

丹瓜方对 ApoE^{-/-} 糖尿病小鼠肝脏 AdipoR2 表达的影响

蓝元隆¹ 李 亮² 衡先培² 黄苏萍³ 陈 燕^{4△} 陈依楚⁴ 杨柳清² 林 青⁵ 程心玲⁶

摘要 目的 研究祛瘀化痰的复方中药丹瓜方对载脂蛋白 E 基因敲除 (ApoE^{-/-}) 糖尿病小鼠肝脏脂联素受体 (AdipoR2) 表达及其对肝脏的影响。**方法** 将 8 周龄的 ApoE^{-/-} 小鼠, 随机分为模型对照组、丹瓜方组、吡格列酮组和联合治疗组, 另设同龄 C57BL/6J 小鼠为 C57 组, 4 组 ApoE^{-/-} 小鼠均注射链脲佐菌素 (STZ) 诱导糖尿病模型, 并分别予以相应的药物干预, 12 周后, 观察丹瓜方对糖脂代谢的影响, 并分别检测肝脏 AdipoR2 mRNA 及蛋白表达, 用 HE、红油 O 脂肪染色、Masson 等观察肝脏组织形态学改变。**结果** 丹瓜方组 ApoE^{-/-} 小鼠的空腹血糖 (FBG)、总胆固醇 (TC) 和低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 较模型组显著降低; 丹瓜方组 ApoE^{-/-} 小鼠肝脏 AdipoR2 蛋白及 mRNA 表达明显高于模型对照组 ($P < 0.01$), 并优于吡格列酮组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 丹瓜方组在改善糖尿病 ApoE^{-/-} 小鼠肝细胞脂肪异位沉积和纤维化等病理改变上明显优于吡格列酮组和联合治疗组。**结论** 丹瓜方能够明显地改善肝脏脂代谢, 减轻肝脏脂肪沉积和纤维化, 可能与丹瓜方促进肝脏 AdipoR2 的表达有关。

关键词 丹瓜方; 糖尿病; 脂联素受体

Effect of Dangua Recipe on Hepatic Adiponectin Receptor 2 Expression in Diabetic Apolipoprotein E Knockout Mice LAN Yuan-long¹, LI Liang², HENG Xian-pei², HUANG Su-ping³, CHEN Yan⁴, CHEN Yi-chu⁴, YANG Liu-qing², LIN Qing⁵, and CHENG Xin-ling⁶ 1 Department of Diabetes and Kidney Disease, Zhangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Fujian (363000); 2 Department of Endocrinology, People's Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou (350004); 3 Editorial Department, Journal of Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou (350108); 4 Department of Traditional Chinese Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou (350108); 5 Clinical Laboratory, People's Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou (350004); 6 Department of Pharmaceutical Preparation, People's Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou (350004)

ABSTRACT Objective To observe the effect of Dangua Recipe (DR) on adiponectin receptor 2 (AdipoR2) expression in liver of apolipoprotein E knockout (ApoE^{-/-}) diabetic mice. **Methods** Eight-week-old ApoE^{-/-} mice were randomly divided into the model control group, the DR group, the pioglitazone group, and the combined treatment group. Besides, a C57 group was set up consisting of same age C57BL/6J mice. Streptozotocin (STZ) was injected to ApoE^{-/-} mice in the four groups to induce diabetic model, and they were intervened by corresponding drugs. After 12 weeks the effect of DF on glucose-lipid metabolism was observed. mRNA and protein expressions of AdipoR2 in liver were detected. Histomorphological changes of the liver were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining, red O fat dyeing, and Masson

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81173179, 81473550, 81403329); 福建省科技社会发展重点项目 (No. 2012Y0037); 陈可冀中西医结合发展基金资助项目 (No. CKJ2009004); 福建省卫生厅中医药科研重点实验室基金 (No. wztn201304)

作者单位: 1. 福建省漳州市中医院糖肾科 (福建 363000); 2. 福建中医药大学附属省人民医院内分泌科 (福州 350004); 3. 福建中医药大学学报编辑部 (福州 350108); 4. 福建中医药大学中医系 (福州 350108); 5. 福建中医药大学附属省人民医院检验科 (福州 350004); 6. 福建中医药大学附属省人民医院药剂科 (福州 350004)

