

“化浊解毒方”对二恶英暴露2型糖尿病大鼠脂代谢及胰岛素抵抗的影响

郭胜男¹ 刘弘毅² 吴深涛¹

(1. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300380; 2. 云南中医药大学第一附属医院, 云南昆明 650000)

摘要 目的:研究化浊解毒方对二恶英暴露2型糖尿病大鼠(ZDF大鼠)脂代谢及胰岛素抵抗的影响。方法:口服葡萄糖耐量试验(OGTT)合格的雄性ZDF(fa/fa)大鼠,随机分为模型组6只,二恶英染毒组12只,另取6只雄性ZDF(fa/+)大鼠为正常组。正常组予普通饲料喂养,模型组、二恶英染毒组予ZDF专用饲料PMI Labdiet5008喂养。二恶英染毒组予二恶英混标品(50 ng/kg)灌胃染毒,正常组、模型组灌胃等体积玉米油,共8周。染毒后,将二恶英染毒组随机分为染毒组与化浊解毒方组。化浊解毒方组予化浊解毒颗粒生药 $6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃给药,其他各组灌服等体积生理盐水,连续治疗4周。各组大鼠采用葡萄糖氧化酶法进行OGTT,放射免疫法测空腹血清胰岛素水平,全自动生化分析仪检测血清甘油三酯(TG)、胆固醇(TC)水平,比色法检测游离脂肪酸(FFA)水平。结果:与正常组比较,模型组大鼠血糖、空腹胰岛素水平、胰岛素抵抗指数、血脂水平均明显上升($P<0.05$),胰岛素敏感指数明显下降($P<0.05$);与模型组比较,染毒组大鼠血糖、空腹胰岛素水平、胰岛素抵抗指数、血脂水平明显上升($P<0.05$),胰岛素敏感指数明显下降($P<0.05$)。经化浊解毒颗粒治疗后,上述指标均较染毒组明显改善($P<0.05$)。结论:化浊解毒方具有显著改善二恶英暴露大鼠胰岛素抵抗及糖脂代谢的作用。

关键词 实验性糖尿病;化浊解毒方;血清胰岛素;胰岛素抵抗指数;血脂;大鼠;雄性;实验研究

中图分类号 R587.105 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2020)06-0083-04

基金项目 国家自然科学基金地区科学基金项目(8176150282);云南省应用基础研究计划中医联合面上项目[2018FF001(-053)];云南省应用基础研究计划青年项目(2017FD174)

目前,全球2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)的患病人数呈爆炸性增长,胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)和胰岛素分泌受损是T2DM发生、发展的两大病理生理基础,传统观念认为不良的生活方式(如久坐少动)和不健康的饮食习惯(如高脂饮食)是导致肥胖、IR和T2DM的主

要原因,但这些常规危险因素已不能解释全球范围内与IR相关的代谢性疾病的飞速增长,然而却与近50年工业发展呈一致趋势。随着全球工业的发展,环境污染日益加剧,持续性有机污染物(persistent organic pollutants, POPs)是环境污染物中最具代表性的有毒化学物质^[1],这类化合物具有

该病包括西医学中早产儿、小于胎龄儿等。因此,以上整理概括历代重要医籍中关于胎怯病名、病因病机及治法方药之相关论述及学术脉络和规律,庶为后世医家治疗胎怯提供重要思路,为当今临床提供参考。

参考文献

- [1] 高旭昀,刘思娜,韩鹏.中医药治疗胎怯的研究进展[J].中国中医药现代远程教育,2019,17(5):136.
- [2] 刘彪,叶肖琳,叶新苗.叶新苗辨治胎怯经验[J].浙江中医杂志,2019,54(4):297.
- [3] 盛晓静,殷勤.母乳喂养对胎怯儿体格发育的影响[J].实用中西医结合临床,2016,16(7):37.

- [4] 陈丽亚.136例低出生体重儿与母亲中医体质关系的研究[J].中医儿科杂志,2015,11(4):56.

- [5] 马融.中医儿科学[M].4版.北京:中国中医药出版社,2016:180.

