

· 论著 ·

黄连解毒汤对糖耐量减低大鼠的糖尿病延缓作用

刘海逸 张欣荣 岳晓丹 韩菲 王靖宇 杨少华 常宝成 杨菊红 单春艳

【摘要】 目的 观察黄连解毒汤对糖耐量减低(IGT) Zucker 糖尿病肥胖(ZDF, fa/fa)大鼠糖尿病发病的延缓作用并探讨相关机制。**方法** 以高脂饲料诱导20只ZDF大鼠至IGT期后,将大鼠按随机数字表法分为模型组及黄连解毒汤干预组(黄连组),每组10只,并以 Zucker Lean(fa/+)大鼠作为正常对照组,其中,黄连组以黄连解毒汤0.075 g/d灌胃干预,模型组及正常对照组以同体积双蒸水对照,以干预3周后,模型组全部发展至糖尿病为实验终点。行口服葡萄糖耐量试验(OGTT)观察黄连组糖尿病发病率。以酶联免疫吸附法(ELISA)测定血浆脂多糖、胰高血糖素样肽-1(GLP-1)、胰岛素及胰高血糖素(GC)水平,并以稳态模型评估-胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)评价胰岛素抵抗;以免疫组化方法观察不同组间回肠occludin, zonula occludens(ZO)-1、核因子- κ B和肿瘤坏死因子(TNF)- α 的表达。**结果** 药物干预3周后,模型组全部发展为糖尿病,而黄连组仅50%发展为糖尿病,且与模型组相比,黄连组空腹血糖水平($F=13.940, P<0.01$)显著下降。随着糖尿病病程进展,模型组大鼠空腹血浆GC($F=51.045, P<0.01$)、HOMA-IR($F=19.260, P<0.01$)、脂多糖($F=10.661, P<0.05$)、GLP-1($F=7.077, P<0.01$)水平逐渐升高,而胰岛素($F=13.445, P<0.01$)水平逐渐下降;干预3周后,与模型组相比,黄连组胰岛素($F=1.020, P>0.05$)、HOMA-IR($F=13.227, P<0.01$)、GC($F=23.440, P<0.05$)、脂多糖($F=22.636, P<0.01$)水平均有不同程度下降, GLP-1水平升高($F=4.954, P<0.05$)。在回肠,与正常对照组相比,模型组核因子- κ B($F=91.951, P<0.01$)和TNF- α ($F=83.633, P<0.01$)的表达增加,而 occludin($F=105.653, P<0.01$)及ZO-1($F=71.753, P<0.01$)表达明显减少。黄连组上述指标均有明显改善(P 均 <0.01)。**结论** 黄连解毒汤可能通过改善GLP-1的分泌、减轻肠道炎症反应并维持肠道屏障功能,对IGT期ZDF大鼠有延缓T2DM发病的作用。

【关键词】 黄连解毒汤;胰高血糖素样肽-1;2型糖尿病;肠道炎症

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81473472);天津市自然科学基金资助项目(13JCZDJC30500)

Effects of huang-lian-jie-du-decoction in delaying diabetes in rats with impaired glucose tolerance

Liu Haiyi*, Zhang Xinrong, Yue Xiaodan, Han Fei, Wang Jingyu, Yang Shaohua, Chang Baocheng, Yang Juhong, Shan Chunyan. *Graduated School of Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China
Corresponding author: Shan Chunyan, Email: chunyanshan@hotmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of huang-lian-jie-du-decoction in delaying diabetes in Zucker diabetes fat (ZDF, fa/fa) rats with impaired glucose tolerance (IGT) and its related mechanisms. **Methods** High fat diet was used to induce IGT in ZDF rats. Twenty rats were divided into model group and huang-lian-jie-du-decoction intervention group(huang-lian group) in accordance with the random number table once they entered into the stage of IGT with ten rats in each group. Zucker Lean (ZL, fa/+) rats were used as normal control group. Rats in huang-lian group were treated with huang-lian-jie-du-decoction at dose of 0.075 g/d, whereas rats in the model group and normal control group received the same volume of distilled water as vehicle. The interventions were terminated when all rats in model group developed

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2017.03.002

作者单位:300070 天津医科大学研究生院(刘海逸,张欣荣,岳晓丹,韩菲);300070 天津医科大学代谢病医院糖尿病肾病科,卫生部激素与发育重点实验室(王靖宇,杨少华,常宝成,杨菊红,单春艳)

