

· 基础研究 ·

降糖消脂片对 KK-A^y 转基因小鼠胰岛素抵抗的影响

葛争艳 金龙 杨斌 董小霞 李宏坤 郭宇洁 任烨 洪晓华 王杨慧 刘建勋

摘要 目的 观察降糖消脂片对 KK-A^y 转基因小鼠稳态模型评估胰岛素抵抗指数(homeostasis model assessment for insulin resistance index, HOMA-IR)、胰岛素敏感指数(insulin sensitivity index, ISI)、胰腺组织胰岛素(insulin, INS)及胰岛素受体(insulin receptor, InsR)蛋白表达的影响。**方法** 采用高脂饲料喂养 KK-A^y 转基因小鼠,制备糖尿病肥胖小鼠模型。同时选取 11 只同龄 C₅₇ 小鼠作为正常对照。将成模的 55 只 KK-A^y 小鼠采用随机数字表法分为模型组、吡格列酮组(8 mg/kg)、降糖消脂片高、中、低剂量组(分别给予降糖消脂片 10、5、2.5 g 生药/kg),每组 11 只。以上各组均灌胃给药,正常对照组及模型组灌胃等体积灭菌水,每日 1 次,连续 8 周。给药 8 周后,称体重并测随机血糖(random blood glucose, RBG);眼静脉丛取血,测定 INS、TC 及 TG 水平,计算 HOMA-IR 及 ISI;取胰腺进行形态学观察;采用免疫组化方法检测胰腺组织 INS 及 InsR 表达;采用免疫印迹(Western blot)法检测胰腺胰岛素受体 β (insulin receptor β , InsR β)及胰岛素受体底物 1(insulin receptor substrate 1, IRS-1)蛋白表达水平。**结果** 与正常对照组比较,造模后各组小鼠出现肥胖,血糖及血脂明显升高($P < 0.01$)。给药 8 周后模型组小鼠体重增加($P < 0.01$),血糖及血脂稳定在高位水平;与模型组比较,降糖消脂片各剂量组小鼠体重、TG、INS 及 HOMA-IR 水平明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);且高剂量组 RBG 降低更明显($P < 0.01$);降糖消脂片高、低剂量组小鼠 ISI 明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。胰腺病理 HE 染色结果显示,模型组胰岛萎缩,胰岛数目明显减少,分布稀疏,胰岛密度减低,胰岛细胞代偿性肥大,空泡变性,并可见凋亡细胞,表现为胞浆肿胀,核固缩。降糖消脂片高、中剂量组胰岛细胞数目明显增多,变性及凋亡细胞减少。免疫组化结果显示,与正常对照组比较,模型组 INS 及 InsR 累积光密度(OD)值明显降低($P < 0.01$);与模型组比较,降糖消脂片各剂量组胰腺 INS 及 InsR OD 值明显增加($P < 0.05$, $P < 0.01$)。Western blot 结果显示,与正常对照组比较,模型组 InsR β 及 IRS-1 蛋白表达明显降低($P < 0.01$);与模型组比较,降糖消脂片各剂量组 InsR β 及 IRS-1 蛋白表达水平升高($P < 0.01$),与吡格列酮组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 降糖消脂片对 KK-A^y 糖尿病肥胖小鼠有明显的降糖、降脂及改善胰岛素抵抗的作用,其机理可能是通过增加胰岛细胞 InsR β 及 IRS-1 表达,促进 INS 与受体的结合,从而改善糖、脂代谢和 IR 状态。

关键词 降糖消脂片;KK-A^y 小鼠;胰岛素抵抗指数;胰岛素敏感指数;胰岛素受体 β ;胰岛素受体底物-1

Effect of Jiangtang Xiaozhi Tablet on Insulin Resistance KK-A^y Transgenic Mice Model of Diabetes Mellitus GE Zheng-yan, JIN Long, YANG Bin, DONG Xiao-xia, LI Hong-kun, GUO Yu-jie, REN Ye, HONG Xiao-hua, WANG Yang-hui, and LIU Jian-xun *Institute of Basic Medical Sciences, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing Municipal Key Laboratory of Pharmacology of Chinese Materia Medica, Beijing (100091)*

ABSTRACT Objective To observe effects of Jiangtang Xiaozhi Tablet (JTXZT) on homeostasis model of assessment for insulin resistance index (HOMA-IR), insulin sensitivity index (ISI), expressions of insulin (INS) and insulin receptor (InsR) in pancreas tissues of KK-A^y transgenic mice model of diabetes mellitus (DM). **Methods** KK-A^y transgenic mice were fed with high fat forage to induce hyper-

基金项目:科技部重大新药创制项目(No. 2010ZX09102-213, No. 2012ZX09103201-040)

