

连梅颗粒对糖尿病大鼠腹部脂肪组织中 NF- κ B 及 IKK β 蛋白表达的影响[※]

● 米佳^{*} 王秀阁 陈曦 王国强 朱浩宇 朴春丽[▲]

摘要 目的:观察连梅颗粒对自发性糖尿病大鼠腹部脂肪组织中 NF- κ B 及 IKK β 蛋白表达的影响。方法:将高脂饲料喂养的雄性 SPF 级 ZDF (Zucker Diabetic Fatty rat) 大鼠随机分为模型组、连梅颗粒组、吡格列酮组,普通饲料喂养的雄性 SPF 级 ZL (Zucker Lean) 大鼠为正常对照组,每组各 10 只。连梅颗粒组按照 $5.1\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃给药,吡格列酮组按照 $1.07\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃给药,连续给药 12 周。经 Western blot 法检测各组大鼠腹部脂肪组织中 NF- κ B、IKK β 蛋白的表达水平。结果:在治疗第 12 周末,模型组、吡格列酮组、连梅颗粒组大鼠腹腔脂肪组织中 NF- κ B、IKK β 蛋白的表达明显高于正常对照组 ($P < 0.01$)。连梅颗粒组和吡格列酮组与模型组相比均明显降低 ($P < 0.01, P < 0.05$),且连梅颗粒组优于吡格列酮组 ($P < 0.05$)。结论:连梅颗粒组在一定程度上能抑制糖尿病大鼠腹部脂肪组织中 NF- κ B 及 IKK β 蛋白的表达。

关键词 连梅颗粒 ZDF 大鼠 NF- κ B IKK β 糖尿病

糖尿病是一种由多种原因引起的糖、脂肪、蛋白质代谢紊乱综合征^[1]。在我国成人糖尿病人数已超过 9200 万,并且糖尿病前期患者约有 1.48 亿^[2]。根据预测到 2025 年患病率将达到 5.4%^[3]。2013 年,全球有 510 万人死于糖尿病相关性疾病,占有死亡人数的 8.39%,而糖尿病医疗花费占全球医疗支出的 11%。以糖尿病为代表的慢性疾病已经成为导致人口死亡的主要原因,严重威胁着人民健康安全。若糖尿病早期及时有效治疗,可预防及延缓并发症的发生,延缓病情进展。胰岛素抵抗及胰岛功能受损是 2 型糖尿病 (T2DM) 发病的两个基本环节^[4]。因此,深入研究能够改善胰岛素抵抗及胰岛功能受损的药物,

对于防治糖尿病及其并发症具有重要意义。此次动物实验旨在已有的前期研究基础上,进一步深入探讨连梅颗粒对自发性糖尿病大鼠腹腔脂肪组织中 NF- κ B、IKK β 蛋白表达的影响,探讨本方治疗 T2DM 的作用机制,为糖尿病的中医治疗提供新的思路和方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级 9 周龄雄性 ZDF 大鼠,体重 (244 ~ 291) g; SPF 级 9 周龄雄性 ZL 大鼠,体重 (183 ~ 220) g,均购于北京维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证:SCXK (京)2014-0003。大鼠在北京中医药大学基础医学院实验室中饲养,实验室温度 20 ~ 22℃,相对湿度 55 ± 5%,12/12 小时光照黑暗循环。适应环境 1 周后开始实验。

1.1.2 实验药物 连梅颗粒,长春中医药大学附属医院颗粒药房提供;吡格列酮,江苏恒瑞医药股份有限公司提供 (批号:国药准字 H20040631)。

1.1.3 实验试剂 鼠 NF- κ B 单克隆抗体 (批号:PW2-3)、兔 IKK β 多克隆抗体 (批号:PW2-3)、Anti-GAPDH (批号:25007) 均购于美国 CST 公司;蛋白

※基金项目 吉林省教育厅课题 (No. 吉教科合字 2012 第 65 号)

