

LW-AFC 对饮食和链佐星联合诱导糖尿病大鼠的治疗作用

徐智宇, 迟晓丽, 马 渊, 周文霞, 张永祥

(军事医学科学院毒物药物研究所中药和神经免疫药理学研究室, 北京 100850)

摘要:目的 评价 LW-AFC 治疗糖尿病的作用, 并探讨其作用特点。方法 采用高热量饲料对 Wistar 大鼠饮食诱导 5 周, 随后一次性 ip 给予链佐星 (STZ) $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 制备糖尿病大鼠模型。7 d 后 ig 给予 LW-AFC 0.28, 0.56 和 $1.12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 每天 1 次, 连续 8 周。在给药后 2, 4, 6 和 8 周动态监测大鼠空腹血糖、胰岛素、胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR)、总胆固醇 (TC)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 和甘油三酯 (TG) 水平, 称量内脏脂肪质量 (VFM) 并计算内脏脂肪系数 (VFC)。采用酶比色法检测血糖、TC 和 TG, 采用清除法检测 LDL-C, 采用放射免疫分析法检测胰岛素。结果 与正常对照组比较, 模型组大鼠 VFM 和 VFC 显著升高 ($P < 0.01$), 空腹血糖水平显著升高 ($P < 0.01$), 胰岛素水平在 2 和 6 周明显升高 ($P < 0.05$), TC 水平在 4, 6 和 8 周明显升高, LDL-C 水平在 2, 6 和 8 周明显升高 ($P < 0.05$), TG 水平在 2 周明显升高。与模型组比较, LW-AFC 0.56 和 $1.12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给药 8 周可显著降低 VFM 至 17.1 ± 3.0 和 $(16.0 \pm 3.6) \text{ g}$, 可降低 VFC 至 $(4.5 \pm 0.6)\%$ 和 $(4.3 \pm 0.9)\%$ ($P < 0.01$); LW-AFC $1.12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给药 4, 6 和 8 周可将空腹血糖水平由 19.3 ± 3.1 , 21.4 ± 7.0 和 $(17.0 \pm 4.7) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 分别降低至 14.2 ± 4.0 , 11.8 ± 4.9 和 $(11.2 \pm 4.9) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; LW-AFC 对胰岛素水平无明显影响。HOMA-IR 在 2 ~ 8 周明显升高 ($P < 0.01$), HOMA-IR 降低至 17.3 ± 4.8 , 17.4 ± 6.7 和 4.1 ± 2.4 ($P < 0.05$), LW-AFC $1.12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给药 4, 6 和 8 周可明显降低 TC 至 2.34 ± 0.22 , 2.09 ± 0.29 和 $(2.16 \pm 0.22) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。LW-AFC $1.12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给药 2 周可将 LDL-C 降至 $(0.41 \pm 0.11) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 在 6 和 8 周降至 0.50 ± 0.10 和 $(0.46 \pm 0.08) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。LW-AFC 0.56 和 $1.12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给药 2 周 TG 降低至 1.9 ± 0.8 和 $(1.8 \pm 0.8) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结论 LW-AFC 对糖尿病模型大鼠具有改善腹型肥胖、糖脂代谢紊乱和胰岛素抵抗的作用。

关键词: 六味地黄汤; LW-AFC; 糖尿病, 实验性; 血糖; 胰岛素

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3002(2012)02-0205-07

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2012.02.015

六味地黄汤 (Liuweidihuang decoction, LW) 是滋补肾阴的经典名方, 由熟地、山茱萸、山药、泽泻、牡丹皮和白茯苓以 8:4:4:3:3:3 的质量比例配伍组成, 主治腰膝酸软、头晕目眩、耳聋耳鸣、盗汗自汗、发热、瘦弱、小便淋秘和口渴失音等肾阴不足之证。糖尿病症状与传统医学中消渴病基本一致, 患者阴津亏耗, 阴损及阳, 导致气阴两伤和阴阳俱虚。因此, 消渴病常以主治肾阴虚的 LW 为基础方。现代

临床医学研究也表明, LW 对糖尿病有较好的疗效^[1]。目前现有的 LW 制剂几乎都是粗制剂, 缺乏可靠的质量控制方法。本课题组以免疫和内分泌活性评价为导向, 从 LW 中分离获得了多糖、寡糖和糖苷等活性物质并按一定比例组成复方, 即 LW-AFC。本研究观察 LW-AFC 对饮食和链佐星 (streptozocin, STZ) 联合诱导的糖尿病模型大鼠的肥胖、糖脂代谢紊乱和胰岛素抵抗的治疗作用, 以期为 LW-AFC 作为防治糖尿病的新药研发提供实验依据。

