

- [10] 郑妮, 汤宇, 黎赛, 等. 新型复合式老年痴呆小鼠模型的建立[J]. 中南药学, 2009, 7(7): 481-484.
- [11] 洪汝, 许文强, 卢焕俊, 等. 续断提取物对血管性痴呆模型大鼠学习记忆能力的影响[J]. 延边大学医学学报, 2016, 39(2): 97-99.
- [12] 李雪娜. 益智胶囊对 $A\beta$ 致阿尔茨海默病模型大鼠干预作用及其有效成分研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2015.
- [13] 李钰兰, 郭宏敏. 血管性痴呆的五脏论治[J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(1): 30-32.
- [14] 左扁头, 张华. 血管性痴呆的中医药治疗进展[J]. 光明中医, 2015, 30(8): 1811-1813.
- [15] 王璞, 王聿成, 潘激扬. 中医对老年痴呆的认识及治疗方药[J]. 中国医药科学, 2012, 2(4): 9-11.
- [16] 康宝仁, 庞声航. 中医防治老年痴呆概述[J]. 实用中医药杂志, 2013, 29(4): 327-329.
- [17] 张均田. 人参皂甙 R_{g1} 和 R_{b1} 药理作用的比较[J]. 基础医学与临床, 2000, 20(5): 4-6.

黄杞总黄酮对 2 型糖尿病合并动脉粥样硬化大鼠胰岛素抵抗的影响

韦洁, 李燕婧*, 陈晓军, 黄秋燕

(广西中医药研究院, 广西中药质量标准研究重点实验室, 广西南宁 530022)

摘要: 目的 探讨黄杞总黄酮对 2 型糖尿病合并动脉粥样硬化大鼠胰岛素抵抗的影响。方法 高脂饲料、腹腔注射 *N*-硝基-*L*-精氨酸甲酯 (5 mg/kg) 共同诱导 GK 大鼠动脉粥样硬化后, 随机分为 5 组, 即模型组, 二甲双胍组 (150 mg/kg), 阿托伐他汀组 (10 mg/kg), 黄杞总黄酮高、低剂量组 (500、250 mg/kg), 另以正常 Wistar 大鼠为对照组, 灌胃给药 8 周。每 2 周检测体质量, 第 8 周测定空腹血糖 (FBG)、空腹胰岛素 (FINS), 计算胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR)、胰岛素敏感指数 (ISI), HE 染色法观察胰腺组织病理变化。**结果** 8 周后, 黄杞总黄酮组大鼠体质量显著低于模型组 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 黄杞总黄酮高剂量组 FBG、HOMA-IR 显著降低 ($P < 0.05$), ISI 显著升高 ($P < 0.05$), 而 FINS 水平无显著变化 ($P > 0.05$); 低剂量组亦然 (除 FBG 无明显变化, $P > 0.05$)。黄杞总黄酮高剂量组大鼠胰岛边缘较清晰, 胰岛形态较完整, 胰岛内细胞分布较均匀。**结论** 黄杞总黄酮可明显改善 2 型糖尿病合并动脉粥样硬化大鼠胰腺胰岛组织纤维化, 改善胰岛素抵抗, 增加胰岛素敏感性, 从而降低其血糖和体质量。

关键词: 黄杞; 总黄酮; 2 型糖尿病; 动脉粥样硬化; 胰岛素抵抗

中图分类号: R966

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2018)09-2055-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.09.036

糖尿病是目前最常见的慢性代谢病之一, 致残率高, 严重影响患者生活质量, 以 2 型糖尿病最常见 (约占 90%), 其机制主要与胰岛素抵抗有关, 表现为糖、脂代谢异常^[1-2]。目前, 动脉粥样硬化是临床上较常见的 2 型糖尿病并发症, 而且高脂、高血糖易造成一定程度血管损伤^[3,4], 同时其伴随的胰岛素抵抗可通过抑制血管活性 NO 生成与释放进一步加剧血管病变^[5]。GK 大鼠是一种国际公认的自发性非肥胖型 2 型糖尿病动物模型, 主要表现为胰岛功能受损及胰岛素抵抗, 与人类发病特点较相似^[6]。