作者单位:中国中医科学院西苑医院基础医学研究所 中药药理北京市重点实验室(北京 100091)

通讯作者:刘建勋, Tel: 010-62835601, E-mail: liujx0324@sina.com

DOI: 10.7661/CJIM.2017.03.0331

glycemic obese DM model. The C_{57} mice at same age were used as a normal control group (fed with equal volume of sterile water, $n = 11$). Successful modeled 55 mice with DM obesity were divided into 5 groups by random digit table (11 in each group), including the model group (fed with equal volume of sterile water, with no treatment), the Pioglitazone Hydrochloride Tablet treatment group (8 mg/kg; as a positive control group), and JTXZT groups [high (10.0 g crude drugs/kg), middle (5.0 g crude drugs/kg) and low dose (2.5 g crude drugs/kg)]. All medications were fed by gastrogavage, once per day for 8 successive weeks. All mice were weighed and levels of random blood glucose (RBG) determined after 8 weeks of treatment. Blood was collected from ophthalmic vein. Levels of insulin (INS), serum total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) were detected. HOMA-IR and ISI were calculated. The morphological changes of pancreas tissues were extracted for performed pathological examinations. The expressions of INS and insulin receptor (InsR) were measured by immunohistochemistry (IHC). Expressions of insulin receptor β (InsR β) and insulin receptor substrate-1 (IRS-1) in pancreas tissues were detected using Western blot. Results Compared with the normal control group, obesity, obviously increased blood glucose and blood lipids occurred in each group after modeling ($P < 0.01$). After 8 weeks of medication mice in the model group had put up body weight ($P < 0.01$), blood glucose and blood lipids were kept on quite higher levels. Compared with the model group, body weight, serum levels of TG, INS, and HOMA-IR obviously decreased in each JTXZT group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Besides, RBG decreased obviously lower in the high dose JTXZT group ($P < 0.01$). ISI obviously increased in low and high dose JTXZT groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Pathological results of HE staining in pancreas showed that atrophied islets with obviously reduced numbers in the model group. They were sparsely distributed with reduced islet density. Islet cells were compensatively hypertrophy, with degenerated vacuoles. Apoptosis of islet cells could also be seen in the model group, manifested as swollen cytoplasm and paryopyknosis. Islet number was obviously increased in high and middle dose JTXZT groups, with reduced apoptosis and degenerated cells. Results of IHC assay showed, as compared with the normal control group, the grey values of INS and InsR were significantly decreased in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, IOD values of INS and InsR (IOD) were significantly increased in each JTXZT group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Results from Western blot showed that protein expressions of InsR β and IRS-1 were obviously decreased in the model group, as compared with the normal control group ($P < 0.01$). Compared with the model group, protein expressions of InsR β and IRS-1 were obviously increased in each JTXZT group ($P < 0.01$), but with no statistical difference as compared with the Pioglitazone Hydrochloride Tablet treatment group ($P > 0.05$). Conclusions JTXZT had obvious roles in decreasing levels of blood glucose, serum lipids, and improving insulin resistance in KK- A^y transgenic mice model with diabetic obesity. Its mechanism might involve in increasing expressions of InsR β and IRS-1 in pancreas cells, promoting the integration of INS to its receptors, and thereby improving glucose metabolism, lipid metabolism, and IR state.

KEYWORDS Jiangtang Xiaozhi Tablet; transgenic KK- A^y mouse; insulin resistance index; insulin sensitivity index; insulin receptor β ; insulin receptor substrate-1

随着经济的迅猛发展,我国糖尿病患者总人数已位居世界前列,其中 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T_2DM) 占全部糖尿病患者的 95% 以上,其患病率和病死率不断攀升,已成为严重影响人类身心健康的主要公共卫生问题和重大疾病^[1]。KK- A^y 小鼠是一种毛色基因 (A^y) 突变型糖尿病小鼠,与人类 T_2DM 的表现极为相似,是一种理想的 T_2DM 动物模型^[2,3]。降糖消脂胶囊是中国中医科学院西苑医院使用十余年的院内制剂,现改为片剂。前期研究发现,降

糖消脂片对四氧嘧啶和链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 诱导的糖尿病动物均有降血糖作用^[4,5]。进一步实验表明,该药对 T_2DM 大鼠及 KK- A^y 转基因小鼠有降糖、降脂作用,可明显增加胰腺中胰岛数目,诱导胰岛素受体及底物的表达^[6-8]。本实验采用稳态模型评估胰岛素抵抗指数 (homeostasis model assessment-insulin resistance, HOMA-IR) 和胰岛素敏感指数 (insulin sensitivity index, ISI) 观察降糖消脂片改善 IR 的作用,并通过免疫组化法检测胰腺组织中胰

