

降糖消渴颗粒对自发性2型糖尿病 KKAY 小鼠 肝脏功能和氧化应激的影响

张毅 穆倩倩 于娜 赵丹丹 左加成 安宏 马越 莫芳芳 高思华

(北京中医药大学,北京,100029)

摘要 目的:探讨降糖消渴颗粒对高脂饮食诱导的2型糖尿病 KKAY 小鼠肝脏功能和氧化应激的影响。方法:30只 KKAY 小鼠予以高脂饲料喂养4周后,建立2型糖尿病(空腹血糖 ≥ 13.9 mmol/L)小鼠模型。将成模后的 KKAY 小鼠随机分为模型组、吡格列酮组、降糖消渴颗粒高、中、低剂量组(1.75,3.5,7 g/kg),6只 C57BL/6J 鼠为正常对照组。干预10周后,检测小鼠血清中 ALT、AST、 γ -GT、SOD、MDA 含量;取肝脏组织匀浆,检测肝脏组织中 MDA、SOD、GSH 的含量。结果:降糖消渴颗粒低剂量(1.75 g/kg)可降低血清 ALT、 γ -GT、MDA 水平并提高 SOD 活性($P < 0.01$),但对肝脏中氧化应激指标无明显改善作用;中、高剂量(3.5,7 g/kg)均可显著降低血清 ALT、 γ -GT,减少血清及肝脏 MDA 含量,提高 SOD 活性($P < 0.01$),肝脏 GSH 活性也有所增强($P < 0.05$)。高剂量还具有降低血清 AST 的作用($P < 0.01$)。结论:降糖消渴颗粒可以有效改善 T2DM 状态下肝脏的功能和氧化应激状态。

关键词 降糖消渴颗粒;2型糖尿病;肝脏功能;氧化应激

Effect of Jiangtang Xiaoke Granule on Hepatic Function and Oxidative Stress in Type 2 Diabetic KKAY Mice

Zhang Yi, Mu Qianqian, Yu Na, Zhao Dandan, Zuo Jiacheng, An Hong, Ma Yue, Mo Fangfang, Gao Sihua

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

Abstract Objective: To investigate the effect of Jiangtang Xiaoke granule (JTXKG) on hepatic function and oxidative stress in type 2 diabetic KKAY mice. **Methods:** A total of 30 KKAY mice were fed by high-fat-diet for 4 weeks, T2DM model were established by FBG ≥ 11.1 mmol \cdot L $^{-1}$. The T2DM mice were then randomly divided into model group, pioglitazone group and JTXK granule groups in low (1.75 g/kg), medium (3.5 g/kg), and high (7 g/kg) doses. The normal group had 6 C57BL/6J in it. After 10-week treatment, the serum ALT, AST, γ -GT, MDA, SOD and hepatic MDA, SOD, GSH were measured. **Results:** Compared with model group, T2DM mice supplemented with 1.75 g/kg dose of JTXK granule has lower serum ALT, γ -GT, MDA ($P < 0.01$) and higher SOD activity ($P < 0.05$). However, it has little effect on hepatic oxidative stress index. T2DM mice fed with 3.5 and 7 g/kg dose of JTXK granule has lower serum ALT, γ -GT, serum and hepatic MDA and higher SOD, GSH activities significantly ($P < 0.01$). **Conclusion:** JTXKG can improve hepatic function and oxidative stress in T2DM mice.

Key Words Jiangtang Xiaoke granule; Type 2 diabetes; Hepatic function; Oxidative stress

中图分类号:R242;R285;R587.1 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.09.053

随着人们生活质量的提高,糖尿病(DM)发病率持续走高,其中2型糖尿病(T2DM)患者占DM总人数的90%以上,而其主要发病原因是胰岛素抵抗导致的糖脂代谢紊乱。肝脏作为机体糖脂代谢的重要器官之一,在T2DM状态下的病理存在形式主要为非乙醇性脂肪性肝病(NAFLD)^[1-2]。导致这一损伤的机制可能是高脂高糖内环境下,肝细胞内抗氧化酶活性降低,产生过量的氧自由基(ROS)和氮自由基(RNS),超过细胞自身的氧化还原能力,产生氧化应激,导致线粒体失活酶活力减低,肝细胞脂肪酶氧化能力受损,造成细胞的损伤^[3-4]。

降糖消渴颗粒是以中医整体观为辨证论治思

想,以肝脾肾3脏同调理论为指导,并结合现代中药炮制方法而创制的治疗DM的方剂,经前期基础研究和临床实践证实具有良好的改善胰岛素抵抗、降糖、降脂等作用^[5]。本研究选用自发性T2DM KKAY小鼠为研究对象,予以高脂饲料喂养,模拟人类T2DM发病原因,探讨降糖消渴颗粒对DM小鼠肝脏功能及氧化应激的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 KKAY小鼠,雄性,8周龄,28~32g,购自北京华阜康生物科技有限公司,许可证号SCXK(京)2012-0001。饲养于北京中医药大学屏障

