

丹瓜方对 Apo E^{-/-} 糖尿病模型小鼠糖脂代谢及血管细胞黏附分子-1 及 mRNA 表达水平的影响

衡先培¹ 李 亮² 黄苏萍³ 陈 燕² 林妙娴² 庄怀山² 颜群芳² 杨柳清¹ 陈 玲⁴ 林 青¹
程心玲¹ 陈敏灵¹ 陈依楚² 蓝元隆² 王志塔² 姚淑红² 张治三²

摘要 **目的** 研究丹瓜方对载脂蛋白 E 基因敲除(ApoE^{-/-})小鼠复合糖尿病模型糖脂代谢指标、血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)及其 mRNA 表达水平的影响,探讨丹瓜方防治糖尿病合并血管病变的部分机制。**方法** Apo E^{-/-}小鼠皮下注射链脲佐菌素(STZ)制备糖尿病模型。将 32 只成模鼠按照体重分层,再按血糖水平以随机数字表法分为模型组[无菌水(SW), 15 mL/(kg·d)]、丹瓜方组[丹瓜方(DG), 15 mL/(kg·d)]、联合用药组[吡格列酮(PG), 4.3 mg/(kg·d)加 DG 15 mL/(kg·d)]、吡格列酮组[PG, 4.3 mg/(kg·d)], 每组 8 只。选血糖正常的 8 只同龄同品系 C 57 小鼠作为对照组。灌胃干预 12 周。监测各组小鼠空腹血糖(FBG)、体重、摄食量及饮水量;测量皮温及鼠尾长度,并通过肉眼观察肝脂肪变程度;测定各组小鼠血清 HbA1c、TC、LDL-C 水平,采用放射免疫法测定 ET-1,生化法—硝酸还原酶法测定 NO, ELISA 法测定 VCAM-1,应用实时荧光定量 PCR(qPCR)检测肾组织 VCAM-1 mRNA 表达。**结果** 与对照组比较,模型组小鼠体重及摄食量减少,饮水量增加($P < 0.05$),且血糖值曲线全程高于对照组($P < 0.01$)。与模型组比较,丹瓜方组小鼠体重增量、HbA1c、TC、LDL-C、ET-1、VCAM-1 水平显著降低,皮温升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与吡格列酮组比较,丹瓜方组小鼠体重、体重增量、FBG、TC 及 LDL-C 水平降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)、饮水量和摄食量增加,鼠尾较长($P < 0.01$);各组小鼠 NO 水平比较,差异无统计学意义。与对照组比较,模型组肝脂肪变程度较重($P < 0.05$);与模型组及吡格列酮组比较,丹瓜方组脂肪变程度明显减轻($P < 0.05$, $P < 0.01$),吡格列酮组肝脂肪变程度重于模型组($P < 0.01$),而联合用药组肝脂肪变程度处于丹瓜方组和吡格列酮组之间。丹瓜方组 VCAM-1 mRNA 的表达显著低于模型组($P < 0.01$),且低于联合用药组和吡格列酮组($P < 0.05$)。**结论** 丹瓜方对自发性动脉粥样硬化和高脂血症的 ApoE^{-/-}转基因小鼠的复合糖尿病模型有降低血糖、血脂及抗脂肪肝作用,并可减轻吡格列酮致脂肪肝不良作用,降低 ET-1、VCAM-1 及其 mRNA 的表达,表现出综合调控糖脂代谢、改善血管功能的效果,有助于防治糖尿病血管病变。

关键词 丹瓜方;糖尿病;血管病变;高糖无害化;糖脂代谢

Effect of Dangua Recipe on Glycolipid Metabolism and VCAM-1 and Its mRNA Expression Level in Apo E^{-/-} Mice with Diabetes Mellitus HENG Xian-pei¹, LI Liang², HUANG Su-ping³, CHEN Yan², LIN Miao-xian², ZHUANG Huai-shan³, YAN Qun-fang², YANG Liu-qing¹, CHEN Ling⁴, LIN Qing¹, CHENG Xin-ling¹, CHEN Min-ling¹, CHEN Yi-chu², LAN Yuan-long², WANG Zhi-ta², YAO Shu-hong², and ZHANG Zhi-san² 1 Department of Endocrinology, People's Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou (350004), China; 2 Postgraduate Department, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou (350108), China; 3 Fujian Institute of Integrated Chinese and Western Medicine, Fuzhou (350108), China; 4 Department of Physiology, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou (350108), China

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81173179);福建省自然科学基金资助项目(No.2011J01198);福建省科技社会发展重点项目(2012Y0037);陈可冀中西医结合发展基金资助项目(No. CKJ2009004)

作者单位:1.福建中医药大学附属人民医院暨福建省人民医院内分泌科(福州 350004);2.福建中医药大学研究生部(福州 350108);3.福建中西医结合研究院(福州 350108);4.福建中医药大学生理学教研室(福州 350108)

通讯作者:衡先培, Tel:13101424082, E-mail: hengxianpei@hotmail.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.09.1086

ABSTRACT **Objective** To study the effect of Dangua Recipe (DGR) on glycolipid metabolism, vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and its mRNA expression level of transgenic Apo E^{-/-} mouse with spontaneous atherosclerosis, thus revealing its partial mechanism for curing diabetes mellitus (DM) with angiopathy. **Methods** Diabetic model was prepared by peritoneally injecting streptozotocin (STZ) to Apo E^{-/-} mouse. Totally 32 modeled mice were stratified by body weight, and then divided into 4 groups referring to blood glucose levels from low to high by random digit table, i.e., the model group (MOD, fed with sterile water, at the daily dose of 15 mL/kg), the DGR group (fed with DGR at the daily dose of 15 mL/kg), the combination group (COM, fed with DGR at the daily dose of 15 mL/kg and pioglitazone at the daily dose of 4.3 mg/kg), and the pioglitazone group (PIO, at the daily dose of 4.3 mg/kg), 8 in each group. Another 8 normal glucose C57 mouse of the same age and strain were recruited as the control group. All interventions lasted for 12 weeks by gastrogavage. The fasting blood glucose (FBG), body weight, food intake, water intake, skin temperature, the length of tail, and the degree of fatty liver were monitored. The hemoglobin A1c (HbA1c), total cholesterol (TC), and LDL-C were determined. Endothelin-1 (ET-1) was determined by radioimmunoassay. Nitrogen monoxidum (NO) was determined by nitrate reductase. The kidney tissue VCAM-1 level was analyzed with ELISA. The expression of VCAM-1 mRNA in the kidney tissue was detected with real time quantitative PCR. **Results** Compared with the control group, the body weight and food intake decreased, water intake increased in all the other model groups ($P < 0.05$). Besides, the curve of blood glucose was higher in all the other model groups than in the control group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the body weight increased; levels of HbA1c, TC, LDL-C, ET-1, and VCAM-1 were significantly lower; and skin temperature was higher in the DGR group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the PIO group, body weight, the increment of body weight, FBG, TC, and LDL-C were lower ($P < 0.05$, $P < 0.01$); food intake and water intake increased more and the tail length was longer in the DRG group ($P < 0.01$). There was no statistical difference in the level of NO among groups. The degree of fatty liver in the model group was significantly severer than that in the control group ($P < 0.05$). It was obviously alleviated in the DGR group ($P < 0.05$) when compared with the model group and the PIO group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). But it was severer in the PIO group than in the model group ($P < 0.01$). The degree of fatty liver in the combination group ranged between that of the DGR group and the PIO group ($P < 0.05$). The level of VCAM-1 mRNA expression was significantly lower in the DGR group than in the model group, the PIO group, and the combination group ($P < 0.05$). **Conclusions** DGR had effect in lowering blood glucose and blood lipids, and fighting against fatty liver of transgenic Apo E^{-/-} mouse with spontaneous atherosclerosis. DGR played an effective role in preventing and treating DM with angiopathy by comprehensively regulating glycolipid metabolism and promoting the vascular function.

