

【实验研究】

津力达对糖尿病大鼠血糖调节激素及胰岛细胞功能干预作用研究*

庞洁^{1 2 3}, 高怀林^{3 4}, 王宏涛^{2 3}, 魏聪^{2 3}, 吴以岭^{2 3 Δ}

(1. 南京中医药大学 南京 210046; 2. 河北以岭医药研究院(河北省络病重点实验室), 石家庄 050035; 3. 国家中医药管理局重点研究室(心脑血管络病), 石家庄 050035; 4. 河北医科大学附属以岭医院, 石家庄 050092)

摘要: 目的: 观察2型糖尿病大鼠血清胰岛素、胰高血糖素、生长激素及胰岛内分泌细胞表达变化, 探讨中药津力达颗粒(JLD)对血糖调节激素及胰岛细胞功能的干预作用。方法: 采用高脂饲料及腹腔注射链脲佐菌素(45 mg/kg)诱导2型糖尿病大鼠模型, 继续高脂饲养并给予津力达、罗格列酮干预, 8周后检测血清胰岛素、胰高血糖素及生长激素水平, 并对胰岛进行免疫组织化学染色及胰岛内分泌激素表达半定量分析。结果: 津力达干预能够降低空腹血糖、血清胰高血糖素及生长激素水平($P < 0.05$, $P < 0.01$), 升高血清胰岛素水平($P < 0.05$), 增加胰岛内胰岛素表达, 同时降低胰高血糖素表达($P < 0.05$, $P < 0.01$)。津力达组生长抑素表达略有升高, 胰多肽表达有下降趋势, 但与模型组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论: 津力达颗粒通过调节糖尿病大鼠血糖相关激素水平及胰岛内分泌细胞功能, 从而改善糖尿病大鼠糖代谢紊乱。

关键词: 津力达; 糖尿病; 胰岛素; 胰高血糖素; 生长激素; 胰岛细胞

中图分类号: R965 文献标识码: B 文章编号: 1006-3250(2014) 05-0605-03

Effect of Jin Li Da's intervention of blood glucose regulation hormone and pancreatic islet cell function in diabetic rats

PANG Jie^{1 2 3}, GAO Huai-lin^{3 4}, WANG Hong-tao^{2 3}, WEI Cong^{2 3}, WU Yi-ling^{2 3 Δ}

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China; 2 HebeiYiling Medical Research Institute (Key Laboratory of Collateral Disease of Hebei Province), Shijiazhuang 050035, China;

3. Key Research Centre of State Administration of Traditional Chinese Medicine (Collateral Disease of Cardiovascular), Shijiazhuang 050035, China; 4. Yiling Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050092, China)

Abstract: Objective: To observe the change of serum insulin, glucagon, growth hormone and expression of pancreatic endocrine cells in type 2 diabetic rat, and study the intervention effect of traditional Chinese medicine Jinlida particles (JLD) on blood glucose regulation-related hormones. Methods: Applying the methods which combined high fat diet with STZ (i. p. 45 mg/kg) to establish type 2 diabetes rat model, continue high fat diet and intervene with JLD, rosiglitazone for eight weeks, detect serum insulin, glucagon and growth hormone levels, and semi-quantitative analysis expression of immunohistochemical staining in islets. Results: The fasting blood glucose, glucagon and growth hormone levels of JLD intervention group were reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$), serum insulin level was elevated, and the expression of insulin in islets was significantly increased, while glucagon expression was significantly reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Somatostatin expression of JLD group was slightly elevated and pancreatic polypeptide expression on a downward trend, but there was no significant difference with the model group. Conclusion: Jinlida particles can improve glucose metabolism in diabetic rats by regulating secretion of blood glucose related-hormone and the function of pancreatic endocrine cells.

