

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2015.03.018

# 健脾消渴方对 2 型糖尿病大鼠胰岛细胞分泌功能的影响

黄延芹\*

(山东中医药大学附属医院, 山东省济南市经十路 16369 号, 250011)

**摘要** 目的 探讨健脾消渴方对 2 型糖尿病 (T2DM) 的作用及机制。方法 将 46 只大鼠随机分为正常组 (10 只) 和造模组 (36 只)。正常组常规饲料喂养, 造模组大鼠高糖高脂饲料喂养。6 周后, 造模组大鼠一次性腹腔内注射链脲佐菌素 (30 mg/kg) 建立 T2DM 模型。36 只造模成功大鼠随机分为模型组、优降糖组、中药组, 每组 12 只。优降糖组给予优降糖混悬液 0.27 mg/(kg·d) 灌胃, 中药组给予健脾消渴方水煎液 6.36 g/(kg·d) 灌胃, 正常组和模型组给予等量生理盐水。6 周后观察大鼠体重并检测各组大鼠空腹血糖 (FBG)、空腹胰岛素 (FINS)、胰高血糖素 (GC), 计算胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR) 及胰岛素分泌指数 (HOMA-β), 免疫荧光分析胰岛 β、α 细胞在胰腺中的分布和定位。结果 优降糖组和中药组给药后 FBG、体重较本组给药前显著下降, 并且 FBG 较同时时间点的模型组显著降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。与模型组比较, 优降糖组和中药组 GC 水平下降明显 ( $P < 0.01$ ), FINS、HOMA-β 水平升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 优降糖组 FINS、HOMA-IR、HOMA-β 水平明显高于中药组 ( $P < 0.05$ )。免疫荧光显示中药组胰岛 β 细胞数量较模型组和优降糖组明显增多, 胰岛 α 细胞数量减少。结论 健脾消渴方可升高 T2DM 大鼠 FINS、降低 GC 及改善胰岛素抵抗, 调节胰岛 α、β 细胞在胰腺分布和数量, 这可能是其作用机制之一。

**关键词** 健脾消渴方; 2 型糖尿病; 胰岛素抵抗; 血糖; 胰岛细胞

胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞受损是 2 型糖尿病 (T2DM) 的显著特征, 其中胰岛 β 细胞功能是决定 T2DM 发病的关键和中心环节<sup>[1]</sup>。近年来, 胰高血糖素 (GC) 在糖尿病 (DM) 中的作用也逐渐引起人们的重视。如有效控制 GC 水平, 将减少胰岛素的需要, 间接起到保护胰岛 β 细胞的作用<sup>[2]</sup>。我们在消渴方 (《丹溪心法》) 的基础上, 结合临床经验组建健脾消渴方, 本研究观察该方对糖尿病大鼠胰岛细胞的可能调控作用。

## 1 材料及方法

### 1.1 实验动物

健康 SPF 级雄性 Wistar 大鼠 46 只, 体重 (200 ± 25) g, 由山东鲁抗医药有限公司实验动物中心提供, 实验动物许可证号: SCXK 鲁 20130001。标准饲料喂养 1 周, 室温 20 ~ 25℃, 湿度 50% ~ 65%, 每日光照正常, 空气流通, 自

由摄食、饮水。

### 1.2 药物

健脾消渴方处方: 黄芪 15 g, 黄连 9 g, 天花粉 12 g, 生地黄 12 g, 川牛膝 9 g, 佩兰 12 g, 药物购于山东中医药大学附属医院, 煎煮浓缩至 1 g/ml。优降糖 (2.5 mg/片): 广东华南药业集团有限公司, 国药准字 H44020768。

### 1.3 主要试剂及仪器

高脂高糖饲料: 清洁级, 配方为 10.0% 猪油、20.0% 蔗糖、10.0% 蛋黄粉、0.5% 胆酸钠和 59.5% 常规饲料, 北京科澳协力饲料有限公司, 合格证号: SCXK (京) 2009 - 0012; 链脲佐菌素 (STZ, 批号: 12110345): 美国 Sigma 公司; 大鼠胰岛素放免试剂盒 (批号: 20131228): 北京北方生物技术研究所; 大鼠胰高血糖素酶联免疫试剂盒 (批号: 2013090867): 北京华英生物技术研究所; 兔抗大鼠胰岛素多克隆抗体 (批号: 13015327): Bioss 公司; 兔抗大鼠胰高血糖素多克隆抗体 (批号: 13020724): Bioss 公司; 柠檬酸缓冲液 (批