基金项目:重大新药创制(编号:2012ZX09103201-005);科学研究与研究生教育-科学研究与科研基地建设项目-治疗代谢综合征创新中药临床前研究(编号:1000062520025)

作者简介:张毅(1986.03—),女,博士研究生在读,研究方向:中医药防治糖尿病,E-mail:yicando@163.com

通讯作者:高思华(1957.07—),男,博士,教授,研究方向:中医药防治内分泌代谢性疾病,E-mail:gaosihua1216@163.com

环境动物实验室,合格证号 SCXK(京)2011-0024,环境温度 22~24℃,相对湿度(40±10)%,12/12 光照/黑暗循环。普通饲料及高脂饲料(20%蔗糖、2.5%胆固醇、10%猪油、1%胆酸钠、66.5%基础饲料)购自北京华阜康生物科技有限公司。

1.1.2 仪器 贝克曼全自动生化分析仪(美国 Beckman 公司),BMG 全波长酶标仪(德国 BMG LABTECH 公司),IKA 高速组织匀浆机(德国 IKA 公司),分析天平。

1.1.3 药物 降糖消渴颗粒(丹参、生地黄、黄连、茯苓、山茱萸、生晒参等 10 味药依 6:6:3:3:2:2... 比例组成)饮片购于河北安国药材批发市场,经北京中医药大学中药学院中药科技发展部鉴定为正品,并制成颗粒,每克含 5.01 g 生药。用时以蒸馏水配制相应浓度的混悬液。盐酸吡格列酮片(北京太平洋药业有限公司)。

1.1.4 试剂 脂质氧化测定试剂盒,总 SOD 活性检测试剂盒(WST-8 法),GSH 和 GSSG 检测试剂盒,均购自碧云天生物技术研究所。RIPA 裂解液(Solarbio,批号:20150122)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型制备 KKAy 小鼠 36 只,适应性饲养 1 周后给予高脂饲料饲养。C57BL/6J 小鼠 6 只作为正常对照组,普通饲料喂养。KKAy 小鼠高脂饲养 4 周后,禁食 12 h 后检测空腹血糖(FBG),以 $FBG \geq 13.9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为 DM 小鼠标准,成模率 100%。

1.2.2 分组及给药方法 将成模后的 DM 小鼠按血糖,体重随机分为模型组,阳药组,降糖消渴颗粒高、中、低剂量组,每组 6 只。中药治疗各组灌胃给予等体积,不同浓度中药,阳药组予 6.5 mg/kg 吡格列酮,模型组和正常组予等体积蒸馏水灌胃。实验期间于每日上午灌胃一次,T2DM 小鼠予高脂饲料饲养,正常组小鼠予普通饲料饲养,共给药 10 周。

1.2.3 血清中相关指标检测 给药 10 周后称取动物体重并记录,麻醉后腹主动脉取血,离心,取上层血清检测丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST), γ -谷氨酰转肽酶(γ -GT),丙二醛(MDA),超氧化物歧化酶(SOD)。

1.2.4 肝脏中相关指标检测 摘除肝脏,4℃预冷生理盐水冲洗后滤纸吸干,取相同部位肝组织,置于预冷的 RIPA 裂解液中,冰浴匀浆为 10% 的匀浆液。4℃,3 000 r/min 离心 15 min,取上清液按照试剂盒说明书测定肝脏 MDA 含量。肝脏 SOD、还原型谷胱

甘肽(GSH)测定方法同上。

1.2.5 统计学方法 实验结果用 SPSS 19.0 软件进行数据分析处理,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异性具有统计学意义。

2 结果

2.1 降糖消渴颗粒对 T2DM 小鼠肝脏功能的影响 高脂饲料喂养诱导的 T2DMKKAy 小鼠肝脏功能相关指标较正常小鼠显著升高($P < 0.01$)。给药 10 周后,吡格列酮与降糖消渴颗粒各剂量(1.75 g/kg, 3.5 g/kg, 7 g/kg)均可显著降低肝脏 ALT、 γ -GT 含量($P < 0.01$),吡格列酮和高剂量(7 g/kg)降糖消渴颗粒可有效降低血清 AST 含量($P < 0.01$),低、中剂量组小鼠血清 AST 未见明显改善($P > 0.05$),提示使用药物控制 DM 的进程可以在一定程度上减轻肝细胞的损伤。降糖消渴颗粒对肝功相关指标的改善呈现出剂量依赖性关系的趋势,高剂量(7 g/kg)效果最佳。见表 1。

表 1 降糖消渴颗粒对 T2DM 小鼠肝脏功能的影响($\bar{x} \pm s$)

