

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00385

津力达颗粒对糖尿病大鼠胰岛 B 细胞的保护作用

史婧丽, 吴莹, 宋玉萍, 韩冲, 刘志民*

第二军医大学长征医院内分泌科, 上海 200003

[摘要] **目的** 探讨津力达颗粒对糖尿病大鼠胰岛 B 细胞的保护作用。**方法** 采用高脂饮食, 链脲佐菌素腹腔一次性注射诱发 SD 大鼠糖尿病模型, 随机分为模型组、津力达药物(0.75、1.5、3.0 g/kg)组、 α -硫辛酸组、胰岛素组、二甲双胍组。根据分组分别给予不同的药物, 胰岛素组采用皮下注射, 其余药物均灌胃给药。给药 2 个月后测定体质量, 空腹血糖(FBG)、胰岛素(FINS)、糖化血红蛋白(HbA_{1c})水平, 超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)活性, 白介素(IL)-1 β 、TNF- α 和丙二醛(MDA)含量, 并取胰尾组织行胰岛素免疫组化染色观察。**结果** 与模型组相比, 其他各组 FBG、HbA_{1c}等均降低($P < 0.05$, $P < 0.01$); 津力达高剂量(3.0 g/kg)组 SOD、GSH 活性升高($P < 0.01$), IL-1 β 、TNF- α 、MDA 含量降低($P < 0.01$), 胰岛素免疫阳性染色的面积增加。**结论** 津力达颗粒对受损的糖尿病大鼠胰岛 B 细胞具有保护作用。

[关键词] 津力达颗粒; 糖尿病; 胰岛素分泌细胞; 氧化性应激**[中图分类号]** R 587.1**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2012)04-0385-05

Protective effect of *Jinlida* granules on islet β cells in diabetes mellitus rats

SHI Jing-li, WU Ying, SONG Yu-ping, HAN Chong, LIU Zhi-min*

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

[Abstract] **Objective** To investigate the protective effect of *Jinlida* granules on islet β cells in diabetes mellitus rats. **Methods** Diabetic models were induced by high-fat diet and intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) in SD rats. The study was divided into model group, *Jinlida* granule group (0.75, 1.5, 3.0 g/kg), α -lipoic acid group, insulin group, and metformin group. Each group was given corresponding drugs, with insulin given by subcutaneous injection and other drugs given by intragastric administration. The body weight, fasting blood glucose (FBG), fasting insulin (FINS), glycosylated hemoglobin (HbA_{1c}), the activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH), and the contents of malondialdehyde (MDA), IL-1 β and TNF- α were examined 2 months later. The pancreatic tissues were immunostained for insulin. **Results** Compared with the model group, the levels of FBG and HbA_{1c} were decreased in other groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The activities of SOD and GSH were significantly increased ($P < 0.01$) and the levels of MDA, IL-1 β and TNF- α were significantly decreased ($P < 0.01$) in high-dose (3.0 g/kg) *Jinlida* granule group, with increased islet area as shown by pathological staining. **Conclusion** *Jinlida* granule has protective effect against STZ-induced islet β cell injury in diabetic rats.

[Key words] *Jinlida* granule; diabetes mellitus; islet β cells; oxidative stress

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(4): 385-389]

糖尿病属中医“消渴病”范畴, 对于糖尿病的病因而, 目前中医一致认为显示先天禀赋不足(元气虚), 这是决定能否发病的关键因素, 外因有饮食不节、劳倦内伤、情志失调等。中医治疗糖尿病的方法是多途径、多环节的, 各种治疗糖尿病的中医中药不仅能够降低血糖, 对全身症状也有综合性的疗效。津力达颗粒是以人参、黄精、苍术(炒)、苦参、麦冬、地黄、

制何首乌、山茱萸、茯苓、佩兰、黄连、知母、淫羊藿(炙)丹参为成分, 主要功用为益气养阴、健脾运津, 用于气阴两虚证, 具有治疗消渴之功效^[1]。本研究旨在观察不同剂量津力达颗粒对 2 型糖尿病大鼠的降糖作用及对胰岛 B 细胞的保护作用, 为津力达的临床治疗提供实验依据。

