

黄荔合剂对高血压合并高胆固醇血症大鼠胰岛素抵抗的影响

黄晓忠^{1,2,3#} 林曙光^{1,2,3} 符永恒^{1,2,3} 刘晓颖^{1,2,3} 林秋雄^{1,2,3} 余细勇⁴

(1 广东省人民医院 广州 510080; 2 广东省医学科学院 广州 510080;

3 广东省心血管病研究所 广州 510080; 4 广州医科大学药学院 广东广州 514436)

摘要:目的:评价黄荔合剂对高血压合并高胆固醇血症动物模型胰岛素抵抗影响。方法:将体质量 300~400 g 雄性成年自发性高血压大鼠(SHR)24 只随机分为 SHR 组、模型组、黄荔合剂组,另取 8 只 Wistar 大鼠作为对照组,建立动物模型并给予药物干预,8 周后进行生化检测、葡萄糖耐量试验及胰岛素钳夹实验。结果:模型、药物干预组大鼠总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇较 SHR 组、对照组大鼠显著增高。干预后,与模型组比较,黄荔合剂组葡萄糖耐量明显改善,胰岛素抵抗情况显著改善($P<0.05$)。结论:模型大鼠具有高血压及高胆固醇血症,糖耐量异常及胰岛素抵抗等特征。黄荔合剂改善模型大鼠的胰岛素抵抗,空腹血糖受损及糖耐量异常,具有改善代谢异常的作用。

关键词:自发性高血压大鼠;黄荔合剂;高胆固醇血症;胰岛素抵抗;高胰岛素血症正常血糖钳夹试验;葡萄糖耐量试验

中图分类号:R544.1

文献标识码:B

doi:10.13638/j.issn.1671-4040.2021.14.074

胰岛素抵抗(Insulin Resistance, IR)是骨骼肌、脂肪和肝脏等胰岛素的靶组织对胰岛素刺激的葡萄糖摄取抵抗,引发代偿性胰岛素高分泌,导致糖耐量减低、高胰岛素血症、高三酰甘油血症(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)降低及高血压等疾病。IR 是代谢综合征、多囊卵巢综合征、心血管事件、肥胖、痴呆甚至肿瘤等疾病发病机制的共同环节^[1]。IR 及其继发的代谢紊乱是产生冠心病、糖尿病和高血压的共同原因^[2],大约三分之一貌似健康的人存在 IR 并且发展成临床疾病^[3]。有效治疗 IR,逆转代谢紊乱是避免和减少疾病发生的重要方法,但目前缺乏有效治疗 IR 药物。中药治疗具有价格低廉,疗效稳定且长期使用毒副作用小的优势。利用中国中医药资源及研究的优势,以期发现能够治疗 IR 的中药制剂。建立存在 IR、高血压及高胆固醇血症大鼠模型,采用广东省心血管病研究所经验方组合成的黄荔合剂进行研究,评价其改善 IR 的作用。本研究采用了质检合格的中药浸膏粉以一定比例混合后使用以保证效果稳定,通过空腹血糖测定、糖耐量实验及高胰岛素正常血糖钳夹(Clamp)技术来评价黄荔合剂对模型大鼠 IR、空腹血糖受损及糖耐量异常的影响。现报道如下:

1 材料

1.1 实验动物 体质量 300~400 g 成年雄性自发性高血压大鼠(SHR)及雄性 Wistar 大鼠均由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。

1.2 药材与试剂 黄芪、荔枝核、荷叶等中药浸膏粉(购于广东一方药业有限公司并经过指纹图谱质控,批号 05110823)以一定比例组成黄荔合剂(国家发明专利,专利号 ZL200810026380.0 及

200810026381.5),生化检测试剂盒(美国 Beckman 公司),肝素钠注射液(国药准字 H20153264)3 750 U/kg、2% 盐酸利多卡因注射液(国药准字 H32022839)、门冬胰岛素注射液(注册证号 S20140109)。