1 材料与方方法

1.1 动物、药物、试剂和仪器

SPF 级 Wistar 大鼠, 雄性, 180 ~ 220 g, 由军事医学科学院实验动物中心提供, 动物合格证号: SCXK-(军) 2002-001, 12 h 光照/12 h 黑暗, 室温 23 ~ 25℃, 相对湿度 50% ~ 70%, 自由摄食和饮水。二甲双胍 (metformin, Met), 北京四环制药有限责任

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2009ZX09301-002); 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2009ZX09502-017); 国家自然科学基金 (90709012); 国家自然科学基金 (30772562); 国家自然科学基金 (30701073); 国家自然科学基金 (30901818)

作者简介: 徐智宇 (1984 -), 男, 硕士研究生, 主要从事内分泌药理学研究; 周文霞 (1968 -), 女, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事神经、免疫和内分泌药理学研究。

联系作者: 周文霞, E-mail: zhouwx@nic.bmi.ac.cn, Tel: (010)66931625

公司,国药准字 H11020127; LW-AFC 由本室制备,经过滤、减压浓缩和灭菌后保存于 4℃ 备用^[2],根据预实验结果, LW-AFC 0.28, 0.56 和 1.12 g·kg⁻¹, 临用前用蒸馏水配制成相应浓度的溶液。STZ、柠檬酸(FM = 192.14)和柠檬酸钠(FM = 294.10)系美国 Sigma 公司产品,临用前将柠檬酸和柠檬酸钠溶液混合配制成 pH4.0 的缓冲液,过滤除菌后与 STZ 配制成相应浓度的注射液;葡萄糖、总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C)和甘油三酯(triglycerides, TG)测定试剂盒,北京中生北控有限责任公司;胰岛素放射免疫分析试剂盒,北京北方生物技术研究所;高热量饲料,中国医学科学院动物研究所提供,由酪蛋白(25.8%)、D-L-蛋氨酸(0.4%)、麦芽糊精(16.2%)、蔗糖(8.9%)、纤维素(6.5%)、猪油(35%)、复合矿物质(1.5%)、一水合柠檬酸钾(2.1%)、磷酸钙盐(1.7%)和复合维生素(1.3%)等成分组成,每 100 g 饲料可提供 524.3 kcal 的能量。Sn-69513 型免疫计数器,上海核所日环光电仪器有限公司;Napco2200 型 37℃ 恒温箱,美国 Napco 公司。POLARstar Galaxy 多功能酶标仪,德国 BMG 公司。

1.2 动物分组、模型制备和给药

Wistar 大鼠适应性饲养后,按体质量随机分为正常对照组(12 只)和模型组(70 只)。正常对照组大鼠每天饲以标准饲料,模型组每天饲以高热量饲料,饮食诱导共持续 5 周。随后模型组大鼠过夜禁食 12 h 后一次性 ip 给予 STZ 30 mg·kg⁻¹。

注射 STZ 1 周后模型组大鼠测定空腹血糖,血糖 > 16.65 mmol·L⁻¹ 的大鼠(约为 85%)按血糖和体质量随机平均分为 5 个组,即模型组、Met 0.2 g·kg⁻¹、LW-AFC 0.28、0.56 和 1.12 g·kg⁻¹, 每组 12 只。大鼠分组后分别 ig 给予蒸馏水、Met 或 LW-AFC, 每天 1 次,连续 8 周。除正常对照组饲以标准饲料外,其余各组大鼠均继续以高热量饲料喂食。给药期间每 2 周动态监测空腹血糖、胰岛素、TC、LDL-C 和 TG 水平,并计算胰岛素抵抗指数(homeostasis model assessment of insulin resistance, HOMA-IR)。HOMA-IR 是反映胰岛素抵抗状态的重要指标。HOMA-IR = 空腹血糖(mmol·L⁻¹) × 胰岛素(mIU·L⁻¹)/22.5。大鼠采血前过夜禁食 12 h, 采血后恢复饮食。采集的血液在室温静置 60 min 后,1500 × g 4℃ 离心 30 min, 分离血清在 -20℃ 低温保存,备用。给药结束后处死大鼠,称取腹腔、肾囊和睾丸处脂肪,检测内脏脂肪质量(visceral fat

mass, VFM),并计算内脏脂肪系数(visceral fat coefficient, VFC),以反映腹型肥胖水平。VFC = VFM (g) / 体质量 (g) × 100%。

1.3 相关血清生化指标的测定

葡萄糖、TC 和 TG 采用酶比色法检测^[3], LDL-C 采用清除法检测^[4], 胰岛素采用放射免疫分析法检测^[5]。其中胰岛素采用双孔法检测,每孔 100 μl 血清,检测结果取算数平均值得到最终结果。