基金项目: 山东省科技发展计划项目 (2006GG3202011)

\* 通讯方式: dahuang79@126.com, (0531) 68616010

号: 21536594): 溧阳市东郊化工厂; 水合氯醛 (批号: T20120403): 青岛宇龙海藻有限公司。

ME235P 电子分析天平: 德国赛多利斯产品; 稳豪型血糖仪及配套血糖试纸: 美国强生公司; 超级低温冰箱: 美国 Thermo Forma 公司; AU2700 全自动血生化仪: 日本 Olympus 公司; ELx808 全自动酶标仪: 美国 BioTek 公司产品; 石蜡切片机及石蜡包埋机: 德国 Leica 公司; DC-300F 免疫荧光显微镜: 德国 Leica 公司。

#### 1.4 动物分组及处理

采用随机数字表法将大鼠分为正常组 (10 只) 和造模组 (36 只)。正常组常规饲料喂养, 造模组大鼠高糖高脂饲料喂养。6 周后, 大鼠禁食不禁水 12 h, 称重, 造模组大鼠一次性腹腔内注射 STZ (30 mg/kg, 溶于 0.1 mmol/L 柠檬酸缓冲液, pH 4.5, 终浓度为 4%, 冰浴, 现配现用, 20 min 内用完), 正常组大鼠按 0.1 ml/100 g 剂量腹腔注射柠檬酸缓冲液 (0.1 mmol/L, pH4.5)。72 h 后造模组大鼠尾静脉采血, 血糖  $\geq 16.7$  mmol/L 为 T2DM 模型成功<sup>[4]</sup>。

36 只造模成功大鼠采用随机数字表法分为模型组、优降糖组、中药组, 每组 12 只。根据 DM 饮食控制原则, 所有大鼠均给予常规饲料喂养。优降糖组给予优降糖混悬液 0.27 mg/(kg·d) 灌胃, 2 周后, 随机血糖  $> 11.1$  mmol/L 为控制不佳<sup>[4]</sup>, 优降糖剂量加倍; 中药组给予中药水煎液 6.36 g/(kg·d) 灌胃; 正常组和模型组给予等量生理盐水。各组大鼠均自由饮水, 共灌胃 6 周。

#### 1.5 观察指标及方法

实验结束, 大鼠禁食 12~14 h, 禁水 2 h 后称重, 以水合氯醛 (30 mg/kg) 腹腔麻醉, 大鼠仰卧位固定, 局部消毒后沿腹正中中线打开腹腔, 经腹主动脉取血 10 ml, 12000 r/min 离心 10 min, 分离血清, 置 -20℃ 冰箱保存备用。分离胰腺周围脂肪并取出胰腺, 将胰腺标本置于 4% 中性甲醛固定液。

1) 一般情况: 大鼠精神状态、饮食及活动情况、毛色、饮水量、尿量等。2) 体重: 分别于给药前后提大鼠尾部促使其排空尿液测量体重。3) 空腹血糖 (FBG): 采用 AU2700 全自动生化分析仪检测。4) 空腹胰岛素 (FINS) 测定: 采用鼠胰岛素放射免疫试剂盒, 计算胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR) =  $\text{FBG} \times \text{FINS} / 22.5$ <sup>[4]</sup>, 胰岛素分泌指数 (HOMA- $\beta$ ) =  $20 \times \text{FINS} / (\text{FBG} - 3.5)$ <sup>[4]</sup>。5) 血清 GC 测定: 采用大鼠 GC 酶联免疫试剂盒。6)

免疫荧光检测: 大鼠胰腺固定后以石蜡包埋, 切片厚度 4  $\mu\text{m}$ , 做免疫荧光检测胰岛  $\beta$ 、 $\alpha$  细胞在胰腺中的分布和定位。

#### 1.6 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件包进行数据统计分析, 计量资料采用 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组内比较采用  $t$  检验, 各组间比较采用单因素方差分析。

### 2 结果

#### 2.1 各组大鼠一般情况观察

实验结束时, 模型组死亡 3 只, 优降糖组死亡 3 只, 中药组死亡 1 只, 正常组无死亡。分析大鼠死亡原因: 1) 严重高血糖引起酮症酸中毒或高渗性昏迷造成大鼠代谢紊乱加重, 严重电解质紊乱及各脏器功能衰竭; 2) 高血糖合并严重感染; 3) 实验过程较长, 血糖不能有效控制, 可能会出现严重血管并发症致大鼠死亡。

