

方药研究

胰敏胶囊对 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗的改善作用

尚文斌* 司晓晨* 程海波*

摘要 目的:观察胰敏胶囊对 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗的影响。方法:通过小剂量一次性腹腔注射链脲佐菌素(25mg/kg)加高脂饲料喂养建立 2 型糖尿病大鼠模型,用胰敏胶囊治疗,并以罗格列酮作为阳性对照。4 周后,对糖尿病大鼠的体重、空腹血糖(FBG)和胰岛素水平(INS)、血清游离脂肪酸(FFA)、甘油三酯(TG)进行检测,并计算胰岛素敏感性指数(ISI)。以血糖钳技术(GCT)测定大鼠的葡萄糖输注率(GIR)和大鼠股四头肌³H-葡萄糖摄取率(GUR),对胰岛素敏感性进行评估。结果:与未经治疗的糖尿病大鼠相比较,胰敏胶囊治疗后的糖尿病大鼠体重增加减缓,FBG、INS、FFA 和 TG 显著下降,而 ISI、GIR 和 GUR 明显升高,其作用与罗格列酮相当。结论:胰敏胶囊能增加 2 型糖尿病大鼠胰岛素敏感性,并改善糖脂代谢紊乱。

主题词 糖尿病 2 型/中医药疗法 胰岛素抗药性/中医药疗法 @ 胰敏胶囊

胰岛素分泌缺陷和胰岛素抵抗是 2 型糖尿病的主要病理生理基础和显著特征,可导致体内葡萄糖和脂质代谢的紊乱^[1]。通过改善胰岛素抵抗及增强胰岛素敏感性,能够更有效地治疗 2 型糖尿病及其慢性并发症,已成为 2 型糖尿病重要的治疗手段。我们在既往研究的基础上,研制出中药胰岛素增敏剂——胰敏胶囊,观察其对 2 型糖尿病大鼠葡萄糖和脂质代谢的影响,并运用血糖钳技术对其改善胰岛素抵抗的作用进行评估。

1 材料

1.1 动物和饲料:雄性 Wistar 大鼠,体重 200~250g,8 周龄,由南京中医药大学实验动物中心提供。标准饲料:碳水化合物 53%,脂肪 5%,蛋白质 23%;高脂饲料:在 10kg 标准饲料中加入食盐 150g、白糖 50g、猪油 2000g、麻油 400g、花生 2000g、鸡蛋 900g,其中碳水化合物 48%,脂肪 22%,蛋白质 20%。

1.2 药品、试剂和设备:胰敏胶囊由黄连、制何首乌、黄精、石菖蒲、川芎、防己按 1:2:2:2:2:2:1.6 比例

组成,每克胶囊粉相当于生药 4.07g,由南京中医药大学中药研究所提供,批号:000316;罗格列酮:4mg/片,中美史克天津必成公司生产,批号:991106。胰岛素放射免疫分析盒由北京福瑞生物工程公司生产,批号:0003;甘油三酯(TG)试剂盒为上海荣盛生物技术有限公司产品,批号:000310;血清游离脂肪酸(FFA)试剂盒为南京建成生物工程研究所产品,批号:20010221;胰岛素为美国 Lilly 公司产品,浓度 40mU/ml;³H-葡萄糖(³H-2-deoxy-D-glucose)为美国 SIGMA 公司产品,批号:031K9456。微量血糖测定仪由美国罗氏公司出品;UV-754 型分光光度计由上海分析仪器厂生产;WIZARD1470 型全自动 γ 计数器为芬兰医学放免仪器公司产品;微电脑针筒输注泵为美国 FISHER 公司产品;大鼠恒温手术台由南京六合生理生化仪器厂生产;LS-5000TD 液体闪烁仪由美国 Beckman 公司生产。

2 实验方法

2.1 造模和分组:参照文献方法^[2],Wistar 大鼠适应性饲养 1 周,称体重,随机抽出 16 只,为正常组,喂以标准饲料。其余大鼠喂以高脂饲料,4 周后禁食 12 小时,按 25mg/kg 体重的剂量一次性腹腔内注射链脲佐菌素(STZ,溶于 0.1mmol/L 柠檬酸缓冲液, pH4.4),2 周后,大鼠禁食 12 小时,按 2g/kg 体重灌喂 20% D-葡萄糖溶液,做口服糖耐量试验,凡 0 和 120 分钟血糖分别大于 7.0 和 11.0mmol/L 的大鼠作为糖尿病大鼠,再随机分为 3 组,每组 16 只,其中 8 只眼眶取血检测 TG 和 FFA 后,继续喂以高脂饲料,并给予相应药物灌胃,每日 1 次。治疗组按 1.75g/kg 体重给予胰敏胶囊粉;对照组按 3mg/kg 体重给予罗格列酮;模型组和

