

木丹颗粒对谷氨酸钠诱导的胰岛素抵抗小鼠胰岛 β 细胞功能影响的实验研究

刘率男 孙素娟 刘 泉 侯少聪 申竹芳

摘要 **目的** 研究木丹颗粒(Mudan Granule, MD)对谷氨酸钠(monosodium glutamate, MSG)诱导的肥胖性胰岛素抵抗小鼠糖代谢及胰岛 β 细胞功能的影响。**方法** 新生小鼠连续 7 日皮下注射 MSG 形成模型动物,选 40 只具有胰岛素抵抗特征的 MSG 小鼠,依照体重、空腹血糖、血脂 TG、TC 以及胰岛素耐量试验中 40 min 血糖下降百分数 5 个指标,随机分为 4 组,包括模型组(Con 组),MD 组低、高剂量组和二甲双胍组(Met 组),另取 10 只 ICR 小鼠为正常对照组(Nor 组),MD 低剂量组和高剂量组分别给予 2.5、5 g/kg 体重的原料药干膏粉水溶剂, Met 组给予 0.2 g/kg 体重的盐酸二甲双胍水溶液, Nor 组和 Con 组均给予等剂量配药溶剂蒸馏水,每日灌胃给药 1 次,给药时长 15 周。期间进行胰岛素耐量(ITT)和口服葡萄糖耐量试验(OGTT);采用高血糖钳夹技术评价 β 细胞功能;测定 MSG 小鼠胰腺中硝化应激相关指标(ONOO⁻、iNOS)的改变;胰腺组织 HE 染色,观察胰岛病理形态的变化;检测胰腺中炎症相关因子蛋白 iNOS 和 NF- κ B p65 及其磷酸化蛋白(p-NF- κ B p65)水平的改变。**结果** 与 Nor 组比较, Con 组的 OGTT 及 ITT 实验各时间点的血糖水平、AUC 以及空腹血清胰岛素、ONOO⁻ 含量、iNOS 活性、iNOS 表达、NF- κ B p65 亚基表达、p-NF- κ B p65 亚基表达均明显升高, ITT 实验 40 min 血糖下降百分数、葡萄糖输注速率(GIR)、一相及最大胰岛素分泌均明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 Con 组比较, Met 组可改善上述各项指标($P < 0.05$, $P < 0.01$); MD 低组 OGTT 及 ITT 实验的 AUC、iNOS 活性、iNOS 表达、p-NF- κ B p65 亚基表达均明显下降, ITT 实验 40 min 血糖下降百分数及 GIR 均明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$); MD 高组 OGTT 及 ITT 实验的 AUC、ONOO⁻ 含量、iNOS 活性、iNOS 表达、NF- κ B p65 亚基表达、p-NF- κ B p65 亚基表达均明显下降, ITT 实验 40 min 血糖下降百分数、GIR 以及最大胰岛素分泌均明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 木丹颗粒可显著改善肥胖性胰岛素抵抗 MSG 小鼠的胰岛素抵抗和 β 细胞功能紊乱状态,可能与其降低 MSG 小鼠胰腺中炎症反应有关。

关键词 木丹颗粒; MSG 小鼠; 胰岛 β 细胞功能; 炎症因子

Effect of Mudan Granule on Islets β Cell Function in Monosodium Glutamate Induced Obese Mice with Insulin Resistance: an Experimental Study LIU Shuai-nan, SUN Su-juan, LIU Quan, HOU Shao-cong, and SHEN Zhu-fang National Key Laboratory of Bioactive Substances and Functions of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing (100050), China

ABSTRACT **Objective** To study the effect of Mudan Granule (MD) on the glucose metabolism and beta cell function in monosodium glutamate (MSG) induced obese mice with insulin resistance (IR). **Methods** MSG obese mice were induced by subcutaneous injecting MSG (4 g/kg for 7 successive days in neonatal ICR mice). Forty MSG mice with IR features were recruited and divided into four groups according to body weight, fasting blood glucose, triglyceride (TG), total cholesterol (TC), and the percentage of blood glucose decreased within 40 min in the IR test, i.e., the model group (Con), the low dose MD group, the high dose MD group, and the Metformin group (Met). Besides, another 10 ICR mice were recruited as the normal control group (Nor). The water solvent of 2.5 g/kg MD or 5 g/kg MD was respectively administered

