

胰高血糖素样肽-1 在中医振腹疗法治疗 2 型糖尿病中的机制探讨

范德宇 姜默琳 冒慧敏 季 然 李祎铭 指导老师:林彩霞 陈幼楠

(北京中医药大学,北京,100029)

摘要 目的:探究中医振腹疗法在治疗 2 型糖尿病(Type 2 Diabetes Mellitus, T2DM)中对胰高血糖素样肽-1(Glucagon-Like Peptide-1, GLP-1)及大鼠糖代谢的影响及机制。方法:采用长期高糖高脂饲料饲养加小剂量链脲佐菌素(STZ, 30 mg·kg⁻¹, 腹腔注射)诱导 2 型糖尿病大鼠模型,动物随机分为空白对照组、模型组、西药组、振腹组、西药加振腹组。结果:与模型组比较,振腹组体重变化量明显减小($P < 0.05$),西药加振腹组体重变化量与西药组比较明显减小($P < 0.05$)。治疗后振腹组大鼠血糖值较模型组显著降低($P < 0.05$)。振腹组和西药加振腹组 GLP-1 含量较模型组显著升高($P < 0.05$),西药加振腹组 GLP-1 含量较西药组升高($P < 0.05$)。各组病理结果显示:西药加振腹组的大鼠胰腺破坏的程度最低,其次是振腹组、西药组、模型组。结论:振腹疗法可以降低血糖,改善糖尿病症状,减轻或减缓胰岛细胞破坏,其降糖作用可能与 GLP-1 途径有关。

关键词 振腹疗法; 2 型糖尿病; 胰高血糖素样肽-1; 空腹血糖; 胰岛 β 细胞及小肠形态

Study on Mechanism of TCM Abdominal Vibration Therapy Curing Type

2 Diabetes Mellitus via GLP-1 Pathway

Fan Deyu, Jiang Molin, Mao Huimin, Ji Ran, Li Yiming, Instructor: Lin Caixia, Chen Younan

(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract Objective: The study was to explore the effect of TCM abdominal vibration treatment on glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and rat's glucose metabolism. **Methods:** To induced animal models of type 2 diabetes with Long-term high glucose and lipid diet and a small dose of streptozotocin (STZ, 30mg·kg⁻¹, ip). Rats were randomly divided into control group, model group, western medicine group, abdominal vibration group, western medicine plus abdominal vibration group. **Results:** After treatment, the weight of abdominal vibration group was significantly reduced compared to T2DM model group. Weight reduction was more significant in western medicine plus abdominal vibration group than in western medicine group ($P < 0.05$). GLP-1 increased significantly in abdominal vibration group, western medicine group, western plus abdominal vibration group ($P < 0.05$). The pathological slice of Islet beta cell showed that western medicine plus abdominal vibration group was least damaged, followed by abdominal vibration group, western medicine group and model group. **Conclusion:** Abdominal vibration therapy can reduce serum glucose, relieve diabetes symptoms and cell damage via GLP-1 pathway.

Key Words Abdominal vibration therapy; Type 2 diabetes mellitus (T2DM); Glucagon-like peptide-1 (GLP-1); Fasting plasma glucose; Islet beta cell and intestinal morphology

中图分类号: R332; R259 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2014.12.021

振腹疗法是传统中医推拿手法中振法衍生的产物,是由北京中医药大学臧福科教授,在上个世纪 80 年代提出。大量临床报道指出,振腹疗法治疗糖尿病疗效显著,尤以 2 型糖尿病为佳^[1-4]。但关于振腹疗法治疗糖尿病的机制,尚未见相关报道。糖尿病是危害人类健康的常见疾病,现代医学对于糖尿病的治疗主要选用胰岛素及口服降糖药物两大类。近年来, GLP-1 类似物成为研究热点。其由肠道 L 细胞分泌,主要通过葡萄糖依赖