通讯作者: 衡先培, Tel: 13067366157, E-mail: hengxianpei@hotmail.com

△ 现在浙江省杭州市余杭区第一人民医院 (杭州 311100)

DOI: 10.7661/CJIM.2016.09.1097

staining, respectively. Results Contents of fasting blood glucose (FBG), total cholesterol (TC), and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) were reduced more significantly in the DR group than in the model group. DR could promote liver expression of AdipoR2 mRNA and protein expressions in ApoE^{-/-} mice, which was significantly higher than that of the model group ($P < 0.01$), and better than that of pioglitazone ($P < 0.05$, $P < 0.01$). DR could improve ectopic fat deposition and fibrosis of liver cells in diabetic ApoE^{-/-} mice significantly, which was better than that of the pioglitazone group and the combined treatment group. Conclusion DR could significantly improve liver lipid metabolism, and reduce liver fat deposition and fibrosis, which might possibly be associated with promoting AdipoR2 expression in liver.

KEYWORDS Dangua Recipe; diabetes; adiponectin receptor

2 型糖尿病又被称作糖脂病,其本质是葡萄糖与脂肪的代谢紊乱。“脂代谢紊乱—脂肪肝—氧化应激—糖代谢紊乱及糖尿病”的起病方式目前已经引起重视,在本病序贯的进展过程中,有效地干预脂肪肝,对糖尿病具有防和治的双重意义^[1,2]。载脂蛋白 E 基因敲除 (ApoE^{-/-}) 小鼠是具有自发高血脂代谢紊乱的转基因小鼠,在糖尿病造模因素的共同作用下,可形成兼具糖尿病、高脂血症、动脉硬化及脂肪肝的动物模型。本课题组先前研究表明,丹瓜方对该模型糖代谢^[3]、脂代谢^[4]、动脉粥样硬化^[5,6]及氧化应激^[7]等具有干预作用。基于祛瘀化痰的中药复方丹瓜方具有良好的降低高糖毒性^[3]、保护血管内皮细胞周期及细胞骨架^[5,6]、抑制糖尿病氧化应激^[7],并具有降糖、降脂、抗动脉粥样硬化作用,对高脂饲养的 Goto-Kakizaki 自发性糖尿病鼠的肝脏脂肪异位沉积有防治作用^[8]。本研究将进一步探讨和揭示祛瘀化痰的复方中药丹瓜方改善 ApoE^{-/-} 糖尿病小鼠肝脏脂联素受体 (AdipoR2) 表达的部分机制。

材料与方法

1 动物 ApoE^{-/-} 小鼠, C57BL/6J 品系, 纯合子, 雄性, 8 周龄, SPF 级, 共 60 只, 体重 (21 ± 2) g, 购买于北京大学医学部, 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 C57BL/6J 小鼠 15 只, 体重 (22 ± 2) g。许可证号: SCXK(京)2011-0012。按 2 只/笼饲养于独立通气系统内, 条件设置: 房间温度范围 21 ~ 23 °C, 湿度范围 45% ~ 55%, 昼夜明暗周期各 12 h。实验期间测血糖、灌胃、解剖等操作均在超净工作台上进行, 并由专人负责换水、添加饲料等工作。

2 饲料及药物 常规饲料, 由福建省医学科学研究所实验动物中心提供, 并经高温消毒与辐照处理。丹瓜方液: 由丹参、瓜蒌、川芎、郁金、薤白、赤芍、白僵蚕等组成, 由福建中医药大学附属省人民医院药剂科

