

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00630

· 论 著 ·

## 通络方剂对1型糖尿病大鼠糖脂代谢的影响

岳欣欣,张宗静,阳秋良,刘志民\*

第二军医大学长征医院内分泌科,上海 200003

**[摘要]** **目的** 探讨通络方剂对1型糖尿病大鼠糖脂代谢的影响。**方法** 30只成年雄性SD大鼠随机分为正常对照组(NC)、糖尿病组(DM)、通络方剂治疗组(TLR),每组10只;后两组大鼠采用链脲佐菌素(STZ)60 mg/kg腹腔注射制备1型糖尿病模型。模型制备成功后,通络方剂组给予通络方剂( $1.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ )灌胃,糖尿病组、正常对照组给予同剂量双蒸水灌胃。8周后比较各组大鼠体质量、附睾周围脂肪组织质量、空腹血糖(FBG)、空腹胰岛素(FINS)及血总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、游离脂肪酸(FFA)、瘦素(leptin)水平,检测脂肪组织中瘦素 mRNA 表达水平。**结果** 与糖尿病组相比,通络方剂治疗组大鼠体质量增加( $P<0.01$ )、血 FBG 降低( $P<0.05$ )、FINS 升高( $P<0.01$ )、FFA 降低( $P<0.01$ )、血 leptin 水平增加( $P<0.05$ );脂肪组织 leptin mRNA 表达水平升高( $P<0.05$ )。**结论** 通络方剂可能通过改善糖尿病大鼠瘦素、胰岛素低水平状态纠正糖脂代谢紊乱。

**[关键词]** 通络方剂;糖尿病;葡萄糖;脂类;代谢;瘦素;胰岛素

**[中图分类号]** R 587.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)06-0630-03

### Effect of *Tongluo* recipe on leptin and insulin in rat model of type 1 diabetes mellitus

YUE Xin-xin, ZHANG Zong-jing, YANG Qiu-liang, LIU Zhi-min\*

Department of Endocrinology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

**[Abstract]** **Objective** To study the effect of *Tongluo* recipe on leptin and insulin in rat model of type 1 diabetes mellitus. **Methods** A total of 30 adult male SD rats were equally randomized into the following 3 groups: normal control group, diabetes mellitus group and *Tongluo* recipe group. SD rats were administered intraperitoneally with STZ(60 mg/kg) to induce the model of type 1 diabetes mellitus. The rats in *Tongluo* recipe group were administered intragastrically with *Tongluo* recipe( $1.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), and the other two groups were administered intragastrically with double distilled water in the same dosage. The body weight, white adipose tissue weight, fasting blood glucose, fasting insulin, total cholesterol, triglyceride, free fatty acid, and leptin levels were compared between each group 8 weeks later. The expression of leptin mRNA in white adipose tissue was examined. **Results** Compared with diabetes mellitus group, the body weight, fasting insulin, and leptin were significantly higher ( $P<0.05$  or  $0.01$ ) in the *Tongluo* recipe group, the levels of fasting blood glucose, total cholesterol, and free fatty acid were significantly lower ( $P<0.05$  or  $0.01$ ) in *Tongluo* recipe group, and the expression of leptin mRNA was significantly higher ( $P<0.05$ ) in the *Tongluo* recipe group. **Conclusion** *Tongluo* recipe may correct the disturbance in the lipid and glucose metabolism by improving the low leptin and insulin levels in diabetic rats.

**[Key words]** *Tongluo* recipe; diabetes mellitus; glucose; lipids; metabolism; leptin; insulin

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(6): 630-632]

糖尿病的患病率逐年增加,严重威胁人类生命健康<sup>[1-2]</sup>。伴随糖尿病病程的进展,机体内许多脂肪因子的分泌和表达也发生改变<sup>[3-4]</sup>。本研究主要通过观察通络方剂(*Tongluo* recipe, TLR)治疗前后糖尿病大鼠瘦素、胰岛素和糖脂代谢水平,探讨通络方剂的治疗效果及可能的作用机制。

### 1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器 链脲佐菌素(STZ)购自美国 Sigma 公司;TLR 由河北石家庄以岭药业有限公司提供;空腹血糖(FBG)测定采用罗氏公司优越型血糖仪;游离脂肪酸(FFA)、空腹胰岛素(FINS)、瘦

**[收稿日期]** 2011-03-11 **[接受日期]** 2011-06-06

**[基金项目]** 国家重点基础研究发展计划("973"计划,2005CB523304). Supported by National Program on Key Basic Research Projects("973" Program, 2005CB523304).

