

• 实验研究 •

2型糖尿病大鼠模型中医证型演变的实验研究

施 红¹ 王麒又¹ 辛金钟¹ 何才姑¹ 王晓宁¹ 郑燕芳² 高尤亮³

1. 福建中医药大学中西医结合学院, 福建省福州市闽侯大学城华佗路 1号, 350108

2 福建中医药大学药学院; 3 福建省第二人民医院病理科)

基金项目: 福建中医学院 2008年度陈可冀中西医结合发展基金 (第八批)资助项目 (CKJ2008017);

福建省 2008年科技项目计划资助 (2008F5028)

通讯作者: shihong3327@ sina . com, 1330001114

摘 要 目的 观察不同时期糖尿病大鼠模型的证型属性, 探讨其证型演变。方法 选用 Wistar 大鼠, 除正常对照组普食喂养外, 余均高脂高糖喂养 4 周后, 腹腔注射链脲佐菌素 (STZ) 2 次制备糖尿病模型大鼠。将成模大鼠按血糖水平分层后随机分为模型组、增液汤组、生脉散组、肾气丸组。每组再根据用药时间不同分为 I、II、III 期。每期予相应药物干预 4 周后, 进行血糖、血脂、胰岛素、胰高血糖素检测和病理观察。结果 I 期肾气丸干预效果优于其他各组; II 期生脉散干预能显著改善各指标; III 期增液汤干预优于其他药物干预组。病理观察发现增液汤组胰岛细胞趋于正常, 未见岛内纤维化。结论 此法所形成的糖尿病模型类似于人类 2 型糖尿病, 其成模初期 (I 期) 偏于阴阳两虚, 中期 (II 期) 偏于气阴两虚, 后期 (III 期) 偏于阴虚。

关键词 2 型糖尿病; 链脲佐菌素; 大鼠; 动物模型; 中医证型; 增液汤; 生脉散; 肾气丸

SHI Hong¹, WANG Qiyou¹, XIN Jinzhong¹, HE Caigu¹, WANG Xiaoning¹, ZHENG Yanfang², GAO Youliang³

(1. 福建中医药大学中西医结合学院, 福建省福州市闽侯大学城华佗路 1 号, 350108; 2. 福建中医药大学药学院; 3. 福建省第二人民医院病理科)

基金项目: 福建中医学院 2008 年度陈可冀中西医结合发展基金 (第八批) 资助项目 (CKJ2008017); 福建省 2008 年科技项目计划资助 (2008F5028)

Abstract To observe the TCM syndromes of rat models of type 2 diabetes and discuss the syndrome evolution in different stages of disease. Wistar rats, except for the normal control group, were fed with high fat and high sucrose diet for 4 weeks, and treated by intraperitoneal streptozotocin injections for model making. Those with successful model establishment were randomized into control group, Zengye Tang (fluid increasing decoction) group, Shengmai San (pulse restoring powder) group, and Shenqi Wan (renal qi pill) group. Each of them was subdivided randomly into I, II, and III stage subgroups for herbal medicinal intervention at the time of 0w, 4w, and 8w. After the medicinal intervention for four weeks in each stage, changes in blood sugar, blood fat, insulin, glucagons, and pathologic structure were observed. The effect of stage I of Shenqi Wan group was better than that of other group. All indices of stage II of Shengmai San group were improved significantly. The result of stage III of Zengye Tang group was superior to that of the other groups, and the islet cells of Zengye Tang group were tending to normal and without islet fibration. Diabetes model made by this way is similar to the human type 2 diabetes. In its early stage (stage I), the syndrome is of both yin and yang deficiency; in its medium stage (stage II), the syndrome is of both qi and yin deficiency, and in its late stage (stage III), the syndrome is of yin deficiency.

