

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.17.015

实验研究

参芪复方对 2 型糖尿病大鼠腓肠肌病理形态及血清炎症因子的影响

钟文¹, 谢春光^{1*}, 刘桢¹, 朱海燕², 高泓¹, 贾华楠¹

(1. 成都中医药大学临床医学院, 四川省成都市十二桥路 37 号, 610075; 2. 成都医学院第一附属医院)

摘要 目的 探讨参芪复方对 2 型糖尿病骨骼肌损害的影响及可能作用机制。方法 18 只自发性 2 型糖尿病 (GK) 大鼠随机分为模型组、参芪复方组及西格列汀组, 每组 6 只; 另设 Wistar 大鼠 6 只为正常对照组。除正常对照组外, 其余各组给予高脂饮食连续 8 周建立 2 型糖尿病模型。造模同时正常对照组、模型组均按 5 ml/(kg·d) 给予生理盐水灌胃, 参芪复方组按 1.44 g/(kg·d) 给予参芪复方浸膏灌胃, 西格列汀组按 16 mg/(kg·d) 给予磷酸西格列汀片混悬液灌胃。试验结束后检测各组大鼠血清胰岛素样生长因子 1 (IGF-1)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1 β (IL-1 β) 含量, 取腓肠肌称取湿重并观察其病理形态学改变, 检测腓肠肌 p70s6k1 蛋白表达。结果 与正常对照组比较, 模型组大鼠腓肠肌湿重、血清 IGF-1 水平及 p70s6k1 蛋白明显降低 ($P < 0.05$), 血清 TNF- α 、IL-1 β 含量明显升高 ($P < 0.05$), 且病理观察发现腓肠肌细胞萎缩, 有较大面积水肿, 肌间淋巴细胞浸润。与模型组比较, 西格列汀组及参芪复方组大鼠腓肠肌湿重、IGF-1 含量及 p70s6k1 蛋白表达均明显升高, TNF- α 、IL-1 β 含量明显降低 ($P < 0.05$), 且病理观察未见明显肌细胞萎缩、水肿, 炎细胞浸润少。西格列汀组与参芪复方组各指标比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 参芪复方可减轻糖尿病骨骼肌损害, 其可能机制是减少炎症因子含量, 升高血清 IGF-1 水平, 从而维持骨骼肌质量。

关键词 2 型糖尿病; 骨骼肌损害; 参芪复方; 炎症细胞因子; 胰岛素样生长因子 1

2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 是一种多因素引起的慢性代谢障碍性疾病, 机体的代谢紊乱影响了体内重要器官和组织的生理功能, 从而出现各种并发症。糖尿病骨骼肌损害是其并发症之一, 主要表现为骨骼肌萎缩及肌无力等^[1]。研究表明, 60 岁以上的 T2DM 患者较非糖尿病患者发生肌少症的风险更高, 前者肌量减少的风险是后者的 3 倍^[2]。T2DM 本身是一种自然免疫及炎症性疾病, 被认为是慢性低度炎症状态, 与肿瘤坏死因子、白细胞介素等炎症细胞因子密切相关^[3]。参芪复方是我们临床治疗 T2DM 的经验方, 前期研究结果表明, 其具有辅助控制血糖、改善胰岛素抵抗、降低炎症标志物的作用^[4]。本研究进一步观察参芪复方对血清炎症因子的影响并探索其防治糖尿病骨骼肌病变的可能机制。

基金项目: 国家自然科学基金 (81503566)

* 通讯作者: xcg718@yahoo.com.cn, (028) 87769903

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性自发性 2 型糖尿病 GK 大鼠 18 只, 体重 271 ~ 338 g, 5 月龄, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 实验动物合格证号: SCXK (沪) 2012-0002。SPF 级雄性 Wistar 大鼠 6 只, 体重 240 ~ 260 g, 5 月龄, 由成都达硕实验动物有限公司提供, 实验动物合格证号: SCXK (川) 2015-030。