1.3 高脂高糖饲料 100 g 饲料中含有 10 g 猪油,10 g 蔗糖,4 g 胆固醇及 0.1%丙硫氧嘧啶,由南方医科大学实验动物中心配制。

1.4 仪器 自动生化分析仪(LX20,美国 Beckman 公司)、血糖仪(Advantage IV,德国罗氏公司),双通道数字式微量注射泵(Harvard Apparatus, USA, WZS250C2 型,浙江大学医学仪器厂)。

2 检测方法

2.1 实验模型制备 将体质量 300~400 g 成年 SHR 大鼠 24 只(购于上海斯莱克实验动物有限责任公司)随机分为 SHR 组、模型组、黄荔合剂组,另取 8 只正常血压雄性 Wistar 大鼠作为对照组。将各组大鼠称重,测定血压及尾静脉取血后,SHR 组及对照组以普通饲料喂养,模型组、黄荔合剂组以含丙硫氧嘧啶的高脂高糖饲料共喂养 8 周,造模 4 周后再进行药物干预 4 周。造模后测定血压及尾静脉取血测定生化指标,确定建立高血压合并高胆固醇血症大鼠模型。

2.2 药物干预方法 以黄荔合剂 1.35 g/kg 对大鼠灌胃治疗,1 次/d,其它组以等体积蒸馏水灌胃,每次 2 ml,共治疗 4 周。

2.3 尾动脉血压测量 将大鼠在 38℃避光烤箱加热 5~10 min 后,采用生理记录仪(Powerlab,澳大利亚)测定大鼠尾动脉血压,选其中 3 次(各测定值间相差在 10 mm Hg 内)取平均值为大鼠血压。

* 基金项目:广东省中医药局科研项目(编号:20181009);

广东省科技计划项目(编号:2013 B 021800189);

广东省科技计划项目(编号:2018KJY2018)

通信作者:黄晓忠, E-mail: xiaozhuang@163.com

2.4 生化指标测量 造模及干预后,大鼠空腹 12 h,尾静脉取血 2 ml 离心后取血浆,采用自动生化分析仪及其配套试剂盒进行生化指标分析,包括空腹血糖(FBG)、总胆固醇(TC)、TG、HDL-C、低密度脂蛋白(LDL-C)等各项指标。

2.5 口服糖耐量试验(OGTT) 药物干预 4 周时,将各组大鼠空腹 12 h 后,从各组大鼠尾静脉末端切口取血 50 μL,采用血糖仪(Advantage IV,德国罗氏公司)及配套血糖试纸测定空腹血糖,再用 20%葡萄糖溶液以 2 g/kg 给各组大鼠灌胃,在灌胃后 15、30、60 及 120 min 时从大鼠尾静脉末端切口处取血 50 μL 同上测定即刻血糖。

2.6 高胰岛素正常血糖钳夹实验

2.6.1 尾动脉插管术 将大鼠空腹 12 h 后,称体质量并腹腔注射肝素注射液 3 750 U/kg 后,将大鼠置于大鼠固定器中,用 2%利多卡因 0.5 ml 在大鼠尾根部环状皮下注射局麻,待尾部反射消失(用针尖刺激鼠尾无反应)后,将鼠套翻转,鼠尾腹面向上,在尾根部中线左侧 0.2 cm 处沿尾纵轴作一长约 1.0 cm 切口。分离皮肤,可见尾动脉鞘,用微血管止血钳分离尾动脉约 0.5 cm,丝线拉紧远心端,使用接装有 50 U/ml 肝素生理盐水注射器 24 G 一次性静脉留置针穿刺尾动脉,轻轻拔出针心,丝线结扎固定导管,明胶海绵止血并胶布固定针体,每小时尾根部补加 2%利多卡因保持局麻。

2.6.2 尾静脉插管术 鼠尾远侧 1/2~1/3 处酒精或热水局部擦洗,使血管扩张,可见到皮下尾静脉,用 24 G 一次性使用静脉留置针穿刺尾静脉,有回血后拔出针心并向近心端推进至套管全部进入静脉,并用胶布固定留置。静脉输液针内装有 50 U/ml 肝素生理盐水,尾部与小三通管相连。

