

· 基础研究 ·

黄连人参对药对自发性 2 型糖尿病大鼠
脂联素及其受体表达的影响周迪夷¹ 牟新¹ 刘颖慧¹ 寿成珉¹ 周旦阳¹ 王世东² 赵进喜² 李丽娜³ 葛东宇³

摘要 目的 观察清热益气中药黄连人参对药对自发性 2 型糖尿病(T2DM)大鼠胰岛纤维化、脂联素(ADPN)水平及其受体(ADPNR)表达的影响。**方法** 采用高热量高脂饲料喂养诱导 GK 大鼠,建立自发性 T2DM 大鼠模型。造模成功大鼠随机分为 2 组:模型组、黄连人参组,每组 10 只;另取雄性 Wistar 大鼠 10 只为正常对照组。黄连人参组以 3.8 g/(kg·d)黄连人参水溶液(1.9 g 生药/mL)灌胃,正常对照组和模型组灌服等量蒸馏水,持续给药 4 周。治疗前后进行 OGTT 试验,治疗后观察胰岛纤维化、ADPN 及 ADPNR 在胰岛的表达情况。**结果** 治疗前与正常对照组比较,模型组 FPG 与 2h PG 均升高($P < 0.01$)。治疗后与正常对照组比较,模型组大鼠体重、FPG 与 2h PG 均升高($P < 0.01$),黄连人参组体重及 2h PG 较模型组降低($P < 0.05$)。与正常对照组比较,模型组胰岛内 ADPNR1 表达水平降低,胰岛内纤维结缔组织含量升高($P < 0.01$);与模型组比较,黄连人参组胰岛内 ADPNR1 表达水平升高($P < 0.01$),胰岛内纤维结缔组织含量降低($P < 0.05$)。3 组间 ADPN 水平及 ADPNR2 表达比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 清热益气中药黄连人参可能通过上调 ADPNR1 表达,提高 ADPN 生物利用率,改善胰岛纤维化,促进胰岛损伤修复。

关键词 清热益气中药;2 型糖尿病;脂联素;脂联素受体;黄连人参;胰岛纤维化

Effect of *Coptis and Ginseng* Drugs on the Expression of Adiponectin and its Receptor in Spontaneous Type 2 Diabetic Rats ZHOU Di-yi¹, MOU Xin¹, LIU Ying-hui¹, SHOU Cheng-min¹, ZHOU Dan-yang¹, WANG Shi-dong², ZHAO Jin-xi², LI Li-na³, and GE Dong-yu³ 1 Endocrinology Department of Hangzhou Red Cross Hospital, Hangzhou (310003); 2 Endocrinology Department of Dongzhimen Hospital affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100700); 3 Laboratory of Molecular Biology Center of Basic Medical Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100029)

ABSTRACT Objective To observe the effect of heat-clearing qi-replenishing herb *Coptis and Ginseng* on the expression of adiponectin and its receptors in rats with spontaneous type 2 diabetes. **Methods** The spontaneous T2DM rat model was established with the GK rats induced by high calorie high fat diet. The rats were randomly divided into two groups: the model group and the *Coptis Ginseng* group (10 in each group); Meanwhile 10 male Wistar rats were recruited as a normal control group. *Coptis Ginseng* aqueous solution (1.9 g crude drug per milliliter) was administered to the rats in the *Coptis Ginseng* group [3.8 g/(kg·d)]. Rats in the normal control group and the model group were fed with the same amount of distilled water for 4 weeks. OGTT was performed before and after treatment. After treatment, The islet fibrosis was observed by pancreatic masson staining. The level of ADPN and the expression of ADPNR were also detected. **Results** Compared with the normal control group, FPG and 2h PG were in-

基金项目:国家自然科学基金面上项目(No.81273623);浙江省自然科学基金项目(No.LQ14H270004),浙江省卫生厅资助项目(No.2010KYB087);浙江省科技厅项目(No.2013C33212);北京中医药大学自主选题项目(No.2332010077);浙江省中医药管理局项目(No.2017ZKL016);杭州市科委科技计划项目(No.20150733Q42)

作者单位:1.杭州市红十字会医院内分泌科(杭州 310003);2.北京中医药大学东直门医院内分泌科(北京 100700);3.北京中医药大学基础医学院分子生物中心实验室(北京 100029)