前期研究显示, 黄杞 *Engelhardia roxburghiana* Wall. 叶中的总黄酮可明显降低四氧嘧啶致糖尿病小鼠血糖水平, 但其机制尚未明确^[7]。本实验采用 GK 大鼠合并动脉粥样硬化模型模拟临床上 2 型糖尿病合并血管并发症, 考察黄

杞总黄酮对其胰岛素抵抗的影响, 明确该成分对胰岛素释放及血糖调控的机制, 以期阐明它对 2 型糖尿病合并血管并发症的影响, 为相关临床应用提供基础。

1 材料

1.1 动物及饲料 清洁级雄性 Goto-Kakisaki (GK) 大鼠、SPF 级 Wistar 大鼠, 均购于上海斯莱克实验动物有限公司, 动物许可证号 SCXK (沪) 2012-0002。普通饲料、高脂饲料 (猪油 10%、胆固醇 1%、猪胆盐 0.2%、鸡蛋黄 5%、丙硫氧嘧啶 0.07%、普通饲料 83.73%) 均由广西中医药研究院提供。饲养温度保持在 20~25℃, 相对湿度 55% 左右, 动物自由进食饮水, 每日 12 h 昼夜循环。

1.2 试药 黄杞叶采自广西上思, 经广西中医药研究院中药所专家鉴定为黄杞 *Engelhardia roxburghiana* Wall. 干燥

收稿日期: 2017-09-22

基金项目: 广西中药质量标准研究重点实验室青年骨干创新基金资助项目 (桂中重自 201508)

作者简介: 韦洁 (1988—), 女 (壮族), 硕士, 助理研究员, 从事中药药理学研究。Tel: 18776762005, E-mail: abcdefgwj@126.com

* 通信作者: 李燕婧 (1979—), 女, 副主任药师, 从事中药药理学研究。Tel: 13878126053, E-mail: 124756736@qq.com

叶,其总黄酮由广西中医药研究院化学所制备^[12]。盐酸二甲双胍片(中美上海施贵宝制药有限公司,批号 AA62812);阿托伐他汀钙片(辉瑞制药有限公司,批号 L80727)。胆固醇、猪胆粉、丙硫氧嘧啶、*N*-硝基-*L*-精氨酸甲酯(上海源叶生物科技有限公司);水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司);胰岛素测试盒(北京科美生物技术有限公司);HE染色试剂盒(北京雷根生物技术有限公司)。

1.3 仪器 Accu-Chek Active 血糖仪(瑞士罗氏公司);高速冷冻离心机(德国 Hettich 公司);I2000Sr 化学发光免疫分析仪(美国雅培公司);石蜡包埋机、组织切片机、光学显微镜(德国徕卡公司)。

2 方法

2.1 模型建立 GK 大鼠给予高脂饲料喂养 4 周,同时第 1~14 天腹腔注射 *N*-硝基-*L*-精氨酸甲酯(5 mg/kg)以诱导动脉粥样硬化形成^[8]。在第 4 周结束时测定空腹血糖,取空腹血糖值 >11.1 mmol/L 者进行实验。

2.2 分组及给药 将合格大鼠按空腹血糖值随机分为模型组,二甲双胍组(150 mg/kg),阿托伐他汀组(10 mg/kg),黄杞总黄酮高、低剂量组(500、250 mg/kg),每组 5 只,另取 5 只同年龄正常 Wistar 大鼠作为对照组,其中对照组给予普通饲料,其他组继续给予高脂饲料。然后,给药组灌胃给予相应药物 8 周,对照组、模型组灌胃给予等量蒸馏水。