配制成原生药 2 g/mL 药液, 批号: 120928, ; 吡格列酮: 15 mg/片, 日本武田药品工业株式会社生产, 批号: JX20010100。

3 试剂及仪器 链脲佐菌素 (STZ): Simga 公司生产, 批号: S8050; 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗 (D&B); ReverAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, K1622), SYBR Premix Ex Taq (Takara, RR420A), Adiponectin Receptor 2 (Abcam, ab77612), Restore Western Blot Stripping Buffer (Pierce, 21059), Western Breeze® Wash Solution (16 ×) (life technology, WB7003), PBST (北京康为世纪生物科技有限公司), 微量紫外分光光度计 (Thermo Scientific); 7500 型荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI); LX-200 迷你离心机 (其林贝尔); 超纯水系统 (美国 Millipore); ELX800 全自动酶标仪 (BioTek); SHP-150 型生化培养箱 (上海精宏实验设备有限公司); TS-100 脱色摇床 (其林贝尔); 电泳制胶玻璃板 (Bio-RAD); 垂直电泳槽 (Bio-RAD); PVDF 膜 (Millipore); 转膜滤纸 (Whatman); 转印槽及转膜装置 (Bio-RAD); 凝胶成像系统 (Bio-RAD); BM-VII 型生物组织包埋机 (湖北省宏业医用仪器有限公司)。

4 方法

4.1 糖尿病模型制备 参照参考文献[4,9], 连续 3 天称取小鼠空腹状态下的体重, 再以第 3 天所称取的体重为准, 清晨空腹腹部皮下注射 STZ (40 mg/kg), 连续注射 3 天。于最后一次注射后的 48 h 和 72 h 分别测定小鼠的空腹血糖 (FBG), 分别选出两次血糖值均 ≥ 11.1 mmol/L 的小鼠, 血糖未达标的小鼠再按上述方法连续注射两日同等剂量的 STZ, 然后再测定 FBG, 再选出两次 FBG 均 ≥ 11.1 mmol/L 的小鼠, 通过两次筛选, FBG 均达标的小鼠被视为糖尿病成模鼠。为了尽量减少分组干预时灌胃失败可能导致的动物死亡, 将所有成模小鼠进行适应性灌胃 1 周并

观察其反应。1 周后再次测定所有糖尿病成模小鼠的 FBG,连续测定两天,再以这两次 FBG 的平均值做为基线血糖。1 周的适应性灌胃期间,共有 2 只糖尿病成模小鼠因灌胃失败而导致死亡。最后共有 32 只糖尿病模型 ApoE^{-/-} 小鼠进入后期实验。

4.2 分组及给药情况 在测定基础血糖次日测定糖尿病成模鼠空腹状态下的体重,按体重分层,再按血糖水平由高至低,按随机数字表法,随机分为模型对照组、丹瓜方组、吡格列酮组、联合治疗组,每组 8 只。所有小鼠用药量都按照体重 60 公斤的成年人每日常规服用量换算。通过公式:(动物体重/人的体重)×人用量×8.65 计算而来^[10]。15 只 C57BL/6J 小鼠连续测定 FBG 两天,计算 2 次 FBG 的平均值,选出 FBG 值正常的 8 只 C57BL/6J 鼠作为 C57 组。模型对照组和 C57 组小鼠每日灌服无菌水 15 mL/kg,丹瓜方组小鼠每日灌服丹瓜方液 15 mL/kg,吡格列酮组每日灌服吡格列酮混悬液 4.3 mg/kg,联合治疗组小鼠每日灌服吡格列酮混悬液 4.3 mg/kg 加丹瓜方液 15 mL/kg 的混合液。所有小鼠均以常规饲料喂养。干预 12 周后,禁食但不禁水 12 h 后取材。

4.3 血液生化检测 自基础血糖开始,每 2 周以拜安时电脑微量血糖仪测 1 次 FBG。第 12 周后,禁食不禁水 12 h 后取材。检测 TC 及 LDL-C,以美国贝克曼公司全自动生化仪检测。取材前,所有小鼠均禁食 12 h,右眼眼眶静脉丛采血,并离心备用。处死小鼠后,沿着腹部正中中线切开,暴露肝脏,分别取肝右叶下缘 2 cm×1 cm 大小肝组织块,并分割成数小块,分别分装到液氮、OTC 固定液、多聚甲醛中保存备用。