基金项目:重大新药创制国家科技重大专项-心脑血管病,糖尿病并发症,神经退行性疾病药物药效学评价(No. 2012ZX09301002-004)

作者单位:中国医学科学院北京协和医学院药物研究所天然药物活性物质与功能国家重点实验室(北京 100050)

通讯作者:申竹芳, Tel: 010-83172669, E-mail: shenzhf@imm.ac.cn

DOI: 10.7661/CJIM.2014.07.0853

to mice in the low dose MD group and the high dose MD group. Metformin hydrochloride was given to mice in the Met group at 0.2 g/kg body weight. Equal dose solvent distilled water was administered to mice in the Nor group and the Con group by gastrogavage, once per day. All medication was lasted for 15 weeks. Insulin tolerance test (ITT) and oral glucose tolerance test (OGTT) were performed after 6 weeks of treatment. Beta cell function was assessed by hyperglycemic clamp technique. The morphological changes in the pancreas were evaluated by hematoxylin-eosin (HE) staining. Changes of iNOS, NF- κ B p65, and p-NF- κ B p65 in the pancreas were tested. Results Compared with the Nor group, the blood glucose level, AUC, and fasting blood insulin, ONOO⁻ contents, iNOS activities, and the expression of iNOS, NF- κ B p65 subunit, p-NF- κ B p65 subunit obviously increased; decreased percentage of blood glucose within 40 min in ITT, glucose infusion rate (GIR), Clamp 1 min insulin, and Max-Insulin obviously decreased in the Con group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the Con group, the aforesaid indices could be improved in the Met group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). In the low dose MD group, AUC, iNOS activities, and the expression of iNOS and p-NF- κ B p65 subunit obviously decreased; percentage of blood glucose within 40 min in ITT and GIR obviously increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). In the high dose MD group, AUC, ONOO⁻ contents, iNOS activities, and the expression of iNOS, NF- κ B p65 subunit, and p-NF- κ B p65 subunit obviously decreased; percentage of blood glucose within 40 min in ITT, Max-Insulin, and GIR obviously increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Conclusion MD could significantly improve IR and functional disorder of β cells in MSG obese mice, which might be associated with lowering inflammatory reaction in the pancreas.

KEYWORDS Mudan Granule; islet Beta cell function; inflammatory factor

木丹颗粒 (Mudan Granule, MD, 又称糖末宁颗粒) 由黄芪、延胡索、丹参等 9 味中药组方, 功能主治为益气活血, 通络止痛, 用于治疗糖尿病性周围神经病变。临床研究证明, 木丹颗粒能改善糖尿病性周围神经病变患者的神经传导速度, 而且使患者四肢麻木、疼痛、倦怠乏力、神疲懒言、自汗、肌肤甲错等临床表现有明显改变^[1]。鉴于在以往药效学实验及临床研究中, 木丹颗粒的功能主治为益气活血, 通络止痛, 笔者认为木丹颗粒可以通过促进血液微循环对全身症状的进行改善, 可能具有改善 2 型糖尿病其他病理症状 (胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞功能) 的作用。同时有数据显示: 木丹颗粒可轻微抑制或延缓链脲霉素 (STZ) 诱导的糖尿病大鼠胰岛 β 细胞的凋亡或改善糖尿病肾病大鼠的脂质代谢^[2, 3]。中医学认为益气活血、祛瘀生新的中药方剂常可通过整体调节和综合作用治疗糖尿病及降低其并发症的发生。本研究旨在观察长期应用木丹颗粒能否改善除神经病变以外 2 型糖尿病的其他病理变化。因此, 选择谷氨酸钠 (monosodium glutamate, MSG) 诱导的肥胖性胰岛素抵抗小鼠, 围绕糖代谢、胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞功能等方面, 评价长期给药后, 木丹颗粒对模型动物糖代谢和胰岛 β 细胞功能的影响, 并探讨其作用特点和机制。

材料与方法

1 动物 正常雄性、雌性 ICR 小鼠分别为 10 只

和 20 只, 体重 20 ~ 22 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证编号为 SCXK (京) 2002 - 0003。所有动物均饲养于 SPF 级动物房。

2 药物 木丹颗粒干膏粉 (原料药干膏粉, 成分: 黄芪、延胡索 (醋制)、三七、赤芍、丹参、川芎、红花、苏木、鸡血藤), 由辽宁营口奥达制药有限公司提供。批号: 20110620。盐酸二甲双胍片 (0.5 g, 批号 A114L, 澳大利亚艾华大药厂)

