

益气养阴方对2型糖尿病大鼠脂代谢的影响

任蓁¹, 代培方¹, 刘悦², 张晶², 穆欣^{1*}, 刘跟莉^{3*}

(1. 黑龙江中医药大学附属第一医院, 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040;
3. 黑龙江中医药大学附属第二医院, 哈尔滨 150001)

[摘要] 目的: 观察药食同源益气养阴方对高脂饲料联合链脲佐菌素(STZ)腹腔注射建立的2型糖尿病(T2DM)大鼠模型脂代谢的影响, 探讨其在调控脂代谢方面的作用机制。方法: 高脂饲料喂养大鼠4周, 腹腔注射STZ制备T2DM大鼠模型。糖尿病大鼠随机分为模型组、益气养阴高、中、低剂量组(9.00, 4.50, 2.25 g·kg⁻¹)和二甲双胍组(0.20 g·kg⁻¹), 另设正常组。益气养阴方高、中、低剂量组分别给予口服不同剂量的益气养阴方颗粒, 二甲双胍组给予二甲双胍, 模型组、正常组均给予同体积生理盐水干预。连续灌胃3周, 测定体质量、血糖, 全自动生化分析仪检测甘油三酯(TG), 总胆固醇(TC), 低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C), 高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C), 天门冬氨酸氨基转移酶(AST), 丙氨酸氨基转移酶(ALT), 碱性磷酸酶(ALP), 总蛋白(TP)的含量; 苏木素-伊红(HE)染色观察各组肝脏组织病理变化情况; PAS染色观察肝脏组织肝糖原病理变化情况; 油红O染色观察肝脏组织脂质变化情况; 蛋白免疫印迹法(Western blot)观察肝脏组织腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)/固醇调节元件结合蛋白1c(SREBP-1c)/乙酰辅酶A羧化酶1(ACC1)/过氧化物酶体增殖激活受体α(PPARα)通路蛋白表达情况。结果: 与正常组比较, 模型组TG, TC, LDL-C, AST, ALT, ALP含量明显升高, HDL-C含量明显降低($P<0.05$, $P<0.01$), 与模型组比较, 益气养阴方各组可显著降低大鼠血清中TG, LDL-C含量($P<0.05$, $P<0.01$), 显著增加HDL-C含量($P<0.05$); 组织形态学检测显示, 益气养阴方对肝脏中肝细胞胞间空泡、脂肪变性程度显著减轻, 肝脏组织脂质区域显著缩小; 与正常组比较, 模型组肝脏组织中p-AMPKα, PPARα, SREBP-1(浆)蛋白表达显著降低, p-ACC1, SREBP-1(核)蛋白表达显著升高($P<0.01$); 与模型组比较, 益气养阴方对肝脏组织中p-AMPKα, PPARα, SREBP-1(浆)蛋白表达显著升高($P<0.05$, $P<0.01$), p-ACC1, SREBP-1(核)蛋白表达显著降低($P<0.05$, $P<0.01$)。结论: 益气养阴方对高脂饲料联合STZ引起的T2DM大鼠血脂升高具有明显的降低作用; T2DM大鼠血脂的降低可能与影响大鼠肝脏AMPK/ACC1/SREBP-1/PPARα通路有关。

[关键词] 益气养阴方; 2型糖尿病; 脂代谢

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)07-0057-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210302

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210127.0836.001.html>

[网络出版日期] 2021-1-27 11:10

Effect of Yiqi Yangyin Prescription on Lipid Metabolism in Rats with Type 2 Diabetes

REN Zhen¹, DAI Pei-fang¹, LIU Yue², ZHANG Jing², MU Xin^{1*}, LIU Gen-li^{3*}

(1. First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;

2. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;

3. Second Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150001, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Yiqi Yangyin prescription on lipid metabolism in type 2 diabetes rat model induced by high fat diet combined with intraperitoneal injection of streptozocin (STZ), and explore its mechanism in regulation of lipid metabolism. **Method:** The rats were fed with high-fat diet for 4 weeks, and intraperitoneal injection of STZ was provided to establish diabetes model. The diabetic rats were

[收稿日期] 20201203(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373537)

[第一作者] 任蓁, 博士, 副教授, 从事药食同源物质饮食研究, E-mail: 18646301160@163.com

[通信作者] *穆欣, 教授, 博士生导师, 从事临床中药药食同源物质的研究, E-mail: mu-xin-mu-xin@163.com;

*刘跟莉, 博士, 副主任护师, 从事临床护理研究, E-mail: 26809961@qq.com

randomly divided into model group, Yiqi Yangyin prescription high dose group, medium dose group and low dose group ($9.00, 4.50, 2.25 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and metformin group ($0.20 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Another blank control group was set up. The high, medium and low dose groups were given with different oral doses of Yiqi Yangyin prescription granules, metformin was given in metformin group, the model group and the blank group received the same volume of normal saline. Intragastric administration was given for three weeks, and then the weight and blood glucose were measured. Automatic biochemical analyzer was used to detect triglyceride (TG), total cholesterol (TC), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), and content of total protein (TP). Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of liver tissues in each group. Periodic acid-schiff stain (PAS) staining was used to observe the pathological changes of liver glycogen. The lipid changes of liver tissues were observed by oil red O staining. The expression of adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK)/sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP1c)/acetyl-coenzyme A carboxylase (ACC1)/peroxisome proliferator activated re-ceptor α (PPAR α) pathway in liver tissues was observed by Western blot. **Result:** Compared with the blank group, TG, CHO, LDL-C, AST, ALT and ALP significantly increased and HDL-C significantly decreased in the model group ($P<0.05, P<0.01$). Compared with the model group, TG and LDL-C contents significantly decreased ($P<0.05, P<0.01$) and LDL-C contents significantly increased in Yiqi Yangyin prescription groups ($P<0.05$). Histomorphology showed that Yiqi Yangyin prescription significantly reduced the degree of hepatocyte intercellular vacuoles and steatosis in liver, and significantly reduced the lipid area of liver tissue. Compared with the blank group, the protein expression levels of p-AMPK α , PPAR α , SREBP-1 (plasma) in the liver tissues significantly decreased in the model group, but such expression levels increased after treatment with Yiqi Yangyin prescription ($P<0.05, P<0.01$), compared with the blank group, the protein expression levels of p-ACC1 and SREBP-1 (nuclear) significantly increased ($P<0.01$) in model group, but such expression significantly decreased after treatment with Yiqi Yangyin prescription ($P<0.05, P<0.01$). **Conclusion:** Yiqi Yangyin prescription can significantly reduce blood lipid in the diabetic rats caused by high-fat feed combined with STZ. The decrease of blood lipid in the type 2 diabetes rats may be related to the influence on AMPK/ACC1/SREBP-1/PPAR pathway in rat liver.

