

应用“启枢散精化浊”法改善糖尿病 GK 大鼠胰岛微循环对血糖波动及肠道 GLP-1 分泌水平的影响*

王柔钧¹, 温伟波², 李 军¹, 李倩雯¹, 侯建婷¹, 徐 凡^{3△}

(1. 云南中医药大学第三附属医院内分泌科, 云南 昆明 650500;

2. 云南中医药大学, 云南 昆明 650500; 3. 云南大学附属医院内分泌科, 云南 昆明 650021)

摘要: **目的** 探讨“启枢散精化浊”法即应用我院院内制剂三生调脂舒改善糖尿病 GK 大鼠胰岛微循环对血糖波动及肠道胰高血糖素样肽 1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 分泌水平的影响。**方法** 建立由高脂饲料喂养的糖尿病大血管病变大鼠模型。实验分 4 组, 空白对照组 (正常 Wistar 大鼠组), 模型组, 三生调脂舒组, 阳性对照组。于灌胃后每周 1 次测 1 日内 8:00、10:00、14:00、16:00、18:00 5 次血糖水平, 并用血糖稳定性指标 (MBG、SDBG、LAGE) 量化各组血糖稳定性; 检测血清 GLP-1、血清胰岛素水平。**结果** 三生调脂舒组各状况优于模型组, 可减少大鼠的血糖波动, 升高血清 GLP-1 水平; 胰岛素 (INS) 与模型组比, 无统计学意义; GLP-1 水平较模型组有明显增加 ($P < 0.01$)。**结论** 应用“启枢散精化浊”法治疗糖尿病 GK 大鼠, 可促进 GLP-1 的分泌, 降低血糖, 减少血糖的波动, 保持血糖的稳态, 减轻模型 GK 大鼠血管内皮损伤, 改善糖尿病大血管的病变, 从而起到延缓糖尿病进展的作用。

关键词: 糖尿病; “启枢散精化浊”法; 胰岛微循环; GLP-1; 三生调脂舒

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2022)04-0055-05

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2022.04.013

The Effects of "Dredging Hub, Diverging Serum and Refinding Turbid" to Improve the Pancreatic Islet Microcirculation on Improving Blood Glucose Fluctuation and Intestinal GLP-1 Secretion in Diabetes Mellitus GK Rats

WANG Roujun¹, WEN Weibo², LI Jun¹, LI Qianwen¹, HOU Jianting¹, XU Fan³

(1. Department of Endocrinology, The Third Affiliated Hospital, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China;

2. Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China;

3. Department of Endocrinology, The Affiliated Hospital of Yunnan University, Kunming 650021, China)

ABSTRACT: Objective To explore the effect of "Dredging hub, diverging serum and refinding turbid" method, namely the application of Sansheng Tiaozhishu to improve the blood glucose fluctuation and intestinal glucagon-like peptide-1 (GLP-1) secretion level in diabetic GK rats. **Methods** A rat model of diabetic macroangiopathy was established by high-fat diets. The rats were divided into 4 groups: blank control group, model group, Sansheng Tiaozhishu group and positive control group. After intragastric administration, their blood glucose levels were measured once a week at 8:00, 10:00, 14:00, 16:00 and 18:00, and their blood glucose stability indexes (MBG, SDBG and LAGE) were used to quantify the blood glucose stability of each group. The levels of serum GLP-1, serum insulin and glucagon were measured. **Results** The condition of Sansheng Tiaozhishu group was better than that of the model group, which could reduce the fluctuation of blood glucose and increase the level of serum GLP-1. Compared with the model group, insulin (INS) had no statistical significance but GLP-1 was significantly higher than that of the model group ($P < 0.01$). **Conclusion** The application of the method of

收稿日期: 2022-04-13

* 基金项目: 云南省卫生科技计划项目(2016NS305)

第一作者简介: 王柔钧(1983-), 女, 主治医师, 在职在读博士研究生, 研究方向: 中西医结合内分泌代谢性疾病临床与基础研究。△通信作者: 徐凡, E-mail: 708851425@qq.com

"Dredging hub, diverging serum and refinding turbid" in the treatment of diabetic GK rats with the Sansheng Tiaozhishu in our hospital can promote the secretion of GLP-1, reduce blood sugar and the fluctuation of blood sugar, so as to maintain the homeostasis of blood glucose, alleviate the injury of vascular endothelium in model GK rats, and improve the pathological changes of the large blood vessels of the disease, thereby slowing the progression of diabetes.

