

· 论著 ·

清热解毒方对 2 型糖尿病模型大鼠血清炎症因子 TNF- α 、IL-1、IL-6 的干预研究

冯建华 李洁 王殿云 张萌 刘媛 李国霞

【摘要】 目的 观察清热解毒方对 2 型糖尿病大鼠血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-1 (IL-1)、白介素-6 (IL-6) 水平的影响。**方法** 采用小剂量链脲佐菌素 (STZ) 加高脂饮食饲养的方法建立 2 型糖尿病 (DM) 肥胖大鼠模型, 随机分为正常对照组, 模型组, 中药高剂量组, 中药低剂量组, 二甲双胍组。给药 4 周后观察大鼠血清 TNF- α 、IL-1、IL-6 水平的变化。**结果** 与模型组相比, 中药组血糖、血清 TNF- α 、IL-1、IL-6 水平明显下降 ($P < 0.05$), 中药高低剂量组之间无明显差异, 中药组与二甲双胍组相比有显著差异 ($P < 0.05$)。**结论** 清热解毒方可明显降低 2 型糖尿病模型大鼠血清中的炎症因子水平。

【关键词】 清热解毒方; 2 型糖尿病; 炎症因子; 大鼠

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2012.08.004

Influence of Qingre Jiedu Decoction on TNF- α , IL-1, IL-6 in type 2 diabetic rats FENG Jian-hua, LI Jie, WANG Dian-yun, et al. Department of Endocrinology, the Second Affiliated Hospital of Shandong University of Chinese Medicine, Jinan 250001, China

Corresponding author: FENG Jian-Hua, E-mail: jhfeng@126.com

【Abstract】 Objective To study the influence of Qingre Jiedu Decoction on type 2 diabetic rat serum tumor necrosis factor- α and interleukin-6 levels. **Methods** To establish type 2 diabetic obese rat model by injecting with low dose of STZ and high-fat diet feeding. Then the rats were randomly divided into model group, high dose of Chinese medicine, low dose of Chinese medicine and metformin group. After 4 weeks drug delivery, the levels of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in the rat serum were measured. **Results** Compared with the model group, the serum tumor necrosis factor- α and interleukin-6 levels of Chinese medicines groups were decreased significantly. There is no significantly difference between the two groups of traditional Chinese medicine group. There is a significant difference between the metformin group and the TCM group. **Conclusion** Qingrejiedu Decoction can significantly reduce the levels of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in the serum of T2DM rat.

【Key words】 Qingre Jiedu Decoction; Type 2 diabetes; Inflammatory factors; Rat

糖尿病是一种严重威胁人们身体健康的常见内分泌代谢性疾病, 2 型糖尿病的特征是胰岛素抵抗和进行性胰岛 β 细胞功能衰竭, 这两方面可能有着共同的基本发病机制。近几年的研究表明, 炎症

因子与 2 型糖尿病之间有密切的关系^[1-3]。目前, 西医关于糖尿病炎症因子的研究报道较多, 而中医药针对 DM 炎症因子的研究鲜见报道。笔者提出了 2 型糖尿病炎症因子反应为中医学“内生之毒”的理论假说, 其主要的病因病机为热毒内盛, 基于此理论, 选择以清热解毒为主的中药复方, 观察其对链脲佐菌素 (STZ) 糖尿病大鼠血清肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素-1 (IL-1)、白介素-6 (IL-6) 水平的干预作用。

基金项目: 国家自然科学基金 (30772799)

作者单位: 250001 济南, 山东中医药大学第二附属医院内分泌科 (冯建华、刘媛、李国霞); 山东中医药大学基础实验室 (李洁、张萌); 山东中医药大学 [王殿云 (硕士研究生)]

作者简介: 冯建华 (1950-), 教授, 主任医师, 博士生导师。研究方向: 中医药防治内分泌代谢性疾病临床研究。E-mail: jhfeng@126.com

文献标引格式:

冯建华, 李洁, 王殿云, 等. 清热解毒方对 2 型糖尿病模型大鼠血清炎症因子 TNF- α 、IL-1、IL-6 的干预研究 [J]. 环球中医药, 2012, 5(8): 573-575.

1 材料与方法

1.1 动物

健康雄性清洁级 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 60 只, 体质量 250 ~ 300 g, 由山东省实验动物中心提供, 生产许可证号: SCXK(鲁)20050015。山东中医药大学实验动物中心恒温饲养、造模和观察。

1.2 动物与试剂

清热解毒方药由黄连 9 g、黄芩 12 g、金银花 30 g、大黄 6 g、玄参 15 g、生地黄 15 g、丹参 15 g、西洋参 6 g 组成, 所含的生药饮片均购自济南, 按照原方比例和制法由山东中医药大学试验药厂提供; 对照品盐酸二甲双胍由河北天成药业有限公司生产。

1.3 仪器

AB-160 型电子分析天平系德国 Sartorius 公司产品; 微量加样器系法国 Gilson 公司产品; Elisa 酶联免疫盒(白介素 1、白介素 6、胰岛素、血清肿瘤坏死因子)均系上海蓝基生物科技有限公司产品; STZ 系美国 Sigma 公司产品。