通讯作者:牟新, Tel:0571-56109796, E-mail:mouxin888@126.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20170327.065

creased in the model group ($P < 0.01$) before treatment. After treatment, the body weight, FPG and 2h PG in the model group were higher than those in the normal control group ($P < 0.01$), while the body weight and 2h PG of the *Coptis Ginseng* group were lower than the model group ($P < 0.05$). Compared with the normal control group, the expression level of ADPNR1 in the islets was decreased and the content of fibrous connective tissue in the islets was increased ($P < 0.01$) in the model group. Compared with the model group, the expression level of ADPNR1 in the islet and the content of fibrous connective tissue was decreased ($P < 0.05$) in the *Coptis Ginseng* group. There was no significant difference in the level of ADPN and the expression of ADPNR2 among the three groups ($P > 0.05$). Conclusion Heat-clearing and qi-replenishing herb *Coptis and Ginseng* may alleviate the islet fibrosis and promote islet repairment through uprising the expression of ADPNR1 and increasing the bioavailability of ADPN.

KEYWORDS heat-clearing qi-replenishing Herbs; type 2 diabetes; adiponectin; adiponectin receptor; *Coptis and Ginseng*; islet fibrosis

2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 是以慢性血糖水平增高为主要特征的代谢性疾病。胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 和胰岛素分泌功能缺陷是其主要病理变化。近年来研究发现, 脂联素 (adiponectin, ADPN), 作为一种脂肪细胞因子, 与其受体 (adiponectin receptor, ADPNR) 可能共同参与了 IR 的形成和发展, 并在维持体内能量平衡中起重要作用^[1]。课题组在既往清热益气中药黄连人参对药改善 IR 的实验研究基础上^[2], 采用自发性糖尿病大鼠模型, 观察黄连人参对药改善胰岛纤维化, 调节 ADPN 及其受体在胰岛内表达的影响。

材料与方法

1 动物 清洁级雄性自发性 2 型糖尿病 GK 大鼠, 12 周龄 20 只, 体重 (300 ± 10) g, 购于上海斯莱克实验动物有限责任公司, 许可证编号: SCXK (沪) 2007-0005。同周龄雄性 Wistar 大鼠 10 只, 体重 (300 ± 10) g, 购于北京华阜康实验动物中心, 许可证编号: SCXK (京) 2007-0002。通过北京中医药大学动物伦理审核, 审批号: 010952010077。

2 药物及主要试剂、仪器 黄连人参对药由北京中医药大学东直门医院颗粒剂药房提供的单味黄连、人参饮片配方颗粒剂, 以黄连人参 1:1 配制成水溶液^[2], 1.9 g 生药/mL, 4 °C 保存, 灌胃前放置至室温后使用。大鼠血清 ADPN ELISA 试剂盒 (北京优博奥生物科技有限公司, 批号: DER20040), 兔抗大鼠 ADPN 受体 1 (bs-0610R)、受体 2 抗体 (bs-0611R, 北京博奥森生物技术有限公司)。超薄切片机 (德国 LEITZ), 显微成像系统 (日本 Olympus), Sigma3K30 低温高速离心机 (美国 Sigma)。

3 黄连人参剂量的确定 根据前期研究, 黄连人

参单味药配方颗粒, 给药量依据《药理实验方法学》^[3] 确定, 具体公式如下: 大鼠剂量 (mg/kg) = 人体剂量 (mg/kg) $\times 90\% \times (\text{人体重}/\text{大鼠体重})^{1/3}$ 。该公式计算得出治疗组黄连人参中药颗粒剂用量为 3.8 g/(kg · d), 相当于人体临床常用剂量的 5 倍。

4 高脂饲料 高热量高脂饲料配方: 猪油 10%, 胆固醇 2%, 胆酸盐 0.25%, 蔗糖 5%, 基础饲料 82.75%^[2]。均由军事医学科学院提供。

5 造模、分组及干预方法 GK 大鼠喂养全价高糖脂饲料; Wistar 大鼠喂养全价普通饲料。造模方法参照文献[4]。适应性喂养 1 周后, 断尾取血测定随机血糖, 结果 GK 大鼠 20 只均达到 2 次随机血糖在 13.9 mmol/L 以上, 造模成功。GK 大鼠按随机数字表法分为 2 组: 模型组、黄连人参组, 每组 10 只; 另取雄性 Wistar 大鼠 10 只为正常对照组。黄连人参组以 3.8 g/(kg · d) 灌胃, 正常对照组和模型组灌胃等量蒸馏水, 持续给药 4 周。在治疗过程中, 模型组 1 只大鼠因灌胃时操作失误, 导致死亡。正常对照组和黄连人参组均未出现大鼠死亡。