[收稿日期] 2012-01-17 **[接受日期]** 2012-03-22**[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 (“973” Projects, 2005CB523304).**[作者简介]** 史婧丽, 硕士生. E-mail: wushuisanqincao@126.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81885377, E-mail: zmliu-cz@hotmail.com

1 材料和方法

1.1 动物 雄性SD大鼠,SPF级,35日龄,体质量150~160 g,由第二军医大学实验动物中心提供,环境温度为20~25℃,湿度为56%,自由饮水,12 h/12 h昼夜规律,喂食时间为每日下午5点至次日上午8点。饲养笼具、垫料、饲料、饮水均按SPF级实验动物的要求进行制备与消毒。大鼠适应性饲养2 d后,禁食不禁水12 h,取血测血糖等指标,并称体质量,作为基础值。

1.2 药品与试剂 津力达颗粒(河北以岭药业集团有限公司);诺和灵N(诺和诺德制药有限公司); α -硫辛酸(美国Sigma公司);二甲双胍(中美上海施贵宝有限公司);链脲佐菌素(streptozotocin, STZ;美国Sigma公司);羟甲基纤维素钠、柠檬酸及柠檬酸钠均购于Sigma公司;抗胰岛素抗体(Abcam公司,货号:ab6995);超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒(批号:20110905,南京建成生物工程研究所);丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒(批号:20110905,南京建成生物工程研究所);谷胱甘肽(GSH)试剂盒(批号:20110905,南京建成生物工程研究所);IL-1 β 、TNF- α 试剂盒(批号:201110,美国RB公司);胰岛素放射免疫分析测定试剂盒(批号:201110,南京建成生物工程研究所);2%戊巴比妥钠溶液(上海西唐生物科技有限公司);10%甲醛溶液、2.5%戊二醛溶液(国药集团化学试剂有限公司);高脂饲料(胆固醇2.5%、胆酸钠0.2%、猪油5%、蔗糖5%;中国科学院上海分院);普通饲料(第二军医大学实验动物中心)。

1.3 造模与分组 将100只SPF级SD大鼠以普通饲料适应性喂养1周后,随机取出10只作为正常对照组,全程以普通饲料喂养,其余大鼠改为高脂饲料喂养4周后,禁食不禁水12 h,测大鼠体质量,并除正常对照组外按30 mg/kg剂量一次性腹腔注射STZ(0.1 mmol/L柠檬酸盐缓冲液配制,pH 4.2~4.5,现用现配,30 min内注射完毕)。以血糖>16.7 mmol/L确定为造模成功,3 d后尾尖采血验证模型是否成功,不成功者再次注射10~20 mg/kg STZ。成模率为90%。随机分为模型组、津力达低剂量组、津力达中剂量组、津力达高剂量组、 α -硫辛酸组、胰岛素组、二甲双胍组,每组10只大鼠。

1.4 给药方法 津力达颗粒低、中、高剂量分别为0.75、1.5、3.0 g/kg, α -硫辛酸用量为50 mg/kg,胰

岛素(诺和灵N)用量为1.5 U/kg,二甲双胍剂量为50 mg/kg。除胰岛素采用皮下注射外,其他药物均用0.5%羟甲基纤维素钠溶解均匀后灌胃给药。正常对照组与模型组均用同等体积的羟甲基纤维素钠灌胃。每日给药1次,连续处理2个月。

1.5 标本采集与指标观察

1.5.1 血清学检查 用药2个月后,禁食12 h后称体质量,2%戊巴比妥钠2 ml/kg腹腔注射进行麻醉,腹主动脉采血,分离血清检测胰岛素(FINS)、血糖(FBG)及糖化血红蛋白(HbA_{1c})。

