

仙鹤草对 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗及炎症因子的干预作用

秦灵灵 王磊 李娟娥 刘铜华

【摘要】 **目的** 观察仙鹤草提取物对 2 型糖尿病大鼠血糖、血脂、胰岛素抵抗及血清中炎症因子的影响。**方法** 采用高脂饲料喂养加腹腔注射小剂量链脲佐菌素 STZ 的方法制备 2 型糖尿病动物模型,随机分为 4 组($n=9$):模型组、吡格列酮组、仙鹤草高剂量组、仙鹤草低剂量组。灌胃给药 4 周后取血检测各组大鼠空腹血糖(FBG)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(CHOL)、高密度脂蛋白(HDL-C)、低密度脂蛋白(LDL-C),采用放射免疫法测定空腹血清胰岛素(Fins)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、C 反应蛋白(CRP),并根据 Fins,FBG 计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)。**结果** 仙鹤草高剂量可显著降低大鼠 FBG,FINS,HOMA-IR;可降低甘油三酯,升高高密度脂蛋白;降低血清中炎症因子 TNF- α 和 CRP 含量。**结论** 仙鹤草提取物对 2 型糖尿病大鼠具有降糖调脂的治疗作用,可缓解 2 型糖尿病胰岛素抵抗,并推测可能与降低血清炎症因子含量有关。

【关键词】 仙鹤草提取物; 2 型糖尿病; 血糖; 血脂; 胰岛素抵抗; 炎症因子

【中图分类号】 R587.1 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2013.05.004

Effects of Herba Agrimoniae on insulin resistance and inflammatory factors in T2DM rats QIN Ling-ling, WANG Lei, LI Juan-e, et al. Department of endocrinology, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China

Corresponding author: LIU Tong-hua, E-mail: thliu@vip.163.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of Herba Agrimoniae on glucose and blood lipid, insulin resistance and the levels of inflammatory factors in T2DM Rats. **Methods** The T2DM rats induced by high lipid diet and small dosage intraperitoneal injection of STZ, were randomly divided into four groups ($n=9$ in each). Model, Herba Agrimoniae (high dose and low dose) and Pioglitazone were administered respectively by gavage. Four weeks later, the levels of FBG and blood lipid were detected. Fins were measured by radioactive immunoassay and accordingly insulin resistance indexes(HOMA-IR) were figured out. TNF- α and CRP in the serum were detected by the method of radioactive immunoassay too. **Results** Compared with model group, the levels of FBG, Fins, HOMA-IR, TG, were decreased, HDL was increased. The levels of TNF- α , CRP in the serum were down-regulated in high dose Herba Agrimoniae group. **Conclusions** Herba Agrimoniae can decrease glucose, blood lipid and improve insulin resistance in type 2 diabetic mellitus rats by decreasing the the levels of inflammatory factors of TNF- α and CRP.

【Key words】 Herba Agrimoniae; Type 2 diabetes; Glucose; Blood lipid; Insulin resistance; Inflammatory factors

基金项目:国家国际科技合作项目(2010DFB33260)

作者单位:100078 北京中医药大学东方医院内分泌科[秦灵灵(博士研究生)、李娟娥],科技处(刘铜华);北京中医药大学第三附属医院内分泌科(王磊)

作者简介:秦灵灵(1984-),女,2010 级在读博士研究生。研究方向:中医药防治糖尿病作用机制研究。E-mail:15201484725@126.com

通讯作者:刘铜华(1963-),医学博士,教授。研究方向:中医药防治糖尿病及其并发症临床及作用机制研究。E-mail:thliu@vip.163.com

仙鹤草,又名脱力草、龙牙草,系蔷薇科植物龙牙草的干燥地上部分,野生于中国各地。仙鹤草性平,味苦涩,归心、肝经,具有收敛止血、截疟、止痢、解毒的功效,临床上传统用于各种出血症^[1]。据报道仙鹤草中含有酚、酯、黄酮、鞣质、糖苷、有机酸、挥发油、三萜皂苷等极其复杂的化学成分^[2]。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级 Wistar 大鼠 60 只, 雄性, 8 周龄, 体重(180 ± 20) g, 合格证号: SCXK(京)2006-0009。