KEYWORDS Dangua Recipe; diabetes mellitus; angiopathy; harmless hyperglycemia; glycolipid metabolism

载脂蛋白 E 基因敲除 (ApoE^{-/-}) 小鼠是具有自发高血脂和动脉粥样硬化的转基因鼠, 被广泛用于动脉粥样硬化的研究。糖尿病患者的心血管风险是非糖尿病人群的 2~3 倍, 平均寿命比非糖尿病患者短 6 年, 其主要原因在于动脉粥样硬化^[1]。Riddle MC 等^[2]及 ACCORD 研究组^[3-5]的研究结果表明, 现代医学所有干预措施, 包括更加理想的血糖、血脂、血压控制, 都不能使糖尿病患者进一步获益, 为此提出“高糖无害化”干预策略, 即通过多层次和多靶点干预高血糖引发慢性并发症尤其是动脉硬化的

中间环节, 以使糖尿病患者最终净获益的策略, 有助于解决上述困境以提高糖尿病血管病变的防治效果^[6,7]。糖尿病是动脉粥样硬化的独立危险因素, 是冠状动脉粥样硬化性心脏病的等危症。糖尿病动脉硬化病变涉及全身多器官的大小血管, 包括心、脑、肾等, 显著影响靶器官的结构与功能, 是糖尿病患者致残、致命的主要原因。2/3 的冠心病患者具有糖代谢异常^[6]。以 Apo E^{-/-} 转基因鼠塑造糖尿病模型是比较理想的研究复合性血管病变的模型, 目前相关研究开展较少。高浓度葡萄糖的毒性是糖尿病产

生危害的原因。既往研究表明,高糖无害化干预策略是消除糖尿病危害的有益途径^[1]。基于痰瘀同治法的中药复方丹瓜方具有良好的消除高糖毒性的作用^[8],可保护血管内皮细胞周期及细胞骨架^[9,10],抑制糖尿病氧化应激^[7],并对高脂饲养的自发性糖尿病鼠(Goto-kakizaki, GK)的动脉粥样硬化有防治作用^[11],从多角度显示出良好的消除高糖毒性的效果。本研究进一步探讨丹瓜方对 Apo E^{-/-}转基因小鼠复合糖尿病模型糖脂代谢的影响,并借助 qPCR 等新技术观察所伴随的血管功能变化。

材料与方法

1 动物 Apo E^{-/-}小鼠,雄性,8 周龄,SPF 级,共 60 只,体重(21 ± 2)g,购于北京大学医学部,系美国 Jackson 实验室引进。并同时购入与上述小鼠同品系的同龄、同性别的 C57 小鼠 15 只,体重(22 ± 2)g。动物许可证编号:SCXK(京)2011-0012。分笼饲养于独立的通气笼具。自由摄取常规饲料(由福建省医学科学研究所实验动物中心提供),并经高温消毒与辐射照射处理。自由饮用清洁自来水。环境温度:(22 ± 1)℃。环境湿度:50% ± 5%。每日更换鼠笼的垫材木屑以保持干燥。每日光照与黑夜 12 h 交替 1 次。实验操作均在超净工作台内进行,动物常规管理由专人负责。

2 药物及试剂 丹瓜方由丹参、栝蒌、川芎、郁金、薤白、赤芍、白僵蚕等组成。制剂由福建中医药大学附属人民医院药剂科生产,原生药 2 g/mL 药液(生产批号:120928)。链脲佐菌素(STZ)购自 Sigma 公司(生产批号:S8050)。盐酸吡格列酮由日本武田药品工业株式会社生产,天津武田药品有限公司分装(批号:153 B)。拜安时糖化血红蛋白测试卡(干化学检测法),No. YZB/USA 1778-2011。糖化血红蛋白(HbA1c)稀释液,No. YZR/USA 1780-2011。磷酸盐缓冲液,赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司。无水乙醇购自天津达森化工产品销售有限公司(批号:20121103)。DEPC 水(THERO11-1)购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司。异丙醇购自广东光华化学厂有限公司(批号:20100216)。氯仿、柠檬酸钠购自国药集团化学试剂有限公司。柠檬酸购自西陇化工股份有限公司(批号:1205052)。内皮素(ET)放免试剂盒、抑肽酶 + EDTA-2Na:解放军总医院东亚免疫技术研究所,生产批号:2013-04-15。NO 试剂盒(生化法-硝酸还原酶法):南京建成科技有限公司(批号:

20130416)。血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1,VCAM-1)酶联免疫法试剂盒,上海西唐生物科技有限公司。裂解液(Trizol Reagent),美国 Invitrogen 公司。RT 试剂(ReverAdi First Strand cDNA Synthesis Kit)(K1622)和 Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix(2X)(K0221),Thermo Scientific 公司。反转录试剂(PrimeScript RT Reagent Kit)(DRR037A)购自 TAKARA 公司。

3 主要仪器 拜安时糖化血红蛋白仪,产品标准编号:YZB/USA 1442-2011。皮温测定仪(IR-MultiScan Thermometer),型号:Delwa-Star Pccolo-II;DXC 800 自动生化仪检测仪(美国贝克曼公司);CR2032 微量血糖测试仪(拜耳公司);Milli-Q Advantage A10 超纯水系统(美国 MILLIPORE 公司);GC-1200γ 全自动放免分析仪(中国科技大学科技实业总公司中佳光电仪器分公司);WH-1 微型涡旋混合仪(上海沪西分析仪器厂);722G 可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);Forma 905 超低温冰箱及 Heraeus Multifuge X1R 台式高速冷冻离心机购于 Thermo Scientific 公司。ELX800 全自动酶标仪(美国 BioTek 公司);7500 型荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);NanoDrop 2000c 微量紫外分光光度计(Thermo Scientific 公司)。

