

苓桂术甘汤联合热量限摄对胰岛素抵抗模型大鼠的影响及机制研究

汪园国¹ 金明华² 柯 斌² 李苏华³ 沈泳芝³ 翟佳羽³ 陈春宇³ 秦 鉴²

摘要 **目的** 探讨苓桂术甘汤联合热量限摄对胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)模型大鼠空腹血糖(FPG)、IR 及过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR- γ)的影响。**方法** 48 只雄性 Wistar 大鼠随机分为对照组、模型组、限摄组和中药限摄组,每组 12 只。对照组喂以普通饲料,其他 3 组以高脂饮食喂养 12 周建立 IR 模型。造模成功后,对照组和模型组继续原饲料喂养 4 天,并灌胃生理盐水 20 mL/(kg·d);限摄组给予热量限摄 4 天及生理盐水 20 mL/(kg·d)灌胃;中药限摄组给予热量限摄 4 天联合苓桂术甘汤 20 mL/(kg·d)灌胃。比较各组大鼠体重、FPG、血清空腹胰岛素(FINS)、胰岛素抵抗指数(IRI)和大网膜脂肪组织 PPAR- γ 蛋白表达。**结果** 热量限摄 4 天后,与模型组比较,限摄组和中药限摄组大鼠体重明显下降($P < 0.01$),两限摄组间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);限摄组大鼠 FINS、IRI 明显降低($P < 0.01, P < 0.05$),中药限摄组大鼠 FPG、FINS 和 IRI 均显著降低($P < 0.05, P < 0.01$);两限摄组大鼠 PPAR- γ 蛋白表达均明显下降($P < 0.01$),痰湿状态均得到改善,以中药限摄组作用更显著。**结论** 苓桂术甘汤联合热量限摄能降低 IR 模型大鼠体重、FPG 及 IRI,且较单纯热量限摄效果更佳,其改善 IR 作用可能与抑制 PPAR- γ 的活性有关,并可能同时具有抑制脂肪细胞分化的作用。

关键词 苓桂术甘汤;热量限摄;胰岛素抵抗;痰湿;过氧化物酶体增殖物激活受体- γ

Effects of Linggui Zhugan Decoction Combined Calorie Restriction on the Insulin Resistance of Model Rats and Mechanisms Research WANG Yuan-yuan¹, JIN Ming-hua², KE Bin², LI Su-hua³, SHEN Yong-zhi³, ZHAI Jia-yu³, CHEN Chun-yu³, and QIN Jian² 1 Department of Traditional Chinese Medicine, Huangpu District, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou (510700), China; 2 Department of Traditional Chinese Medicine, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou (510080), China; 3 Sun Yat-sen Medical College, Sun Yat-sen University, Guangzhou (510080), China

ABSTRACT **Objective** To explore the effects of Linggui Zhugan Decoction (LZD) combined calorie restriction on fasting plasma glucose (FPG), the insulin resistance (IR), and the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR- γ) of IR model rats. **Methods** Totally 48 male Wistar rats were randomly divided into the control group, the model group, the calorie restriction group, and the TCM + calorie restriction group, 12 in each group. Ordinary forage was given to those in the control group, and high fat diet was fed to those in the rest 3 groups for 12 weeks to establish the IR model. After successful modeling, rats in the control group and the model group were continually fed with the original farage for 4 days. The normal saline at the daily dose of 20 mL/kg was given to them by gastrogavage. The normal saline at the daily dose of 20 mL/kg was given to rats in the calorie restriction group by gastrogavage after 4-day calorie restriction. LZD at the daily dose of 20 mL/kg was given to rats in the TCM + calorie restriction group by gastrogavage after 4-day calorie restriction. The body weight, FPG, serum fasting insulin (FINS), insulin resistance index (IRI), and the protein expression of PPAR- γ in the omental adipose tissue were compared. **Results** After 4-day calorie restriction, the body weight obviously decreased in the calorie restriction group and the TCM + calorie restriction group, when compared with the model group ($P < 0.01$). There was no statistical

基金项目:广东省科技厅国际合作项目(No. 2009B050700022)

作者单位:1.中山大学附属第一医院黄埔院区中医科(广州 510700);2.中山大学附属第一医院中医科(广州 510080);3.中山大学中山医学院(广州 510080)