1.5.2 胰腺组织SOD、GSH活性和MDA、IL-1 β 、TNF- α 含量的测定 麻醉后切开腹腔并迅速取出胰腺,于胰尾处取小块组织,滤纸吸干,剪碎后置于匀浆器中,按照各试剂盒说明书的要求进行检测。

1.5.3 胰腺组织H-E染色和免疫组化染色 取出的胰腺组织置于10%甲醛中固定,常规脱水、包埋、切片、染色,切片厚4 μ m,H-E染色观察胰岛的形态。胰腺免疫组化染色滴加抗小鼠胰岛素单抗(工作浓度1:200),滴加生物素化二抗,DAB显色,镜下掌握显色程度,棕色时终止显色。蒸馏水洗,苏木红复染2 min,盐酸乙醇分化,脱水、透明、封片、镜检。

1.6 统计学处理 所有数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用SPSS 19.0统计软件进行分析,多组间比较采用单因素方差分析。检验水平(α)为0.05。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况 正常对照组大鼠一般情况良好,精神状态佳,活动自如,毛发光泽,饮食及大小便正常,无死亡;模型组大鼠一般情况较差,精神状态不佳,行动迟缓,毛发杂乱无光,出现多饮、多食现象。各药物组此种情况均有不同程度的改善。

2.2 各组大鼠体质量及血清FINS、FBG、HbA_{1c}的变化 结果见表1。模型组体质量与正常对照组相比降低,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组相比,津力达高剂量组、胰岛素组、二甲双胍组体质量均升高,差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。与正常对照组相比,模型组FBG、HbA_{1c}、FINS均升高,差异有统计学意义($P<0.01$)。与模型组相比,津力达中剂量组、津力达高剂量组、 α -硫辛酸组、胰岛素组、二甲双胍组HbA_{1c}水平均降低,差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组相比,津力达高剂量、 α -硫辛酸组、胰岛素组、二甲双胍组FBG、FINS水平均降低,差异有统计学意义($P<0.01$, $P<0.05$)。

表 1 各组大鼠体质量、FBG、HbA_{1c} 和 FINS 的变化Tab 1 Changes of body mass, FBG, HbA_{1c} and FINS in rats of each groupn=10, $\bar{x} \pm s$

Group	BM m/g	FBG c _B /(mmol · L ⁻¹)	HbA _{1c} c _B /(nmol · L ⁻¹)	FINS z _B /(mU · L ⁻¹)
Control	470.14 ± 33.30	6.06 ± 0.33	366.11 ± 36.59	2.49 ± 0.20
Model	346.11 ± 52.98**	29.39 ± 8.25**	845.97 ± 35.71**	7.75 ± 0.45**
JLD 0.75 g · kg ⁻¹	395.77 ± 67.41	25.29 ± 8.21	824.14 ± 38.21	7.44 ± 0.26
JLD 1.5 g · kg ⁻¹	378.77 ± 81.59	23.85 ± 7.40	804.72 ± 30.36 [△]	7.48 ± 0.44
JLD 3.0 g · kg ⁻¹	414.00 ± 55.09 [△]	12.21 ± 6.83 ^{△△}	774.38 ± 30.03 ^{△△}	7.10 ± 0.56 ^{△△}
ALA 50 mg · kg ⁻¹	319.65 ± 56.81	22.80 ± 7.95 [△]	722.10 ± 49.57 ^{△△}	5.44 ± 0.41 ^{△△}
INS 1.5 U · kg ⁻¹	427.14 ± 83.86 ^{△△}	10.54 ± 8.38 ^{△△}	714.73 ± 42.19 ^{△△}	4.59 ± 0.40 ^{△△}
MET 50 mg · kg ⁻¹	433.55 ± 75.11 ^{△△}	9.30 ± 7.32 ^{△△}	719.94 ± 46.12 ^{△△}	5.89 ± 0.28 ^{△△}

BM: Body mass; FBG: Fasting blood glucose; HbA_{1c}: Glycosylated hemoglobin; FINS: Fasting insulin; JLD: *Jinlida* granule; ALA: α -lipoic acid; INS: Insulin; MET: Metformin. ** $P < 0.01$ vs control group; [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$ vs model group