性促进胰岛素分泌、促进胰岛细胞增生、抑制胰升糖素分泌及抑制食欲等途径降低血糖。振腹疗法作用于腹部,亦直接作用于肠道,大量临床报道表明振腹疗法具有调节内分泌功能的作用^[3]。因此,我们设想振腹疗法可通过促进肠道分泌 GLP-1 来治疗 2 型糖尿病,即振腹疗法-肠-胰岛轴的建立。本实验拟在基于 GLP-1,验证中医振腹疗法对 2 型糖尿病的防治作用,并力争为 2 型糖尿病的防治带来新思路。

基金项目:北京市共建项目课题(编号:BJ1103)

作者简介:范德宇, Tel: (010)84612290

通信作者:林彩霞(1960—),女,硕士,教授,硕士生导师,研究方向:针灸推拿作用机理, E-mail: doctorlincaixia@sina.com; 陈幼楠(1980—),女,博士,讲师,研究方向:推拿治疗内科病的机理, E-mail: chenyounan2010@163.com

1 材料与方法

1.1 实验材料及仪器

1.1.1 实验动物 清洁级近交系雄性 Wistar 大鼠 30 只, 8 周龄, 体重 (215 ± 5) g。购于北京市维通利华实验动物技术有限公司, 动物许可证号: SCXK (京)-2006-0009。

1.1.2 动物饲料 高糖高脂饲料^[5]由基础鼠饲料加蔗糖、炼猪油和蛋黄按比搭配制作高脂高糖饲料: 其比例为猪油 18%、蔗糖 20%、蛋黄 3%、基础饲料 59%。普通饲料成分: 小麦、玉米、进口鱼粉、氨基酸、维生素、矿物质添加剂等。普通饲料均由北京科澳协力公司提供。

1.1.3 治疗 2 型糖尿病药物 盐酸二甲双胍缓释片 (格华止, 中美上海施贵宝制药有限公司)

1.1.4 点穴按摩器 型号 HS302MINI, 频率 400 Hz, 最大振幅约 0.5 cm^[6]。(韩尚科技有限公司制作)

1.1.5 试剂及仪器 试剂及仪器: GLP-1 大鼠胰高血糖素样肽试剂盒 (北京环亚泰克生物医学技术有限公司提供); 链脲佐菌素 (STZ, 美国 Sigma 公司)。罗氏快速血糖测定仪及配套血糖试纸, 酶标仪: 芬兰 (Lab-systems Multiskan, MS), 仪器型号: 352 型; 洗板机: 芬兰 (Thermo LabSystems), 仪器型号: AC8; 离心机: 微量高速离心机 (国产), 仪器型号: TG16W; 培养箱: 隔水式恒温培养箱 (国产), 仪器型号: GNP-9080 型; 尼康正置生物显微镜 (Nikon eclipse 50i, 日本)。

1.1.6 实验器械 手术常用无菌器械、电子天平、离心机、移液枪 (均由北京中医药大学西区实验室提供)

1.2 分组与造模 适应性喂养 1 周后血糖正常者 (3 ~ 7.5 mmol/L)^[7]纳入研究对象, 按体重随机分出对照组 6 只、造模组 24 只。采用高糖高脂饲料喂养加小剂量 STZ 方法造模^[8]。模型成功标准: 空腹血糖 (FBG) ≥ 16.7 mmol/L 作为大鼠 2 型糖尿病成模标准^[9]。排除标准: 适应性饲养时随机血糖不在正常范围内 (≥ 7.5 mmol/L, ≤ 3 mmol/L)^[10]; 不符合纳入标准者。造模组分为模型组、西药组、振腹组、西药加振腹组, 每组各 6 只。

1.3 干预方法 3 d 适应性固定结束后, 将振腹组大鼠固定于固定器中, 参照全国针灸学会实验针灸研究会制定的“实验动物针灸穴位图谱 - 大鼠”点穴按摩器头部贴放在大鼠腹部以覆盖神阙穴、天枢穴、中脘穴、关元穴^[11], 实施振法, 振动频率为 400 次/min, 振幅为 0.5 cm, 每次 20 min, 1 次/d, 1 个疗程 7 d, 连续 2 个疗程。空白对照组: 不采用任何干预方法; 模型组: 不采用干预措施; 西药组: 采用盐酸二甲双胍缓释片按