第一作者:姜德友(1960—),男,医学博士,教授,研究方向为中医药防治内科疑难杂病。

通讯作者:韩洁茹,医学博士,副教授。
87569229@qq.com

收稿日期:2019-12-16

编辑:吕慰秋

理化性质稳定、难降解、亲脂性、疏水性、远距离传输、高蓄积性等特点,并且能够通过食物链进入人体内并产生生物放大效应^[2],最终蓄积在人体(血液、脂肪、母乳等)中,并且很难从人体代谢或排泄出去,对人类健康产生潜在的负面影响^[3]。有证据表明,POPs暴露会导致胰岛素抵抗及2型糖尿病的发生^[4]。

早期研究发现,脂毒性与脂代谢异常既是胰岛素抵抗的结果,又是胰岛素抵抗的重要致病因素^[5]。我们前期研究表明,化裁自升降散的化浊解毒方在改善SD大鼠糖、脂毒性相关IR方面有显著的疗效^[6-7]。本研究选取POPs中典型的有机污染物——二恶英,建立2型糖尿病大鼠(ZDF大鼠)染毒模型,观察化浊解毒方对二恶英暴露的ZDF大鼠糖脂代谢及IR的影响,揭示化浊解毒方如何解“环境污染之毒”,为其进一步临床应用提供实验依据。

1 实验材料

1.1 实验动物及饲料 SPF级雄性ZDF (fa/fa) 大鼠,6周龄,体重180~200 g;SPF级雄性ZDF (fa/+) 大鼠,6周龄,体重140~160 g。大鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2016-0006。PMI Labdiet5008饲料:成分为粗蛋白24%、粗脂肪7.1%、粗纤维3.2%、无氮浸出物48.9%、矿物质(有机物)6.7%、维生素3.2%,购自雍立(上海)生物科技有限公司。大鼠饲养于屏障级实验动物中心(配备独立通气饲养笼),控制温度20~25℃,湿度(55±10)%,12 h明暗交替照明(光照时间7:00—19:00)。实验期间,动物自由摄食进水,每日更换垫料,保持笼内干燥、清洁。

1.2 实验药物 二恶英混标(成分:2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin, 1,2,3,7,8-Pentachlorodibenzo-p-dioxin, 1,2,3,4,7,8-Hexachlorodibenzo-p-dioxin, 1,2,3,4,6,7,8-Heptachlorodibenzo-p-dioxin, Octachlorodibenzo-p-dioxin),购自美国AccuStandard公司;化浊解毒方颗粒(组成:黄连、大黄、姜黄、蝉蜕、僵蚕、枳实、清半夏、白芍、柴胡、黄芩、干姜、佩兰),由天津中医药大学第一附属医院药厂制备,批号:津药制字(临)Z20130944。

1.3 试剂与仪器 碘^[125I]胰岛素放射免疫试剂盒,购自北京北方生物技术研究所;游离脂肪酸测定试剂盒(比色法),购自南京建成生物工程研究所。罗氏血糖仪(型号:ACCU-CHEK),购自德国罗氏诊断有限公司;血糖试纸(型号:ACCU-CHEK),购自德国罗氏诊断有限公司,批号477493;SN697双探头全自动放免 γ 计数器,购自上海核所日环光电仪器有限公司;全自动生化

分析仪(规格型号:7020型ISE),购自日本日立公司;电子天平(型号:KFS-3000),购自浙江凯丰集团公司;低速多管架自动平衡离心机(型号:TDZ5-WS),湖南湘仪实验室仪器开发有限公司生产;分光光度计(型号:723S),购自上海棱光技术有限公司。

2 实验方法

2.1 分组与染毒、药物干预 选取6周龄雄性ZDF (fa/fa) 大鼠为模型鼠,以普通饲料适应性饲养1周,按照随机数字表法随机分为模型组与二恶英染毒组,另取6周龄雄性ZDF (fa/+) 大鼠为正常组。实验全程正常组予普通饲料喂养,模型组、二恶英染毒组予ZDF专用饲料PMI Labdiet5008喂养。二恶英用玉米油溶解,以50 ng/kg灌胃二恶英染毒组大鼠染毒,模型组和正常组以等体积玉米油灌胃,每日灌胃1次,共8周。随后将二恶英染毒组大鼠随机分为染毒组与化浊解毒方组。依据《中国临床药理学与治疗学》中的公式以及我们前期研究,化浊解毒方高剂量(6.0 g·kg⁻¹·d⁻¹) 在降糖降脂及改善胰岛素抵抗等方面明显优于低剂量(1.5 g·kg⁻¹·d⁻¹) 及中剂量(3.0 g·kg⁻¹·d⁻¹)^[8-9],因此本研究化浊解毒方组按生药6.0 g·kg⁻¹·d⁻¹灌胃给药,其他各组以等体积生理盐水灌胃,共4周。最终各组选择6只大鼠进行指标检测。