2.3 体质量测定 大鼠于 0、2、4、6、8 周禁食 12 h 后,

测定其体质量。

2.4 血清空腹血糖(FBG)、空腹胰岛素(FINS)测定 大鼠给药第 8 周后禁食 12 h,尾静脉取血,测定空腹血糖。然后,腹腔注射 10% 水合氯醛(3 mL/kg)麻醉,腹主动脉取血。另取血分离血清,化学发光法测定血清胰岛素含量,计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)和胰岛素敏感指数(ISI),公式分别为 $HOMA-IR = FBG \text{ (mmol/L)} \times FINS \text{ (mU/L)} / 22.5$ ($1 \text{ mU/L} = 0.14 \text{ pmol/L}$)、 $ISI = 1 / [FBG \text{ (mmol/L)} \times FINS \text{ (mU/L)}]$

2.5 胰腺病理检查 大鼠取血后,立即摘取胰腺,4% 多聚甲醛固定,脱水,透明,石蜡包埋,切片,HE 染色,将染色切片置于高倍显微镜下观察。

2.6 统计学分析 通过 SPSS 16.0 软件进行处理,数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,多组样本均数两两比较采用单因素方差分析,方差齐性采用 Dunnett-*t* 检验,方差不齐采用非参数检验;两组独立样本均数比较采用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 黄杞总黄酮对大鼠体质量的影响 干预前(0 d),各组大鼠体质量均显著低于对照组($P < 0.05$),但各组之间无显著差异($P > 0.05$)。干预后,各组大鼠体质量均有所增长,其中阿托伐他汀组、黄杞总黄酮高剂量组程度较小;第 6 周,黄杞总黄酮组显著低于模型组($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 黄杞总黄酮对大鼠体质量的影响(g, $\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	时间/周				
		0	2	4	6	8
对照组	—	279.0 ± 29.3	298.4 ± 19.5	317.0 ± 22.0	340.6 ± 20.8	363.3 ± 16.4
模型组	—	237.7 ± 19.9*	256.6 ± 15.4*	273.6 ± 20.6*	301.5 ± 18.7*	325.2 ± 18.3*
二甲双胍组	150	244.3 ± 21.6	251.7 ± 18.4*	263.5 ± 15.8*	276.2 ± 16.6*	289.9 ± 15.9*#
阿托伐他汀组	10	243.5 ± 16.2*	240.5 ± 16.3*	248.3 ± 18.9*	259.2 ± 20.1*#	270.6 ± 23.0*#
黄杞总黄酮组	500	234.1 ± 14.5*	244.2 ± 13.7*	257.9 ± 13.8*	266.3 ± 14.1*#	281.8 ± 12.9*#
黄杞总黄酮组	250	237.5 ± 20.3*	248.7 ± 13.9*	261.1 ± 12.1*	273.6 ± 17.6*#	288.4 ± 15.4*#

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$

3.2 黄杞总黄酮对大鼠 FBG、FINS、HOMA-IR、ISI 的影响 给药 8 周后,与模型组比较,黄杞总黄酮高剂量组、二甲双胍组大鼠 FBG 显著降低($P < 0.05$),给药组 FINS

均无显著变化($P > 0.05$),二甲双胍组、黄杞总黄酮组 HOMA-IR 显著降低($P < 0.05$);ISI 显著增加($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 黄杞总黄酮对大鼠 FBG、FINS、HOMA-IR、ISI 的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	FBG/(mmol·L ⁻¹)	FINS/(pmol·L ⁻¹)	HOMA-IR	ISI
对照组	—	6.62 ± 0.68 [#]	2.38 ± 0.29 [#]	0.10 ± 0.02	0.45 ± 0.08 [#]
模型组	—	15.8 ± 0.9	1.88 ± 0.28	0.22 ± 0.04	0.24 ± 0.04
二甲双胍组	150	9.2 ± 0.2 [#]	2.11 ± 0.39	0.12 ± 0.02 [#]	0.37 ± 0.06 [#]
阿托伐他汀组	10	14.6 ± 0.7	1.90 ± 0.27	0.18 ± 0.03	0.26 ± 0.04
黄杞总黄酮组	500	9.8 ± 0.8 [#]	2.13 ± 0.34	0.13 ± 0.03 [#]	0.34 ± 0.07 [#]
黄杞总黄酮组	250	10.7 ± 1.4	2.09 ± 0.37	0.14 ± 0.03 [#]	0.33 ± 0.07 [#]