1.4 统计学方法

实验结果数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SAS 8.1 统计软件进行统计分析,多组间均数比较采用单因素方差分析,并进行 Dunnett *t* 多重比较。

2 结果

2.1 LW-AFC 对糖尿病大鼠肥胖的影响

表 1 可见,与正常对照组比较,模型组大鼠 VFM 和 VFC 均明显升高($P < 0.01$),呈现出腹型肥胖。与模型组比较, Met 0.2 g·kg⁻¹, LW-AFC 0.56 和 1.12 g·kg⁻¹ 给药 8 周均可显著降低 VFM 和 VFC ($P < 0.05$),表明 LW-AFC 可改善腹型肥胖。

Tab.1 Effect of LW-AFC on obesity formation in diabetic model rats

Group	Body mass/g	VFM/g	VFC/%
Normal control	453 ± 44	12 ± 6	2.6 ± 1.1
Model	401 ± 27**	22 ± 4**	5.4 ± 1.1**
Metformin 0.2	380 ± 30	16 ± 2##	4.3 ± 0.9#
LW-AFC 0.28	382 ± 39	18 ± 5	4.5 ± 1.2
0.56	383 ± 29	17 ± 3#	4.5 ± 0.6#
1.12	381 ± 43	16 ± 4##	4.3 ± 0.9#

Diabetic rat model was established by given high-calorie diet for 5 weeks and ip administer 30 mg·kg⁻¹ of streptozocin once. After streptozocin, metformin and LW-AFC were ig administered once daily for 8 weeks. Water was used instead of drugs in normal and model groups. The body mass was measured when the experiment was end. After the end of the experiment, visceral fat mass (VFM) and visceral fat coefficient (VFC) were detected. VFC = VFM (g) / body mass (g) × 100%. $\bar{x} \pm s$, $n = 12$. ** $P < 0.01$, compared with normal control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, compared with model group.

2.2 LW-AFC 对糖尿病大鼠糖代谢的影响

2.2.1 LW-AFC 对糖尿病大鼠空腹血糖的影响

与正常对照组相比,模型组大鼠空腹血糖显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较, Met 0.2 g·kg⁻¹ 在 8 周的给药周期内均可明显降低空腹血糖($P < 0.01$); LW-AFC 3 个剂量给药 4~8 周亦可明显降低空腹血糖($P < 0.05$, $P < 0.01$),改善糖代谢紊乱(表 2)。

Tab. 2 Effect of LW-AFC on fasting blood glucose level in diabetic model rats

Group	Fasting blood glucose/mmol·L ⁻¹			
	2	4	6	8(week)
Normal control	4.6 ± 0.4	4.4 ± 0.4	4.9 ± 0.8	4.3 ± 0.4
Model	18.0 ± 4.6 ^{**}	19.3 ± 3.1 ^{**}	21.4 ± 6.9 ^{**}	16.9 ± 4.7 ^{**}
Metformin 0.2	9.6 ± 2.7 ^{##}	7.9 ± 1.9 ^{##}	6.5 ± 2.5 ^{##}	5.8 ± 1.6 ^{##}
LW-AFC 0.28	19.7 ± 4.0	18.8 ± 5.3	10.2 ± 3.7 ^{##}	9.1 ± 3.2 ^{##}
0.56	20.3 ± 3.9	19.3 ± 5.0	10.7 ± 3.5 ^{##}	10.9 ± 5.0 [#]
1.12	18.2 ± 5.8	14.2 ± 4.0 [#]	11.8 ± 4.9 ^{##}	11.2 ± 4.9 [#]

See Tab. 1 for rat treatment. The serum fasting blood glucose level was measured using oxidase method after drug given. $\bar{x} \pm s$, $n = 12$. ^{**} $P < 0.01$, compared with normal control group; [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, compared with model group.

2.2.2 LW-AFC 对糖尿病大鼠胰岛素水平的影响

与正常对照组相比,模型组大鼠胰岛素水平在 2 和 6 周时明显升高 ($P < 0.05$), 4 周时则显著降低; LW-AFC 在给药 4 和 6 周时与模型组比较胰岛素水平明显降低(表 3)。

2.2.3 LW-AFC 对糖尿病大鼠胰岛素抵抗指数的影响

与正常对照组相比,模型组大鼠 HOMA-IR 在

2~8 周明显升高 ($P < 0.01$), 形成明显而稳定的胰岛素抵抗。与模型组相比, Met 在给药后 2~8 周可明显降低 HOMA-IR ($P < 0.01$); LW-AFC 3 个剂量给药 4~8 周亦可显著降低 HOMA-IR ($P < 0.01$), 改善胰岛素抵抗状态(表 4)。