**[作者简介]** 岳欣欣,硕士生. E-mail: yue2xinxin@126.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81885371, E-mail: zmliu\_cz@hotmail.com

素(leptin)的检测采用ELISA法,ELISA试剂盒为美国RB公司产品;总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)的检测由南京建成生物制品研究所完成;TRIzol试剂及SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup>试剂盒购自大连TaKaRa公司;ReverTra Ace- $\alpha$ -反转录试剂盒采用日本Toyobo公司产品;KUBOTA 5420型台式高速离心机;Eppendorf Centrifuge 5417R型高速冷冻离心机;Eppendorf Realplex<sup>2</sup>荧光定量PCR仪;Eppendorf Biophotometer核酸蛋白检测仪。

1.2 动物分组及模型制备 雄性成年SD大鼠30只,体质量180~200 g,购自中国科学院上海实验动物中心。大鼠适应性饲养5 d,禁食18 h后随机分组。采用STZ(溶于pH 4.5,0.1 mol/L的柠檬酸缓冲液)60 mg/kg腹腔注射;正常对照组10只,给予同剂量的柠檬酸缓冲液(pH 4.5,0.1 mol/L)腹腔注射。糖尿病组大鼠于注射STZ 72 h后测尾静脉血糖,以血糖高于16.7 mmol/L确定为糖尿病模型制备成功。成模的糖尿病大鼠再随机分为糖尿病组和通络方剂治疗组,每组各10只。通络方剂治疗组每天给予通络方剂(1.0 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)灌胃,余两组给予同剂量双蒸水灌胃。3组大鼠在相同环境下饲养,持续8周后处死。

1.3 血液指标的检测 大鼠禁食过夜后尾静脉采血测空腹血糖(FBG),称质量后腹腔注射10%水合氯醛0.3 ml/100 g进行麻醉,腹主动脉取血,静置离心留取血清,检测总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、游离脂肪酸(FFA)、空腹胰岛素(FINS)、瘦素(leptin)。

1.4 Real-time PCR测定脂肪组织leptin mRNA表达 留取雄性大鼠附睾周围脂肪组织,称质量后液氮速冻,-80℃冰箱保存;按照TRIzol说明书提取大鼠附睾周围脂肪组织总mRNA,按照ReverTra Ace- $\alpha$ -反转录试剂盒说明书将提取的mRNA反转录成cDNA;目的基因及内参基因的引物合成由上海生工生物工程技术有限公司完成。引物序列,leptin:正义为5'-CCT ATG TTC AAG CTG TGC CT-3',反义为5'-ATA CCG ACT GCG TGT GTG AA-3',T<sub>m</sub> 51℃,长度105 bp;GAPDH:正义为5'-ACT GCC ACC CAG AAG ACT-3',反义为5'-GCT CAG TGT AGC CCA GGA T-3',T<sub>m</sub> 55℃,长度292 bp。按照引物合成订单配制引物,选取熔解曲线呈高尖单峰的温度值为最适温度;取最适温度按照SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup>试剂盒说明书进行Real-time PCR检测脂肪组织瘦素(leptin) mRNA表达水平。

1.5 统计学处理 采用SPSS 18.0统计软件包进行数据分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK检验,检

验水平( $\alpha$ )为0.05。

## 2 结果

2.1 大鼠一般情况 大鼠在腹腔注射STZ后,出现明显的多饮、多食、多尿及消瘦等糖尿病代谢紊乱症状,体毛杂乱,反应迟钝,活动减少;通络方剂治疗组大鼠一般状态较糖尿病组有所改善;纳入的30只大鼠均进入结果分析。结果(表1)表明:与正常对照组大鼠相比,其他两组大鼠体质量均显著降低( $P < 0.01$ ),通络方剂治疗组与糖尿病组大鼠相比体质量显著升高( $P < 0.01$ );与正常对照组大鼠相比,其他两组大鼠附睾周围脂肪组织质量均显著降低( $P < 0.01$ ),通络方剂治疗组与糖尿病组大鼠差异无统计学意义。