正常组大鼠饮食、饮水正常, 精神良好, 毛发光泽, 眼光有神, 反应敏捷, 粪便呈麦粒样, 尿量正常, 体重呈进行性增长。模型组大鼠多饮多食多尿症状明显, 毛发竖立无光泽, 逐渐出现精神萎靡, 反应欠灵敏, 眼光呆滞, 蜷卧拱背, 粪便时而不成形, 体重减轻。优降糖组和中药组大鼠多饮多尿明显减轻, 精神好转, 反应较模型组大鼠灵敏, 毛发较为光泽。

#### 2.2 各组大鼠给药前后 FBG 水平和体重比较

表 1 示, 给药前模型组、优降糖组和中药组大鼠 FBG 和体重均较正常组明显升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 优降糖组和中药组给药后 FBG 较本组给药前显著下降, 并且较同时时间点的模型组显著降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。正常组给药后大鼠体重较给药前增加 ( $P < 0.05$ ), 模型组、优降糖组、中药组体重下降明显 ( $P < 0.05$ )。给药后中药组大鼠 FBG 高于优降糖组, 体重明显低于优降糖组 ( $P < 0.05$ )。

#### 2.3 各组大鼠 GC、FINS、HOMA-IR 和 HOMA- $\beta$ 水平比较

表 2 示, 与正常组比较, 模型组 GC、HOMA-IR 水平明显升高, FINS、HOMA- $\beta$  水平下降 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。与模型组比较, 优降糖组和中药组 GC 水平下降明显 ( $P < 0.01$ ), FINS、HOMA- $\beta$  水平升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 中药组 HOMA-IR 水平下降 ( $P < 0.05$ )。优降糖组 FINS、HOMA-IR、HOMA- $\beta$  水平明显高于中药组 ( $P < 0.05$ )。

表 1 各组大鼠给药前后 FBG 水平、体重比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别   | 鼠数 | FBG (mmol/L)               |                              | 体重 (g)                     |                              |
|------|----|----------------------------|------------------------------|----------------------------|------------------------------|
|      |    | 给药前                        | 给药后                          | 给药前                        | 给药后                          |
| 正常组  | 10 | 4.26 ± 0.32                | 4.08 ± 0.52                  | 366.6 ± 25.89              | 522.7 ± 44.22*               |
| 模型组  | 9  | 26.41 ± 3.22 <sup>△△</sup> | 25.44 ± 4.76 <sup>△△</sup>   | 459.0 ± 48.26 <sup>△</sup> | 344.8 ± 41.25* <sup>△△</sup> |
| 优降糖组 | 9  | 23.91 ± 2.18 <sup>△△</sup> | 18.54 ± 3.16** <sup>▲▲</sup> | 477.9 ± 48.31 <sup>△</sup> | 377.0 ± 40.00*               |
| 中药组  | 11 | 26.12 ± 3.92 <sup>△△</sup> | 21.18 ± 3.15* <sup>▲#</sup>  | 450.7 ± 30.43 <sup>△</sup> | 339.5 ± 35.98* <sup>#</sup>  |

注: FBG, 空腹血糖; 与本组给药前比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与正常组同时时间点比较,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$ ; 与模型组同时时间点比较,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$ ; 与优降糖组同时时间点比较,  $\#P < 0.05$

表 2 各组大鼠 GC、FINS、HOMA-IR 和 HOMA-β 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别   | 例数 | GC (pg/ml)                   | FINS (mIU/L)               | HOMA-IR                    | HOMA-β                     |
|------|----|------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 正常组  | 10 | 150.36 ± 16.14               | 23.03 ± 1.17               | 5.72 ± 0.74                | 163.16 ± 18.79             |
| 模型组  | 9  | 227.32 ± 23.58*              | 12.35 ± 1.16*              | 16.17 ± 1.25**             | 16.21 ± 1.24**             |
| 优降糖组 | 9  | 168.93 ± 21.34 <sup>△△</sup> | 20.75 ± 1.39 <sup>△</sup>  | 15.75 ± 0.92               | 58.26 ± 5.64 <sup>△△</sup> |
| 中药组  | 11 | 172.95 ± 26.62 <sup>△△</sup> | 16.02 ± 1.04 <sup>△▲</sup> | 11.34 ± 1.04 <sup>△▲</sup> | 21.07 ± 1.71 <sup>△▲</sup> |

注: GC, 胰高血糖素; FINS, 空腹胰岛素; HOMA-IR, 胰岛素抵抗指数; HOMA-β, 胰岛素分泌指数; 与正常组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$ ; 与优降糖组比较,  $\Delta P < 0.05$

