

Effects of Shendi Tang Maining Decoction on Steatosis of hepatocyte in Experimental Type 2 Diabetic Rats

ZHANG Xue-liang, WU Ying, XIE Ling-zhi, SHEN Qiong, JIANG Lian, WANG Li, CHEN Lei, WANG Fei

Department of Endocrinology, Base of Suzhou Municipal Hospital, Suzhou, Jiangsu, China

Received: May 13, 2014

Accepted: Jul 04, 2014

Published: Jul 22, 2014

DOI:10.14725/gjems.v1n1.a446 URL:<http://dx.doi.org/10.14725/gjems.v1n1.a446>

This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Objective: To evaluate effects of Shendi Tang Maining Decoction on steatosis of hepatocyte in type 2 diabetes mellitus. **Methods:** Type 2 diabetes was induced, in female Wistar rats, by intraperitoneal injection of streptozotocin (25 mg/kg BW), fed with high sucrose and high lipid food. Animals were divided into 2 groups, type 2 diabetes control group (T2DMC group; n=12), type 2 diabetes invention group (T2DMI group; n=12). The age and sex matched Wistar rats served as normal control group (NC group, n=12). The rats of T2DMI group were fed with Shendi Tang Maining Decoction [active pharmaceutical ingredient 5mg/(kg BW•d)]. The rat of NC group and T2DMC were fed with cool boiled water. **Results:** Steatosis of hepatocyte was significant more in every group of type 2 diabetes than NC group ($P<0.01$). Steatosis of hepatocyte was significant less in T2DMI group than T2DMC group ($P<0.01$). Hepatic PAS stain was significant lighter in every group of type 2 diabetes than NC group ($P<0.01$). Hepatic PAS stain was significant darker in T2DMI group than T2DMC group ($P<0.01$). **Conclusion:** Shendi Tang Maining Decoction can ameliorate steatosis and glycogen quantity of hepatocyte in type 2 diabetes mellitus.

Key words

Shendi Tang Maining Decoction; Hepatocyte steatosis; Type 2 diabetes

参地糖脉宁汤对实验性 2 型糖尿病大鼠肝细胞脂肪变的效应*

张学亮, 吴英, 谢灵芝, 沈琼, 蒋联, 王丽, 陈蕾, 王飞

苏州市立医院本部内分泌科, 江苏苏州, 中国

通讯作者: 张学亮, E-mail: zxlsz@hotmail.com

*基金项目: 苏州市科技发展计划项目 (SYSD2010172)

【摘要】目的 评价参地糖脉宁汤对 2 型糖尿病时肝细胞脂肪变的效应。方法 用小剂量 STZ (25 mg/kg BW) 雌性 Wistar 大鼠腹腔内注射加含高糖和高脂饲料喂养造成实验性 2 型糖尿病模型, 分为二组, 2 型糖尿病对照组 (T2DMC 组, n=12), 2 型糖尿病干预组 (T2DMI 组, n=12)。相同鼠龄的雌性 Wistar 大鼠作为正常对照组 (NC 组, n=12)。T2DMI 组用参地糖脉宁汤 [原药 5g/(kg WD•d)] 灌胃; NC 组、T2DMC 组用凉开水灌胃。观察参地糖脉宁汤对 2 型糖尿病时肝细胞脂肪变的效应。结果 T2DM 各组大鼠肝细胞脂肪变显著多于 NC 组 ($P<0.01$), 而 T2DMI 组肝细胞脂肪变显著少于 T2DMC 组。T2DM 各组大鼠肝 PAS 染色密度显著低于 NC 组 ($P<0.01$), 而 T2DMI 组肝细胞 PAS 染色深度显著高于 T2DMC 组。结论 参地糖脉宁汤能改善 2 型糖尿病时的肝细胞脂肪变和糖原含量。

【关键词】参地糖脉宁汤; 肝细胞脂肪变; 2 型糖尿病

随着物质条件的不断提高, 人们的活动量较以前明显减少, 而进食量相对较多, 肥胖和超重人群的比例在逐渐上升。脂肪肝和糖尿病的患病率也在不断上升, 据国内有关统计分析, 糖尿病患者合并脂肪肝的