4 造模方法 参考文献[12,13],连续称取小鼠空腹状态下的体重 3 天,以第 3 天体重为准,按每千克体重 40 mg STZ 量,于清晨空腹腹部皮下注射,连续 3 天。最后一次注射后 48、72 h 分别测定空腹血糖(FBG),选出两次 FBG 均 ≥ 11.1 mmol/L 的小鼠,余下小鼠再同法注射两日 STZ 并测定血糖,选出全部 2 次 FBG ≥ 11.1 mmol/L 的 Apo E^{-/-}小鼠视为糖尿病成模鼠。为减少分组后灌胃失败所导致的动物减员,将成模鼠适应性灌胃观察 1 周。1 周后再次测定糖尿病成模鼠 FBG 连续 2 天,以两次血糖的均值作为基础血糖。适应性灌胃期间有 2 只鼠因灌胃失败死亡。

5 分组及干预方法 在测定 FBG 次日测定糖尿病成模鼠空腹状态下的体重,按体重进行分层,再根据 FBG 水平,按照随机数字表法将小鼠分为模型组[无菌水(SW),15 mL/(kg · d)]、丹瓜方组[丹瓜方(DG),15 mL/(kg · d)]、联合用药组[吡格列酮(PG) 4.3 mg/(kg · d)加 DG 15 mL/(kg · d)]、吡格列酮组[PG,4.3 mg/(kg · d)],每组 8 只。以上用药量均以 60 kg 成人每日常规用量为

参照,按照小鼠用药量公式[(动物体重/人的体重)×成人剂量×8.65]计算得出^[14]。15只C57小鼠连续测定FBG 2天,计算2次FBG的平均值,选出FBG值正常的8只小鼠作为对照组,以常规饲料喂养。根据前期预实验干预12周后,禁食不禁水12h取标本。摘除右眼球取血,一部分置于1.5 mL离心管中,室温静置1h,3 000 r/min离心10 min,取上层血清,-80℃冰箱保存待测。另一部分置于预先加入含10% EDTA-2Na和抑肽酶的1.5 mL离心管,取血后颠覆混匀,4℃放置1h后,离心及保存同前。小鼠取血后迅速拉尾断颈,置冰上操作,开腹肝脏照相及采摘右肾等。取右肾上1/2盛于1.5 mL离心管并放入液氮冻存备用。

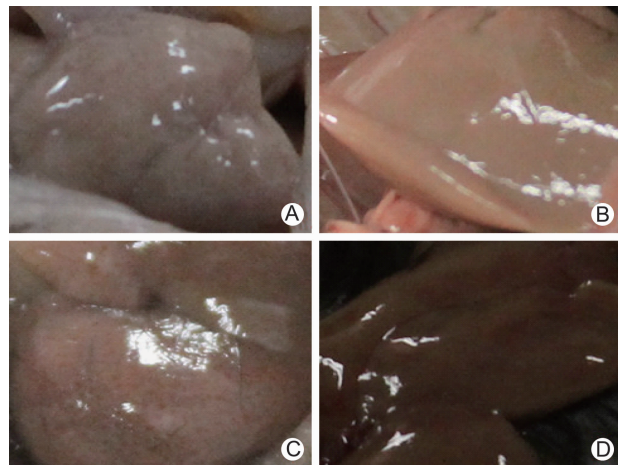
6 检测指标及检测方法

6.1 观察小鼠皮毛整洁程度、垫料湿度、活动情况及精神状态与FBG测定同步,每2周称取小鼠空腹体重,并测量摄食量及饮水量。

6.2 皮温与尾长测量 小鼠右后肢足掌面,以75%乙醇棉球清洁、消毒,待乙醇自然挥发,晾干。以皮温剂测试端置于足心(相当于涌泉穴),测量皮肤温度2次,间隔5 min。取两次皮温平均值(°F)。鼠尾长度主要取决于断尾的情况,但以实际测量长度为准。具体方法如下:一人固定小鼠,将测量尺起始端置于鼠尾体毛际,以刚接触体毛尖端为合适,摆直鼠尾,记录测量值(cm)。

6.3 糖脂代谢指标检测 自基础FBG开始,每2周以拜安时电脑微量血糖仪检测1次FBG。第12周后,禁食不禁水12h,小鼠尾端以75%乙醇棉球消毒,晾干,采血针取微量血,以拜安时糖化血红蛋白仪测定HbA1c。采用美国贝克曼公司全自动生化仪检测TC及LDL-C。ET-1采用放射免疫法,以全自动放免分析仪测定放射性计数(cpm)。NO采用生化法—硝酸还原酶法,以可见分光光度计测定A值,再根据A值计算浓度。

6.4 肝脂肪变观察 沿小鼠腹中线剖腹,充分暴露肝脏,观察肝脏形态及色泽并照相留存,同时对肝脂肪变程度进行分级(如图1)。A:整体“白肝”,质地变韧,可伴各肝叶不平衡增大或相邻肝叶融合,甚至伴脾大,提示肝重度脂肪变;B:“次白肝”,整肝白变呈淡白红色,色泽鲜艳光亮,质地稍韧,可有各肝叶不平衡增大,提示肝中度脂肪变;C:“部分白肝”,淡白红色肝与紫肝交错相嵌,提示肝轻度脂肪变;D:正常肝质地柔软,色泽均一正常,无脂肪变迹象。



注:A为整体“白肝”;B为“次白肝”;C为“部分白肝”;D为正常肝组织

图1 小鼠肝脂肪变肉眼观察

6.5 VCAM-1 检测 采用ELISA法。冰上操作,取待检肾组织,滤纸吸干,称取50 mg,剪碎放入匀浆器,按1:9的比例根据组织量加入0.9%氯化钠溶液,冰上研磨8 min,4℃10 000 r/min离心10 min,吸取上清10 μL(余量上清置-80℃冰箱分装保存),移入1.5 mL离心管,加入标本稀释液1 590 μL(稀释160倍)待测。在96孔酶标包被板上分别设空白孔、标准孔及待测样品孔。其中A1为空白孔(不加入酶标试剂及样品),B1~H1为标准孔(加入按比例稀释的标准品液100 μL),A2~H2(A~H共8个孔)、A3~H3、A4~H4、A5~H5、A6~H6为待测样品孔,在各待测样品孔中加入已稀释的待测样品100 μL。用封板膜封板后置37℃温育40 min。轻轻揭掉封板膜,弃液体,甩干,每孔加满洗涤液,静置30 s后弃去,如此重复5次,用滤纸吸干(洗板),每孔加入蒸馏水及一抗各50 μL(空白除外),将反应板充分混匀,置37℃温育20 min。再次洗板后,用滤纸吸干,每孔加入酶标试剂100 μL,置37℃温育10 min。第3次洗板,滤纸印干,每孔先加入底物工作液100 μL,置37℃暗处反应15 min后,每孔加终止液100 μL混匀以终止反应。以空白孔调零,450 nm波长依序测量各孔吸光度(A值)。