大鼠体重标准剂量灌胃^[12-13], 1 次/d, 治疗 2 周; 振腹组: 采用点穴按摩器振腹每次 20 min, 1 次/d, 1 个疗程 7 d, 治疗 2 周^[14]; 西药加振腹组: 采用西药加振腹联合应用, 治法同上, 治疗 2 周。总共 12 周。

1.4 指标的测定

1.4.1 行为学指标 观察各组大鼠毛发生长情况及排泄情况, 并在实验开始后每隔 7 d 测量所有大鼠体重并做记录。

1.4.2 生化指标 空腹血糖的检测: 测量前禁食 6 h, 用罗氏快速血糖仪检测。检测时间点如下: 实验开始前随机测量 1 次, 筛选合格动物; 注射 STZ 前测量血糖 1 次; 注射 STZ 后 2 周测量 1 次, 筛选模型; 2 周治疗完毕, 处死前, 测量 1 次, 评价治疗效果。

1.4.3 GLP-1 的测定 第 1 d 禁食不禁水 12 h, 剪尾取血 1 mL, 样本静置 30 min 后 3000 r/min 离心 15 min, 分离血清以检测 GLP-1。采用酶联免疫法 (ELISA 试剂盒) 测定 GLP-1。

1.4.4 胰腺及小肠取材 分离胰腺及小肠空肠段组织标本数块, 置于 10% 中性甲醛固定, 后进行 HE 染色, 切片。光镜下观测胰岛、胰岛 β 细胞、小肠绒毛的形态结构。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件包行统计学处理, 实验数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

2 结果

2.1 各组大鼠体重比较

2.1.1 各组大鼠体重动态变化 治疗期内, 从体重的动态变化来看, 模型组呈下降趋势, 西药组的下降趋势小于模型组。随着治疗的进行, 振腹组及西药加振腹组总体呈上升趋势, 且西药加振腹组的上升趋势较单纯振腹组更明显 (见图 1)。

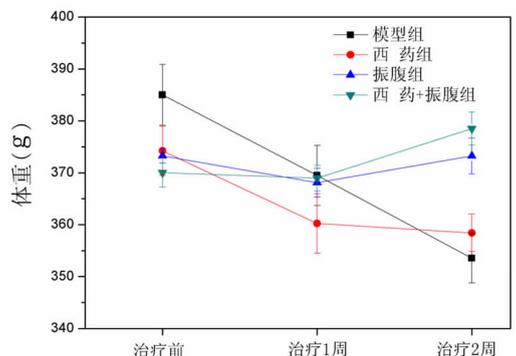


图 1 各组大鼠体重动态变化

2.1.2 大鼠体重动态变化的组间比较 治疗期间, 模型组与西药组、振腹组、西药加振腹组的体重在各个时间点上均无统计学意义; 治疗前后, 模型组与西药组的体重变化量比较, 无统计学意义。模型组与振腹组及

西药加振腹组的体重变化量比较明显增加,有统计学意义($P = 0.000$)。西药组与西药加振腹组体重变化

量比较明显增加,有统计学意义($P = 0.008$) (见表1)。

表1 各组大鼠体重比较(g, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	治疗前	治疗1周	治疗2周	体重变化量
对照组	5	505.32 ± 7.36	524.74 ± 7.81	536.66 ± 7.69	31.34 ± 3.34
模型组	5	385.00 ± 14.69	369.50 ± 14.49	353.54 ± 11.91	-31.46 ± 9.13
西药组	4	374.22 ± 10.91	360.22 ± 13.18	358.43 ± 8.26	-15.80 ± 6.10
振腹组	5	373.26 ± 3.47	368.10 ± 6.82	373.24 ± 8.62	-0.20 ± 6.00 Δ
西药加振腹组	4	370.03 ± 8.03	368.95 ± 7.12	378.50 ± 9.21	8.48 ± 7.32 Δ^*