胰岛素(insulin,INS)及胰岛素受体(insulin receptor, InsR)表达,采用免疫印迹(Western blot)法检测胰腺中胰岛素受体 β (insulin receptor β , InsR β)及胰岛素受体底物1(insulin receptor substrate 1, IRS-1)蛋白表达水平。

材料与方法

1 动物 55 只 KK-A^y 转基因雄性小鼠,12 周龄,体重(35.36 ± 1.79)g;同龄 C₅₇BL/6J 雄性小鼠 11 只,体重(25.15 ± 0.59)g,由中国医学科学院实验动物研究所/北京华阜康生物科技股份有限公司提供。中国中医科学院西苑医院实验动物中心饲养。室温:22~25℃,相对湿度:45%~60%。普通饲料由北京科澳协力饲料有限公司提供,产品许可证号:京饲(配)第238号。高脂饲料由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,配方:猪油10%、蛋黄粉10%、普通饲料80%。小鼠自由摄食及饮水,饮用水为灭菌水,每天更换水瓶,定期更换垫料。

2 药物 降糖消脂片干粉,5.4 g 生药/g 粉,由中国中医科学院西苑医院基础医学研究所药化研究室提供(批号:20100308)。盐酸吡格列酮片由北京太洋药业有限公司提供(批号:090901)。

3 试剂与仪器 INS 试剂盒:解放军总医院科技开发中心放免所生产(批号:201000620);TC 试剂盒(批号:001186)及 TG 试剂盒(批号:008450)均为日本和光纯药工业株式会社产品;一抗购自北京智旋宏达科技有限责任公司,INS、InsR 由 Abcam 公司生产(货号分别为 Ab52167, Ab32351)。二抗(PV-6000)通用型二步法免疫组化检测试剂盒及 DAB 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。兔抗 IRS-1(D23G12)单克隆抗体、兔抗 InsR β 抗体购自 Cell Signaling 公司;鼠抗 GAPDH 单克隆抗体和 HRP 标记的羊抗兔、羊抗鼠 IgG 抗体购自 Sigma 公司。乐康全活力型血糖仪(德国罗氏诊断有限公司);血糖试纸[德国罗氏公司生产,批号:23407632,罗氏诊断产品(上海)有限公司分装];Sn-6915B 型免疫计数器(上海核所日环光电仪器有限公司);LAB-SPECT 003 型全自动生化分析仪(日本日立公司);Anymicro DSS 型图像分析仪(北京裕天世纪伟业科技有限公司);ChemicDoc XRS + Image Lab 凝胶图像分析管理系统(Bio-Rad 公司)。

4 糖尿病肥胖小鼠模型制备 55 只 KK-A^y 转基因小鼠,每只单笼饲养,避免互相撕咬。在中国医学科学院实验动物研究所高脂饲料喂养 12 周,诱发糖

尿病伴肥胖^[2]。在实验动物中心适应性饲养 1 周后,称体重,尾尖取血,用血糖仪测定随机血糖(random blood glucose, RBG),筛选体重达标且 RBG > 13.9 mmol/L 作为模型成功小鼠。

5 动物分组及给药 采用随机数字表法将成模的 55 只 KK-A^y 糖尿病肥胖小鼠分为模型组、吡格列酮组、降糖消脂片高、中、低剂量组,每组 11 只。吡格列酮组以 8 mg/kg 吡格列酮片水溶液灌胃给药,降糖消脂片高、中、低剂量组分别给予降糖消脂片溶液(10.5、2.5 g 生药/kg,分别相当于临床用药的 20、10.5 倍)灌胃给药,正常对照组(同龄雄性 C₅₇BL/6J 小鼠)和模型组灌等体积灭菌水,每日 1 次,连续灌胃给药 8 周。

6 观察指标及检测方法

6.1 体重测定 于给药前及给药后 8 周,采用电子秤进行体重测定。

6.2 RBG 测定 禁食 3 h,将小鼠尾尖用酒精棉擦净,再用纱布擦干。将罗康全活力型血糖仪处于准备状态,将血糖试纸插入仪器中,尾尖取血,取约 2 μ L 血滴于血糖试纸上,10 s 后记录血糖值。

6.3 血清 TC、TG 及 INS 水平测定 小鼠眼静脉丛取血,离心分离血清,采用 LST-003 型全自动生化分析仪测定血脂(TC 采用胆固醇氧化酶-HMMPS 法,TG 采用 GOP-HMMPS 去游离甘油法)。采用 Sn-6110 型免疫计数器测定 INS(平衡放射免疫分析法)。HOMA-IR 及 ISI 计算公式如下: $HOMA-IR = RBG (mmol/L) \times INS (uIU / mL) / 22.5$, $ISI = Ln [1 / (INS \times RBG)]$ 。