4.4 Real-time qPCR 先按 Trizol 试剂的使用操作步骤,从约 100 mg 大鼠肝脏中提取总 RNA,以总 RNA 2 μg 为逆转录反应模板,采用 Oligo dT 为引物,按照反转录试剂盒的操作说明在普通 PCR 仪上进行逆转录,合成第一条 cDNA 链,再以 1 μL 逆转录反应产物为模板,按照荧光实时定量 PCR 试剂盒的说明,在冰上配置 20 μL 的 PCR 反应体系。基因引物序列为:β-actin(NW_007393),F:5'-GTCCCT-CACCCTCCCAAAAG-3',R:5'-GCTGCCTCAA-CACCTCAACCC-3',产物长度:266 bp,AdipoR2(NM_197985),F:5'-TTTCAATGGAAGCAGCA-CAG-3',R:5'-AGACACCAGGGAGAAGCAGA-3',产物长度:230 bp。实时定量 PCR 扩增条件:预变性,95℃,30 s;变性,95℃,3 s;退火,60℃,30 s;延伸,72℃,20 s;共循环 40 次。目的基因表达丰度

的表示方法:各样品基因的 Ct 值与 β-actin 的 Ct 值的比值即是目的基因表达量,目标基因表达的半定量分析是以(2^{-ΔCt})法进行。

4.5 Western blot 取小鼠肝脏组织加入蛋白酶磷酸酶和 PMSF 抑制剂,冰上匀浆,4℃、12 000 g×4 min 离心,吸取上清并用 BCA 法进行蛋白定量。取等量蛋白与相应的蛋白加样缓冲液进行还原变性的 10%SDS-PAGE 凝胶电泳,使用半干转膜仪将蛋白转移至 PVDF 膜,将该膜在室温下封闭 2 h,TBST 液漂洗,加入兔抗鼠 AdipoR2 多克隆抗体(1:1 000),4℃孵育过夜,经过 TBST 液漂洗后,加入相应种属 HRP 标记二抗(1:10 000)孵育 1 h,再将膜用 TBST 液彻底的漂洗后进行 ECL 化学发光显影。避光放置 1 min,置于荧光及化学发光成像分析系统中观察结果,条件设置为曝光 1 min,CCD 自动获取图片结果。蛋白表达值用条带的灰度值除以 β-actin 来校正。

4.6 肝组织染色 肝组织切片分别进行 HE 染色、红油 O 脂肪染色、Masson 染色。HE 染色:组织洗涤,组织石蜡包埋,组织切片,组织切片脱蜡至水,苏木素浸染,1%盐酸酒精分蓝,自来水浸泡返蓝,伊红浸染,浸洗,树脂封片。Masson 染色:将石蜡切片脱蜡至水,切片铬化处理,自来水浸洗至黄色消失后,再用蒸馏水滴注洗涤,加入 Regaud 苏木精染液,充分水洗,加入 Masson 丽春红酸性复红液,洗涤,1%磷钼酸水溶液分化,苯胺蓝染色,0.2%冰醋酸水溶液浸洗,脱水透明,中性树胶封片。镜下观察:蓝色部分为胶原纤维,红色部分为胞浆,胞核则显现深蓝色。油红 O 脂肪染色:冰冻切片,厚度 10 μm,70%乙醇固定,蒸馏水洗涤,油红稀液染液,避光,密封,加入 60%乙醇,蒸馏水洗涤,苏木素复染,蒸馏水洗涤,甘油明胶封片。镜下观察:鲜红色部分为脂滴,蓝色部分为细胞核,间质则显现为无色。

4.7 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理和统计分析。正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 来表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较方差齐采用 LSD 检验,方差不齐采用 Games-Howell 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组小鼠 FBG 和血脂变化比较(表 1) 干预结束后,丹瓜方组和联合治疗组 FBG 均显著低于模型对照组($P < 0.01$)。与 C57 组比较,ApoE^{-/-} 模型小鼠 TC、LDL-C 水平均显著升高($P < 0.01$);与模型对照组比较,各药物干预组中仅丹瓜方组 TC、LDL-C 水

