

• 实验研究 •

化浊解毒方对脂代谢异常伴胰岛素抵抗大鼠
肝脏组织 DGAT2 mRNA 表达的影响周 祥¹ 章清华² 闫冬雪³ 节阳华¹ 史翠娟¹ 吴深涛^{2*}

(1. 天津中医药大学研究生院, 天津市南开区双峰道 314 号, 300193;

2 天津中医药大学第一附属医院; 3. 天津市南开医院)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30973728)

* 通讯作者: wushentao@yahoo.com.cn, (022)27432413

[摘要] 目的 探讨化浊解毒方改善脂代谢异常伴胰岛素抵抗(IR)的作用机制。方法 30 只 SD 大鼠随机选取 10 只为空白对照组,其余大鼠采用一次性尾静脉注射小剂量链脲佐菌素加高脂饲料诱导脂代谢异常伴 IR 模型,将造模成功的 16 只大鼠随机分为模型组、化浊解毒方组各 8 只;化浊解毒方组给予化浊解毒颗粒 3g 生药/(kg·d),空白对照组与模型组给予等量生理盐水,各组均连续灌胃 8 周。8 周后检测各组大鼠空腹血糖(FBG)、血中胰岛素(FINS)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、游离脂肪酸(FFA),采用实时定量 PCR 检测模型组和化浊解毒方组大鼠肝脏二酰基甘油酰基转移酶 2(DGAT2)mRNA 表达。结果 与空白对照组比较,模型组 FBG、FINS、TG、TC、FFA 均明显升高($P<0.01$);与模型组比较,化浊解毒方组 FBG、FINS、TG、TC、FFA 均显著下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$);化浊解毒方组 DGAT2 mRNA 表达较模型组显著降低($P<0.01$)。结论 化浊解毒方可抑制脂代谢异常伴 IR 大鼠肝脏 DGAT2 mRNA 表达,可能是其改善脂代谢异常伴 IR 的机制之一。

[关键词] 脂代谢异常;胰岛素抵抗;化浊解毒;二酰基甘油酰基转移酶 2

Effect of Huazhuo Jiedu Formula on DGAT2 mRNA Expression in Liver Tissue of Lipid Disorders Rats with Insulin Resistance
ZHOU Xiang¹, ZHANG Qinghua², YAN Dongxue³, JIE Yanghua¹, SHI Cuijuan¹, WU Shentao²

(1. Tianjin University of TCM, Tianjin 300193; 2. First Affiliated Hospital of Tianjin University of TCM; 3. Tianjin Nankai Hospital)

ABSTRACT Objective To observe the mechanism of Huazhuo Jiedu Formula (turbidity-transforming toxin-resolving formula, HJF) for lipid disorders with insulin resistance (IR). **Methods** Among 30 SD rats, 10 rats were selected as the blank control group and other rats were modeled with low-dose streptozotocin (STZ) and high fat diet. Sixteen successfully modeling rats were randomized into model group and HJF group, with 8 in each. The HJF group was given 3g crude drug/(kg·d) of HJF granules. Normal saline was given to the blank control group and model group. The intragastric administration lasted for 8 weeks. Fasting blood glucose (FBG), fasting serum insulin (FINS), triglyceride (TG), total cholesterol (TC) and free fatty acid (FFA) were detected 8 weeks later. The expression of diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2) mRNA was examined by real time polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Comparing with the blank control group, FBG, FINS, TG, TC and FFA were significantly increased in the model group ($P<0.01$). Comparing with the model group, FBG, FINS, TG, TC and FFA were significantly decreased in the HJF group ($P<0.01$ or $P<0.05$). Comparing with the model group, DGAT2 mRNA expression was significantly decreased in the HJF group ($P<0.01$). **Conclusion** HJF can inhibit DGAT2mRNA expression in liver tissue of lipid disorders rats with IR, which may be part mechanism for ameliorating IR and lipid disorders.