2.3 各组大鼠胰腺组织 SOD、GSH 活性和 MDA、IL-1 β 、TNF- α 含量的变化 与正常对照组相比,模型组 SOD、GSH 活性降低,IL-1 β 、TNF- α 、MDA 含量升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组相比,津力达高剂量组、 α -硫辛酸组、胰岛素组、二甲双

胍组 SOD、GSH 活性升高,IL-1 β 、TNF- α 、MDA 含量降低,差异有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.05$)。津力达中剂量组的 GSH 活性和 IL-1 β 、MDA 含量与模型组比较,差异也有统计学意义($P < 0.01$)。详见表 2。

表 2 各组大鼠胰腺组织 SOD、GSH 活性和 MDA、IL-1 β 、TNF- α 含量的变化Tab 2 Changes of SOD, GSH activities and IL-1 β , TNF- α , and MDA contents in rats of each groupn=10, $\bar{x} \pm s$

Group	SOD (U · g ⁻¹)	GSH (mg · g ⁻¹)	IL-1 β ρ_B /(ng · L ⁻¹)	TNF- α ρ_B /(ng · L ⁻¹)	MDA m _B /(nmol · mg ⁻¹)
Control	11.86 ± 0.92	3.43 ± 0.37	4.86 ± 0.62	29.84 ± 1.95	0.15 ± 0.02
Model	3.55 ± 0.70**	1.32 ± 0.18**	12.86 ± 0.62**	93.79 ± 6.03**	1.13 ± 0.09**
JLD 0.75 g · kg ⁻¹	3.83 ± 0.57	1.48 ± 0.14	12.41 ± 0.46	93.23 ± 5.27	1.07 ± 0.10
JLD 1.5 g · kg ⁻¹	4.04 ± 0.63	1.65 ± 0.20 ^{△△}	11.98 ± 0.31 ^{△△}	92.62 ± 5.14	1.02 ± 0.18 ^{△△}
JLD 3.0 g · kg ⁻¹	5.00 ± 1.12 ^{△△}	2.00 ± 0.24 ^{△△}	10.84 ± 0.34 ^{△△}	88.07 ± 2.38 [△]	0.90 ± 0.07 ^{△△}
ALA 50 mg · kg ⁻¹	6.33 ± 0.89 ^{△△}	2.16 ± 0.24 ^{△△}	9.76 ± 0.57 ^{△△}	81.36 ± 5.13 ^{△△}	0.82 ± 0.10 ^{△△}
INS 1.5 U · kg ⁻¹	7.94 ± 0.69 ^{△△}	2.51 ± 0.31 ^{△△}	8.67 ± 0.69 ^{△△}	68.57 ± 5.98 ^{△△}	0.73 ± 0.07 ^{△△}
MET 50 mg · kg ⁻¹	6.47 ± 0.55 ^{△△}	2.14 ± 0.28 ^{△△}	9.73 ± 0.78 ^{△△}	79.49 ± 6.67 ^{△△}	0.83 ± 0.09 ^{△△}

SOD: Superoxide dismutase; GSH: Glutathione; MDA: Malondialdehyde; JLD: *Jinlida* granule; ALA: α -lipoic acid; INS: Insulin; MET: Metformin. ** $P < 0.01$ vs control group; [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$ vs model group

2.4 各组大鼠胰腺组织形态学变化 正常组大鼠胰腺组织镜下胰岛丰富,团索状,呈圆形或类圆形,胞质丰富,形态完整,胞核居中,细胞界限清晰。模型组大鼠胰岛数量少,形态不规则,分布零散,边缘不齐,界限不清,细胞体积增大,胞核偏心分布。津力达高剂量组、胰岛素组、二甲双胍组较模型组有较明显改善。详见图 1。

2.5 各组大鼠胰腺组织胰岛素免疫组化染色结果 胰岛素免疫组化阳性染色细胞为棕色颗粒细胞。与正常组相比,模型组胰岛素表达量明显减少,各治疗组较模型组有不同程度的改善。详见图 2。