6.4 胰腺形态学观察 各组小鼠解剖取胰腺,10%甲醛固定、乙醇脱水、石蜡包埋、切片、HE 染色,光镜下进行胰腺形态学观察。

6.5 胰腺免疫组化检测 胰腺用 10% 中性甲醛固定,脱水、透明、浸蜡、包埋、制片。按常规免疫组化方法操作,采用免疫组化 PV6000 二步法染色,封片后采集图像,进行 INS 及 InsR 图像分析。INS 及 InsR 阳性信号为棕褐色颗粒,表达于细胞胞浆,高倍镜下每组计数 30 个视野,进行免疫组化阳性信号累积光密度(IOD)分析,以 IOD 值作为组织表达的定量标准,IOD 值越高其表达越强。 $IOD = \text{平均光密度}(AOD) \times \text{阳性面积}(A)$ 。

6.6 胰腺组织 IRS-1 及 InsR β 蛋白水平检测 采用 Western blot 法检测。胰腺组织制备匀浆,离心收集上清(胞浆蛋白),测定其含量进行 IRS-1 检测。管底沉积为胞膜蛋白,重悬于溶解缓冲液中,测定其含量

进行 InsR β 检测。聚丙烯胺凝胶电泳 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE), 采用相关抗体进行增强化学发光 (enhanced chemiluminescence, ECL) 显色, 底片曝光。比较各泳道 IRS-1 和 InsR β 显色深浅, 颜色越深提示表达水平越高。

7 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计学软件进行数据分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间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 各组造模情况 高脂饲料喂养后, 造模各组小鼠体重明显增加, RBG 升高 ($P < 0.01$), 提示造模成功。

2 各组小鼠给药前后体重水平比较 (表 1) 给药 8 周后, 与正常对照组比较, 模型组小鼠体重明显增加; 与模型组比较, 降糖消脂片各剂量组小鼠体重明显减轻 ($P < 0.01$); 降糖消脂片各剂量组小鼠体重与吡格列酮组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组小鼠给药前后体重水平比较 (g, $\bar{x} \pm s$)			
组别	n	体重	
		给药前	给药 8 周
正常对照	11	25.17 $\pm$ 0.61	29.59 $\pm$ 0.69
模型	11	35.87 $\pm$ 1.72 *	44.73 $\pm$ 2.01 *
吡格列酮	11	35.39 $\pm$ 1.86	41.96 $\pm$ 3.79 Δ
降糖消脂片			
高剂量	11	35.82 $\pm$ 1.66	40.49 $\pm$ 1.98 $\Delta\Delta$
中剂量	11	34.45 $\pm$ 1.46	40.98 $\pm$ 2.58 $\Delta\Delta$
低剂量	11	34.34 $\pm$ 1.80	39.41 $\pm$ 1.97 $\Delta\Delta$

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

3 各组小鼠 RBG 及血脂水平比较 (表 2、3) 高脂饲料喂养后, 与正常对照组比较, 模型组小鼠 RBG 明显增高 ($P < 0.01$)。给药 8 周后, 与模型组比较, 降糖消脂片高剂量组 RBG 明显下降 ($P < 0.01$), 但其降糖效果弱于吡格列酮组 ($P < 0.05$)。

表 4 各组小鼠 INS、HOMA-IR 及 ISI 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)				
组别	n	INS (uIU / mL)	HOMA-IR	ISI
正常对照	11	24.33 $\pm$ 14.53	6.76 $\pm$ 4.05	-4.88 $\pm$ 0.55
模型	11	65.17 $\pm$ 7.47 *	69.10 $\pm$ 13.53 *	-7.33 $\pm$ 0.19 *
吡格列酮	11	57.44 $\pm$ 8.81 Δ	36.84 $\pm$ 11.20 $\Delta\Delta$	-6.68 $\pm$ 0.30 $\Delta\Delta$
降糖消脂片				
高剂量	11	55.83 $\pm$ 10.23 Δ	45.83 $\pm$ 13.19 $\Delta\Delta$	-6.89 $\pm$ 0.32 $\Delta\Delta$
中剂量	11	55.82 $\pm$ 7.82 Δ	56.05 $\pm$ 14.54 Δ	-7.10 $\pm$ 0.32
低剂量	11	56.95 $\pm$ 8.87 Δ	57.51 $\pm$ 11.23 Δ	-7.15 $\pm$ 0.21 Δ