Keywords lipid disorders; insulin resistance; transform turbidity and resolve toxin; diacylglycerol acyltransferase 2

胰岛素抵抗(IR)是 2 型糖尿病(T2DM)发生发展的主要因素之一,导致 IR 的机制复杂,研究发现脂代谢异常及其脂毒性既是 IR 的结果,又是 IR 的重要致病因素^[1]。二酰基甘油酰基转移酶(DGAT)作为甘油三酯(TG)的合成限速酶,与脂代谢异常及 IR 具有密切关系^[2]。研究认为浊毒是 T2DM 发病的重要因素,浊毒与现代医学糖尿病脂

毒性密切相关,并贯穿糖尿病病变全过程^[3-5]。本研究观察化浊解毒方对肝脏 DGAT2 mRNA 表达的影响,探讨其对脂代谢异常伴 IR 的作用机制。

1 材料

1.1 动物及饲料

雄性 SPF 级 SD 大鼠 30 只,体重 150~180 g,由中国医学科学院医学动物研究所提供,动物许可

证号:SYXK(京)2010-0030。高脂饲料依照文献[6]配制,即普通饲料中加入20%脂肪(50%猪油和50%蛋黄粉)和20%蔗糖,由中国医学科学院医学实验动物研究所提供。

1.2 药物及试剂

化浊解毒方颗粒(组成:黄连15g、大黄6g、僵蚕6g、枳实20g、清半夏10g、柴胡15g、黄芩15g、干姜5g、佩兰20g)由天津中医药大学第一附属医院药厂制备,批号101003,每克相当于生药1.57g;链脲佐菌素(STZ)购自美国Sigma公司,批号:S-0130;血清胰岛素(FINS)试剂盒购自中国原子能科学研究院同位素研究所,批号:201013;总RNA快速提取试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司,批号:RP1202;Prime Script® RT reagent 试剂盒(批号:DRR037A)、SYBR® Premix ExTaq™ II 试剂盒(批号:DRR081)均购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.3 主要仪器

One Touch II 型微量血糖仪,美国强生公司;7100 全自动生化分析仪,日立公司;BS110S 电子天平,上海 Sartorius 公司;ALLEGRA64R 台式高速离心机,美国 Beckman 公司。

2 方法

2.1 造模及分组

建立脂代谢异常伴 IR 大鼠模型^[6],适用性喂养1周,采用随机数字表法选取10只为空白对照组,以普通饲料喂养;高脂饲料组20只,高脂饲料喂养8周后,按25mg/kg 一次性尾静脉注射 STZ(溶于0.1mmol/L 柠檬酸缓冲液,pH4.4)。造模成功标准:72h 后禁食12h,用20%葡萄糖溶液2g/kg 灌胃,灌胃后和120min 血糖分别大于7.0和11.1mmol/L。造模成功16只,采用随机数字表法分为模型组、化浊解毒方组各8只。

2.2 给药方法

化浊解毒方组给予化浊解毒方颗粒按生药3g/(kg·d)灌胃,空白对照组及模型组灌服等体积生理盐水,各组均连续灌胃8周。进入统计的各组动物数为:空白对照组8只,化浊解毒方组6只,模型组6只。

2.3 检测指标及方法

麻醉动物,腹主动脉取血。空腹血糖(FBG)、TG、总胆固醇(TC)、游离脂肪酸(FFA)采用全自动生化分析仪检测;FINS 采用放射免疫法测定。

DGAT2 mRNA 的表达采用 RT-PCR 法。实验结束时处死大鼠,按总 RNA 快速提取试剂盒说明书提取肝脏组织总 RNA。以组织总 RNA 为模板,严格按 Prime Script® RT reagent 试剂盒说明书进行逆转录。引物的设计根据基因特异性 cDNA 序列由宝生物工程(大连)有限公司设计。DGAT2 引物序列:上游 5'-CCT GGC AAG AAC GCA GTC AC-3',下游 5'-GGG CGA AAC CAA TAT ACT TCT GGA-3';内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)引物序列:上游 5'-GGC ACA GTC AAG GCT GAG AAT G-3',下游 5'-ATG GTG GTG AAG ACG CCA GTA-3'。DGAT2 与 GAPDH 基因体外扩增,按 SYBR® Premix ExTaq™ II 试剂盒说明书进行,反应条件:95℃ 预变性 5min;95℃ 30s,58℃ 45s,72℃ 30s,共30个循环,4℃ 保存。检测3个复孔,取平均值,同时做1组负对照。1%琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物,进行 $\Delta\Delta CT$ 法分析。 $\Delta\Delta CT = (\text{实验组目的基因 CT 值} - \text{实验组内参基因 CT 值}) - (\text{对照组目的基因 CT 值} - \text{对照组内参基因 CT 值})$,相对拷贝数为 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 15.0 统计学软件处理,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间均数比较采用方差分析,配对样本比较采用 t 检验;计数资料用 χ^2 检验。