KEY WORDS: diabetes mellitus; the method of "Dredging hub, diverging serum and refinding turbid"; islet microcirculation; GLP-1; Sansheng Tiaozhishu

糖尿病是一种以慢性高血糖为特征的代谢性疾病,其危害程度目前仍然在不断升级^[1]。血糖波动的危害性远大于单纯高血糖^[2]。糖尿病血糖波动与糖尿病大血管病变关系密切,氧化应激、抗氧化应激受损、炎症反应等是造成血管内皮细胞损伤的主要机制。同时平滑肌细胞异常增殖与凋亡、止血凝血机制紊乱等因素的相互作用下,最终引起大血管相关并发症发生^[3-4]。由于糖尿病病人血糖常在高峰与低谷间波动,导致大血管病变,而大血管并发症是导致糖尿病患者死亡的主要原因。相关研究显示,糖尿病病人出现心脑血管疾病的概率较非糖尿病病人高 4 倍左右^[5],因此高血糖状态和血糖波动是影响糖尿病慢性并发症发生、发展的两个最为关键的因素。那么,减少血糖波动及维持血糖稳态就是糖尿病及其并发症防治过程中亟待解决的问题。

中医学认为,血糖来源于水谷精微^[6],与脾主运化功能密切相关。脾气散精功能正常则血糖等精微物质得以在全身正常的输布。而中焦是糖脂代谢病发病的枢纽,运用“启枢散精化浊”通过调达肝气,开启中焦脾胃枢纽,可使气机升降有序,津液正常输布,各个脏腑的气化功能正常,从而及时的化解祛除体内湿浊痰瘀等病理产物,达到改善胰岛微循环,从而改善胰岛功能,保持血糖稳态。本研究通过应用“启枢散精化浊”法改善糖尿病 GK 大鼠胰岛微循环对血糖波动及肠道胰高血糖素样肽 1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1)分泌水平的影响,为保持糖尿病血糖稳态,增加肠道 GLP-1 分泌水平,减少大血管病变并发症提供实验依据,为找到一种更佳的预防和延缓糖尿病血管并发症的方法提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料及实验动物 雄性糖尿病 GK 大鼠 30 只,SPF 级,6 月龄,体质量(180±10)g;Wistar 大鼠 10 只,SPF 级,5 月龄雄性,体质量(180±10)g,均由北京华阜生物科技有限公司(中国协和医科大学实验

动物学部)提供,实验动物许可证号:SCXK(京)2012-0002。该动物及实验使用条件符合《实验动物管理条例》。在云南中医药大学实验动物中心统一饲养。室温 19~26℃,相对湿度 40%~70%左右,每日 12 h 光照,动物自主摄食及饮水。

实验期间空白对照组 Wistar 大鼠喂饲普通饲料(由北京科澳协力饲料有限公司生产提供);高脂饲料(配方由 Uiman E A, Ph.D. Resarch Diets Inc 提供,北京华阜康饲料有限公司制作)。实验期实验动物饮用水为灭菌纯水(云南中医药大学实验动物中心提供)。

药品:三生调脂舒(组成:三七、何首乌、薏苡仁、山楂,由昆明市中医医院药剂科生产,批号:20191117)、磷酸西格列汀片[规格是 100 mg/片×7 片,Merck Sharp Dohme Ltd (United Kingdom)(国药准字 J20140095)]。

1.2 造模与分组 6 月龄雄性 GK 大鼠随机分为 3 组,每组 10 只,随机分为模型组、阳性对照组、三生调脂舒组。设 5 月龄雄性 Wistar 大鼠 10 只作为空白对照组。进行适应性饲养 4 周,4 周后除空白组外,连续给予高脂饲料喂养 8 周,同时给药,造模成功与否通过大鼠胸主动脉病理形态学观察来判断。

1.3 给药方法 按表 1 给药,每周对大鼠体质量进行定时监测并据体质量变化及时调整灌胃量。

表 1 各实验组给药方案

组别	每组只数	药物类别	给药剂量/(mL·kg ⁻¹)	给药方式	给药时间/周
空白对照组 (Wistar 大鼠组)	10	生理盐水	5	灌胃	8
模型组	10	生理盐水	5	灌胃	8
三生调脂舒组	10	三生调脂舒	500	灌胃	8
阳性对照组	10	西格列汀	8	灌胃	8