6.6 实时荧光定量PCR(qPCR)检测VCAM-1 mRNA表达 (1)提取总RNA:冰上称取肾组织50 mg,剪碎后在加有液氮的研钵中研磨至细粉末状,迅速加入到盛有Trizol 1 mL试剂的匀浆管中,上下颠倒10次混匀,使粉末浸没在Trizol中形成混悬液。按1 mL Trizol加入0.2 mL氯仿,盖上离心管,颠倒10次混匀。室温放置5 min后,4℃12 000 r/min离心

15 min。小心吸上清约 400 μL 至 DEPC 处理过的 1.5 mL 离心管中,加入 400 μL 异丙醇沉淀 RNA,室温静置 20 ~ 30 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 10 min。弃上清,加入 1 mL 预冷的 75% 乙醇(以 DEPC 水配制),混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 7 500 r/min 离心 5 min。小心吸弃上清乙醇,室温置 5 ~ 10 min,待 RNA 团干后,加入 DEPC 水 40 μL 溶解, -80 $^{\circ}\text{C}$ 分装冻存储备用。同时测定总 RNA 浓度,根据 $\lambda = 260 \text{ nm}$ 和 $\lambda = 280 \text{ nm}$ 处 OD 值 A_{260} 和 A_{280} 确定 RNA 纯度及浓度,确定 A_{260}/A_{280} 在 1.8 ~ 2.0。(2) 逆转录合成 cDNA: 于 0.2 mL PCR 管中,按 PCR 反应体系依次加入 Total RNA 500 ng, Oligo(dT) primer 1 μL , $5 \times$ 第一链合成缓冲液 4 μL , Random 6 mers 1 μL , PrimeScript RT Enzyme Mix I 1 μL , Nuclease-Free Water 加至 20 μL ,在迷你离心机上混匀。于 PCR 仪中 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min,于 85 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 s 终止反应。(3) 设计合成引物: 从 GenBank 中查询,获得目的基因 mRNA 的全长序列,通过引物设计软件 Primer premier 5.0 设计上、下游引物序列: 内参引物 Mouse β -actin; 上游: 5' GTCCCTCAC-CCTCCCAAAAG3'; 下游: 5' GCTGCCTCAACACCT-CAACCC3'。VCAM-1: 上游: 5' ATTTTCTGGGGCA GGAAGTT3'; 下游: 5' ACGTCAGAACAACCGAAT CC3'。将设计引物序列输入 NCBI“BLAST”中比对,匹配率 100%。引物委托北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司合成、纯化。(4) 荧光定量 PCR 反应: 于八联管中依次加入: MaximaSYBR Green/ROX qPCR Master Mix 12.5 μL , 上游引物 0.75 μL , 下游引物 0.75 μL , cDNA 2 μL , nuclease-free Water 加 9 μL 至 25 μL 。盖上管盖,轻敲混合后,迷你离心机混匀,于 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪上扩增。循环程序: 50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min (UDG 孵育), 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min (预变性); 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环。每个样品平行做 3 个复孔。通过扩增曲线得出 Ct 值。计算相对于对照样本(C57)的量。

7 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计学软件进行数据分析,计量资料属正态分布者以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多样本均数比较采用单因素方差分析,方差齐者两两比较采用 LSD 法;方差不齐者经对数转换,方差齐后再用 LSD 比较。计数资料先进行非参数检验(Fisher 精确检验),再进行 χ^2 分割分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组小鼠一般情况、摄食、饮水量、右后肢皮温

及体重比较(图 2,表 1、2)

1.1 造模前后各组小鼠一般情况比较 造模前小鼠一般情况良好,被毛整洁,活动敏捷。干预第 2 周模型组 1 只小鼠出现脱肛。第 4 ~ 5 周,模型组和吡格列酮组小鼠开始有断尾,吡格列酮组小鼠摄食量和饮水量有减少趋势。10 周后,模型组和吡格列酮组小鼠体毛整洁度较其他组差,反应下降,活动减少,尾尖干燥。后期各组小鼠都有不同程度的断尾,但模型组和吡格列酮组断尾现象更明显,且被毛枯槁,喜卷卧。分组后各组动物均未发生减员。

1.2 各组小鼠摄食及饮水量比较 干预 12 周后各组小鼠摄食量比较,差异有统计学意义($P = 0.000$)。与对照组比较,各组 Apo E^{-/-} 小鼠摄食量均减少。吡格列酮组摄食量少于模型组及丹瓜方组($P < 0.01$)。各组小鼠饮水量比较,差异有统计学意义($P = 0.001$)。与对照组比较,模型组小鼠饮水量增多($P < 0.01$)。与模型组比较,吡格列酮组饮水量显著减少($P < 0.01$),其饮水量也明显少于丹瓜方组($P < 0.05$)。

1.3 各组小鼠鼠尾长度比较 干预 12 周后各组小鼠鼠尾长度比较,差异有统计学意义($P = 0.039$)。丹瓜方组小鼠鼠尾长度明显长于模型组($P < 0.05$),吡格列酮组鼠尾明显短于对照及丹瓜方组($P < 0.05$)。

1.4 各组小鼠皮温及体重比较 与模型组比较,丹瓜方组皮温明显增高($P < 0.01$)。干预前各组 Apo E^{-/-} 小鼠体重比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),均显著轻于对照组小鼠($P < 0.01$)。干预结束时各组小鼠体重比较,差异有统计学意义($P = 0.001$),模型组小鼠体重仍显著轻于对照组($P < 0.01$),与丹瓜方组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。但联合用药组及吡格列酮组体重与对照组的差异减小($P < 0.05$),吡格列酮组小鼠体重较丹瓜方组明显增加($P < 0.05$)。各组小鼠干预前后自身对照比较,体重均明显增加($P < 0.01$),吡格列酮组体重增量多于丹瓜方组($P < 0.05$)。

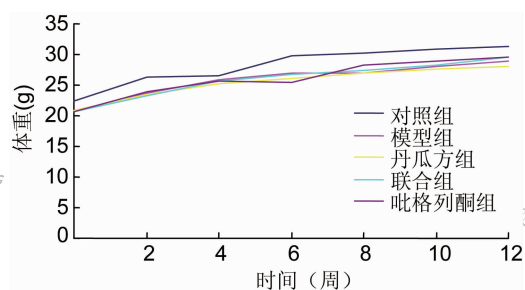


图 2 各组小鼠体重随时间变化趋势

表 1 各组小鼠摄食量、饮水量、鼠尾长度及右后肢皮温比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	摄食量(g)	饮水量(mL)	鼠尾长度(cm)	右后肢皮温(°F)
对照	8	4.13 ± 0.38	5.75 ± 1.40	8.06 ± 0.33	73.14 ± 1.60
模型	8	3.43 ± 0.43 **	7.00 ± 0.84 *	7.77 ± 0.34	74.51 ± 0.66 *
丹瓜方	8	3.48 ± 0.12	6.83 ± 0.97	8.17 ± 0.35 [△]	76.08 ± 0.86 ^{△△}
联合用药	8	3.61 ± 0.21	7.60 ± 0.87	8.12 ± 0.39	74.71 ± 1.11
吡格列酮	8	2.71 ± 0.51 ^{△△▲▲}	5.50 ± 1.00 ^{△△▲}	7.68 ± 0.41 [▲]	75.40 ± 0.95