通信作者:单春艳,Email:chunyanshan@hotmail.com

diabetes after three weeks of intervention. Incidence of diabetes was calculated by oral glucose tolerance test (OGTT) in huang-lian group. Plasma lipopolysaccharide (LPS), glucagon-like peptide-1 (GLP-1), insulin and glucagon (GC) were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), and homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) index was calculated to evaluate insulin resistance. Immunohistochemistry method was used to observe the expression of occludin, zonula occludens (ZO)-1, nuclear factor- κ B and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in different groups. **Results** After 3 weeks of intervention, all rats in model group developed diabetes whereas only 50% rats in huang-lian group developed diabetes. And fasting blood glucose was decreased in huang-lian group compared with model group ($F=13.940$, $P<0.01$). During the progression of diabetes, the fasting plasma GC ($F=51.045$, $P<0.01$), HOMA-IR ($F=19.260$, $P<0.01$), LPS ($F=10.661$, $P<0.05$) and GLP-1 levels ($F=7.077$, $P<0.01$) of model group were gradually increased, while insulin level ($F=13.445$, $P<0.01$) was gradually decreased. After 3 weeks of treatment, compared with model group, insulin ($F=1.020$, $P>0.05$), HOMA-IR ($F=13.227$, $P<0.01$), GC ($F=23.440$, $P<0.05$) and LPS ($F=22.636$, $P<0.01$) of huang-lian group were decreased, but GLP-1 level ($F=4.954$, $P<0.05$) was increased. Compared with normal control group, the expression of nuclear factor- κ B ($F=91.951$, $P<0.01$) and TNF- α ($F=83.633$, $F<0.01$) in ileum of model group were increased, and the expression of occludin ($F=105.653$, $P<0.01$) and ZO-1 ($F=71.753$, $P<0.01$) in ileum decreased significantly. The above indexes were improved obviously in huang-lian group (all $P<0.01$). **Conclusion** Huang-lian-jie-du-decoction may delay the onset of type 2 diabetes in ZDF rats with IGT by improving the secretion of GLP-1, reducing intestinal inflammation and protecting the intestinal barrier function.

【Key words】 Huang-lian-jie-du-decoction; Glucagon-like peptide-1; Type 2 diabetes mellitus; Intestinal inflammation

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81473472); Natural Science Foundation of Tianjin (13JCZDJC30500)

胰高血糖素样肽 (GLP)-1 是由肠道 L 细胞分泌的多种肠促胰素之一^[1]。近年来研究发现,空腹 GLP-1 水平对血糖调节具有重要作用^[2-3]。GLP-1 类似物及二肽基肽酶-IV 抑制剂还可抗炎、抗氧化应激,减少糖尿病并发症的发生^[4]。肠道黏膜屏障的改变也可能是糖尿病发生、发展的重要环节之一。入血的革兰阴性菌细胞壁成分脂多糖(代谢性内毒素血症)已被证实与糖尿病慢性炎症反应息息相关。一系列体内、外研究表明,黄连解毒汤对糖尿病大鼠及患者具有明显的降糖、降脂、改善胰岛素抵抗、缓解内毒素血症、促进 GLP-1 合成及分泌等作用^[5-6]。但黄连解毒汤对空腹 GLP-1 水平的影响,及其抗炎、改善代谢的机制尚不完全明了。本研究将对自发 2 型糖尿病 Zucker 糖尿病肥胖 (ZDF, fa/fa) 大鼠在糖耐量减低 (IGT) 阶段进行药物干预,以观察黄连解毒汤对空腹 GLP-1 水平、肠道炎症反应、肠道黏膜屏障的影响以及在此基础上的糖尿病预防作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 6 周龄 SPF 级雄性健康 ZDF 大鼠[购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证号 SCXK(京)2012-0001]20 只,同周龄健康 Zucker Lean (fa/+, ZL) 大鼠 5 只,体重 190~210 g,饲养于中国医学科学院生物医学工程研究所动物实验

室,环境温度(20 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 40%~60%,光照 12 h/12 h 明暗交替,噪音 <50 dB。大鼠除行口服葡萄糖耐量试验 (OGTT)、测量空腹血糖前 12 h 禁食外,皆自由进食及饮水。

1.1.2 主要试剂及仪器 黄连解毒汤购自北京同仁堂,高脂饲料 (Purina #5008) 购自美国 Nestle Purina Petcare 公司, GLP-1、脂多糖、胰岛素、胰高血糖素 ELISA 试剂盒购自加拿大 Hermes Criterion Biotechnology 公司, occludin 抗体、zonula occludens (ZO)-1 抗体、核因子- κ B 抗体和肿瘤坏死因子 (TNF)- α 抗体购自英国 ABCAM 公司, DAB 显色试剂盒购自中国北京中杉金桥生物技术有限公司、One Touch Ultra 型血糖仪购自美国强生公司,全波长扫描酶标仪购自美国 Biotek SynergyMx 公司,显微镜购自日本奥林巴斯公司。