平有明显降低($P < 0.05$),吡格列酮组 TC、LDL-C 明显高于丹瓜方组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 1 各组小鼠 FBG 及血脂变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	FBG(mm/L)	TC(mm/L)	LDL-C(mm/L)
C57	8	8.84 ± 1.36	1.85 ± 0.73	0.16 ± 0.05
模型对照	8	16.24 ± 2.66 *	13.74 ± 1.14 *	10.91 ± 1.68 *
丹瓜方	8	11.01 ± 2.74 $\Delta\Delta$	12.37 ± 0.87 Δ	8.89 ± 1.90 Δ
吡格列酮	8	13.28 ± 4.87	14.19 ± 1.32 Δ	11.35 ± 2.17 $\Delta\Delta$
联合治疗	8	11.60 ± 3.37 $\Delta\Delta$	12.88 ± 1.87	10.13 ± 1.68

注:与 C57 组比较, * $P < 0.01$;与模型对照组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与丹瓜方组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

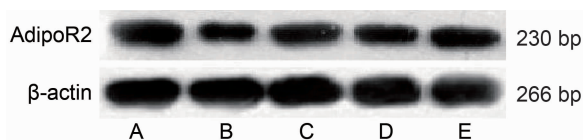
2 各组小鼠肝脏 AdipoR2 mRNA 及蛋白表达比较(表 2,图 1) 各组小鼠肝组织所有抽提总 RNA 经微量核酸-蛋白定量仪定量, A_{260}/A_{280} 值均在 1.80 ~ 2.0 范围内,表明 RNA 纯度高,无蛋白和 DNA 污染,可用于后续的实验研究。丹瓜方组 AdipoR2 mRNA 表达显著高于模型对照组($P < 0.01$)和吡格列酮组($P < 0.05$)。

AdipoR2 蛋白表达 C57 组明显高于模型对照组($P < 0.01$);而模型对照组均低于丹瓜方组($P < 0.01$)、吡格列酮组($P < 0.05$)和联合治疗组($P < 0.01$);而丹瓜方组表达优于吡格列酮组和联合治疗组($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

表 2 各组小鼠肝脏 AdipoR2 mRNA 及蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	AdipoR2 mRNA	AdipoR2 蛋白
C57	6	55.85 ± 13.23	0.56 ± 0.11
模型对照	6	44.51 ± 9.88	0.23 ± 0.05 **
丹瓜方	6	68.82 ± 10.68 $\Delta\Delta$	0.47 ± 0.09 $\Delta\Delta$
吡格列酮	6	50.26 ± 11.64 Δ	0.34 ± 0.04 $\Delta\Delta\Delta$
联合治疗	6	59.93 ± 17.61	0.37 ± 0.07 $\Delta\Delta\Delta$

注:与 C57 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型对照组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与丹瓜方组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$



注:A 为 C57 组;B 为模型对照组;C 为丹瓜方组;D 为吡格列酮组;E 为联合治疗组;下图同

图 1 各组小鼠肝脏 AdipoR2 蛋白表达电泳图

3 各组小鼠肝脏组织光镜观察结果(图 2-4) HE 染色:C57 组小鼠肝小叶结构稍松散,肝板呈尚呈放射状排列,细胞核居中,少量肝细胞浆中可见少许小泡样脂肪颗粒,可见少许炎性细胞浸润,肝细胞无肿胀、

变性或坏死。模型对照组、丹瓜方组、吡格列酮组和联合治疗组小鼠的肝小叶结构比较松散或混乱,肝细胞无或轻度肿胀,细胞核尚居中,呈不同程度小泡性脂肪样变,可见少量炎性细胞浸润,未见明显坏死,模型对照组和吡格列酮组病变程度明显重于丹瓜方组和联合治疗组。红油 O 脂肪染色:C57 组小鼠肝细胞内未见明显红色脂滴,模型对照组、丹瓜方组、吡格列酮组和联合治疗组小鼠的肝细胞内均可见不同程度和数量的红色脂滴,其中模型对照组和吡格列酮组病变程度明显重于丹瓜方组和联合治疗组。Masson 染色:C57 组小鼠肝组织肝内血管壁、肝血窦壁可见少量被染成蓝色的胶原纤维,模型对照组、丹瓜方组、吡格列酮组和联合治疗组小鼠的肝小叶汇管区、狄氏间隙以及部分肝细胞外缘均可见明显蓝色胶原纤维沉积,模型对照组和吡格列酮组病变程度明显重于丹瓜方组和联合治疗组。