6 观察指标及方法

6.1 OGTT 试验 于治疗前后行 OGTT 试验。予大鼠禁食 8 h 后, 以 50% 葡萄糖水按 3 g/kg 剂量灌胃, 分别于灌胃前及灌胃后 2 h 刺尾取血, 采用葡萄糖氧化酶法测定空腹血糖 (fasting plasma glucose, FPG), 餐后 2 h 血糖 (2 hour plasma glucose, 2h PG)。

6.2 血清 ADPN 水平检测 给药 4 周后, 禁食 8 h 后, 麻醉, 腹主动脉取血, 静置 2 h 后 4 °C、3 000 r/min, 10 min 分离血清, -20 °C 保存, 采用 ELISA 法检测血清 ADPN 水平。

6.3 ADPNR 表达检测 摘取胰腺组织, 放入

4%多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,5 μm 切片,行 HE、PAS、Masson 染色,在光学显微镜下观察其病理形态学改变。采用 SP 免疫组化法对胰腺 ADPN 受体 1 (ADPN1)、受体 2 (ADPN2) 蛋白的表达水平进行检测。石蜡切片常规脱蜡至水,3% H₂O₂ 灭活内源性酶后,高温进行抗原修复,10% 正常山羊血清封闭 20 min,滴加一抗 (ADPN1, 1 : 300; ADPN2, 1:200),4 ℃ 过夜,次日加二抗 37 ℃ 孵育 30 min,二氨基联苯胺 (DAB) 显色,苏木素复染,自来水冲洗,脱水透明,封片,以磷酸盐缓冲液 (PBS) 作阴性对照,实验结果判定:阳性反应为棕黄色或灰黄色颗粒沉积。显色结果采用 Image-Pro Plus 彩色图像分析系统根据染色面积和强度进行半定量分析,用吸光度 (A) 值表示。每张标本在显微镜下随机选择 10 个高倍视野 (×200) 测定 A 值,然后各组进行比较, A 值越高,表示所测物质含量越多。

7 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件完成,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较根据正态性检验结果,采用 t 检验或秩和检验,3 组组间差异性比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 治疗前后各组大鼠体重、血糖水平比较 (表 1) 治疗前与正常对照组比较,模型组 FPG 与 2h PG 均升高 ($P < 0.01$)。治疗后与正常对照组比较,模型组大鼠体重、FPG 与 2h PG 均升高 ($P < 0.01$),黄连人参组体重及 2h PG 较模型组降低 ($P < 0.05$)。

表 1 治疗前后各组大鼠的体重、血糖水平比较 ($\bar{x} \pm s$)					
组别	n	时间	体重 (g)	FPG (mmol/L)	2h PG (mmol/L)
正常对照	10	治疗前	325.90 ± 8.85	4.48 ± 0.40	6.42 ± 0.38
		治疗后	357.40 ± 6.80	4.72 ± 0.36	6.49 ± 0.31
模型	9	治疗前	331.89 ± 17.03	5.26 ± 0.40 *	15.21 ± 1.08 *
		治疗后	395.56 ± 15.04 *	6.10 ± 0.78 *	18.38 ± 2.26 *
黄连人参	10	治疗前	328.90 ± 17.10	5.00 ± 0.40	15.48 ± 2.24
		治疗后	374.70 ± 12.73 [△]	5.38 ± 0.58	15.89 ± 1.65 [△]

注:与正常对照组同期比较, * $P < 0.01$;与模型组同期比较, [△] $P < 0.05$

2 各组血清 ADPN 水平比较 正常对照组、模型组及黄连人参组 ADPN 水平分别为 (4.07 ± 0.34)、(3.57 ± 0.42) 及 (4.02 ± 0.28) mg/L,3 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 各组 ADPNR 在胰岛中的表达比较 (图 1、2, 表 2) 黄连人参组 GK 大鼠胰岛内可见较多 ADPN1 及 ADPN2 棕色阳性细胞,呈散在分布,颗粒浓聚,着

色较深。模型组大鼠胰岛内可见少量阳性胰岛细胞,呈散在分布,着色较浅。正常对照组大鼠胰岛内亦有少量阳性胰岛细胞,主要分布于胰岛边缘,排列整齐,邻近基底膜附近细胞着色略深。

ADPNR1 在模型组胰岛内的表达水平低于黄连人参组与正常对照组 ($P < 0.01$);黄连人参组表达水平虽较正常对照组略高,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。ADPNR2 在模型组胰岛内的表达水平虽低

