# 左归降糖清脂方对 2 型糖尿病转基因 MKR 鼠脂肪肝发生的影响

吴勇军, 成细华*, 喻嵘*, 夏金华, 伍参荣
(湖南中医药大学, 长沙 410007)

[摘要] 目的: 探讨左归降糖清脂方对 2 型糖尿病转基因 MKR 鼠脂肪肝发生的影响。方法: 30 只 MKR 鼠随机分为 MKR 组、MKR 高脂组和左归降糖清脂方组; 左归降糖清脂方组以生药 29.64 $g \cdot kg^{-1}$ ig 干预治疗高脂饮食诱发脂肪肝的 MKR 鼠, 观察其肝脏病理形态、血糖、血胰岛素、肝功能和血脂变化。结果: 高脂饲料诱发 MKR 鼠形成非酒精性脂肪肝, 肝细胞有大小不一的脂滴, 呈脂肪性变; MKR 高脂组小鼠空腹血糖、血胰岛素、肝质量、肝指数、肝功能指标[谷丙转氨酶(ALT), 谷草转氨酶(AST)]、血清总胆固醇(TCHO)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)高于 MKR 组($P < 0.05$, $P < 0.01$), 甘油三酯(TG)下降, 低于 MKR 组($P < 0.01$)。2 型糖尿病并发脂肪肝 MKR 鼠经左归降糖清脂方治疗后, 肝细胞内脂肪性变得到改善, 空腹血糖、血胰岛素、肝质量、肝指数、肝功能指标(ALT, AST)和血脂(TCHO, LDL-C 和 TG)显著下降, 低于 MKR 小鼠($P < 0.05$, $P < 0.01$); HDL-C 高于 MKR 小鼠($P < 0.05$)。结论: 左归降糖清脂方可通过调节高脂饮食 MKR 鼠体内的糖脂代谢, 改善肝脏脂肪性变。

[关键词] 左归降糖清脂方; 2 型糖尿病; MKR 鼠; 非酒精性脂肪肝; 血脂; 肝功能
[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)05-0140-04

# Influences of Zuogui Jiangtang Qingzhi Recipe on Liver Steatosis in Type 2 Diabetes MKR Mice

*WU Yong-jun, CHENG Xi-hua*, YU Rong*, XIA Jin-hua, WU Cen-rong*
*(Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha* 410007, *China)*

**[Abstract]** **Objective:** To observe the protective effect of Zuogui Jiangtang Qingzhi Recipe (ZJQR) on the liver steatosis in type 2 diabetes MKR mice. **Method:** Thirty MKR mice were randomly divided into the control group (CG), the model group (MG) and the ZJQR group (ZG). Except for CG mice which were raised by standard animal feeds, the others were all raised by high fat feeds to make liver steatosis model and after 8 weeks ZG were administered by ZJQR for 4 week. Histopathological changes were observed in the liver, including fasting blood-glucose (FBG), insulin (INS) level, blood-lipid, liver quality, hepatosomatic index and liver function. **Result:** In the MG, the histopathological investigation showed increased fatty droplet within hepatocyte and fatty degeneration. As were liver quality, hepatosomatic index, the levels of FBG, INS, total cholesterol (TCHO), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) ($P < 0.05$, $P < 0.01$), but the level of triglycercide (TG) was reduced compared with CG ($P < 0.01$). In the ZG, fatty degeneration within hepatocyte was improved. Liver

[收稿日期] 20100906(001)
[基金项目] 国家自然科学基金项目(30973749); 湖南省自然科学基金杰出青年基金(08JJ1005); 湖南省中医药科研计划项目(2009017); 湖南省科技厅资助项目(2009SK3118); 湖南省高校创新平台开放基金(09K059); 湖南中医药大学方剂学重点学科资助
[第一作者] 吴勇军, 研究生, 副教授, 从事中医药防治糖尿病的机制研究, Tel: 15802636369, E-mail: chengxihua0309@yahoo.com.cn
[通讯作者] * 成细华, 副教授, Tel: 0731-88458072;
* 喻嵘, 教授, 博士生导师, Tel: 0731-88458072, E-mail: yuron@21cn.com

quality, hepatosomatic index, the levels of FBG, INS, TCHO, LDL-C and TG were reduced( $P<0.05$ ), but HDL-C was enhanced compared with that in CG( $P<0.05, 0.01$ ). **Conclusion:** ZGQR can significantly regulate glucose-lipid metabolism, improve fatty degeneration and protect the liver.