Key words: Jinlida (JLD); diabetes; insulin; glucagon; growth hormone; islet cells

随着经济发展及生活方式的改变, 2型糖尿病发病率呈现快速增长并已成为严重威胁人类健康的主要疾病之一。胰岛β细胞分泌的胰岛素作为体

内唯一的降血糖激素, 其分泌不足及作用缺陷一直是糖尿病防治的研究热点。然而研究发现, 胰岛α、δ细胞分泌的胰高血糖素、生长抑素及垂体分泌的生长激素与糖尿病血糖调节同样有着密切关系, 并与胰岛素相互作用共同参与血糖调控。津力达颗粒是“从脾论治”消渴病(糖尿病)理论观点指导下研制出的中成药制剂。临床及实验研究表明, 津力达具有调节糖脂代谢、改善胰岛β细胞功能和胰岛素抵抗及保护心脑血管肾靶器官等作用^[1-3], 但关于津力达对血糖调节相关激素及胰岛细胞功能作用的研究尚未见报道。本研究旨在通过高脂饮食诱导联合链

*基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2012CB518606); 国家高技术研究发展计划(863计划)项目(2011AA020115); 河北省自然科学基金资助项目(H2013106139)

作者简介: 庞洁(1986-), 女, 江苏南京人, 在读博士, 从事络病理论指导糖尿病防治研究。

Δ通讯作者: 吴以岭(1949-), 教授, 博士研究生导师, 从事络病理论指导心脑血管及糖尿病防治研究, Tel: 0311-85901553, E-mail: weitcm@163.com。

豚佐菌素腹腔注射建立2型糖尿病大鼠模型,观察糖尿病大鼠血清胰岛素、胰高血糖素、生长激素及胰岛内分泌细胞功能变化及津力达颗粒干预作用。

1 材料与方法

1.1 动物

48只健康雄性SPF级Sprague Dawley大鼠,体质量220~250g,购自中国食品药品检定研究院(许可证编号SCXK(京)2009-0017),饲养于河北省中西医结合医药研究院新药评价中心。动物房分笼饲养5只/笼,12h明暗交替,自由进食饮水。

1.2 药物与试剂

干预药物:津力达干粉(批号120512,石家庄以岭药业股份有限公司)及盐酸罗格列酮(批号20120202,贵州圣济堂制药有限公司)。主要试剂:拜安康血糖检测试纸(FAD葡萄糖脱氢酶法,德国拜耳),链脲佐菌素(STZ,AMRESCO),胰岛素放射免疫试剂盒(北京华英生物技术研究所),胰高血糖素ELISA试剂盒(MILLIPORE),生长激素ELISA试剂盒(MILLIPORE),小鼠抗大鼠胰岛素抗体(Novus biological),兔抗大鼠胰高血糖素抗体(ImmunoWay),兔抗生长抑素抗体(SANTA CRUZ),羊抗大鼠胰多肽抗体(Abcam),免疫组化SP法试剂盒(北京中杉金桥)。

1.3 主要仪器

拜安康血糖仪, Biofuge primo R高速冷冻离心机(美国索富达), XD711酶标仪(上海迅达医疗器械公司), QB-9001微孔板快速振荡器(海门其林贝尔仪器制造有限公司), LeicaDM6000B显微镜(德国Leica公司)。

1.4 分组给药及模型建立

适应性喂养3d后,正常对照组喂食基础饲料,其余各组喂食高脂饲料(热量构成:脂肪59.8%,碳水化合物20.1%,蛋白质20.1%),每组12只。高脂喂养4周后进行模型建立,造模前日禁食12h以上,不禁水,腹腔注射STZ 45 mg/kg,造模3d后尾静脉取血测定空腹血糖(FBG) ≥ 13.9 mmol/L为造模成功^[4]。符合造模成功标准的动物随机分为正常组(Normal)、模型组(Model)、津力达组(JLD)及罗格列酮组(RSG)4组,按照分组每日分别灌服

0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)(正常组和模型组)、津力达干粉1.5 g/kg、盐酸罗格列酮0.67 mg/kg,继续给予高脂饮食及药物干预8周。

1.5 指标检测

1.5.1 空腹血糖、血清胰岛素、胰高血糖素及生长激素测定 造模前日禁食12h以上,不禁水,10%水合氯醛按照0.35 ml/100g体质量进行麻醉,由腹主动脉取血,全血取出室温静置2h,高速冷冻离心机3500 rpm离心10 min,收集血清样本并在-20℃低温冰箱储存。血清胰岛素采用放射免疫法检测,血清胰高血糖素及生长激素检测严格按照ELISA试剂盒说明书进行操作。