比例为 32%~46%^[1,2]，国外报道，2 型糖尿病患者脂肪肝的患病率比相同年龄、性别和体重指数的非糖尿病人群高 80% 以上^[3]，而脂肪肝是动脉粥样硬化的危险因素^[4,5]。

参地糖脉宁汤是研究者自己的配方。主要由生地、丹参、大黄、川芎等几味中药组成。以往的临床试验表明，参地糖脉宁胶囊具有改善糖尿病患者血液流变学和减少糖尿病肾病患者尿白蛋白量的作用^[6]。动物实验表明，参地糖脉宁汤对糖尿病大鼠的免疫系统具有一定的保护作用^[7]。参地糖脉宁汤能否改善糖尿病时肝脏变化的作用目前还不清楚。本实验用参地糖脉宁汤剂给实验性 2 型糖尿病大鼠灌胃，观察糖尿病大鼠参地糖脉宁汤干预组与糖尿病大鼠对照组的肝脏变化，了解参地糖脉宁汤对 2 型糖尿病时脂肪肝变的效应。

1 材料与方法

1.1 2 型糖尿病模型的建立、分组与给药 2 型糖尿病动物模型采用小剂量链脲菌素腹腔内注射加高脂高糖饲料喂养诱导方法制作^[8]。雌性 Wistar 大鼠，体重 190~210g，STZ 25mg/kg 腹腔内注射。2 周后测血糖，血糖 ≥ 13.9 mmol/L 的大鼠剔除。其余大鼠夜间禁食 10h 后做糖耐量试验；葡萄糖 2g/kg 体重（配成 20% 葡萄糖溶液）大鼠腹腔内注射，测注射前、注射后 30min、1h、2h 血糖。选择注射后 1h、2h 血糖 ≥ 13.9 mmol/L 的大鼠继续饲养，用高糖高脂饲料（10% 蔗糖、10% 猪油、5% 胆固醇、75% 全价基础饲料）喂养。分为 2 型糖尿病对照组（T2DMC 组，n=12），2 型糖尿病干预组（T2DMI 组，n=12）。相同鼠龄的正常大鼠作为正常对照组（NC 组，n=12），腹腔内注射相同容积的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液，全价基础饲料饲养。T2DMI 组每天用参地糖脉宁汤剂[原药 5 g/(kg BW·d)]灌胃。NC 组和 T2DMC 组给予等量的凉开水灌胃。

1.2 标本获取、指标测定、肝组织标本的制备及染色

1.2.1 血液标本获取与指标测定 用药前及用药后用毛细玻璃管从大鼠内眦静脉取血。每组在实验前及实验后每月测定血糖。实验前及实验后 2 个月和 4 个月时测定糖化血红蛋白（HbA1c）、血清甘油三酯（TG）、总胆固醇（TC）、高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C）、低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）、极低密度脂蛋白胆固醇（VLDL-C）及胰岛素水平。血糖测定采用葡萄糖氧化酶法；HbA1c 测定采用高效液相法；血清 TG 和 TC 采用酶法；HDL-C 和 LDL-C 测定采用直接一步法；VLDL-C 为 TC 减去 HDL-C 和 LDL-C 所得的差值；血清胰岛素测定采用放免法。

1.2.2 肝组织标本的制备及染色 4 个月时脱颈椎处死大鼠取肝脏标本。肝组织经 10% 中性福尔马林固定、流水冲洗、梯度酒精（75%、85%、95%、无水酒精）脱水、氯仿透明、石蜡浸透包埋脱水，切片，苏木素-伊红（HE）染色和过碘酸-Schiff（PAS）染色（糖原染色）用于光镜检查。观察肝细胞脂肪变。脂肪分级，占肝小叶（由中心静脉至肝血窦条带）的 $< 1/3$ 为轻度， $\geq 1/3$ 而 $< 2/3$ 为中度， $\geq 2/3$ 为重度。对 PAS 染色的组织片用图像分析仪测定着色光密度。每一张片观察 3 个部位，取均值。

1.3 统计学方法 各组结果以均数加减标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，用 *t* 检验对各组间结果进行比较。各组间肝细胞脂肪变的比较用卡方（ χ^2 ）检验。