表 1 各组大鼠给药前后体重比较(g, $\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	给药前	给药后
正常组	16	374.50±24.72	469.88±31.03
模型组	16	411.75±38.55 [*]	511.25±32.27 [*]
对照组	16	410.25±25.68 [*]	499.75±21.73 ^{*#}
治疗组	16	407.25±21.29 [*]	497.12±20.28 ^{*#△}

与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.01$; 与本组给药前比较, △ $P < 0.01$

基金项目:江苏省教育厅自然科学基金资助项目(99KJB360001)

* 南京中医药大学第一临床医学院内科研究所,南京市汉中

路 282 号(210029)

收稿日期:2003-06-20;修回日期:2003-09-18

表 2 各组大鼠给药前后 FBG 及给药后 INS、ISI 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	FBG(mmol/L)		INS(mU/L)	ISI
		给药前	给药后	给药后	给药后
正常组	8	4.99±0.69	4.94±0.72	21.40±4.64	-4.63±0.25
模型组	8	6.36±0.59 ^{∗∗}	7.23±0.57 ^{∗∗+}	27.39±4.56 [∗]	-5.27±0.16 ^{∗∗}
对照组	8	6.53±0.52 ^{∗∗}	5.66±0.77 ^{∗∗#}	19.01±4.37 ^{##}	-4.65±0.35 ^{∗∗#}
治疗组	8	6.60±0.46 ^{∗∗}	5.79±0.52 ^{∗∗##}	20.53±4.92 ^{##}	-4.74±0.37 ^{∗∗#}

与正常组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; 与本组给药前比较, ⁺ $P < 0.05$; 下表同

表 3 各组大鼠给药前后 TG 及 FFA 比较(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	TG		FFA	
		给药前	给药后	给药前	给药后
正常组	8	1.17±0.17	1.21±0.13	0.97±0.08	1.05±0.12
模型组	8	2.19±0.50 ^{∗∗}	2.34±0.59 ^{∗∗}	1.69±0.29 ^{∗∗}	1.74±0.21 ^{∗∗}
对照组	8	2.21±0.55 ^{∗∗}	1.44±0.22 ^{∗∗#}	1.67±0.26 ^{∗∗}	1.25±0.23 ^{∗∗#}
治疗组	8	2.18±0.40 ^{∗∗}	1.52±0.37 ^{∗∗#}	1.70±0.22 ^{∗∗}	1.29±0.15 ^{∗∗#}

表 4 各组大鼠给药后 GIR 及 GUR 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	稳态血糖 (mmol/L)	胰岛素输注率 (mU · kg ⁻¹ · min ⁻¹)	GIR(mg · kg ⁻¹ · min ⁻¹)	GUR(cpm)
正常组	8	4.80±0.11	4	12.25±0.24	33.75±4.27
模型组	8	7.39±0.17	4	5.54±0.23 ^{∗∗}	16.25±4.59 ^{∗∗}
对照组	8	6.36±0.28	1	9.44±0.29 ^{∗∗##}	27.75±2.96 ^{∗∗##}
治疗组	8	6.16±0.17	4	8.59±0.16 ^{∗∗##}	27.50±3.42 ^{∗∗##}

正常组分别灌服生理盐水(1ml/100g)。给药 4 周后,禁食 12 小时,4 组中的各 8 只大鼠用于检测空腹血糖(FBG)、血浆胰岛素含量(INS)、FFA、TG;另 8 只大鼠进行血糖钳试验。