讨 论

吡格列酮,作为噻唑烷二酮类(TZD)药物的一员,能够改善胰岛素抵抗,提高胰岛素敏感性,从而具有一定的控制血糖的作用。本研究发现,丹瓜方能够显著降低 STZ 诱导的糖尿病模型 ApoE^{-/-} 小鼠的血糖,具有一定的控制血糖的作用,与单独使用吡格列酮治疗相当。然而,2 型糖尿病除了血糖增高外,还常常伴随脂代谢异常,若将糖尿病的监测和治疗的重点仅仅局限在降低血糖上,则容易忽略了对脂代谢紊乱的监测和干预。

TZD 药物能够通过调控与糖脂代谢相关的细胞因子的基因转录,参与脂肪分化^[11]。运用 TZD 类药物治疗非酒精性脂肪肝(NAFLD)是建立在改善肝脏胰岛素抵抗为基础的,因此选择胰岛素增敏剂具有一定的合理性。研究显示,罗格列酮能够减轻肝脏脂肪异位沉积和变性、降低肝组织纤维化率^[12]。Sanyal AJ 等^[13]研究显示吡格列酮能降低血浆转氨酶浓度,降低单纯性脂肪肝、小叶炎症积分,却不能改变纤维化积分。TZD 不能改变 NAFLD 患者肝脏纤维化,但能降低肝脏脂肪沉积的程度,对伴有糖代谢异常的 NAFLD 能明显地改善血糖水平^[14]。对于伴有 NAFLD 的 2 型糖尿病患者,吡格列酮通过改善胰岛素抵抗,不仅可以减少肝脏脂肪含量、一定程度上改善肝脏组织病变、降低肝酶水平,同时还可以有效地控制血糖、保护胰岛细胞,使患者双重获益。

脂联素是目前所发现的唯一与血脂浓度相关的负性调节因子^[15,16]。脂联素受体 AdipoR2 主要的分布在肝脏组织中。有研究发现 AdipoR2 基因在高脂饲

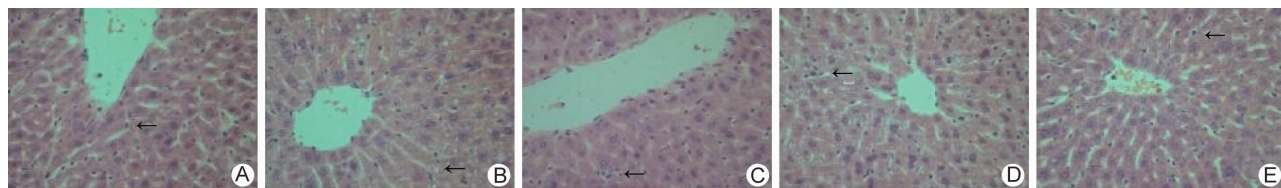


图2 各组小鼠肝脏组织 HE 染色结果 (×400)

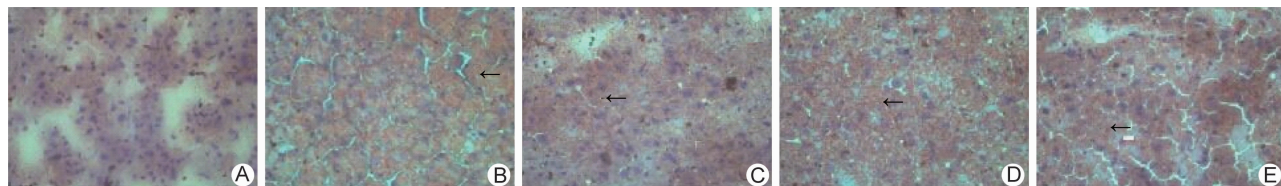


图3 各组小鼠肝脏组织红油 O 脂肪染色结果 (×400)