通讯作者:秦 鉴, Tel:13699718729, E-mail:himybox@yeah.net

difference between the former two groups ($P > 0.05$). The FINS and IRI obviously decreased in the calorie restriction group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). The FPG, FINS, and IRI significantly decreased in the TCM + calorie restriction group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The protein expression of PPAR- γ obviously decreased in the calorie restriction group and the TCM + calorie restriction group ($P < 0.01$). The phlegm dampness state was alleviated, with more significant effects shown in the TCM + calorie restriction group. Conclusions LZD combined calorie restriction could reduce the body weight, FPG, and IRI of IR rats. Besides, it showed better effects than calorie restriction alone. Its effects in improving IR might be correlated with inhibiting the activities of PPAR- γ . Meanwhile, it might play a role in inhibiting the differentiation of fat cells.

KEYWORDS Lingui Zhugan Decoction; calorie restriction; insulin resistance; phlegm dampness; peroxisome proliferator-activated receptor γ

胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)是指胰岛素作用的靶器官对胰岛素的敏感性下降,即正常剂量的胰岛素产生低于正常生物学效应的一种状态。目前认为,IR 不仅是 2 型糖尿病的发病基础,更是多种代谢相关疾病的共同病理生理基础。目前对于 IR 的西医治疗多伴随不同程度副反应的发生,中西医结合治疗亦无较完善的方法,故寻求新的 IR 治疗手段具有重大意义。热量限摄疗法是一种绿色、健康、安全的自然疗法,流行于欧美等地^[1]。已有研究表明,此疗法治疗代谢性疾病等具有良好的效果^[1,2]。然而实践发现,单纯的热量限摄治疗后患者耐饥饿能力和依从性较弱,且多出现不欲饮水、乏力、舌苔增厚、面色黄白等脾阳虚痰湿内泛表现,故在热量限摄的基础上加用苓桂术甘汤^[3],不仅使患者的脾阳虚痰湿内泛状态得到减轻,也使各项代谢相关指标得到进一步降低,进而改良为适合我国国人的中医限摄疗法,并在临床治疗 IR 相关疾病取得了良好的效果^[4]。本研究拟以动物实验进一步证实临床研究结果。

材料与方法

1 动物和饲料 SPF 级健康雄性 Wistar 大鼠 48 只,8 周龄,由中山大学动物实验中心提供,动物合格证号:SYXK(粤)2007-0081,均单笼饲养,明暗周期为 12 h/12 h,自由摄食饮水。普通饲料和高脂饲料均购自广东省动物实验中心。高脂饲料组成:普通饲料 55.0%,猪油 15.0%,蔗糖 21.0%,蛋黄粉 8.5%,胆酸盐 0.5%。

2 药物、试剂和仪器 苓桂术甘汤由茯苓 12 g、桂枝 9 g、白术 6 g、炙甘草 6 g 组成(生药由深圳三九药厂提供),由中山大学附属第一医院药剂科制备成浓缩液(含生药 2 g/mL)。ELISA 试剂盒(购于 Ray-Biotech, Inc 公司,美国),过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR- γ)抗体(Cell Signaling Technolo-

gy, Inc 公司,美国),SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(碧云天生物科技公司),RIPA R0095 蛋白提取液(上海申能博彩生物科技有限公司),WB 超敏发光液(北京普利来基因有限公司)Tris(The Dow Chemical Company, 美国),EDTA·2Na·2H₂O(MBCHEM, 美国),冰醋酸、显影液和定影液(广州化学试剂厂)。酶标仪 TECAN TYPE: Sunrise Remote/ Tonch-Screen(南京华东电子集团医疗装备有限责任公司);微量有机分析专用超纯水机(颐洋企业发展有限公司);恒温生化培养箱(宁波江南仪器厂)。

3 分组、造模和给药 动物先普食适应性喂养 1 周后,按 1:1:1:1 用编程 C++语言中的 random()函数随机分为 4 组:对照组、模型组、限摄组和中药限摄组,每组 12 只。对照组喂以普通饲料,其余 3 组喂以高脂饲料 12 周,喂养 12 周末进行模型评价。造模成功后,对照组和模型组继续原饲料喂养 4 天,自由饮水,每天灌胃生理盐水 20 mL/kg。限摄组:予热量限摄(不予任何饲料,自由饮水)4 天,且每天灌胃生理盐水 20 mL/kg。中药限摄组:予热量限摄 4 天,并每天灌胃苓桂术甘汤 20 mL/kg(按成人每天服药量 60 mL 估算大鼠灌胃剂量)。