1.2 研究方法

1.2.1 动物分组及方法 所有动物适应性饲养 3 d 后,予高脂饲料饲养。每周行 OGTT 确定糖尿病发病情况及分期,并分别于各期对全部大鼠禁食 12 h 后内眦取血。当 ZDF 大鼠于 9 周龄左右发病至 IGT 时,将 IGT 期大鼠按随机数字表法分为模型组或黄连解毒汤干预组 (黄连组),每组 10 只;其中,黄连组以黄连解毒汤 0.075 g/d 灌胃干预,模型组及正常对照组 (ZL 大鼠, $n=5$) 以同体积双蒸水灌胃,至模

型组全部发病至糖尿病期,黄连组各大鼠已干预 3 周,将全部大鼠禁食 12 h,内眦取血后行 OGTT。24 h 内离心并留取血浆,置于 -80°C 环境下储存,留待各项指标测定。

1.2.2 黄连解毒汤制备 以黄连解毒汤(黄连 300 g,黄芩 200 g,黄柏 200 g,栀子 300 g),加 10 L 水浸泡 30 min,煎煮 60 min 后,取 1 煎液,再加 10 L 水煎煮 60 min 后取 2 煎液,第 3 次加 8 L 水煎煮 60 min 后取 3 煎液,3 次所煮液体合并后浓缩成含生药 1 g/ml 药液,于 4°C 条件保存。

1.2.3 空腹血糖及 OGTT 测定 各组大鼠每周测定空腹尾静脉血血糖,不限饮水,以 20:00 至次日 8:00 时间段禁食为空腹标准;每 2 周及全部模型组大鼠发展至糖尿病期行 OGTT 确定疾病进展及分期。测定空腹血糖后,立即以 50% 葡萄糖(2 g/kg)灌胃,分别测定 0、30、60、120 min 尾静脉血血糖。以糖负荷后 2 h 血糖 $>11.1\text{ mmol/L}$ 及峰值血糖 $>16.7\text{ mmol/L}$ 为糖尿病诊断标准,符合其中一项为 IGT^[7]。

1.2.4 ELISA 以 ELISA 测定血浆 GLP-1、脂多糖、空腹胰岛素及胰高血糖素水平。计算稳态模型评估-胰岛素抵抗指数($\text{HOMA-IR} = (\text{空腹血糖} \times \text{空腹胰岛素})/22.5$)。

1.2.5 回肠组织免疫组化染色 末次 OGTT 后,立即将大鼠脱颈处死,迅速于距回盲部近端 1~2 cm 处取回肠组织,磷酸盐缓冲液清洗后置于 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋后制备组织切片。切片组织脱蜡、水化,过氧化物酶阻断剂避光孵育 10 min,正常山羊血清室温封闭 20 min,分别使用 occludin 抗体(1:150)、ZO-1 抗体(1:200)、核因子- κB 抗体(1:200)和 TNF- α 抗体(1:200) 4°C 孵育过夜,生物素化二抗 37°C 孵育 20 min,链霉素抗生物素-过氧化物酶 37°C 孵育 20 min,使用 DAB 显色试剂盒显色 6 min,苏木素复染细胞核 1 min,充分水洗,脱水、封片后置于显微镜下观察。由两名病理科医师采用独立双盲法对镜下 5 个视野的阳性细胞进行计数和分级,以 A 为阳性细胞数分级(0~1% = 0,1~10% = 1,10~50% = 2,50~80% = 3,80~100% = 4),B 为阳性细胞显色强度分级(0:阴性,1:弱阳性,2:阳性,3:强阳性),统计免疫组化评分($\text{IHS} = \text{A} \times \text{B}$)^[8]。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计学分析。正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),重复测量设计资料采用重复测量的多因素方差分析(MANOVA)以 LSD-t 法进行两两比较;计数资料采用中位数(四分位数间距)、百分数表示,采用秩和检验进行组间比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

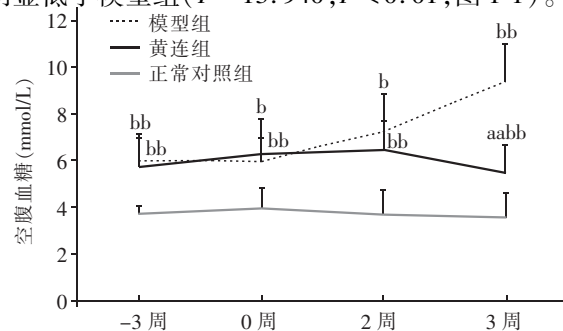
2.1 对糖尿病的预防作用

2.1.1 糖尿病发病情况

ZDF 大鼠于 9 周龄左右

发展为 IGT,12 周龄(药物干预 3 周)时,模型组全部发展为糖尿病,而此时黄连组仅有 50% 进展为糖尿病,另有 50% 糖耐量恢复正常。正常对照组均未发展至 IGT 或糖尿病。随病程进展,模型组及黄连组表现为倦怠,精神不振,并逐渐出现多饮、多食,尿量增加,毛色暗淡。正常对照组好动、活泼,正常进食及饮水,毛色鲜亮。整个实验过程中,无大鼠死亡。

