

本文引用:蒋云霞,陈文辉,李双蕾,覃俏娜,陈薇宇.益气养阴清热方对 KKAY 小鼠 GLP-2、IFN- γ 、NF- κ B 的影响[J].湖南中医药大学学报,2019,39(6):704-707.

益气养阴清热方对 KKAY 小鼠 GLP-2、IFN- γ 、NF- κ B 的影响

蒋云霞¹,陈文辉¹,李双蕾^{1*},覃俏娜²,陈薇宇²

(1.广西中医药大学第一附属医院内分泌科,广西 南宁 530023;2.广西中医药大学,广西 南宁 530001)

[摘要] **目的** 探讨益气养阴清热方对自发性 2 型糖尿病(KKAY)小鼠胰高血糖素样肽 2(glucagon-like peptide 2, GLP-2)、 γ 干扰素(interferon gamma, IFN- γ)、核因子 κ B(nuclear factor kappa beta, NF- κ B)的影响。**方法** 取雄性 SPF 级 KKAY 小鼠 50 只,随机分为模型组,二甲双胍组,益气养阴清热方高、中、低剂量组,每组各 10 只;另取 10 只 C57BL/6J 小鼠作为正常组。各组予以相应干预。干预 8 周后检测各组小鼠 GLP-2、IFN- γ 、NF- κ B 水平。**结果** 与正常组比较,模型组小鼠 IFN- γ 、NF- κ B 明显升高($P<0.01$),GLP-2 水平明显降低($P<0.01$)。益气养阴清热方高、中、低剂量组均可降低 KKAY 小鼠 IFN- γ 水平($P<0.05$);益气养阴清热方高剂量组可降低小鼠 NF- κ B 水平($P<0.05$);益气养阴清热方高、中、低剂量组均可升高小鼠 GLP-2 水平($P<0.05$)。**结论** 益气养阴清热方能改善糖尿病小鼠血糖、胰岛素抵抗,其作用可能与提高 GLP-2 水平、降低炎症反应相关。

[关键词] 糖尿病;益气养阴清热;胰高血糖素样肽 2; γ 干扰素;核因子 κ B

[中图分类号] R285.5;R255.4

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.06.006

Effects of Yiqi Yangyin Qingre Formula on GLP-2, IFN- γ and NF- κ B in KKAY Mice

JIANG Yunxia¹, CHEN Wenhui¹, LI Shuanglei^{1*}, QIN Qiaona², CHEN Weiyu²

(1. Endocrine Department, The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi 530023, China; 2. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi 530001, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of Yiqi Yangyin Qingre Formula on glucagon-like peptide 2 (GLP-2), interferon- γ (IFN- γ) and nuclear factor kappa B (NF- κ B) in spontaneous type 2 diabetes (KKAY) mice. **Methods** A total of 50 male SPF KKAY mice were selected. They were randomly divided into a model group, a metformin group, as well as high, medium and low dose groups of Yiqi Yangyin Qingre Formula, with 10 mice in each group. And 10 C57BL/6J mice were taken as the normal group. Each group was given corresponding intervention. After 8 weeks of intervention, the levels of GLP-2, IFN- γ and NF- κ B of mice were measured. **Result** Compared with the normal group, the levels of IFN- γ and NF- κ B in the model group were increased significantly ($P<0.01$), and the GLP-2 level was decreased significantly ($P<0.01$). The IFN- γ level of KKAY mice could be decreased in the high, medium and low dose groups of Yiqi Yangyin Qingre Formula ($P<0.05$). The NF- κ B level of mice could be decreased in the high dose group of Yiqi Yangyin Qingre Formula ($P<0.05$). And the GLP-2 level of mice could be increased in the high, medium and low dose groups of Yiqi Yangyin Qingre Formula ($P<0.05$). **Conclusion** Yiqi Yangyin Qingre Formula can reduce blood glucose and insulin resistance in diabetic mice, and its effects may be related to the increase of GLP-2 level and the reduction of inflammatory reaction.