2.2 口服葡萄糖耐量试验(OGTT) 治疗后对各组大鼠进行OGTT。大鼠禁食不禁水12 h,于上午7时对各组大鼠依次剪尾,使用血糖仪检测空腹血糖(FBG),随后用50%葡萄糖以2 g/kg的剂量灌胃,在灌胃后30 min、60 min、90 min、120 min时再次剪尾检测血糖浓度。

2.3 空腹血清胰岛素(FINS)及血脂指标检测 药物干预结束后各组大鼠目内眦取血,将收集到的血浆样本置于离心机中,离心半径157 mm,3 000 r/min离心10 min,收集血清,检测空腹血清胰岛素(FINS)、甘油三酯(TG)、胆固醇(TC)及游离脂肪酸(FFA)。

2.4 计算胰岛素抵抗指数、胰岛素敏感指数 参照李光伟教授^[10]发表的相关胰岛素抵抗计算公式,进行计算。胰岛素抵抗指数(HOMA-IRI)=FBG×FINS/22.5,胰岛素敏感指数(HOMA-ISI)=Ln[1/(FBG×FINS)]。

2.5 统计学方法 采用SPSS 19.0软件包进行统计学处理,数据采用($\bar{x} \pm s$)表示,计量资料比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),2组间数据比较采用LSD-t检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组大鼠治疗后OGTT结果比较 见表1。

3.2 各组大鼠治疗后空腹血清胰岛素水平、胰岛素抵抗指数及胰岛素敏感指数比较 见表2。

3.3 各组大鼠治疗后血脂水平比较 见表3。

4 讨论

各国许多大规模流行病学研究已经确定了POPs与胰岛素抵抗以及T2DM之间密切相关,尤其是近10年来,全球至少有20个横断面研究和近10个纵向研究证实了这一观点。POPs不仅造成环境污染,而且90%可通过饮食摄入危害人体健康。研究发现,胎儿在子宫内暴露POPs极大增加成年后罹患糖尿病的风险^[11]。虽然POPs自20世纪70年代已被禁止或限制使用,但其高稳定性、高亲脂性及高生物蓄积性,其危害仍然持续存在。我国长三角、珠三角当地环境中POPs含量显著高于美国等其他国家风险阈值^[12-15],河北省POPs人体负荷水平6年间上升了25%^[16]。因此,研究开发新的药物以防治POPs对人体的持续危害是目前亟须解决的问题。本研究结果进一步证明,二恶英暴露会导致ZDF大鼠胰岛素抵抗,且能够使TC、TG与FFA的水平升高。POPs导致IR具体的分子机制尚未阐明,有研究发现低剂量二恶英暴露引起线粒体出现去极化现象,胰岛细胞对血糖刺激的敏感性显著降低,随着二恶英剂量加大,线粒体嵴出现肿胀,表现出明显的细胞毒性^[17]。

游离脂肪酸及甘油三酯是造成脂毒性的核心物质,脂毒性会促进炎症和IR,IR反过来会加重脂毒性。IR是造成机体代谢紊乱的关键因素,造成高血糖和脂代谢紊乱,是引发脂毒性及多种并发症的重要因素。因此二恶英可能是通过脂毒性导致胰岛素抵抗。胰岛素抵抗可以由各种情况引起,包括异常的胰岛素信号传导、脂毒性、炎症、线粒体功能障碍和内质网(ER)应激等^[18]。二恶英是否通过其他途径导致胰岛素抵抗,还有待进一步研究。