注:三生调脂舒组和西药组给药剂量相当于成人剂量的 5 倍。

1.4 一般情况的监测 每日定时观察各组大鼠的精神状态、饮水、摄食、体质量、尿量、粪便、行为活动情况,并记录大鼠死亡情况。

1.5 血糖波动的监测 用药后每周行尾静脉取血,第4周进行1d内5点血糖监测,即监测8:00、10:00、14:00、16:00、18:00这5个时间点的血糖情况,并用每日血糖平均水平(MBG)、每日平均血糖的标准差(SDBG)、最大血糖波动幅度(LABG,日内血糖最高值与最低值之差)来评估各组大鼠血糖的稳定性,血糖监测至灌胃第8周,统计各组大鼠MBG、SDBG、LABG值。

1.6 血清GLP-1及胰岛素的检测

1.6.1 血清GLP-1的检测 采用双抗体夹心ABC-ELISA法。将抗大鼠GLP-1单抗包被于酶标板上,标准品和样品中的GLP-1与单抗结合,加入生物素化的抗大鼠GLP-1,使其形成免疫复合物连接在板上,通过辣根过氧化物酶标记的Streptavidin与生物素结合后加入底物工作液,显色为蓝色,最后加硫酸作为终止液。在450nm处测OD值,GLP-1浓度与OD值成正比,因此通过绘制标准曲线求出GLP-1浓度。部分标本照像并硬盘记录数据。

1.6.2 血清胰岛素的检测 采用ELISA法,严格按照ELISA试剂盒说明书中的操作步骤执行。

1.7 统计方法 数据均采用SPSS 20.0进行统计学分析,计量资料均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间样本均数比较采用单因素方差分析,方差不齐采用t检验,结果以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠1日MBG、SDBG、LABG情况 由表2可知:空白对照组、三生调脂舒组及阳性对照组大鼠

表2 各组大鼠血糖波动情况($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

组别	n	MBG	SDBG	LAGE
空白对照组 (Wistar组)	10	5.03±0.69**	0.65±0.41**△△	1.80±1.16**
模型组	10	20.81±1.88 ^{##△△}	2.88±0.69 ^{##△△}	8.07±1.83 ^{##△△}
三生调脂舒组	10	18.47±1.51 ^{###}	2.00±0.79 ^{###△}	5.50±2.14 ^{###△}
阳性对照组	10	17.73±1.22 ^{###}	1.57±0.45 ^{###}	4.26±1.24 ^{###}

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与正常组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与阳性对照组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$ 。

1日MBG值显著低于模型组($P < 0.01$),阳性对照组1日MBG值较三生调脂舒组低,但差异不具统计学意义。空白对照组、三生调脂舒组大鼠、阳性对照组大鼠1日SDBG值显著低于模型组($P < 0.01$)。空白对照组、三生调脂舒组及阳性对照组1日LABG值显著低于模型组($P < 0.01$),阳性对照组1日LABG值显著低于三生调脂舒组($P < 0.01$)。

2.2 各组大鼠血清INS及GLP-1水平 由表3可知:在血清INS方面,三生调脂舒组与其他3组均无统计学意义;在血清GLP-1水平方面,三生调脂舒组高于模型组($P < 0.01$),但三生调脂舒组与西药组无明显差异。

表3 各组大鼠血清INS及GLP-1水平($\bar{x} \pm s$, ng/mL)

组别	n	INS	GLP-1
空白对照组 (Wistar大鼠组)	10	0.57±0.12**	1.65±0.06 ^{##}
模型组	10	0.28±0.14 ^{△△##}	1.29±0.08 ^{△△##}
三生调脂舒组	10	0.48±0.10	1.57±0.07**
阳性对照组	10	0.54±0.10**	1.60±0.06 [*]

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与正常组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与阳性对照组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$ 。

3 讨论

3.1 胰岛微循环障碍-血糖波动的关键环节 胰岛作为人体血供十分丰富的器官,其富含的毛细血管使胰岛细胞能迅速感知到体内代谢环境的改变,并迅速作出反应,分泌各种激素经全身血液循环到达相应的靶器官发挥调节机体代谢平衡的作用^[7]。胰岛微循环的顺利进行是胰岛赖以生存的环境基础^[8],也是胰岛功能正常发挥的保证。胰岛微循环障碍使得胰岛素、胰高血糖素的分泌及功能受到影响^[9],因此胰岛微循环障碍也是导致糖尿病及其并发症发生发展的关键^[10]。根据中医理论,糖尿病是一种虚实夹杂的疾病,临床表现多以虚为主,夹杂有气滞、痰浊、水湿、瘀血等。中焦脾土受损、肝气不畅,津液运化失司是血糖波动的发病基础,加之内因或外邪导致脾土受损、肝气郁滞而化生痰、瘀等病理产物,便可导致气、血、津液代谢异常^[11],导致胰岛微循环障碍而破坏胰岛功能。血糖波动正是由于胰岛功能下降,导致血糖调节的机制受阻所导致。因此,降低血糖波动的关键就在于调