Key words type 2 diabetes; streptozotocin (STZ); rat model; TCM syndromes; Zengye Tang (fluid increasing decoction); Shengmai San (pulse restoring powder); Shenqi Wan (renal qi pill)

制备标准化动物模型对保障中医药现代研究的真实性、可靠性、重现性、创新性具有重要意义^[1]。那么, 模型动物是否有“证”? 动物成模后是否会发生“证”的演变? 鉴于糖尿病及其并发症与糖尿病病程密切相关, 本实验拟在前期研究基础上, 探讨糖尿病模型大鼠中医证型演变规律, 以期为中医药的辨证施治提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 Wistar 大鼠, 15~2 月龄, 雌雄各半, 体重 (130±20) g, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 实验动物许可证号: SYXK (沪) 2007-0005。饲养于福建中医药大学动物实验中心 (医动字

23-016 号), 以福建中医药大学动物实验中心提供的颗粒饲料及自制高脂高糖饲料 (蔗糖 15%, 胆固醇 4%, 胆酸钠 0.3%, 猪油 10%, 蛋黄粉 10%, 基础膳食 60.7%, 混合均匀, 加水适量, 塑形, 烤箱烘干) 喂养, 自由摄食、饮水。

1.2 实验药物

所需中药均购于福建中医药大学国医堂药房。增液汤由玄参、生地黄、麦冬按 6: 4: 4 比例组成; 生脉散由五味子、西洋参、麦冬按 3: 5: 7 比例组成; 肾气丸由干地黄、山药、山茱萸、泽泻、茯苓、牡丹皮、桂枝、附子按 8: 4: 4: 3: 3: 3: 1: 1 比例组成。以上各组分别以 6 倍水煎 2 次后过滤, 两次滤液合并后最终调至含生药量 0.96 g/ml。用药剂量依据

2000年版《中华人民共和国药典》根据人和动物体表面积折算的等效剂量比率表计算,用药总量为肾气丸相当于临床等效量,增液汤和生脉散相当于临床 2倍等效量。

1 3 模型制备

将 Wistar大鼠适应性喂养 1周后,模型组给予高脂高糖饮食 4周,然后腹腔注射浓度为 0.25%链脲佐菌素 (STZ),2次 (间隔 2天)。STZ剂量计算:体重≤ 200g的部分按 25mg/kg 计算 STZ量, > 200g部分按 162.45mg/m² 体表面积=大鼠体型系数 (0.09)×体重^{2/3})计算 STZ量,二者相加即为 1次 STZ的注射剂量。正常对照组给予普通饮食 4周后,腹腔注射 0.1mol/L 枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液 (剂量同模型组 STZ体积量)。第 2次腹腔注射后第 5天检测空腹血糖 (FBG),第 7天检测随机血糖 (RBG),以 2次 FBG≥ 7.8mmol/L 或 (和) RBG≥ 16.7mmol/L 为糖尿病成模标准。

1 4 动物分组及给药

适应性喂养 1周后,随机分为正常对照组和造模组,正常对照组随机分为 I 期对照组、II 期对照组和III期对照组,均普食饲养,蒸馏水灌胃。造模组则高脂高糖饲养 4周+腹腔注射 STZ,各期组成模大鼠再以血糖水平分层后,随机分为模型组、增液汤组,生脉散组,肾气丸组;每组再随机分为 I 期、II 期和III期成模组,具体如下: I 期组:普食饲养 0周+药物干预 4周; II 期组:普食饲养 4周后药物干预 4周; III期组:普食饲养 8周后药物干预 4周。灌胃剂量均 1mL/100g体重,2次/天。

1 5 指标检测

FBG、RBG 检测采用葡萄糖氧化酶法;血清总胆固醇 (TC)和甘油三酯 (TG)采用氧化酶比色法;糖化血清蛋白 (GSP)、胰岛素 (INS)、胰高血糖素采用放射免疫测定法;病理切片:取胰腺常规石蜡包埋切片,HE 染色,400倍镜下观察胰岛的形态、大小。