3 讨论

随着生活水平的提高,糖尿病的发病率呈逐年上升趋势,在发展中国家,这种现象尤为突出。已知 2 型糖尿病发生发展的主要病理生理学特征是胰岛 B 细胞功能受损和胰岛素抵抗^[2],胰岛素抵抗是 2 型糖尿病发病过程中的始动因素,越来越多的证据表明,B 细胞功能受损是 2 型糖尿病的决定因素^[3]。糖尿病患者体内的高血糖状态可导致细胞内自由基生成过多,从而引发氧化应激反应,活化一系列应激信号途径而导致组织器官损伤^[4-6]。大量的活性氧(ROS)可以通过多种途径损害胰岛 B 细胞:氧化应

激可减少 PDX-1 mRNA 的表达,进而减少胰岛素 mRNA 的表达,影响胰岛素的合成和释放^[7];ROS 还可以促进炎性细胞因子释放、加重炎症反应,同时炎性细胞因子如 IL-8、TNF- α 和 IFN- γ 等可诱导体外培养的胰岛 B 细胞分泌 ROS 等反过来可以提高 B 细胞对自由基的敏感性,刺激炎性细胞及 B 细胞

产生更多的自由基,从而造成恶性循环^[8]。另外, Piro 等^[9]研究发现 ROS 能诱导胰岛 B 细胞的凋亡,引起胰岛 B 细胞崩解。因此采取积极措施改善体内氧化应激状态,保护胰岛 B 细胞的功能,对延缓 2 型糖尿病的进展具有非常重要的意义。

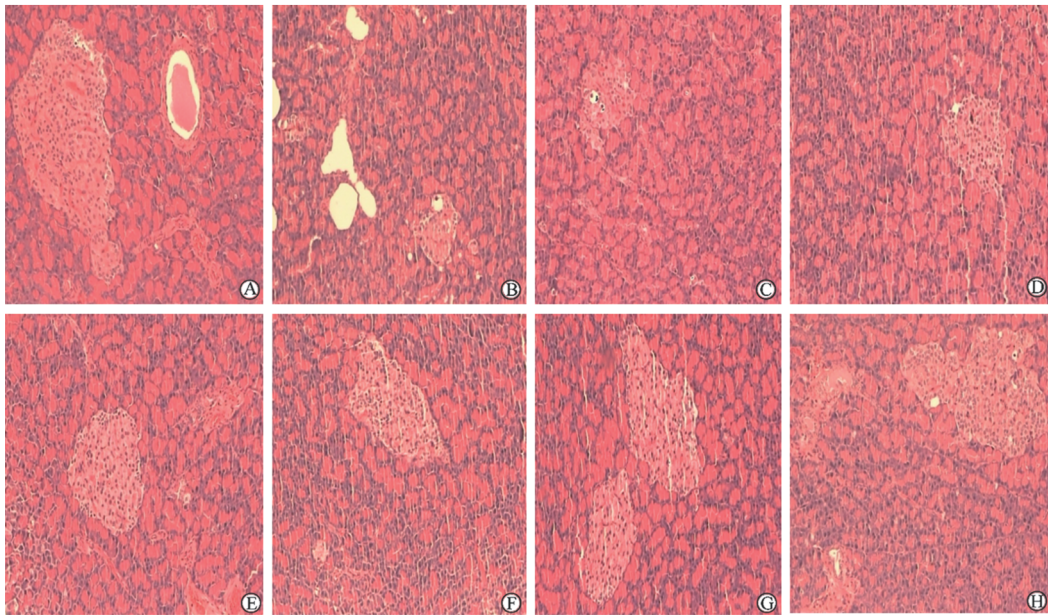


图 1 各组大鼠胰腺组织 H-E 染色结果

Fig 1 H-E staining of pancreatic tissues in rats of each group

A: Control group; B: Model group; C-E: *Jinlida* granule 0.75, 1.5, 3.0 g/kg group, respectively; F: α -lipoic acid group; G: Insulin group; H: Metformin group. Original magnification: $\times 400$