2.3 LW-AFC 对糖尿病大鼠脂代谢的影响

2.3.1 LW-AFC 对糖尿病大鼠总胆固醇的影响

与正常对照组相比,模型组 TC 水平在 4~8

Tab. 3 Effect of LW-AFC on fasting blood insulin level in diabetic model rats

Group	Fasting blood insulin/mIU·L ⁻¹			
	2	4	6	8(week)
Normal control	23 ± 6	40 ± 4	45 ± 7	16 ± 7
Model	30 ± 6 [*]	33 ± 4 ^{**}	56 ± 8 ^{**}	15 ± 5
Metformin 0.2	28 ± 9	33 ± 4	43 ± 10 ^{##}	12 ± 8
LW-AFC 0.28	27 ± 7	21 ± 5 ^{##}	39 ± 10 ^{##}	10 ± 6
0.56	30 ± 8	20 ± 4 ^{##}	46 ± 9 [#]	8 ± 2 ^{##}
1.12	36 ± 10	33 ± 5 ^{##}	56 ± 5	14 ± 3

See Tab. 1 for the rat treatment. The serum fasting blood insulin level was determined after drug given using radioimmunoassay. $\bar{x} \pm s$, $n = 12$. ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, compared with normal group; [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, compared with model group.

Tab. 4 Effect of LW-AFC on homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) of diabetic model rats

Group	HOMA-IR			
	2	4	6	8(week)
Normal control	4.8 ± 1.2	7.8 ± 1.2	9.6 ± 2.0	3.0 ± 1.4
Model	21.9 ± 5.7 ^{**}	27.5 ± 5.0 ^{**}	51.5 ± 12.4 ^{**}	10.7 ± 3.9 ^{**}
Metformin 0.2	11.6 ± 4.2 ^{##}	11.8 ± 3.6 ^{##}	11.4 ± 5.0 ^{##}	3.3 ± 2.7 ^{##}
LW-AFC 0.28	23.0 ± 6.0	17.3 ± 4.8 ^{##}	17.4 ± 6.7 ^{##}	4.1 ± 2.4 ^{##}
0.56	25.1 ± 7.6	16.4 ± 3.4 ^{##}	20.9 ± 5.7 ^{##}	4.4 ± 3.1 ^{##}
1.12	26.0 ± 8.5	14.3 ± 3.3 ^{##}	28.7 ± 11.0 ^{##}	6.2 ± 3.0 [#]

See Tab. 1 for rat treatment. HOMA-IR = fasting blood glucose (mmol·L⁻¹) × fasting blood insulin (mIU·L⁻¹) / 22.5. $\bar{x} \pm s$, $n = 12$. ^{**} $P < 0.01$, compared with normal control group; [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, compared with model group.

周明显升高 ($P < 0.01$), 呈现出严重的脂代谢紊乱。与模型组相比, Met 给药 6 ~ 8 周可明显降低 TC 水平, LW-AFC 3 个剂量给药 4 ~ 8 周亦可明显降低 TC 水平 ($P < 0.05$), 改善高胆固醇血症 (表 5)。

2.3.2 LW-AFC 对糖尿病大鼠低密度脂蛋白胆固醇的影响

与正常对照组相比, 模型组 LDL-C 水平在 2, 6 和 8 周明显升高 ($P < 0.05$)。与模型组相比, Met 给

药 8 周, LW-AFC 3 个剂量给药 2 ~ 8 周可持续稳定地降低 LDL-C 水平 ($P < 0.05$), 改善脂代谢紊乱 (表 6)。

2.3.3 LW-AFC 对糖尿病大鼠甘油三酯的影响

由表 7 可见, 与正常对照组相比, 模型组 TG 水平在 2 周明显升高 ($P < 0.01$), 在 4 ~ 8 周无明显变化。与模型组相比, LW-AFC 0.56 和 1.12 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给药 2 周可显著降低 TG 水平 ($P < 0.05$)。

Tab. 5 Effect of LW-AFC on total cholesterol (TC) level of diabetic model rats

Group	TC/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$			
	2	4	6	8 (week)
Normal control	2.14 ± 0.21	2.23 ± 0.34	2.05 ± 0.26	2.02 ± 0.27
Model	2.23 ± 0.17	2.60 ± 0.23 [*]	2.58 ± 0.28 ^{**}	2.43 ± 0.34 ^{**}
Metformin 0.2	2.42 ± 0.29	2.45 ± 0.29	2.28 ± 0.30 [#]	2.12 ± 0.28 [#]
LW-AFC 0.28	2.27 ± 0.32	2.46 ± 0.31	2.25 ± 0.18 ^{##}	2.24 ± 0.25
0.56	2.32 ± 0.38	2.28 ± 0.25 [#]	2.27 ± 0.36 [#]	2.32 ± 0.23
1.12	2.17 ± 0.29	2.34 ± 0.22 [#]	2.09 ± 0.29 ^{##}	2.16 ± 0.22 [#]

See Tab. 1 for rat treatment. The serum TC level was measured using oxidase method after drug given. $\bar{x} \pm s$, $n = 12$. ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, compared with normal control group; [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, compared with model group.