**[Key words]** Zuogui Jiangtang Qingzhi Recipe; type 2 diabetes; MKR mice; nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD); blood-lipid; liver function

糖尿病是引起脂肪肝的重要病因之一[1]。2型糖尿病转基因MKR鼠体内存在糖脂代谢紊乱,肝脏甘油三酯含量高于C57野生鼠[2],2型糖尿病MKR鼠高脂饲料喂养后容易形成非酒精性脂肪肝。左归降糖清脂方为左归复方(临床和试验均证明其有降糖、降脂和改善胰岛素抵抗等作用)增减方,由黄芪18 g,山药12 g,熟地黄12 g等10味中药组成。本试验采用高脂饮食诱发MKR鼠形成非酒精性脂肪肝,并以左归降糖清脂方对其进行干预治疗,探讨左归降糖清脂方对2型糖尿病合并脂肪肝小鼠肝脏病理形态、血糖、血胰岛素、肝功能和血脂变化的影响。

## 1 材料

**1.1 动物** MKR小鼠(采用组织特异性过度表达转基因技术产生),由美国国立卫生研究院(Dr. D. LeRoith)提供MKR小鼠(纯合子),经自然交配后繁殖的子代用于试验观察。

**1.2 饲养条件及环境** 试验用小鼠饲养在湖南中医药大学SPF级试验动物中心。饲养笼具、垫料、饲料、饮水均按SPF级试验动物的要求进行制备与消毒。

**1.3 高脂饲料** 基础饲料加15%猪油,1%胆固醇(北京索莱宝科技有限公司,批号C8280)。

**1.4 药物和试剂** 左归降糖清脂方由黄芪18 g,山药12 g,熟地黄12 g,山茱萸12 g,黄连6 g,丹参9 g,茵陈15 g,虎杖12 g等10味药组成。中药购自湖南中医药大学杏林药号,各味中药由湖南中医药大学附一医院的王宇红教授鉴定为正品。经水煎2次,合并煎液,过滤浓缩至生药2.4 g·mL$^{-1}$,4 ℃冰箱贮存备用。末端全血葡萄糖测试条(北京怡成生物电子技术有限公司,批号20090924);小鼠胰岛素ELISA试剂盒(ADL公司,批号QRCT-301330013013EIA \UTL)。

**1.5 主要仪器** 怡成超越(JPS-Ⅲ型)血糖测试仪,北京怡成生物电子技术有限公司提供;日立7150全自动生化分析仪,日本日立;MoticB5显微摄像系统,麦克奥迪实业集团公司。

## 2 方法

**2.1 左归降糖清脂方对MKR小鼠的干预研究** 30只经遗传鉴定[2]的MKR鼠8周时根据性别、体质量,随机分为MKR组、MKR高脂组和左归降糖清脂方组。MKR高脂组和左归降糖清脂方均以高脂饲料喂养;MKR组以基础饲料喂养,试验中无小鼠死亡。高脂饲料喂养8周后,左归降糖清脂方组以生药29.64 g·kg$^{-1}$ ig,MKR组和MKR高脂组以等体积蒸馏水ig。ig容量为0.5 mL/20 g。每日定时ig 1次,连续给药30 d。试验结束前天小鼠禁食不禁水5 h后,以小鼠尾静脉血测血糖浓度。

**2.2 标本的收集** 隔夜禁食12 h,不禁水,次日心脏取血,3 000 r·min$^{-1}$离心10 min分离血清,-20 ℃保存备用,用于血清学检测。取出肝脏,称取肝脏湿重,在肝脏最大叶距边缘5 mm处取小块肝组织,10%甲醛溶液固定,石蜡包埋,病理切片,HE染色后光镜观察。

**2.3 指标检测** ①血糖测定:试验结束前1天小鼠禁食不禁水5 h后,以小鼠尾静脉血测血糖浓度。②血脂和肝功能指标测定:TCHO, TG, HDL-C, LDL-C和肝功能指标(AST, ALT),均采用全自动生化仪进行测定,由湖南中医药大学第一附属医院协助完成。③血清胰岛素:采用双抗体夹心ELISA法,操作严格按照试剂盒说明进行。④肝指数计算:肝指数=肝脏质量/体质量×100%。