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

表 2 各组小鼠给药前后 RBG 水平比较 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	给药前	给药 8 周
正常对照	11	8.06 $\pm$ 1.21	6.37 $\pm$ 0.82
模型	11	23.71 $\pm$ 4.54 *	23.76 $\pm$ 2.99 *
吡格列酮	11	23.28 $\pm$ 4.69	14.46 $\pm$ 3.82 Δ
降糖消脂片			
高剂量	11	23.41 $\pm$ 4.02	18.56 $\pm$ 4.50 $\Delta\Delta$
中剂量	11	23.39 $\pm$ 4.25	22.64 $\pm$ 5.27
低剂量	11	23.78 $\pm$ 3.63	23.00 $\pm$ 4.25

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$; 与吡格列酮组比较, $\Delta P < 0.05$

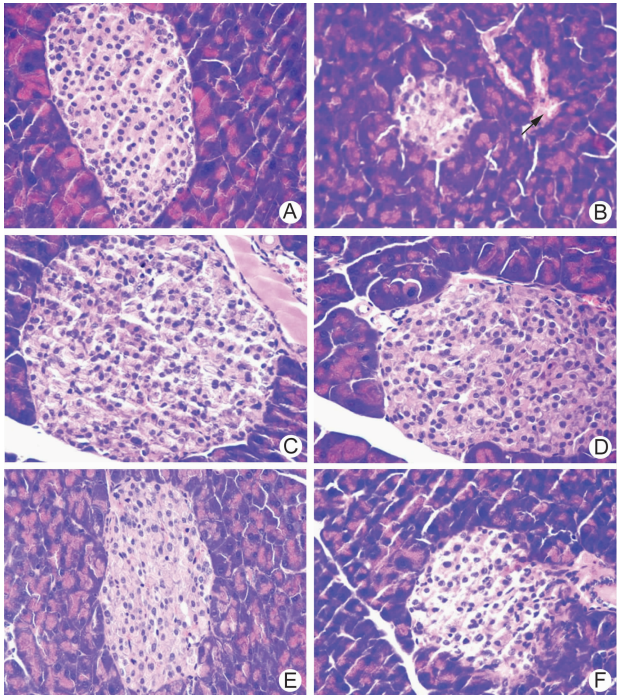
与正常对照组比较, 模型组小鼠 TC 及 TG 水平明显增高 ($P < 0.01$)。给药 8 周后, 降糖消脂片各剂量组小鼠 TG 水平明显降低 ($P < 0.01$), 与吡格列酮组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与模型组比较, 降糖消脂片各剂量组 TC 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 3 各组小鼠给药后血脂水平比较 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)			
组别	n	TC	TG
正常对照	11	2.68 $\pm$ 0.39	0.94 $\pm$ 0.26
模型	11	7.93 $\pm$ 0.99 *	11.46 $\pm$ 6.45 *
吡格列酮	11	7.33 $\pm$ 1.45	4.23 $\pm$ 2.62 Δ
降糖消脂片			
高剂量	11	8.06 $\pm$ 2.52	3.93 $\pm$ 1.87 Δ
中剂量	11	7.44 $\pm$ 0.98	4.27 $\pm$ 1.97 Δ
低剂量	11	7.56 $\pm$ 1.31	3.97 $\pm$ 2.25 Δ

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

4 各组小鼠 INS、HOMA-IR 及 ISI 水平比较 (表 4) 与正常对照组比较, 模型组 INS、HOMA-IR 明显升高, ISI 明显降低 (均 $P < 0.01$); 与模型组比较, 降糖消脂片各剂量组 INS 及 HOMA-IR 明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 降糖消脂片高、低剂量组 ISI 水平均明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 降糖消脂片高剂量组 ISI 水平与吡格列酮组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

5 各组小鼠胰腺病理形态观察(图 1) HE 染色结果显示,正常对照组(图 1A)胰岛数目较多,胰岛界限清楚,无包膜,细胞团大小不一,细胞数量较多,排列紧密,胞浆丰富,核呈圆形,细胞间可见丰富的毛细血管。模型组(图 1B)胰岛萎缩,数目明显减少,分布稀疏,胰岛密度减低,胰岛细胞数减少,胰岛细胞代偿性肥大,空泡变性,并可见凋亡细胞,表现为胞浆肿胀,核固缩。吡格列酮组(图 1C)胰岛数目明显增多,胰岛分布略稀疏,胰岛密度较低,胰岛细胞以轻度过变性为主,凋亡细胞少见。降糖消脂片高剂量组(图 1D)胰岛数目明显增多,胰岛分布略稀疏,胰岛密度较低,胰岛细胞以轻度过变性为主,凋亡细胞少见。降糖消脂片中剂量组(图 1E)胰岛数目略减少,胰岛分布稀疏,胰岛密度较低,胰岛细胞以轻度过变性为主,凋亡细胞少见。降糖消脂片低剂量组(图 1F)胰岛数目减少,胰岛分布稀疏,胰岛密度低,胰岛细胞以轻、中度变性为主,凋亡细胞可见。