注:与模型组比较,# $P < 0.05$

3.3 黄杞总黄酮对大鼠胰腺组织的影响 对照组大鼠胰岛形态正常,与外分泌腺边界清楚;模型组大鼠胰腺组织中纤维细胞大量增生并分割胰岛,边界模糊,胰岛内 B 细胞数量减少;黄杞总黄酮高剂量组、二甲双胍组大鼠胰岛边

缘较清晰,胰岛内细胞分布较均匀;阿托伐他汀组、黄杞总黄酮低剂量组仍存在纤维增生、脂质沉积的情况。见图 1。

4 讨论

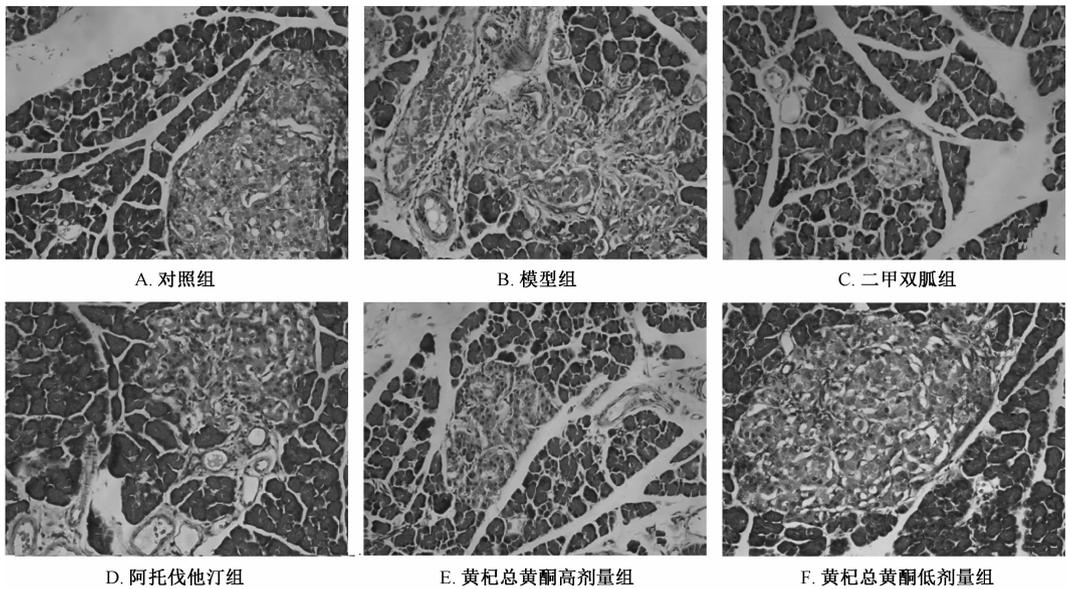


图1 大鼠胰腺组织 HE 染色 (×200)

2型糖尿病发展早期以胰岛素抵抗为主,其主要发生部位是依赖胰岛素的葡萄糖利用器官,如肝脏、骨骼肌、脂肪组织等,主要表现为组织对胰岛素敏感性下降,对葡萄糖利用度降低。有研究指出,胰岛素抵抗也会引起脂质合成通路的异常激活,从而发生脂质的沉积,对体质量有潜在影响^[9]。随着病程延长,胰岛中以I型、III型胶原、纤维连接蛋白等沉积为主的纤维化显著增加,结构被严重破坏^[10]。同时,胰岛纤维化可破坏胰岛微循环,干扰其正常血供,导致其β细胞结构和功能受损,影响胰岛素分泌,使得2型糖尿病病情愈加恶化^[11-12]。