1 6 统计学方法

采用 SPSS12.0 统计分析软件,计量数据以均数±标准差 表示,多组间比较用单因素方差分析。

2 结果

2 1 I 期各组大鼠 FBG、RBG、GSP、INS、胰高血糖素和血脂指标的比较

表 1 示,与对照组比较,除 INS和 TC外,其他指标各组均有统计学意义 (P< 0.01)。与模型组比较,肾气丸组 FBG、GSP 显著减低 (P< 0.05或 P< 0.01);且中药各组的胰高血糖素明显减低 (P< 0.01),以肾气丸组最明显。与对照组比较,各组的 TG 值均显著升高 (P< 0.01),模型组、增液汤组的 TC 值升高 (P< 0.05或 P< 0.01);与模型组比较,中药各组的 TG 值均降低 (P< 0.05或 P< 0.01),且生脉散组、肾气丸组 TC 值降低 (P< 0.05)。说明肾气丸干预对 I 期疗效最明显。

2 2 II 期各组大鼠 FBG、RBG、GSP、INS、胰高血糖素和血脂指标比较

表 2 示,与对照组比较,除 INS外,各组指标均有统计学意义 (P< 0.01)。与模型组比较,各中药组 INS 升高 (P< 0.05),生脉散组、肾气丸组 FBG、胰高血糖素显著减低 (P< 0.05或 P< 0.01),且生脉散组 TC、TG 及 RBG 与模型组有统计学意义 (P< 0.05)。提示生脉散干预对 II 期临床生化指标改善较明显。

表 1 I 期各组大鼠 FBG、RBG、GSP、INS、胰高血糖素、血脂指标比较 (单位)

组别	鼠数	FBG (mmol/L)	RBG (mmol/L)	GSP (mmol/L)	INS (mIU/L)	胰高血糖素 (pg/mL)	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)
对照组	9	4.32±0.36	5.10±0.56	0.73±0.12	9.17±2.61	140.44±15.42	0.89±0.21	1.51±0.44
模型组	10	24.23±4.14	31.18±3.68	1.13±0.12	6.96±2.18	267.68±20.55	2.37±0.45	2.25±0.30
增液汤组	10	19.32±5.89	30.63±3.08	1.06±0.12	7.23±3.71	226.83±18.55	△△ 1.60±0.61	△ 2.47±0.72
生脉散组	10	22.64±3.56	30.13±3.07	1.09±0.14	7.50±2.34	236.64±19.63	△△ 1.71±0.57	△ 1.73±0.65 [△]
肾气丸组	10	14.99±3.76	△△ 27.53±3.09	0.96±0.24	△ 7.55±2.17	185.28±21.56	△△ 1.25±0.42	△△ 1.78±0.71 [△]

注:与对照组比较, P< 0.05; P< 0.01;与模型组比较,△P< 0.05,△△P< 0.01

表 2 II 期各组大鼠 FBG、RBG、GSP、INS、胰高血糖素、血脂指标比较 (单位)

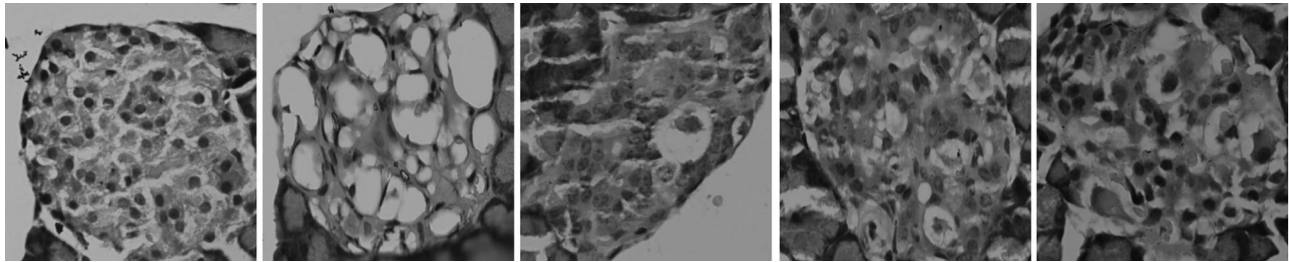
组别	鼠数	FBG (mmol/L)	RBG (mmol/L)	GSP (mmol/L)	INS (mIU/L)	胰高血糖素 (pg/mL)	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)
对照组	12	5.14±0.31	5.65±0.61	0.74±0.15	9.25±2.50	152.44±25.79	1.01±0.55	1.63±0.34
模型组	15	24.57±8.29	29.24±5.47	1.13±0.13	7.22±4.09	280.78±35.40	2.59±0.48	2.92±0.44
增液汤组	15	20.79±6.22	27.54±5.39	1.08±0.30	11.04±5.23 [△]	261.11±25.60	2.14±0.62	2.65±0.45
生脉散组	15	16.13±6.15	△△ 24.15±5.59	△ 1.02±0.22	10.65±4.70 [△]	230.54±30.21	△△ 1.88±0.54	△ 2.21±0.36
肾气丸组	15	17.53±4.97	△△ 25.95±5.63	1.09±0.21	12.06±4.83 [△]	246.60±28.59	△ 2.35±0.64	2.80±0.52