注:与西药组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

2.2 各组大鼠空腹血糖(FBG)比较 治疗前与对照组FBG比较,模型组、西药组、振腹组、西药加振腹组明显升高($P < 0.05$)。治疗第1周,与对照组FBG比较,模型组、西药组、振腹组及西药加振腹组明显升高($P < 0.05$)。模型组与西药加振腹组FBG比较明显升高($P < 0.05$)。治疗第2周,与对照组FBG比较,模型组、西药组、振腹组、西药加振腹组明显升高($P < 0.05$);模型组FBG与西药组、振腹组、西药加振腹组比较显著升高,具有统计学意义($P < 0.05$) (见表2)。

表2 各组大鼠血糖比较(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	治疗前FBG	治疗1周FBG	治疗2周FBG
对照组	5	5.32 ± 0.22	5.78 ± 0.40	6.64 ± 0.48
模型组	5	29.14 ± 2.68*	32.46 ± 0.84*	33.18 ± 0.56*
西药组	4	33.28 ± 1.45*	30.93 ± 1.75*	28.70 ± 1.59* Δ
振腹组	5	32.42 ± 0.88*	31.48 ± 1.19*	29.92 ± 1.19* Δ
西药加振腹组	4	29.05 ± 2.97*	27.40 ± 2.04* Δ	27.40 ± 2.04* Δ

注:与对照组比较, * $P < 0.05$,与模型组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

2.3 各组大鼠GLP-1比较 治疗后振腹组及西药加振腹组GLP-1值与模型组比较显著增高,具有统计学意义($P < 0.01$);西药加振腹组与西药组GLP-1值比较显著升高,具有统计学意义($P < 0.01$) (见表3)。

表3 各组大鼠GLP-1比较(ng/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	GLP-1
对照组	5	88.79 ± 1.74
模型组	5	95.18 ± 0.62
西药组	4	84.99 ± 1.84 $\Delta\Delta$
振腹组	5	102.00 ± 1.63 $\Delta\Delta$
西药加振腹组	4	102.15 ± 1.27 $\Delta\Delta^{**}$

注:与模型组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$;与西药组比较, ** $P < 0.01$ 。

2.4 各组胰岛及胰岛细胞的形态学观察及比较 显微镜下观察到空白对照组大鼠胰岛形态规则,结构完整,胰岛细胞整体分布均匀,细胞间界限清楚。未见胞浆肿胀、纤维组织增生(见图2)。模型组:显微镜下观察到胰岛形态差异较大,部分胰岛已有增生肥大,形态多呈不规则形,细胞核聚集。胰岛细胞分布不均匀,胞

浆肥大较为明显,细胞间界限模糊,部分细胞碎裂溶解(见图3)。西药组:与模型组类似,细胞核聚集,胰岛细胞有部分肥大(见图4)。振腹组:边界较模型组清晰,细胞核聚集较少。未见胞浆肿胀、纤维组织增生(见图5)。振腹加西药组:边界较模型组清晰,较模型组形态规则,细胞核聚集少(见图6)。

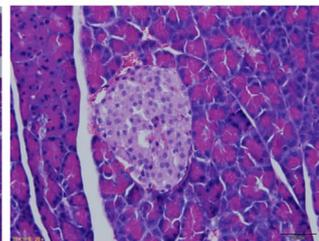
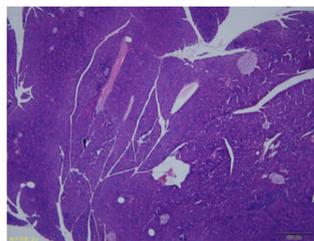


图2a 光镜下空白对照组胰岛细胞观测图(20X)

图2b 光镜下空白对照组胰岛β细胞观测图(20X)