本实验发现,高脂饲料喂养GK大鼠12周后,其体质量缓慢增加,FBG可达15 mmol/L左右,FINS含有量显著低于正常Wistar大鼠。HE染色发现,模型组胰岛组织中纤维组织大量增生并分割胰岛,边界模糊,表明高脂诱导3个月可导致大鼠胰岛组织纤维化;胰岛中央区B细胞数量减少,推测胰岛组织纤维化造成胰岛供血不足,可能引起B细胞数量、FINS分泌减少。结合HOMA-IR升高、ISI降低2项指标,表明此时大鼠已具备明显的胰岛素抵抗特点,符合2型糖尿病特征,与文献[13-14]报道一致。黄杞总黄酮干预8周后,大鼠体质量缓慢增加(较同周龄模型组大鼠轻),FBG明显降低,FINS含有量略升高(不显著),HOMA-IR显著降低,ISI显著升高,显示该成分可能通过改善外周组织胰岛素抵抗、增强胰岛素敏感来促进外周糖利用,从而降低血糖。HE染色表明,黄杞总黄酮高剂量组可明显改善胰岛形态,增加胰岛及胰岛细胞数量,减轻胰岛纤维增生,这可能是该组FINS释放量升高幅度大于其他组的原因,但其机制为增加B细胞数量还是促进B细胞分泌FINS尚不明确,仍需进一步研究。

另外,选择二甲双胍作为胰岛素增敏药物。同时基于胰岛素抵抗与低密度脂蛋白、极低密度脂蛋白、甘油三酯等脂质水平呈正相关^[15],又增加阿托伐他汀作为降脂药

物,比较黄杞总黄酮与两者在胰岛素抵抗、增敏方面的药效作用。

参考文献:

- [1] Hagberg C E, Mehlem A, Falkevall A, et al. Targeting VEGF-B as a novel treatment for insulin resistance and type 2 diabetes [J]. *Nature*, 2012, 490(7420): 426-430.
- [2] Pistrosch F, Passauer J, Fischer S, et al. In type 2 diabetes, rosiglitazone therapy for insulin resistance ameliorates endothelial dysfunction independent of glucose control [J]. *Diabetes Care*, 2004, 27(2): 484-490.
- [3] Ostergård T, Nyholm B, Hansen T K, et al. Endothelial function and biochemical vascular markers in first-degree relatives of type 2 diabetic patients: the effect of exercise training [J]. *Metabolism*, 2006, 55(11): 1508-1515.
- [4] Bonetti P O, Lerman L O, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(2): 168-175.
- [5] Manrique C, Lastra G, Sowers J R. New insights into insulin action and resistance in the vasculature [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2014, 1311(1): 138-150.
- [6] Janssen U, Phillips A O, Floege J. Rodent models of nephropathy associated with type II diabetes [J]. *J Nephrol*, 1999, 12(3): 159-172.
- [7] 钟正贤,周桂芬,陈学芬,等.黄杞总黄酮的实验研究 [J]. *时珍国医国药*, 2000, 11(6): 495-496.
- [8] 衡先培,黄苏萍,程心玲,等.丹栝方干预糖尿病动脉粥样硬化大鼠糖脂代谢及氧化应激研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2013, 33(2): 244-251.
- [9] Asrih M, Jornayvaz F R. Metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease: Is insulin resistance the link? [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2015, 418 Pt1: 55-65.
- [10] Zhou Y P, Madjidi A, Wilson M E, et al. Matrix metalloprotei-

- nases contribute to insulin insufficiency in Zucker diabetic fatty rats[J]. *Diabetes*, 2005, 54(9): 2612-2619.
- [11] 李成梅, 肖纫秋, 吴家祥, 等. 正常及糖尿病大鼠胰岛微循环三维构形的形态学[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2002, 18(5): 398.
- [12] Hayden M R. Islet amyloid and fibrosis in the cardiometabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus[J]. *J Cardiometab Syndr*, 2007, 2(1): 70-75.
- [13] 徐 倍, 吴国亭, 韩玉麒, 等. 2型糖尿病 GK 大鼠病程进展与组织形态学改变[J]. *同济大学学报(医学版)*, 2007, 28(5): 17-21, 25.
- [14] 顾 迁, 高 鑫, 徐 平, 等. GK 糖尿病大鼠生物学特性观察[J]. *中国比较医学杂志*. 2007, 17(12): 688-692.
- [15] 张 莉, 朱德发, 李 艳, 等. 2型糖尿病血管并发症与胰岛素抵抗及血脂异常的关系[J]. *安徽医科大学学报*, 2004, 39(4): 290-291.