2.1.2 空腹血糖、体重及进食量 模型组空腹血糖随时间逐渐升高,而正常对照组血糖相对平稳;模型组及黄连组空腹血糖在基线期及干预 0 周时差异无统计学意义(P 均 > 0.05),均明显高于正常对照组($F = 5.485, P < 0.05$);干预 2 周,与模型组相比,黄连组空腹血糖略有下降;干预 3 周,黄连组空腹血糖明显低于模型组($F = 13.940, P < 0.01$,图 1-1)。



注:与模型组相比,^{bb} $P < 0.01$;与正常对照组相比,^b $P < 0.05$,^{aabb} $P < 0.01$

图 1-1 正常对照组、模型组及黄连组空腹血糖水平的变化

药物干预前,模型组及黄连组体重及进食量均无明显差别;药物干预后,各时期黄连组体重均低于模型组;且黄连组进食量显著下降[2 周:(30.32 ± 2.19) g/d 比 (35.25 ± 3.06) g/d; 3 周:(30.62 ± 5.12) g/d 比 (38.50 ± 6.20) g/d, $F = 5.724, 5.070$, P 均 < 0.05]。

2.1.3 糖耐量 随病情进展,模型组糖负荷后各时间点血糖水平逐渐升高($F = 144.326, P < 0.05$)(图 1-2A)。药物干预前,各组大鼠糖耐量差异无统计学意义($P > 0.05$)。干预 3 周后,与模型组相比,黄连组各时点血糖显著降低($F = 74.358, P < 0.01$),见图 1-2B。

2.1.4 胰岛素、胰高血糖素及胰岛素抵抗水平 随着糖尿病自然病程的发展,模型组空腹血浆胰岛素水平逐渐下降,而胰高血糖素水平、HOMA-IR 呈逐渐升高趋势,并与正常对照组差异有统计学意义($F = 13.445, 51.045, 19.260, P$ 均 < 0.01),见图 1-3A。干预 3 周后,与模型组相比,黄连组胰岛素水平有降低趋势但无统计学意义($F = 1.020, P > 0.05$),HOMA-IR 降低,胰高血糖素分泌减少($F = 13.227, 23.440, P$ 均 < 0.01),见图 1-3B。

2.2 对肠道炎性反应及黏膜屏障的影响

2.2.1 核因子- κB 和 TNF- α

光学显微镜下,可见

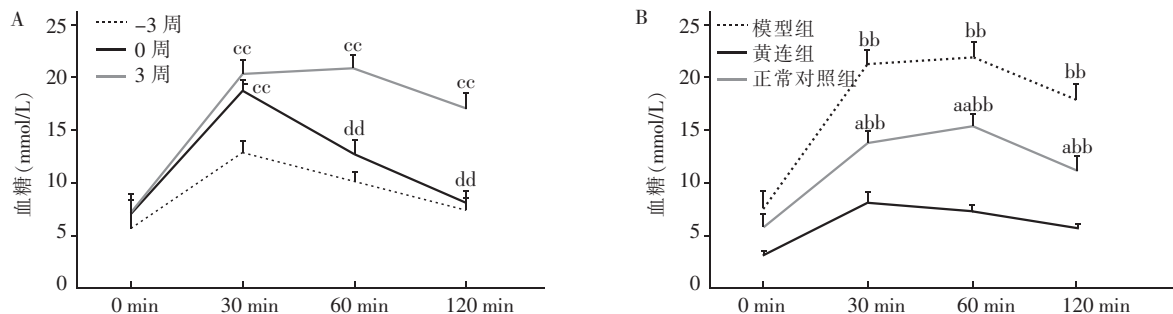
各组大鼠肠绒毛上皮及腺体细胞内包含有棕黄色颗粒的核因子- κ B、TNF- α 阳性细胞。正常对照组、模型组、黄连组回肠核因子- κ B IHS 评分中位数(四分位数间距)分别为 6(0)、2(0)、6(2), 阳性率分别为 $(13.80 \pm 2.28)\%$ 、 $(40.84 \pm 3.43)\%$ 、 $(29.90 \pm 4.79)\%$; TNF- α IHS 评分分别为 6(0)、2(0)、4(2), 阳性率分别为 $(13.20 \pm 1.92)\%$ 、 $(38.46 \pm 4.85)\%$ 、 $(25.70 \pm 2.94)\%$ (免疫组化评分: $\chi^2 = 20.100$ 、21.825, 阳性率: $F = 91.951$ 、83.633, P 均 < 0.01), 见图 2-1(封 3)。