4 观察指标及检测方法

4.1 基础指标检测 分别于造模第 1 天,第 3、6、9、12 周末及热量限摄 4 天后称量大鼠体重。于喂养第 12 周末及热量限摄 4 天后,各组大鼠空腹经尾静脉取血 3 mL,3 600 r/min 离心 10 min,分离血清,取 1 mL 送中山大学附属第一医院检验科测定空腹血糖(FPG),其余 2 mL 标本送中山大学达安基因检验中心测定空腹胰岛素(FINS)水平。

4.2 ELISA 法检测 IR 水平 根据大鼠胰岛素试剂盒中标准品的浓度以及相对应的 OD₄₅₀/OD₆₃₀值通过 Origin 7.5 软件分析作出胰岛素的标准曲线图(图 1),并得到其方程式: $Y = 3.1257 + (0.025084 -$

3.1257)/[1+(X/12.386)^{1.2954}](其中Y为OD₄₅₀/OD₆₃₀值,X为胰岛素标准品的浓度)。根据酶标仪检测得到样品的吸光度值(检测波长为450 nm/630 nm),利用标准曲线方程式计算得出待检样品中胰岛素浓度,其中QC1(0.63~1.31 ng/mL),QC2(2.1~4.3 ng/mL)。本实验QC1=0.93754 ng/mL,QC2=2.9492 ng/mL,符合质控样品的浓度范围。测定FINS,计算胰岛素抵抗指数(insulin resistance index,IRI)。

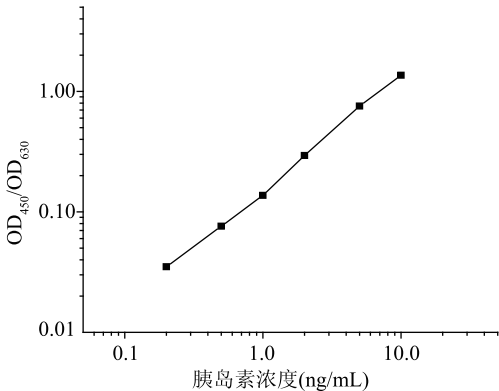


图1 胰岛素的标准曲线图

4.3 痰湿体质评估 参照文献[5]痰湿证评价标准,并根据实验观察,总结痰湿证评价标准量表,即以大鼠肥胖程度、血脂情况、FPG、IRI、大鼠活动度、食欲情况、皮毛光泽度、皮毛蓬松度、大便稀烂情况、外界反应能力强弱及饮水量作为大鼠痰湿模型评价指标,将各指标分4个等级计分,其中“无”记1分,“有些”记2分,“相当”记3分,“非常”记4分。总分≥22分者为痰湿证。

4.4 Western blot 检测大鼠脂肪组织PPAR-γ蛋白表达 实验结束后,乙醚麻醉大鼠,解剖、分离大网膜脂肪组织,匀浆器匀浆,将样品转移到1.5 mL离心管,冰中放置30 min。将离心管4℃ 12 000 r/min离心30 min。取20 μL裂解液,加5 μL 5×电泳上样缓冲液沸水浴5 min,12 000 r/min离心3 min,去除不溶性蛋白,上样。电泳约1.5 h。取分离胶进行转膜。后取出硝酸纤维膜,去离子水洗涤,洗液平衡后用5%脱脂奶粉(用PBS或TBS稀释)室温封闭30 min,再4℃

过夜,第2天室温平衡。不洗,加已稀释好的兔PPAR-γ(1:1 000),37℃反应1 h或4℃过夜。PBS(或TBS)洗膜,第1次15 min,后3次每次5 min。加入5 mL 1:5 000稀释的羊抗兔二抗,37℃反应1 h洗膜同上。先用纸巾把硝酸纤维膜上的PBS吸干,加入ECL化学发光试剂,完全浸透后,放于胶片上,盖上保鲜膜,放入X射线暗盒,置于暗房。在暗房里打开暗盒,放入胶片,盖紧暗盒,10~30 s后打开暗盒,拿出胶片,在显影液中浸透晃洗,再置于定影液浸透晃洗。胶片拿出暗房后马上浸泡于清水中,自然晾干。