2.4 各组大鼠胰岛 α、β 细胞在胰腺中的分布和定位

正常组大鼠胰岛 β 细胞聚集在胰岛中心, 数量较多, 均匀分布; 胰岛 α 细胞在胰腺分布在胰岛细胞周边, 数量较少, 分布均匀。模型组大鼠胰岛 β 细胞数量明显减少, 较正常组偏离胰岛中心, 分布不均匀; 胰岛 α 细胞数量明显增多, 分布不均匀, 逐渐向胰岛中心聚集。优降糖组胰岛 β 细胞数量较模型组增多, 仍占据胰岛中心; 胰岛 α 细胞数量较模型组减少, 分布在胰岛中心, 周边 α 细胞数量明显减少。中药组胰岛 β 细胞数量较模型组和优降糖组明显增多, 聚集在胰岛中心, 胰岛 α 细胞数量较模型组和优降糖组明显减少, 分布以胰岛周边为主, 在胰岛中心有散在分布。

3 讨论

T2DM 的主要特征是胰岛 β 细胞功能受损和胰岛素抵抗, 胰岛 β 细胞功能是决定 T2DM 发生的关键。胰岛 β 细胞功能受损包括胰岛 β 细胞分泌胰岛素的功能下降和 β 细胞数量的减少, β 细胞形态学改变与胰岛素的分泌能力关系密切<sup>[7]</sup>。一直以来, 胰岛 β 细胞和胰岛素在 DM 发病机制中的作用是人们关注的重点, 胰岛 α 细胞和 GC 的作用未引起重视。胰岛 α 细胞分布于胰岛团的周围, 仅占胰岛细胞总量的 20% 左右, 在机体糖代谢中发挥着不可替代的作用。正常情况下, 餐后血糖升高会刺激 β 细胞分泌胰岛素, 抑制 α 细胞分泌 GC<sup>[8]</sup>; 随着血糖及胰岛素水平的降低, α 细胞增加 GC 的分泌, 增加肝糖的输出, 防止低血糖的发

生, 故胰岛素和 GC 的比值是决定血糖浓度的重要因素<sup>[9]</sup>。有研究表明, 对 GC 分泌抑制不足是 DM 患者的血糖明显升高的一个重要原因<sup>[10]</sup>, GC 通过调节肝脏 kisspeptin 使胰岛素分泌受损, 导致 DM 发生<sup>[11]</sup>。所以说, 胰岛 α 细胞的病理改变及 GC 的分泌异常也参与了 T2DM 的发病, 打破胰岛素与 GC 之间的平衡则会导致 T2DM 的发生, 改善胰岛 α 细胞结构和功能可能成为治疗 DM 的另一机制。

健脾消渴方中黄芪健运脾气, 助运化、敛脾精、止消渴, 为君药。黄连味苦性寒, 清热燥湿解毒, 与黄芪二者相配, 寒温并用, 温不伤阴, 寒不伤气, 湿去则能恢复脾之健运之气。生地黄既能滋阴清热, 又可通过培补先天肾之阴滋养后天脾。天花粉清热养阴, 生津止渴, 既善清肺卫之热, 又擅养胃阴, 为治疗内热消渴之良药。黄连配伍天花粉, 清热兼顾滋阴生津。三味共为臣药, 收到养阴清热祛湿之效。用佩兰取其芳香化湿之功效, 佐黄芪健脾祛湿, 恢复脾之运化, 佐黄连祛除湿热。川牛膝一药多用, 一有补肝肾之功, 填精补髓, 配黄芪增强脾肾功能; 二有活血化瘀之效, 改善微循环; 三能导热引血下行, 以降炎上之火, 为使药。全方配伍, 共奏益气养阴、清热生津、活血化浊之功效。

实验结果显示, 健脾消渴方可降低大鼠 FBG 及 GC 水平, 升高 FINS 和 HOMA-β 水平, 改善胰岛素抵抗, 降低体重。免疫荧光显示健脾消渴方能修复 DM 大鼠胰岛 β 细胞减少胰岛 α 数量, 增加胰岛 β 的数量, 调整胰岛 β、α 细胞在胰腺的分