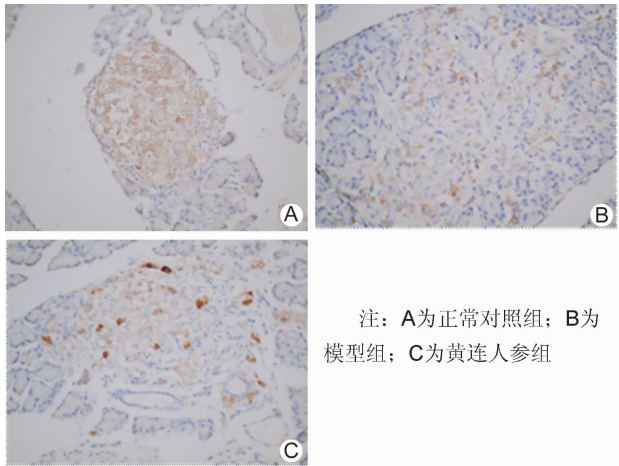


图 1 各组 ADPNR1 在胰岛中的表达比较 (免疫组化, ×200)

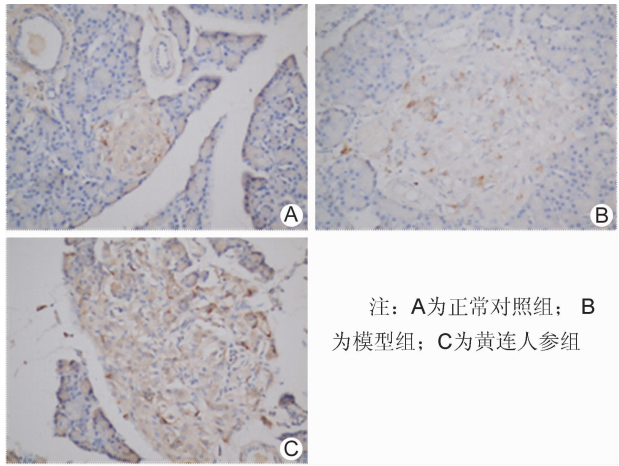


图 2 各组 ADPNR2 在胰岛中的表达比较 (免疫组化, ×200)

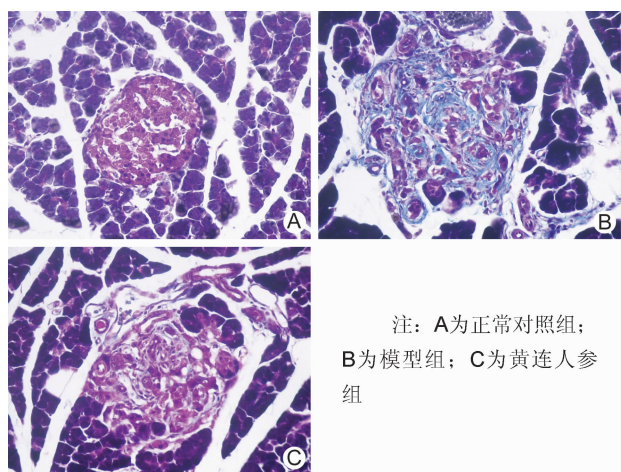
表 2 各组脂联素受体在胰岛中表达的平均光密度值比较 (IOD/Area%, $\bar{x} \pm s$)			
组别	n	ADPNR1	ADPNR2
正常对照	10	0.97 ± 0.44	1.83 ± 1.14
模型	9	0.23 ± 0.08 *	0.78 ± 0.49
黄连人参	10	1.10 ± 0.13 [△]	1.96 ± 0.72

注:与正常对照组比较, * $P < 0.01$;与模型组比较, [△] $P < 0.01$

于黄连人参组与正常对照组,但 3 组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

4 各组胰岛纤维化程度比较(图 3,表 3) 正常对照组大鼠胰岛呈椭圆形,边界清晰,结构规则,内无纤维结缔组织出现,细胞形态饱满,排列紧密。模型组大鼠胰岛形态不规则,结构紊乱,大量纤维结缔组织呈网状,缠绕分隔胰岛及其周围间质,蓝染,血管周围亦可见纤维结缔组织增生。黄连人参组大鼠胰岛内及其间质也可见少量纤维结缔组织增多,呈网状,分隔胰岛,蓝染;血管周围亦可见少量纤维结缔组织增生。

与正常对照组比较,模型组胰岛内纤维结缔组织含量升高($P < 0.01$);与模型组比较,黄连人参组胰岛内纤维结缔组织含量降低($P < 0.05$)。



注: A为正常对照组;
B为模型组; C为黄连人参
组

图3 各组胰岛纤维化程度比较 (Masson, ×200)