注:与对照组比较, P< 0.01;与模型组比较,△P< 0.05,△△P< 0.01

表 3 III期各组大鼠 FBG、RBG、GSP、INS、胰高血糖素指标比较 续上

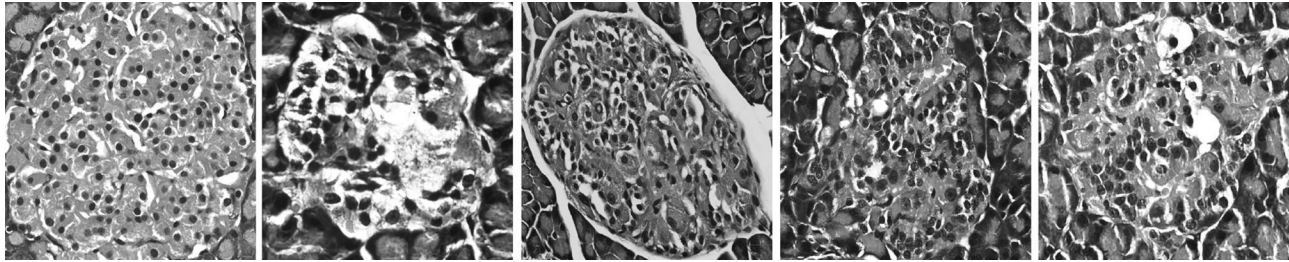
组别	鼠数	FBG (mmol/L)	RBG (mmol/L)	GSP (mmol/L)	INS (mIU/L)	胰高血糖素 (pg/mL)	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)
对照组	10	4.97±0.79	6.2±0.60	0.78±0.09	9.93±3.45	162.08±23.49	0.86±0.13	1.37±0.29
模型组	15	21.04±8.40	30.24±4.72	1.28±0.24	7.90±5.03	242.43±29.00	2.07±0.24	2.36±0.61
增液汤组	15	14.32±5.46 [△]	25.16±5.35 [△]	1.07±0.23 [△]	10.61±4.35 [△]	181.17±21.08 ^{△△}	1.28±0.25 ^{△△}	1.98±0.51 ^{△△}
生脉散组	15	18.31±6.04	27.28±4.01	1.14±0.15	10.00±5.42	171.06±19.04 ^{△△}	1.17±0.40 ^{△△}	1.80±0.50 ^{△△}
肾气丸组	15	16.02±5.59	28.51±4.04	1.22±0.21	13.63±5.97 [△]	213.34±20.68 ^{△△}	1.30±0.34 ^{△△}	2.16±0.60 ^{△△}