3 试剂 胰岛素 (优泌林), 礼来制药公司; 诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、硝基自由基 (ONOO⁻) 测定试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 小鼠超敏胰岛素 ELISA 试剂盒, ALPCO 公司; 蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂, 北京普利莱基因技术有限公司; 抗体 iNOS 和细胞核因子 κ B (NF- κ B), Cell Signaling Technology (CST) 公司; 葡萄糖、L-谷氨酸钠、戊巴比妥钠等其他试剂均为国产分析纯。

4 仪器 μ -Quant 酶标仪 (美国 BIO-TEK 公司); Master Flex-L/S 蠕动泵 (美国 Cole-Parmer 公司); GLUCOTREND 2 血糖仪 (德国 Roche 公司); JY-92 II 型超声破碎仪 (宁波新芝科技股份有限公司); 3 - 18K 型低温高速离心机 (德国 Sigma 公司); HZQ-C 空气浴震荡器 (哈尔滨东明医疗仪器厂); Bio-Rad mini-3D 蛋白电泳装置 (Bio-Rad 公司); 水平摇床 (北京六一仪器厂); ECL (ChemiScope 2820) 化学发光成像系统 (上海勤翔科学仪器有限公司)。

表 1 各组相关指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	空腹血糖 (mmol/L)	40 min 血糖 下降百分数(%)	TG (mmol/L)	CHO (mmol/L)	体重(g)
Nor	10	4.0 ± 0.5 *	33.0 ± 13.6 *	1.0 ± 0.3 *	3.2 ± 0.7 *	31.4 ± 4.4 *
Con	10	5.2 ± 0.8	3.5 ± 12.5	1.8 ± 0.4	5.1 ± 1.2	60.4 ± 6.9
MD 低	10	5.4 ± 0.8	3.3 ± 12.5	1.7 ± 0.4	5.3 ± 1.6	60.5 ± 8.4
MD 高	10	5.2 ± 0.7	3.4 ± 12.3	1.7 ± 0.4	5.2 ± 0.8	60.6 ± 6.0
Met	10	5.3 ± 1.0	3.3 ± 12.9	1.7 ± 0.6	5.3 ± 1.3	60.8 ± 6.3

注:与 Con 组比较,* $P < 0.01$

5 模型建立及分组 依照文献[4]方法,建立谷氨酸钠盐(MSG)诱导的肥胖性胰岛素抵抗小鼠模型(简称MSG小鼠)。雌、雄ICR小鼠交配受孕后,新生的ICR小鼠出生2天后,皮下注射MSG 4 g/kg,连续7天。小鼠断乳后,正常饮食饲养4个月,选择60只肥胖体征动物,采用胰岛素耐量试验(ITT)筛选,依据40 min血糖下降百分数、空腹血糖、血清甘油三酯(TG)、血清总胆固醇(TC)及体重等,挑选40只具有胰岛素抵抗特征的动物均分4组,分别为模型对照组(Con组),木丹颗粒低剂量组(MD低组)和高剂量组(MD高组),阳性药二甲双胍组(Met组),另取10只雌性ICR小鼠作正常对照组(Nor组)。分组指标详见表1。

6 给药方法 动物分组后开始给药,MD低剂量组和高剂量组分别给予剂量为2.5、5 g/kg体重的原料药干膏粉水溶剂,分别相当于临床等效剂量的3和6倍;Met组给予剂量为0.2 g/kg体重的盐酸二甲双胍水溶液,Nor组和Con组均给予等剂量配药溶剂蒸馏水,每日口服灌胃给药1次,给药时长15周。

7 检测指标及方法

7.1 口服葡萄糖耐量试验(OGTT) 给药6周后,实验当天,动物禁食4 h后,进行OGTT。采用葡萄糖氧化酶法,测定空腹血糖(0 min)及葡萄糖(2.0 g/kg)负荷后30、60、120 min时的血糖值,计算30 min血糖上升百分数及血糖曲线下面积(AUC)。

7.2 ITT 给药第7周,实验当天,动物禁食4 h后,进行ITT。取10 μL血样作为零时血样(0 min),皮下注射常规胰岛素溶液(0.4 IU/kg),其后40、90 min采血血样,测定各时间点的血糖,并计算40 min血糖下降百分数及血糖曲线下面积(AUC)。