1.2 药物及试剂

参芪复方药物组成: 人参 15 g, 黄芪 15 g, 生地 10 g, 天花粉 10 g, 山萸肉 10 g, 丹参 10 g, 山药 10 g, 熟地黄 6 g, 由四川省中医药研究院中医研究所药剂科制备成浸膏, 1 g 浸膏相当于原生药 10 g; 磷酸西格列汀片 (默沙东公司生产, 国药准字: J20140095) 100 mg, 灭菌乳钵中研成细末, 加入蒸馏水 30 ml 混匀制备混悬液。胰岛素样生长

因子 1 (IGF-1)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1 β (IL-1 β) 试剂盒均购自上海西唐生物科技有限公司,批号分别为 F15780、F16960、F15810; Anti-s6k1 (phosphoT389) 抗体 (货号: ab2571), Abcam 公司。

1.3 主要仪器

EG1150C 分体式石蜡包埋机、RM2235 石蜡切片机,均为德国 Leica Microsystems Nussloch 公司产品; BX53 光学显微镜,日本奥林巴斯株式会社; TGL-16B 离心机,上海安亭科学仪器厂; UTP3000 型电子天平,上海花潮电器有限公司。

1.4 动物分组

18 只 GK 大鼠适应性饲养 1 周后,测两次随机血糖 ≥ 11.1 mmol/L 纳入研究。大鼠按随机血糖由高到低排列编号,采用随机数字表法分为模型组、参芪复方组、西格列汀组,每组 6 只。另设 6 只 Wistar 大鼠为正常对照组。

1.5 造模及给药

正常对照组给予普通饲料,模型组、参芪复方组、西格列汀组,均每日给予高脂饲料 (配方为:普通饲料 88.2%,精炼猪油 10%,胆固醇 1.5%,猪胆盐 0.3%,由四川省中医药科学院实验动物中心加工),连续 8 周,建立 2 型糖尿病模型^[9]。造模同时开始给药,正常对照组、模型组均按 5 ml/(kg·d) 给予生理盐水灌胃;参芪复方组按 1.44 g/(kg·d) 给予参芪复方浸膏灌胃;西格列汀组按 16 mg/(kg·d) 给予磷酸西格列汀片混悬液灌胃。每周定时测大鼠体重,并根据体重变化及时调整灌药量。

1.6 观察指标及方法

1) 给药 8 周后,禁食不禁水 12 h,腹主动脉取血,分离血清放置于 -20°C 低温冰箱中保存,采用酶联免疫分析法测定大鼠血清中 IGF-1、TNF- α 、IL-1 β 的浓度,按试剂盒说明书检测。2) 将动物处死,自股骨内、外踝起点至跟骨结节止点完整取下双侧腓肠肌,电子天平准确称取肌肉湿重。取下

新鲜的腓肠肌组织块置入 10% 多聚甲醛固定液中,经固定后常规石蜡包埋,4 μm 切片,脱水染色后备普通光学显微镜检查。3) 免疫蛋白质印迹法 (Western blot) 检测腓肠肌 p70s6k1 蛋白表达。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 19.0 对数据进行统计分析,计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,方差齐者采用单因素方差分析,方差不齐者采用非参数检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠腓肠肌湿重比较

表 1 示,模型组大鼠腓肠肌湿重较正常对照组明显下降 ($P < 0.05$),参芪复方组和西格列汀组大鼠腓肠肌湿重较模型组明显增加 ($P < 0.05$),而参芪复方组与西格列汀组组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠腓肠肌湿重比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	腓肠肌湿重
正常对照组	6	1.13 $\pm$ 0.02
模型组	6	0.51 $\pm$ 0.04*
参芪复方组	6	1.02 $\pm$ 0.10 Δ
西格列汀组	6	0.98 $\pm$ 0.07 Δ

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

2.2 各组大鼠腓肠肌病理形态比较

图 1 示,光镜下观察正常对照组肌组织排列规则、清晰、完整,未见细胞萎缩、水肿及坏死等,仅有少量纤维蛋白减少 (固定处理有关);模型组肌组织排列紊乱,肌细胞轻度萎缩,有较大面积水肿,可见肌纤维少量自溶,纤维束膜轻度破裂,肌间少量或中量淋巴细胞浸润;参芪复方组肌组织排列规则,未见明显肌细胞萎缩、水肿,可见少量炎细胞浸润,肌细胞坏死断裂少见;西格列汀组肌组织排列规则,肌细胞萎缩不明显,肌细胞水肿范围小、程度轻,中度炎细胞浸润,偶见肌细胞坏死断裂但程度轻。