2.2.2 Occludin 和 ZO-1 光学显微镜下, 可见各组大鼠肠绒毛上皮及腺体连续分布棕黄色颗粒的 occludin、ZO-1 阳性细胞。正常对照组、模型组、黄连组回肠 occludin IHS 评分分别为 6(0)、2(0)、4(2), 阳性率分别为 $(43.0 \pm 4.06)\%$ 、 $(15.61 \pm 2.81)\%$ 、 $(28.5 \pm 4.47)\%$; ZO-1 IHS 评分分别为 6(0)、

2(0)、4(0), 阳性率分别为 $(38.8 \pm 2.86)\%$ 、 $(14.69 \pm 2.89)\%$ 、 $(26.1 \pm 5.34)\%$ (免疫组化评分: $\chi^2 = 24.675$ 、25.457, 阳性率: $F = 105.653$ 、71.753, P 均 < 0.01 , 图 2-2, 封 3)。

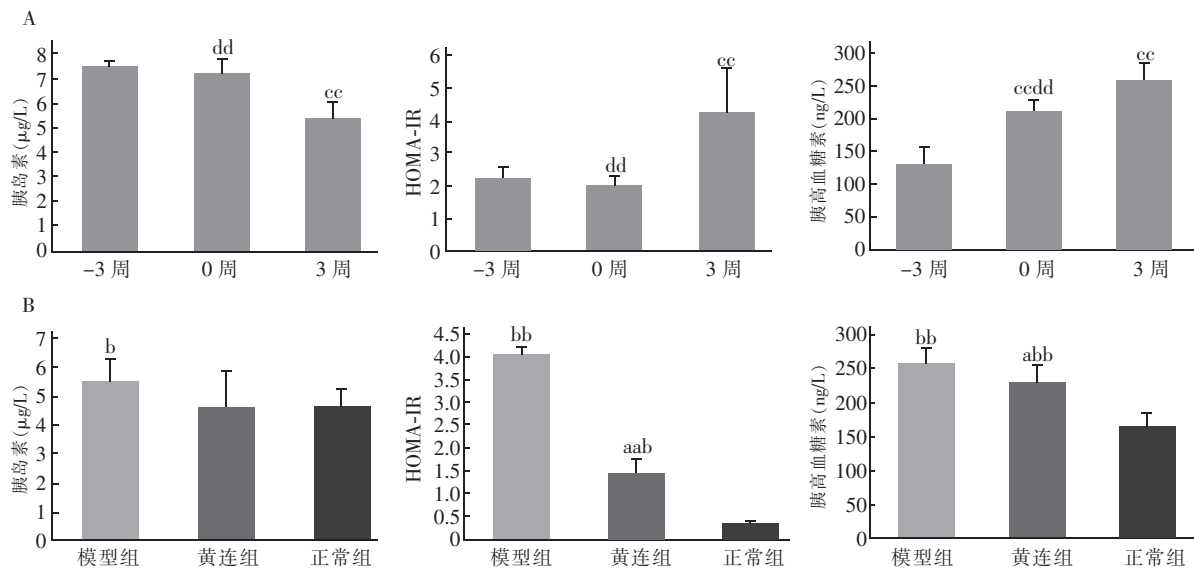
2.3 脂多糖水平 模型组血浆脂多糖水平在 IGT 期(药物干预 0 周)即显著升高($F = 10.661$, $P < 0.05$), 并随病程进展有进一步升高趋势(图 2-3A)。药物干预 3 周后, 与模型组相比, 黄连组血浆脂多糖水平明显降低($F = 22.636$, $P < 0.01$), 而正常对照组则未见明显变化(图 2-3B)。

2.3 对 GLP-1 的影响 模型组空腹血浆 GLP-1 水平随自然病程进展逐渐升高($F = 7.077$, $P < 0.01$) (图 3A)。药物干预 3 周后, 与正常对照组相比, 模型组及黄连组静脉血 GLP-1 水平明显升高($F = 4.954$, $P < 0.05$); 黄连组更为明显($P < 0.05$), 见图 3B。