7.3 高葡萄糖钳夹试验 给药15周时,动物在实验前日晚开始禁食12 h,戊巴比妥钠麻醉(80 mg/kg体重,腹腔注射),固定、行颈静脉插管手术。尾尖采集50 μL血样,用于测定空腹血糖和血清胰岛素水平(FINS),其后开始高糖钳夹试验。经颈静脉插管注

射初始剂量葡萄糖(100 mg/kg体重),使血糖在5 min内迅速升至较高水平,其后持续输入葡萄糖(20%,重量体积比),每5 min检测血糖1次,并调整葡萄糖输注速率(GIR),使血糖水平维持在(14.0 ± 0.5) mmol/L。稳态后取5个时间点GIR的平均值作为稳态时GIR。另外,在初始剂量糖负荷后1~15 min内、稳态期时分别采集血样用于测定一相(Clamp 1 min insulin)和钳夹中最大胰岛素分泌量(Max-Insulin)。根据GIR值判断胰岛β细胞的功能,即β细胞对葡萄糖的反应性及β细胞胰岛素的分泌能力;其中GIR计算公式为:GIR (mg/kg/min) = 葡萄糖输注速率 (mL/min) × 250 (mg/mL)/体重 (g)。

7.4 胰腺病理形态变化 动物处死后,分离胰腺,生理盐水冲洗,拭干后,称重并计算胰腺指数;一部分胰腺组织于液氮中迅速冻存,用于生化指标测定,备用。取胰尾部分用Bouin's液固定,常规石蜡包埋,5 μm切片,进行HE染色。采用多媒体彩色病理图像分析系统在分辨率、对比度、亮度等相同条件下观察胰腺组织的形态学变化。

7.5 胰腺匀浆生化指标测定 取冻存的部分胰腺组织,用冷生理盐水制成10%的组织匀浆,以2 000 r/min低温离心10 min,上清液为胰腺匀浆;其后按各试剂盒说明书操作步骤分别测定胰腺匀浆中ONOO⁻、iNOS含量;蛋白定量采用考马斯亮蓝法。

7.6 检测胰腺组织中炎症相关因子的蛋白表达水平 从-80℃冰箱中取出胰腺组织标本约100 mg,加入400 μL含磷酸化酶抑制剂、蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液,超声匀浆,充分裂解,冰浴放置35 min,期间适时混匀。12 000 r/min离心5 min。吸取上清,获得总蛋白样品。上清与上样缓冲液混匀煮沸制备成蛋白电泳样品,用Western blot检测炎症通路相关蛋白因子iNOS和NF-κB p65及其磷酸化蛋白(p-NF-κB p65)的表达。

8 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组小鼠 OGTT 实验结果比较(表 2) 与 Nor 组比较,Con 组空腹血糖升高($P < 0.05$),口服葡萄糖负荷后各时间点血糖水平均显著升高($P < 0.01$),具有糖耐量受损特征;与 Con 组比较,MD 低、高剂量组 MSG 小鼠口服葡萄糖后 30、60 min 的血糖及 AUC 显著减低($P < 0.01, P < 0.05$); Met 组糖负荷后各时间点的血糖与 AUC 亦比较 Con 组明显降低($P < 0.01$),与 MD 低、高组差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2 各组小鼠 ITT 结果比较(表 3) Con 组 ITT 试验中各时间点血糖、AUC 及 40 min 血糖下降百分数显著低于 Nor 组($P < 0.01$),具有明显胰岛素抵抗特征;与 Con 组比较,MD 低组 MSG 小鼠 40 min 血糖降低 20.1%($P < 0.01$),MD 高组 MSG 小鼠 40 min 血糖降低 19.7%($P < 0.01$);与 Con 组比较,MD 低、高组均可显著降低 MSG 小鼠 ITT 试验中血糖 AUC($P < 0.05$); Met 组 ITT 试验中 40、90 min 的血糖、40 min 血糖降低百分数以及 AUC 亦较 Con 组明显降低($P < 0.01, P < 0.05$)。

3 各组小鼠高葡萄糖钳夹试验结果比较(表 4) Con 组小鼠的 GIR 值、一相和最大胰岛素分泌量均明显低于 Nor 组($P < 0.01$),空腹血清胰岛素水平高于 Nor 组($P < 0.01$);与 Con 组比较,MD 低、高组 GIR 值均增加了 1.87 倍和 1.95 倍($P < 0.05$),Met 组 GIR