Tab. 6 Effect of LW-AFC on low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) of diabetic model rats

Group	LDL-C/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$			
	2	4	6	8 (week)
Normal control	0.43 ± 0.06	0.57 ± 0.14	0.53 ± 0.07	0.49 ± 0.06
Model	0.51 ± 0.07 [*]	0.62 ± 0.08	0.64 ± 0.13 [*]	0.59 ± 0.10 [*]
Metformin 0.2	0.59 ± 0.11	0.64 ± 0.06	0.65 ± 0.16	0.47 ± 0.08 [#]
LW-AFC 0.28	0.48 ± 0.11	0.66 ± 0.18	0.60 ± 0.06	0.50 ± 0.07 [#]
0.56	0.38 ± 0.09 ^{##}	0.57 ± 0.15	0.57 ± 0.14	0.50 ± 0.04 [#]
1.12	0.41 ± 0.11 [#]	0.52 ± 0.08 [#]	0.50 ± 0.10 [#]	0.46 ± 0.08 ^{##}

See Tab. 1 for the rat treatment. The serum LDL-C level was measured using oxidase method after drug given. $\bar{x} \pm s$, $n = 12$. ^{*} $P < 0.05$, compared with normal group; [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, compared with model group.

Tab. 7 Effect of LW-AFC on triglycerides (TG) of diabetic model rats

Group	TG/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$			
	2	4	6	8 (week)
Normal control	1.4 ± 0.4	2.5 ± 0.5	1.7 ± 0.4	1.6 ± 0.6
Model	3.1 ± 1.4 ^{**}	2.8 ± 1.1	1.9 ± 0.6	1.2 ± 0.4
Metformin 0.2	2.4 ± 1.5	2.6 ± 0.8	2.4 ± 0.9	1.3 ± 0.5
LW-AFC 0.28	2.7 ± 1.1	2.8 ± 0.9	2.4 ± 1.0	1.4 ± 0.4
0.56	1.9 ± 0.8 [#]	2.8 ± 1.1	2.0 ± 0.4	1.7 ± 0.6
1.12	1.8 ± 0.8 [#]	2.2 ± 0.7	1.9 ± 0.5	1.3 ± 0.5

See Tab. 1 for the rat treatment. The serum TG level was measured using oxidase method after drug given. $\bar{x} \pm s$, $n = 12$. ^{**} $P < 0.01$, compared with normal group; [#] $P < 0.05$, compared with model group.

3 讨论

既往研究表明,腹型肥胖患者较整体型肥胖患者其代谢障碍和心血管疾病发生率更高^[6],并已成为心脑血管病变的最重要的独立危险因素之一^[7]。同时,鉴于脂质异位沉积已成为诱发胰岛素抵抗重要的因素之一^[8-9],内脏脂肪水平增加对内分泌系统糖脂代谢紊乱起到了越来越重要的作用。本研究发现,模型大鼠的体质量有所下降,与文献报道一致^[10]。但 VFM 和对照组相比仍然明显增加,此外 VFC 亦明显升高,上述实验结果提示,模型大鼠呈现出严重的腹型肥胖。给予 LW-AFC 0.56 和 1.12 g·kg⁻¹ 8 周可以显著降低模型大鼠的 VFM 和 VFC,改善腹型肥胖。这种腹型肥胖的改善可能对胰岛素抵抗的缓解和改善^[11-12]、炎症反应^[13]及动脉粥样硬化^[14]等糖尿病并发症的防治都具有重要和积极的意义。

胰岛素抵抗和(或)胰岛 β 细胞分泌障碍是糖尿病的主要病理特征,而胰岛素抵抗又是 2 型糖尿病整个发病过程中的核心环节。本研究观察到模型组大鼠在 2~8 周的实验周期内表现出以稳定的高血糖和胰岛素抵抗为特征的糖代谢紊乱。给予 LW-AFC 4~8 周可显著降低血糖并明显改善胰岛素抵抗状态,提示 LW-AFC 对饮食和 STZ 联合诱导的糖尿病大鼠高血糖和胰岛素抵抗均具有明显的改善作用。LW-AFC 对胰岛素抵抗表现出明显的改善作用,提示 LW-AFC 可能通过促进外周组织利用葡萄糖,从而降低血糖,并增加胰岛素受体的数量和功能发挥作用,间接降低了胰岛素的需求量,使机体分泌胰岛素的水平下降,但具体作用机制有待进一步研究。