1.4 造模与分组

动物模型的建立按 Srinivasan 等^[4]和周迎生等^[5]的方法改良, 60 只大鼠经适应性喂养 3 天, 随机分为 2 组, 正常对照组 12 只, 给予普通饮食; 造模组 48 只, 给予高脂饮食喂养(基础饲料加上 28% 蔗糖, 20% 熟猪油, 1% 胆固醇, 0.25% 胆酸盐)4 周后禁食(不禁水)16 小时, 一次性腹腔注射低剂量 STZ 30 mg/kg(用 pH 4.4 的 0.1 mmol/L 无菌柠檬酸缓冲液配成 0.25% 浓度); 正常对照组注射等体积的 0.1 mmol/L 的无菌柠檬酸缓冲液。造模组注射 STZ 72 小时后, 尾静脉采血测血糖大于 16.7 mmol/L, 即为造模成功。

将造模成功 48 只动物随机分为 4 组, 每组 12 只, 即模型组、二甲双胍组、中药高剂量组、中药低剂量组, 4 组间血糖水平无统计学差异($P>0.05$)。中药高、低剂量组每天上午 9:00 及下午 5:00 分别以清热解毒方灌胃, 高剂量组为每只每次 2.5 ml, 低剂量组为每只每次 1.2 ml; 二甲双胍组, 每天上午 9:00 及下午 5:00 分别给予 5% 盐酸二甲双胍溶液 2 ml 灌胃; 模型组, 每天上午 9:00 及下午 5:00 分别以蒸馏水 2 ml 灌胃。共干预 4 周。

1.5 观测指标

剪尾取血, 采用 one-touch(美国强生)血糖仪测定空腹血糖; 腹主动脉取血, 采用 ELISA 酶联免疫

试剂盒测定血清 TNF- α 、IL-1、IL-6 水平。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 13.0 进行方差分析, 实验数据计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并进行单因素方差分析。各样本间比较应用 SNK 检验, 实验组与对照组比较用 Dunnett-t 检验, 各组两两比较用 LSD-t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠的血糖情况

造模成功后大鼠血糖升高, 与正常组相比差异有显著统计学意义($P<0.01$), 经过药物干预 4 周后, 中药高剂量组、中药低剂量组及二甲双胍组的血糖水平较模型组均明显下降($P<0.05$), 但中药高剂量组、中药低剂量组的血糖水平仍高于二甲双胍组($P<0.05$)。说明清热解毒方具有降低糖尿病模型大鼠的血糖的作用, 但其作用不如二甲双胍。见表 1。

表 1 造模成功后各组大鼠的血糖比较($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	干预前 (mmol/L)	干预后 (mmol/L)
正常对照组	6.6 \pm 0.86	5.7 \pm 0.62
中药高剂量组	21.5 \pm 2.35 ^a	9.7 \pm 0.88 ^{bc}
中药低剂量组	21.1 \pm 2.48 ^a	10.9 \pm 0.76 ^{bd}
二甲双胍组	22.2 \pm 2.30 ^a	9.2 \pm 0.82 ^b
模型组	20.3 \pm 2.49 ^a	21.0 \pm 0.96

注: 与正常组比较, ^a $P<0.01$; 与模型组比较, ^b $P<0.01$; 与二甲双胍组比较, ^c $P>0.05$, 但整体血糖水平高于二甲双胍组; 与中药高剂量组及二甲双胍组比较, ^d $P<0.05$ 。

2.2 清热解毒方对糖尿病大鼠外周血 TNF- α 、IL-1、IL-6 的影响

模型组 TNF- α 显著高于正常对照组($P<0.05$), 中药高剂量组和中药低剂量组大鼠的 TNF- α 水平均显著低于模型组($P<0.05$), 中药高剂量组、中药低剂量组之间差异无统计学意义($P>0.05$); 中药高剂量组和低剂量组大鼠的 TNF- α 水平显著均低于二甲双胍组($P<0.05$)。说明糖尿病大鼠存在 TNF- α 、IL-1 和 IL-6 的升高, 清热解毒方药高剂量和低剂量均能降低其 TNF- α 含量, 不同剂量效果没有差异, 其降低 TNF- α 、IL-1 和 IL-6 的功效优于二甲双胍。见表 2。

模型组 IL-1 显著高于正常对照组($P<0.05$); 中药高剂量组和中药低剂量组大鼠的 IL-1 水平均显著低于模型组($P<0.05$); 中药高剂量组与中药低剂量组之间差异无统计学意义($P>0.05$), 2 组均显

表 2 清热解毒方对糖尿病大鼠外周血 TNF- α 、IL-1 和 IL-6 的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	TNF- α (ng/L)	IL-1(pg/mL)	IL-6(pg/mL)
正常对照组	10.5 \pm 1.411	271.73 \pm 27.974	109.0 \pm 9.041
中药高剂量组	19.7 \pm 2.259 ^b	396.68 \pm 34.172 ^b	172.5 \pm 7.789 ^b
中药低剂量组	20.7 \pm 1.805 ^b	414.39 \pm 15.973 ^b	190.3 \pm 9.737 ^{bc}
二甲双胍组	30.6 \pm 1.762	516.05 \pm 37.244	201.9 \pm 15.772
模型组	38.6 \pm 3.097 ^a	544.39 \pm 37.918 ^a	238.8 \pm 10.39 ^a