葡萄糖耐量试验是目前诊断糖代谢异常的标准方法,其结果可以反映胰岛β细胞分泌功能以及机体对血糖的调节能力。本研究结果表明,化浊解毒

表1 各组大鼠治疗后口服糖耐量试验结果比较($\bar{x}\pm s$) 单位:mmol/L

组别	动物数/只	0 h	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h
正常组	6	5.00±0.33	8.28±0.44	10.08±0.83	8.75±0.45	6.53±0.38
模型组	6	11.73±0.68 [*]	19.78±0.71 [*]	21.80±0.69 [*]	20.43±0.74 [*]	18.52±0.49 [*]
染毒组	6	23.30±0.93 ^{##}	32.25±1.02 ^{##}	32.72±0.52 ^{##}	33.00±0.21 ^{##}	31.05±0.98 ^{##}
化浊解毒方组	6	16.98±1.71 ^{##▲}	25.07±1.65 ^{##▲}	27.02±1.71 ^{##▲}	27.62±1.18 ^{##▲}	25.02±0.93 ^{##▲}

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$;与染毒组比较,▲ $P<0.05$ 。

表2 治疗后各组大鼠空腹血清胰岛素水平和胰岛素抵抗、胰岛素敏感指数比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	空腹胰岛素水平/(μ IU/mL)	胰岛素抵抗指数	胰岛素敏感指数
正常组	6	13.88±1.54	3.07±0.17	-4.23±0.05
模型组	6	36.07±2.26 [*]	37.27±0.95 [*]	-6.73±0.03 [*]
染毒组	6	597.26±153.52 ^{##}	308.12±63.91 ^{##}	-8.83±0.20 ^{##}
化浊解毒方组	6	137.95±15.45 ^{##▲}	103.23±5.29 ^{##▲}	-7.75±0.05 ^{##▲}

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$;与染毒组比较,▲ $P<0.05$ 。

表3 治疗后各组大鼠血脂水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	TC/(mmol/L)	TG/(mmol/L)	FFA/(μ mol/L)
正常组	6	2.93±0.09	0.81±0.09	807.75±52.21
模型组	6	3.42±0.22 [*]	3.95±0.12 [*]	1159.21±25.39 [*]
染毒组	6	4.51±0.29 ^{##}	7.75±0.35 ^{##}	1383.05±50.70 ^{##}
化浊解毒方组	6	4.24±0.19 ^{##▲}	6.54±0.30 ^{##▲}	1251.04±28.22 ^{##▲}

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$;与染毒组比较,▲ $P<0.05$ 。

方对染毒大鼠葡萄糖耐量具有改善作用。

胰岛素作为机体内唯一具有降低血糖作用的激素,对维持体内葡萄糖稳态有极其重要的作用。IR导致胰岛素对其靶器官的生物效应降低,致染毒大鼠胰岛β细胞代偿分泌胰岛素,并出现高胰岛素血症。本研究结果表明,化浊解毒方能有效降低二恶英染毒大鼠空腹胰岛素水平,改善大鼠高胰岛素血症,其机制与其对染毒大鼠胰岛素抵抗的改善作用有关。

化浊解毒方以清代医家杨栗山之古方升降散化裁,全方“取僵蚕、蝉蜕升阳中之清阳,姜黄、大黄降阴中之浊阴,一升一降,内外通和,而杂气之流毒顿消矣”(《寒温条辨》卷四)。更以黄连清胃肠之热,合大黄为君清热解毒,荡涤浊邪;加柴胡、黄芩为臣清利少阳,泻肝胆而疏理脾胃;白芍柔肝敛阴,辅佐以不伤阴;枳实理气导滞行浊;清半夏降浊合黄连辛开苦降,疏畅中焦;佩兰和胃化浊消脾瘴,干姜辛温以暖中焦,两者相合亦制他药之苦寒。全方共奏化浊解毒、清肝和胃之功。本研究结果表明,化浊解毒方能够降低二恶英暴露大鼠TC、TG、FFA及空腹血糖,改善糖耐量及IR,提高胰岛素敏感性。

综上,我们可以推测,化浊解毒方改善二恶英暴露大鼠的胰岛素抵抗及糖脂代谢紊乱,可能与其改善糖脂毒性有关,进一步说明,化浊解毒方不仅能解糖脂之毒,亦可能解环境污染之毒,做到真正意义上的解毒,

为未来代谢药物的开发提供理论依据。中药复方具有多靶点、多途径调节机体内代谢平衡的作用,今后实验中,我们将重点探讨化浊解毒方对二恶英暴露大鼠肝、胰及脂肪等病理及分子生物学指标方面的影响,进一步揭示化浊解毒方解环境污染之毒的具体机制。