注:与对照组比较, 爬< 0.05 爬< 0.01;与模型组比较,△爬< 0.05 △△爬< 0.01



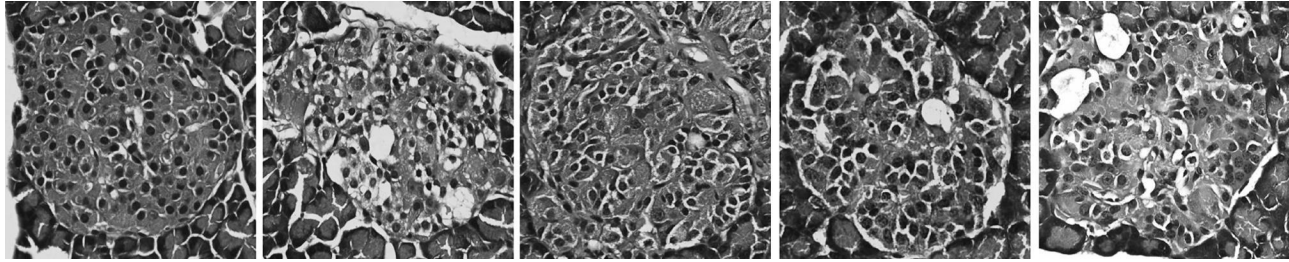
对照组 模型组 增液汤组 生脉散组 肾气丸组

图 1 I 期各组大鼠胰岛形态学比较 (× 400)



对照组 模型组 增液汤组 生脉散组 肾气丸组

图 2 II 期各组大鼠胰岛形态学比较 (× 400)



对照组 模型组 增液汤组 生脉散组 肾气丸组

图 3 III 期各组大鼠胰岛形态学比较 (× 400)

2.3 III期各组大鼠 FBG、RBG、GSP、INS、胰高血糖素和血脂指标比较

表 3 示,与对照组比较,各组的 FBG、RBG、GSP 仍明显升高 (爬< 0.01),中药各组的 INS 水平已超过正常,且肾气丸组的 INS 有统计学意义 (爬< 0.05)。与模型组比较,中药各组的胰高血糖素显著降低 (爬< 0.01),增液汤组的 FBG、RBG、GSP 降低 (爬< 0.05)。中药各组较模型组比较,除肾气丸组

TC 无明显改善外,余各组 TC、TG 均明显改善 (爬< 0.01)。综合血生化指标,本期以增液汤组疗效最佳。

2.4 不同时期各组大鼠胰岛形态观察

2.4.1 I 期各组大鼠胰岛组织病理学形态比较

图 1 示,对照组胰岛细胞呈团索状,境界清晰,胰岛细胞呈椭圆型,胞浆丰富,核圆居中,岛内细胞均较多,间质血管无明显改变。模型组胰岛细胞肿胀、变性,胞内空泡化明显。胰岛内有纤维化,间质血管显

著玻璃变性。肾气丸组胰岛内细胞边界清晰,排列规则、整齐,细胞体积较正常,但也有一些细胞呈萎缩状态。增液汤组、生脉散组胰岛数量及细胞与对照组相比明显减少,空泡化明显,但较模型组空泡化明显减少。

2.4.2 II期各组大鼠胰岛组织病理学形态比较 图2示,模型组较对照组胰岛细胞比较,胰岛数量减少,胰岛面积减少,境界不清,胰岛不规则,胰岛细胞明显肿胀、变性。增液汤组、生脉散组、肾气丸组胰岛数量及胰岛内细胞较模型组比较,数量增多;胰岛内细胞边界清晰,排列规则、整齐,细胞体积较正常,但也有一些细胞呈萎缩状态有空泡化。

2.4.3 III期各组大鼠胰岛组织病理学形态比较 图3示,模型组胰岛细胞仍肿胀、空泡化明显。增液汤组、生脉散组、肾气丸组胰岛细胞边界清晰,岛内细胞排列规则、整齐,细胞体积渐趋正常,但生脉散组有少许纤维化,肾气丸干预组纤维化较明显。

3 讨论

“以方测证”是基于辨证论治原则,根据“有是证,用是方”的对应契合关系的研究方法。即依据方剂的功效推测或反证其对应的“证”的属性,并已在长期、大规模的方药实践和中医临床诊疗中印证。朱邦贤^[2]认为“方证相对”主要指方剂的药物组成、配伍,与其主治病证所内寓的基本病机具有高度的针对性或相关性。孙景波等^[3]运用温补肾阳方药和滋肾阴清热方药分别作用于腺嘌呤所致的慢性肾病动物模型,得到了明显不同的药效结果。