2 结果

2.1 2 型糖尿病各组血糖、糖化血红蛋白、血脂水平及其比较 从表 1 中可以看出，实验开始时、2 个月和 4 个月 2 型糖尿病各组血糖水平均显著高于正常对照组（ $P < 0.01$ ）；实验 4 个月时 T2DMI 组的血糖水平均显著低于 T1DMC 组（ $P < 0.01$ ）。实验 2 个月和 4 个月 2 型糖尿病各组 HbA1c 水平显著高于 NC 组（ $P < 0.01$ ）；实验 4 个月时 T2DMI 组的 HbA1c 水平显著低于 T2DMC 组（ $P < 0.01$ ）。实验开始时、2 个月和 4 个月 T2DM 各组 TG 水平均显著高于正常对照组（ $P < 0.01$ ）；实验 2 个月和 4 个月 T2DMI 组 TG 水平均显著低于 T2DMC 组（ $P < 0.01$ ）。实验开始时、2 个月和 4 个月 T2DM 各组 TC 水平均显著高于 NC 组（ $P <$

0.01)；实验2个月和4个月T2DMI组TC水平均显著低于T2DMC组($P<0.01$)。实验开始时、2个月和4个月2型糖尿病各组之间及与对照组之间HDL-C水平无显著差异($P>0.05$)。实验2个月和4个月糖尿病各组LDL-C水平均显著高于NC组($P<0.05$)。实验2个月和4个月T2DMI组LDL-C水平均显著低于T2DMC组($P<0.01$)。实验开始时、2个月和4个月T2DM各组VLDL-C水平显著高于NC组($P<0.05$)；实验2个月和4个月T2DMI组VLDL-C水平均显著低于T2DMC组($P<0.01$)。实验开始时T2DM各组Ins水平与NC组之间无显著差异($P<0.05$)；实验2个月和4个月T2DM各组Ins水平均显著高于NC组($P<0.01$)，T2DM两组之间Ins水平无显著差异($P>0.05$)。

表1 2型糖尿病各组血糖、糖化血红蛋白、血脂水平及其比较

	NC组(n=12)	T2DMC组(n=12)	T2DMI组(n=12)
PG (mmol/L)			
开始	5.13±1.25	20.03±2.91 ^a	20.18±2.03 ^a
2个月	5.11±1.30	22.09±2.02 ^a	20.05±3.81 ^a
4个月	5.12±1.23	19.39±2.90 ^a	16.01±2.32 ^{ac}
HbA1c (%)			
开始	3.77±0.18	3.72±0.22	3.73±0.21
2个月	3.79±0.19	5.94±0.26 ^a	5.11±0.25 ^{ab}
4个月	3.81±0.19	7.31±0.28 ^a	6.37±0.29 ^{ab}
TG (mmol/L)			
开始	1.03±0.23	4.65±0.22 ^a	4.66±0.25 ^a
2个月	1.04±0.25	4.17±0.39 ^a	2.18±0.46 ^{ac}
4个月	1.04±0.24	4.23±0.68 ^a	2.12±0.40 ^{ac}
TC (mmol/L)			
开始	1.96±0.21	2.05±0.25	2.11±0.22
2个月	1.98±0.22	4.92±1.02 ^a	3.96±1.03 ^{ac}
4个月	2.00±0.20	4.99±0.66 ^a	3.86±0.58 ^{ac}
HDL-C (mmol/L)			
开始	1.09±0.28	1.08±0.32	1.07±0.29
2个月	1.11±0.25	1.14±0.32	1.16±0.30
4个月	1.10±0.24	1.11±0.22	1.17±0.28
LDL-C (mmol/L)			
开始	0.39±0.12	0.41±0.12	0.43±0.13
2个月	0.39±0.14	2.32±0.26 ^a	1.76±0.28 ^{ac}
4个月	0.40±0.13	2.46±0.34 ^a	1.66±0.28 ^{ac}
VLDL-C (mmol/L)			
开始	0.42±0.11	0.61±0.13 ^a	0.61±0.18 ^a
2个月	0.43±0.10	1.46±0.33 ^a	1.04±0.29 ^{ab}
4个月	0.48±0.12	1.52±0.33 ^a	1.03±0.28 ^{ab}
Ins (mU/L)			
开始	14.08±2.59	14.89±2.57	14.59±3.01
2个月	14.96±2.62	19.67±2.52 ^a	18.68±3.63 ^a
4个月	14.90±2.53	24.36±3.01 ^a	23.96±3.02 ^a