表3 胰岛纤维化程度的平均光密度值比较
(IOD/Area%, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	平均光密度值
正常对照	10	0.35 ± 0.44
模型	9	4.67 ± 2.40*
黄连人参	10	0.74 ± 0.72 [△]

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$

讨 论

ADPN 是由一种由白色脂肪组织 (white adipose tissue, WAT) 分泌的细胞因子,具有抗炎、提高胰岛素敏感性、调节糖脂代谢等多种生物活性^[5]。近年来研究显示,肥胖及 T2DM 患者中均存在低 ADPN 血症,ADPN 水平与 IR 及高胰岛素血症密切相关^[6]。Look AHEAD 研究提示,减轻体重可改善肥胖 T2DM 患者的 ADPN 水平^[7]。Okamoto M 等^[8]研究发现 C57BL/6 小鼠注射 ADPN 后可促进胰岛素分泌;在

葡萄糖浓度 5.6 mmol/L 时,ADPN 亦可使离体培养的胰岛细胞胰岛素分泌增加。

ADPNR 主要有 ADPNR1 与 ADPNR2 及 T-钙黏素。目前对 ADPNR1、ADPNR2 研究较多,ADPNR1 在大鼠的脑组织、心肌、肾脏、肝脏、肺组织、骨骼肌、脾脏及睾丸均有表达,其中以骨骼肌中表达最为丰富;ADPNR2 主要在肝脏中表达,两者在胰岛 β 细胞中也均有表达^[9]。ADPN 与其受体结合,经腺苷酸激活蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK)、P38 丝分裂原活化的激酶、过氧化物酶体增殖物激活受体 α 等多个细胞内信号分子通路,发挥抗炎、抗动脉粥样硬化、提高胰岛素敏感性、降低 IR 等作用^[10,11]。Tsuchida A 等^[12]观察肥胖伴 IR 的 T2DM db/db 小鼠,发现其骨骼肌中 ADPNR1 表达显著降低,AMPK 的活性下降,表明 IR 不仅与低 ADPN 水平相关,而且 ADPNR1 的表达下调,导致与 ADPN 结合减少,降低了细胞对 ADPN 的敏感性,加剧 IR,而代偿肥大的胰岛细胞的胰岛素分泌增加,进一步加重高胰岛素血症,加速胰岛 β 细胞凋亡,产生恶性循环。

从中医学角度看,早在《内经》时代,《素问·奇病论》就指出“肥者令人内热,甘者令人中满……转为消渴。”表明饮食失节,转而为热可导致消渴病,《灵枢·五变》中又指出“怒则气上逆,胸中蓄积,……血脉不行,转而为热,热则消肌肤,故为消瘠”,提示情志不遂、气郁化火,气滞瘀血,均能化热,导致消渴病发生。《素问·阴阳别论》:“二阳结谓之消。”也提示胃肠结热是消渴病发病的重要病机。笔者在前期调查了 180 例 T2DM 患者的中医证候,发现除本虚证存在气虚、阴虚外,标实证中内热证普遍存在,可表现为郁热、湿热、痰火、热结等多种形式^[13]。也有学者研究 T2DM 患者的证候分型与指标的相关性,发现气阴两虚、瘀热内蕴型是糖尿病最常见的证型,低密度脂蛋白、尿微量白蛋白的显著升高与内热证候相关^[14]。根据上述中医病机和证候分型,有学者采用随机对照试验观察三黄安消胶囊 (黄芩、黄连、人参)^[15]、黄连素治疗 T2DM 患者,结果发现两者均可降低血糖,改善 IR^[16]。对黄连小檗碱的体外研究也发现:经小檗碱处理后 3T3-L1 脂肪细胞的脂联素 mRNA 的表达增加^[17]。人参皂甙通过上调过氧化物酶体增殖物活化受体 γ 活性和表达,可改善 IR^[18]。也有学者发现补气药物黄芪联合针刺泻法,可降低小鼠瘦素水平,提高 ADPN 水平从而改善 IR 及血糖水平^[19]。课题组前期研究提示黄连人参对药可能通过调节模型动物 FPG、胰岛素、游离脂肪酸、TNF- α , 上调 PPAR γ 基因表达,改善 IR,其作用机制与