2.2 胰岛素敏感性指数的计算:参照李光伟等的方法^[3],胰岛素敏感性指数(ISI)为空腹血糖与胰岛素乘积的倒数,因其为非正态分布,分析中取其自然对数。

2.3 血糖钳技术检测葡萄糖输注率:参照 DeFronzo 的方法^[1]进行改进,实验大鼠禁食不禁水 12 小时后,以 2.5%戊巴比妥钠注射液(50mg/kg 体重)腹腔注射麻醉。仰位固定于大鼠恒温手术台上,保持体液温度在 37℃ 左右,采用美国进口 PE50 导管,管腔中预先注入 50U/ml 的肝素生理盐水溶液抗凝,进行双侧股静脉和右侧颈动脉插管,右股静脉导管连接微电脑注射泵输注葡萄糖,左股静脉导管连接微电脑注射泵恒速输注胰岛素,右颈动脉导管连接注射器以取血样。先测定基础血糖值(BBG),然后以 4.0mU · kg⁻¹ · min⁻¹ 恒速输注胰岛素,5min 后取血测定血糖值,如低于基础值则开始输注 10%葡萄糖溶液,每 5min 测定血糖一次,并根据血糖值调节葡萄糖输注速度,使血糖值稳定在 BBG±0.5mmol/L 的范围内,当连续 3 次血糖值均在上述范围时,即达到稳定状态之后,每 5min 测定血糖一次,并记录稳态下最后 60~120min 葡萄糖输注速率的平均值作为每只大鼠的葡萄糖输注率(GIR)。

2.4 大鼠股四头肌葡萄糖摄取率(GUR)的测定:血糖钳夹实验完成后,从股静脉一次性注射 20μCi 的³H-葡萄糖(³H-2D-G, 1mCi/mi, 取 1ml 用生理盐水稀释为 10ml, 取 0.2ml 即得 20μCi), 45min 后处死实验大鼠,在 2min 内取出大鼠的股四头肌,并立即放入液氮中冷冻,然后把样本存放在-70℃ 冰箱,待测肌组织中³H-2D-G 的放射性活性。测定时称取 1g 股四头肌,剪碎,加入 5ml 生理盐水,研磨肌组织,离心取上清液,放入含 5ml 闪烁液(选用³H 标准专用闪烁液:1000ml 二甲苯溶液加入 PPO 4g, POPOP 0.4g)的杯中,用液体闪烁仪计数 1min ³H-2D-G 放射性活性数值(cpm)即 GUR。

2.5 统计学方法:数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用方差分析,给药前后比较用 t 检验。统计软件是 SPSS 软件包。

3 结果

3.1 胰敏胶囊对糖尿病大鼠体重的影响:表 1 示,给药前,高脂饲料喂养使模型组、治疗组和对照组体重分别显著高于正常组($P < 0.01$),而 3 组糖尿病大鼠体重之间无显著差异;而给药 4 周后,对照组和治疗组的体重明显低于模型组($P < 0.01$)。胰敏胶囊能明显减缓糖尿病大鼠因高脂饲料所致的体重增加。

3.2 胰敏胶囊对糖尿病大鼠 FBG、INS 和 ISI 的影响:表 2 示,给药前模型组、对照组和治疗组的 FBG 无

显著性差异,但均明显高于正常组($P<0.01$),治疗组和对照组给药后的FBG较前明显下降($P<0.05$),亦低于模型组给药后血糖($P<0.01$),同时INS水平显著低于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),ISI明显高于模型组($P<0.01$)。表明胰敏胶囊能增加胰岛素敏感性,降低糖尿病大鼠的血糖和胰岛素水平。

3.3 胰敏胶囊对糖尿病大鼠TG和FFA的影响:表3示,给药前3组糖尿病大鼠的TG和FFA均高于正常组($P<0.01$);给药后,治疗组和对照组TG和FFA均低于给药前水平($P<0.01$),同时明显低于模型组($P<0.01$)。表明胰敏胶囊能改善糖尿病大鼠的脂代谢紊乱。

3.4 胰敏胶囊对糖尿病大鼠GIR和GUR的影响:表4示,模型组的GIR和GUR分别显著低于正常组($P<0.01$),给药后治疗组和对照组的GIR和GUR虽然未达到正常水平($P<0.01$),但与模型组相比,得到明显升高($P<0.01$)。说明糖尿病大鼠模型存在明显的胰岛素抵抗,而胰敏胶囊能够改善糖尿病大鼠的胰岛素抵抗,增加葡萄糖的摄取和代谢。

4 讨论

高脂喂养可以导致大鼠肥胖和广泛的胰岛素抵抗^[5],高脂饲料喂养加小剂量注射链脲佐菌素可以成功地制作出具有显著胰岛素抵抗的2型糖尿病动物模型^[2]。本实验中模型组大鼠表现出明显肥胖、高血糖、高脂血症、高胰岛素血症和胰岛素敏感性下降,具有2型糖尿病的特征。