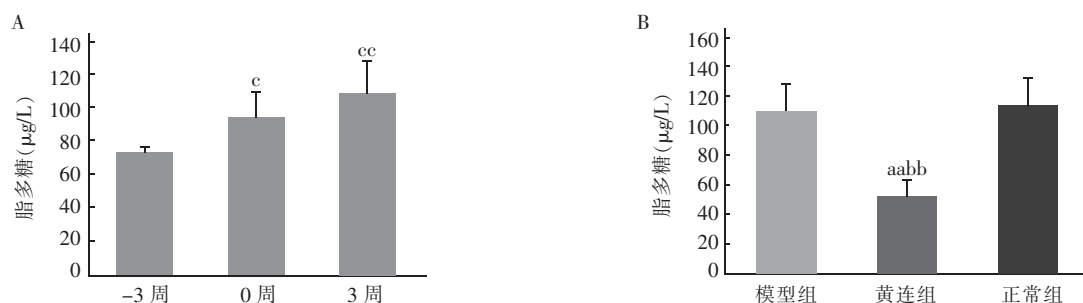
注:与模型组相比,^a $P < 0.05$,^a $P < 0.01$;与正常对照组相比,^b $P < 0.01$;与-3周相比,^c $P < 0.01$;与3周相比,^d $P < 0.01$; -3周:干预前3周,基线期;0周:药物干预前0周;3周:药物干预后3周;黄连组:黄连解毒汤组

图 1-2 模型组不同时期及干预 3 周后各组血糖水平比较



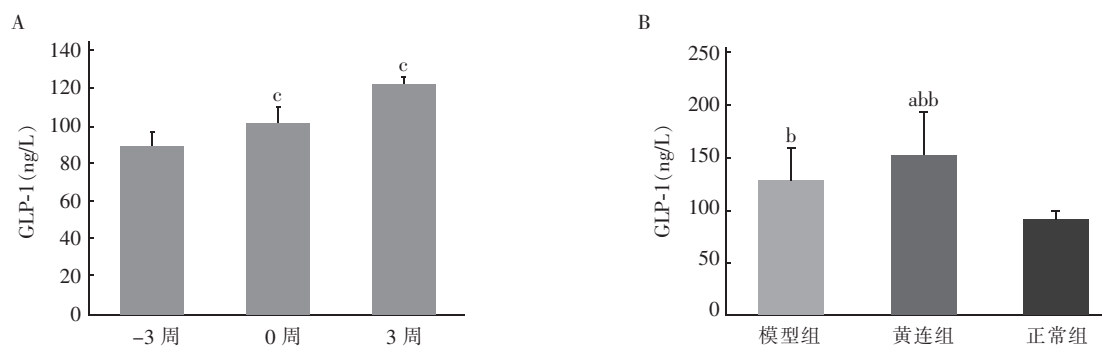
注:与模型组相比,^a $P < 0.05$,^a $P < 0.01$;与正常对照组相比,^b $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与-3周相比,^c $P < 0.01$;与3周相比,^d $P < 0.01$; -3周:干预前3周,基线期;0周:药物干预前0周;3周:药物干预后3周;黄连组:黄连解毒汤组;正常组:正常对照组;HOMA-IR:稳态模型评估-胰岛素抵抗指数

图 1-3 模型组不同时期及干预 3 周后各组胰岛素、HOMA-IR、胰高血糖素水平比较



注:与模型组相比,^a $P<0.01$;与正常对照组相比,^b $P<0.01$;与-3周相比,^c $P<0.05$,^e $P<0.01$; -3周:干预前3周,基线期;0周:药物干预0周;3周:药物干预后3周;黄连组:黄连解毒汤组;正常组:正常对照组

图 2-3 模型组不同时期及干预 3 周后各组血脂多糖水平比较



注:与模型组相比,^a $P<0.05$;与正常对照组相比,^b $P<0.01$;与-3周相比,^c $P<0.05$,^e $P<0.01$; -3周:干预前3周,基线期;0周:药物干预0周;3周:药物干预后3周;GLP-1:胰高血糖素样肽-1;黄连组:黄连解毒汤组;正常组:正常对照组

图 3 模型组不同时期及干预 3 周后各组 GLP-1 水平比较

3 讨论

IGT 阶段作为糖尿病的一个重要过渡期,虽尚未出现血糖的明显升高,但病理生理改变已悄然出现^[9]。已证实全身各器官、系统的脂多糖与糖尿病慢性免疫炎症反应相关^[10-11]。脂多糖作为致病菌及菌体成分进入机体的主要部位,肠道黏膜表面的完整性对于防止其由肠腔进入血液及其他器官系统、抑制内毒素血症的发生具有关键性作用,而肠道炎症水平对肠道屏障功能有重要影响。此外, GLP-1、GLP-2 的分泌及功能紊乱也可能是关键之一。GLP-1 通过血糖依赖性的促胰岛素分泌、降低胰高血糖素水平、延缓胃排空等作用参与调节糖代谢,并可促进胰岛 β 细胞再生及分化^[1]。近年研究表明, GLP-1 分泌并非一定由餐后高血糖、营养物质等刺激引起,白细胞介素-6 可以刺激离体胰岛分泌 GLP-1^[12]。空腹 GLP-1 与糖代谢亦有密切关联。胃旁路手术除改善患者糖代谢外,也对其 GLP-1 的基础水平产生了明显影响^[13]。除了降糖作用,基于肠促胰素的治疗还可减少糖尿病并发症的发生。这可能与抗炎及抗氧化应激的作用相关^[4]。