1.5.2 免疫组织化学法检测胰岛内胰岛素、胰高血糖素、生长抑素及胰多肽表达及平均光密度分析 每组选取4只动物,10%中性甲醛固定胰腺组织样本,石蜡包埋,5 μ m切片,每只动物标本不连续切片3张,切片脱蜡至水,微波抗原修复, H₂O₂室温20 min,正常羊血清室温封闭30 min,分别孵育胰岛素、胰高血糖素、生长抑素及胰多肽抗体4℃过夜,滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液,37℃孵育30 min, DAB显色,苏木精复染细胞核,中性树胶封片。以PBS代替特异性抗体进行阴性对照。每张切片随机选取5个视野,运用Image-Pro Plus软件分析并计算阳性表达区域平均光密度。

1.6 统计学方法

采用SPSS 17.0统计软件进行单因素方差分析,统计数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,方差不齐用Dunnert's T3法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 糖尿病大鼠空腹血糖、血清胰岛素、胰高血糖素及生长激素变化情况

表1显示,与正常组比较,模型组大鼠空腹血糖、血清胰高血糖素及生长激素均显著升高,同时血清胰岛素水平显著降低($P < 0.01$)。药物干预后空腹血糖及血清中各激素水平发生不同程度变化,津力达、罗格列酮干预后空腹血糖、胰高血糖素及生长激素水平降低,血清胰岛素水平升高,且与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表1 各组大鼠空腹血糖、血清胰岛素、胰高血糖素及生长激素($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	空腹血糖(mmol/L)	胰岛素(μ U/mL)	胰高血糖素(ng/L)	生长激素(ng/ml)
正常组	8	4.37 \pm 0.61	23.90 \pm 3.30	41.56 \pm 3.31	1.30 \pm 1.00
模型组	7	29.66 \pm 4.20 [#]	14.44 \pm 1.67 [#]	67.00 \pm 13.64 [#]	59.30 \pm 10.11 [#]
津力达组	7	22.8 \pm 2.01 ^{**}	18.14 \pm 3.57 ^{**}	48.01 \pm 12.11 ^{***}	5.15 \pm 1.51 ^{**}
罗格列酮组	7	22.44 \pm 2.33 ^{**}	18.06 \pm 2.13 ^{**}	47.26 \pm 5.49 ^{***}	15.40 \pm 4.44 ^{**}

注:与正常组比较:[#] $P < 0.01$;与模型组比较:^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$

2.2 胰岛内分泌细胞免疫组化观察

免疫组化结果显示,正常组胰岛 β 细胞分布在胰岛中央,胰岛素在胰岛大部分区域表达,呈深棕色染色(图1A);模型组中 β 细胞胞质着色变浅,胰岛

素表达明显减少且分布杂乱(图1B);津力达、罗格列酮组胰岛素表达较模型组增多且分布以中心部为多(图1C、D)。正常组胰岛 α 细胞主要分布在胰岛周边部位(图2A);模型组 α 细胞显著增生,细胞变

密集且染色加深,胰高血糖素表达明显增加(图2B);津力达、罗格列酮组胰高血糖素与模型组比较表达减少(图2C、D)。正常组胰岛 δ 、PP细胞数量很少,仅散在分布于胰岛周边(图2E、I);模型组2种细胞数量均明显增多,生长抑素及胰多肽表达增加(图2F、J),与模型组比较津力达、罗格列酮组生长抑素(图2G、H)及胰多肽(图2K、L)表达变化不明显。