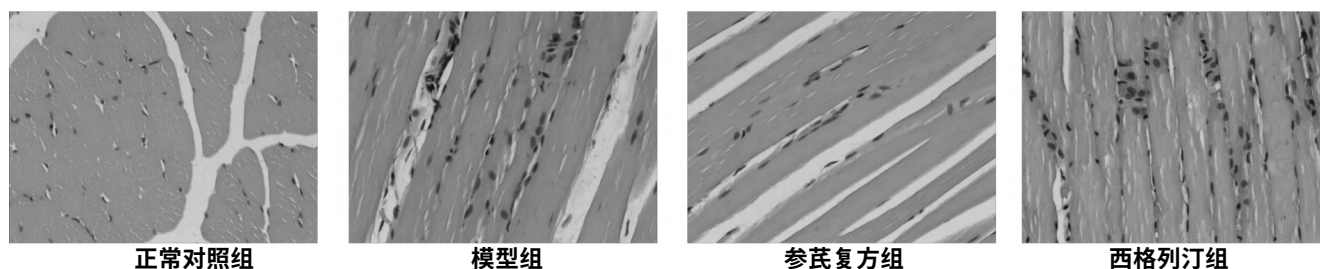


图 1 各组大鼠腓肠肌 HE 染色病理图 ($\times 200$)

2.3 各组大鼠血清 IGF-1、TNF- α 、IL-1 β 含量比较

表 2 示, 与正常对照组比较, 模型组大鼠血清 IGF-1 含量明显降低, TNF- α 、IL-1 β 含量明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 参芪复方组和西格列汀组大鼠血清 IGF-1 含量明显升高, TNF- α 、IL-1 β 含量均显著降低 ($P < 0.05$)。参芪复方组与西格列汀组各指标组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 各组大鼠血清 IGF-1、TNF- α 、IL-1 β 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	IGF-1 (ng/ml)	TNF- α (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)
正常对照组	6	20.30 $\pm$ 3.34	21.51 $\pm$ 7.29	9.37 $\pm$ 3.24
模型组	6	9.83 $\pm$ 1.50*	32.71 $\pm$ 11.75*	20.26 $\pm$ 6.56*
参芪复方组	6	15.03 $\pm$ 2.91 Δ	15.71 $\pm$ 3.67 Δ	6.74 $\pm$ 2.76 Δ
西格列汀组	6	13.30 $\pm$ 1.82 Δ	15.76 $\pm$ 5.31 Δ	11.91 $\pm$ 5.46 Δ

注: IGF-1, 胰岛素样生长因子 1; TNF- α , 肿瘤坏死因子 α ; IL-1 β , 白细胞介素 1 β ; 与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

2.4 各组大鼠腓肠肌 p70s6k1 蛋白表达比较

表 3 示, 与正常对照组比较, 模型组大鼠腓肠肌 p70s6k1 蛋白表达有所降低 ($P < 0.05$); 参芪复方组和西格列汀组大鼠腓肠肌 p70s6k1 蛋白表达较模型组有所升高 ($P < 0.05$), 但两组组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 3 各组大鼠腓肠肌 p70s6k1 蛋白表达比较 ($/GAPDH, \bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	p70s6k1
正常对照组	6	0.79 $\pm$ 0.17
模型组	6	0.54 $\pm$ 0.07*
参芪复方组	6	0.79 $\pm$ 0.13 Δ
西格列汀组	6	0.83 $\pm$ 0.25 Δ

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

3 讨论

《素问·痿论》曰“脾主身之肌肉”;《素问·太阴阳明论》中记载“脾病, ……筋骨肌肉皆无气以生, 故不用焉”。脾为后天之本, 气血生化之源。肌肉(主要指四肢骨骼肌)依赖于脾布散的水谷精微的荣养, 而健硕有力; 若脾气亏虚, 水谷精微不能布散濡养肌肉, 故常见消渴者倦怠乏力、肌肉瘦削。因此, 糖尿病骨骼肌损害的治疗强调健运脾胃以充养四末。参芪复方以健脾益气为主, 方中人参大补元气, 助脾健运; 黄芪善补脾气, 升举阳气, 助脾布散; 人参、黄芪联用为君, 改善脾之运化功能; 山药可补脾固肾, 益气力, 长肌肉; 天