* 作者简介 米佳,女,医学博士,主治医师。研究方向:中医药治疗内分泌及其代谢病的研究。

▲通讯作者 朴春丽,女,教授,博士研究生导师。研究方向:中医药治疗内分泌及其代谢病的研究。E-mail: pcl2013@sina.cn

• 作者单位 长春中医药大学附属医院内分泌科 (130021)

裂解液+苯甲基磺酰氟(批号:P0013B)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号:P0006)均购于上海碧云天生物技术公司。

1.1.4 实验仪器 调节台式高速低温离心机(HERAEUS Fresco 17, Thenno Scientific, USA);温控震荡仪(Thenno Scientific, USA);电泳仪、电泳及电转移装置(PowerPac Basic, Bio-Rad, USA);酶标仪(Model 550 Microplate Reader, Bio-Rad, USA);凝胶图像处理系统(Tanon GIS-1000, 上海)。

1.2 动物模型的制作 ZDF 大鼠予普通饲料适应性喂养 1 周后,予高脂饲料#5008(购于北京华阜康生物科技股份有限公司,合格证号:SCXK(京)2009-0008,粗脂肪 6.5%、粗蛋白 23.5%)喂养。大鼠定期进行糖耐量实验,试验前禁食不禁水 15h,剪尾取血用微量血糖仪测空腹血糖后,予 30% 葡萄糖溶液按 $2\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃^[5]。糖负荷后分别在 0.5h、1h、1.5h 和 2h 剪尾取血,用血糖仪测量血糖。当血糖峰值高于 $16.7\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和/或糖负荷后 2h 高于 $11.1\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,可诊断为糖尿病或糖耐量减低,表明造模成功。

1.3 分组及给药方法 将造模成功的 ZDF 大鼠 30 只随机分为模型组、连梅颗粒组、吡格列酮组 3 组,每组各 10 只,10 只 ZL 大鼠为正常对照组。将连梅颗粒和吡格列酮分别配置成混悬液,造模成功后,连梅颗粒使用时按照 $5.1\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重(前期工作已确定的最佳剂量)混悬液灌胃,吡格列酮组按照 $1.07\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重灌胃,正常对照组和模型组均予等体积蒸馏水灌胃,各组大鼠均连续灌胃 12 周,每日 1 次。用药治疗期间正常对照组大鼠饲以普通饲料,其它组饲以高脂饲料,自由进食、饮水,每周称重,根据体重调整灌胃剂量。

1.4 标本采集 给药 12 周后,将大鼠处死后打开腹腔,迅速取出腹部脂肪组织,把组织剪切成细小的碎片,PMSF 与 PIPA 裂解缓冲液以 1:100 的比例加入组织中,涡旋振荡,冰浴中用玻璃匀浆器匀浆,直至充分裂解,将匀浆液其置于 EP 管中, 4°C 、 $13000\text{rpm} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 分钟,收集中层清液,用于检测 NF- κB 、IKK β 蛋白的表达。

1.5 Western-blot 法检测各组大鼠腹部脂肪组织 NF- κB 、IKK β 蛋白的表达 Western blot:裂解脂肪细胞并匀浆,离心取上清液,考马斯亮蓝法测定蛋白浓度,取样品 5 μL ,SDS-PAGE 电泳分离蛋白,转膜, Anti-NF- κB 、Anti- IKK β 、Anti-GAPDH 抗体稀释

液与膜充分接触, 4°C 过夜, TBST 中室温脱色,放入二抗稀释液,封闭, 37°C 孵育 1h,显影曝光、洗片,扫描仪扫描电泳调带,软件进行光密度值分析。

1.6 统计学处理 所有数据采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm S$)表示,选用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