2.6.3 高胰岛素-正葡萄糖糖钳夹术 大鼠插管后静待 30 min,解除插管术可能带来的应激反应。接尾静脉小三通管的一个通道接胰岛素注射液(胰岛素溶于生理盐水溶液中),另一个通道接 10%葡萄糖注射液,胰岛素和葡萄糖分别用双通道数字式微量注射泵(Harvard Apparatus, USA, WZS250C2 型,浙江大学医学仪器厂)注射。首次 0 min 取尾动脉血 2 ml 行生化和血糖检测,用罗氏血糖仪测量血糖值,此时所测血糖为基础血糖(Basic Blood Glucose, BBG)。然后以 1.67 mU/(kg•min)的恒定速度输入胰岛素,5 min 后取动脉血 20 μL,用罗氏血糖仪测量血糖,若此时血糖低于 BBG 的 0.5 mmol/L,则开始输入 10%葡萄糖注射液。以后每 5 min 测血糖 1 次,不断调整葡萄糖输入速率(Glucose Infusion Rate, GIR),使血糖保持在(BBG±0.5) mmol/L 范

围内。60 min 后,若连续 3 次测血糖保持在上述范围内,即达到稳态,此时取动脉血 0.5 ml 测量血浆胰岛素(钳夹稳态胰岛素),继续上述过程,直到 120 min 结束,共采血 24 次。实验结束后,采用 60~120 min 时各组平均 GIR 指标来反映胰岛素抵抗的程度,记为 GIR₆₀₋₁₂₀。其中对胰岛素敏感性越高 GIR₆₀₋₁₂₀ 就越大,反之机体对胰岛素敏感性越低 GIR₆₀₋₁₂₀ 就越低。

2.7 统计学方法 应用 SPSS11.5 统计学软件分析处理数据。计量资料均以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验, *P*<0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠血压测定值比较 给药前与模型组比较,SHR 组血压显著增高,对照组显著降低(*P*<0.01);给药后与模型组比较,SHR 组血压显著升高,对照组及黄荔合剂组血压降低(*P*<0.05)。见表 1。

表 1 各组大鼠血压测定值比较(mm Hg, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	给药前	给药后
对照组	8	132.28±15.07 [#]	116.99±10.24 [#]
SHR 组	8	211.93±21.94 [#]	213.00±9.62 [#]
模型组	8	172.80±19.13	186.83±13.77
黄荔合剂组	8	184.90±24.50	170.51±20.09 [*]

注:与模型组比较,^{*}*P*<0.05;与模型组比较[#]*P*<0.01。

3.2 各组生化指标结果比较 给药前与模型组比较,对照组除 TG 显著升高外其他指标均显著降低;SHR 组 TG 显著升高,TC、LDL、HDL 均显著降低(*P*<0.05 或 *P*<0.01);SHR 组 FBG,黄荔合剂组各项指标与模型组比较,差异无统计学意义(*P*>0.05)。给药后与模型组比较,对照组 TG 升高,TC、LDL、HDL 显著降低,SHR 组 TC、LDL 显著降低,黄荔合剂组 HDL 显著升高,FBG、TC 显著降低(*P*<0.05 或 *P*<0.01);除对照组外各组 TG 比较,差异无统计学意义(*P*>0.05)。见表 2。

表 2 各组生化指标结果比较(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	时间	FBG	TG	TC	LDL	HDL
对照组	给药前	465±149 [*]	054±023 [#]	128±014 [#]	046±040 [#]	111±017 [#]
	给药后	456±154	045±014 [#]	148±021 [#]	031±016 [#]	114±017
SHR 组	给药前	697±137	043±019 [#]	111±011 [#]	024±010 [#]	089±010 [#]
	给药后	699±205	034±010	073±014 [#]	017±004 [#]	128±034
模型组	给药前	636±162	020±003	342±136	254±100	187±010
	给药后	607±140	026±007	561±084	339±112	150±030
黄荔合剂组	给药前	643±194	025±012	269±047	189±076	147±026
	给药后	396±060 [*]	031±005	447±064 [*]	443±082	295±023 [#]