值增加了 2.0 倍($P < 0.05$),与 MD 低、高组作用相当;与 Con 组比较,MD 高组可显著增加 MSG 小鼠最大胰岛素分泌量($P < 0.05$);Met 组亦可显著增加最大胰岛素分泌量($P < 0.01$),作用优于 MD 高组。

表 4 各组小鼠高葡萄糖钳夹试验结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	GIR	FINS	一相胰岛素	最大胰岛素分泌
		(mg/kg/min)	(ng/mL)		
Nor	10	36.3 ± 3.1 **	1.2 ± 0.2 **	15.9 ± 3.0 *	212.8 ± 6.0 **
Con	10	14.2 ± 3.5	5.1 ± 0.2	6.4 ± 3.0	33.7 ± 2.8
MD 低	10	26.6 ± 4.3 *	6.2 ± 1.1	12.3 ± 3.4	56.5 ± 1.5
MD 高	10	27.7 ± 4.9 *	5.0 ± 0.1	10.7 ± 0.1	114.1 ± 11.9 *
Met	10	28.4 ± 6.3 *	7.1 ± 2.0	13.0 ± 2.9 *	204.8 ± 1.3 **

4 各组小鼠胰腺组织中炎症相关因子的蛋白表达水平比较(表 5) Con 组胰腺中 ONOO⁻ 含量和 iNOS 活性高于 Nor 组($P < 0.01, P < 0.05$);与 Con 组比较,MD 低、高组可降低 MSG 小鼠胰腺中 iNOS 的活性达 57.5% 和 66.3% ($P < 0.05$),MD 高组 MSG 小鼠胰腺中 ONOO⁻ 含量也显著降低 28.8% ($P < 0.01$)。Met 组亦可显著降低 MSG 小鼠胰腺中 iNOS 活性及 ONOO⁻ 含量($P < 0.05$),与 MD 低、高组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 5 各组小鼠胰腺组织中炎症相关因子的蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ONOO ⁻ (μmol/g pro)	iNOS (IU/mg pro)
Nor	10	0.39 ± 0.08 **	0.48 ± 0.20 *
Con	10	0.59 ± 0.10	0.80 ± 0.30
MD 低	10	0.51 ± 0.07	0.34 ± 0.19 *
MD 高	10	0.42 ± 0.08 **	0.27 ± 0.10 *
Met	10	0.47 ± 0.10 *	0.41 ± 0.22 *

表 2 各组小鼠 OGTT 实验结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	OGTT 血糖值 (mmol/L)				AUC (mmol/L/h)
		0 min	30 min	60 min	120 min	
Nor	10	4.9 ± 0.8 *	8.4 ± 0.8 **	6.4 ± 0.7 **	5.4 ± 0.8 **	12.9 ± 1.2 **
Con	10	6.2 ± 1.4	11.9 ± 3.4	8.7 ± 1.6	8.5 ± 1.9	18.3 ± 3.5
MD 低	10	5.9 ± 0.4	8.2 ± 1.3 **	6.9 ± 0.7 **	7.3 ± 0.8	14.4 ± 1.4 **
MD 高	10	6.1 ± 0.7	8.4 ± 2.3 *	7.0 ± 1.4 *	7.2 ± 1.1	14.5 ± 2.6 *
Met	10	4.7 ± 1.0 **	7.0 ± 1.6 **	7.0 ± 1.3 **	6.2 ± 1.0 **	13.0 ± 2.2 **

注:与 Con 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;下表、图均同

表 3 各组小鼠 ITT 结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ITT 血糖值 (mmol/L)			AUC (mmol/L/h)	40 min 血糖 下降百分数 (%)
		0 min	40 min	80 min		
Nor	10	3.9 ± 0.8 *	2.4 ± 0.4 **	2.4 ± 0.6 **	4.1 ± 0.6 **	36.6 ± 11.5 **
Con	10	6.5 ± 1.4	5.9 ± 1.1	6.5 ± 1.3	9.3 ± 1.6	8.5 ± 9.7
MD 低	10	5.9 ± 0.4	4.7 ± 1.0 *	6.7 ± 1.0 **	8.3 ± 1.2 *	20.1 ± 14.0 **
MD 高	10	5.5 ± 0.8	4.4 ± 1.0 **	6.2 ± 0.8	7.7 ± 1.1 *	19.7 ± 7.0 **
Met	10	5.0 ± 0.7 **	4.1 ± 1.1 **	5.4 ± 0.9 *	7.0 ± 1.3 **	17.4 ± 7.7 **