3 结果

3.1 各组大鼠 FBG、FINS、TG、TC、FFA 比较

表1示,与空白对照组比较,模型组 FBG、FINS、TG、TC、FFA 均明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,化浊解毒方组 FBG、FINS、TG、FFA 均明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3.2 化浊解毒方组与模型组 DGAT2 mRNA 表达水平比较

表2示,与模型组比较,化浊解毒方组 DGAT2 mRNA 表达明显被抑制($P < 0.01$)。

表1 各组大鼠 FBG、FINS、TG、TC、FFA 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	FBG(mmol/L)	FINS(μ IU/ml)	TG(mmol/L)	TC(mmol/L)	FFA(μ mol/L)
空白对照组	8	5.22±0.73	12.04±2.10	1.58±0.45	1.65±0.25	428.21±19.97
模型组	6	14.28±1.15*	32.02±1.32*	4.84±0.54*	2.89±0.29*	675.31±21.42*
化浊解毒方组	6	9.78±0.86 $\Delta\Delta$	23.01±1.82 $\Delta\Delta$	2.33±0.27 $\Delta\Delta$	2.28±0.24 Δ	467.81±22.32 $\Delta\Delta$

注:与空白对照组比较,* $P < 0.01$,与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

表 2 化浊解毒方组与模型组 DGAT2 mRNA 表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	DGAT2 mRNA
模型组	6	1
化浊解毒方组	6	0.031 ± 0.009*

注:与模型组比较,* $P < 0.01$

4 讨论

DGAT 是脂肪细胞中控制 TG 合成的限速酶,在细胞甘油酯类的代谢中起着重要作用,使二酰基甘油(DAG)加上脂肪酸酰基形成 TG。DGAT 有 DGAT1 和 DGAT2 两种类型。研究表明,DGAT2 过度表达使组织三酰甘油(TAG)合成增多,过多的 TAG 在胰岛中堆积会对胰岛 β 细胞产生毒性作用,引起继发性的胰岛素分泌障碍,降低了其他组织对胰岛素的敏感性,进而导致糖尿病、肥胖等^[2]。小鼠胰岛素样受体底物-2 基因敲除后,DGAT2 基因上调表达^[7];当用反义核苷酸抑制 DGAT2 表达时,可以明显改善饮食诱导的 IR^[8]。

我们认为糖尿病脂代谢紊乱是因脾虚不能散精,升清降浊失司,水谷精微壅滞,血浊内蕴进而由浊致毒的过程,并于实践中总结出化浊解毒法,临床观察表明化浊解毒颗粒在对抗糖、脂毒性相关 IR 方面疗效确切^[9],清代医家杨栗山谓升降散“盖取僵蚕、蝉蜕,升阳中之清阳;姜黄、大黄,降阴中之浊阴,一升一降,内外通和,而杂气之流毒顿消矣”。化浊解毒方更以黄连清胃肠之热,合大黄为君清热解毒,荡涤浊邪;加柴胡、黄芩为臣清利少阳,泻肝胆而疏理脾胃;白芍柔肝敛阴,辅佐以不伤阴;枳实理气导滞行浊,清半夏降浊合黄连辛开苦降,疏畅中焦,佩兰和胃化浊消脾瘴,干姜辛温以暖中焦,两者相合亦制他药之苦寒。全方共奏化浊解毒、清肝和胃之功。

