

GXNh、GXN I和 PC组,尤以纤维间隔及肝窦处的间质细胞胞浆棕黄色着色明显增多,与 M组相比,MMP-13的表达显著升高($P<0.05$)。GXN I组与 PC组相比无统计学差异($P>0.05$);GXNh组与 GXN I组和 PC组相比有统计学差异($P<0.05$)。

2.3 TMP-1的表达

TMP-1在 N组汇管区的血管壁和胆管壁周围有少量阳性染色。M组 TMP-1阳性染色表达部位和 MMP-13组一致,与 N组相比有统计学差异($P<0.05$)。GXNh、GXN I和 PC组仅见汇管区和纤维间隔中有少量较淡的阳性染色,与 M组相比表达明显下降($P<0.05$)。GXN I组与 PC组相比无统计学差异($P>0.05$);GXNh组与 GXN I组和 PC组相比有统计学差异($P<0.05$)。

3 讨论

MMP-13或胶原酶 3属于中性蛋白酶一族,需锌离子的激活,专门降解 I、III型间质胶原酶,胶原酶活性的正常调控受到破坏可促进肝纤维化的进展,而造成肝纤维化、肝硬化形成的主要原因之一是特异性降解 I、III型胶原的间质胶原酶在纤维化进展期活性下降所致。TMP-1则为 MMP-13的抑制物。MMP-13与 TMP-1在肝纤维形成过程中主要由激活的 HSC分泌。Iredale JP等认为肝纤维化过程中 TMP-1与 MMP-13动态平衡破坏即前者升高后者降低的结果是促进了胶原纤维的累积并促进肝纤

维化的发展,我们发现 TMP-1在模型组于纤维间隔、中央静脉周围、肝窦处的间质细胞胞浆可见大量棕黄色着色,MMP-13亦可见表达,应用肝心宁后,TMP-1表达明显减少,而 MMP-13表达则显著升高。模型组肝纤维化程度与 TMP-1蛋白表达升高呈正相关,由此可见,CCl₄造模诱导肝纤维化 6周末,TMP的蛋白表达显著升高,而 MMP-13的蛋白表达明显降低,MMP-13/TMP-1的不平衡表达,可能是肝纤维化形成的主要原因。而同时给予肝心宁后,MMP-13则显著升高,TMP-1则明显降低,说明肝心宁可以逆转该不平衡,促进过多 ECM的降解,因此,肝心宁是否对 MMP-13有激活作用尚未知,但我们认为不能排除这种可能性。对模型组、肝心宁高剂量组及肝心宁低剂量组 α -SMA、MMP-13及 TMP-1三者之间蛋白表达的相关性进行分析表明,各组 α -SMA与 TMP-1二者蛋白表达有正相关,而与 MMP-13蛋白表达呈负相关,由此亦可说明,HSC在肝纤维化形成的过程中发挥着重要作用,而肝心宁使肝纤维化的程度明显减轻很可能是通过抑制 HSC的活化起作用的。

1 北京中医药大学东直门医院(100700)

2 新疆维吾尔自治区中医医院耳鼻喉科

3 成都中医药大学临床医学院

桑精胶囊对 2型糖尿病大鼠葡萄糖和脂质代谢的影响

张 馨¹ 陆付耳² 邹 欣² 徐丽君² 董 慧² 杨明炜²

桑精胶囊由桑叶、桑椹、桑枝和桑白皮等药组成,临床用于治疗 2型糖尿病(T2DM)显示出良好的效果。本研究所前期研究证明,桑精胶囊能显著 T2DM大鼠的胰岛素抵抗(IR)^[1]。为进一步明确其对 T2DM的治疗效应,本实验主要观察桑精胶囊对 T2DM大鼠葡萄糖和脂质代谢的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及饲料

清洁级雄性 Wistar大鼠 60只,约 2月龄,体重 200~220g 购于湖北省实验动物研究中心(许可证号:SCXK(鄂)2007-0005)。基础饲料购于华中科技大学同济医学院实验动物中心,高脂高热卡饲料按配方(蔗糖:猪油:奶粉:鸡蛋:基础饲料=30:20:4:2:63)配制。

1.2 药物及试剂

桑精胶囊由桑叶、桑椹、桑枝和桑白皮等药按 2:4:2:3比例组成,生药均购于武汉同济医院,水煎醇沉后浓缩成浸膏(1ml浸膏相当于 2g桑精胶囊生药),置 4℃冰箱保存备用。二甲双胍(MF),成都川力制药有限公司