花粉排脓, 消肿毒, 生肌长肉; 丹参排脓止痛, 生肌长肉; 生地黄、山药、山茱萸联用滋阴填精, 有三补之意, 补益先天肾精以养后天脾土; 丹参、熟大黄合用活血化瘀、推陈致新。全方以健脾益气为主, 生肌蕴含其中, 扶正祛邪, 标本兼顾。

现代研究认为, 维持骨骼肌质量需要保持蛋白质合成与降解代谢之间的平衡^[8]。IGF-1 在骨骼肌生长的过程中起到重要的调控作用, 且能抵抗骨骼肌退行性变, 如质量下降、力量减少以及运动单位的重塑, IGF-1 增加将激活 IGF-1 受体介导的骨骼肌肥大相关通路, 从而引起蛋白合成增加及降解减少^[9]。在肌肥大过程中, IGF-1 受体/PI3K/Akt/mTOR 通路被激活, 最终增加蛋白转录正向调节者 p70s6k1, 而后者是蛋白翻译的关键调节因子, 调控骨骼肌的生长和代谢^[8]。研究表明, 炎症细胞因子促使骨骼肌纤维退化及蛋白含量减少, 破坏肌力和耐力^[8]; 系统性炎症加速骨骼肌蛋白质分解代谢, IL-1 及 TNF- α 均与肌量减少、肌力减弱相关^[10]。

本研究结果表明, 模型组较正常对照组 TNF- α 及 IL-1 β 水平明显上升, 而腓肠肌湿重、血清 IGF-1 及骨骼肌 p70s6k1 蛋白表达水平均明显下降, 提示糖尿病处于慢性炎症状态, 可能导致胰岛素抵抗, 削弱骨骼肌蛋白质合成代谢而导致骨骼肌萎缩。经参芪复方治疗后, 腓肠肌湿重、血清 IGF-1 及骨骼肌 p70s6k1 蛋白表达水平均有显著提升, TNF- α 及 IL-1 水平下降, 并且参芪复方作用与西格列汀片疗效相当, 提示参芪复方可能通过降低血清炎症因子, 升高血清 IGF-1 水平, 进而促进骨骼肌蛋白质合成, 防止骨骼肌萎缩, 改善糖尿病骨骼肌病变。

参考文献

- [1] 蒙碧辉, 舒昌达. 糖尿病骨骼肌病变 [J]. 国外医学(内分泌学分册), 2002, 22(5): 336-338.
- [2] KIMTN, PARK MS, YANG SJ, et al. Prevalence and determinant factors of sarcopenia in patients with type 2 diabetes: The Korean Sarcopenic Obesity Study (KSOS) [J]. Diabetes Care, 2010, 33(7): 1497-1499.
- [3] 张黎明. 炎症细胞因子在 2 型糖尿病发病机制中的研究进展 [J]. 重庆医学, 2016, 45(8): 1113-1116.
- [4] 罗茂林. 参芪复方对 GK 大鼠炎症标志物及胰岛素抵抗的作用的实验研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2005.
- [5] KOVACS P, STUMVOLL M. Fatty acids and insulin resistance in muscle and liver [J]. Best Pract Res Clin Endo-

crinol Metab, 2005, 19(4): 625-635.

⑤ 黄燕峰, 魏连波. 骨骼肌蛋白代谢及其调控机制研究进展 [J]. 广东医学, 2015, 36(23): 3728-3731.

⑥ ROMMEL C, BODINE SC, CLARKE BA, et al. Mediation of IGF-I induced skeletal myotube hypertrophy by PI3K/Akt/mTOR and PI3K/Akt/GSK3 pathways [J]. Nat Cell Biol, 2001, 3(11): 1009-1013.

⑦ 马景亮, 陈彩珍, 卢健, 等. 细胞生长中 IGF-I/PI3K/

AKT/mTOR(p70S6K) 信号通路与肌萎缩的关系 [J]. 中国老年学杂志, 2009, 29(1): 108-111.