**2.4 统计学处理** 多组计量资料数据处理,采用SPSS13.0统计软件分析。组间比较采用One-way ANOVA分析,方差不齐采用非参数检验,$P<0.05$有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 左归降糖清脂方对MKR高脂组小鼠肝脏病理形态的影响** 光镜下可见MKR组鼠肝脏肝小叶结构正常,肝细胞排列规则成条索状,以中央静脉为中心,呈放射状分布,肝细胞大小正常,胞核位于细胞中央。MKR高脂组小鼠肝细胞以弥漫性小泡性脂变为主。左归降糖清脂方对高脂饮食MKR鼠脂肪性变有改善作用。见图1。

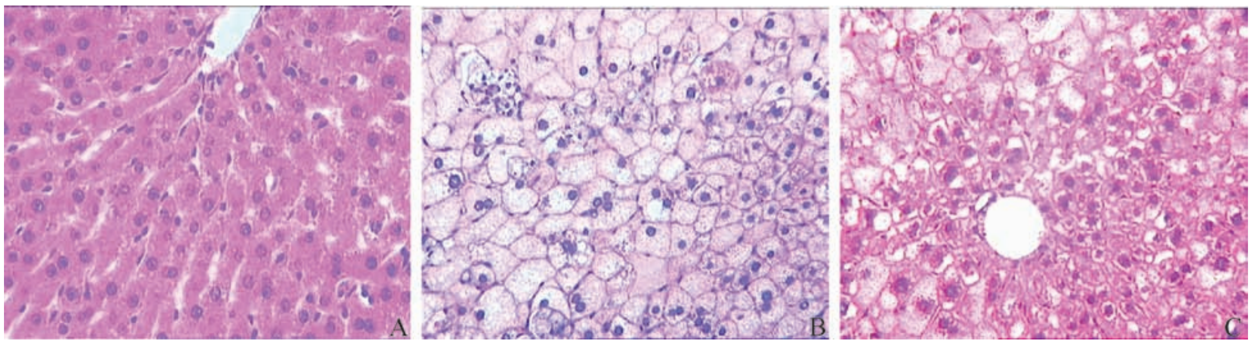

图 1 左归降糖清脂方对 MKR 高脂组小鼠肝脏病理变化的影响(HE, ×400)

A. MKR 鼠; B. MKR 高脂组; C. 左归降糖清脂方 29.64 $g \cdot kg^{-1}$ 组

**3.2 左归降糖清脂方对 MKR 高脂组小鼠血糖及胰岛素含量的影响** 高脂饮食 MKR 鼠空腹血糖浓度进一步升高($P < 0.05$), 胰岛素含量显著升高($P < 0.01$)。左归降糖清脂方能显著降低高脂饲料喂养的 MKR 鼠血糖浓度和胰岛素水平($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果见表 1。

表 1 左归降糖清脂方对 MKR 高脂组小鼠血糖及胰岛素含量的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

| 组别 | 剂量 /$g \cdot kg^{-1}$ | 空腹血糖 /$mmol \cdot L^{-1}$ | 胰岛素 /$\mu g \cdot L^{-1}$ |
|---|---|---|---|
| MKR | - | 8.94 ±1.71$^{1)}$ | 6.06 ±0.31$^{2)}$ |
| MKR 高脂 | - | 9.66 ±1.46 | 20.89 ±1.14 |
| 左归降糖清脂方 | 29.64 | 8.16 ±0.75$^{1)}$ | 5.83 ±0.12$^{2)}$ |

注: 与 MKR 高脂组比较 $^{1)}P < 0.05$, $^{2)}P < 0.01$(表 2 ~4 同)。

**3.3 左归降糖清脂方对 MKR 高脂组小鼠肝指数的影响** 高脂饮食 MKR 鼠肝质量和肝指数均显著高于 MKR 鼠($P < 0.01$); 左归降糖清脂方能显著降低高脂饮食 MKR 鼠的肝质量和肝指数($P < 0.05$, $P < 0.01$)。高脂饮食使 MKR 鼠体质量重于 MKR 组, 但无统计学意义, 左归降糖清脂方无改善作用。结果见表 2。