[Key words] Yiqi Yangyin prescription; type 2 diabetes; lipid metabolism

糖尿病是由遗传和环境因素共同作用而引起的一组以慢性高血糖为特征的代谢紊乱性疾病,发病基础是胰岛素抵抗和胰岛素分泌缺陷,其中2型糖尿病(T2DM)是威胁人类健康的主要类型,占有糖尿病患者的95%左右。有研究表明,糖尿病与脂类代谢紊乱的发生密切相关^[1],糖尿病患者脂类代谢紊乱的发病风险是一般人群的3倍^[2],目前除生活干预外,临床上采用药食同源物质干预糖尿病或糖尿病引起脂代谢紊乱已逐渐受到人们的关注^[3]。

药食同源中药以其天然、低毒、安全、价廉的优点,在全方位、全周期维护人民群众健康中发挥出独特的优势。尤其在改善代谢综合征早期腹型肥胖、血脂、血糖代谢紊乱的干预中的效果已得到证实^[4-19]。药食同源中药的研究当前主要以单味药的

功能或功效研究较多,对复方的研究较少,而临床应用或饮食调理上一般以复方较多。在前期研究中,将110种药食同源中药作为研究对象,通过《中药大辞典》进行单味药性味归经筛选,通过《方剂大辞典》查询,将由药食同源物质组成的方剂进行归纳、整理,以临床常见的气阴两虚型消渴病为研究目的,通过专家咨询最终组成的益气养阴方。经临床观察证明,该方对气阴两虚型消渴病(T2DM)及糖尿病合并脂代谢紊乱患者具有一定的改善效果。为证明其该方的有效性和作用机制,采用高脂喂养联合链脲佐菌素(STZ)注射诱导的T2DM大鼠模型,研究该方对此模型大鼠的肝脏功能及脂质代谢的影响,并探讨其作用机制,为药食同源益气养阴方的进一步研究开发和临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 动物 健康SPF级SD大鼠,雄性,体质重180~220 g,由哈尔滨医科大学实验动物中心提供,动物合格证号SCXK(黑)2016-004。动物实验获哈尔滨医科大学实验动物伦理委员会批准,编号2017101005。实验前,分笼饲养,适应性饲养3 d。大鼠饲料购自于北京科澳协力饲料有限公司,批号20120710。正常饲料成分为豆粕、鱼粉、酵母粉、面粉、食盐、植物油、多种维生素和矿物元素等;糖尿病模型特殊饲料(即高糖高脂饲料)成分为大鼠正常饲料(67%),猪油(10%),蔗糖(20%),胆固醇(2.5%)和胆酸钠(0.5%)。

1.2 试剂 STZ(麦克林企业有限公司,货号18883-66-4);盐酸二甲双胍片(澳大利亚艾华大药厂,批号8066462);内参抗体 β -肌动蛋白(β -actin)(沈阳万类生物有限公司,批号WL01845);羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G-辣根过氧化物酶(HRP)(沈阳万类生物有限公司,批号WLA023);苏木素染料(上海化学试剂研究所有限公司,批号820408);过碘酸雪夫(PAS)染色液(北京雷根生物技术有限公司,批号DG0005);油红O试剂(美国Sigma公司,批号O0625);BCA蛋白定量试剂盒(北京康为世纪科技有限公司,批号CW0014S);高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C),低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C),总胆固醇(TC),甘油三酯(TG),丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST),碱性磷酸酶(ALP),总蛋白(TP)测试试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司提供,批号分别为180721,191301,182022,187831,182681,181361,181511,181511);苯甲基磺酰氟(PMSF,北京碧云天生物技术有限公司,批号ST506);蛋白酶抑制剂混合物(Protease Inhibitor Cocktail,美国APExBio公司);十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)叠加凝胶缓冲液,SDS-PAGE加样缓冲液,SDS-PAGE分离胶缓冲液,多色标记蛋白Marker,Tris缓冲液(TBST)(北京康为世纪科技有限公司,批号分别为CW0025, CW0028S, CW0026, CW2841, CW0043S);磷酸化(p)-腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK) α , AMPK α ,乙酰辅酶A羧化酶1(ACC1),p-ACC1抗体[维百奥(北京)生物技术有限公司,批号分别为AF3423, WL02254, AF6241, AF3421];过氧化物酶体增殖激活受体 α (PPAR α),固醇调节元件结合蛋白1c(SREBP-1c)抗体(沈阳万类生物有限公司,批号分别为WL00978, WL02093);10%中性缓冲磷酸盐缓

冲液固定液(北京益利精细化学品有限公司,批号20190305);无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司,批号10009218)。

1.3 仪器 H-2050R型超速冷冻台式离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);ELX-800型全自动酶标仪(美国BioTek公司);ACCU-CHEK型血糖仪(德国罗氏诊断有限公司);F10型匀浆器(上海弗鲁克科技发展有限公司);2000型全自动生化分析仪(美国MD公司魅力);RM2235型切片机,DM6B型正置荧光显微镜,CM1860型冰冻切片机(德国Leica公司);QH01-9030A型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);WD-9405B型水平摇床,DYY-12型电泳仪,DYY-6D型转膜仪(北京六一仪器厂);7600-020型全自动生化分析仪(日本日立公司);DP73型显微镜拍照系统(日本Olympus公司)。

2 方法

2.1 益气养阴方制备 方中黄芪20 g,山药20 g,西洋参5 g,玉竹10 g,黄精10 g,山萸肉10 g,豆豉10 g,葛根5 g,山楂10 g,共9味中药,购自于黑龙江中医药大学附属第一医院,经黑龙江中医药大学药学院中药鉴定教研室苏连杰教授鉴定,符合2015年版《中华人民共和国药典》规定标准。全方共100 g,加10倍量水浸泡2 h,回流60 min,滤过。药渣再同样方法煎煮1次。合并2次滤液,减压浓缩至生药0.9 g·mL⁻¹的药液,4℃冰箱冷藏备用。临用时调节成所需给药浓度。