产品(批号:060910),临用前用双蒸水配制成含二甲双胍 61mg/ml的混悬液;链脲佐菌素(STZ),Sigma公司产品(批号:060811);葡萄糖测定试剂盒为北京北化康泰临床试剂有限公司产品;胰岛素放免测定试剂盒为北京北方生物技术研究所以产品;甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、载脂蛋白 A I(ApoA I)和载脂蛋白 B(ApoB)测定试剂盒均为温州东瓯生物工程有限公司产品;游离脂肪酸(FFA)测定试剂盒为南京建成生物工程研究所产品。

1.3 动物造模及分组处理

动物基础饲料适应性喂养 2周后按体质量随机分为正常对照组 10只和造模组 50只。造模方法参考文献[2]并结合本实验室经验^[3],造模组按 25mg/kg剂量经尾静脉注射 STZ溶液 1次,并饲以高脂高热卡饲料。2周后作口服葡萄糖耐量试验(OGTT),50%葡萄糖溶液按 2.2g/kg剂量灌胃,用剪尾法在灌胃前及灌胃后 30、60和 120min从尾静脉采血检测血糖值。筛选糖耐量异常者共

36只(根据正常大鼠血糖值计算出 95%可信度的正常范围,有两个时间点血糖值高于相应时间点血糖正常范围上限,或有 1个时间点血糖值高于相应时间点血糖正常范围上限 20%,被认为是糖耐量异常大鼠),按体质量随机分为模型组、二甲双胍组、桑精胶囊组各 12只。桑精胶囊组:按剂量 6g/kg体质量给大鼠灌服上述桑精胶囊混悬液,每日 9:00~10:00灌胃 1次(以下各组灌胃药液容积及灌胃时间相同);二甲双胍组:按 184mg/kg体质量灌服上述二甲双胍混悬液;模型组:灌等容积双蒸水。以上 3组在治疗期间仍饲以高脂高热卡饲料,正常对照组不予任何干预,均喂养 8周,每周测体质量 1次。末次给药后禁食 12h行 OGTT。OGTT结束后继续喂养动物 1周,禁食 12h后以 50mg/kg戊巴比妥腹腔注射麻醉,腹主动脉取血 10ml 30min内取血清,置 -20℃冰箱保存,2周内进行相关指标检测。

1.4 生化指标的检测

血糖采用葡萄糖氧化酶法测定;胰岛素采用放免法测定;TG和 TC采用酶学方法测定;HDL-C和 LDL-C采用磷钨酸镁沉淀法测定;ApoA I和 ApoB采用免疫透射比浊法测定;FFA采用铜试剂显色法测定,均按试剂盒说明书进行检测。

1.5 胰岛素敏感性的评估

采用稳态模型评估法^[4]计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)和胰岛β细胞功能指数(HOMA-β);采用李光伟等^[5]提出的方法计算胰岛素敏感指数(ISI)。HOMA-IR和 ISI评价胰岛素敏感性,HOMA-β评价基础状态下的胰

岛素分泌。

$$\text{HOMA-IR} = \text{FPG} \times \text{FINS} / 22.5;$$

$$\text{HOMA-}\beta = 20 \times \text{FINS} / (\text{FPG} - 3.5) \text{ (剔除结果中的负值)};$$

$\text{ISI} = 1 / (\text{FPG} \times \text{FINS})$,因以上数据均为非正态分布,故分析时取其自然对数值。

FBG即空腹血糖水平、FINS即空腹胰岛素水平。

1.6 统计学方法

实验数据均以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 11.5软件处理,多组比较选用方差分析。

2 结果

2.1 桑精胶囊对 T2DM大鼠体质量的影响

本实验观察到模型组大鼠生长迅速,形体肥硕。模型组大鼠体质量增加程度显著高于正常组,提示高脂高热卡饲料可以使动物形成肥胖。各用药组大鼠体质量增长明显低于模型组,桑精胶囊组大鼠体质量与二甲双胍组比较差异无统计学意义,提示该药具有降低 T2DM 大鼠体质量的作用。

2.2 桑精胶囊对 T2DM大鼠葡萄糖耐量及空腹胰岛素水平的影响

药物干预 8周后进行 OGTT 结果显示,与正常组比较,模型组大鼠空腹血糖(FBG)和空腹胰岛素(FINS)水平以及糖负荷后血糖水平均明显升高($P < 0.01$)。桑精胶囊组 FBG和 FINS水平以及糖负荷后血糖水平与模型组比较均显著下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),与二甲双胍组比较差异无统计学意义。见表 1。