1.2 药物与试剂

仙鹤草提取物由北京中医药大学中药学院提供: 仙鹤草全草饮片 5 kg, 加水煎煮 3 次, 料液比分别为 1:10、1:10、1:8, 煎煮时间分别为: 1.5、1.5、1 小时, 分别过滤合并滤液, 滤液减压浓缩至稠膏, 70℃真空干燥, 粉碎, 过 80 目筛, 得仙鹤草提取物 0.5925 kg(得率 11.85%); 艾汀(盐酸吡格列酮片) 15 mg/片, 由江苏太洋医药股份有限公司制造, 国药准字批号: H20040267; 链脲佐菌素(STZ)(sigma0130)购自北京博爱商贸有限公司, 批号: B57218; 血脂 4 项生化试剂盒、胰岛素放免试剂盒, C 反应蛋白(CRP)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 放免试剂盒购自南京建成生物有限公司。

1.3 实验仪器

低温高速离心机(3K30, 美国 Sigma 公司制造); 酶标仪(Multiskan MK3 型, Thermo 制造); 水浴锅(荣华仪器厂); 血糖仪及配套试纸(德国罗氏罗康全)。

1.4 饲料

造模大鼠喂养的高脂饲料, 购自北京科奥协力饲料有限公司, 配方: 基础饲料 65.75%, 蔗糖 20%, 猪油 10%, 蛋黄粉 3%, 胆固醇 1%, 猪胆盐 0.25%, 正常组大鼠喂养普通饲料。

1.5 动物分组及给药

动物饲养于北京中医药大学 SPF 级动物实验室, 每天 12 小时光照维持, 昼夜循环, 自由饮水进食。动物适应性喂养 1 周后, 按照随机数字表随机选取 9 只为正常对照组, 以普通饲料喂养, 其余大鼠以高脂饲料喂养。在饲养 4 周后, 夜间禁食 12 小时后腹腔注射 STZ(30 mg/kg 溶于 0.1 mmol/L 柠檬酸缓冲液, pH = 4.4); 2 周后测定大鼠空腹血糖, 测得非同日两次血糖值 ≥ 16.7 mmol/L 者为模型成功大鼠。选取造模成功的 36 只大鼠按血糖高低编号, 并按照随机数字表随机分为模型组、吡格列酮组(4.05 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、仙鹤草高剂量组(12 g·kg⁻¹·d⁻¹)和仙鹤草低剂量组(6 g·kg⁻¹·d⁻¹), 中药以生药量计, 灌胃给药 4 周。正常组和模型组予相同体积的生理盐水。

1.6 取材

取材前禁食不禁水 12 小时, 断尾取血测其空腹血糖(FBG), 腹腔注射 3% 戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉, 腹主动脉取血, 常温静置 3 小时, 2500 g, 4℃离心 10 分钟, 血清, -20℃保存。

1.7 观察指标

1.7.1 一般情况观察 观察大鼠毛色、神态、精神状态、活动度等情况, 随时记录。

1.7.2 血清指标 用德国罗康全血糖仪及配套试纸测定空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)空腹血清胰岛素(fasting serum insulin, Fins)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和 C 反应蛋白(c-reactive protein, CRP)用放免法测定, 甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, CHOL)、高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL-C)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL-C)用全自动生化仪测定。严格按照试剂盒说明书步骤测定。

1.7.3 胰岛素抵抗指数(HOMA-IR) $HOMA-IR = (\text{空腹血糖} \times \text{空腹血清胰岛素}) / 22.5^{[3]}$ 。

1.8 统计学方法

应用 SPSS 17.0 统计软件包处理数据, 数据以($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析方法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般状态观察