2.2 T2DM大鼠模型制备^[20] SD大鼠,每天喂食高糖高脂饲料,自由饮水。另取6只大鼠,喂食基础饲料,作为正常组。高糖高脂饮食4周后,禁食不禁水过夜(禁食时间>12 h),每只大鼠腹腔注射STZ(1%)溶液,剂量为35 mg·kg⁻¹,体积为3.5 mL·kg⁻¹。正常组大鼠腹腔注射等体积溶剂(柠檬酸缓冲液)。在注射后第3天和第7天,剪尾尖取血测定血糖值。2次血糖值均>11.1 mmol·L⁻¹者为造模成功大鼠用于实验研究。

2.3 分组及给药 将造模成功的46只大鼠以血糖值和体质量为标准随机分为5组,益气养阴方高、中、低剂量组(9.0, 4.5, 2.25 g·kg⁻¹),二甲双胍组(0.2 g·kg⁻¹)和模型组。另外6只大鼠作为正常组。实验动物给药剂量按照体表面积换算法折算,分别为人临床等效剂量的1, 0.5, 0.25倍。造模4周后,每只大鼠灌胃体积均为10 mL·kg⁻¹,每天给药1次,连续灌胃给药3周。末次给药后2 h,麻醉动物取

血,称取肝脏质量,并计算肝脏指数。

2.4 全自动生化分析仪测定血清TC,TG,LDL-C,HDL-C含量 各组大鼠禁食不禁水过夜,末次给药2 h后,用5%水合氯醛腹腔注射($7\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)进行麻醉。钝性分离腹主动脉后,用不含抗凝剂采血管接取5 mL血液,室温静置2 h后, $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min(离心半径3 cm),分离血清。按照TC,TG,LDL-C,HDL-C测定试剂盒说明书,用全自动生化分析仪测定血清中TC,TG,LDL-C,HDL-C的含量。

2.5 全自动生化分析仪测定血清AST,ALT,ALP,TP含量 采血及血清分离方法及步骤同2.4项。按照AST,ALT,ALP,TP测定试剂盒说明书,采用全自动生化分析仪测定血清中AST,ALT,ALP,TP的含量。

2.6 苏木素-伊红(HE)染色观察肝脏组织形态学变化 各组大鼠禁食不禁水过夜,末次给药2 h后,用5%水合氯醛腹腔注射($7\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)进行麻醉,取肝脏组织,中性多聚甲醛固定液固定,梯度乙醇脱水,石蜡包埋, $5\text{ }\mu\text{m}$ 连续切片,二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,蒸馏水浸洗。常规HE染色,200倍光镜下观察肝脏组织形态学变化。

2.7 PAS染色检测肝糖原表达 取同HE染色样本的肝脏组织,中性多聚甲醛固定液固定,梯度乙醇脱水,石蜡包埋, $5\text{ }\mu\text{m}$ 连续切片,二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,蒸馏水浸洗。常规PAS染色,200倍光镜下观察肝糖原(被染成紫红色)含量,采用Image J 1.52v分析软件统计肝糖原面积。

2.8 油红O染色观察肝脏组织脂质的变化 将固定过夜的肝脏组织脱水,预冷,切成 $10\text{ }\mu\text{m}$ 的薄片,快速贴附在载玻片上,晾干后,在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。60%异丙醇浸洗,放于60%油红O染液常温染

色15 min,60%异丙醇分化至间质清晰,蒸馏水洗涤,Mayer苏木素复染1 min,蒸馏水洗涤,晾干,甘油明胶封片,光学显微镜下镜检。置于镜下拍照并用Image J 1.52v分析软件统计脂质面积。

2.9 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白的表达 取大鼠肝脏组织150 mg,加入蛋白裂解液,冰浴裂解30 min,BCA法测定总蛋白浓度。SDS-PAGE凝胶电泳分离,每孔上样量 $60\text{ }\mu\text{g}$ 。一抗 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜(SREBP-1c 1:1 000, p-AMPK α 1:1 000,其余均为1:500),TBST洗涤3次,每次5 min,将膜置于TBST稀释的山羊抗兔HRP偶联的二抗(羊抗兔IgG-HRP 1:5 000)中,室温孵育2 h,TBST洗涤3次,滴加eECL化学发光剂 $300\text{ }\mu\text{L}$ 显影,避光孵育3 min后,滤纸吸去发光液。采用Image J 1.52v分析软件分析条带灰度值。计算各蛋白相对表达量变化情况。

2.10 统计学方法 采用SPSS 16.0统计学分析软件进行数据处理,数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较满足方差齐性采用单因素方差分析方法,不满足方差齐性时用非参数检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对T2DM大鼠肝脏质量、肝脏指数的影响 与正常组比较,模型组、益气养阴方中、低剂量组及二甲双胍组大鼠体质量、肝脏质量显著降低($P<0.01$);与模型组比较,各给药大鼠体质量明显升高($P<0.05$),肝脏质量差异无统计学意义;与正常组比较,模型组大鼠肝脏指数显著升高($P<0.05$),与模型组比较,益气养阴方中、低剂量组及二甲双胍组大鼠肝脏指数明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),益气养阴方高剂量组大鼠肝脏指数有降低趋势,但差异无统计学意义。见表1。

表1 益气养阴方对T2DM大鼠肝脏质量、肝脏指数变化的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Effect of Yiqi Yangyin prescription on liver weight and liver index changes in T2DM rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	<i>n</i>	体质量/g	肝脏质量/g	肝脏指数/%
正常		6	435.1 $\pm$ 29.6	14.6 $\pm$ 0.87	3.36 $\pm$ 0.09
模型		8	352.7 $\pm$ 39.6 ¹⁾	12.9 $\pm$ 1.15 ¹⁾	3.67 $\pm$ 0.33 ²⁾
二甲双胍	0.2	9	400.7 $\pm$ 39.1 ²⁾	12.0 $\pm$ 1.48	3.00 $\pm$ 0.32 ³⁾
益气养阴	9.0	10	406.5 $\pm$ 41.4 ²⁾	13.5 $\pm$ 1.23	3.35 $\pm$ 0.37
	4.5	10	399.4 $\pm$ 41.1 ²⁾	12.9 $\pm$ 1.13	3.24 $\pm$ 0.31 ²⁾
	2.25	9	397.5 $\pm$ 43.4 ²⁾	12.2 $\pm$ 0.96	3.09 $\pm$ 0.37 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ 。

