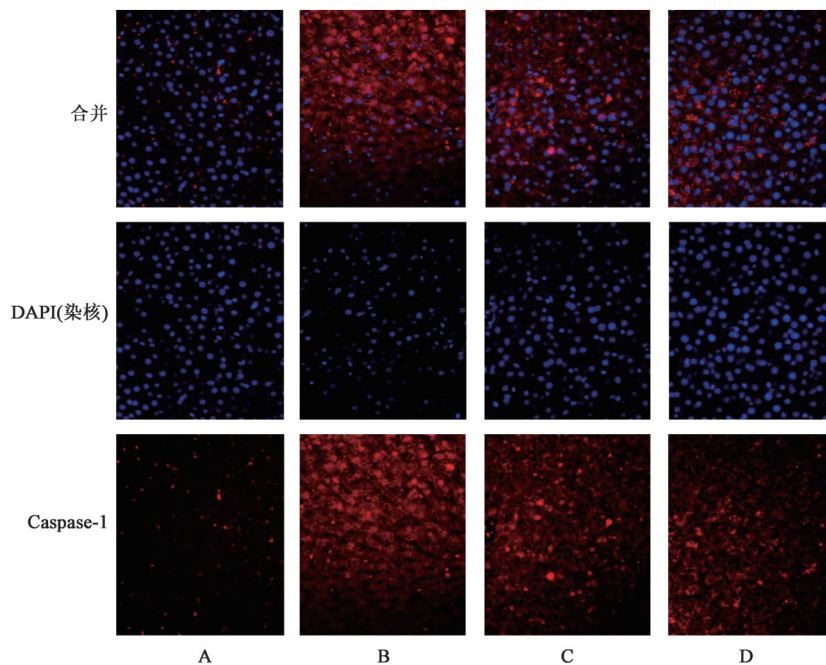


图2 黄连温胆汤对IGT大鼠肝组织中Caspase-1蛋白表达的影响(免疫荧光,×400)

Fig. 2 Effect of Huanglian Wendantang on Caspase-1 protein in liver tissue of IGT rats (IF,×400)

3.7 对IGT大鼠肝脏组织形态的影响 正常组大鼠肝组织结构正常,肝细胞形态清晰规整,排列有序,细胞质与细胞核染色均匀,未见炎症细胞浸润。与正常组相比,模型组大鼠肝细胞肿胀严重,排列紊乱,细胞核偏移固缩,细胞质染色不均,炎症细胞浸润明显,可见散在脂肪性空泡。与模型组比较,黄连温胆汤组肝细胞肿胀仍在,排列欠规整,细胞核偏移减少,固缩有所缓解,细胞质染色较为均匀,炎症细胞浸润明显减轻,脂肪变性减弱;盐酸二甲双胍组肝组织病变程度明显减轻,细胞形态较为规

整,肿胀减轻,细胞核偏移减少,存在少量固缩,炎症细胞浸润情况减轻,脂肪变性减弱。见图4。

4 讨论

在所有糖尿病类型中,T2DM占比为90%^[1]。而IGT作为T2DM的过渡阶段,发展成T2DM的概率为6%~10%,是正常人的100倍。从IGT发展到T2DM与高血糖严重程度以及肥胖/超重、年龄、饮食不节、久坐少动等危险因素有关。肥胖/超重尤其是腹型肥胖是引起IR最常见的原因,亦是目前公认导致IGT的危险因素之一,而肥胖症又被认为是一