注：与NC组比较^a $P<0.01$ ；与T2DMC组比较^b $P<0.05$ ，^c $P<0.01$

2.2 2型糖尿病各组肝脏组织学变化及其比较

表2 2型糖尿病各组肝脏组织学变化及其比较

	NC组(n=12)	T2DMC组(n=12)	T2DMI组(n=12)
轻度肝细胞脂肪变	0	0	2
中度肝细胞脂肪变	0	0	8 ^{ab}
重度肝细胞脂肪变	0	12 ^a	2 ^b
PAS染色密度(OD值)	12202±1203	5671±786 ^a	8365±879 ^{ab}

注：与NC组比较^a $P<0.01$ ；与T2DMC组比较^b $P<0.01$ 。

从表2中可以看出，2型糖尿病各组肝细胞中、重度脂肪变显著多于正常对照组($P<0.01$)；T2DMI组重度肝细胞脂肪变显著少于T2DMC组。2型糖尿病各组肝脏PAS染色OD值显著小于正常对照组($P<0.01$)；T2DMI组肝脏PAS染色OD值显著高于T2DMC组($P<0.01$)。见表2、图1-6。

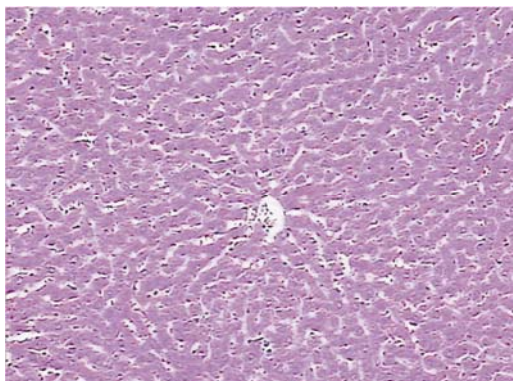


图 1 正常对照大鼠肝脏, HE 染色, 光镜×100

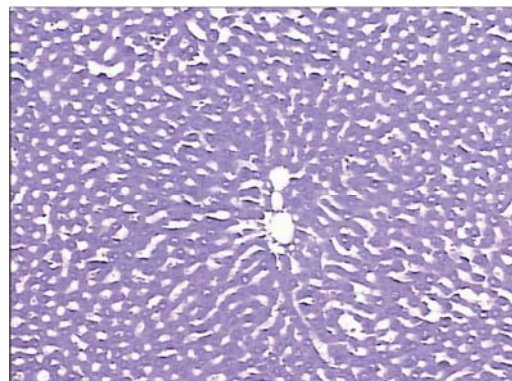


图 4 正常对照组大鼠肝脏, PAS 染色, 光镜×100

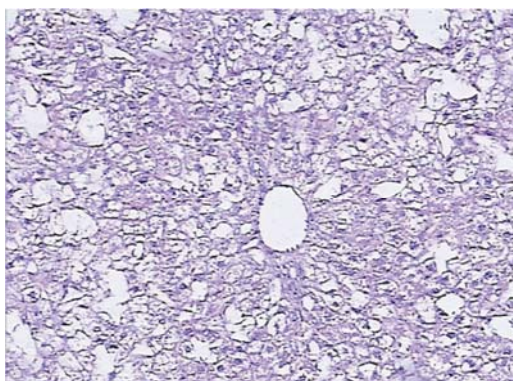


图 2 2 型糖尿病对照组大鼠肝脏, HE 染色, 光镜×100

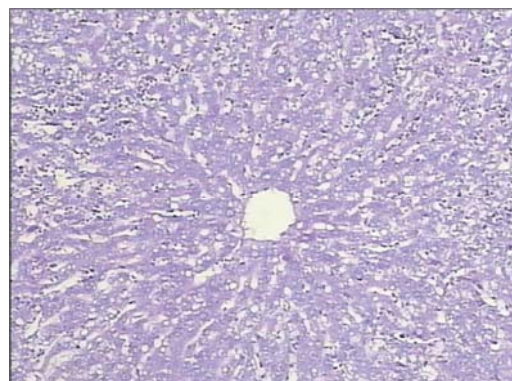


图 5 2 型糖尿病对照组大鼠肝脏, PAS 染色, 光镜×100

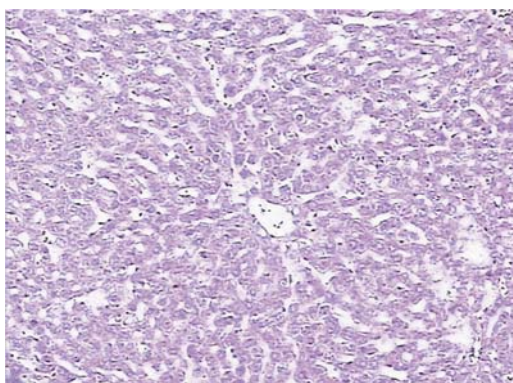


图 3 2 型糖尿病干预组大鼠肝脏, HE 染色, 光镜×100

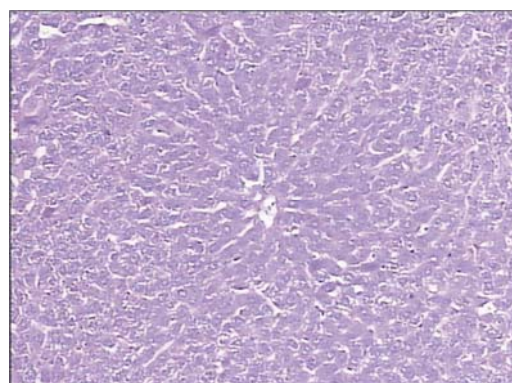