本研究观察到正常对照组大鼠胰岛素水平存在波动现象,可能与胰岛素测定方法不是非常稳定有关。本研究采用放射免疫分析法检测胰岛素,从方法学上看,采用放免法检测胰岛素比酶联免疫法灵敏度高,但受不同批次试剂盒同位素标记水平存在差异的影响,批间误差较大。在本研究中,为了随时获得实验过程中血糖和胰岛素水平,以动态了解模型指标变化和药物的效应,本研究对各周次的指标采取了采血完成后立即进行检测的方法,因此实验期间胰岛素水平波动较大。大鼠胰岛素的基础值一般在 15~56 mIU·L⁻¹ 之间波动^[15-17],本研究结果与文献报道基本是一致的,尚在可接受的范围内。本课题组在实验后期采用了瘦素基因缺乏的自发遗传性糖尿病小鼠——*ob/ob* 小鼠作为模型动物对 LW-AFC 的药理作用进行了进一步的深入研究。

ob/ob 小鼠由于瘦素缺乏,进而表现出明显的高胰岛素血症和胰岛素抵抗,给予 LW-AFC 对 *ob/ob* 小鼠的高胰岛素血症和胰岛素抵抗均具有明显的改善作用(待发表)。

胰岛素抵抗还可以诱发以高血脂为代表的脂代谢紊乱。胰岛素抵抗导致胰岛素抑制血浆中脂肪酸的作用降低,脂肪酸浓度升高,并最终分解为 LDL-C。高胰岛素血症通过兴奋交感神经,刺激 α-受体使脂蛋白脂酶减少,而脂蛋白脂酶的主要作用是降低肝脏极低密度脂蛋白的分泌,增加极低密度脂蛋白的清除。因此,胰岛素抵抗进一步导致极低密度脂蛋白浓度的升高。此外,胰岛素抵抗还可以通过使 LDL-C 受体活性下降和高密度脂蛋白合成受阻等多条途径进一步加重脂代谢紊乱。本研究发现模型组大鼠血清 TC 和 LDL-C 水平明显升高,形成了严重的脂代谢紊乱。LW-AFC 给药 2~8 周可不同程度地显著降低 TC 和 LDL-C,改善糖尿病大鼠的脂代谢紊乱。本研究亦发现,模型组大鼠 TG 水平在注射 STZ 后 2 周显著升高,在 6~8 周则恢复至正常对照组水平,提示模型组未能形成稳定的高 TG 血症。有文献报道, TG 的升高出现在造模 2~3 周内^[18],此后可降低甚至恢复至对照组水平,其具体机制有待进一步研究。LW-AFC 给药 2 周可以显著降低 TG 水平。本课题组在后期实验中也采用 *ob/ob* 小鼠观察了 LW-AFC 对其脂代谢的影响,实验期间各周次 *ob/ob* 小鼠的 TG 水平均显著升高且没有大的波动,给予 LW-AFC 对 *ob/ob* 小鼠的高 TG 血症具有明显的改善作用(待发表)。

现有研究表明,高血脂症与引起糖尿病并发症的主要因素——动脉粥样硬化的关系十分密切^[19-20]。在糖尿病的临床治疗过程中,《美国胆固醇教育计划成人治疗组第三次指南(NCEP ATP III)》^[21],将各项血脂指标中的 LDL-C 作为最主要调脂靶点,其主要的理由为高胆固醇血症,特别是 LDL-C 增高仍为致冠心病和动脉粥样硬化最重要的血脂改变^[22]。本研究发现,LW-AFC 对 LDL-C 的改善作用非常明显,不但起效时间早,而且作用也较持久。据此初步推测,LW-AFC 在改善糖脂代谢紊乱的同时对动脉粥样硬化也可能具有潜在的预防作用。

上述研究结果表明,LW-AFC 可同时改善糖尿病模型大鼠的腹型肥胖、降低血糖和血脂水平,并改善胰岛素抵抗状态。其中对腹型肥胖和 LDL-C 的改善作用提示其可能对糖尿病并发症具有一定的预防作用。因此,LW-AFC 用于防治糖尿病具有进一步研究开发的价值。

参考文献:

- [1] Qi CH, Zhang YX, Shen BF. Advances in study on modern pharmacology of Liuwei Dihuang decoction[J]. *Bull Acad Mil Med Sci*(军事医学科学院院刊), 2002, **26**(1):57-61.
- [2] Zhang YX, Zhao YM. *Research of Modern Pharmacology and Chemistry of Liuwei Dihuang Decoction*(六味地黄汤现代药理学与化学研究)[M]. Beijing: Science Publishing Press, 2006:209-217.
- [3] Yin XM. Effects of Pyrrolidine Dithiocarbamate on islet β -cell apoptosis in type 2 diabetic rat(吡咯烷二硫代氨基甲酸酯对 2 型糖尿病大鼠胰岛 β 细胞的凋亡作用)[D]. Hebei Medical University. 2011.
- [4] Li DQ. Clinical evaluation of two kinds of enzymatic clearance assay for determination of low-density lipoprotein cholesterol[J]. *J North Sichuan Med Coll*(川北医学院学报), 2004, **19**(1):98-100.
- [5] Luo XJ, Lu HK, Gao CY, Lu JX, Gu CC, Jia WP. Comparative study of serum insulin immunoassays and its clinical significance[J]. *Chin J Endocrinol Metab*(中华内分泌代谢杂志), 2009, **25**(6):622-625.
- [6] Pi-Sunyer FX. The epidemiology of central fat distribution in relation to disease [J]. *Nutr Rev*, 2004, **62**(7 Pt 2):S120-S126.
- [7] Pankow JS, Kwan DK, Duncan BB, Schmidt MI, Couper DJ, Golden S, *et al.* Cardiometabolic risk in impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance: the Atherosclerosis Risk in Communities Study [J]. *Diabetes Care*, 2007, **30**(2):325-331.
- [8] Lee Y, Lingvay I, Szczepaniak LS, Ravazzola M, Orzi L, Unger RH. Pancreatic steatosis: harbinger of type 2 diabetes in obese rodents [J]. *Int J Obes (Lond)*, 2010, **34**(2):396-400.
- [9] Zyromski NJ, Mathur A, Gowda GA, Murphy C, Swartz-Basile DA, Wade TE, *et al.* Nuclear magnetic resonance spectroscopy-based metabolomics of the fatty pancreas: implicating fat in pancreatic pathology [J]. *Pancreatology*, 2009, **9**(4):410-419.
- [10] Wang BW, Li Y, Liu XH, Liu S, Sun CH. Effect of the duration of high-fat diet and the dosage of streptozotocin on establishing experimental animal model of type 2 diabetes mellitus[J]. *J Hyg Res*(卫生研究), 2011, **40**(1):99-102,106.
- [11] Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, *et al.* Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB [J]. *Nat Med*, 2005, **11**(2):183-190.
- [12] Yudkin JS, Eringa E, Stehouwer CD. "Vasocrine" signalling from perivascular fat: a mechanism linking insulin resistance to vascular disease [J]. *Lancet*, 2005, **365**(9473):1817-1820.
- [13] Shin JY, Kim SY, Jeung MJ, Eun SH, Woo CW, Yoon SY, *et al.* Serum adiponectin, C-reactive protein and TNF-alpha levels in obese Korean children[J]. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2008, **21**(1):23-29.
- [14] Kotronen A, Yki-Järvinen H. Fatty liver: a novel component of the metabolic syndrome [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, **28**(1):27-38.
- [15] Du YZ, Gu ZY, Li CL, Liu Y, Ma LC, Gong YP, *et al.* Exploration of effect of aging on insulin sensitivity of Wistar rats by using the euglycaemic-hyperinsulinaemic clamp[J]. *Chin J Geriatr Heart Brain Vessel Dis*(中华老年心脑血管病杂志), 2009, **11**(5):369-372.
- [16] Zhang M, Zhao D, Wang MY, Ren LM. Effect of urethane on insulin level in rats [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*(中国药理学与毒理学杂志), 2003, **17**(5):370-374.
- [17] Cusin I, Rourou J, Rohner-Jeanrenaud F. Intracerebroventricular glucocorticoid infusion in normal rats: induction of parasympathetic-mediated obesity and insulin resistance[J]. *Obes Res*, 2001, **9**(7):401-406.
- [18] Fang LH, Kim HI, Hu JJ, Wang YH, Du GH. Antidiabetic effect and mechanisms of gemfibrozil in experimental diabetes mellitus rats[J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2009, **44**(6):426-431.
- [19] Mulè G, Cottone S, Mongiovì R, Cusimano P, Mezzatesta G, Seddio G, *et al.* Influence of the metabolic syndrome on aortic stiffness in never treated hypertensive patients[J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2006, **16**(1):54-59.
- [20] Tzou WS, Douglas PS, Srinivasan SR, Bond MG, Tang R, Chen W, *et al.* Increased subclinical atherosclerosis in young adults with metabolic syndrome: the Bogalusa Heart Study[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, **46**(3):457-463.
- [21] Scott M, Grundy MD. *Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults*[M]. NIH Publication No. 02-5215. 2001, **285**:2486-2497.
- [22] Saitoh M, Nishimura H, Tanaka T, Kondoh T. Gender-related differences in target organ damage in untreated patients with essential hypertension [J]. *Intern Med*, 2006, **45**(6):377-383.