对于胰岛素抵抗准确客观的检测和评估也是胰岛素抵抗研究中关键的问题。用血糖钳技术测定高胰岛素条件下的葡萄糖输注率和摄取率,被公认是研究胰岛素抵抗的金指标,但在中医药糖尿病研究中尚未广泛开展。在本实验中,我们运用血糖钳技术并加以改进,观察了高胰岛素和稳态基础血糖状态下大鼠的葡萄糖输注率。胰岛素抵抗多发生在骨骼肌、脂肪和肝脏对胰岛素的敏感性下降,故又结合放射性葡萄糖输注,观察大鼠股四头肌葡萄糖摄取率,同时引用目前国内常用的胰岛素敏感性指数^[3],较全面地对糖尿病大鼠的胰岛素敏感性的变化进行观测。

胰岛素抵抗作为2型糖尿病的主要病理生理基础和显著特征,导致体内葡萄糖和脂质代谢的紊乱,也是多种慢性并发症产生的重要因素^[1,6]。目前,针对糖尿病胰岛素抵抗,运用胰岛素增敏剂Thiazolidinediones类药物进行治疗^[7],而中医药领域也对此进行了许多有益的探讨,寻求从中药中开发胰岛素增敏剂^[8]。胰敏胶囊的药味取自我们既往用于治疗高血压和高脂血症

的验方,而高血压和高脂血症作为胰岛素抵抗综合征(代谢综合征)的重要组成部分,与2型糖尿病有着共同的病理基础,即胰岛素抵抗。针对胰岛素抵抗综合征的临床证候特点,我们认为,胰岛素抵抗与肝肾亏虚、痰瘀蕴生有关。方中制何首乌和黄精补益肝肾;石菖蒲和川芎化痰祛瘀;黄连和防己清热降火。本实验的结果表明,胰敏胶囊能显著提高2型糖尿病大鼠的胰岛素敏感性,同时明显改善糖尿病大鼠的糖和脂代谢的紊乱。胰敏胶囊为中药复方制剂,现代药理学研究证实,本方中的多味中药具有降低血糖和/或调节脂代谢紊乱的作用,而糖尿病患者体内升高的甘油三酯和游离脂肪酸是胰岛素抵抗形成的重要病理因素,即所谓的脂毒性^[9]。胰敏胶囊提高糖尿病大鼠的胰岛素敏感性可能与其调节脂代谢,对抗脂毒性有关,其作用机理有待进一步探讨和研究。

参考文献

- 1 DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E. Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes Care*, 1992, 15(3): 318-368.
- 2 刘永玉,毛良,莫启忠,等. 实验性NIDDM大鼠模型. *中华内分泌代谢杂志*, 1990, 6(2): 115-116.
- 3 李光伟,潘孝仁, Lillioja, 等. 检测人群胰岛素敏感性的一项新指标. *中华内科杂志*, 1993, 32(10): 656-659.
- 4 DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol*, 1979, 237(3): E214-E223.
- 5 Storlien LH, James DE, Burleigh KM, et al. Fat feeding causes widespread in vivo insulin resistance, decreased energy expenditure, and obesity in rats. *Am J Physiol*, 1986, 251(5 pt 1): E576-E583.
- 6 Fujimoto WY. The importance of insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Am J Med*, 2000, 108(6A): 9S-14S.
- 7 Matthaei S, Stumvoll M, Kellerer M, et al. Pathophysiology and pharmacological treatment of insulin resistance. *Endocr Rev*, 2000, 21(6): 585-618.
- 8 尚文斌,程海波. 糖尿病胰岛素抵抗的中医药研究进展. *中医杂志*, 1999, 40(11): 692-695.
- 9 Boden G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes*, 1997, 46(1): 3-10.

颈肩腰腿病中医药新疗法培训班招生

河北省巨鹿县中医风湿病专科研究所培训学校陶纪志医师积累了20余年治疗各种颈肩腰腿痛的诊断和治疗方法,应广大学员的要求,现继续面向国内外招生。传授内容有:类风湿性关节炎长期发热,遇寒后疼痛加剧,得热痛减,形寒肢冷的中药疗法;颈椎骨质增生、腰椎骨质增生、骨性关节炎、产后风湿、骨坏死等疾病的处方药物疗法;现场配制讲解一种风湿病外用药的方法;颈椎、腰椎、膝关节、股骨头坏死CT、X线片的诊断;传授腰椎间盘突出(正骨复位法)、肩周炎一针疗法、膝关节骨刺、背部三棱针疗法、网球肘皮内针刺疗法。

开班时间:常年招生,每月1日、15日准时开课,学期10天,开课前一天为报到日期,详细资料及入学通知汇10元索取。电话:(0319)4338888,地址:河北省巨鹿县中医风湿病专科研究所培训学校(朝阳路),联系人:李老师,邮编:255250。