正常组大鼠精神状态良好, 反应灵敏, 动作自如, 皮毛有光泽。模型组以及给药组在喂养高脂饲料阶段, 体重逐渐上升, 出现精神萎靡, 反应迟钝, 动作迟缓, 皮毛失去光泽的情况, 造模结束给药后, 模型组大鼠以上这些情况逐渐加重的同时尿量明显增多。吡格列酮组、仙鹤草高剂量治疗组有类似模型组表现, 但程度较轻。在给药阶段模型组, 吡格列酮组、仙鹤草高低剂量组分别死亡 1 只, 推测原因可能是血糖突然升高, 发生了酮症酸中毒(DKA)。在取材阶段, 仙鹤草低剂量组由于取血失败, 造成腹主动脉大出血致死。最后正常组、模型组、吡格列酮组、仙鹤草高剂量组进入统计的大鼠均为 8 只, 仙鹤草组进入统计的大鼠 7 只。

2.2 仙鹤草提取物对大鼠 FBG, Fins, HOMA-IR 的影响

模型组与正常组相比 FBG 升高($P = 0.000$,

表 1 仙鹤草提取物对大鼠 FBG, Fins, HOMA-IR 的影响($\bar{x} \pm s$)

分组	n	FBG (mmol/L)	Fins (uIU/mL)	HOMA-IR
正常组	8	4.81 ± 0.56	59.72 ± 8.31	12.79 ± 2.33
模型组	8	22.19 ± 2.27 ^a	142.79 ± 26.86 ^a	141.28 ± 33.40 ^a
吡格列酮组	8	20.14 ± 2.02 ^b	121.16 ± 21.05 ^b	108.61 ± 23.49 ^c
仙鹤草低剂量组	7	20.60 ± 2.27	142.23 ± 18.15	130.27 ± 21.75
仙鹤草高剂量组	8	19.80 ± 1.43 ^b	123.20 ± 15.88 ^b	108.80 ± 18.57 ^c

注:与正常组相比,^a $P < 0.01$;与模型组相比,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$ 。

表 2 仙鹤草提取物对大鼠血脂的影响($\bar{x} \pm s$) (mmol/L)

分组	n	CHOL	TG	HDL-C	LDL-C
正常组	8	1.62 ± 0.29	0.67 ± 0.24	0.60 ± 0.05	0.67 ± 0.23
模型组	8	12.23 ± 2.18 ^a	4.47 ± 1.27 ^a	0.41 ± 0.11 ^a	8.77 ± 2.10 ^a
吡格列酮组	8	8.44 ± 3.19	2.68 ± 0.81	0.57 ± 0.12 ^c	7.53 ± 2.81
仙鹤草低剂量组	7	11.17 ± 3.45	4.32 ± 1.40	0.44 ± 0.14	7.50 ± 2.86
仙鹤草高剂量组	8	8.54 ± 3.39	2.18 ± 0.78 ^b	0.58 ± 0.10 ^c	7.33 ± 2.70

注:与正常组相比,^a $P < 0.01$;与模型组相比,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$ 。

$P < 0.01$),吡格列酮组与模型组相比 FBG 下降($P = 0.030, P < 0.05$),仙鹤草高剂量组与模型组相比 FBG 降低($P = 0.013, P < 0.05$),说明仙鹤草可降低大鼠血糖;模型组与正常组相比 Fins 升高($P = 0.000, P < 0.01$),吡格列酮组与模型组相比 Fins 下降($P = 0.030, P < 0.05$),仙鹤草高剂量组与模型组相比 Fins 降低($P = 0.048, P < 0.05$),说明仙鹤草可降低血清中胰岛素的浓度;模型组与正常组相比 HOMA-IR 升高($P = 0.000, P < 0.01$),吡格列酮组与模型组相比 HOMA-IR 下降($P = 0.006, P < 0.01$),仙鹤草高剂量组与模型组相比 HOMA-IR 降低($P = 0.006, P < 0.01$),说明仙鹤草可缓解胰岛素抵抗。低剂量组有不同程度的改善,但差异无统计学意义。见表 1。

2.3 仙鹤草提取物对大鼠血脂水平的影响

模型组与正常组相比血清中 TG 含量升高($P = 0.000, P < 0.01$),血清中 CHOL 含量升高($P = 0.000, P < 0.01$),LDL-C 含量升高($P = 0.000, P < 0.01$),HDL-C 水平降低($P = 0.001, P < 0.01$)。仙鹤草高剂量组与模型组相 TG 水平降低($P = 0.010, P < 0.05$),HDL-C 水平升高($P = 0.005, P < 0.01$);吡格列酮组与模型组相比 HDL-C 水平升高($P = 0.009, P < 0.01$)。见表 2。