分组	剂量 (g/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	γ -GT (U/L)
正常	—	3.58 ± 0.99	11.60 ± 1.64	13.00 ± 2.37
模型	—	160.40 ± 21.18**	51.84 ± 9.50**	47.00 ± 3.22**
吡格列酮	0.0065	72.73 ± 10.21 $\Delta\Delta$	41.40 ± 6.01 $\Delta\Delta$	26.67 ± 3.20 $\Delta\Delta$
降糖消渴颗粒	1.75	53.20 ± 11.02 $\Delta\Delta$	45.60 ± 3.17	30.00 ± 2.76 $\Delta\Delta$
	3.5	57.20 ± 13.09 $\Delta\Delta$	49.40 ± 7.53	15.17 ± 3.19 $\Delta\Delta$
	7	21.80 ± 9.21 $\Delta\Delta$	26.80 ± 6.42 $\Delta\Delta$	17.83 ± 2.99 $\Delta\Delta$

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

2.2 降糖消渴颗粒对 T2DM 小鼠血清 MDA、SOD 的影响 高脂饲料喂养诱导的 T2DMKKAy 小鼠血清中 MDA 含量显著高于正常组($P < 0.01$),而 SOD 活性较正常组低($P < 0.01$)。给药 10 周后,吡格列酮有效的降低了血清 MDA($P < 0.01$)含量且提高了 SOD 活性($P < 0.01$)。降糖消渴颗粒各剂量(1.75 g/kg, 3.5 g/kg, 7 g/kg)均明显改善了血清 MDA、SOD,以中剂量(3.5 g/kg)效果最佳。见表 2。

2.3 降糖消渴颗粒对 T2DM 小鼠肝脏 MDA、SOD、GSH 的影响 高脂饲料喂养诱导的 T2DMKKAy 小鼠肝脏中 MDA 含量较正常组显著升高($P < 0.01$),SOD、GSH 活性则较正常组降低。给药 10 周后,吡格列酮组小鼠 GSH 活性有所升高($P < 0.05$),而 MDA 含量和 SOD 活性与模型组小鼠比较未见统计学意义。低剂量(1.75 g/kg)降糖消渴颗粒对肝脏氧化应激没有明显改善作用,中、高剂量(3.5 g/kg, 7 g/kg)降糖消渴颗粒可显著降低肝脏中 MDA 含量

($P < 0.01$), 提高 SOD 活性($P < 0.01$), 且 GSH 活性也较模型组小鼠有所提高($P < 0.05$)。高剂量效果稍优于中剂量, 但无统计学意义。见表 3。

表 2 降糖消渴颗粒对 T2DM 小鼠血清 MDA、SOD 的影响($\bar{x} \pm s$)

分组	剂量(g/kg)	MDA(nmol/mL)	SOD(μ /mL)
正常	—	7.24 \pm 1.01	423.79 \pm 31.14
模型	—	16.43 \pm 2.12**	256.21 \pm 24.33**
吡格列酮	0.006 5	7.51 \pm 1.71 $\Delta\Delta$	410.28 \pm 17.56 $\Delta\Delta$
降糖消渴颗粒	1.75	12.67 \pm 2.36 $\Delta\Delta$	348.58 \pm 20.49 $\Delta\Delta$
	3.5	7.98 \pm 1.46 $\Delta\Delta$	389.91 \pm 31.63 $\Delta\Delta$
	7	8.22 \pm 2.06 $\Delta\Delta$	346.06 \pm 29.57 $\Delta\Delta$

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

表 3 降糖消渴颗粒对 T2DM 小鼠肝脏 MDA、SOD、GSH 的影响($\bar{x} \pm s$)

分组	剂量(g/kg)	MDA(nmol/g of liver)	SOD(μ /mg of prot)	GSH(μ /mg of prot)
正常	—	49.86 \pm 11.37	246.61 \pm 15.63	91.56 \pm 8.69
模型	—	86.35 \pm 14.25**	113.44 \pm 12.50**	77.89 \pm 8.19*
吡格列酮	0.006 5	77.06 \pm 12.60	116.33 \pm 16.75	90.79 \pm 8.04 Δ
降糖消渴颗粒	1.75	80.56 \pm 15.75	116.98 \pm 4.88	82.45 \pm 7.73
	3.5	51.26 \pm 11.01 $\Delta\Delta$	132.81 \pm 11.30 $\Delta\Delta$	90.49 \pm 10.22 Δ
	7	60.16 \pm 17.70 $\Delta\Delta$	134.26 \pm 11.38 $\Delta\Delta$	89.11 \pm 10.39 Δ