5 统计学方法 应用SPSS 18.0软件包进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠体重比较(表1) 对照组造模第3~9周体重迅速上升,第9周后体重上升速度较前减慢。模型组、限摄组和中药限摄组大鼠体重前6周呈缓慢上升趋势,6~12周体重上升速度加快。热量限摄4天后,限摄组和中药限摄组大鼠体重较模型组明显下降($P < 0.01$),但两限摄组间体重比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2 各组大鼠热量限摄4天后FPG、FINS及IRI比较(表2) 与对照组比较,模型组大鼠FPG、FINS和IRI均显著升高($P < 0.01$)。热量限摄前,限摄组与中药限摄组大鼠FPG、FINS、IRI比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。经4天热量限摄后,与模型组比较,限摄组大鼠FPG无明显下降($P > 0.05$),FINS、IRI则明显降低($P < 0.01, P < 0.05$);中药限摄组大鼠FPG、FINS、IRI均显著降低($P < 0.05, P < 0.01$),且明显低于限摄组($P < 0.05$)。

3 各组大鼠痰湿体质比较(表2、3) 造模第12周末,与对照组比较,模型组大鼠出现IR,活动度降低,食欲下降,皮毛无光泽,蓬松,大便烂,对外界反应能力下降,饮水量减少。模型组、限摄组及中药限摄组间上述指标比较,差异无统计学意义。与模型组比较,热量限摄4天后,限摄组大鼠体重减轻,血脂下降,IR

表1 各组大鼠体重比较 (g, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	体重					
		造模第1天	造模第3周末	造模第6周末	造模第9周末	造模第12周末	热量限摄4天后
对照	12	204 ± 9	211 ± 26 *	266 ± 45 *	366 ± 54 *	395 ± 64 *	424 ± 68 *
模型	12	209 ± 11	224 ± 28	243 ± 57 *	347 ± 66 *	375 ± 71 *	378 ± 75 *
限摄	12	199 ± 10	216 ± 34 *	229 ± 61 *	302 ± 67 *	357 ± 72 *	319 ± 64 Δ
中药限摄	12	196 ± 17	206 ± 38	234 ± 68 *	298 ± 75 *	338 ± 76 *	301 ± 70 Δ

注:与本组第1天比较,* $P < 0.05$;与模型组同期比较,Δ $P < 0.01$

表 2 各组大鼠热量限摄 4 天后 FPG、FINS、IRI、TG 及 TC 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	FPG (mmol/L)	FINS (ng/mL)	IRI	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)
对照	12	3.37 ± 0.86	13.98 ± 2.46	2.05 ± 0.65	1.71 ± 0.05	1.01 ± 0.42
模型	12	5.31 ± 1.06 *	18.52 ± 5.51 *	4.42 ± 1.44 *	2.06 ± 0.72 *	1.93 ± 0.28 *
限摄	12	4.78 ± 1.16	7.11 ± 3.70 $\Delta\Delta$	1.52 ± 0.89 Δ	1.00 ± 0.26 $\Delta\Delta$	1.23 ± 0.34 $\Delta\Delta$
中药限摄	12	2.98 ± 1.09 $\Delta\Delta$	4.93 ± 1.88 $\Delta\Delta\Delta$	0.62 ± 0.24 $\Delta\Delta\Delta$	0.85 ± 0.18 $\Delta\Delta$	1.43 ± 0.27 $\Delta\Delta$

注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与限摄组比较, $\Delta P < 0.05$

改善($P < 0.01, P < 0.05$);但其 FPG 仍较高,活动度、食欲、对外界反应能力进一步降低,皮毛更加蓬松暗黄;大便烂,饮水量仍较少。而中药限摄组大鼠不但体重减轻,血脂、FPG 下降,IR 改善($P < 0.01, P < 0.05$);其活动度、食欲、饮水量、对外界反应能力、大便情况也出现好转。

表 3 热量限摄 4 天后各组大鼠痰湿证评分比较 (分)