温通活血乳膏对 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞 TNF- α 、IL-6、NF- κ B 表达的影响

马 丽¹, 冯程程¹, 徐利娟², 郭诗韵², 康小龙¹, 王 晶¹, 白生宾^{3*}

(1. 新疆维吾尔自治区中医医院, 新疆 乌鲁木齐 830061; 2. 新疆医科大学研究生院, 新疆 乌鲁木齐 830000; 3. 新疆医科大学基础医学院组胚教研室, 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘要: 目的 观察温通活血乳膏对脂多糖(LPS)诱导的RAW264.7巨噬细胞TNF- α 、IL-6、NF- κ B表达的影响。**方法** 将RAW264.7细胞随机分为正常对照组、LPS组、空白对照组、温通活血乳膏浓缩液高、中、低剂量组(250、50、10 μ g/mL)。样品与细胞共同孵育24 h后,进行相关检测。**结果** 不同剂量温通活血乳膏对细胞生长均无抑制作用,细胞活力正常。与LPS组比较,温通活血乳膏组能显著抑制NO、ROS产生及TNF- α 、IL-6水平($P < 0.05$, $P < 0.01$),并均呈量效关系;也能显著抑制LDH释放($P < 0.05$),但量效关系不明显。RAW264.7细胞经LPS刺激后,p65、p-p65、IKK、p-IKK细胞核区可见明显的绿色荧光表达,与细胞核蓝色叠加,其核内荧光强度显著高于正常对照组($P < 0.01$);经温通活血乳膏干预后,p65蛋白荧光强度显著降低($P < 0.01$)。**结论** 温通活血乳膏能有效抑制LPS诱导的RAW264.7巨噬细胞释放炎症因子,具有一定抗炎作用,其机制可能与抑制p65蛋白核转位有关。

关键词: 温通活血乳膏; RAW264.7巨噬细胞; LPS; TNF- α ; IL-6; NF- κ B

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2018)09-2058-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2018.09.037

糖尿病周围神经病变是糖尿病最常见的慢性并发症之一,统计学分析表明,初诊2型糖尿病患者中有糖尿病周围神经病变的约占34.6%^[1],其临床表现为对称性疼痛、感觉异常、间歇性或持续性发作,是导致足部溃疡、感染、坏疽的主要危险因素。炎症学说认为,糖尿病周围神经病变是细胞因子介导的炎症反应,炎症在其发展过程中起着媒介作用。温通活血乳膏功效温经通络、活血散瘀、消肿止痛,主要用于治疗消渴病引发痹症(即糖尿病周围神经病变),具有较好的抗炎、消肿、镇痛、改善微循环作用^[2],临床应用10余年,能明显缓解糖尿病周围神经病变导致的痛觉过敏现象。为了探讨温通活血乳膏对炎症因子的影响,本实验观察了该方对RAW264.7巨噬细胞的体外抗炎作用。

1 材料

1.1 细胞系 小鼠单核巨噬细胞白血病细胞(RAW264.7),购自美国模式培养物集存库。

1.2 药物 温通活血乳膏浓缩液为自制,每1 mL相当于1 g生药,批号20141026,冷藏保存。

1.3 试剂 细胞活力试剂盒(MTS)(批号0000125533)、乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(批号0000129806)、Griess试剂盒(批号0000131725)(美国Promega公司);双抗(美国Hyclone公司,批号J140027);脂多糖(LPS)(美国Biosharp公司,批号L-2880);小鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α)ELISA试剂盒(批号E09479-1647)、小鼠白介素-6(IL-6)ELISA试剂盒(批号E09362-1655)(美国eBioscience公司);Hoechst 33342(美国Sigma公司,批号

收稿日期: 2017-10-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(81360529)

作者简介: 马 丽(1974—),女,博士,从事内分泌相关疾病研究。Tel: 13699983028, E-mail: lvgangxj@163.com

* 通信作者: 白生宾(1973—),男,副教授。Tel: 15199131718, E-mail: bsbxx@126.com