黄连解毒汤及其主要成分小檗碱等,因其有效的抗炎作用被广泛应用于结肠炎等肠道疾病,同时,也已被证实对糖尿病大鼠及患者具有明显的降糖、降脂、改善胰岛素抵抗、缓解内毒素血症等作用^[14]。然而,黄连解毒汤抗炎作用的机制仍然不清。由于黄连解毒汤难以被吸收入血,其主要作用部位位于

胃肠道黏膜表面^[15]。研究表明,5 周黄连解毒汤治疗以剂量依赖方式升高糖尿病大鼠糖负荷后血浆 GLP-1 水平,促进肠道 GLP-1 的合成及分泌,进而增加胰岛素分泌,增强胰岛 β 细胞功能^[6]。因此推测,黄连解毒汤可能通过改善肠道炎症反应,降低肠道通透性,减少菌体入血,并促进 GLP-1 分泌,调节代谢,最终减轻胰岛素抵抗,预防并延缓糖尿病的发生、发展。

本研究选用因瘦素受体基因突变而自发 2 型糖尿病的 ZDF 大鼠动物模型,于 IGT 期予黄连解毒汤灌胃干预。在模型组病情自然发展至糖尿病期时,黄连组可见到糖尿病发病率明显降低,以及明显的进食量减少,体重下降,空腹血糖、血脂、胰高血糖素水平降低,胰岛素敏感性增强等。既往研究已发现,随病程进展,高脂饲喂大鼠餐后血浆 GLP-1 水平逐渐升高,这可能与肠道 L 细胞对肠道内营养物质敏感,释放 GLP-1 增加相关^[16]。而黄连解毒汤可明显促进糖尿病大鼠肠道 L 细胞内 GLP-1 的合成^[6]。本研究也观察到,随病程进展,与正常组相比,模型组空腹血浆 GLP-1 水平亦有明显升高,而 3 周黄连解毒汤药物干预使其进一步增加。大鼠发病延缓可能与血浆 GLP-1 水平升高相关。GLP-1 通过促进胰岛素分泌,增加胰岛素敏感性,降低胰高血糖素水平,延缓大鼠胃排空,从而延缓 IGT 期 ZDF 大鼠糖尿病病程进展。

紧密连接为位于上皮细胞管腔面膜的顶侧部的

相邻上皮细胞之间、环绕上皮细胞的连续网带状复合物,包括occludin、闭合蛋白、ZO等,与肠上皮细胞一起维持肠道屏障功能。作为紧密连接组成成分之一的occludin及ZO-1的变化常被用来评价肠黏膜屏障功能^[17]。对ZDF大鼠远端回肠黏膜免疫组化染色后发现,糖尿病期ZDF大鼠肠道炎症因子TNF- α 表达明显增加。炎症反应可导致肠道屏障功能紊乱,增加肠黏膜通透性。模型组occludin及ZO-1表达降低与上述表现相一致,而黄连解毒汤对肠道炎症反应及肠道屏障具有明显的改善作用。降低的炎症反应水平在一定程度上参与维持肠道黏膜屏障,减少菌体及其成分入血,进而抑制机体慢性免疫炎症反应,从而延缓糖尿病的发生、发展。既往实验已证实,GLP-1可以下调细胞中核因子- κ B的激活,减少炎症细胞因子(白细胞介素-1 β 、TNF- α)的产生,减轻肠道炎症反应及维持肠道上皮结构^[4]。因此推测,黄连解毒汤的抗炎作用可能与升高的GLP-1水平相关。

本研究观察到,黄连解毒汤明显降低了ZDF大鼠血浆脂多糖水平。然而,与预期相反的是,药物干预3周后,即高脂喂养6周后,正常对照组血浆脂多糖水平亦有明显升高,与模型组差异无统计学意义。结合正常对照组血糖、胰岛素、胰高血糖素水平的变化,不除外高脂饮食后,正常对照组肠道菌群已有明显改变,且发生菌群定植移位、肠道屏障受损的可能,且上述改变发生于胰岛素水平、血糖水平发生改变之前。而黄连组血浆脂多糖水平降低是单纯来源于药物对肠道屏障功能的改善,亦或是受黄连解毒汤对肠道菌群构成及数量调节的影响,仍需进一步探讨。