表 2 左归降糖清脂方对 MKR 高脂组小鼠肝指数的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

| 组别 | 剂量 /$g \cdot kg^{-1}$ | 肝质量 /g | 肝指数 /% | 体质量 /g |
|---|---|---|---|---|
| MKR | - | 1.222 ±0.135$^{2)}$ | 5.76 ±0.38$^{2)}$ | 21.50 ±3.25 |
| MKR 高脂 | - | 2.232 ±0.285 | 9.87 ±1.91 | 22.94 ±1.83 |
| 左归降糖清脂方 | 29.64 | 1.712 ±0.212$^{1)}$ | 7.51 ±1.41$^{2)}$ | 22.78 ±2.23 |

**3.4 左归降糖清脂方对 MKR 高脂组小鼠肝功能的影响** 高脂饮食 MKR 鼠血清肝功能指标 ALT 和 AST 均显著高于 MKR 鼠($P < 0.05$, $P < 0.01$); 左归降糖清脂方能显著降低高脂饮食 MKR 鼠的血清 ALT 和 AST 水平($P < 0.05$)。结果见表 3。

**3.5 左归降糖清脂方对 MKR 高脂组小鼠血脂的影响** 高脂饮食 MKR 鼠血清 TCHO, LDL-C 和 HDL 均显著高于 MKR 鼠($P < 0.01$), TG 显著低于 MKR 鼠($P < 0.01$), 左归降糖清脂方能显著降低高脂饮食 MKR 鼠血清 TG, TCHO 和 LDL-C, 升高 HDL($P < 0.05$)。结果见表 4。

表 3 左归降糖清脂方对 MKR 高脂组小鼠肝功能的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$) $U \cdot L^{-1}$

| 组别 | 剂量 /$g \cdot kg^{-1}$ | ALT | AST |
|---|---|---|---|
| MKR | - | 23.00 ±6.05$^{2)}$ | 201.00 ±60.69$^{1)}$ |
| MKR 高脂 | - | 27.00 ±7.88 | 291.70 ±51.85 |
| 左归降糖清脂方 | 29.64 | 22.78 ±2.23$^{2)}$ | 235.29 ±43.58$^{2)}$ |

表 4 左归降糖清脂方对 MKR 高脂组小鼠血脂的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$) $mmol \cdot L^{-1}$

| 组别 | 剂量 /$g \cdot kg^{-1}$ | TG | TCHO | LDL-C | HDL-C |
|---|---|---|---|---|---|
| MKR | - | 1.75 ±0.28$^{2)}$ | 2.15 ±0.53$^{2)}$ | 0.164 ±0.051$^{2)}$ | 1.711 ±0.277$^{2)}$ |
| MKR 高脂 | - | 0.62 ±0.13 | 4.28 ±1.01 | 1.611 ±0.706 | 2.260 ±0.442 |
| 左归降糖清脂方 | 29.64 | 0.41 ±0.067$^{1)}$ | 3.23 ±0.71$^{1)}$ | 1.201 ±0.342$^{1)}$ | 2.654 ±0.461$^{1)}$ |

## 4 讨论

根据流行病学调查, 在引起脂肪肝的所有病因中, 糖尿病居第 3 位, 仅次于饮酒和肥胖, 2 型糖尿病由于与 NAFLD 在发病机制上存在“共同土壤”——胰岛素抵抗而成为其重要病因[1]。我们课题组从国外引进的 2 型糖尿病转基因 MKR 鼠, 不仅有骨骼肌胰岛素样生长因子-1 受体(IGF-IR)的功能缺失, 还表现为胰岛素受体的功能缺失。这种 MKR 鼠在出生 5 周左右即可表现为显著的肌肉、肝脏、脂肪组织的胰岛素抵抗, 糖耐量异常、胰岛 β细胞功能紊乱以及游离脂肪酸、甘油三酯(TG)的脂代谢紊乱, 肝脏 TG 堆积等[2-3]。本试验给 MKR 鼠喂养高脂饲料, 进一步加剧了 MKR 鼠糖脂代谢紊乱。结果显示, MKR 高脂组小鼠血糖, 血胰岛素、肝质量、肝指数、肝功能指标(ALT, AST)和血脂(TCHO, HDL-C, LDL-C)高于 MKR 鼠($P < 0.05$, $P < 0.01$), 说明高脂饲料喂养糖脂代谢紊乱的 MKR 鼠, 更易使脂质流向肝脏, TG 在肝细胞内的堆积必然损伤肝细胞的结构和功能, 使得肝细胞内 ALT 和 AST 释放入血,