参考文献

- [1] World Health Organization.State of the science of endocrine disrupting chemicals-2012[M].Geneva: World Health Organization, 2017: 3.
- [2] MAGLIANO D J, LOH V H Y, HARDING J L, et al. Persistent organic pollutants and diabetes: a review of the epidemiological evidence[J].Diabetes Metab, 2014, 40(1): 1.
- [3] World Health Organization.Persistent organic pollutants: impact on child health[J].Geneva: World Health Organization, 2010: 19.
- [4] WOLF K, BONGAERTS B W C, SCHNEIDER A, et al. Persistent organic pollutants and the incidence of type 2 diabetes in the CARLA and Kora cohort studies[J].Environ Int, 2019, 129: 221.
- [5] 杨文英.从脂毒性到糖尿病再到血脂异常[J].国外医学内分泌学分册, 2004, 24(4): 287.
- [6] 章清华, 吴深涛, 周祥, 等.化浊解毒方对胰岛素抵抗大鼠脂联素及胰岛素敏感指数的影响[J].江苏中医药, 2013, 45(2): 72.
- [7] 张峻, 章清华, 闫冬雪, 等.化浊解毒方对胰岛素抵抗大鼠脂代谢的影响[J].辽宁中医杂志, 2014, 41(8): 1747.
- [8] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等.药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J].中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069.
- [9] ZHANG Q H, HUANG Y Y, LI X J, et al.Tangduqing granules attenuate insulin resistance and abnormal lipid metabolism through the coordinated regulation of PPAR γ and DGAT2 in type 2 diabetic rats[J].J Diabetes Res, 2019: 7403978.
- [10] 李光伟.胰岛素抵抗评估及其临床应用[J].中华老年多器官疾病杂志, 2004, 3(1): 11.
- [11] NGWA E N, KENGNE A P, TIEDEU-ATOCHO B, et al.Persistent organic pollutants as risk factors for type 2 diabetes[J].Diabetol Metab Syndr, 2015, 7: 41.
- [12] 张煜, 陈社军, 李楠, 等.苏南城市群河流表层沉积物中二噁英和共平面多氯联苯的浓度水平、来源和生态风险[J].环境化学, 2014, 33(9): 1445.
- [13] 夏洁.二恶英类污染物的高通量生物检测技术研究及其在环境监测中的应用[D].南京: 南京大学, 2013.
- [14] ZHANG S K, PENG P G, HUANG W L, et al.PCDD/PCDF pollution in soils and sediments from the Pearl River Delta of China[J].Chemosphere, 2009, 75(9): 1186.
- [15] 韩见龙.浙江省二恶英、多氯联苯污染水平及其对人体健康危害的风险评价研究[D].杭州: 浙江大学, 2011.
- [16] 李敬光, 赵云峰, 吴永宁.我国持久性有机污染物人体负荷研究进展[J].环境化学, 2011, 30(1): 5.
- [17] LEE H K, CHO Y M, KWAK S H, et al.Mitochondrial dysfunction and metabolic syndrome-looking for environmental factors[J].Biochim Biophys Acta, 2010, 1800(3): 282.
- [18] KIM Y A, PARK J B, WOO M S, et al.Persistent organic pollutant-mediated insulin resistance[J].Int J Environ Res Public Health, 2019, 16(3): e448.

第一作者: 郭胜男(1989—), 女, 博士研究生, 主治医师, 研究方向为中医药治疗内分泌与代谢性疾病。

通讯作者: 吴深涛, 医学博士, 教授, 主任医师, 博士研究生导师。shtaowu@163.com

收稿日期: 2020-01-10

编辑: 吴宁

《江苏中医药》论文层次标题及编号的编写要求

(1) 层次标题是对本段、本条主题内容的高度概括。各层次的标题应简短明确, 同一级别层次标题词组结构应尽可能相同, 语气一致。

(2) 层次标题的分级编号, 推荐执行新闻出版行业标准 CY/T 35—2001《科技文献的章节编号方法》, 采用阿拉伯数字。

(3) 层次标题不宜使用非公知公认的缩略语。

(4) 层次标题的层次不宜过多, 一般不超过4级, 即“1”“1.1”“1.1.1”“1.1.1.1”。

(5) 语段中出现多层次接排序号时, 可依次用圆括号数码“(1)”“①”。