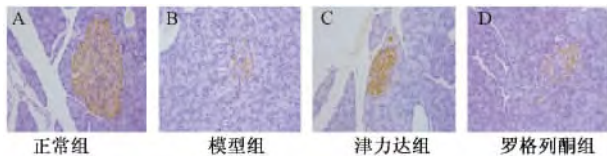


图1 大鼠胰岛 β 细胞免疫组化染色(DAB \times 200)
注:A~D:胰岛 β 细胞胰岛素表达

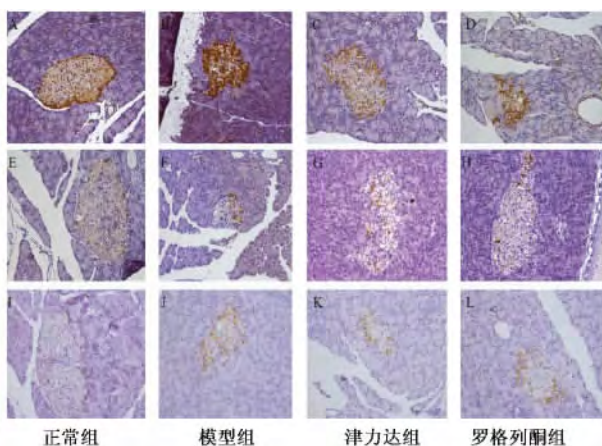


图2 大鼠胰岛 α 、 δ 、PP细胞免疫组化染色(DAB \times 200)
注:A~D:胰岛 α 细胞胰高血糖素表达;E~H:胰岛 δ 细胞生长抑素表达;I~L:胰岛PP细胞胰多肽表达。

表2 各组大鼠胰岛内分泌细胞阳性表达平均光密度分析($\bar{x} \pm s$)

组别	α 细胞 (胰高血糖素)	β 细胞 (胰岛素)	δ 细胞 (生长抑素)	PP细胞 (胰多肽)
正常组	0.367 \pm 0.085	0.404 \pm 0.048	0.372 \pm 0.090	0.328 \pm 0.075
模型组	0.483 \pm 0.095 [#]	0.266 \pm 0.069 [#]	0.475 \pm 0.069 [#]	0.415 \pm 0.11 [#]
津力达组	0.408 \pm 0.047 [*]	0.359 \pm 0.070 ^{##}	0.497 \pm 0.057 [#]	0.389 \pm 0.083
罗格列酮组	0.397 \pm 0.114 ^{**}	0.339 \pm 0.081 ^{##}	0.476 \pm 0.065 [#]	0.367 \pm 0.123

注:与正常组比较:[#] $P < 0.01$;与模型组比较:^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$

温脾阳淫羊藿为主要成分,并佐以祛瘀生新之丹参及调畅气机之荔枝核,诸药相合共奏益气养阴、健脾运津之效,旨在恢复脾(胰腺)主运化水谷精微之功能^[5]。

胰岛由4种内分泌细胞组成,其中 α 、 β 、 δ 细胞间存在紧密连接和缝隙连接,形成具有丰富神经和血管联系的外周细胞单元,内分泌细胞分泌的小分子物质可不经细胞膜而直接转运至其他细胞而发生相互作用,并在胰岛内形成自身反馈系统,共同参与血糖调节^[6]。体内血糖调节主要取决于 α 细胞和 β 细胞功能的相互平衡,当胰岛 β 细胞功能障碍引起胰岛素分泌绝对或相对不足时,胰岛素对胰高

2.3 胰岛内分泌细胞阳性表达平均光密度分析

表2显示,与正常组比较,模型组胰岛 β 细胞分泌的胰岛素表达平均光密度显著降低,胰岛 α 、 δ 、PP细胞分泌的胰高血糖素、生长抑素及胰多肽表达平均光密度均显著升高($P < 0.01$)。津力达、罗格列酮组胰岛素表达平均光密度显著升高,胰高血糖素表达则明显降低,且与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组比较,津力达、罗格列酮组生长抑素表达虽略有升高,胰多肽表达有下降趋势,但差异均无统计学意义。

3 讨论

糖尿病属于中医消渴病范畴,既往虽以肺脾胃三消论治,但究其原因皆归于脾。正如张锡纯《医学衷中参西录》中曰:“消渴一证,古有上中下之分,谓其证皆起于中焦而极于上下。”脾之运化转输功能失常,引起机体水液代谢输布及饮食精微转输利用紊乱及不平衡。早在《素问·太阴阳明论》就有“脾与胃以膜相连耳。”至张介宾《类经·图翼诸部经穴次序》中认为,脾“形如刀镰,胃同膜而附其上之左”,这与西医学中胰腺的解剖位置与形态是基本一致的,并据此认为中医历代所论之“脾”包括胰腺在内。而就脾之功能而言,水谷精微经由脾气转输布散至全身,内养五脏六腑、外濡四肢百骸而实现其主运化功能,而这一功能的实现有赖于胰腺外分泌腺分泌的多种消化酶及内分泌腺分泌胰岛素、胰高血糖素、生长抑素及胰多肽对水谷精微物质主要成分葡萄糖的利用、合成、贮存及异生,因此认为胰腺是“脾主运化”功能实现的组织结构基础。津力达颗粒以益脾气之人参,滋脾阴之黄精、麦冬、葛根,化脾湿之苍术、佩兰、茯苓,泄脾热之苦参、黄连、知母,