注:与模型组比较,^{*}*P*<0.05;与模型组比较[#]*P*<0.01。

3.3 干预后各组口服糖耐量试验比较 黄荔合剂组、对照组与模型组比较,在 0、15、30、60 及 120 min 时血糖水平明显降低,差异有统计学意义(*P*<0.05 或 *P*<0.01)。SHR 组与模型组比较,在 0、15、30 min 时血糖水平比较,差异无统计学意义(*P*>0.05),60、120 min 血糖水平低于模型组,差异有统计学意义(*P*<0.05 或 *P*<0.01)。见表 3。

表 3 干预后各组口服糖耐量试验比较 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	0 min	15 min	30 min	60 min	120 min
对照组	4.56± 0.56 [*]	5.51± 0.76 [#]	5.43± 0.44 [#]	5.25± 0.54 [#]	4.41± 0.46 [#]
SHR 组	4.71± 0.47	8.83± 1.61	9.48± 1.06	9.21± 1.62 [*]	6.44± 2.75 [#]
模型组	5.25± 1.26	7.61± 1.52	8.78± 1.76	11.44± 3.08	10.84± 4.00
黄荔合剂组	4.05± 0.48 [#]	5.58± 0.83 [#]	6.58± 0.72 [#]	7.50± 0.75 [#]	6.68± 0.74 [#]

注:与模型组比较,^{*}*P*<0.05;与模型组比较[#]*P*<0.01。

3.4 干预后各组 GIR 指标比较 黄荔合剂组大鼠 GIR₆₀₋₁₂₀ 较模型组升高, 差异有统计学意义 (*P*<0.05);SHR 组及对照组 GIR₆₀₋₁₂₀ 较模型组升高, 但差异无统计学意义 (*P*>0.05)。见表 4。

表 4 干预后各组 GIR 指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	SHR 组	模型组	黄荔合剂组	对照组
GIR ₆₀₋₁₂₀ [mg/(kg·min)]	7.12± 2.952	6.18± 1.992	10.13± 3.229 [*]	8.27± 3.140

注:与模型组比较,^{*}*P*<0.05。

4 讨论

IR 状态下, 机体对胰岛素处理葡萄糖能力减退, 必须以高于正常的胰岛素释放水平来维持正常糖耐量, 表现为高胰岛素血症、空腹血糖异常及糖耐量受损。高胰岛素血症导致水钠潴留, 刺激血管平滑肌细胞增殖, 交感神经系统及肾素血管紧张素系统活性增强, 具有升高血压的作用^[4]。IR 导致高 TG、低 HDL 血症、增高小而致密 LDL 水平及 ApoA I/ApoB100 比值降低等脂质代谢紊乱状态^[5]。

目前除通过减肥、锻炼等生活方式改变 (Therapeutic Lifestyle Changes, TLC) 改善 IR 外, 也使用他汀类调脂药、双胍类降糖药、抗高血压药 (ACE 抑制剂、ARB、 α 受体阻断剂等)、过氧化物酶增殖体激活物受体 (PPARs) α 、 γ 激动剂等治疗 IR, 对改善 IR 有一定作用, 但存在用药种类及药物不良反应多, 疗效欠佳, 社会及患者的经济负担重等问题。进一步寻找和开发方便、有效、相对安全且经济的治疗方法具有重要的临床意义。

黄芪主要成分包括黄酮、生物碱和黄芪多糖等。黄芪通过促进脂肪细胞凋亡增加, 减少抵抗素及脂联素等细胞因子分泌, 改善饮食导致的胰岛素抵抗, 并与罗格列酮疗效相当^[6]。黄芪多糖干预肌肉组织 PKB/GLUT4 信号通路纠正了 KKAY 小鼠 IR^[7], 荔枝核具有降血糖、增强胰岛素抵抗模型大鼠胰岛素敏感性等药理作用^[8], 荷叶具有调脂、降糖等药理作用^[9]。本研究利用黄芪、荔枝核、荷叶等浸膏粉组成黄荔合剂, 可以保证药物疗效及组方的稳定性。