Therapeutic effect of LW-AFC on diabetic model rats induced by high-calorie diet and streptozocin

XU Zhi-yu, CHI Xiao-li, MA Yuan, ZHOU Wen-xia, ZHANG Yong-xiang

(*Department of Traditional Chinese Materia Medica and Neuroimmunopharmacology, Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China*)

Abstract: **OBJECTIVE** To investigate effects and characteristics of Liuweidihuang decoction (LW)-AFC on diabetes mellitus. **METHODS** Diabetic rat model was established by given high-calorie diet for 5 weeks and ip given streptozocin (STZ) 30 mg·kg⁻¹ once. After that, LW-AFC 0.28, 0.56 and 1.12 g·kg⁻¹ were ig given for 8 weeks, and then the fasting blood glucose (FBG), fasting blood insulin (FBI), homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR), total cholesterol (TC), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and triglycerides (TG) were measured after LW-AFC was ig given for 2, 4, 6 and 8 weeks. At the end of the experiment, the visceral fat mass (VFM) and visceral fat coefficient (VFC) were measured. FBG, TC and TG levels were measured by oxidase methods. TG level was measured by clearance assay. FBI was determined by radioimmunoassay test. **RESULTS** Compared with normal control group, VFM and VFC in diabetic rats significantly increased ($P < 0.01$). Compared with model group, LW-AFC 0.56 and 1.12 g·kg⁻¹ could significantly reduce VFM to (16.0 ± 3.6) g, and reduce VFC to (4.3 ± 0.9)%. Compared with normal control group, FBG level in diabetic rats significantly increased ($P < 0.01$). Compared with model group, LW-AFC 1.12 g·kg⁻¹ could significantly decrease FBG level to 14.2 ± 4.0, 11.8 ± 4.9 and (11.2 ± 4.9) mmol·L⁻¹ in 4, 6 and 8 weeks. Compared with normal control group, FBI level significantly increased in 2 and 6 weeks but LW-AFC had no obvious effect on this change. Compared with model group, HOMA-IR in diabetic rats significantly increased in 2, 4, 6 and 8 weeks ($P < 0.01$) and LW-AFC 0.28 g·kg⁻¹ could significantly decrease FBG level to 17.3 ± 4.8, 17.4 ± 6.7 and (4.1 ± 2.4) mmol·L⁻¹ in 4, 6 and 8 weeks. LW-AFC could also improve lipid metabolism disorders. Compared with normal control group, TC level in model group significantly increased, and LW-AFC 1.12 g·kg⁻¹ could significantly decrease TC to 2.34 ± 0.22, 2.09 ± 0.29 and (2.16 ± 0.22) mmol·L⁻¹. Compared with normal group, LDL-C level in model group significantly increased, and LW-AFC 1.12 g·kg⁻¹ could significantly decrease LDL-C level to (0.41 ± 0.11) mmol·L⁻¹ in 2 weeks, and decrease LDL-C level to 0.50 ± 0.10 and (0.46 ± 0.08) mmol·L⁻¹. Compared with normal group, TG level in model group significantly increased in 2 weeks, and LW-AFC 0.56 and 1.12 g·kg⁻¹ could significantly decrease TG level to 1.9 ± 0.8 and (1.8 ± 0.8) mmol·L⁻¹. **CONCLUSION** LW-AFC can ameliorate obesity, glyco-metabolism and lipid metabolism disaster and insulin resistance on diabetic rats.

Key words: Liuweidihuang decoction; LW-AFC; diabetes mellitus, experimental; blood glucose; insulin

Foundation item: The project supported by National Mega-project of Science Research of China (2009ZX09301-002); National Mega-project of Science Research of China (2009ZX09502-017); National Natural Science Foundation of China (90709012); National Natural Science Foundation of China (30772562); National Natural Science Foundation of China (30701073); and National Natural Science Foundation of China (30901818)

Corresponding author: ZHOU Wen-xia, E-mail: zhouwx@ nic. bmi. ac. cn, Tel: (010)66931625

(收稿日期: 2011-09-09 接受日期: 2012-01-19)

(本文编辑: 齐春会)