血糖素分泌的抑制作用随血糖浓度的增加而逐渐减弱^[7]表现为胰岛组织内 α 细胞增生及高胰高血糖素血症;另一方面胰高血糖素分泌增加刺激 δ 细胞增生,引起生长抑素分泌增加,生长抑素通过抑制胰岛细胞对钙离子的摄取,使细胞内cAMP含量下降,并以旁分泌形式抑制胰高血糖素和胰岛素分泌,其中以对胰高血糖素作用为主^[8]。PP细胞在胰岛组织中分布极少,其分泌的胰多肽具有促进肝糖原分解、抑制胰酶及胃酸分泌等作用。研究发现,糖尿病患者血浆胰多肽水平明显增高,且胰岛PP细胞存在显著增生^[9]。同时有研究证实,减少胰多肽分泌
(下转第648页)

燥体。临床应用该类方剂不仅起到平肝息风、祛风止痒疗效,同时滋补肝肾,达到标本兼治之功。

针对帕金森综合征已有研究发现,中西医结合治疗具有良好疗效,同时可减少单纯治疗出现的不良反应。故此我院将多巴丝肼与一贯煎合芍药甘草汤加虫类药物应用于该类患者,观察疗效发现综合治疗的实验组总有效率(90.4%)高于单纯西医治疗的对照组(79.2%),认为实验组治疗方案值得推广。

参考文献:

[1] 蔡学兵. 一贯煎合芍药甘草汤加虫类药物联合多巴丝肼治疗帕金森综合征[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2012, 15(20): 80-81.

[2] 陈岚, 李玫. 血管性帕金森综合征与原发帕金森病的临床症状和MRI对比分析[J]. 现代预防医学, 2011, 38(18): 3795-3799.

[3] 李朝霞, 何利, 王晓霞. 帕金森病人的康复护理对策[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2009, 11(22): 160-161.

[4] 程冕, 陈宏平, 连文文. 芍药甘草汤联合卡马西平治疗三叉神经痛的临床观察[J]. 淮海医药, 2010, 28(1): 67.

[5] 王军, 吴翔, 郝传铮, 等. 神经生长液治疗老年帕金森病的初

步临床应用研究[J]. 交通医学, 2010, 24(4): 332-334.

[6] 沈熊, 马海滨, 厉璐, 等. 复方海蛇胶囊对帕金森病小鼠的作用[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2010, 15(9): 1023-1026.

[7] 宋伟, 黄睿, 赵璧, 等. 多巴反应性肌张力障碍临床分析[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2011, 11(1): 93-95.

[8] 唐富平, 刘晓芳, 廖喜珍. 心理干预对帕金森病患者焦虑状态影响的研究[J]. 中国实用神经病杂志, 2012, 15(12): 45-46.

[9] 张作文, 撒俊鹏, 车福友, 等. 多巴丝肼过量致左侧肢体不随意运动[J]. 药物不良反应杂志, 2012, 14(2): 105-106.

[10] 张玮. 多巴丝肼片致血小板减少2例[J]. 中国药物与临床, 2010, 10(11): 1216.

[11] 林少刚, 蔡建鹰, 郭建斌, 等. 77例帕金森病患者的情绪障碍分析[J]. 中国实用神经病杂志, 2013, 16(1): 12-14.

[12] 韦文科. 息宁控释片治疗帕金森病患者症状波动和运动障碍临床分析[J]. 右江民族医学院学报, 2007, 12(4): 513-515.

[13] 冯涛, 王拥军, 芦林龙, 等. P型和C型多系统萎缩的急性多巴反应性研究[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2007, 4(3): 146-149.

[14] 周蕾, 张桂贞, 闫也. 糖尿病酮症酸中毒昏迷心肺复苏后致帕金森综合征1例[J]. 中国现代医药杂志, 2010, 12(2): 103.