[Keywords] diabetes mellitus; Yiqi Yangyin Qingre; glucagon-like peptide 2; interferon- γ ; nuclear factor- κ B

[收稿日期] 2018-07-16

[基金项目] 广西自然科学基金项目(2015GXNSFAA139119);广西名老中医民族医传承工作室建设项目(桂卫中[2014]9号文件)。

[作者简介] 蒋云霞,女,硕士,研究方向:中西医结合防治内分泌代谢性疾病。

[通讯作者] *李双蕾,女,主任医师,教授,硕士研究生导师,E-mail:lslei66@126.com

2型糖尿病发病早期多存在胰岛素抵抗,研究表明,炎症因子与糖尿病胰岛素抵抗存在明显相关^[1],但是此慢性炎症的启动基点尚不清楚。进一步研究表明,肠黏膜屏障损伤可能是炎症启动的关键环节,而胰高血糖素样肽2(glucagon-like peptide 2, GLP-2)有维持肠黏膜屏障功能的作用,GLP-2同时与糖代谢及胰岛素抵抗也存在密切关系^[2-5]。益气养阴清热方是广西名中医李双蕾教授的经验方,既往研究已经证实其可改善血糖及胰岛素抵抗^[6],有效降低2型糖尿病患者的炎症因子水平^[7]。前期实验研究已表明益气养阴清热方能改善糖尿病小鼠胰岛素抵抗,降低空腹及随机血糖,其机制可能是通过抑制炎症反应来实现^[8]。本研究在此基础上,拟进一步观察益气养阴清热方对KKAy小鼠GLP-2、 γ 干扰素(interferon gamma, IFN- γ)、核因子 κ B(nuclear factor kappa beta, NF- κ B)的影响,探讨其可能通过改善肠道黏膜屏障,进而降低炎症反应、改善胰岛素抵抗的作用机制。

1 材料

1.1 动物

SPF级5周龄雄性自发性2型糖尿病(KKAy)小鼠50只,5周龄雄性SPF级C57BL/6J小鼠10只,体质量均为19~33 g,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供。动物许可证号:SYXK(桂)2014-0003。

1.2 药物与试剂

益气养阴清热方(由生黄芪30 g,黄连9 g,知母20 g,麦冬20 g,连翘9 g,淮山药20 g组成),单味中药浓缩颗粒剂,江阴天江药业有限公司,批号:1611021。盐酸二甲双胍片:上海信谊天平药业有限公司,批号:1660706;0.9%氯化钠注射液:山东康宁药业有限公司,批号:A16031901。

血糖试纸:罗氏卓越型血糖仪试纸,罗氏诊断产品有限公司。小鼠血清胰岛素(fasting insulin, FINS)测定ELISA试剂盒、小鼠胰GLP-2测定ELISA试剂盒、小鼠IFN- γ 测定ELISA试剂盒、小鼠NF- κ B测定ELISA试剂盒,均由武汉华美生物工程有限公司提供。

1.3 仪器

ACCU-CHEK Performa Nano血糖仪,德国罗氏;

T-5000型电子天平,国双杰兄弟(集团);Eppendorf 5840R冷冻高速离心机,德国Eppendorf公司;型号5810R高速冷冻离心机,德国Eppendorf公司;型号Nanodrop2000微量紫外分光光度计,美国Thermo;Aeroset全自动生化分析仪,日本TOSHIBA公司;MK3酶标仪,芬兰Labsystems Multiskan。

2 方法

2.1 造模与干预

KKAy小鼠及C57BL/6J小鼠5周龄,以普通全价颗粒饲料适应性喂养1周后,KKAy小鼠改为高脂饲料(成分:粗蛋白17.98%,粗纤维4.45%,粗脂肪19.42%,粗灰分7.42%,水分8.98%,碳水化合物48.47%)喂养2周;尾静脉取血测随机血糖 ≥ 13.9 mmol/L^[9],且维持72 h,为造模成功。将造模成功KKAy小鼠随机分为模型组,二甲双胍组,益气养阴清热方高、中、低剂量组(以下简称为中药高、中、低剂量组),每组10只;另取C57BL/6J小鼠10只作为正常组。按二甲双胍组(0.2 g/kg)、中药高剂量组(2 g/kg)、中药中剂量组(1 g/kg)、中药低剂量组(0.5 g/kg)灌胃,灌胃容积0.5 mL。模型组、正常组:灌服等体积0.9%生理盐水。干预周期为8周。

2.2 观察指标与检测

于连续用药8周后,停药,禁食不禁水12 h,眶静脉取血,静置2~3 h后,4℃、3 000 r/min离心15 min,分离血清,分装,-20℃保存,采用ELISA法测定GLP-2、IFN- γ 、NF- κ B水平。

2.3 统计学处理

采用SPSS 22.0软件分析,计量资料实验数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,组间均数比较采用单因素方差分析,方差不齐时应用非参数秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对糖尿病小鼠IFN- γ 、NF- κ B水平的影响