2.4 仙鹤草提取物对大鼠血清炎性因子 TNF- α 、CRP 的影响

模型组与正常组相比血清 TNF- α 高于正常组($P = 0.000, P < 0.01$),吡格列酮组与模型组相比 TNF- α 下降($P = 0.029, P < 0.05$),仙鹤草高剂量组

与模型组相比 TNF- α 降低($P = 0.001, P < 0.01$),说明仙鹤草可降低血清 TNF- α 含量;模型组与正常组相比血清 CRP 高于正常组($P = 0.000, P < 0.01$),吡格列酮组与模型组相比 CRP 下降($P = 0.001, P < 0.01$),仙鹤草低剂量组与模型组相比 CRP 降低($P = 0.024, P < 0.05$)仙鹤草高剂量组与模型组相比 CRP 降低($P = 0.015, P < 0.05$),说明仙鹤草可降低血清 CRP 含量。

表 3 仙鹤草提取物对大鼠血清炎性因子的影响($\bar{x} \pm s$) (ng/mL)

分组	n	TNF- α	CRP
正常组	8	8.65 ± 2.24	1.10 ± 0.14
模型组	8	14.21 ± 2.81 ^a	2.02 ± 0.38 ^a
吡格列酮组	8	10.98 ± 2.21 ^b	1.38 ± 0.42 ^c
仙鹤草低剂量组	7	12.78 ± 2.52	1.60 ± 0.32 ^b
仙鹤草高剂量组	8	9.10 ± 3.95 ^c	1.58 ± 0.37 ^b

注:与正常组相比,^a $P < 0.01$;与模型组相比,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$ 。

3 讨论

仙鹤草是良好的收敛止血药,传统多用于治疗各种出血症,而近年来临床上将其应用又扩大到抗糖尿病,抑菌,抗肿瘤,抗心律失常等疾病的治疗上,其中有关仙鹤草降血糖作用的临床报道引起了研究者的注意。范尚坦等人一直致力于仙鹤草治疗糖尿病的临床及实验研究,在临床经验的基础上,利用肾上腺素、四氧嘧啶诱导的糖尿病小白鼠

动物模型验证了仙鹤草的潜在降糖作用,并推测其可能通过对胰岛素 β 细胞的保护作用,改善胰岛素的分泌缺陷,促进胰岛素 β 细胞分泌胰岛素起到降低血糖作用的^[4-5]。现有实验研究所采用的实验动物模型多是采用化学损伤法复制的糖尿病动物模型,其造模原理为通过四氧嘧啶对胰岛 β 细胞高度选择的毒性作用,引发实验性糖尿病,此类模型多只符合 1 型糖尿病特征与 2 型糖尿病的病理特征相差较大,本研究采用于小剂量链脲佐菌素加膳食诱导法复制的更接近于 2 型糖尿病病理变化及临床症状的 2 型糖尿病大鼠模型观察仙鹤草对 2 型糖尿病的治疗作用,借此获得更可信、更有指导意义的实验数据^[6-7]。

2 型糖尿病患者约占糖尿病患者的 90% 左右,因此对 2 型糖尿病的防治已经成为了中国一个严重的社会公共问题。2 型糖尿病常由胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞功能减退引起,是一种以双重病理机制(胰岛素抵抗和胰岛素分泌缺乏)为特点的代谢性疾病。胰岛素抵抗是 2 型糖尿病的主要特征,不仅是其发生的驱动因素,而且贯穿于其病情发展的始终。大量的流行病学研究和临床研究显示慢性炎症反应是胰岛素抵抗的发生和发展中的重要环节^[8],而抗炎治疗可以改善患者糖、脂代谢异常,提高胰岛素敏感性。目前 2 型糖尿病胰岛素抵抗所涉及到的主要炎症因子包括:(1)急性期反应蛋白,主要由肝细胞产生,如 C 反应蛋白(CRP)、血清淀粉样蛋白 A(SAA)等^[9];(2)细胞因子,如肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素-6 等^[10-13]。本实验以炎症因子 TNF- α 、CRP 为切入点,初步探寻仙鹤草的作用机制。