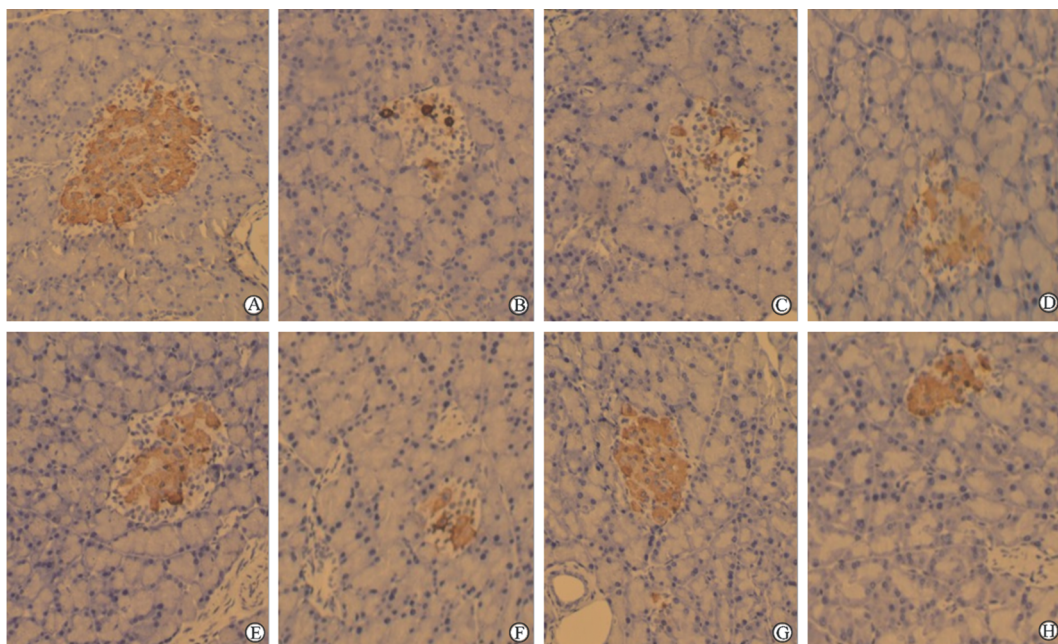


图 2 各组大鼠胰腺组织胰岛素免疫组化染色结果

Fig 2 Immunohistochemical staining for insulin in rat pancreatic tissues of each group

A: Control group; B: Model group; C-E: *Jinlida* granule 0.75, 1.5, 3.0 g/kg group, respectively; F: α -lipoic acid group; G: Insulin group; H: Metformin group. Original magnification: $\times 400$

中医理论认为,脾的运化功能失调与糖尿病的发生发展密切相关,中医传统认识中的脾包括了现代解剖学中的脾和胰在内,中医脾的运化功能与现代医学胰的分泌功能有着密切关系。胰腺分泌胰岛素的相对不足或绝对不足是引起消渴病(糖尿病)的基本病理生理改变。“健脾运津”的治疗法则认为,脾气健运才能将通过饮食进入体内的葡萄糖化生精气,输布到全身各个脏腑组织,使葡萄糖充分利用,其作用并不是单纯降糖,而是协调脏腑机能。津力达颗粒以健脾助运,益气养阴为主要治疗原则,辨证与辨病相结合,标本兼治,旨在通过恢复脾输水谷津液的正常功能,纠正饮食水谷津液在输布利用及代谢过程中的不平衡状态,以达标本兼治的目的。津力达颗粒选用人参益气健脾运津,黄精、苦参、苍术清热滋阴,燥湿健脾,佩兰、麦冬、知母、丹参化湿醒脾,养阴畅脉,葛根、荔枝核引津上升,调畅气机。已有研究发现津力达颗粒能够恢复胰岛B细胞功能,增强胰岛素分泌,改善胰岛素抵抗^[10],降低血糖,调整血脂代谢,多角度干预糖尿病及并发症^[11]。本实验也发现,津力达颗粒能够降低糖尿病大鼠空腹血糖、糖化血红蛋白水平,改善胰岛素抵抗,与上述研究结果一致。