图2 光镜下空白对照组胰岛细胞观测图

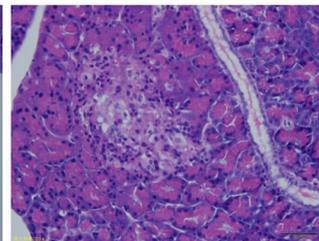
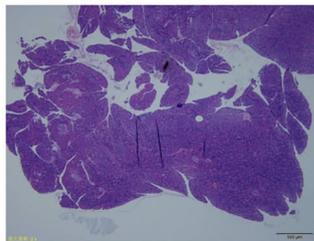


图3a 光镜下模型组胰岛细胞观测图(20X)

图3b 光镜下模型组胰岛β细胞观测图(20X)

图3 光镜下模型组胰岛细胞观测图

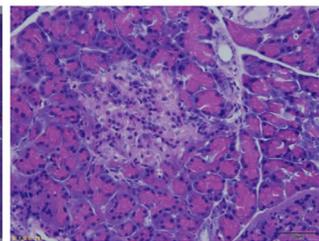
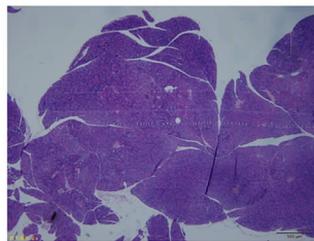


图4a 光镜下西药组胰岛细胞观测图(20X)

图4b 光镜下西药组胰岛β细胞观测图(20X)

图4 光镜下西药组胰岛细胞观测图

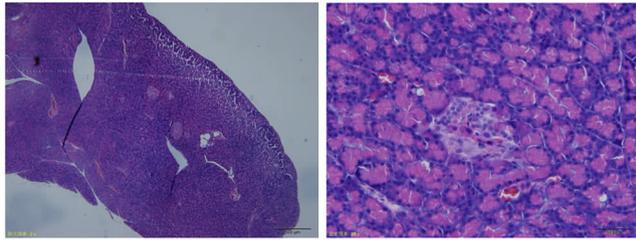


图 5a 光镜下西药组 胰岛细胞观测图(2X)
图 5b 光镜下西药组 胰岛 β 细胞观测图(20X)

图 5 光镜下西药组胰岛细胞观测图

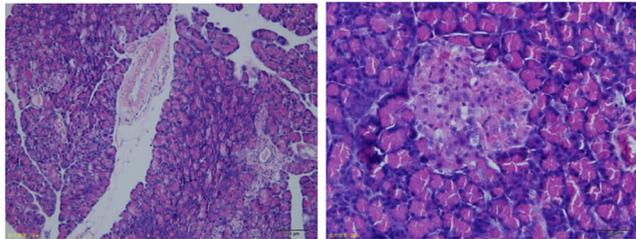


图 6a 光镜下振腹加西药组 胰岛细胞观测图(2X)
图 6b 光镜下振腹加西药组 胰岛 β 细胞观测图(20X)

图 6 光镜下振腹加西药组胰岛细胞观测图

2.5 各组小肠绒毛的形态学观察及比较 显微镜下观察到各组大鼠小肠空肠段形态规则,结构完整,小肠绒毛细胞生长良好,细胞间界限清楚。未见肿瘤,炎性疾病等,符合正常小肠形态,各组间无显著差异。

3 讨论

振腹疗法是传统中医推拿手法中振法衍生的产物,大量临床报道指出,振腹疗法治疗糖尿病效果显著。但关于振腹疗法治疗糖尿病的机制,尚未见相关报道。临床报道振腹疗法具有调节内分泌功能的作用。因此,我们设想振腹疗法是通过促进肠道分泌 GLP-1 从而治疗 2 型糖尿病。