表 1 各组大鼠空腹血糖、空腹胰岛素和口服葡萄糖耐量试验结果($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	FBG(mmol/L)	FINS(mIU/L)	BG ^{-1h} (mmol/L)	BG ^{-2h} (mmol/L)
正常组	10	3.52±0.28	23.27±8.17	6.52±0.69	5.92±0.75
模型组	12	5.87±0.36**	32.45±13.32*	12.37±1.35**	8.58±1.47**
二甲双胍组	12	3.56±0.21△△	21.59±7.26△△	8.27±0.79△△	7.27±0.84△△
桑精胶囊组	12	3.54±0.18△△	24.18±5.95△	8.76±0.87△△	6.81±0.61△△

注:与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$

2.3 桑精胶囊对 T2DM大鼠胰岛素敏感性的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠 HOMA-IR升高同时 HOMA-β和 ISI显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。桑精胶囊能有效降低实验动物 HOMA-IR同时提高 HOMA-β和 ISI($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),作用效果与二甲双胍比较差异无统计学意义。见表 2、3。

2.4 桑精胶囊对 T2DM大鼠脂质代谢的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠血清 TG、TC、LDL-C、ApoB和 FFA含量均明显升高,HDL-C和 ApoA I水平则显著降低($P < 0.01$)。桑精胶囊组大鼠血清 TG、TC、LDL-C、ApoB和 FFA含量较模型组均明显下降,HDL-C和 ApoA I水平则显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),表明桑精胶囊有显著改善脂质代谢异常的作用,且桑精胶囊降低 TG、TC、LDL-C效果明显优于二甲双胍($P < 0.01$)。

表 2 各组胰岛素抵抗指数和胰岛素敏感指数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	ln(HOMA-IR)	ln(ISI)
正常组	10	1.23±0.43	-4.34±0.43
模型组	12	2.04±0.51*	-5.16±0.51**
二甲双胍组	12	1.17±0.41△	-4.28±0.41△△
桑精胶囊组	12	1.30±0.30△	-4.42±0.29△△

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$

表 3 各组胰岛β细胞功能指数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	ln(HOMA-β)
正常组	5	7.28±0.52
模型组	12	5.53±0.54*
二甲双胍组	6	7.32±0.49△
桑精胶囊组	6	7.67±0.36△

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,△ $P < 0.01$

表 4 各组血清 TG、TC、HDL-C和 LDL-C比较 (mmol/L $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	TG	TC	HDL-C	LDL-C
正常组	10	0.61±0.18	1.69±0.11	1.17±0.09	0.86±0.12
模型组	12	2.04±0.13*	2.32±0.14*	0.60±0.12*	1.50±0.16*
二甲双胍组	12	1.27±0.04 Δ	1.95±0.08 Δ	1.00±0.09 $\Delta\Delta$	1.12±0.12 $\Delta\Delta$
桑精胶囊组	12	1.07±0.08 $\Delta\#$	1.80±0.12 $\Delta\#$	1.09±0.07 $\Delta\Delta$	0.94±0.16 $\Delta\Delta\#$

注:与正常组比较,* P<0.01;与模型组比较, Δ P<0.05, $\Delta\Delta$ P<0.01;与二甲双胍组比较, $\Delta\#$ P<0.01

表 5 各组血清 ApoAⅠ、ApoB和 FFA比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	ApoAⅠ (g/L)	ApoB (g/L)	FFA (μ mol/L)
正常组	10	1.06±0.22	0.36±0.06	424.20±74.40
模型组	12	0.68±0.13*	0.56±0.10*	586.34±79.90*
二甲双胍组	12	0.91±0.09 Δ	0.42±0.08 Δ	429.29±95.38 Δ
桑精胶囊组	12	0.93±0.14 Δ	0.42±0.13 Δ	442.40±92.83 Δ

注:与正常组比较,* P<0.01;与模型组比较, Δ P<0.01

见表 4、5。

3 讨论

流行病学研究表明,肥胖已成为世界范围内的流行病,肥胖常与 T2DM 合并存在,是 T2DM 的重要危险因素。肥胖特别是内脏型肥胖,增生或肥大的脂肪细胞分泌大量炎症因子,参与对胰岛素信号转导的干扰和 IR 的形成,进而导致糖尿病的发生发展^[6-7]。DeCristofaro等^[8]发现肥胖者体内葡萄糖利用降低,FFA 升高。高 FFA 血症是肥胖引发 IR 的重要因素,可使胰岛素受体的数量和活性降低,从而降低组织对胰岛素的敏感性。本实验观察到类似现象:模型组大鼠肥胖、血清 FFA 水平升高,呈明显胰岛素抵抗状态。桑精胶囊干预后,大鼠体质量明显减轻,效果与二甲双胍相当。