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

3 讨论

T2DM 条件下的肝脏病变主要表现为 NAFLD, 1998 年 Day 等提出的“二次打击”学说^[6] 阐明了其病理机制:在胰岛素抵抗情况下,肝细胞内脂质沉积导致脂肪肝的形成;活化的内源性损害因子通过氧化应激使反应性活性氧(ROS)增多,导致肝细胞内脂质过氧化增强,线粒体功能受损,细胞产生炎症反应,肝损伤进一步加剧^[7-8]。MDA 是 ROS 与细胞膜磷脂中的多不饱和脂肪酸发生脂质过氧化的产物,是评价机体氧化应激发生的重要指标^[9]。

DM 是现代医学中的病名,传统中医学并无此名,而多将此类疾病归属于“消渴”范畴。中医辨证多属肝脾肾三脏功能失常,以某一脏失调为主,渐次波及其余两脏,且多虚实夹杂,气阴两虚挟气滞、血瘀、湿(痰)凝、热结^[10]。临床治疗当扶正兼顾祛邪,恢复肝脾肾三脏功能。降糖消渴颗粒是结合现代 DM 的发病特点,立足肝脾肾,3 脏同调而创制的系列方之一,本方以地黄汤为底方加减变化,滋肾荣肝,凉血活血且兼补血,同时健脾渗湿,更以黄连清热泻火^[11]。

本实验中 DM 小鼠血清和肝脏中 MDA 含量都较正常组显著升高,说明高脂饲料喂养诱导的

T2DM 小鼠体内发生了明显的氧化应激,而 ALT、AST 的升高则说明 DM 小鼠肝细胞受损,这可能是由氧化应激导致的。经过降糖消渴颗粒给药治疗后,各组小鼠肝脏中氧化应激的水平都得到了不同程度的减轻。在改善肝功方面,降糖消渴颗粒呈现出剂量依赖性趋势,高剂量(7 g/kg)较中、低剂量更能明显降低血清中 ALT、AST 含量,对肝细胞保护作用较强;在改善血清及肝脏中氧化应激指标方面,中、高剂量(3.5, 7 g/kg)降糖消渴颗粒都具有明显优势,这说明降糖消渴颗粒可在一定程度上降低 DM 状态下肝细胞内的氧化应激,提高体内抗氧化酶活性,减轻肝细胞损伤,从而起到保护肝脏的作用。而降糖消渴颗粒发挥这一作用的机制是本身作为一种抗氧化剂,纠正机体氧化失衡状态,还是通过改善胰岛素抵抗状态从而减轻肝细胞炎症反应,仍需进一步研究。

综上所述,降糖消渴颗粒对 DM 状态下的肝脏损伤具有一定的保护作用,其作用可能是通过增强肝细胞抗氧化能力实现的。

参考文献

- [1] Saponaro C, Gaggini M, Gastaldelli A. Nonalcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes: common pathophysiologic mechanisms [J]. *Curr Diab Rep*, 2015, 15(6):607.
- [2] Zhou X, Xu J, Shi Y, et al. Discovery of Novel Anti-Diabetic Drugs by Targeting Lipid Metabolism [J]. *Curr Drug Targets*, 2015.
- [3] Chambel S S, Santos-Goncalves A, Duarte T L. The Dual Role of Nrf2 in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Regulation of Antioxidant Defenses and Hepatic Lipid Metabolism [J]. *Biomed Res Int*, 2015; 597134.
- [4] Yilmaz B, Sahin K, Bilen H, et al. Carotenoids and non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Hepatobiliary Surg Nutr*, 2015, 4(3):161-171.
- [5] Zhao D D, Yu N, Li X K, et al. Antidiabetic and antioxidative effect of jiang tang xiao ke granule in high-fat diet and low-dose streptozotocin induced diabetic rats [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014;475192.
- [6] 苏剑锋, 江伟. “二次打击”对非酒精性脂肪肝的影响 [J]. *华夏医学*, 2015, 28(2):141-144.
- [7] Gusdon A M, Song K X, Qu S. Nonalcoholic Fatty liver disease: pathogenesis and therapeutics from a mitochondria-centric perspective [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014;637027.
- [8] Besse-Patin A, Estall J L. An Intimate Relationship between ROS and Insulin Signalling: Implications for Antioxidant Treatment of Fatty Liver Disease [J]. *Int J Cell Biol*, 2014;519153.
- [9] 牟忠卿, 李晓博, 陈丽. 糖尿病大鼠肝脏组织中氧化应激标志物的表达变化及意义 [J]. *山东医药*, 2015, 55(7):26-28.
- [10] 高思华. 以中西医结合理论为指导, 立足肝脾肾辨治糖尿病 [J]. *中国中西医结合杂志*, 1994, 14(10):622-623.
- [11] 高思华, 龚燕冰, 倪青, 等. 肝脾肾同治法辨证治疗 2 型糖尿病的临床研究 [J]. *中华中医药杂志*. 2009, 24(8):1007-1010.