在糖尿病证型方面,林兰认为糖尿病分为阴虚热盛、气阴两虚、阴阳两虚3型,分别代表着糖尿病病程发展的早、中、晚3个不同时期^[4]。该观点已成为2002年版《中药新药治疗消渴病(糖尿病)的临床研究指导原则》的证候标准。另外,糖尿病临床研究也显示,针对患者阴虚热盛、气阴两虚、阴阳两虚等不同证型,分别以增液汤、生脉散、肾气丸加减,临床疗效良好^[5-7]。因此,我们运用方证、药证对应的糖尿病辨证经典滋阴方——增液汤、益气养阴方——生脉散、滋阴助阳方——肾气丸来反证模型的证型及证型变化。

大量研究认为,一次性大剂量注射STZ所形成的糖尿病模型,更类似1型糖尿病;鉴于临床2型糖尿病(T2DM)发病率高,国内外众多学者常用高脂高糖饲料联合STZ或高脂饲料联合STZ或小剂量STZ多次注射以探索人类T2DM造模方式^[8-10]。我

们多年的临床观察认为,糖尿病始于痰湿阻滞、痰瘀热积,继而伤阴(夹瘀)引发糖耐量异常和T2DM,伤阴日久耗气致气阴两虚(夹瘀)和阴阳两虚(夹瘀)。本实验中,通过对成模后大鼠不同时期(设每4周为1个时期)进行不同中药方干预,依据其作用效果来反证各期模型的中医证型,提示该模型动物主要呈现阴阳两虚—气阴两虚—阴虚的证型演变。该变化过程恰与临床T2糖尿病患者的证型进程成反向,随病程延长,胰岛素抵抗和胰岛细胞功能下降日益明显,因此患者证型多呈阴虚内热—气阴两虚—阴阳两虚的进程变化;而模型大鼠在高脂高糖膳食后应用STZ瞬时造成了胰岛β细胞的严重损伤,引发了伴胰岛素抵抗的高血糖,故在模型初期主要表现为阴阳两虚,而随时间延长,损伤的胰岛细胞逐渐自愈,因而呈现与临床T2糖尿病证型演变相反的过程。由此可见,模型动物有证,而证型及其证型变化则主要取决于造模方式。而且用高脂高糖+腹腔注射小剂量STZ的方法^[11-12],从病因上既模拟中医多食肥甘而致糖尿病的病因,又结合STZ对胰岛细胞特异性损伤的病理生理特点,以及本次实验呈现“证”的变化,均表明该模型为更类似于人类T2DM的大鼠模型。

本实验结果表明,增液汤、生脉散抑制胰高血糖素的作用较强,而肾气丸促进胰岛素相对明显,提示中药复方药性不同,其主要作用靶点亦有所不同。另外,这3种中药方干预后虽然空腹血糖下降,但随机血糖变化不如空腹血糖快,且大鼠成模时随机血糖先升高,空腹血糖后升高,而当逐步恢复时,则空腹血糖先降低,且血脂的升高和恢复均早于血糖等,上述现象与人体对糖、脂代谢的调节一致,亦提示了恰当的中医药辨证论治治疗将有助于促进疾病向愈。而增液汤干预组未见纤维化,生脉散干预组少见纤维化,肾气丸干预组纤维化相对最明显,其方中的西洋参、附子、肉桂在临床治疗中的长期应用需引起适当重视。

此法所构建的糖尿病大鼠模型,在模型大鼠初期(成模后4~6周),中医证型偏于阴阳两虚,中期(成模后6~10周)中医证型偏于气阴两虚,后期(成模后10~14周)更偏重于阴虚为主,且为类似于人类T2DM模型。

参考文献

- [1] 苏小茹. 中医证候动物模型的复制方法动物选择以及评价标准[J]. 中国现代药理学杂志, 2005, 4(7): 48-50.