导致血清ALT和AST升高。MKR高脂组血脂TG反而低于MKR鼠($P<0.05$)，但仍高于C57野生鼠($P<0.01$)，推其原因可能是肝细胞受损，使得肝细胞合成ApoB100以及VLDL在内质网包装成熟的能力下降，最终使得肝脏合成及分泌VLDL能力下降，从而血脂TG含量相对下降，促使TG在肝脏更容易堆积，蓄积到一定程度，即发生肝脏组织学改变，形成NAFLD[1,4]。

经左归降糖清脂方治疗后，高脂饮食MKR鼠血糖、血胰岛素和血脂(TG，TCHO和LDL-C)下降具有统计学意义，HDL-C升高亦具有统计学意义，说明左归降糖清脂方减轻了胰岛素抵抗，调节了体内糖脂代谢，减少了肝脏脂质堆积，缓减了脂肪肝的发展，肝功能指标得到改善，从而保护了肝脏。

本课题组在前期临床研究与临床文献调研中认为2型糖尿病主要病理机制为气阴两虚，夹瘀血热毒(虚、瘀、毒)，并据此以滋阴益气、活血解毒立法组成的左归复方分别用于2型糖尿病及其合并症的防治，已取得较好疗效[5-6]。我们认为2型糖尿病脂肪肝的中医病机为：肝肾阴虚、湿热内蕴、痰瘀互结(虚、痰、毒、瘀)，其病位主要在肝，涉及脾肾，主要病理产物是痰、瘀、毒；其证属本虚标实。以滋阴益气、清肝解郁、化痰消瘀法的左归降糖清脂方(为左归复方增减方)，能减轻高脂饮食加剧的MKR鼠的胰岛素抵抗，增强外周组织对胰岛素的敏感性，使得血糖，TG，TCHO和LDL-C下降，HDL-C升高。左归降糖清脂方通过调节高脂饮食MKR鼠体内的糖脂代谢，减少TG在肝脏的堆积，缓减了脂肪肝的发展，具有保护肝脏的作用。

## [参考文献]


[1] 范建高，曾民德. 脂肪性肝病[M]. 北京：人民卫生出版社，2005：220.

[2] 喻嵘，成细华，胡伟，等. 骨骼肌特异性胰岛素样生长因子1及胰岛素双受体功能缺失鼠糖尿病及其相关炎症因子的变化[J]. 中国组织工程研究与临床康复，2007，11(45)：9075.

[3] Toyoshima Y, Gavrilova O, Yakar S, et al. Leptin improves insulin resistance and hyperglycemia in a mouse model of type 2 diabetes[J]. Endocrinology, 2005, 146(9): 4024.

[4] 张惠美. 2型糖尿病合并动脉粥样硬化病人血清中LDL-C-C与HDL-C-C及TG水平检测及其临床意义[J]. 中华腹部疾病杂志，2005，5(3)：174.

[5] 喻嵘，陈大舜，梅志刚，等. 左归双降方对葡萄糖、胰岛素、低密度脂蛋白诱导损伤的血管内皮细胞ICAM-1，tPA，PAI的影响[J]. 中医药学刊，2005，23(1)：61.

[6] 成细华，喻嵘，吴勇军，等. 左归复方对MKR转基因2型糖尿病小鼠糖代谢和抗氧化应激的影响[J]. 中草药，2008，39(11)：1675.


[责任编辑　聂淑琴]

# 简　讯

据中国高等学校自然科学学报研究会、中国科学技术期刊编辑学会2009年统计结果报道，2008年《中国实验方剂学杂志》登载的学术论文中，有224篇被美国化学文摘(CA)收录，标志着《中国实验方剂学杂志》已成为CA在国内的主要统计源期刊之一，也标志着该杂志的学术水平又迈上了一个新台阶。

在此，谨向热心于《中国实验方剂学杂志》审稿、组稿工作的人员表示衷心感谢，向各学术论文作者对《中国实验方剂学杂志》工作支持表示诚挚谢意！