布,有利于胰岛  $\beta$  细胞功能的恢复,这可能是健脾消渴方可能的作用机制之一。

# 参考文献

- [1] 全小林,赵昱,陈良,等. 胰岛  $\beta$  细胞功能保护的中医认识与对策 [J]. 中医杂志,2006,47(12):888-890.
- [2] 洪天配. 新型口服降糖药 DPP-4 抑制剂:从胰岛  $\alpha$  细胞看 2 型糖尿病治疗的新进展 [J]. 中国糖尿病杂志,2012,20(7):558-560.
- [3] 施红,王麒又,辛金钟,等. 2 型糖尿病大鼠模型中医证型演变的实验研究 [J]. 中医杂志,2011,52(5):408-412.
- [4] 任曙光,吴建华,巨英超. 天麦消渴片对糖尿病模型大鼠血糖的影响 [J]. 中医杂志,2011,52(19):1679-1681.
- [5] 付真真,顾经宇,郭雯,等. 利用 Botnia 钳夹技术评估新简易胰岛素抵抗指数在 2 型糖尿病患者中与胰岛素抵抗的相关性 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2013,33(5):641-645.
- [6] 李永玲,邓华聪,糜公仆,等. 2 型糖尿病患者血糖、血脂、氧化应激与  $\beta$  细胞功能的相关性研究 [J]. 解放军

医学杂志,2011,36(6):636-639.

- [7] 张瑞珍,刘成桂. 胰岛素抵抗、胰岛素分泌缺陷与高胰岛素血症和 2 型糖尿病的关系 [J]. 检验医学与临床,2009,6(2):122-124.
- [8] Leung YM, Ahmed I, Sheu L, et al. Insulin regulates islet  $\alpha$ -cell function by reducing K-ATP channel sensitivity to adenosine 5'-triphosphate inhibition [J]. Endocrinology, 2006,147(5):2155-2162.
- [9] Sloop KW, Michael MD, Moyers JS. Glucagon as target for the treatment of type 2 diabetes [J]. Expert Opin Ther Targets, 2005,9(3):593-600.
- [10] Marroquí L, Alonso-Magdalena P, Merino B, et al. Nutrient regulation of glucagon secretion: involvement in metabolism and diabetes [J]. Nutr Res Rev, 2014,27(1):48-62.
- [11] Song WJ, Mondal P, Wolfe A, et al. Glucagon regulates hepatic kisspeptin to impair insulin secretion [J]. Cell Metab, 2014,19(4):667-681.

## Effect of Jianpi Xiaoke Formula on the Secretion of Islet Cells of Type 2 Diabetes Mellitus Rats

HUANG Yanqin

(Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Shandong Province, 250011)

**ABSTRACT Objective** To analyze the effect and possible mechanism of *Jianpi Xiaoke Formula* (JPXKF) on type 2 diabetes mellitus (T2DM) rats. **Methods** Totally 46 rats were randomly assigned to normal group ( $n = 10$ ) and model-making group ( $n = 36$ ). The normal group was given regular forage, while the model group was fed with high-glucose and high-fat forage. After 6 weeks, the model-making group were intraperitoneally injected with streptozotocin (30 mg/kg) to make T2MD models, and the 36 successfully made models rats were randomly divided to Model group, Glibenclamide group, TCM group, with 12 rats in each. The Glibenclamide group and TCM group were given glibenclamide suspension 0.27 mg/(kg·d) and JPXKF decoction 6.36 g/(kg·d) by gavage respectively, while the normal group and Model group were given the same amount of normal saline. After six weeks, all rats were weighed and fasting blood glucose (FBG), fasting insulin (FINS), glucagon (GC) were tested. Insulin resistance index (HOMA-IR) and insulin secretion index (HOMA- $\beta$ ) were calculated. Immunofluorescence was used to analyze the distribution and localization of islet  $\beta/\alpha$  cells in the pancreas. **Results** The FBG and weight of the Glibenclamide group and TCM group were significantly decreased after treatment, and decrease of FBG at the same time was more significant compared with the Model group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Compared with the Model group, the GC levels of the Glibenclamide group and TCM group were significantly lower ( $P < 0.01$ ), while FINS, HOMA- $\beta$  levels were significantly higher ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The FINS, HOMA-IR, HOMA- $\beta$  levels of the Glibenclamide group were significantly higher than those of the TCM group ( $P < 0.05$ ). Immunofluorescence test showed that the number of islet  $\beta$  cells in the TCM group were significantly more while the number of islet  $\alpha$  cells was reduced than that of the Model group and Glibenclamide group. **Conclusion** JPXKF could increase FINS, decrease GC, reduce insulin resistance and regulate the distribution and number of islet  $\alpha$ ,  $\beta$  cells in T2DM rat, which may be one of the mechanisms.

**Keywords** *Jianpi Xiaoke Formula*; type 2 diabetes mellitus (T2DM); insulin resistance; blood glucose; islet cells

(收稿日期: 2014-05-29; 修回日期: 2014-09-11)

编辑: 邓 媛