指标	对照组 (n = 12)	模型组 (n = 12)	限摄组 (n = 12)	中药限摄组 (n = 12)
肥胖程度	1	2	1	1
血脂	1	3	1	1
FPG	1	3	2	2
IRI	1	3	2	2
活动度	1	2	3	1
食欲	1	2	2	1
皮毛光泽度	1	2	2	2
皮毛蓬松	1	2	2	2
大便	1	2	2	1
外界反应能力	1	2	2	1
饮水量	1	2	3	1
总分	11	25	22	15

4 各组大鼠大网膜脂肪组织 PPAR- γ 蛋白表达比较(图 2,表 4) 与对照组比较,模型组大网膜脂肪 PPAR- γ 蛋白表达升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,限摄组和中药限摄组大网膜脂肪 PPAR- γ 蛋白表达下调,差异有统计学意义($P < 0.01$),中药限摄组较限摄组表达量下调更明显($P < 0.01$)。

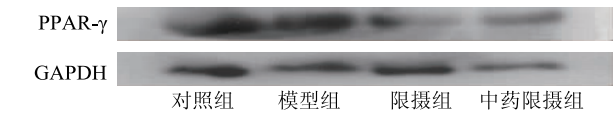


图 2 各组 Western blot 图

表 4 各组大鼠大网膜脂肪组织 PPAR- γ 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PPAR- γ ($\mu\text{mol/L}$)	GAPDH	PPAR- γ /GAPDH
对照	12	0.20 ± 0.05	0.35 ± 0.06	0.58 ± 0.11
模型	12	0.63 ± 0.06 *	0.32 ± 0.02	1.95 ± 0.07 *
限摄	12	0.55 ± 0.06 Δ	0.35 ± 0.05	1.57 ± 0.19 Δ
中药限摄	12	0.40 ± 0.03 $\Delta\Delta$	0.35 ± 0.04	1.13 ± 0.06 $\Delta\Delta$

注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$;与限摄组比较, $\Delta P < 0.01$

讨 论

现代社会代谢综合症的发病率不断升高^[5]。而限摄疗法是一种引自欧美的健康的自然疗法,本实验进行前,中医限摄疗法在我科临床已试行了 2 年余,我们发现,患者的血脂、血糖、IR、痰湿状态等各项指标较治疗前明显好转,并且副反应小。故鉴于此,我们开始了动物实验的论证研究。

前期动物实验表明,大鼠热量限摄 3~4 天为比较合理的限摄时间,不良反应小^[6]。本实验采用 4 天限摄方案,成功复制了 IR 大鼠模型,而在热量限摄后,限摄组 FINS 及 IRI 明显降低($P < 0.01, P < 0.05$),FPG 并无明显降低,说明单纯限摄虽可改善 IR,但对 FPG 的改善无益,其原因可能是限摄期间,大鼠肝脏糖异生增加,导致内源性肝糖输出增加,从而不能达到明显的血糖改善;但中药限摄组的良好降糖效果充分证明了中医限摄疗法对 IR 的有效性及安全性,对临床中医限摄疗法疗效的证实有着重要的科学意义。研究结果亦表明,两限摄组在 IR 改善的同时,其 PPAR- γ 的活性亦受到了抑制($P < 0.01$),且中医限摄组更显著($P < 0.01$)。可见热量限摄和中医联合热量限摄对于 IR 的改善作用与 PPAR- γ 表达的抑制呈明显正相关。推测苓桂术甘汤联合热量限摄疗法可能通过抑制脂肪细胞的分化,从而降低体重,并且改善 IR 水平,而其对 IR 的改善作用机制可能与 PPAR- γ 活性的抑制有关。这一点尤其值得我们深入研究探讨。

既往研究多集中于探讨如何激活 PPAR- γ 的活性,从而达到改善 IR 的治疗目的。而对于现今众所周知的 PPAR- γ 的激活剂噻唑烷二酮(TZD)来说,其类药物罗格列酮是目前治疗 IR 的代表药物,它促进 PPAR- γ 表达的增加和脂肪细胞的分化。但罗格列酮最终使脂肪积聚增多,引起体重增加,而肥胖与 IR 具有高度相关性,造成了治疗上的矛盾^[7]。

而从本实验结果发现,中医限摄疗法及短期限摄对 PPAR- γ 活性的抑制作用与罗格列酮类药物对 PPAR- γ 表达的激活作用机制恰恰相反,但却仍然很好地改善了 IR 水平,且不具有类似肥胖的副反应发