IR 检测方法多样, 但目前评价 IR 的“金标准”是高胰岛素正常血糖钳夹 (Clamp) 试验, 该方法可有效纠正内源性胰岛素缺乏对研究结果的影响。但存在操作复杂、费时且价格高等问题, 很少在研究中使用。目前研究多使用操作简便, 与 Clamp 试验有

一定相关性的如稳态模型胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR) 和定量胰岛素敏感性指标 (QUICKI) 等来评价 IR, 其证据强度低于 Clamp。

本研究最大特色是创新性地采用 Clamp 技术证实 SHR 组及模型组大鼠存在 IR, 模型组大鼠 IR 更加严重。与既往研究一致, 本研究证实存在严重 IR 的大鼠模型具有空腹血糖受损、糖耐量受损等病理特征。本研究使用 SHR 大鼠具有高血压、低 HDL、胰岛素抵抗、空腹血糖受损及糖耐量异常等特点, 通过含丙硫氧嘧啶的高胆固醇饲料喂养后产生高胆固醇血症。

黄荔合剂干预模型大鼠 4 周后, 显著升高了 HDL, 降低了空腹血糖、改善糖耐量受损及胰岛素抵抗, 具有显著改 IR 导致的代谢紊乱作用。既往研究表明黄荔合剂剂量依赖性增高主动脉过氧化物酶体增殖物受体 γ (Peroxisome Proliferators -Activated Receptor, PPAR- γ) 基因及蛋白的表达^[10]。黄荔合剂激活 PPAR- γ , 可以显著增加组织对葡萄糖的摄取, 增加胰岛素敏感性, 可能是其改善胰岛素抵抗的作用机制之一。黄荔合剂治疗合并 IR 的高血压合并高胆固醇血症大鼠, 降低了空腹血糖, 显著改善了糖耐量受损及胰岛素抵抗, 可能与黄荔合剂可能增加 PPAR- γ 基因复制及其蛋白表达, 干预肌肉组织 PKB/GLUT4 信号通路等有关, 对合并 IR 的高血压合并高胆固醇血症综合防治可能有良好的前景。本实验还需进一步进行临床研究。

参考文献

[1]Rutter MK,Meigs JB,Sullivan LM,et al.Insulin resistance, the metabolic syndrome,and incident cardiovascular events in the Framingham offspring study[J].Diabetes,2005,54(11):3252-3257.
[2]王令舒.胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞功能在糖尿病及合并心脏病患者间的差异及相关因素分析[D].山东:山东大学,2013.
[3]Zemel PC,Sowers RJ.Relation between lipids and atherosclerosis: epidemiologic evidence and clinic implications [J].Am J Cardiol, 1990,66(21):71-121.
[4]Vecchione C,Morisco C,Fratta L,et al.Dietary sodium restriction impairs endothelial effects of insulin [J].Hypertension,1998,31(6): 1261-1265.
[5]Blaak EE,AJM WAGENMAKERS,Glatz JFC,et al.Plasma FFA utilization and fatty acid-binding content are diminished in type 2 diabetic muscle[J].Am J Physiol,2000,279(1):146-154.
[6]杨凌辉.黄芪改善高脂饲养大鼠胰岛素抵抗的机制研究[D].上海: 第二军医大学学报,2002.1-37.
[7]Liu M,Wu K,Mao X,et al.Astragalus polysaccharide improves insulin sensitivity in KKAY mice:regulation of PKB/CLUT4 sig-naling in skeletal muscle[J].Ethnopharmacol,2010,127(1): 32-37.
[8]郭洁文,潘竞铨.荔枝和荔枝核的化学成分、生物活性及药理作用研究[A].见:全国生化与生物技术药物学术年会[C].银川:中国药学会,2005.
[9]周丽霞,张娜娜.荷叶在心脑血管疾病防治中的应用研究[J].光明中医,2017,32(1):151-154.
[10]黄晓忠,林曙光,费洪文,等.黄荔合剂对高血压合并高胆固醇血症大鼠动脉的影响及机制研究[J].广东医学,2017,38(7):700-705.

(收稿日期: 2021-04-25)