3.2 对T2DM大鼠血清中TC,TG,LDL-C,HDL-C含量的影响 与正常组比较,模型组大鼠血清中

TG,TC,LDL含量显著增加($P<0.01$),HDL-C含量明显降低($P<0.05$);与模型组比较,益气养阴方高、

中剂量组大鼠血清中 TG, TC, LDL-C 含量明显降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), HDL-C 含量明显增加 ($P<0.05$), 益气养阴方低剂量组大鼠血清中 TG 含量显著降低 ($P<0.01$), HDL-C 含量明显增加 ($P<0.05$), TC,

LDL-C 含量有降低趋势,但差异无统计学意义,二甲双胍组 TG 含量显著降低 ($P<0.01$),差异有显著统计学意义,TC, HDL-C, LDL-C 含量差异无统计学意义。见表 2。

表 2 益气养阴方对 T2DM 大鼠血清中 TC, TG, LDL-C, HDL-C 含量的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Effect of Yiqi Yangyin prescription on contents of TC, TG, LDL-C, HDL-C in serum of T2DM rats ($\bar{x}\pm s$) mmol·L⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	TG	TC	HDL-C	LDL-C
正常		6	0.41±0.11	1.52±0.22	1.48±0.059	0.50±0.046
模型		8	1.35±0.42 ²⁾	1.98±0.19 ²⁾	1.40±0.046 ¹⁾	0.63±0.075 ²⁾
二甲双胍	0.2	9	0.41±0.18 ⁴⁾	1.83±0.30	1.44±0.060	0.58±0.092
益气养阴	9.0	10	0.43±0.10 ⁴⁾	1.62±0.13 ⁴⁾	1.46±0.057 ³⁾	0.51±0.051 ⁴⁾
	4.5	10	0.47±0.09 ⁴⁾	1.61±0.16 ⁴⁾	1.45±0.045 ³⁾	0.54±0.069 ³⁾
	2.25	9	0.46±0.14 ⁴⁾	1.76±0.27	1.45±0.048 ³⁾	0.56±0.084

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ 。

3.3 对 T2DM 大鼠血清中 AST, ALT, ALP, TP 含量的影响 与正常组比较,模型组大鼠肝功能指标 AST, ALT, ALP 明显增加 ($P<0.05$), TP 含量差异无统计学意义;与模型组比较,益气养阴方高、中、低

剂量组大鼠肝功能指标 AST, ALT, ALP 明显降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), TP 含量差异无统计学意义,二甲双胍组大鼠肝功能指标 ALP 明显降低 ($P<0.05$), AST, ALT, TP 均差异无统计学意义。见表 3。

表 3 益气养阴方对 T2DM 大鼠血清中 AST, ALT, ALP, TP 含量的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Effect of Yiqi Yangyin prescription on AST, ALT, ALP and TP in serum of T2DM rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	AST/U·L ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	ALP/g·L ⁻¹	TP/g·L ⁻¹
正常		6	45.3±5.62	29.9±5.06	258.2±26.3	49.9±2.21
模型		8	55.4±7.70 ¹⁾	42.0±8.74 ¹⁾	442.9±163.2 ¹⁾	51.1±4.50
二甲双胍	0.2	9	50.4±5.70	40.5±5.90	252.9±41.6 ²⁾	51.0±2.55
益气养阴	9.0	10	43.8±11.97 ²⁾	28.9±10.50 ²⁾	274.0±97.7 ²⁾	49.1±2.48
	4.5	10	43.6±12.06 ²⁾	27.6±10.45 ²⁾	264.4±99.8 ²⁾	50.8±2.12
	2.25	9	42.3±7.38 ³⁾	20.9±5.23 ³⁾	276.1±105.4 ²⁾	51.6±2.44

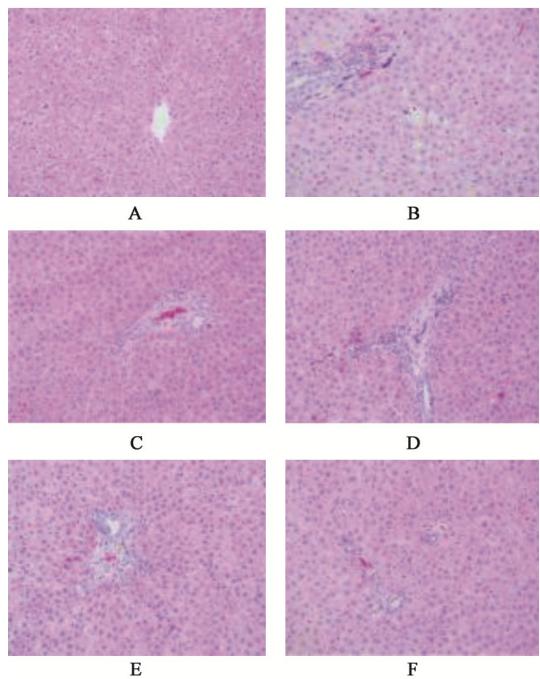
注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ 。

3.4 对 T2DM 大鼠肝脏组织病理变化的影响 正常组大鼠肝脏组织中肝细胞排列整齐,结构清晰。与正常组比较,模型组大鼠肝脏组织中肝细胞肿胀、脂肪变性伴大量细胞间空泡、少许炎细胞浸润;与模型组比较,益气养阴方高、中、低剂量组及二甲双胍组肝脏中肝细胞大小正常、排列整齐、结构清晰,极少胞间空泡、脂肪变性显著减轻。见图 1。

3.5 对 T2DM 大鼠肝脏组织脂质变化的影响 正常组大鼠肝脏组织油红 O 染色呈现阴性(无红色区域出现)。模型组大鼠肝脏组织存在大量油红 O 染色阳性区域(红色的脂质),阳性区域面积显著增加 ($P<0.01$);与模型组比较,益气养阴方高、中、低剂量组及二甲双胍组肝脏组织油红 O 染色阳性区域显著缩小 ($P<0.01$)。见图 2,表 4。

3.6 对 T2DM 大鼠肝脏组织肝糖原的影响 正常组大鼠肝脏组织大面积 PAS 染色阳性(细胞浆深紫色),模型组大鼠肝脏组织 PAS 染色阳性区域显著减少 ($P<0.01$)。与模型组比较,益气养阴方高、中、低剂量组及二甲双胍组肝脏组织 PAS 染色阳性区域显著增加 ($P<0.01$)。见图 3,表 4。