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与二甲双胍组比较,^b $P < 0.05$;与中药高剂量组比较,^c $P < 0.05$ 。

著低于二甲双胍组($P < 0.05$)。见表 2。

模型组 IL-6 显著高于正常对照组($P < 0.05$), 中药高剂量组和中药低剂量组大鼠的 IL-6 水平均显著低于模型组($P < 0.05$);且中药高剂量组的 IL-6 水平显著低于中药低剂量组($P < 0.05$),2 组均显著低于二甲双胍组($P < 0.05$)。见表 2。

3 讨论

肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素 1(IL-1) 和白介素 6(IL-6) 均是重要的细胞因子,研究证实大量 TNF- α 作用于胰岛 β 细胞,可造成 β 细胞的 DNA 损伤,而且 TNF- α 还可通过白介素 1(IL-1) 及一氧化氮(NO)途径,抑制胰岛素作用,促进 β 细胞损伤,另一方面 TNF- α 作用于肝细胞、脂肪细胞等,使胰岛素受体底物-1 的丝氨酸残基磷酸化,抑制正常胰岛素传导途径,间接影响胰岛素敏感性^[6]。本课题组的前期临床研究结果显示:2 型糖尿病患者血清 TNF- α 、IL-1、IL-6 水平较正常人明显升高($P < 0.05$),且伴有血管并发症的糖尿病患者血清 TNF- α 、IL-1、IL-6 水平明显高于无并发症的患者($P < 0.05$)。经清热解毒方治疗后可降低 2 型糖尿病患者血清 TNF- α 、IL-1 和 IL-6 水平,改善血糖、糖基化血红蛋白、血清胰岛素等指标,并显著改善患者症状体征^[7]。

炎症因子既是病理产物又是致病因素,我们从中医理论的角度提出了“内生之毒”的假说观点,毒邪内盛是消渴病(糖尿病)及其并发症发生发展的基本病理机制。正如《灵枢·五变篇》谓:“怒则气上逆,胸中蓄积,血气逆留,髓皮充肌,血脉不行,转而与热,热则消肌肤,故为消瘠。”《丹溪心法·消渴》指出:“酒面无节,嗜嗜炙炙……于是炎火上熏,脏腑生热,燥热炽盛,津液干焦,渴饮水浆,而不能自禁。”这就从病理方面指出胃肠热结,毒邪内生,耗伤津液是消渴病发病的主要机理。根据“热者寒之”、“温者清之”、“治热以寒”的治疗原则,采用以黄连、黄芩、金银花、生地黄、玄参、大黄等清热解毒

为主的中药组成基本方,对中医辨证为肺胃热盛者 2 型糖尿病患者进行了临床干预研究,取得了初步临床疗效^[7]。方中的药物除具有清热解毒作用外,现代药理研究表明还具有抗病原微生物、抗炎、免疫抑制和调节血糖等作用。

本研究显示,模型组大鼠外周血中 TNF- α 、IL-1、IL-6 水平均明显高于正常组,经清热解毒方干预后均显著下降,且优于二甲双胍组。本研究证实了清热解毒为主的中药复方可抑制糖尿病模型大鼠的 TNF- α 、IL-1、IL-6 水平,降低血糖;研究为验证炎症因子反应为“内生之毒”的理论假说提供了一定的依据,为清热解毒治疗 2 型糖尿病找到了理论根据和客观依据。但对其具体作用机制尚有待于进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Schmidt MI, Duncan BB, Scharret AR, et al. Markers of inflammation and prediction of diabetes mellitus in adults (Atherosclerosis Risk in Communities study): a cohort study [J]. Lancet, 1999, 353 (9165): 1649-1652.
- [2] Barzilay JI, Abraham L, Heckbert SR, et al. The relation of markers of inflammation to the development of glucose disorders in the elderly: the Cardiovascular Health Study [J]. Diabetes, 2001, 50 (10): 2384-2389.
- [3] Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, et al. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus [J]. Jama, 2001, 286 (3): 327-334.
- [4] Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, et al. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening [J]. Pharmacol Res, 2005, 52 (4): 313-320.
- [5] 周迎生,高妍,李斌,等. 高脂喂养联合链脲佐菌素注射的糖尿病大鼠模型特征[J]. 中国实验动物学报, 2005, 13 (3): 154-158.
- [6] O'Doherty R, Stein D, Foley J. Insulin resistance [J]. Diabetologia, 1997, 40 (suppl 3): B10-5.
- [7] 张萌,冯建华,张昭. 清解合剂对 2 型糖尿病炎症因子水平的影响[J]. 山东中医药大学学报, 2009, 33 (6): 486-488.

(收稿日期: 2012-03-23)

(本文编辑:刘群)