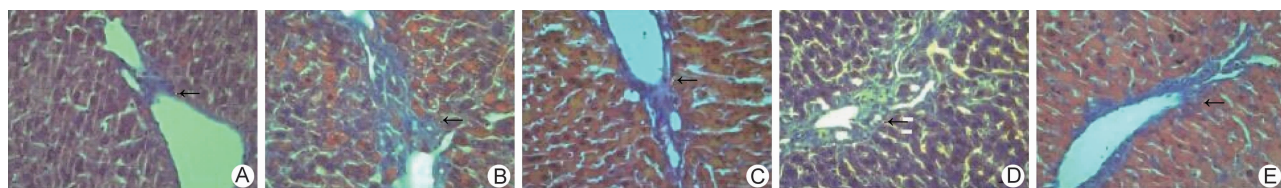


图4 各组小鼠肝脏组织 Masson 染色结果 (×400)

料饲养的 Wistar 大鼠肝脏中的表达是明显降低的^[17,18],而且 NAFLD 患者肝细胞 AdipoR2 mRNA 的表达也显著低于健康人群^[19]。我们也有同样的发现,糖尿病脂代谢紊乱的 ApoE^{-/-}小鼠肝脏 AdipoR2 mRNA 和蛋白的表达也明显下调。先前研究显示丹瓜方能够减轻高脂饲养的 GK 大鼠肝脏脂肪沉积、肝细胞变性,减轻肝细胞炎症损伤、坏死,具有明确的保护肝脏的作用^[8]。本研究中,模型对照组和吡格列酮组血清脂肪浓度明显升高,而且 HE 染色及脂肪染色提示,模型对照组和吡格列酮组肝脏脂肪沉积、脂肪变性的程度是最严重的,脂肪染色显示模型对照组和吡格列酮组肝纤维化程度明显增加,AdipoR2 的表达与脂代谢及肝脏脂肪样变、纤维化等程度成正比,说明,脂联素受体的表达与机体脂肪浓度水平或脏器脂肪容量及肝脏纤维化程度可能存在负相关。丹瓜方组 ApoE^{-/-}小鼠肝脏 AdipoR2 的表达明显高于其他各组 ApoE^{-/-}小鼠,丹瓜方改善糖尿病 ApoE^{-/-}小鼠肝细胞脂肪异位沉积、炎症和纤维化等病理改变,明显优于吡格列酮组和联合治疗组,提示,丹瓜方可能通过促进脂联素受体在肝细胞的表达进而改善糖尿病 ApoE^{-/-}小鼠肝脏的脂肪异位沉积,减轻肝脏脂肪变性、纤维化等病理损伤,较之吡格列酮更具有明显优势。推测 AdipoR2 可能直接具有肝脏保护作用,提示祛瘀化痰的丹瓜方可能通过逆转和上调肝细胞 AdipoR2 的表达而具有肝脏的保护作用。另有研究显

示,肝脏 AdipoR2 mRNA 表达水平可能与胰岛素抵抗直接相关^[20],丹瓜方是否有助于改善胰岛素敏感性有待进一步探讨。

脂联素只有通过与其受体结合,才能激活下游 AMP 蛋白激酶(AMPK)和过氧化物酶体增殖体激活受体- α (peroxisome proliferators activated receptor gamma, PPARG),有助于增加脂肪酸的氧化和葡萄糖的摄取,进而能够改善胰岛素敏感性^[21,22],发挥抗糖尿病、抗动脉粥样硬化及抗炎等效应,能够改善糖脂代谢,改善肝脏胰岛素敏感性^[23,24]。噻唑烷二酮类药物罗格列酮能够促进肝脏 AMPK 的表达及磷酸化,进而促进肝糖原合成,在一定程度上能够减少肝脏脂肪含量,有效地改善肝脏脂肪沉积和变性^[25]。丹瓜方能够明显促进肝细胞 AMPK mRNA 及蛋白的表达^[7],强烈提示丹瓜方可能通过促进 AdipoR2 及其信号转导通路的表达增强 AMPK 的表达。

(致谢:感谢衡先培团队成员庄怀山、颜群芳、陈敏灵、王志塔、姚淑红、张治三等给予的巨大帮助)

参 考 文 献

- [1] 范建高. 非酒精性脂肪肝病诊疗指南(2010 修订版)[J]. 胃肠病学和肝脏病学杂志, 2010, 19(6): 483-487.
- [2] 中华医学会糖尿病学分会代谢综合征研究协作组. 中华医学会糖尿病学分会关于代谢综合征的建议[J]. 中华糖尿病杂志, 2004, 12(3): 156-161.