5 各组小鼠胰腺组织病理形态比较(图 1) 与 Nor 组比较, Con 组胰岛面积有一定程度增大,部分胰岛中出现炎性浸润、空泡状且外周不规则。与 Con 组比较,MD 低、高组中,部分胰岛外周接近规则,边界也较清晰,炎性浸润情况有所减轻,与 Met 组对胰岛形态的改善作用相近。

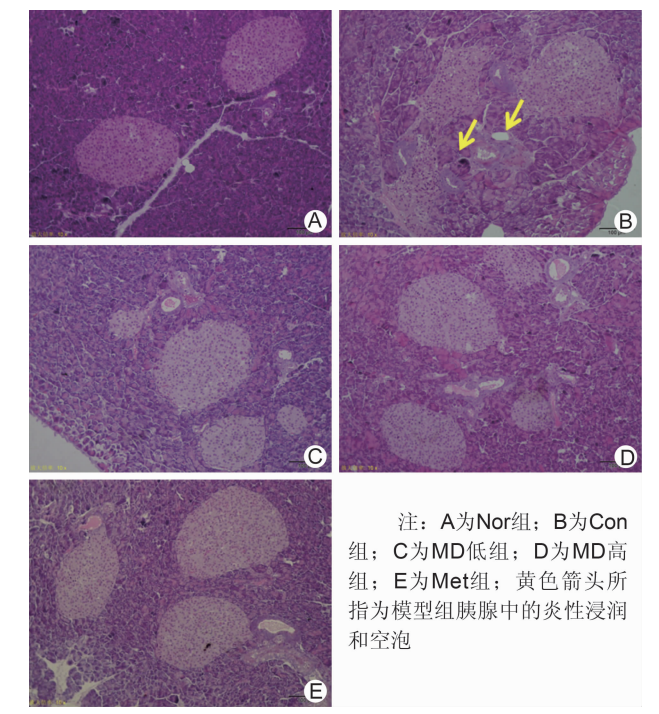


图1 各组小鼠胰腺组织病理形态结果比较 (HE, ×100)

6 各组小鼠胰腺中 iNOS 和 NF-κB 蛋白及其磷酸化蛋白表达比较(图 2) 与 Nor 组比较,Con 组胰腺中 iNOS、NF-κB p65 亚基及 p-NF-κB p65 亚基的表达量显著增加($P < 0.01$, $P < 0.05$)。MD 低组可一定程度减低 MSG 小鼠胰腺中 iNOS 和 p-NF-κB p65 亚基的表达水平($P < 0.05$, $P < 0.01$),MD 高组亦可显著下调 MSG 小鼠胰腺中 iNOS、NF-κB p65 亚基及 p-NF-κB p65 亚基的表达水平($P < 0.01$);Met 组可显著下调 MSG 小鼠胰腺中 NF-κB p65 和 p-NF-κB p65 亚基表达($P < 0.01$),作用与 MD 高组相当;亦可显著下调胰腺 iNOS 的表达水平($P < 0.05$),作用与 MD 低组相当。

讨 论

中医学认为糖尿病(消渴症)的基本病因为燥热伤阴、阴损气耗、经久不愈而终导致的气阴两虚。气虚运血无力以至瘀血阻络时,最终导致糖尿病的各种并发症(微血管、肾脏及周围神经病变等)。木丹颗粒以黄芪、延胡索、三七、川芎、丹参、赤芍、红花、苏木、鸡血