本实验结果表明,化浊解毒方可下调脂代谢异

常伴 IR 大鼠 FBG、FINS、TG、FFA 水平($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),提示经化浊解毒方治疗后,脂代谢异常伴 IR 大鼠糖代谢及脂代谢均有明显改善;化浊解毒方能显著下调脂代谢异常伴 IR 大鼠肝脏 DGAT2 mRNA 表达($P < 0.01$),化浊解毒方可能通过抑制 DGAT2 mRNA 表达,降低 TG、TC 及 FFA,从而改善 IR。

参考文献

- [1] 齐婷,许樟荣. 2 型糖尿病合并非酒精性脂肪性肝病的研究进展[J]. 国际内分泌代谢杂志,2010,30(6):391-393.
- [2] Stone SJ, Myers HM, Watkins SM, et al. Lipopenia and Skin Barrier Abnormalities in DGAT2-deficient Mice [J]. J Biol Chem,2004,279(12):11767-11776.
- [3] 吴深涛. 糖尿病中医病机新识[J]. 中国中医基础医学杂志,2005,11(11):808-809.
- [4] 吴深涛. 浊毒与糖尿病糖毒性和脂毒性的相关性[J]. 中医杂志,2004,45(9):647-649.
- [5] 吴深涛,闫冬雪. 从浊毒论糖尿病血脂异常之防治[J]. 中华中医药杂志,2009,24(8):1047-1049.
- [6] 周迎生,高妍,李斌,等. 高脂喂养联合链脲佐菌素注射的糖尿病大鼠模型特征[J]. 中国实验动物学报,2005,13(3):154-158.
- [7] Suzuki R, Tobe K, Aoyama M, et al. Expression of DGAT2 in white adipose tissue is regulated by central leptin action[J]. J Biol Chem, 2005,280(5):3331-3337.
- [8] Cheol CS, Savage DB, Kvlkarni A, et al. Suppression of Diacylglycerol Acyltransferase-2 (DGAT2), but Not DGAT1, with Antisense Oligonucleotides Reverses Diet-induced Hepatic Steatosis and Insulin Resistance[J]. J Biol Chem,2007,282(31):22678-22688.
- [9] 吴深涛,武娜杰,张罡,等. 化浊解毒法对 2 型糖尿病葡萄糖毒性作用的临床观察[J]. 天津中医药,2005,22(2):9-12.

(收稿日期:2012-07-16;修回日期:2012-12-01)

[编辑:洪 涛]

(上接第 400 页)

参考文献

- [1] 中华医学会内分泌学分会,《中国甲状腺疾病诊治指南》编写组. 中国甲状腺疾病诊治指南——甲状腺结节[J]. 中华内科杂志,2008,47(10):867-868.
- [2] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则[M]. 北京:中国医药科技出版社,2002:233.
- [3] 燕山,詹维伟,周建桥. 甲状腺与甲状旁腺超声影像学[M]. 北京:科学技术文献出版社,2009:48.
- [4] Knobel M, Umezawa ES, Garcia MS, et al. Elevated anti-galactosyl antibody titers in endemic goiter[J]. Thyroid, 1999, 9(5): 493-498.
- [5] 张彬. 甲状腺结节诊治的规范化[J]. 中国耳鼻咽喉头颈

外科,2008,15(6):317-318.

- [6] 杨卫平,邵堂雷,丁家增,等. 双侧结节性甲状腺肿手术切除范围的探讨[J]. 中国实用外科杂志,2007,27(5):403-405.
- [7] 简小兵,戴莲仪. 甲 1 方治疗甲状腺结节临床观察[J]. 中国中医药信息杂志,2004,11(1):72-73.
- [8] 卢秀鸾. 曲竹秋教授治疗瘰疬的临床经验[J]. 天津中医,2000,17(1):3-4.
- [9] 肖秀丽,唐汉钧. 唐汉钧教授治疗甲状腺结节经验撷菁[J]. 天津中医药,2009,26(3):180-181.
- [10] 施佩珍,黄圣光,陈如泉. 试析甲状腺病从痰辨治[J]. 湖北中医杂志,2005,27(3):21-22.

(收稿日期:2012-09-06;修回日期:2012-11-30)

[编辑:王利芬]