与正常组比较,模型组小鼠IFN- γ 、NF- κ B水平显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,中药高、中、低剂量组均可降低IFN- γ 水平($P < 0.05$),其作用与二甲双胍组相当($P > 0.05$)。中药高剂量组可降低NF- κ B水平($P < 0.05$),而中药中、低剂量组及二甲双胍

组作用并不明显($P>0.05$)。见表1。

3.2 对糖尿病小鼠 GLP-2 水平的影响

与正常组比较,模型组小鼠 GLP-2 水平显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,中药高、中、低剂量组均可升高 GLP-2 水平($P<0.05$),中药高、中剂量组其作用与二甲双胍组相当($P>0.05$)。见表1。

表1 各组小鼠 IFN- γ 、NF- κ B 及 GLP-2 水平比较($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	IFN- γ /(ng·L ⁻¹)	NF- κ B/(ng·L ⁻¹)	GLP-2/(pmol·L ⁻¹)
正常组	981.67±93.74	731.76±78.85	12.10±0.71
模型组	1381.09±83.91 ^{##}	1072.11±57.86 ^{##}	8.85±0.68 ^{##}
二甲双胍组	1251.63±245.47*	980.61±59.62	10.26±0.84**
中药高剂量组	1245.86±96.29*	943.42±67.92* [△]	10.49±0.76**
中药中剂量组	1251.09±117.59*	971.52±101.42	10.32±0.49**
中药低剂量组	1258.98±170.31*	993.44±93.80	9.71±1.34* ^{△△}

注:与正常组比较,## $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与二甲双胍组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$

4 讨论

2型糖尿病是一种以胰岛素抵抗为主要机制的内分泌代谢性疾病。近年来对糖尿病胰岛素抵抗机制的研究表明,IFN- γ 、NF- κ B 等多种炎症因子参与到了胰岛素抵抗的过程中^[8,10-12],胰岛素抵抗是一种慢性炎症过程。而在此过程中慢性炎症是如何启动的仍需要进一步研究。

正常状态下,肠道中含有大量潜在的内毒素和致病菌,而完整健康的肠黏膜屏障可以有效地防止肠道内的内毒素和细菌进入体内,对机体形成天然的保护,维持机体内环境的相对稳定。一旦这种平衡状态被打破,发生菌群失调,细菌及其毒素就可能通过启动炎症反应,破坏肠黏膜屏障功能,进而导致全身的慢性炎症反应,参与肥胖和胰岛素抵抗进程^[13]。

而在维持肠黏膜屏障功能中 GLP-2 起到至关重要的作用。GLP-2 被认为是一种生理状态下的肠道营养因子,特异性地作用于肠道的黏膜、黏膜下和肌间神经元、柱状上皮的祖细胞,促进柱状上皮细胞增生和营养底物吸收,加速包括内分泌细胞在内的整个肠隐窝部细胞群的分化、生长和修复,从而增加小肠的重量、蛋白质的合成、绒毛的高度和隐窝深度,降低肠道通透性^[2,14]。同时,GLP-2 亦属于胰高血糖素原衍生肽类,是胰高血糖素原基因的表达产物之一,有研究显示,GLP-2 可通过促进肠道葡萄糖

吸收调节葡萄糖稳态^[2],肥胖患者体内 GLP-2 水平与胰岛素敏感指数呈明显的正相关关系^[3],同时,敲除中枢 GLP-2 受体的大鼠葡萄糖耐量减低,并且表现出胰岛素抵抗,而中枢输注 GLP-2 可改善血糖^[4]。2型糖尿病大鼠肠黏膜屏障受损,GLP-2 水平也随之下降^[5]。因此,GLP-2 在维持肠道屏障功能,抑制炎症反应,改善胰岛素抵抗方面具有重要作用。

中医学认为,糖尿病属“消渴”“消瘴”等范畴^[15],许多学者也从“虚”“热”论治其重要性^[16]。《证治要诀·三消》曰:“三消得之气之实,血之虚,久久不治,气尽虚,则无能为力矣。”因而采用益气养阴清热治法在糖尿病治疗中具有独特疗效。

李双蕾教授根据多年临床经验,在“气阴亏虚,热毒为患”的理论基础上,精选药物组成益气养阴清热方,该方由生黄芪、黄连、知母、麦冬、连翘、淮山药组成。《神农本草经》谈到黄芪可“补丈夫虚损,五劳羸瘦,止渴,腹痛泄痢,益气,利阴气”,故以黄芪为君,补中益气,脾气健旺,则水道通调;山药健脾补肺,固肾益精,黄连清热解毒,燥湿坚阴,二者为臣;知母泻三焦虚火,麦冬养阴除烦,滋养匮乏之胃阴,二者相和,养阴清热而共为佐药;连翘清热解毒,散结消肿,一清热毒,二防补益太过,聚而为毒,为佐使之用。全方共奏益气养阴,清热解毒之效。