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与丹瓜方组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

表 2 各组小鼠体重及体重增量比较 (g, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	干预前体重	干预后体重	体重增量
对照	8	22.44 ± 0.75	31.40 ± 0.96 *	8.94 ± 1.46
模型	8	20.66 ± 0.50 [△]	28.96 ± 1.63 * [△]	8.18 ± 1.83
丹瓜方	8	20.94 ± 0.81	28.08 ± 1.35 *	7.14 ± 1.45
联合用药	8	20.74 ± 0.78	29.51 ± 1.57 *	8.78 ± 1.51
吡格列酮	8	20.64 ± 0.73	29.53 ± 1.47 * [▲]	8.89 ± 1.83 [▲]

注:与本组干预前比较,* $P < 0.01$;与对照组比较, $\Delta P < 0.01$;与丹瓜方组比较, $\Delta P < 0.05$

表 3 各组小鼠 FBG 及 HbA1c 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	干预前 FBG (mmol/L)	干预后 FBG (mmol/L)	HbA1c(%)
对照	8	6.44 ± 1.39	8.84 ± 1.36	4.66 ± 0.29
模型	8	13.36 ± 1.44 *	16.24 ± 2.66 *	5.24 ± 0.29 *
丹瓜方	8	12.44 ± 1.37	11.01 ± 2.74 [△]	4.73 ± 0.41 [△]
联合用药	8	12.73 ± 1.56	11.60 ± 3.37 [△]	4.78 ± 0.34 [△]
吡格列酮	8	12.83 ± 1.09	13.28 ± 4.87	4.63 ± 0.29 [△]

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

2 各组小鼠 FBG 及 HbA1c 水平比较(图 3,表 3) 对照组 FBG 曲线全程低于其他组 Apo E^{-/-}鼠 FBG,但随着实验时间的延长,FBG 水平呈逐渐上升的趋势。除对照组外,其他各组 Apo E^{-/-}鼠干预前(基础)FBG 比较,差异无统计学意义。干预 4 周后,其他 4 组 Apo E^{-/-}鼠 FBG 均较干预前稍有降低且水平较接近。之后模型组 FBG 渐趋升高,且其曲线始终维持高于其他各组 FBG 曲线。其他给药干预的 3 组 Apo E^{-/-}小鼠的 FBG 在第 4~8 周均有较大波动。但在第 8 周后出现稳定变化的趋势,丹瓜方组及联合用药组 FBG 渐趋稳定,而吡格列酮组 FBG 趋于升高。第 7 次 FBG 各组间比较,差异有统计学意义($P = 0.001$),模型组明显高于对照组($P < 0.01$),丹瓜方组和联合组明显低于模型组($P < 0.01$);而吡格列酮组 FBG 与模型组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组小鼠 HbA1c 水平比较,差异有统计

学意义($P = 0.005$),模型组明显高于对照组($P < 0.01$);各治疗组 Apo E^{-/-}鼠 HbA1c 水平比较,差异无统计学意义,且均明显低于模型组($P < 0.01$)。

3 各组小鼠 TC、LDL-C、NO、ET-1 水平及脂肪肝病变程度比较(表 4、5) 灌胃 12 周后,各组小鼠 TC、LDL-C 比较,差异有统计学意义($P = 0.000$)。与对照组比较,各组 Apo E^{-/-}小鼠 TC、LDL-C 水平均显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,丹瓜方组 TC、LDL-C 水平呈明显降低($P < 0.05$);吡格列酮组 TC、LDL-C 水平明显高于丹瓜方组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。各组小鼠 ET-1 水平比较,差异有统计学意义($P = 0.001$),模型组明显高于对照组($P < 0.01$),3 组药物治疗组 ET-1 水平均明显低于模型组($P < 0.01$)。各组 NO 水平比较,差异无统计学意义($P = 0.517$)。各组间脂肪肝变程度比较,差异有统计学意义($F = 0.002$)。与对照组比较,模型组脂肪肝变程度明显加重($P < 0.05$)。与模型组比较,丹瓜方组脂肪肝程度明显减轻($P < 0.05$),吡格列酮组脂肪肝程度较丹瓜方组显著加重($P < 0.01$)。

4 各组小鼠 VCAM-1 水平及 VCAM-1 mRNA 表达比较(表 6,图 4、5) 各组 VCAM-1 水平比较,差异有统计学意义($P = 0.028$)。与对照组比较,模型组虽有升高,但差异无统计学意义($P > 0.05$);与模型组比较,丹瓜方组 VCAM-1 水平显著降低($P < 0.01$);与丹瓜方组比较,联合组 VCAM-1 水平升高($P < 0.05$)。各组 VCAM-1 mRNA 水平以对照值作为参

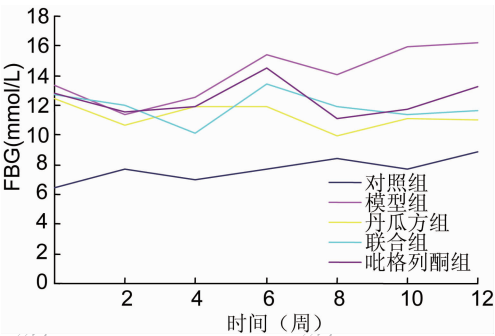


图 3 各组小鼠 FBG 随时间变化趋势

表 4 各组小鼠 TC、LDL-C、NO 及 ET-1 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TC (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	NO (μmol/L)	ET-1 (pg/mL)
对照	8	1.85 ± 0.73	0.16 ± 0.05	54.25 ± 23.09	28 677.23 ± 641.33
模型	8	13.74 ± 1.14 *	10.91 ± 1.68 *	57.20 ± 27.94	30 309.50 ± 834.37 *
丹瓜方	8	12.37 ± 0.87 [△]	8.89 ± 1.90 [△]	70.32 ± 8.97	28 560.45 ± 615.75 ^{△△}
联合用药	8	12.88 ± 1.87	10.13 ± 1.68	58.18 ± 25.57	29 136.91 ± 811.80 ^{△△}
吡格列酮	8	14.19 ± 1.32 [▲]	11.35 ± 2.17 ^{▲▲}	68.88 ± 23.31	28 952.24 ± 1 006.77 ^{△△}