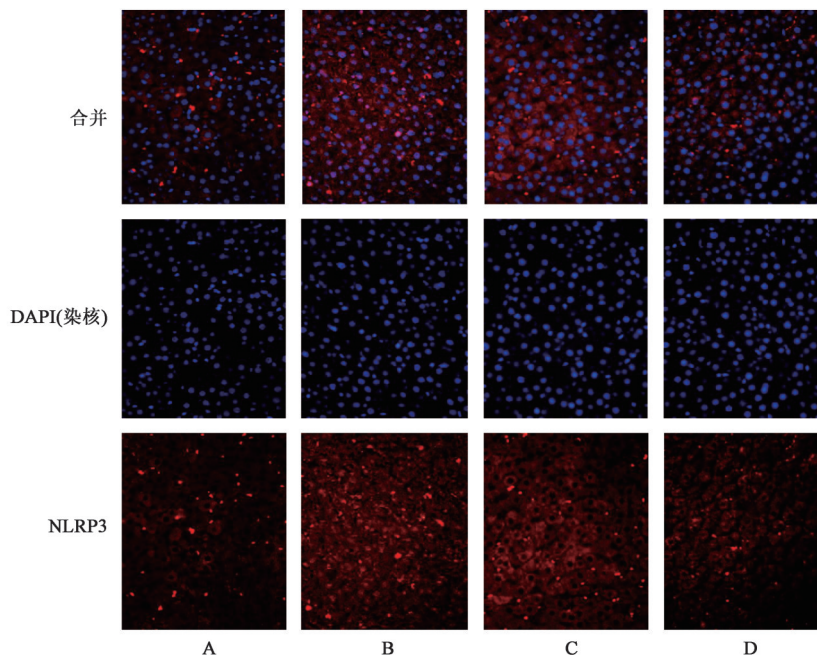


图3 黄连温胆汤对IGT大鼠肝组织中NLRP3蛋白表达的影响(免疫荧光,×400)

Fig. 3 Effect of Huanglian Wendantang on NLRP3 protein in liver tissue of IGT rats (IF,×400)

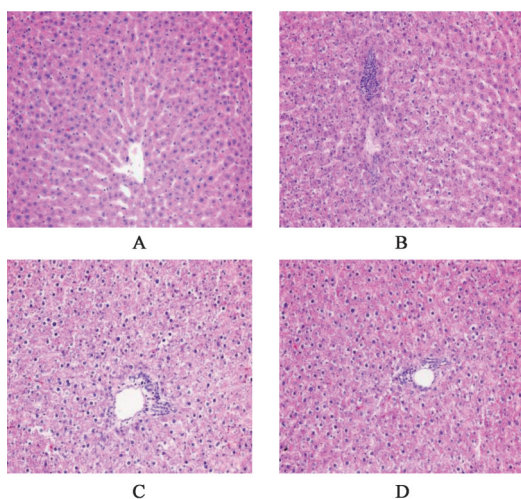


图4 黄连温胆汤对IGT大鼠肝脏组织形态的影响(HE,×200)

Fig. 4 Effect of Huanglian Wendantang on liver tissues in IGT rats (HE,×200)

种慢性低度炎症过程^[1,14]。现代医学认为,低度炎症可能是导致IGT患病率上升的重要原因之一^[15]。研究发现NF- κ B为炎症启动和调节的关键核因子;而IL-6作为细胞内重要的促炎因子,是机体炎症反应程度的重要体现,其升高与腹型肥胖,IR等相关。本实验结果表明,高脂饮食长程喂养所致IGT模型大鼠血清中IL-6水平升高,肝脏组织中NF- κ B mRNA及蛋白表达增高,且肝脏组织中可见炎症细胞浸润,可认为长程高脂饲料喂养的IGT大鼠存在炎症反应^[16-18]。

细胞焦亡作为一个高度炎性细胞死亡模式,被

分为依赖于炎性Caspase-1的经典途径和依赖于Caspase-4/5/11的非经典途径^[19-22]。前者主要是内源性或外源性刺激作用于炎症小体如AIM2, NLRC4, NLRP3等,活化后的炎症小体再通过接头蛋白ASC与无活性的Caspase-1前体相结合,形成活性Caspase-1,进一步促使无活性的炎性因子IL-1 β 和IL-18前体成熟并释放,诱发级联放大的炎症反应;与此同时,活化后的Caspase-1切割下游GSDMD蛋白以改变细胞结构并释放炎性因子,最终引发伴炎症反应的细胞死亡。可以说,细胞焦亡的关键因素是炎症小体活化,GSDMD蛋白是细胞焦亡的关键蛋白。为了探究存在炎症反应的IGT大鼠是否存在肝细胞焦亡,本实验运用Real-time PCR, Western blot及免疫荧光技术检测到模型组大鼠肝脏组织中Caspase-1和NLRP3表达明显上调,提示模型大鼠肝脏组织中存在细胞焦亡。

本实验研究结果进一步显示,黄连温胆汤可有效降低IGT模型大鼠体质量,并纠正其FPG和2h PG异常水平,且能降低模型大鼠血清中IL-6水平,调节其肝脏组织中NF- κ B, Caspase-1和NLRP3蛋白及基因表达,改善IGT模型大鼠炎症反应程度和细胞焦亡情况。

综上所述,炎症反应存在于高脂诱导的IGT模型大鼠中,Caspase-1介导的细胞焦亡参与了该模型形成过程。黄连温胆汤可有效纠正IGT大鼠FPG, 2h PG水平,调节炎症反应程度,缓解细胞焦亡状