注:A 为正常对照组;B 为模型组;C 为吡格列酮组;D 为降糖消脂片高剂量组;E 为降糖消脂片中剂量组;F 为降糖消脂片低剂量组;箭头所示为病理变化;图 2 同

图1 给药 8 周各组胰腺病理形态观察 (HE 染色,×400)

6 各组小鼠胰腺组织 INS 及 InsR 蛋白表达水平比较(表 5) 免疫组化结果显示,与正常对照组比较,模型组小鼠胰腺组织 INS 及 InsR IOD 值明显降低($P<0.01$);与模型组比较,降糖消脂片各剂量组 INS 及 InsR IOD 值明显增加($P<0.05$, $P<0.01$)。

表 5 各组小鼠胰腺组织 INS 及 InsR 蛋白表达水平比较 (免疫组化法, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	INS	InsR
正常对照	30	2 676.83 ± 416.99	2 942.37 ± 659.58
模型	30	2 107.30 ± 524.30 *	1 995.17 ± 448.36 *
吡格列酮	30	2 457.03 ± 411.27 $\Delta\Delta$	2 607.30 ± 452.92 $\Delta\Delta$
降糖消脂片			
高剂量	30	2 557.17 ± 369.86 $\Delta\Delta$	2 366.53 ± 519.01 $\Delta\Delta$
中剂量	30	2 431.97 ± 303.64 $\Delta\Delta$	2 323.47 ± 496.60 $\Delta\Delta$
低剂量	30	2 382.97 ± 484.10 Δ	2 233.27 ± 348.81 Δ

注:与正常对照组比较,* $P<0.01$;与模型组比较, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$

7 各组小鼠胰岛 β 细胞 INS 及 InsR 抗体阳性细胞表达水平比较(图 2、3) INS 主要由胰岛 β 细胞分泌,棕褐色颗粒为阳性表达的细胞。正常对照组胰岛形状规则,棕褐色的阳性细胞较多,细胞间界限清晰(图 2A);模型组胰岛形状不规则,阳性细胞数量明显减少,细胞间界限不清,细胞脱颗粒,染色较浅(图 2B);吡格列酮组(图 2C)及降糖消脂片各剂量组(图 2D、E、F)阳性细胞数较模型组明显增加,细胞分布较密集。

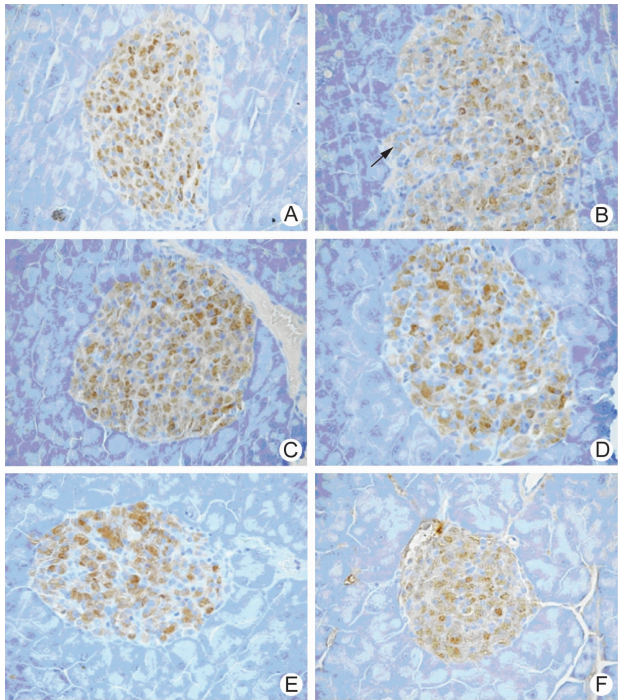


图2 各组胰岛 β 细胞 INS 阳性表达细胞比较 (PV6000 二步法染色,×400)

InsR 抗体着色主要表达于胰岛周边,棕黄色颗粒为阳性表达的细胞。正常对照组胰岛边缘有很明显的棕黄色阳性细胞(图 3A);模型组几乎看不出胰岛的轮廓,棕黄色颗粒极少(图 3B);吡格列酮组胰岛周边