注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与丹瓜方组比较,[▲] $P < 0.05$,^{▲▲} $P < 0.01$

表 5 各组小鼠肝脏脂肪病变程度比较 (例)

组别	n	重度 脂肪肝	中度 脂肪肝	轻度 脂肪肝	无脂 肪肝
对照	8	0	0	2	6
模型	8	0	2	5	1
丹瓜方	8	0	0	1	7
联合用药	8	0	2	3	3
吡格列酮	8	2	4	2	0

照,组间 VCAM-1 mRNA 相对含量比较,差异有统计学意义($P = 0.000$)。与模型组比较,丹瓜方、吡格列酮及联合用药组 VCAM-1 mRNA 相对含量均降低($P < 0.01$, $P < 0.05$),吡格列酮组和联合用药组均明显高于丹瓜方组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 6 各组小鼠 VCAM-1 及 VCAM-1 mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	VCAM-1 (ng/mL)	VCAM-1 mRNA
对照	8	248.55 ± 50.18	—
模型	8	258.27 ± 61.91	3.41 ± 0.80
丹瓜方	8	173.98 ± 60.47 **	0.48 ± 0.42 **
联合用药	8	240.54 ± 61.81 [△]	2.22 ± 1.14 * ^{△△}
吡格列酮	8	213.18 ± 34.52	1.64 ± 0.49 ** [△]

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与丹瓜方组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$

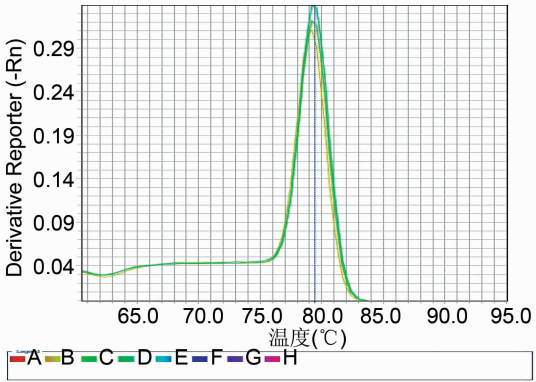
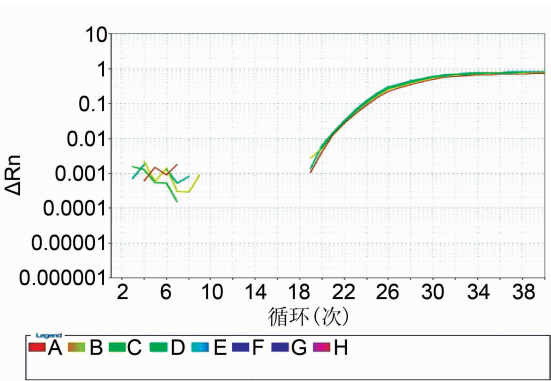


图 5 VCAM-1 mRNA 在 qPCR 中的溶解曲线

讨 论

近年来,糖尿病防治已经从简单的血糖达标发展到糖脂代谢及血压、体重的全面控制^[15],并正从单纯追求患者有限的生存期延长,过渡到更加重视生活质量的提高^[6]。糖尿病治疗的获益主要通过血管的获益体现。糖尿病的血管病变具有泛发的特点,不同器官的大、小血管的基本病理相近。高糖毒性和氧化应激损伤血管内皮细胞,重塑血管结构和功能,进而发生动脉硬化。糖尿病患者绝大多数最终因血管病变而致残致命,包括心、脑、肾、眼等多器官的大小血管^[6]。同时这些血管病变也是决定患者生活质量的关键因素,如冠心病所致胸闷、胸痛,脑卒中所致四肢失能或生活自理能力下降甚至丧失,糖尿病视网膜病变所致视力受损,以及糖尿病肾病、糖尿病周围血管病变等,是危害糖尿病患者健康的主要原因。高糖无害化干预策略,通过多层次、多渠道综合调节,有效地保护血管,是糖尿病患者寿命和生活质量获益的共同核心。

丹瓜方由丹参、栝蒌、法半夏、薤白、郁金、赤芍、川芎、僵蚕等组成,功效清润活血、化痰通络,并兼有实脾之效,痰瘀同治。其中丹参性味苦、微寒,活血化瘀兼养营血;栝蒌味甘、性寒而润,利气化痰而能降浊。二者为君药,活血化痰,凉润而不伤阴。郁金性寒而味辛、苦,能活血、行气解郁、凉血清心;赤芍性微寒而味



注:A-H 至为 96 孔板上一行中 8 个孔样本;图 5 同
图 4 VCAM-1 mRNA 实时定量基因扩增曲线

苦,功能清热凉血并活血祛瘀;法半夏、川芎均性温而味辛,具有芳香走串之性,消痰活血、通络化痰之力强。此 4 味药为臣,寒温并用,通而不伤阴,凉而不留邪。薤白为佐,性味辛温,既助君药之力又防其寒而留邪。僵蚕为使,引诸药入络通达。高糖毒性通过生瘀、生痰阻塞经络,损伤气血津液的正常敷布。丹瓜方痰瘀同治,直接针对了高糖毒性的病机。

本研究表明,丹瓜方具有与吡格列酮同等的改善糖代谢作用,且丹瓜方对 TC 及 LDL-C 也有明显的调节作用。尤其是对内脏脂肪,丹瓜方干预使脂肪肝患者显著获益。但吡格列酮对于血脂及脂肪肝是负得益,与同为 TZD 类的罗格列酮作用相似^[16]。据文献报道,高脂饮食可以成功复制大鼠非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)模型,该模型大鼠肝脏 PPAR- γ 表达增强^[17]。过度激活肝脏 PPAR- γ 则促进肝脏脂肪变及脂肪肝的形成^[18],与本研究结果一致。研究表明,虽然丹瓜方和吡格列酮都可通过单磷酸腺苷活化蛋白激酶(AMPK)途径调控血糖,但吡格列酮促进 AMPK 的磷酸化,这一作用会打破腺苷酸代谢池的平衡,从而影响肝细胞膜上的 P 受体,在能量过剩等情况下增加肝细胞的 TG 堆积^[19]。本研究表明,吡格列酮组摄食量、饮水量均明显减少,体重则明显重于丹瓜方组,提示吡格列酮可能抑制能量消耗,促进热量贮存。在脂联素缺乏时,罗格列酮促进脂酰辅酶 A 脱氢酶的堆积,从而影响脂肪酸的 β 氧化^[20]。研究表明 ApoE^{-/-} 小鼠脂联素水平显著不足^[21]。临床流行病学调查显示,在肥胖、高脂、代谢综合征、糖尿病患者中,NAFLD 患病率高达 50%~88%^[22,23]。吡格列酮显著增加体重,也可能与增加脂肪肝发病有关。但由于脂肪肝本身的发病机制仍不明确^[24],因此 TZD 类与脂肪肝的关系也有待进一步的深入研究。本课题组既往研究表明,丹瓜方主要通过增加 AMPK mRNA 表达,而不影响 pAMPK/AMPK 的比例^[25],从而在调节血糖的同时使腺苷酸代谢池保持常态。丹瓜方在有效调节糖、脂代谢的同时,不影响摄食量和饮水量,但相对减轻体重,可能与其增加 AMPK mRNA 表达从而促进分解代谢有关。超重和肥胖都被认为是心血管病变的危险因素^[26]。丹瓜方则能适度地控制体重。丹瓜方调节糖脂代谢的这些特点,有助于带来其心血管的综合获益,与化学药物的治疗显著不同。本研究结果还表明,丹瓜方可减轻联合应用的吡格列酮所带来的肝脏脂肪沉积,减轻吡格列酮增加脂肪肝风险和增加体重的不良作用。