3.7 对 T2DM 大鼠肝脏组织脂质代谢相关通路蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠肝脏组织中 p-AMPK α , PPAR α , SREBP-1(浆)蛋白表达显著降低 ($P<0.01$), P-ACC1, SREBP-1(核)蛋白表达显著升高 ($P<0.01$), AMPK α , ACC1 蛋白表达差异无统计学意义;与模型组比较,益气养阴方高、中、低剂量组及二甲双胍组肝脏组织中 p-AMPK α , PPAR α , SREBP-1(浆)蛋白表达明显升高 ($P<0.05$,



A. 正常组;B. 模型组;C. 二甲双胍组;D. 益气养阴方高剂量组;E. 益气养阴方中剂量组;F. 益气养阴方低剂量组(图 2~4 同)

图 1 益气养阴方对 T2DM 大鼠肝脏组织病理变化的影响 (HE, ×200)

Fig. 1 Effect of Yiqi Yangyin Prescription on pathological changes of liver tissue of T2DM rats (HE, ×200)

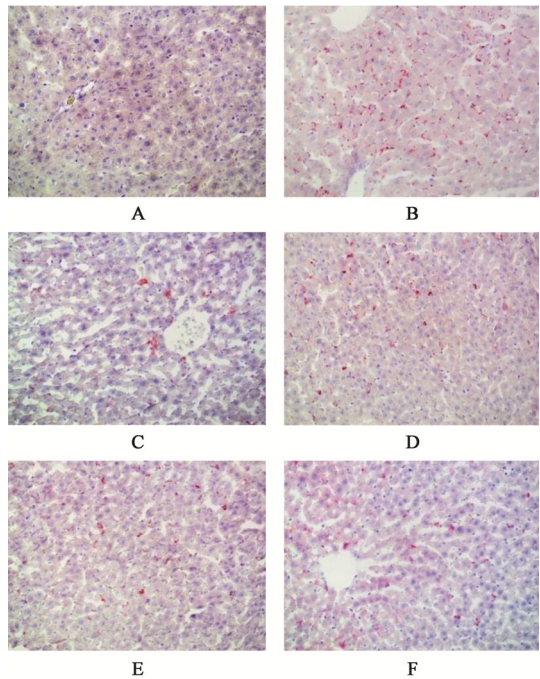


图 2 益气养阴方对 T2DM 大鼠肝脏组织脂质变化的影响 (油红 O, ×200)

Fig. 2 Effect of Yiqi Yangyin prescription on lipid changes in liver tissue of T2DM rats (oil red O, ×200)

$P<0.01$), P-ACC1, SREBP-1(核)蛋白表达明显降低 ($P<0.05$, $P<0.01$); AMPK α , ACC1 蛋白表达差异无

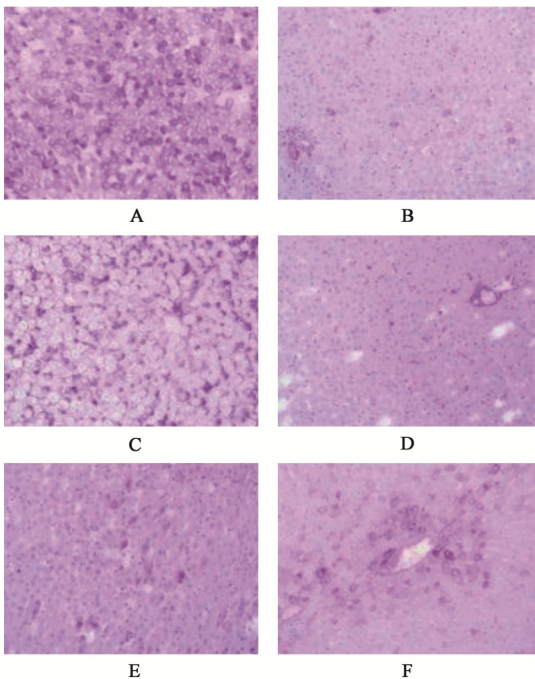


图 3 益气养阴方对 T2DM 大鼠肝脏组织肝糖原含量变化的影响 (PAS, ×200)

Fig. 3 Effect of Yiqi Yangyin prescription on hepatic glycogen content of T2DM rats (PAS, ×200)

表 4 益气养阴方对 T2DM 大鼠肝组织中肝糖原含量的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 4 Effect of Yiqi Yangyin prescription on changes of lipid and hepatic glycogen content in T2DM rat liver tissue ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	面积($\times 10^4$)/ μm^2
正常		11.05 $\pm$ 2.377
模型		0.26 $\pm$ 0.105 ¹⁾
二甲双胍	0.2	5.90 $\pm$ 0.477 ²⁾
益气养阴	9.0	0.77 $\pm$ 0.069 ²⁾
	4.5	1.80 $\pm$ 0.226 ²⁾
	2.25	4.78 $\pm$ 0.325 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.01$ 。

统计学意义。见表 5, 图 4。

4 讨论

中医学认为 T2DM 的主要病机之一是“气阴两虚”,主要表现为阴虚为本、燥热为标^[21]。阴虚和燥热两者共同构成本病的病理基础,阴虚日久或者燥热耗气伤阴,也会加重气阴两虚,甚至导致阴阳俱虚。现代研究发现, T2DM 气阴两虚证主要临床表现包括胰岛素分泌缺陷、胰岛素受体减少及胰腺多种与血糖调节相关的物质分泌异常,而这些表现是 T2DM 患者临床最常见的症状^[22]。因此,历代医学家都以益气养阴法作为治疗 T2DM 的重要治疗方