可见少量棕黄色颗粒(图 3C),降糖消脂片各剂量组胰岛阳性细胞数较模型组有所增加(图 3D、E、F),但染色较浅,且明显少于正常对照组及吡格列酮组。

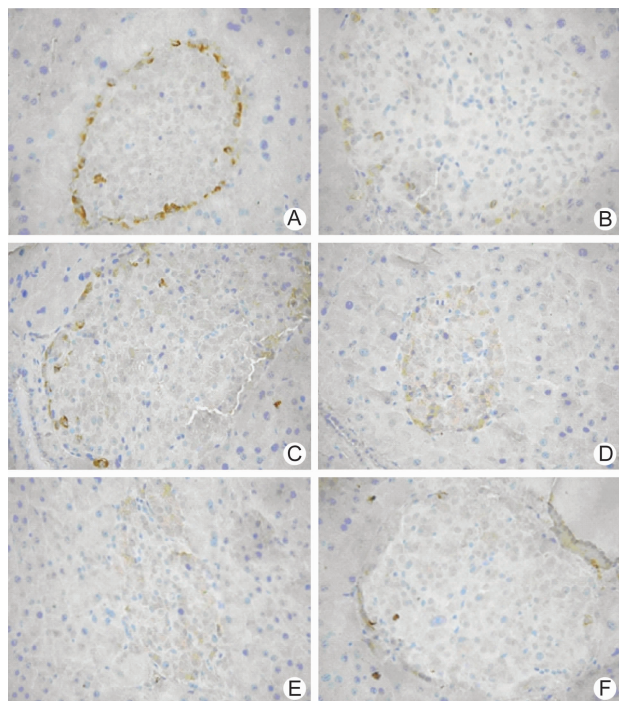
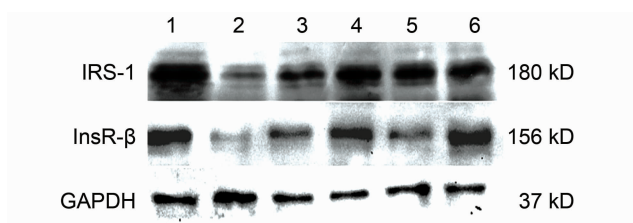


图3 各组胰岛 β 细胞 InsR 阳性表达细胞水平比较 (PV6000 二步法染色, $\times 400$)

8 各组小鼠 InsR β 及 IRS-1 表达水平比较(图 4、5) 与正常对照组比较,模型组 InsR β 及 IRS-1 表达水平明显降低($P < 0.05$);与模型组比较,降糖消脂片各剂量组 InsR β 及 IRS-1 表达水平明显增高($P < 0.05$),其与吡格列酮组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

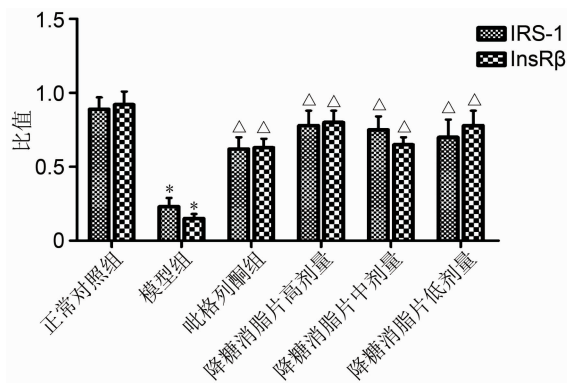


注:1 为对照组,2 为模型组,3 为吡格列酮组,4 为降糖消脂片高剂量组,5 为降糖消脂片中剂量组,6 为降糖消脂片低剂量组

图4 各组小鼠胰腺组织 InsR β 及 IRS-1 蛋白表达电泳图($n = 3$)

讨 论

T_2DM 的主要发病机理为 IR 及/或 INS 分泌不足,国内多采用高糖高脂饮食联合 STZ 注射的方法制



注:与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

图5 各组胰腺组织 InsR β 和 IRS-1 表达定量分析 ($n = 3$)

备 T_2DM 动物模型,其不足之处在于无法体现遗传因素的作用,且成模个体差异大。KK- A^y 小鼠是一种自发的 T_2DM 小鼠,具有肥胖、高血糖、血脂异常、高胰岛素血症等特征,其个体差异小,实验重复性好,与人类 T_2DM 的发病过程极其相似。这种转基因技术与自发性动物模型结合制备的动物模型,是目前研究 T_2DM 及其并发症较为理想的动物模型。

胰岛素信号传递受阻或减弱是导致 IR 的根本原因,胰岛素受体是胰岛素信号转导的起始部位,胰岛素到达相应靶组织后,与 InsR α 亚单位相结合,激活 β 亚单位使 InsR 自动磷酸化。磷酸化的 InsR 一方面为其他信号分子提供结合位点,另一方面使 IRS-1 磷酸化。IRS 与 p85 调节亚基结合,激活 PI-3K,进而激活葡萄糖转运因子 4 (GLUT4),最终促进糖的转运活动^[9,10]。