高糖无害化可弥补降糖治疗防治糖尿病的重要缺

陷^[6],其机制除抗高糖所致氧化应激外^[7],保护血管内皮细胞、维护血管功能甚为关键。前期研究表明,丹瓜方具有抗糖尿病动脉粥样硬化的作用^[11],本文则进一步研究了丹瓜方对血管功能的调控。NO、ET-1 及 VCAM-1 均为血管内皮细胞分泌的血管活性因子。其中 NO 和 ET-1 相互拮抗,前者舒张血管,后者收缩血管,二者的相互制衡对于器官血供和氧化应激介导的动脉硬化的发生发展,都具有重要影响^[27]。ET-1 本身是致 AS 炎性细胞因子^[28],并且是加重内质网应激的因素^[29]。糖尿病患者 ET-1 水平升高且与 C 反应蛋白(CRP)相关^[30]。丹瓜方降低 ET-1 水平,对于解除血管痉挛,保持血管的良好状态,维持器官的正常供血具有重要意义。阻断核因子- κ B(NF- κ B)可降低 ET-1 水平^[28],前期研究已表明丹瓜方显著降低 NF- κ B 水平及基因表达^[7]。VCAM-1 即 CD106,属 IgSF 成员,配体为 $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4)和 $\alpha 4\beta 7$,属于不良刺激的慢性信号反应,其与 VLA-4 相互作用,参与白细胞穿越血管壁到达炎症部位^[31]。糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子(TNF)受体家族相关的配体,通过上调 VCAM-1 促进白细胞的黏附^[32]。丹瓜方降低 VCAM-1 水平及其 mRNA 表达,表明丹瓜方可能阻断动脉粥样硬化斑块的形成。前期研究发现,丹瓜方降低血糖控制不良糖尿病患者血清 TNF- α ^[33],保护血管内皮细胞^[8,9],与本研究结果相一致。

本研究还表明,丹瓜方显著改善肢体远端皮温,减少实验小鼠断尾以维持鼠尾的长度,提示丹瓜方改善糖尿病个体外周血流供应,显示其宏观的血管保护效果,支持了丹瓜方的微观血管保护的众多机制。糖尿病患者因血管病变常发生四肢远端的缺血性改变,常表现为肢端厥冷、麻木、疼痛、皮肤发绀,重者出现间隙性跛行、缺血性溃疡和坏死(糖尿病足)等,甚至导致截肢,严重降低了患者的生活质量。丹瓜方改善糖尿病外周血管供血,有助于提高患者的生活质量,改善其生存状态。

本研究证据表明,痰瘀同治丹瓜方可助减少热量摄入和贮存,降低体重,调节糖脂代谢并显著防治肝脏脂肪变,这对糖尿病的治疗具有重要意义。同时,丹瓜方抗自由基,抑制氧化应激,消除代谢性炎症以降低部分炎性细胞因子^[7,34],无疑对 2 型糖尿病(T2DM)胰岛素抵抗和胰岛功能有利。降低 ET-1 水平和血管益处提示丹瓜方可能有助于血压控制。降低 TNF- α 、hsCRP、NF- κ B 等多种有害细胞因子^[7,33],并增加脂联素^[35]等多种有益细胞因子,保护细胞周期^[8]及细胞骨架^[10],改善血管内皮细胞功能,抑制多种动脉粥样硬化斑块形成机制,并降低尿微量白蛋白^[36]等多种心

血管风险预测因子,可从复杂的中间环节带来血管获益。动物实验证实了丹瓜方抗动脉粥样硬化的效果^[11]。通过高糖无害化带来多途径血管得益,同时也带来糖尿病生活质量的提高,有效地弥补了现代医学和化学药物的不足,提示通过高糖无害化干预策略来改善糖尿病预后和提高生活质量,具有可行性。提示进一步明确丹瓜方调节糖脂代谢、抗脂肪肝的内在机制,及这一作用在早期防治 T2DM 中的意义,实现一药多效多防,可能带来代谢性疾病防治的重大进展。更加深入和广泛的研究势在必行。