2.2 血清学指标检测结果 结果(表1)表明:与正常对照组相比,其他两组大鼠空腹血糖水平均升高( $P < 0.01$ ),通络方剂治疗组与糖尿病组大鼠相比空腹血糖水平降低( $P < 0.05$ );与正常对照组相比,其他两组大鼠空腹胰岛素水平均降低( $P < 0.05$ ),通络方剂治疗组与糖尿病组大鼠相比空腹胰岛素水平升高( $P < 0.01$ );与正常对照组相比,其他两组大鼠三酰甘油水平显著升高( $P < 0.01$ ),通络方剂治疗组与糖尿病组大鼠相比有所降低,但差异无统计学意义;与正常对照组相比,糖尿病组大鼠游离脂肪酸升高( $P < 0.01$ ),通络方剂组大鼠游离脂肪酸升高( $P < 0.05$ ),通络方剂组与糖尿病组大鼠相比游离脂肪酸降低( $P < 0.01$ )。与正常对照组相比,糖尿病组大鼠瘦素水平降低( $P < 0.01$ ),通络方剂组大鼠瘦素水平降低,但差异无统计学意义,通络方剂组与糖尿病组大鼠相比瘦素水平升高( $P < 0.05$ )。

2.3 大鼠附睾周围脂肪组织leptin mRNA的表达 结果(图1)表明:与正常对照组相比,糖尿病大鼠脂肪组织中leptin mRNA水平降低( $P < 0.01$ ),通络方剂组大鼠脂肪组织leptin mRNA水平降低,但差异无统计学意义;与糖尿病组相比,通络方剂组大鼠脂肪组织中leptin mRNA水平升高( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

脂肪组织不仅是供能和储脂器官,更是重要的内分泌器官,它可以分泌多种脂肪因子,如瘦素、脂联素、TNF- $\alpha$ 等,通过自分泌、旁分泌、内分泌等途径参与机体的代谢,且这些脂肪因子中许多都与糖尿病密切相关<sup>[5]</sup>。瘦素与机体多种代谢途径密切相关,且具有广泛的生物学效应。瘦素可参与胰岛素的分泌调节,通过脂肪-胰岛内分泌轴,在脂肪组织和胰岛B细胞间形成瘦素和胰岛素的双向反馈调

节,正常生理状态下,胰岛素作用于脂肪组织调节瘦素,瘦素又作用于下丘脑和胰腺来调节胰岛素,两者保持动态平衡<sup>[6-7]</sup>。瘦素作为动物体内代谢水平和

脂肪沉积量的信号,当体内脂肪含量上升时,瘦素可通过下丘脑调节摄食量,也可作用于脂肪组织而增强脂肪代谢,促进三酰甘油分解,脂肪酸氧化<sup>[8]</sup>。

表 1 各组大鼠一般情况及血清指标检测结果

Tab 1 Measurements and serum parameters in each group

(n=10,  $\bar{x}\pm s$ )

Group	Body weight m/g	WAT weight m/g	FBG $c_B/(mmol \cdot L^{-1})$	FINS $z_B/(mU \cdot L^{-1})$
NC	482.86±22.15	7.88±0.48	4.80±1.67	20.63±2.62
DM	200.71±42.86**	0.48±0.18**	25.02±3.09**	12.03±2.16**
TLR	279.29±39.42** $\Delta\Delta$	0.80±0.13**	20.29±4.39** $\Delta$	17.21±2.03** $\Delta\Delta$
Group	TC $c_B/(mmol \cdot L^{-1})$	TG $c_B/(mmol \cdot L^{-1})$	FFA $c_B/(\mu mol \cdot L^{-1})$	Leptin $\rho_B/(\mu g \cdot L^{-1})$
NC	1.54±0.43	0.34±0.11	92.22±16.44	1.65±0.32
DM	1.54±0.33	0.91±0.21**	182.39±35.69**	1.05±0.32**
TLR	1.32±0.25	0.77±0.27**	133.47±36.12** $\Delta\Delta$	1.49±0.27 $\Delta$

NC: Normal control group; DM: Diabetic untreated group; TLR: *Tongluo* recipe treated group. \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$  vs NC group;  $\Delta P<0.05$ ,  $\Delta\Delta P<0.01$  vs DM group