图 6 2 型糖尿病干预组大鼠肝脏, PAS 染色, 光镜×100

3 讨论

实验结果表明, 参地糖脉宁汤可降低实验性 2 型糖尿病大鼠血糖、糖化血红蛋白和血脂水平; 可明显改善实验性 2 型糖尿病大鼠肝细胞脂肪变和糖原含量。

以往的研究表明, 丹参具有增加红细胞变形性, 降低红细胞聚集性和血粘度, 抑制血小板聚集, 降低血脂, 改善肾功能, 抑制成纤维细胞的胶原生成, 抑制血管平滑肌细胞钙内流和细胞增殖的作用^[9]。生地具有改善肾功能、降低血压、轻度降糖的作用^[9]。川芎具有增加红细胞变形性, 降低红细胞聚集性和血粘

度,抑制血小板聚集,改善微循环,增加冠脉流量,减少主动脉脂质的沉积,改善肾功能,抑制血管平滑肌细胞钙内流和舒张血管平滑肌的作用^[9]。大黄具有降低血糖、糖化血红蛋白和血脂的作用^[10-13]。

参地糖脉宁汤主要由生地、丹参、川芎和大黄组成。可以改善红细胞变形性、红细胞聚集性、血小板粘附性和聚集性、血液粘度等,使微循环得以改善。可使葡萄糖在组织中的利用增加。血糖水平下降。参地糖脉宁汤剂使2型糖尿病大鼠的血甘油三酯水平降低,进入肝细胞的脂肪减少。使肝脏脂肪浸润减轻,肝细胞脂肪变减低。PAS染色也称为糖原染色,染色的深浅取决于肝细胞的糖原含量。参地糖脉宁汤使2型糖尿病大鼠血液粘度降低,肝组织微循环改善,肝细胞脂肪变减轻,肝细胞的糖原生成和含量得以改善。

非酒精性脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎及肝纤维化的发生与肝脏及脂肪组织的胰岛素抵抗有关^[13-17]。脂肪组织胰岛素抵抗导致血液中游离脂肪酸增多,游离脂肪酸进入肝细胞增多,肝细胞合成脂肪增多^[14,16]。参地糖脉宁汤可能通过改善胰岛素抵抗而降低血糖、血脂水平而改善实验性2型糖尿病大鼠肝细胞脂肪变和糖原含量。鉴于参地糖脉宁汤对实验性2型糖尿病大鼠的上述作用,可进一步进行临床研究。