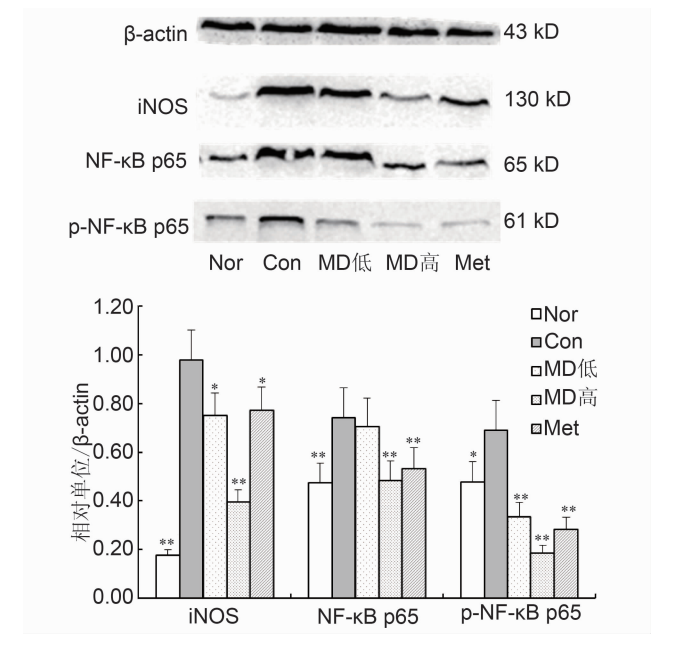


图2 各组小鼠胰腺中 iNOS 和 NF-κB 蛋白及其磷酸化蛋白表达比较(n = 10)

藤 9 味中药组方,具益气活血,祛瘀生新、通络止痛的功效^[5]。木丹颗粒组方中,黄芪是许多降糖中药复方的常用药味之一^[6],丹参也对于改善糖尿病肝、肾病变也有一定疗效^[7,8]。而木丹颗粒这类具有益气活血、祛瘀生新的方剂,长期服用也可能通过促进血液循环及全身症状的改善,对 2 型糖尿病其他病理症状(胰岛素抵抗和胰岛素分泌功能受损)也具有改善功效^[9]。

MSG 肥胖小鼠模型,其主要特征是胰岛素抵抗,还具有肥胖、高胰岛素血症,糖耐量异常等特征,常被用于代谢综合征或糖尿病治疗新药的药效学评价^[10]。木丹颗粒(分别 2.5、5 g/kg)治疗 7 周后,在一定程度上能改善 MSG 小鼠的胰岛素抵抗及糖耐量异常,但对 MSG 小鼠的空腹血糖的降低作用并不显著,该结果可能与 MSG 小鼠自身空腹血糖水平不高有关;在给药过程中还发现,低、高剂量均能够降低 MSG 小鼠的饮水量,MD 高组可显著降低 MSG 小鼠的摄食量,且该组 MSG 小鼠的体重显著降低,该作用与阳性药物二甲双胍类似。因此,长期服用木丹颗粒有可能利于肥胖和糖尿病前期状态下的体重控制。

另外,本实验中木丹颗粒可显著增加 MSG 小鼠高葡萄糖钳夹中的 GIR 值,且 MD 高组可增加胰岛 β 细胞的最大分泌能力。但木丹颗粒对 MSG 小鼠的空腹血清胰岛素和一相胰岛素分泌未见显著影响。提示在 MSG 小鼠中,MD 对其高胰岛素血症的改善作用不显著,且对糖刺激的快速胰岛素分泌影响不大。但通

过长期给药可改善 MSG 小鼠的最大胰岛素分泌量,可能促进其胰岛素生物合成和储存能力,从而改善受损的胰岛 β 细胞功能。另外,木丹颗粒对 MSG 小鼠胰岛病理形态也有一定改善作用,MD 两个剂量组中胰岛形态规则化程度增加,部分胰岛的炎性浸润减少。

糖脂毒性引起的氧化、硝化应激是胰岛 β 细胞损伤的主要原因之一^[11]。其中硝化应激是指由一氧化氮或由一氧化氮(NO)衍生的活性氮族(reactive nitrogen species, RNS)共同联合发生的生物化学作用。RNS 使细胞内蛋白质中的酪氨酸硝化,与炎症、心血管疾病等多种病症相关,能够诱导慢性炎症和胰岛素抵抗^[12,13]。在 β 细胞损伤和凋亡中, NF- κ B 的活化及 iNOS 的激活引起的炎症学说备受关注。在胞浆中, NF- κ B 以 P50 和 P65 二聚体形式存在并处于失活状态,经细胞因子、活性氧等刺激 NF- κ B 活化,调控下游相关靶基因的转录表达(包括 iNOS、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1)等^[14,15]。其中 iNOS 又可广泛地参与趋炎因子表达和 RNS 的产生,进一步干扰胰岛素信号转导而诱发胰岛素抵抗、胰岛 β 细胞功能受损^[16]。本实验中发现,木丹颗粒可降低 MSG 小鼠胰腺中硝化应激相关因子——ONOO⁻ 含量和 iNOS 的活性。采用 Western blot 法检测了胰腺 NF- κ B 和其磷酸化活性形式的表达水平,木丹颗粒各剂量组可一定程度减低 MSG 小鼠胰腺中 NF- κ B p65 亚基的表达水平,且磷酸化形式的 p-NF- κ B p65 的比例有所降低。故笔者考虑木丹颗粒改善 MSG 小鼠胰岛 β 细胞功能紊乱很可能与其改善胰腺组织中炎症状态有关。