[15] 阳敏燕, 孙红斌. 普拉克索添加治疗帕金森病的临床疗效及安全性研究[J]. 实用医院临床杂志, 2013, 51(01): 73-75.

收稿日期: 2014-02-16

(上接第607页)

对于改善胰岛β细胞功能具有重要作用^[10]。除上述胰岛细胞分泌的激素外,由垂体前叶细胞分泌的生长激素对血糖调控同样发挥着重要作用。在糖尿病持续高血糖作用下,由于下丘脑对葡萄糖调节反应能力下降,导致葡萄糖对生长激素的抑制作用减弱,引起其分泌增加^[11]。研究表明,生长激素长期升高将导致胰岛β细胞功能衰竭及游离脂肪酸增加,从而加重糖代谢紊乱并加速糖尿病及其微血管疾病的发生和发展^[12]。综上,体内糖代谢是在胰岛及其他血糖调节激素等多因素共同参与下完成的,随着2型糖尿病的发生,胰岛细胞构成及功能明显变化,同时由于血糖调节激素异常分泌,势必加重糖尿病糖代谢紊乱。实验结果显示,模型组血清胰高血糖素、生长激素水平显著升高,胰岛素水平显著下降,并伴随胰岛内胰岛素表达显著减少,胰高血糖素、生长激素及胰多肽表达增加,表明模型组胰岛β细胞功能明显减退,并伴随α、δ、PP细胞功能紊乱。运用津力达干预后血清胰高血糖素、生长激素水平显著降低,血清胰岛素水平升高,同时增加胰岛组织中胰岛素表达并减少胰高血糖素表达,但对生长抑素及胰多肽作用不明显。

综上所述,津力达颗粒通过调节糖尿病大鼠血清胰岛素、胰高血糖素、生长激素等血糖调节激素水平,同时调节胰岛细胞分泌功能,从而改善2型糖尿病大鼠糖代谢紊乱。

参考文献:

[1] 史婧丽, 吴莹, 宋玉萍, 等. 津力达颗粒对糖尿病大鼠胰岛B细胞的保护作用[J]. 第二军医大学学报, 2012, 33(4): 385-

389.

[2] 李斐, 赵瑛. 津力达颗粒对糖尿病大鼠海马组织的保护作用[J]. 第二军医大学学报, 2013, 34(2): 137-141.

[3] 吴莹, 史婧丽, 宋玉萍, 等. 津力达颗粒对糖尿病大鼠肾及心血管组织肾素-血管紧张素系统的影响[J]. 第二军医大学学报, 2012, 33(010): 1065-1069.

[4] Wilson, R. D., & Islam, M. S. (2012). Fructose-fed streptozotocin-injected rat: an alternative model for type 2 diabetes[J]. Pharmacological Reports, 64(129), 129-139.

[5] 吴以岭. 消渴病从脾论治探讨[J]. 中医杂志, 2002, 43(6): 410-411.

[6] Unger R H. Glucagon physiology and pathophysiology in the light of new advances[J]. Diabetologia, 1985, 28(8): 574-578.

[7] Abdul-Ghani M, DeFronzo R A. Fasting hyperglycemia impairs glucose-but not insulin-mediated suppression of glucagon secretion[J]. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2007, 92(5): 1778-1784.

[8] Farthing M J G. The role of somatostatin analogues in the treatment of refractory diarrhoea [J]. Digestion, 1996, 57 (Suppl. 1): 107-113.

[9] Floyd Jr J C, Fajans S S, Pek S, et al. A newly recognized pancreatic polypeptide; plasma levels in health and disease[J]. Recent progress in hormone research, 1975, 33: 519-570.

[10] Kahleova H, Mari A, Nofrate V, et al. Improvement in β-cell function after diet-induced weight loss is associated with decrease in pancreatic polypeptide in subjects with type 2 diabetes[J]. Journal of diabetes and its complications, 2012, 26(5): 442-449.

[11] 刘新民. 实用内分泌学[M]. 北京: 人民军医出版社, 1997: 772.

[12] Ørskov H. Somatostatin, growth hormone, insulin-like growth factor-I, and diabetes: friends or foes? [J]. Metabolism, 1996, 45: 91-95.

收稿日期: 2014-02-23