在治疗第 12 周末,模型组、吡格列酮组、连梅颗粒组大鼠腹腔脂肪组织中 NF- κB 、IKK β 蛋白的表达明显高于正常对照组($P < 0.01$)。连梅颗粒组和吡格列酮组与模型组相比均明显降低($P < 0.01$, $P < 0.05$),说明连梅颗粒和吡格列酮均有降低糖尿病大鼠腹腔脂肪组织 NF- κB 、IKK β 蛋白表达的作用,且连梅颗粒组优于吡格列酮组($P < 0.05$)。见表 1、图 1。

表 1 western blot 检测各组大鼠腹部脂肪组织中 NF- κB 、IKK β 蛋白的表达变化($n = 10$, $\bar{x} \pm S$)

分 组	NF- κB	IKK β
正常对照组	0.53 ± 0.01	0.62 ± 0.02
模型组	$0.89 \pm 0.03^*$	$0.89 \pm 0.02^*$
吡格列酮组	$0.83 \pm 0.03^{*\Delta\Delta}$	$0.84 \pm 0.02^{*\Delta\Delta}$
连梅颗粒组	$0.68 \pm 0.02^{*\Delta\#\#}$	$0.70 \pm 0.02^{*\Delta\#\#}$

注:与正常组相比* $P < 0.01$,与模型组相比 $\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta P < 0.05$;与吡格列酮组相比, $\#\#P < 0.05$ 。

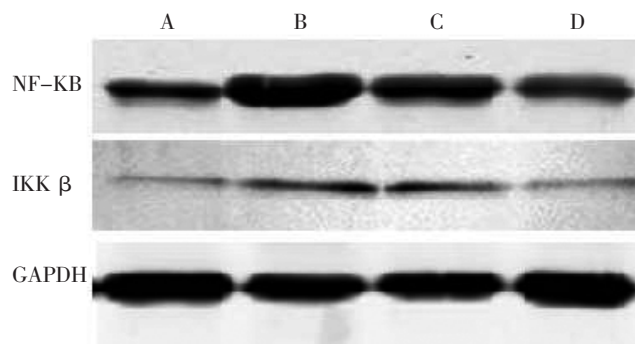


图 1 各组大鼠腹部脂肪组织中 NF- κB 、IKK β 蛋白的表达
(A. 正常对照组;B. 模型组;C. 吡格列酮组;D. 连梅颗粒组)

3 讨论

课题组所在的团队经 10 余年的临床和动物实验研究^[6,7]证实,六郁和络滞并存是导致肥胖型 2 型糖尿病的核心病机。六郁是指以肥甘滋腻之品滞脾碍胃(食郁)为先导而形成的气郁、血郁、热郁、痰郁、湿郁的病理状态;膏、浊、痰、脂、瘀、毒化生,郁滞络脉。络滞是由六郁交互作用而形成络脉郁滞的病理状态。连梅颗粒主要由黄连、乌梅、大黄、麦冬、生地、干姜组成。黄连为君,其性大苦大寒,《本草衍义》云:“生物者气也,成之者味也……气坚则壮,故苦可以养气。”《黄帝内经》曰:“寒伤形,热伤气。”消渴六郁化火,渐耗气阴,气因热而伤,苦可养气,取黄连苦寒之性以泻热,使邪去正安,其气自复,故为君药。臣用乌梅、大黄,乌梅性味酸温,主收敛生津,与黄连相伍以苦酸制甜;大黄苦寒,助黄连泻热,并可除积行瘀。干姜辛温,辛通入络,合黄连辛开苦降以调畅气机,使郁滞得除,且可反佐黄连、大黄苦寒之弊,以顾护阳气;针对消渴阴虚为本的病机特点,以麦冬、生地养阴生津,三药同为佐使。六药合用,苦、酸、辛并施,通调结合,达到了燥湿泻壅、养阴清热、通调气机的目的。