降糖消脂片以益气养阴、行气通络为组方原则,方中女贞子滋补肝肾为君药,黄芪补中益气,黄连清热解毒,姜黄活血行气,共为臣药,附有荔枝核行气通络等佐药,全方以扶正为主,祛邪为辅。本研究中模型组小鼠明显肥胖,与正常对照组比较,血糖、血脂明显升高,并出现高胰岛素血症, HOMA-IR 明显升高, ISI 降低,提示模型组存在明显的 IR。经过 8 周连续给药,降糖消脂片各剂量组 INS 及 HOMA-IR 水平降低, ISI 升高。免疫组化结果显示,降糖消脂片组胰岛 β 细胞 INS 阳性颗粒较模型组明显增加,细胞分布较密集; Western blot 结果显示,降糖消脂片组胰腺组织 InsR β 及 IRS-1 表达水平亦较模型组明显增高。提示降糖消脂片有一定的改善 IR 作用,其作用可能是通过提高胰岛细胞 InsR β 及 IRS-1 表达水平,促进 INS 与受体的结合,改善糖、脂代谢和 IR 状态。

肥胖和 T₂DM 之间有着内在的联系,肥胖是公认的发生 IR 最常见的危险因素。肥胖可造成代谢紊乱,近年来,炎症在 IR 形成过程中的作用越来越受到人们的重视,研究认为 IR 是一个慢性亚临床炎症过程^[1]。由于 KK-A^y小鼠取血量有限,故本研究仅测定血糖、血脂、INS 等指标,未能测定其他与 IR 相关的脂肪因子,如视黄醇结合蛋白 4(RBP4)、脂联素(APN);与 IR 相关的炎症因子,如 TNF- α 、IL-6 等。另外,脂肪组织是 INS 作用的外周靶组织,也是糖、脂代谢进行交叉作用的主要场所,其中分布于脂肪细胞中对糖代谢和脂肪细胞分化均具有重要调节作用的过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR- γ)是当前研究 IR 的集中关注点,具有高位调控作用,可通过多个环节改善 IR,这为探讨药物的作用机制提供了另一条思路,需在后续工作中采用肥胖大鼠模型进行降糖消脂片作用机理的进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 迟家敏,汪耀,周迎生主编.实用糖尿病学[M].北京:人民卫生出版社,2009:11-63.
- [2] 郭清华,陆菊明,潘长玉.饮食能量对 KK-A^y及 KK 小鼠 2 型糖尿病发病的影响[J].军医进修学院学报,2005,26(2):140-142.

- [3] 刘率男,刘泉,孙素娟,等.二甲双胍对 2 型糖尿病 KK-Ay 小鼠胰岛 β 细胞功能的影响及初步作用机制探讨[J].药科学报,2014,49(11):1554-1562.
- [4] 闫爱国,葛争艳,刘建勋,等.降糖消脂胶囊对 2 型糖尿病大鼠模型的胰岛及肝脏形态学改变的影响[J].中国中药杂志,2008,33(9):1067-1071.
- [5] 葛争艳,金龙,闫爱国,等.降糖消脂片对糖尿病动物降糖作用的研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(16):143-146.
- [6] 金龙,葛争艳,郭宇洁,等.降糖消脂片对 2 型糖尿病大鼠的实验研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(21):161-165.
- [7] 葛争艳,金龙,郭宇洁,等.降糖消脂片对转基因小鼠降糖降脂作用的实验研究[J].中国中西医结合杂志,2012,32(8):1095-1098.
- [8] 郑咏秋,葛争艳,金龙,等.降糖消脂片对 KK-Ay 小鼠胰岛素受体及底物表达的影响[J].中国糖尿病杂志,2013,19(3):175-179.
- [9] 严哲琳,董正平,孙文,等.翻白草水提液对 2 型糖尿病胰岛素抵抗大鼠糖脂代谢的影响[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(7):216-219.
- [10] 牛燕媚,刘彦辉,李慧阁,等.胰岛素受体底物蛋白 1 及其丝氨酸磷酸化活性在胰岛素抵抗发生中的作用[J].中国糖尿病杂志,2012,20(2):136-140.

(收稿:2016-01-24 修回:2016-11-09)

《中国中西医结合杂志》荣获中国科协精品科技期刊项目

按照《中国科协精品科技期刊工程项目实施方案(2015—2017)》,通过项目申报,资格审查及专家评审,分别评选出精品科技期刊 TOP50 项目 50 项,学术质量提升项目 120 项,数字出版建设项目 11 项,集群(联盟)建设项目 11 项,出版人才培养项目 2 项,精品科普期刊项目 5 项,共 199 项。《中国中西医结合杂志》进入 TOP50 项目。