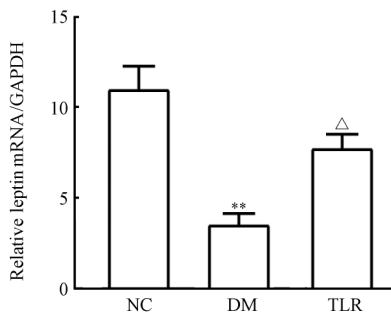


图 1 脂肪组织 leptin mRNA 的表达

Fig 1 Leptin mRNA expression in white adipose tissue

NC: Normal control group; DM: Diabetic untreated group; TLR: *Tongluo* recipe treated group. \*\*  $P<0.01$  vs NC group;  $\Delta P<0.05$  vs DM group; n=6,  $\bar{x}\pm s$

糖尿病属于中医“消渴病”范畴。其病理基础为阴虚燥热,在此基础上出现气虚、血瘀等症候,导致脾肺肾功能失职,出现糖脂代谢紊乱。TLR的主要成分是人参、水蛭、全蝎、土鳖虫、蜈蚣、赤芍等药物,具有改善糖尿病及其并发症的作用<sup>[9-11]</sup>。STZ制备的1型糖尿病大鼠模型胰岛被破坏,胰岛素分泌不足,瘦素对胰岛素的负反馈调节被阻断,从而使血清瘦素处于低水平状态,与之前报道一致<sup>[12]</sup>。同时由于胰岛素分泌不足,脂肪组织摄取葡萄糖及从血中移出三酰甘油减少,脂肪合成减少,脂蛋白酯酶活性低下,所以血三酰甘油和游离脂肪酸浓度升高,引起糖尿病脂代谢紊乱<sup>[13]</sup>。

综上所述,本研究结果显示通络方剂治疗后糖尿病大鼠瘦素和胰岛素水平升高,FBG、TG及FFA水平降低,糖脂代谢紊乱得到改善。这提示通络方剂改善糖尿病糖脂代谢紊乱可能与其升高瘦素和胰岛素水平有关。

[参考文献]

- [1] Kaufman N. Internet and information technology use in treatment of diabetes[J]. Int J Clin Pract Suppl, 2010, 64(S166): 41-46.
- [2] Otto-Buczowska E, Jarosz-Chobot P, Tucholski K. New developments in the treatment and monitoring of type 1 diabetes mellitus[J]. Endokrynol Pol, 2008, 59: 246-253.
- [3] Gautron L, Elmquist J K. Sixteen years and counting: an update on leptin in energy balance[J]. J Clin Invest, 2011, 121: 2087-2093.
- [4] Morton G J, Schwartz M W. Leptin and the central nervous system control of glucose metabolism[J]. Physiol Rev, 2011, 91: 389-411.
- [5] Karastergiou K, Mohamed-Ali V. The autocrine and paracrine roles of adipokines[J]. Mol Cell Endocrinol, 2010, 318(1-2): 69-78.
- [6] Howard J K, Flier J S. Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins[J]. Trends Endocrinol Metab, 2006, 17: 365-371.
- [7] Lee M J, Fried S K. Multilevel regulation of leptin storage, turnover, and secretion by feeding and insulin in rat adipose tissue [J]. J Lipid Res, 2006, 47: 1984-1993.
- [8] Friedman J M, Halaas J L. Leptin and the regulation of body weight in mammals[J]. Nature, 1998, 395: 763-770.
- [9] 孙亮亮, 邹俊杰, 石勇铨, 刘岩, 李文桐, 刘明, 等. 通络方剂对1型糖尿病大鼠模型肾脏保护作用的形态学研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2008, 17: 3419-3429.
- [10] 王贵平, 周晖, 赵瑛, 刘志民. 通络方剂对糖尿病周围神经病大鼠模型的神经电生理及病理变化的影响[J]. 临床神经电生理学杂志, 2009, 18: 3-8.
- [11] 沈婕, 夏新新, 邹俊杰, 石勇铨, 刘志民. 通络方剂治疗糖尿病性肝损伤的疗效及其可能机制[J]. 第二军医大学学报, 2010, 31: 499-503.
- [12] Shen J, Xia X X, Zou J J, Shi Y Q, Liu Z M. *Tongluo* recipe on hepatic injury in streptozotocin induced diabetic rats and its possible mechanism[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31: 499-503.
- [13] 侯淑峰, 张毅奎, 蔡航. 洋参御唐丸对STZ-DM大鼠血糖、瘦素、胰岛素影响的实验研究[J]. 中华临床医学研究杂志, 2007, 13: 430-431.
- [13] 叶任高. 内科学[M]. 5版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 798-805.

[本文编辑] 贾泽军