本研究结果显示,KKAy 小鼠血清中的 IFN- γ 、NF- κ B 明显升高,说明胰岛素抵抗糖尿病小鼠处于炎症反应状态,与课题组以往研究结果一致。而益气养阴清热方能够降低 IFN- γ 、NF- κ B 水平,说明其具有抑制低度炎症的作用。同时研究结果显示,KKAy 小鼠血清中的 GLP-2 水平明显降低,说明胰岛素抵抗糖尿病小鼠的肠道黏膜屏障功能下降。而益气养阴清热方可升高小鼠体内 GLP-2 水平,提示益气养阴清热方可能通过提高体内 GLP-2 水平,改善肠道黏膜屏障功能,进而减少慢性炎症反应,改善胰岛素抵抗和血糖水平。

参考文献

- [1] BOLAND L, BURAND A J, BROWN A J, et al. IFN- γ and TNF- α Pre-licensing protects mesenchymal stromal cells from the pro-inflammatory effects of palmitate[J]. Molecular Therapy, 2018,26(3):860-873.

- [2] GUAN X, STOLL B, LU X, et al. GLP-2-mediated up-regulation of intestinal blood flow and glucose uptake is nitric oxide-dependent in TPN-fed piglets 1[J]. *Gastroenterology*, 2003,125(1):136-147.
- [3] GELONEZE B, LIMA M M, PAREJA J C, et al. Association of insulin resistance and GLP-2 secretion in obesity: a pilot study[J]. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 2013,57(8): 632-635.
- [4] SHI X, ZHOU F G, CHANG B, et al. Central GLP-2 enhances hepatic insulin sensitivity via activating PI3K signaling in POMC neurons[J]. *Cell Metabolism*, 2013,18(1):86-98.
- [5] SHAN C Y, YANG J H, KONG Y, et al. Alteration of the intestinal barrier and GLP2 secretion in Berberine-treated Type 2 diabetic rats[J]. *Journal of Endocrinology*, 2013, 218(3): 255-262.
- [6] 李双蕾,陈文辉,陈莉娜,等.益气养阴清热方对初发2型糖尿病患者胰岛素抵抗的影响[J].*广西中医药*,2012,35(4):9-12.
- [7] 李双蕾,陈莉娜,赵伟,等.益气养阴清热方对2型糖尿病患者炎症因子的影响[J].*中华中医药杂志*,2013,28(3):474-748.
- [8] 蒋云霞,李双蕾,陈文辉,等.益气养阴清热方对糖尿病KKAy小鼠血清胰岛素及TNF- α 、IL-6的影响[J].*世界中西医结合杂志*,2018,13(9):1248-1251.
- [9] 刘晓丹,杨刚,范秋灵,等.自发性2型糖尿病动物模型KKAy小鼠肾脏损害的特征与演变[J].*中国医科大学学报*,2011,40(2): 104-106.
- [10] SCHMIDT F M, WESCHENFELDER J, SANDER C, et al. Inflammatory cytokines in general and central obesity and modulating effects of physical activity[J]. *PloS ONE*, 2015, 10(3):e0121971.
- [11] GUZIK T J, SKIBA D S, TOUYZ R M, et al. The role of infiltrating immune cells in dysfunctional adipose tissue[J]. *Cardiovascular Research*, 2017,113(9):1009-1023.
- [12] KIECHL S, WITTMANN J, GIACCARI A, et al. Blockade of receptor activator of nuclear factor- κ B (RANKL) signaling improves hepatic insulin resistance and prevents development of diabetes mellitus[J]. *Nature Medicine*, 2013,19(3):358-363.
- [13] SHI H, KOKOEVA M V, INOUE K, et al. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2006,116(11):3015-3025.
- [14] CAMERON H L, PERDUE M H. Stress impairs murine intestinal barrier function: improvement by glucagon-like peptide-2[J]. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2005,314(1):214-220.
- [15] 全小林.糖尿病中医药临床循证实践指南[M].北京:科学出版社, 2016:19.
- [16] 张翔,喻嵘,曾婧,等.从“热”论消渴[J].*湖南中医药大学学报*,2015,35(6):27-31.

(本文编辑 杨 瑛)