- [3] Heng XP, Chen KJ, Hong ZF, 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] Heng XP, Chen KJ, Hong ZF, et al. Anti-colchicine cytotoxicity enhanced by Dan Gua Fang, a Chinese herb prescription in ECV304 in mediums [J]. *Chin J Integr Med*, 2011, 17(2): 126–133.
- [7] 衡先培, 黄苏萍, 程心玲, 等. 丹桂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] Lan YL, Huang SP, Heng XP, et al. Dan-gua Fang improves glycolipid metabolic disorders by promoting hepatic adenosine 5'-monophosphate activated protein kinase expression in diabetic Goto-Kakizaki rats [J]. *Chin J Integr Med*, 2015, 3(21): 188–195.
- [9] Buzello M, Törnig J, Faulhaber J, et al. The apolipoprotein E knockout mouse: a model documenting accelerated atherogenesis in uremia [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14(2): 311–316.
- [10] 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.
- [11] Yoon JC, Chiekerling TW, Rosen ED, et al. Peroxisome proliferators-activated receptor gamma target gene encoding a novel angiopoietin-related protein associated with adipose differentiation [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(14): 5343–5349.
- [12] Beylot M, Pinteaur C, Peroni O, et al. Expression of the adiponectin receptors AdipoR1 and AdipoR2 in lean rats and in obese Zucker rats [J]. *Metabolism*, 2006, 55(3): 396–401.
- [13] Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, et al. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis [J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(18): 1675–1685.
- [14] World Gastroenterology Organization. Global guidelines for nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis [J]. *J Clin Gastroenterol*, 2014, 48(6): 467–473.
- [15] Xin YN, Xuan SY, Guan HS. Leptin: is it a possible specific liver drug for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. *Med Hypotheses*, 2008, 71(3): 462–463.
- [16] Chavez-Tapia NC, Tiribelli C. Are non-invasive tests accurate enough to predict hepatic fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. *Gut*, 2008, 57(10): 1351–1353.
- [17] 赵彩彦, 孔令波, 李亚, 等. 非酒精性脂肪性肝病患者肝组织脂联素表达及意义 [J]. *河北医药*, 2010, 32(5): 522–525.
- [18] 梁华荣, 刘飞雄, 余伟, 等. 罗格列酮对高脂饮食诱导非酒精性脂肪肝大鼠脂肪因子的影响 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2012, 21(29): 3207–3209.
- [19] Kaser S, Moschen A, Cayon A, et al. Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis [J]. *Gut*, 2005, 54(1): 117–121.
- [20] Bullen JW, Blüher S, Kelesidis T, et al. Regulation of adiponectin and its receptor in response to development of diet-induced obesity in mice [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007, 292(4): E1079–E1086.
- [21] Wu X, Motoshima H, Mahadev K, et al. Involvement of AMP-activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes [J]. *Diabetes*, 2003, 52(6): 1355–1363.
- [22] Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects [J]. *Nature*, 2003, 423(6941): 762–769.
- [23] Takei Y, Sato N. Adipokine interrelationship with the liver [J]. *Nippon Rinsho*, 2006, 64(6): 1083–1087.
- [24] Engeli S, Feldpausch M, Gorzelniak K, et al. Association between adiponectin and mediators of inflammation in obese women [J]. *Diabetes*, 2003, 52(4): 942–947.
- [25] Vozarova de Courten B, Degawa-Yamauchi M, Considine RV, et al. High serum resistin is associated with an increase in adiposity but not a worsening of insulin resistance in Pima Indians [J]. *Diabetes*, 2004, 53(5): 1279–1284.

(收稿: 2015-02-25 修回: 2016-01-15)