总之,参地糖脉宁汤可以改善实验性2型糖尿病大鼠肝细胞脂肪变和糖原含量。

【参考文献】

- [1] 赵琳, Dine Shrestha, 张霞, 等. 2型糖尿病患者非酒精性脂肪肝患病率的回归分析[J]. 中国糖尿病杂志, 2008,16(09):535;562.
- [2] 相莉, 李金荣. 2型糖尿病伴非酒精性脂肪肝临床分析[J]. 天津医药, 2007,35(08):609-610.
<http://dx.doi.org/10.3969/j.issn.0253-9896.2007.08.019>
- [3] Kotronen A, Juurinen L, Hakkarainen A, et al. Liver fat is increased in type 2 diabetic patients and underestimated by serum alanine aminotransferase compared with equally obese nondiabetic subjects[J]. Diabetes Care, 2008,31(01):165-169.
<http://dx.doi.org/10.2337/dc07-1463>
- [4] 范建高, 蔡晓波. 非酒精性脂肪性肝病促进动脉粥样硬化的发生[J]. 中国动脉硬化杂志, 2008,16(01):1-3.
<http://dx.doi.org/10.3969/j.issn.1007-3949.2008.01.001>
- [5] Hamaguchi M, Takeda N, Nagata C, et al. Nonalcoholic fatty liver disease is a novel predictor cardiovascular disease[J]. World Journal of Gastroenterology. 2007,13(10):1579-1584. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v13.i10.1579>
- [6] 张学亮, 徐梓辉, 周世文, 等. “参地糖脉宁”对糖尿病肾病患者红细胞聚集性及尿白蛋白量的影响[J]. 中国血液流变学杂志, 2003,13(03):253-255. <http://dx.doi.org/10.3969/j.issn.1009-881X.2003.03.021>
- [7] 何萍, 张学亮, 张学光. 参地糖脉宁对大鼠免疫系统的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2008,15(10):27-29.
- [8] 郭啸华, 刘志红, 李恒, 等. 实验性2型糖尿病大鼠模型的建立. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2000,9(04):351-355.
<http://dx.doi.org/10.3969/j.issn.1006-298X.2000.04.012>
- [9] 王浴生, 邓文龙, 薛春生. 中药药理应用[M], 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1998:190-198; 412-416; 112-119.
- [10] 杨俊伟, 黎磊石, 刘志红. 大黄抑制糖尿病大鼠肾脏肥大的作用与肾小球内多肽生长因子表达的关系[J]. 中华内分泌代谢杂志, 1995,11(04):228-230. <http://dx.doi.org/10.3760/j.issn:1000-6699.1995.04.009>
- [11] 杨俊伟, 黎磊石. 大黄治疗糖尿病肾病的实验研究[J]. 中华内分泌代谢杂志, 1993,09(04):222-224.
- [12] 杨俊伟, 黎磊石. 大黄对实验性糖尿病大鼠肾脏肥大及高滤过作用的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 1993,13(05): 286-288.
- [13] 张学亮, 郭啸华, 刘志红, 等. 大黄酸对低剂量链脲菌素肥胖糖尿病大鼠尿蛋白量、肾小球形态学和 TGF β 1 mRNA 表达变化的影响[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2005,21(06):563-564
- [14] Cusi K. The role of adipose tissue and lipotoxicity in the pathogenesis of type 2 diabetes[J]. Current Diabetes Reports. 2010,10(4):306-315. <http://dx.doi.org/10.1007/s11892-010-0122-6>
- [15] Angulo P. Medical progress: nonalcoholic fatty liver disease[J]. The New England Journal of Medicine. 2002,346(16):1221-1231. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra011775>
- [16] Cusi K. Nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes mellitus[J]. Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity. 2009;16(02):141-149. <http://dx.doi.org/10.1097/MED.0b013e3283293015>
- [17] Harrison SA, Oliver D, Arnold HL, et al. Development and validation of a simple NAFLD clinical scoring system for identifying patients without advanced disease[J]. Gut, 2008;57(10):1441-1447. <http://dx.doi.org/10.1136/gut.2007.146019>