表 5 益气养阴方对 T2DM 大鼠肝脏组织脂质代谢相关通路蛋白表达量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Yiqi Yangyin prescription on relative expression of proteins related to lipid metabolism in T2DM rat liver ($\bar{x}\pm s, n=3$)								
组别	剂量/g·kg ⁻¹	p-AMPK α / β -actin	AMPK α / β -actin	p-ACC1 / β -actin	ACC1 / β -actin	PPAR α / β -actin	SREBP-1(浆) / β -actin	SREBP-1(核) / β -actin
模型		0.32 $\pm$ 0.08 ²⁾	0.99 $\pm$ 0.07	4.49 $\pm$ 0.53 ²⁾	0.94 $\pm$ 0.10	0.20 $\pm$ 0.05 ²⁾	0.25 $\pm$ 0.04 ²⁾	4.03 $\pm$ 0.47 ²⁾
二甲双胍	0.2	0.78 $\pm$ 0.09 ⁴⁾	1.01 $\pm$ 0.10	1.95 $\pm$ 0.21 ⁴⁾	1.02 $\pm$ 0.09	0.73 $\pm$ 0.07 ⁴⁾	0.70 $\pm$ 0.05 ⁴⁾	1.89 $\pm$ 0.22 ⁴⁾
益气养阴	9.0	0.42 $\pm$ 0.07 ³⁾	0.98 $\pm$ 0.08	3.37 $\pm$ 0.28 ⁴⁾	0.97 $\pm$ 0.12	0.34 $\pm$ 0.10 ³⁾	0.29 $\pm$ 0.09 ³⁾	3.52 $\pm$ 0.35 ³⁾
	4.5	0.56 $\pm$ 0.04 ⁴⁾	1.05 $\pm$ 0.08	2.86 $\pm$ 0.33 ⁴⁾	0.95 $\pm$ 0.07	0.41 $\pm$ 0.08 ⁴⁾	0.37 $\pm$ 0.08 ³⁾	3.13 $\pm$ 0.29 ⁴⁾
	2.25	0.67 $\pm$ 0.08 ⁴⁾	1.06 $\pm$ 0.07	2.41 $\pm$ 0.18 ⁴⁾	1.02 $\pm$ 0.15	0.56 $\pm$ 0.09 ⁴⁾	0.39 $\pm$ 0.07 ⁴⁾	2.30 $\pm$ 0.30 ⁴⁾

注:设正常组各指标蛋白相对表达量为 1;与正常组比较 ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$;与模型组比较 ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$ 。

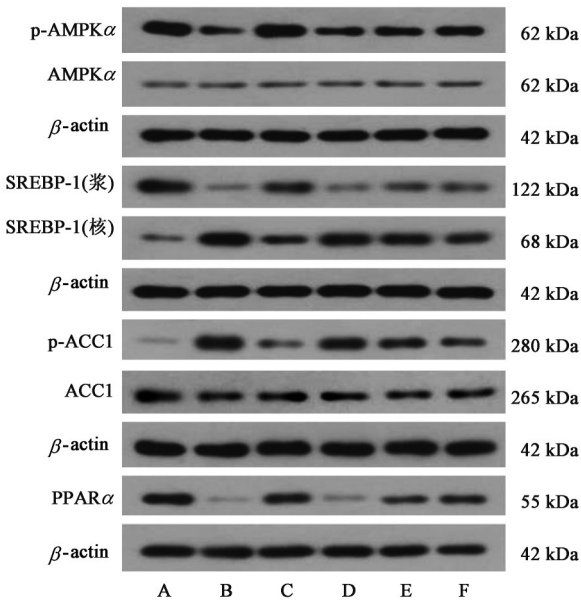


图 4 各组大鼠肝脏组织脂类代谢相关通路蛋白表达电泳
Fig. 4 Electrophoresis of lipid metabolism related pathway proteins expression in liver tissue of rats in each group

法^[23-27]。方中黄芪、山药、西洋参性味甘平微温,有补气养阴之功效;玉竹、黄精性味甘平、山萸肉性味酸涩微温,三者并用取养阴生津固涩之功;豆豉、葛根性味分别为苦寒、甘辛,有清热生津除烦功效。本方选择的药物均为药食同源的药物,同时高度契合 T2DM 发病过程中气阴两虚的关键病机,上述诸药共奏益气养阴、清热生津的功效。而方中选择的药物很多现代研究均证实能够改善 T2DM 临床症状,逆转糖脂代谢异常或者保护胰岛功能。

T2DM 是以血糖升高、血脂谱异常及胰岛素抵抗(IR)为重要特征的一种代谢综合症。糖脂代谢紊乱是 T2DM 最基础的病理表现特征。糖原是葡萄糖在机体内的主要储存形式,其合成与分解作用受胰岛素的调节,胰岛素通过调控糖原的合成与分解,维持体内血糖的平衡。研究表明,糖尿病患者体内的肝糖原含量明显低于正常群体。本实验结

果显示,经益气养阴方干预后,观察到各剂量组大鼠肝糖原含量明显升高。说明益气养阴方可通过降低模型动物高血糖,增加血液中血糖的摄取,促进糖原合成,从而维持血糖平衡^[28]。

血脂异常是与糖尿病有关的一种代谢性异常,其特点是脂质和脂蛋白出现定量和定性的改变,被称为糖尿病性血脂异常,表现为高 TG 血症,HDL-C 降低和 LDL-C 升高^[29]。实验结果显示,与正常组比较,模型组大鼠血清中 TG,TC,LDL 含量显著增加,而 HDL-C 含量显著降低。治疗后大鼠肝脏质量及肝脏指数也较模型组改善。说明 T2DM 模型大鼠中出现血脂代谢紊乱。益气养阴方干预后,血清中 TG,TC,LDL-C 含量显著降低,HDL-C 含量显著增加,提示益气养阴方可以降低血脂水平,缓解肝脏脂质的蓄积,有效调节 T2DM 模型大鼠血脂代谢紊乱。

肝脏是机体脂肪代谢的重要场所,其结构及功能的正常是肝脏发挥正常作用的基础,本研究显示,模型组大鼠肝功能指标 AST,ALT,ALP 较正常组显著增加,而 TP 含量无显著变化,说明造模后大鼠即开始出现肝脏代谢功能障碍,主要表现为 AST,ALT,ALP 升高。而给予益气养阴方治疗能够不同程度的改善 AST,ALT,ALP,说明益气养阴方治疗 T2DM 同时具有较好的肝脏保护作用。病理研究中发现,造模后大鼠肝脏组织中肝细胞肿胀,脂肪变性伴大量细胞间空泡,少许炎细胞浸润,说明 T2DM 大鼠脂质代谢异常与肝脏功能障碍密切相关。给予益气养阴方治疗能够改善肝脏病理形态学变化,主要表现为肝细胞大小正常,排列整齐,结构清晰,极少胞间空泡,脂肪变性显著减轻,而这可能是益气养阴方治疗 T2DM,改善脂质代谢的重要结构基础。