态。而炎症反应与IR存在何种关系,是否可通过细胞焦亡途径以改善IR,逆转IGT病程,需要做更进一步研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. *IDF Diabetes Atlas* [M]. 9th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2019.
- [2] ORNING P, LIEN E, FITZGERALD K. Gasdermins and their role in immunity and inflammation[J]. *J Exp Med*, 2019, 216(11): 2453-65.
- [3] MA Y, JIANG J, GAO Y, et al. Research progress of the relationship between pyroptosis and disease [J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(7): 221-223.
- [4] AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Classification and diagnosis of diabetes; standards of medical care in diabetes-2018 [J]. *Diabetes Care*, 2018, 41: S13-S27.
- [5] SHI J, GAO W, SHAO F. Pyroptosis: gasdermin-mediated programmed necrotic cell death [J]. *Trends Biochem Sci*, 2017, 42(4): 245-54.
- [6] CHEN J, CHEN Z J. PtdIns4P on dispersed trans-Golgi network mediates NLRP3 inflammasome activation [J]. *Nature*, 2018, 564: 71-76.
- [7] HUGHES M M, O'NEILL L A J. Metabolic regulation of NLRP3 [J]. *Immunol Rev*, 2018, 281(1): 88-98.
- [8] 陆子贤. 六因条辨[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1982.
- [9] 陈亚昕, 万红娇, 朱金华, 等. 黄连温胆汤对2型糖尿病模型鼠空腹血糖、INS及肠道菌群变化的影响[J]. *中药药理与临床*, 2019, 35(3): 2-7.
- [10] 彭鹏, 韩宇博, 徐慧荣, 等. 加味黄连温胆汤治疗痰热互结型代谢综合征合并H型高血压临床研究[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2019, 21(4): 149-152.
- [11] 喻松仁, 舒晴, 白洋, 等. 温胆汤对肥胖痰湿证大鼠相关炎症因子及JAK2/STAT3通路关键分子STAT3表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(6): 39-44.
- [12] 李雨庭. 黄连温胆汤中黄连最佳剂量对T2DM大鼠肝脏脂代谢PPAR α -LXR α -ABCA1信号通路的影响[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2018.
- [13] 马伯艳, 宋颖星, 张洋, 等. 高脂诱导大鼠IGT模型“痰湿瘀热”证候研究[J]. *中医药学报*, 2014, 42(5): 14-17.
- [14] KIDGER A M, SIPTHORP J, COOK S J. ERK1/2 inhibitors: new weapons to inhibit the RAS-regulated RAF-MEK1/2-ERK1/2 pathway [J]. *Pharmacol Therapeut*, 2018, 187: 152.
- [15] PAWELZIK S C, AVIGNON A, IDBORG H, et al. Urinary prostaglandin D2 and E2 metabolites associate with abdominal obesity, glucose metabolism, and triglycerides in obese subjects [J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2019, 145: 106361.
- [16] ERNST O, VAYTTADEN S J, FRASER I. Measurement of NF- κ B Activation in TLR-Activated Macrophages [J]. *Methods Mol Biol*, 2018 (714) : 67-78.
- [17] CHI G, FENG X X, RU Y X, et al. TLR2/4 ligand-amplified liver inflammation promotes initiation of autoimmune hepatitis due to sustained IL-6/IL-12/IL-4/IL-25 expression [J]. *Mol Immunol*, 2018, 99: 171-181.
- [18] CHEDRAUI P, ESCOBAR G S, PEREZ-LOPEZ F R, et al. Angiogenesis, inflammation and endothelial function in postmenopausal women screened for the metabolic syndrome [J]. *Maturitas*, 2014, 77 (4) : 370-374.
- [19] MAN S M, KARKI R, KANNEGANTI T D. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases [J]. *Immunol Rev*, 2017, 277 (1) : 61-75.
- [20] CHEN K W, DEMARCO B, HEILIG R, et al. Extrinsic and intrinsic apoptosis activate pannexin-1 to drive NLRP3 inflammasome assembly [J]. *EMBO J*, 2019, 38: e101638.
- [21] SOLLBERGER G, CHOIDAS A, BURN G L, et al. Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps [J]. *Sci Immunol*, 2018, 3 (26): eaar6689.
- [22] KAMBARA H, LIU F, ZHANG X, et al. Gasdermin D exerts anti-inflammatory effects by promoting neutrophil death [J]. *Cell Rep*, 2018, 22: 2924-2936.

[责任编辑 周冰冰]