参 考 文 献

- [1] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 [M]. 北京:北京大学医学出版社, 2011:9-11.
- [2] Riddle MC, Ambrosius WT, Brillon DJ, et al. Epidemiologic relationships between A1C and all-cause mortality during a median 3.4-year follow-up of glycemic treatment in the ACCORD trial [J]. *Diabetes Care*, 2010, 33 (5): 983-990.
- [3] ACCORD Study Group, Gerstein HC, Miller ME, et al. Long-term effects of intensive glucose lowering on cardiovascular outcomes [J]. *N Engl J Med*, 2011, 364 (9): 818-828.
- [4] ACCORD Study Group, Cushman WC, Evans GW, et al. Effects of intensive blood-pressure control in type 2 diabetes mellitus [J]. *N Engl J Med*, 2010, 362 (17): 1575-1585.
- [5] ACCORD Study Group, Ginsberg HN, Elam MB, et al. Effects of combination lipid therapy in type 2 diabetes mellitus [J]. *N Engl J Med*, 2010, 362 (17): 1563-1574.
- [6] 衡先培, 黄国良, 修玲玲主编. 糖尿病大血管病变 [M]. 北京:人民军医出版社, 2011:序一, 序二, 前言, 311-351.
- [7] 衡先培, 黄苏萍, 程心玲, 等. 丹栝方干预糖尿病动脉粥样硬化大鼠糖脂代谢及氧化应激研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2013, 33(2): 244-251.
- [8] Xian-pei H, Ke-ji C, Zheng-feng H, et al. Glucose endothelial cytotoxicity and protection of Dan Gua-Fang, a Chinese herb prescription in HUVEC in hyperglycemia medium [J]. *J Diabetes Complications*, 2009, 23(5): 297-303.
- [9] Heng XP, Chen KJ, Hong ZF, et al. Toxicity features of high glucose on endothelial cell cycle and protection by Dan Gua-Fang in ECV-304 in high glucose medium [J]. *Chin J Integr Med*, 2013, 19 (8): 596-602.
- [10] Heng XP, Chen KJ, Hong ZF, et al. Anticolchicine cytotoxicity enhanced by Dan Gua-Fang, a Chinese herb prescription in ECV304 in mediums [J]. *Chin J Integr Med*, 2011, 17(2): 126-133.
- [11] 黄苏萍, 林如辉, 陈文列, 等. 丹瓜方对糖尿病大鼠胸主动脉超微结构影响的初步观察 [J]. *福建中医药大学学报*, 2011, 21(2): 19-22.
- [12] Tamarat R, Silvestre JS, Huijberts M, et al. Blockade of advanced glycation end-product formation restores ischemia-induced angiogenesis in diabetic mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(14): 8555-8560.
- [13] Buzello M, Törnig J, Faulhaber J, et al. The apolipoprotein E knockout mouse: A model documenting accelerated atherogenesis in Uremia [J]. *Circulation*, 2003, 14 (2): 311-316.
- [14] 章元沛主编. 药理实验方法学 [M]. 第 2 版. 北京:人民卫生出版社, 1996:238.
- [15] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 [M]. 北京:北京大学医学出版社, 2011:15.
- [16] 高凌云, 何作云, 牟娇. 罗格列酮对 apoE 基因敲除小鼠血清 NOS/NO 的影响 [J]. *第三军医大学学报*, 2006, 28(11): 1204-1205.
- [17] 范建高, 丁晓东, 王国良, 等. 高脂饮食性非酒精性脂肪性肝病大鼠肝脏 PPAR- γ 表达增强 [J]. *肝脏*, 2004, 9(4): 225-228.
- [18] Yu S, Matsusue K, Kashireddy P, et al. Adipocyte-specific gene expression and adipogenic steatosis in the mouse liver due to peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 (PPAR-gamma1) over-expression [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(1): 498-505.
- [19] Li P, Shibata R, Unno K, et al. Evidence for the importance of adiponectin in the cardioprotective effects of pioglitazone [J]. *Hypertension*, 2010, 55(1): 69-75.
- [20] Zhou M, Xu A, Lam KS, et al. Rosiglitazone promotes fatty acyl CoA accumulation and excessive glycogen storage in livers of mice without adiponectin [J]. *J Hepatol*, 2010, 53(6): 1108-1116.
- [21] Da-Wa CR, Zhao F, Qi YF, et al. Role of adiponectin and its receptors in anti-atherosclerotic effects of pioglitazone on ApoE knocked out mice [J]. *J Peking Univ*, 2009, 41(2): 174-178.
- [22] Alam S, Noor-E-Alam SM, Chowdhury ZR, et al. Nonalcoholic steatohepatitis in nonalcoholic fatty liver disease patients of Bangladesh [J]. *World J*

- Hepatology, 2013, 5(5): 281–287.
- [23] Lazo M, Hernaez R, Eberhardt MS, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in the United States: The Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1994 [J]. Am J Epidemiol, 2013, 178(1): 38–45.
- [24] 李秀钧主编. 代谢综合征胰岛素抵抗综合征 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 201–202.
- [25] Lan YL, Huang XP, Heng XP, et al. Dangua Fang improves glycolipid metabolic disorders through promoting hepatic AMPK expression in diabetic GK rats [J]. Chin J Integr Med, 2013, 19(7): 891–895.
- [26] Park MH, Sovio U, Viner RM, et al. Overweight in childhood, adolescence and adulthood and cardiovascular risk in later life: pooled analysis of three British birth cohorts [J]. PLoS One, 2013, 8(7): e70684.
- [27] Wang H, Wang AX, Aylor K, et al. Nitric oxide directly promotes vascular endothelial insulin transport [J]. Diabetes, 2013, 62(12): 4030–4042.
- [28] Dai Y, Mehta JL, Chen M. Glucagon-like peptide-1 receptor agonist liraglutide inhibits endothelin-1 in endothelial cell by repressing nuclear factor-Kappa B activation [J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2013, 27(5): 371–380.
- [29] De Miguel C, Pollock JS. Does endoplasmic reticulum stress mediate endothelin-1-induced renal inflammation? [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2013, 305(2): R107–R109.
- [30] Jung C, Rafnsson A, Brismar K, et al. Endothelial progenitor cells in relation to endothelin-1 and endothelin receptor blockade: A randomized, controlled trial [J]. Int J Cardiol, 2013, 168(2): 1017–1022.
- [31] Scott DW, Vallejo MO, Patel RP. Heterogenic endothelial responses to inflammation: role for differential N-glycosylation and vascular bed of origin [J]. J Am Heart Assoc, 2013, 2(4): e000263.
- [32] Lacal PM, Petrillo MG, Ruffini F, et al. GITRL (glucocorticoid-induced TNF receptor family-related ligand) triggering up-regulates VCAM-1 and ICAM-1 and promotes leukocyte adhesion [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2013, 347(1): 164–172.
- [33] 衡先培, 褚克丹, 林青, 等. 丹瓜方对血糖控制不良 2 型糖尿病患者 TNF- α 的干预研究 [J]. 福建中医学院学报, 2009, 19(2): 9–12.
- [34] 黄雯晖, 杨柳青, 衡先培. 痰瘀同治法治疗 2 型糖尿病痰瘀证患者血浆 TNF- α 、CRP 的临床观察 [J]. 中医临床研究, 2011, 3(9): 1–3.
- [35] 陈玲, 衡先培, 蓝元隆, 等. 丹瓜方对 2 型糖尿病模型大鼠骨骼肌脂联素的影响 [J]. 福建中医药大学学报, 2013, 23(1): 10–12.
- [36] 翁苓, 衡先培, 郑海霞. 芎藭通脉方治疗 2 型糖尿病痰瘀证患者尿 MA 及血、尿 β 2-MG 的临床观察 [J]. 光明中医, 2010, 25(12): 2257–2259.

(收稿: 2013–08–06 修回: 2014–06–22)

《中国中西医结合杂志》获“2013 中国国际影响力优秀学术期刊”

2013 年 12 月 30 日, 中国学术期刊(光盘版)电子杂志社、清华大学图书馆、中国学术文献国际评价研究中心联合发布《中国学术期刊国际引证年报(2013 版)》, 年报从国际引证计量统计的角度, 提供了重新认识中国学术期刊国际影响力的全新视角。同时也发布了“2013 中国最具国际影响力学术期刊”和“2013 中国国际影响力优秀学术期刊”名单。《中国中西医结合杂志》再次获得“中国国际影响力优秀学术期刊”。本刊国际影响力指数 CI 为 52.998, 国际他引总引频次 510 次, 国际他引影响因子 0.079。