本实验通过检测MDA、SOD、GSH等指标来反映糖尿病大鼠胰腺内氧化应激及抗氧化的状态,结果发现模型组MDA升高,SOD、GSH降低,而津力达中、高剂量组用药后MDA下降,高剂量组的SOD以及GSH也有升高。这表明津力达颗粒能够提升机体抗氧化水平,减轻氧化应激反应,间接表明津力达颗粒对胰岛B细胞具有保护作用。本实验还通过检测TNF- α 和IL-1 β 来反映大鼠炎症反应的水平。TNF- α 主要来源于单核-巨噬细胞,是重要的炎症因子,它可出现在炎症早期参与组织病理损伤并可以促进IL-1 β 的产生。IL-1 β 能够刺激集落刺激因子、血小板生长因子等,在免疫应答中和组织修复中发挥作用。本实验检测结果显示模型组TNF- α 和IL-1 β 的含量上升,而在津力达高剂量组用药后均有下降。这表明津力达用药后炎症反应也随之减轻。胰腺H-E染色及免疫组化结果也均提示,津力达高剂量组对大鼠胰岛B细胞损伤有良好的修复作用。

综上所述,津力达颗粒能够降低空腹血糖、糖化血红蛋白,改善胰岛素抵抗,减轻炎症反应,提升抗氧化作用,保护胰岛B细胞功能。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 马利成,魏淑景,朱旅云,李新芳,王广宇. 津力达口服液治疗2型糖尿病40例临床观察[J]. 河北中医,2001,23:8-10.
- [2] Barillari G, Fabbro E, Pasca S, Bigotto E. Coagulation and oxidative stress plasmatic levels in a type 2 diabetes population [J]. Blood Coagul Fibrinolysis, 2009, 20: 290-296.
- [3] Guillausseau P J, Meas T, Virally M, Laloi-Michelin M, Médeau V, Kevoorkian J P. Abnormalities in insulin secretion in type 2 diabetes mellitus [J]. Diabetes Metab, 2008, 34 (Suppl 2): S43-S48.
- [4] Du Y, Miller C M, Kern T S. Hyperglycemia increases mitochondrial superoxide in retina and retinal cells [J]. Free Radic Biol Med, 2003, 35: 1491-1499.
- [5] Forbes J M, Coughlan M T, Cooper M E. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes [J]. Diabetes, 2008, 57: 1446-1454.
- [6] Shen G X. Oxidative stress and diabetic cardiovascular disorders: roles of mitochondria and NADPH oxidase [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2010, 88: 241-248.
- [7] Harmon J S, Stein R, Robertson R P. Oxidative stress-mediated, post-translational loss of MafA protein as a contributing mechanism to loss of insulin gene expression in glucotoxic beta cells [J]. J Biol Chem, 2005, 280: 11107-11113.
- [8] Chang Y C, Chuang L M. The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes: from molecular mechanism to clinical implication [J]. Am J Transl Res, 2010, 2: 316-331.
- [9] Piro S, Anello M, Di Pietro C, Lizzio M N, Patanè G, Rabuazzo A M, et al. Chronic exposure to free fatty acids or high glucose induces apoptosis in rat pancreatic islets: possible role of oxidative stress [J]. Metabolism, 2002, 51: 1340-1347.
- [10] 高怀林, 张建军, 吴以岭, 丁来标, 曹月香, 王 猛, 等. 津力达颗粒对2型糖尿病胰岛 β 细胞功能的影响 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21: 1119-1120.
- [11] 徐祖传, 刘如善, 冉玲玲. 津力达3号治疗糖尿病肾病临床观察 [J]. 中医药临床杂志, 2007, 19: 435-437.

[本文编辑] 孙 岩