胰岛素增敏剂吡格列酮的相似^[2]。

本研究提示,模型组大鼠 ADPNR1 的表达水平显著低于黄连人参组及正常对照组,表明高血糖、脂代谢紊乱与低 ADPN 水平、ADPNR 的低表达相关。应用黄连人参对药可上调 ADPNR1 表达,促进 ADPN 与其受体结合,提高机体内 ADPN 的生物利用率,从而改善胰岛纤维化程度。表明 T2DM 的高血糖、高血脂、高胰岛素血症的代谢紊乱状态,经黄连清热泻火,人参益气养阴,上调了 ADPNR1 的表达,提高 ADPN 与 ADPNR1 的结合率,促进 β 细胞损伤修复,反证了 T2DM “壮火食气”内热伤阴耗气的基本病机。本研究由于实验条件有限,仅对黄连、人参对药复方进行了研究,对二者单药改善 IR,保护胰岛 β 细胞的分别作用机制有待进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Antonopoulos AS, Margaritis M, Coutinho P, et al. Adiponectin as a link between type 2 diabetes and vascular NADPH oxidase activity in the human arterial wall: the regulatory role of perivascular adipose tissue[J]. *Diabetes*, 2015, 64(6): 2207–2219.
- [2] 姜森,王世东,黄允瑜,等. 黄连人参对药治疗 2 型糖尿病胰岛素抵抗机制的实验研究[J]. *新中医*, 2006, 38(5): 89–91.
- [3] 魏伟主编. 药理实验设计中的剂量问题·药理实验方法学[M]. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 70–72.
- [4] Zhao Q, Egashira K, Inoue S, et al. Vascular endothelial growth factor is necessary in the development of arteriosclerosis by recruiting /activating monocytes in a rat model of long-term inhibition of nitric oxide synthesis [J]. *Circulation*, 2002, 105(9): 1110–1115.
- [5] Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, et al. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome [J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(7): 1784–1792.
- [6] 陈涛,王中心,黄丽华,等. 初诊 2 型糖尿病合并高血压患者血清脂联素和改良稳态模型评估法计算的胰岛素抵抗指数的变化及相关性[J]. *中华高血压杂志*, 2015, 23(5): 452–456.

- [7] Belalcazar LM, Lang W, Haffner SM, et al. Improving adiponectin levels in individuals with diabetes and obesity: insights from Look AHEAD[J]. *Diabetes Care*, 2015, 38(8): 1544–1550.
- [8] Okamoto M, Ohara-Imaizumi M, Kubota N, et al. Adiponectin induces insulin secretion *in vitro* and *in vivo* at a low glucose concentration [J]. *Diabetologia*, 2008, 51(5): 827–835.
- [9] Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects [J]. *Nature*, 2003, 423 (6941): 762–769.
- [10] Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors[J]. *Endocrine Rev*, 2005, 26(3): 439–451.
- [11] Hosch SE, Olefsky JM, Kim JJ. APPLIED mechanics: uncovering how adiponectin modulates insulin action [J]. *Cell Metab*, 2006, 4(1): 5–6.
- [12] Tsuchida A, Yamauchi T, Ito Y, et al. Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(29): 30817–30822.
- [13] 周迪夷,赵进喜,牟新,等. 基于“症”的 2 型糖尿病中医证候聚类分析[J]. *中华中医药杂志*, 2012, 27(12): 3121–3124.
- [14] 毛竹君,董颖,栾洁,等. 180 例 2 型糖尿病患者中医证候调查及证型研究[J]. *中华中医药杂志*, 2009, 24(8): 1064–1067.
- [15] 姜森. 三黄安消胶囊治疗 2 型糖尿病及改善胰岛素抵抗作用的临床研究[J]. *新中医*, 2006, 38(1): 28–30.
- [16] 于秀辰,李靖,赵进喜. 黄连素治疗 2 型糖尿病 30 例临床观察[J]. *中国临床医生*, 2003, 31(5): 48.
- [17] 谷卫,曾文衡,胡海英. 小檗碱对 3T3-L1 脂肪细胞脂联素表达的影响[J]. *中国中药杂志*, 2005, 30(4): 682.
- [18] 尚文斌,杨颖,陈名道. 人参与其主要成分抗糖尿病作用机制[J]. *国际内分泌代谢杂志*, 2007, 27(2): 115–118.
- [19] 赵亲伟,李茜,孙志. 针刺联合黄芪多糖对 db/db 小鼠瘦素和脂联素的影响[J]. *山东中医药大学学报*, 2014, 38(3): 275–277.

(收稿:2016-03-14 修回:2017-03-08)

责任编辑:汤 静