- [2]朱邦贤.“方证相对”是中医辨证论治法则之魂 [J]. 上海中医药杂志, 2006, 40 (8): 52—54.
- [3]孙景波, 华荣, 曾星, 等. 用以药测证原理研究慢性肾衰大鼠模型的中医证候属性 [J]. 现代中医药, 2004, (2): 61—63.
- [4]林兰. 中西医结合糖尿病学 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1999: 1.
- [5]何威, 杨洁. 加味增液汤对 2 型糖尿病胰岛素抵抗的影响 [J]. 中医药学刊, 2003, 21 (2): 234—235.
- [6]唐晓晨. 加味生脉散治疗 2 型糖尿病 60 例 [J]. 河南中医, 2007, 27 (5): 52—53.
- [7]刘得华. 金匱肾气丸治疗阴阳两虚型 2 型糖尿病 62 例临床观察 [J]. 新中医, 2004, 36 (7): 31—32.
- [8]郭啸华, 刘志红, 李恒. 高糖高脂饮食诱导的 2 型糖尿病大鼠模型及其肾病特点 [J]. 中国糖尿病杂志, 2002, 10 (5): 290.
- [9]Guo H, Ling W, Wang Q et al Effect of anthocyanin

- rich extract from black rice (*Oryza sativa* L. indica) on hyperlipidemia and insulin resistance in fructose fed rats [J]. Plant Foods Hum Nutr, 2007, 62 (1): 1—6.
- [10]Skalski S, Kucera P, Goldenberg Z et al Neuropathy in a rat model of mild diabetes induced by multiple low doses of streptozotocin: effects of the antioxidant stobadine in comparison with a high dose alpha lipoic acid treatment [J]. Gen Physiol Biophys, 2010, 29 (1): 50—58.
- [11]施红, 金国琴, 余文珍, 等. 诱导构建最佳类似人类 2 型糖尿病大鼠的造模方式 [J]. 中国临床康复, 2005, 9 (39): 69—72.
- [12]施红, 杨奇红, 张捷平等. 石斛合剂对高脂高糖加 STZ 造模大鼠的作用及机制探讨 [J]. 中药药理与临床, 2002, 18 (3): 22—23.

收稿日期: 2010—07—12 修回日期: 2010—09—07

编辑: 行之

多功能浓缩收膏机

打破传统收膏工艺 引领高效制膏方

产品特点

- ◎ 蒸馏浓缩中药, 可制成膏剂、粉等不同剂型
- ◎ 真空密闭状态下煎煮浓缩, 实现无味煎煮
- ◎ 低温方式提取, 可防止糊焦
- ◎ 采用真空浓缩技术, 浓缩速度快, 可达 3000~4000 毫升/小时
- ◎ 兼具压力、无压力煎煮功能, 且具备搅拌功能, 可充分提取药物有效成份
- ◎ 多功能控制器, 具有自身过热防止功能、自我诊断等功能
- ◎ 冷却方式为水冷式, 冷却效果更佳



YZN-50

膏方包装机

膏滋包装轻松实现 卫生快捷又方便

产品特点

- ◎ 自动包装, 省时省力, 卫生健康
- ◎ 保质期长, 易于携带, 服用方便
- ◎ 膏方包装机可实现 20~50ml 无级变量包装
- ◎ 可根据客户需要调整包装量, 服用剂量更加精准



YB10-50A

传统膏方制作工艺过程繁琐, 在时间、人力以及能源方面均需较大消耗, 提取过程不封闭造成药效流失, 且卫生无法保障。北京东华原生产的浓缩收膏机具有的高效制药、快速收膏、真空提取、卫生洁净、包装便捷、携带方便等特点, 使中药膏方制取更科学合理。

北京东华原医疗设备有限公司

咨询热线: 400-888-0258 800-810-0359
网 址: www.donghuagroup.com