肝脏脂质代谢除了依赖正常的肝脏结构及功能外,尚由机体多种细胞信号通路进行调控。肝脏对体内糖、脂代谢调节具有重要作用,当肝糖输出

过度进而出现肝糖代谢紊乱时,容易诱发胰岛素抵抗,T2DM等相关疾病。而AMPK信号通路被证实与肝脏糖脂代谢密切相关,AMPK即AMP依赖的蛋白激酶,AMPK通过激活ATP产生途径,同时能够减少其消耗,因此是各种细胞生命活动的重要能量代谢调节器。现有研究表明,AMPK磷酸化后可激活葡萄糖转运体(GLUT),进而促进糖代谢^[30]。而过氧化物酶活化受体(PPAR α)参与脂质和葡萄糖代谢,脂肪细胞分化,炎症反应等调控反应过程。也有研究表明AMPK/GLUT4/GSK3 β 信号通路可能与PPAR α 具有相互作用。PPAR α 主要通过促进细胞代谢,从而加强肝脏和骨骼肌中存储的脂质进行氧化代谢。本研究表明,模型组大鼠肝脏组织中p-AMPK α , PPAR α , SREBP-1(浆)蛋白表达均显著降低,而p-ACC1, SREBP-1(核)蛋白表达显著升高,说明T2DM模型大鼠肝脏中AMPK信号通路被抑制,表现为磷酸化AMPK α 降低。给予益气养阴方治疗能够调控糖脂代谢相关信号通路表达,从而达到调节肝脏糖脂代谢,治疗T2DM的作用。本研究还发现,益气养阴方可使肝脏组织中p-AMPK α , PAR α , SREBP-1(浆)蛋白表达显著升高,p-ACC1, SREBP-1(核)蛋白表达显著降低。说明益气养阴方可能通过调控肝脏AMPK/SREBP1c/ACC1/PPAR α 通路,抑制脂肪酸合成,促进脂肪酸代谢,从而降低肝脏脂质水平。

[参考文献]

- [1] KOSMIDOU M, MILIONS H. Diabetes mellitus and non-alcoholic fatty liver disease; the thread of ariadne [J]. *Minerva Endocrinol*, 2017, 42(2): 109-121.
- [2] SAPONARO C, GAGGINI M, GASTALDELLI A. Nonalcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes; Common pathophysiologic mechanisms [J]. *Curr Diab Rep*, 2015, 15(6): 607.
- [3] KOMIYA C, TSUCHIYA K, SHIBA K, et al. Ipragliflozin improves hepatic steatosis in obese mice and liver dysfunction in type 2 diabetic patients irrespective of body weight reduction [J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0151511.
- [4] 张丹, 黄华. 药食同源中药特膳对2型糖尿病高脂血症患者体质量指数、体脂含量、骨骼肌含量、空腹血糖及血脂水平的影响 [J]. *甘肃中医药大学学报*, 2019, 36(4): 56-60.
- [5] 王玉香. 药食同源谷物粉对2型糖尿病周围神经病变患者的疗效评价 [D]. 长春: 吉林大学, 2019.
- [6] 厉德凤, 葛金卓, 张丽, 等. 17种药食同源组方主食对糖调节受损患者恢复的影响 [J]. *卫生研究*, 2018, 47

(5): 840-842.

- [7] 何青岑, 杨涵, 邹宇, 等. 以苦瓜提取物为主的复方食疗方法对调理糖尿病及并发症的作用研究 [J]. *糖尿病新世界*, 2018, 21(9): 197-198.
- [8] 胡力文, 刘银, 庞钰鑫, 等. 中药复方对早期糖尿病肾病大鼠血糖及肾脏糖代谢的影响 [J]. *现代预防医学*, 2018, 45(8): 1479-1482.
- [9] 王玉香, 路英丽, 吴美巧, 等. 药食同源谷物粉治疗糖尿病性周围神经病变的效果 [J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38(5): 1072-1073.
- [10] 柳园, 石磊, 陶利, 等. 药食同源主食与传统主食对2型糖尿病患者餐后血糖的影响比较 [J]. *中华老年多器官疾病杂志*, 2017, 16(12): 889-893.
- [11] 何书励, 马方, 张家瑜, 等. 不同主食成分对糖尿病患者血糖的影响——药食同源主食、小麦纤维主食与普通主食的比较 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2017, 25(9): 773-777.
- [12] 张桂英, 张文高, 沙凤桐. 糖尿病药膳养生食品“胰道动力谷物调理粥”研制思路与初步成果 [C]//中国药膳研究会. 2016年中国药膳学术研讨会论文集, 北京 [出版社不详], 2016: 35-37.
- [13] 田雨, 丁艳平, 邵宝平, 等. 黄芪等药食同源类中药作为功能性食品与肠道菌群的相互作用 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(11): 2486-2492.
- [14] 柳萍, 陈伟, 张家瑜, 等. 富含膳食纤维主食对2型糖尿病患者糖代谢效应的影响 [J]. *中国临床医生杂志*, 2016, 44(6): 24-28.
- [15] 王立成, 张鹏, 徐佳, 等. 药食同源植物醛糖还原酶抑制剂的筛选 [J]. *吉林大学学报: 理学版*, 2016, 54(3): 652-656.
- [16] 张家瑜. 2型糖尿病药食同源营养干预研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2016.
- [17] 袁媛, 陈立勇, 刘昭纯. 药食同源组方主食对住院2型糖尿病患者疗效的实验研究 [C]//中国中西医结合学会. 第四届全国中西医结合营养学术会议论文资料汇编, 海口: [出版社不详], 2013: 199-201.
- [18] 袁媛, 陈立勇. 药食同源组方主食对住院2型糖尿病患者疗效的实验研究 [J]. *慢性病学杂志*, 2013, 14(3): 172-174.
- [19] 王清媛. 三味药食同源中药对代谢综合征大鼠糖脂代谢及抗氧化的影响 [D]. 大连: 大连医科大学, 2011.
- [20] GHEIBI S, KASHFI K, GHASEMI A. A practical guide for induction of type-2 diabetes in rat: Incorporating a high-fat diet and streptozotocin [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 95: 605-613.
- [21] 吕予, 侯杰军, 智冰清, 等. 益气养阴活血法与2型糖尿病胰岛 β 细胞功能相关性研究 [J]. *世界中医药*,