T2DM 是一种异质性疾病,其发病中心环节是 IR 和胰岛 β 细胞功能衰竭,IR 是 2 型糖尿病的主要特征并贯穿 2 型糖尿病发生、发展的始终,但仅有 IR 不足以导致 2 型糖尿病。纵向研究表明,显著高血糖与胰岛 β 细胞分泌功能下降有关, β 细胞功能缺陷是 T2DM 发病的必要条件,胰岛 β 细胞衰竭是其发展的结果,也是 T2DM 病情加重的驱动力量^[9]。早期通过降低血糖浓度,可逆转胰岛 β 细胞功能的减退,使胰岛素分泌恢复正常,以达到延缓糖尿病自然病程进展和稳定糖尿病病情的作用。本实验结果显示,桑精胶囊给药 8 周后,实验动物 FBG 和 FINS 水平以及糖负荷后血糖水平与模型组比较均显著下降,与二甲双胍组大鼠比较差异无统计学意义。与正常对照组比较,模型组大鼠 HOMA-IR 升高同时 ISI 降低,提示其胰岛素敏感性显著降低,呈明显胰岛素抵抗状态;模型组大鼠 HOMA- β 显著降低,提示其胰岛 β 细胞基础状态下的胰岛素分泌功能受损严重。值得注意的是:本实验还观察到,与正常组比较,模型组大鼠 HOMA- β 降低较 HOMA-IR 升高更为明显,提示其胰岛 β 细胞基础状态下的胰岛素分泌功能受损严重程度较胰岛素抵抗程度更深,与文献^[9-11]观点一致。桑精胶囊能显著降低实验动物 HOMA-IR 并提高 HOMA- β 和 ISI 效果与二甲双胍比较差异无统计学意义。以上结果说明桑精胶囊能有效改

善实验动物 IR 和胰岛 β 细胞基础状态下分泌胰岛素的功能。

综上所述,本实验结果提示,桑精胶囊具有显著的减肥、降糖和调脂作用,防治 T2DM 及其并发症具有良好的应用前景;其发挥治疗作用的分子机制是下一步的研究重点。

参考文献

[1]张远超,陆付耳.桑精胶囊改善 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗及其分子机制的研究[J].中国中西医结合杂志,2005,26(基础理论研究):81-86.

[2]刘永玉,毛良,莫启忠.实验性 NIDDM 大鼠模型[J].中华内分泌代谢杂志,1990,6(2):115-116.

[3]陆付耳,冷三华,屠庆年,等.黄连解毒汤与黄连素对 2 型糖尿病大鼠葡萄糖和脂质代谢影响的研究[J].华中科技大学学报(医学版),2002,31(6):662-665.

[4]Matthews DR, Hosker JB, Rudenski AS, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man[J]. Diabetologia, 1985, 28(7):412-419.

[5]李光伟,潘孝仁, Lillilja S. 检测人群胰岛素敏感性的一项新指数[J].中华内科杂志,1993,32(10):656-660.

[6]Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of TNF- α : direct role in obesity-linked insulin resistance[J]. Science, 1993, 259(5091):87-91.

[7]Kem PA, Ranganathan S, Li C, et al. Adipose tissue TNF and IL-6 expression in human obesity and insulin resistance[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001, 280(5):745-751.

[8]De Cristofaro R, Rocca B, Vitacolonna E, et al. Lipid and protein oxidation contribute to a prothrombotic state in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. J Thromb Haemost, 2003, 1(2):250-256.

[9]Purrello F, Rabuzza AM. Metabolic factors that affect beta cell function and survival[J]. Diabet Nutr Metab, 2000, 13(2):84-91.

[10]Bergman RN. Lilly lecture 1989. Toward physiological understanding of glucose tolerance: a minimal model approach[J]. Diabetes, 1989, 38(12):1512-1527.

[11]Kahn SE, Prigeon RL, McCulloch DK, et al. Quantification of the relationship between insulin sensitivity and β -cell function in human subjects[J]. Diabetes, 1993, 42(11):1663-1672.

1. 湖北中医药大学附属医院临床教学部 (430061)
2. 华中科技大学同济医学院同济医院中西医结合研究所