本研究结果显示,小剂量链脲佐菌素加高脂饮食诱导的 2 型糖尿病模型大鼠显示出高血糖血脂异常,高胰岛素血症以及胰岛素敏感性降低,血清炎症因子 TNF- α 、CRP 含量升高的特征,经高剂量的仙鹤草干预后,大鼠血糖降低,血清中胰岛素含量减少,血脂异常得以改善,并且胰岛素敏感性增加,血清炎症因子 TNF- α 、CRP 含量降低。而仙鹤草低剂量组虽然可降低血清中炎症因子 CRP 含量,但是对于血糖等异常变化的改善作用并没有显现出有统计学的治疗意义。根据实验结果推断仙鹤草可改善 2 型糖尿病模型大鼠胰岛素抵抗状态,从降糖调脂两个方面起到抗糖尿病的作用,并且推断抗炎作用是其作用机制,但尚需更进一步从炎症反应方面

对其作用机制进行具体研究,深层次的挖掘其分子作用机制。另外,本实验只是对仙鹤草粗提取物进行了研究,尚不明确仙鹤草抗 2 型糖尿病胰岛素抵抗作用的有效部位及活性成分,故对仙鹤草抗 2 型糖尿病胰岛素抵抗的作用机制进行多靶点的深层次研究的同时,筛选出作用的有效成分是日后研究的重点。

参 考 文 献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京:化学工业出版社,2005:67.
- [2] 洪阁,戴永红,刘培勋. 仙鹤草化学成分和药理作用研究进展[J]. 药学服务与研究,2008,8(5):362-366.
- [3] 张家庆. HOMA2-IR 是个较好的胰岛素抵抗指数[J]. 中华内分泌代谢杂志,2005,21(4):304-305.
- [4] 范尚坦,李金兰,姚振华. 仙鹤草降血糖的实验研究[J]. 福州总医院学报,2005,12(4/5):270-282.
- [5] 范尚坦,李金兰,杨忠东,等. 单味仙鹤草治疗糖尿病 1 例[J]. 福建中医药,2002,33(2):32.
- [6] 查彦红,谷卫. 糖尿病动物模型的研究进展[J]. 浙江医学,2007,29(12):1342-1345.
- [7] 司晓晨,尚文斌,卞慧敏,等. 链脲佐菌素加高脂膳食诱导 2 型糖尿病大鼠模型[J]. 安徽中医临床杂志,2003,15(5):383-385.
- [8] Yamaguchi K, Higashiura K, Ura N, et al. The effect of tumor necrosis factor alpha on tissue specificity and selectivity to insulin signaling[J]. Hypertens Res,2003,26(5):389-396.
- [9] Frank B. Hu, James B. Meigs, et al. Inflammatory Markers and Risk of Developing Type 2 Diabetes in Women[J]. Diabetes, 2004,53(3):693-700.
- [10] Liu Y, Jin JQ, Yuan ZF, et al. Levels of interleukin-6 and tumor necrosis factor- α in saliva of patients with type 2 diabetes mellitus and oral lichen planus[J]. Beijing Da Xue Xue Bao, 2011,43(4):596-599.
- [11] Sun WL, Chen LL, Zhang SZ, et al. Inflammatory cytokines, adiponectin, insulin resistance and metabolic control after periodontal intervention in patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis[J]. Intern Med, 2011,50(15):1569-74.
- [12] Takano M, Nishihara R, Sugano N, et al. The effect of systemic anti-tumor necrosis factor-alpha treatment on Porphyromonas gingivalis infection in type 2 diabetic mice[J]. Arch Oral Biol, 2010,55(5):379-384.
- [13] Rotter V, Nagaev I, Smith U. Interleukin-6 induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL28 and TNF-alpha overexpressed in human fat cells from insulin resistant subjects[J]. J Biol Chem, 2003,278(46):45777-45784.

(收稿日期:2013-04-04)

(本文编辑:黄凡)