- 2019, 14(9):2354-2358.
- [22] 官艳华,叶正芹,吴学苏,等. 参芪麦味地黄汤治疗2型糖尿病气阴两虚证的临床效果观察[J]. 中国社区医师, 2019, 35(36):102-103.
- [23] 田会萍,任乐,姚鸿萍,等. 中医"益气养阴"法辅助治疗2型糖尿病的Meta分析[J]. 世界中医药, 2019, 14(5):1192-1197.
- [24] 陈冰,吴桂林,杨昌杰,等. 参芪降糖片配合西药治疗2型糖尿病气阴两虚证的疗效观察[J]. 内蒙古中医药, 2019, 38(11):42-43.
- [25] 李艳红,黎艳,王亚兰,等. 玉泉丸合桃红四物汤加减对气阴两虚证2型糖尿病心血管主要危险因素的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(19):177-182.
- [26] 魏亚莉,郭锦,刘志鹏,等. 芦少敏主任医师治疗2型糖尿病伴失眠临证经验总结[J]. 亚太传统医药, 2019, 15(10):103-104.
- [27] 姜嫄嫄,赵文景. 益气养阴活血方治疗气阴两虚血瘀型2型糖尿病肾病早期的临床观察[J]. 世界中医药, 2017, 12(8):1781-1785.
- [28] KRSSAK M, BREHM A, BERNROIDER E, et al. Alterations in postprandial hepatic glycogen metabolism in type 2 diabetes[J]. Diabetes, 2004, 53(12):3048-3056.
- [29] 张新茹. 红景天苷在2型糖尿病小鼠中通过microRNA改善糖脂代谢的机制研究[D]. 长春:吉林大学, 2016.
- [30] 龚豪杰,谢谨,张楠,等. 不同强度运动对AMPK α 2三种不同基因状态鼠MEF2/GLUT4DNA结合活性的影响[J]. 体育科学, 2011, 31(2):55-63.
- [责任编辑 周冰冰]

·书讯·

活血解郁汤联合针刺四花穴对脑卒中后抑郁症患者血浆5-HT, DA和NE的影响 ——评《脑卒中的治疗与调养》

脑卒中患者最常见并发症及后遗症是脑卒中后抑郁症,在左右脑卒中患者中,占40%~50%。脑卒中后抑郁在临床中的表现主要为较低自我认同感、恐惧焦虑、睡眠障碍及情绪低落等,同时还合并出现各种其他现象,如懒于活动、悲观自闭及身体不适等。大部分患者通常会存在一定程度的语言障碍,在表达能力方面也显著减弱,使患者发病不易被察觉、较为隐匿。通过各种负性情绪的影响,患者有可能发生自残,影响患者的治疗依从性,情况严重的甚至轻生。在治疗脑卒中后抑郁症患者时,不仅需要关注脑卒中病变自身,还需要关注患者的负性情绪变化。中医学在脑卒中的治疗方面记载悠久,且临床经验十分丰富,尤其是针刺及中药对脑卒中并发症及后遗症的治疗方法,疗效理想。本文将结合《脑卒中的治疗与调养》一书探讨活血解郁汤联合针刺四花穴对脑卒中后抑郁症患者血浆5-HT, DA和NE的影响。

《脑卒中的治疗与调养》可以协助我们对脑卒中抑郁患者的治疗意义有更进一步的认知及了解,该书是由朱路文编著,2018年7月在上海科学技术文献出版社出版发行。本书的编写背景主要也是在脑卒中治疗技术发展的现状下,对现实中的实际需求进行叙述。其中介绍了脑卒中在治疗及调养方面的注意事项,同时还精要说明了脑卒中的发病原因、临床症状、疾病防治等内容,读者能对防治知识进行有效的掌握,同时还可以对脑卒中的保健、运动及饮食之道进行充分了解,使相关医护人员更加了解脑卒中治疗的重要性。书中有关脑卒中的相关基本知识可以给临床医护人员对脑卒中的治疗护理提供部分知识方面的储备,利于医护人员针对脑卒中方面的学习,便于在日后的临床工作过程中更加规范、更加专业的进行脑卒中患者治疗。

针刺四花穴方法:取患者的双膈俞穴及双胆俞穴,依据《针灸治疗学》来进行穴位的定位,同时依据中医辨证实施补泻手法,得气后留针:30 min, 1次/d, 5次/周。4周为1疗程,连续治疗3个疗程。

活血解郁汤的组方主要为在血府逐瘀汤的基础上加疏肝解郁药:山茱萸、香附、郁金及柴胡等。药方当中的川芎、桃仁、红花、赤芍及当归尾等主要功效为通络祛瘀、通泄血滞。当归尾可活血化瘀,赤芍同时兼泄血分郁热,川芎可化瘀行气,合用黄芪可补机体脏腑的经络营卫之气,从而使得患者充足正气、通畅血行、消散瘀血但不伤正气。郁金的功效主要为理气疏肝、解郁行气,在《本草备要》中曾经记载,郁金可解郁、行气、破郁及泻血;柴胡可解郁疏肝、调达肝气,香附既解六郁、通利三焦,同时还可解郁宽中,联合使用三者可疏理肝气,通畅气机。合用诸药以达化瘀活血、理气疏肝、解郁行气之效。

中医学当中一种传统的重要治疗方式就是针刺,在脑卒中后抑郁中广泛应用;且经相关研究证实,针刺疗效十分显著。研究指出,针刺能够对神经递质产生调节作用,同时还能使得脑血流得到有效改善、下丘脑兴奋,从而实现促使神经功能康复的目的。同时,针刺还能够对脑部产生刺激作用,使其释放5-HT,机体当中的去甲肾上腺素及5-HT水平增加,实现抗抑郁的效果。四花穴是由机体内的双胆俞穴及双膈俞穴组合而成的。四花穴的主要作用为清热养阴、解郁疏肝、利膈宽胸等。膈俞穴是八会穴之血会,在肝俞及心俞之间,其作用主要为调节气血、宽胸利膈、化瘀活血。胆俞是胆腑经气输注的一个穴位,附之于肝,内应于胆,主疏利中土,升清降浊,其主要作用为解郁理气、疏利肝胆及调节气机。两穴配合使用,可对脏腑功能进行调节,从而增强中药的解郁疏肝、化瘀活血之效,调顺气血。且治疗后患者血浆5-HT, DA和NE水平升高,提示联合使用活血解郁汤及针刺四花穴能够使得脑卒中后抑郁患者疗效显著提高。

基金项目:河北省中医药管理局(2019476)

(作者谢素春¹,马欣欣²,梁英²,杜欣远²,尹国强²,赵梅萍²,1.邢台市人民医院,河北 邢台 054000; 2.井陘县中医院,石家庄 050000)