综上所述,黄连解毒汤对于IGT期ZDF大鼠具有延缓糖尿病发生的作用。这可能与黄连解毒汤促进GLP-1合成及分泌、改善肠道炎症反应、保护肠道黏膜屏障相关。因此,本研究首次发现,黄连解毒汤具有预防2型糖尿病的作用,并可显著升高糖尿病大鼠空腹血浆GLP-1水平。并且,在整个实验过程中,无大鼠死亡等不良事件的发生。药物的安全性及有效性也为预防2型糖尿病、延缓其病程进展提供了新的解决方法和思路。

参 考 文 献

- [1] Kappe C, Zhang Q, Nyström T, et al. Effects of high-fat diet and the anti-diabetic drug metformin on circulating GLP-1 and the relative number of intestinal L-cells[J]. *Diabetol Metab Syndr*, 2014, 6:70. DOI: 10.1186/1758-5996-6-70.
- [2] 岳峰, 许娟, 李秀莲, 等. 多囊卵巢综合征患者高糖负荷后胰高血糖素样肽1的变化[J]. *中华糖尿病杂志*, 2016, 8(2): 108-112. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-5809.2016.02.010.
- [3] 韩瑛, 吕肖锋. 早期胰岛素泵治疗对新诊断的2型糖尿病患者胰升血糖素样肽1的影响[J]. *中国糖尿病杂志*, 2011, 19(2): 122-124. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6187.2011.02.011.
- [4] Kawanami D, Matoba K, Sango K, et al. Incretin-based therapies for diabetic complications: basic mechanisms and clinical evidence[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(8). pii: E1223. DOI: 10.3390/ijms17081223.
- [5] Pang B, Zhao LH, Zhou Q, et al. Application of berberine on treating type 2 diabetes mellitus[J]. *Int J Endocrinol*, 2015, 2015:905749. DOI: 10.1155/2015/905749.
- [6] Yu YL, Lu SS, Yu S, et al. Huang-lian-jie-du-decoction modulates glucagon-like peptide-1 secretion in diabetic rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 124(3): 444-449. DOI: 10.1016/j.jep.2009.05.027.
- [7] Kawano K, Hirashima T, Mori S, et al. Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain[J]. *Diabetes*, 1992, 41(11): 1422-1428.
- [8] Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, et al. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors[J]. *Cancer*, 2000, 89(12): 2637-2645.
- [9] Tabák AG, Jokela M, Akbaraly TN, et al. Trajectories of glycaemia, insulin sensitivity, and insulin secretion before diagnosis of type 2 diabetes: an analysis from the Whitehall II study[J]. *Lancet*, 2009, 373(9682): 2215-2221. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)60619-X.
- [10] Kemp DM. Does chronic low-grade endotoxemia define susceptibility of obese humans to insulin resistance via dietary effects on gut microbiota? [J]. *Adipocyte*, 2013, 2(3): 188-190. DOI: 10.4161/adip.24776.
- [11] Hameed I, Masoodi SR, Mir SA, et al. Type 2 diabetes mellitus: from a metabolic disorder to an inflammatory condition[J]. *World J Diabetes*, 2015, 6(4): 598-612. DOI: 10.4239/wjd.v6.i4.598.
- [12] Ellingsgaard H, Hauselmann I, Schuler B, et al. Interleukin-6 enhances insulin secretion by increasing glucagon-like peptide-1 secretion from L cells and alpha cells[J]. *Nat Med*, 2011, 17(11): 1481-1489. DOI: 10.1038/nm.2513.
- [13] 任泽强, 章红, 张蓬波, 等. 胃转流术对2型糖尿病大鼠胰高血糖素样肽1及小肠黏膜的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2014, 31(10): 2172-2174. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2014.10.031.
- [14] 姚霜霜, 张翼飞, 张志国, 等. 小檗碱改善代谢性疾病的肠道相关机制[J]. *国际内分泌代谢杂志*, 2014, 34(6): 386-389. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2014.06.007.
- [15] Hua W, Ding L, Chen Y, et al. Determination of berberine in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 44(4): 931-937. DOI: 10.1016/j.jpba.2007.03.022.
- [16] Nakajima S, Hira T, Hara H. Postprandial glucagon-like peptide-1 secretion is increased during the progression of glucose intolerance and obesity in high-fat/high-sucrose diet-fed rats[J]. *Br J Nutr*, 2015, 113(9): 1477-1488. DOI: 10.1017/S0007114515000550.
- [17] 李希, 吴克芬, 任卫英, 等. 肠内营养对增龄大鼠肠黏膜上皮屏障的影响[J]. *老年医学与保健*, 2014, 20(5): 304-307. DOI: 10.3969/j.issn.1008-8296.2014-09.

(收稿日期: 2016-10-15)