综上,木丹颗粒长期给药可改善 MSG 肥胖小鼠胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞功能紊乱状态,其可能与下调胰腺中炎症通路活化因子,降低 iNOS 活性,缓解 MSG 小鼠胰腺中的低度炎症状态有关。但是,木丹颗粒对 2 型糖尿病的血糖控制和长期应用时其他病理症状改善的作用还需要在多种实验模型中得到验证,有待进一步研究和探讨。

参 考 文 献

- [1] 王丽,于世家. 糖末宁治疗 DPN 临床疗效和机理研究[J]. 实用糖尿病杂志, 2007, 3(4): 26-27.
- [2] 金小北. 中药合剂糖末宁对糖尿病肾病大鼠血脂异常调节作用的研究[J]. 光明中医, 2011, 26(9): 1792-1794.
- [3] 申林. 木丹颗粒对糖尿病大鼠胰岛 β 细胞 Bcl-2/Bax 的影响[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2010.
- [4] Iwase M, Yamamoto M, Iino K, et al. Obesity induced by neonatal monosodium glutamate treat-

ment in spontaneously hypertensive rats: an animal model of multiple risk factors[J]. *Heartens Res*, 1998, 21(1): 1-6.

- [5] 寇秋爱, 张广德, 魏子孝, 等. 糖末宁颗粒治疗糖尿病性周围神经病变(气虚络阻证)432 例临床研究[J]. 中药新药与临床药理, 2007, 18(1): 66-69.
- [6] 马燕, 张晶, 王亚, 等. 黄芪降糖颗粒降糖作用实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8): 157-160.
- [7] 胡波, 范红伟, 鲍军强, 等. 丹参对糖尿病肾损伤大鼠水液代谢异常与水通道蛋白调节机制探讨[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(2): 356-358.
- [8] 李静, 刘德义. 丹参对链脲佐菌素糖尿病大鼠肝和肾组织结构的影响[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(21): 11162-11164.
- [9] 施剑, 伊桐凝, 于世家. 木丹颗粒对 2 型糖尿病患者颈动脉内膜中层厚度及血浆炎症因子水平的影响[J]. 光明中医, 2012, 27(5): 896-897.
- [10] Yamamoto T, Matsuo S, Ueshima Y, et al. Plasma levels of insulin-like growth factor-I are reduced at one week of age in monosodium L-glutamate-treated mice[J]. *Endocr J*, 1993, 40(4): 461-465.
- [11] 吴元洁, 方朝晖, 郑书国, 等. 丹蛭降糖胶囊联合运动对糖尿病大鼠胰腺氧化应激及胰岛功能的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(11): 1531-1534.
- [12] Akopova OV, Korkach IuP, Kotsiuruba AV, et al. Reactive nitrogen and oxygen species metabolism in rat heart mitochondria upon administration of NO donor *in vivo* [J]. *Fiziol Zh*, 2012, 58(2): 3-15.
- [13] Newsholme P, Rebelato E, Abdulkader F, et al. Reactive oxygen and nitrogen species generation, antioxidant defenses, and β -cell function: a critical role for amino acids[J]. *J Endocrinol*, 2012, 214(1): 11-20.
- [14] Darra E, Rungtatscher A, Carcereri de Prati A, et al. Dual modulation of nitric oxide production in the heart during ischaemia/reperfusion injury and inflammation[J]. *Thromb Haemost*, 2010, 104(2): 200-206.
- [15] Olson N, van der Vliet A. Interactions between nitric oxide and hypoxia-inducible factor signaling pathways in inflammatory disease[J]. *Nitric Oxide*, 2011, 25(2): 125-137.
- [16] Wang Y, Zhu Y, Gao L, et al. Formononetin attenuates IL-1 β -induced apoptosis and NF- κ B activation in INS-1 cells[J]. *Molecules*, 2012, 17(9): 10052-10064.

(收稿: 2013-04-07 修回: 2014-04-01)