实验结果表明,与空白对照组相比,糖尿病模型

组大鼠腹部脂肪组织中 NF- κ B、IKK β 蛋白表达量显著上调,连梅颗粒组在一定程度上能抑制糖尿病大鼠腹部脂肪组织中 NF- κ B、IKK β 蛋白的表达,这可能是连梅颗粒抑制炎症信号通路的传导而发挥其改善胰岛素抵抗治疗糖尿病的机制之一。这为我们以后开展中药复方有效物质的研究提供了思路。

参考文献

- [1]陈艳芬,王春怡,李卫民,等.黄芪葛根汤对糖尿病心肌病大鼠氧化应激和 NF- κ B 表达的影响[J].中成药,2012,34(8):1428-1432.
- [2]中华医学会糖尿病学分会.中国 2 型糖尿病防治指南/2013 年版[S].中国糖尿病杂志,2014,22(8):2-42.
- [3]Shaw J E, Sicree R A, Zimmet P Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030[J]. DiabetRes ClinPract,2010,87(1):4-14.
- [4]Lanuza - Masdeu J, Arevalo ml, Vila C, et al. In vivo JNK activation in pancreatic β - cells leads to glucose intolerance caused by insulin resistance in pancreas[J]. Diabetes,2013,Jan 24. Epub ahead of print.
- [5]Pick A, Clark J, Kubstrup C, et al. Role of apoptosis in failure of beta - cell mass compensation for insulin resistance and beta - cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat [J]. Diabetes,1998,47(3):358-64.
- [6]王淑俊,朴春丽,刘禹辛.苦酸通调 I 号方治疗肥胖型 2 型糖尿病 40 例临床观察[J].中华实用中西医杂志,2009,22(4):221-222.
- [7]朴春丽,邓悦,米佳.苦酸通调法抑制糖尿病脂肪组织炎症机制的理论探讨[J].中华实用中西医杂志,2009,22(3):146-148.

中医文化

漫说“千金”妇人卷

《备急千金要方》(简称《要方》)中首列“妇人方”三卷,《千金翼方》(简称《翼方》),将“妇人”增至四卷。《翼方》与《要方》有何关系?

相同篇目 从两书目录看,《翼方》与《要方》有 13 篇相同篇目,即求子、产后虚烦、恶露、心痛、腹痛、虚损、盗汗、中风、心悸等。需要注意的是,两书相同篇目中,还有些差异,例如:《要方》“心腹痛”篇,《翼方》则分别为“心痛”“腹痛”;《要方》“盗汗”附在“虚损”篇,而《翼方》则单独成篇。

篇目互异 《要方》中有 10 篇独有的篇目,即妊娠恶阻(辨男女、辨将产附)、养胎(禁忌、滑胎附)、妊娠诸病、产难、子死腹中(得病须去胎附)、逆生、胞胎不出、杂治、补益、月经不调。《翼方》中有 12 篇独有的篇目,即妇人积聚、妇人乳疾、妇人杂病等。

内容同异 在两书相同的篇目中,内容并非完全一致,《翼方》既有重复也有增补。例如:《翼方》中“求子”篇 7 首方皆是重复的;《翼方》中“产后虚烦”共有 13 方,其中 12 首是重复的,1 首为新增的;《翼方》“恶露”篇共有 18 方,其中 13 首是重复的,5 首新增的。

内容调整 《翼方》“妇人”卷新增篇目中,有些内容取自《要方》中“妇人”卷中的相关篇目。例如:《翼方》“产后心闷”篇 4 首方皆选自《要方》“产难”篇。此外,《翼方》妇人卷的有些内容,取自《要方》妇人之外各卷,如“妇人乳疾”篇有方 6 首,其中治乳痈始作方、排脓散、治乳痈汤共 3 首,取自《要方》卷二十三“肠痈(妬乳、乳痈)”篇。

如此看来,《翼方》对《要方》既有继承,又有调整,还有增补,要全面了解孙思邈妇产科成就与特点,当认真分析这些异同,从中寻绎学术演变轨迹。

(摘自《中国中医药报》)