⑧ JACKMAN RW, KANDARIAN SC. The molecular basis of skeletal muscle atrophy [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2004, 287(4): C834-C843.

⑨ MICHAUD M, BALARDY L, MOULIS G, et al. Proinflammatory cytokines, aging, and age-related diseases [J]. J Am Med Dir Assoc, 2013, 14(12): 877-882.

Effect of *Shenqi Fufang* (参芪复方) on Pathological Morphology and Serum Inflammatory Factors of Gastrocnemius in Type 2 Diabetic Rats

ZHONG Wen¹, XIE Chunguang¹, LIU Ya¹, ZHU Haiyan², GAO Hong¹, JIA Huanan¹

(1. Clinical Medical School, Chengdu University of Chinese Medicine, Chengdu, 610075; 2. First Affiliated Hospital of Chengdu Medical College)

ABSTRACT Objective To explore the effect of *Shenqi Fufang* (参芪复方, SF) on skeletal muscle damage of type 2 diabetes mellitus (T2DM) and its possible mechanism. **Methods** Eighteen rats with spontaneous type 2 diabetes mellitus (GK) were randomized into the model group, SF group and sitagliptin group with six rats in each group, and six more Wistar rats were selected as the control group. Each group was given high fat diet for 8 weeks to build T2DM model except for the control group. At the same time, the control group and the model group were given normal saline 5 ml/(kg · d) by gastric perfusion, the SF group was given SF extract 1.44 g/(kg · d) by gastric perfusion, and sitagliptin group was given sitagliptin phosphate suspension 16 ml/(kg · d) by gastric perfusion. Eight weeks later, the levels of serum insulin-like growth factor 1 (IGF-I), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) were measured in each group, the gastrocnemius muscle was taken out to get the wet weight and observe the pathological changes, and the expression of p70s6k1 protein was detected. **Results** Compared with the control group, the wet weight of the gastrocnemius muscle, the serum IGF-I level and p70s6k1 protein expression in the model group significantly decreased ($P < 0.05$), while the levels of serum TNF- α and IL-1 β significantly increased ($P < 0.05$). Through pathological observation, there existed gastrocnemius muscle cells atrophy, a larger area of edema and interstitial lymphocyte infiltration. Compared with the model group, the wet weight of the gastrocnemius muscle, IGF-I content and p70s6k protein expression in the sitagliptin group and the SF group significantly increased, the contents of TNF- α and IL-1 β significantly decreased ($P < 0.05$), and there were no obvious muscle cell atrophy and edema, and also little inflammatory cell infiltration. There was no significant difference between the sitagliptin group and SF group ($P > 0.05$). **Conclusion** SF could reduce the diabetic skeletal muscle injury; the potential mechanism seems to reduce the inflammatory factor content, improve IGF-I resistance and maintain the skeletal muscle mass.

Keywords type 2 diabetes mellitus; skeletal muscle injury; *Shenqi Fufang* (参芪复方); inflammatory cytokine; insulin-like growth factor

(收稿日期: 2017-04-12; 修回日期: 2017-05-26)

编辑: 邓 媛

赵绍琴教授百年诞辰征文

已故赵绍琴教授是中国当代著名中医学家、中医教育家,其学术成就和临床水平享誉国内外,是北京中医药大学和当代中医界的一面旗帜。为迎接和纪念赵绍琴教授百年诞辰(2018-12-04),北京中医药大学特向海内外中医同仁征集学术论文及纪念文章,内容包括:1) 赵绍琴教授学术思想和临床经验的整理和应用研究;2) 临床运用赵绍琴教授学术经验和方药的治验报告;3) 赵绍琴教授百年诞辰纪念文章。

征文无体例、字数限制,曾经公开发表与否不限,篇数不限。已发表过的文章请注明出处,并征得原出版机构的同意。入选征文将汇编成《赵绍琴学术经验整理研究与临床应用》,并于2018年12月前正式出版。征文请附100字以内的作者简介。入选作者均将被邀请参加赵绍琴百年诞辰纪念暨学术研讨会。征文征集截止时间:2018年5月30日。请用WORD文档发送至邮箱:995091676@qq.com 或 sxg6428@163.com。联系人:赵艳;联系电话:010-64286832。