实验表明,按造模动物体重的动态变化来看,模型组呈下降趋势,西药组的下降趋势小于模型组。随着治疗的进行,振腹组及西药加振腹组体重总体呈上升趋势。这表明,经振腹干预后,有缓解体重下降趋势,减轻 T2DM 症状。各组大鼠在治疗 1 周后,西药组、振腹组虽较 1 周前 FBG 略有下降,但无统计学意义,西药加振腹组 TBG 较 1 周前有明显下降,有统计学意义。各组大鼠在治疗 2 周后,西药组、振腹组、西药加振腹组 TBG 较 2 周前有明显下降,与模型组比较,有统计学意义。西药组、振腹组与西药加振腹组间比较无统计学意义。这表明振腹疗法可降低血糖,调整糖代谢,其结果与西药有等同的关系。各组大鼠 GLP-1 比较,治疗后振腹组及西药加振腹组 GLP-1 值与模型组比较显著增高,具有统计学意义,西药加振腹组与

西药组 GLP-1 值比较显著升高,具有统计学意义。说明振腹疗法的降糖作用可能与 GLP-1 途径有关,其具体机制有待更进一步研究。从各组大鼠胰岛 β 细胞病理切片上看,西药加振腹组的胰腺被破坏的程度最低,其次是振腹组,西药组,模型组,这表明或许振腹疗法有减轻或减缓胰岛细胞破坏的作用。从各种小肠绒毛细胞来看,符合正常形态,各组间无显著差异。

综上所述,中医振腹疗法治疗高糖高脂饲料加小剂量 STZ 的 T2DM 模型大鼠是有效的,可缓解体重下降趋势,增加体重,减轻 T2DM 症状,调整糖代谢,减缓胰岛细胞破坏。实验表明,振腹疗法与西药联合应用作用明显优于单纯的西药降糖作用。本实验初步验证了振腹疗法可通过振腹疗法-肠-胰岛轴从而降糖的结论,其作用机理与 GLP-1 途径有关,中医振腹疗法作为非药物疗法展现出了广大而实用的临床应用前景。

参考文献

- [1] 林彩霞. 振腹法临床应用体会[J]. 世界中医药, 2009, 4(3): 157 - 158.
- [2] 宏达, 臧福科. 大成推拿术[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1998. 694.
- [3] 王金涛. 松振法为主推拿治疗糖尿病 18 例[J]. 山东中医杂志, 1999, 18(11): 502.
- [4] 郭俊海. 振腹法治疗糖尿病初探[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(16): 224.
- [5] 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, 9(13): 153 - 157.
- [6] 郑娟娟, 赵毅. 振法参数的理论探讨及临床应用研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2008, 15(7): 104 - 106.
- [7] 王竹, 杨月欣, 向雪松, 等. 实验大鼠血糖正常范围的估算[J]. 卫生研究, 2010, 2(3): 5.
- [8] 向雪松, 王竹, 祝宇铭, 等. 链脲佐菌素注射剂量对建立 2 型糖尿病大鼠模型的影响[J]. 卫生研究, 2010, 2(4): 85 - 87.
- [9] 王春艳. 链脲佐菌素诱导大鼠 2 型糖尿病模型的建立[J]. 吉林医药学院学报, 2011, 31(1): 33 - 35.
- [10] 饶子亮, 赵士海, 刘盛来, 等. 2 型糖尿病伴随高脂血症大鼠模型的建立及二甲双胍的干预[J]. 实验动物科学, 2009, 1(1): 24 - 26.
- [11] 潘万顺. 振腹疗法的原理及操作[J]. 当代医学, 2010, 31(1): 5 - 6.
- [12] 张玉领, 孙长颢. 2 型糖尿病动物模型的研究进展[J]. 现代预防医学, 2012, 8(5): 15 - 18.
- [13] 何清华, 周迎生, 王征, 等. 2 型糖尿病大鼠模型制备的影响因素及其特点[J]. 中国实验动物学报, 2007, 15(6): 92 - 93.
- [14] 邱万光. 振腹疗法研究[J]. 中医临床研究, 2010, 20(1): 35.