节胰岛微循环,使之正常。

3.2 脾气散精与胰岛微循环的关系 祖国传统中医学认为脾为后天之本,“脾胰同源”这一理论一直受到众多医家的推崇^[12]。糖尿病病位在胰,胰归属于脾,故绝大多数糖尿病的治疗应从脾来论治,治脾即治胰,保证脾的运化功能正常才是降糖之道^[13]。脾气散精功能,正常则血糖等精微物质得以正常输布,故《脾胃论》曰:“脾胃平则万物安”。《灵枢·本脏》亦曰:“脾脆则善病消瘵易伤”。而脾主运化,故脾的生理功能与津液代谢密切相关,正如《素问·经脉别论》所曰:“饮入于胃,游溢精气,上输于脾,脾气散精,上归于肺,通调水道,下输膀胱,水精四布,五经并行”。脾气散精是代谢过程的重要环节,若脾气散精功能障碍,则精微物质不能输布至五脏六腑,而是聚生成痰、湿、瘀、浊,阻于脉络,导致糖尿病及其并发症的发生发展。正是基于“脾气散精”理论,中医“脾”的功能也包含了现代医学“胰”的生理功能^[14],故有“脾胰同源”的说法。而脾正是位于中焦,因而中焦是糖脂代谢病发病的核心和枢纽。本院院内制剂三生调脂舒以生三七、何首乌、薏苡仁、山楂等为主药,正是作用于中焦,基于中焦病理产物痰、湿、瘀为标的特点而制。方中生三七性温,味甘、微苦,归肝、胃经,能行血活血、破瘀散结;何首乌性温,味苦、甘、涩,归肝、心、肾经,可补益肝肾,润肠通便,兼具化痰血作用。薏苡仁性凉,味甘、淡,归脾、胃、肺经,能健脾利湿;山楂性微温,味酸、甘,归脾、胃、肝经,能消食健胃,行气散瘀;故全方发挥补肾健脾、活血祛瘀、化痰泻浊、通经畅脉之功^[15]。药理研究证实方中君药生三七具有双向调节血糖、降低血脂、胆固醇、抑制动脉硬化作用^[16],首乌具有扩血管、降脂、促红细胞生成作用,薏苡仁中多糖成分具有降糖作用^[17-18],山楂具有调节胃肠运动作用,促进消化酶的分泌,对痉挛状态的平滑肌有抑制作用,同时也具降脂、抗动脉硬化作用。

3.3 胰高血糖素样肽 1 对血糖的影响 GLP-1 来源于胰高血糖素原前体,是肠道 L 细胞分泌的一种肽类激素,当机体在进食的时候释放出的一类高效的肠促胰岛素^[19]。它是以葡萄糖浓度依赖的方式促进胰岛 β 细胞分泌胰岛素,同时减少胰岛 α 细胞分泌胰高血糖素来降低血糖^[20-21]。正常人在进食后,随着肠促胰岛素分泌的启动,刺激胰岛素分泌,保持餐后血糖的稳定,

这也被称作为“肠促胰岛素效应”。而 2 型糖尿病患者的“肠促胰岛素效应”是失灵的,进餐后 GLP-1 的浓度几乎不变,故促进 GLP-1 分泌可以作为 2 型糖尿病治疗的一个重要目标^[22]。而 GLP-1 的生理作用主要为促进胰岛素的合成分泌、促进胰岛 β 细胞的修复增殖、减少胰高血糖素的分泌、延缓胃排空、抑制食欲、减少摄食、减轻体质量、促进糖原合成、抑制肝糖原输出^[23]。关于 GLP-1 作用的研究新进展表明其具有心血管保护作用、神经保护作用、改善脂代谢、骨代谢及抗炎作用^[24-25]。

综上,本研究通过应用“启枢散精化浊”法,使用我院院内制剂三生调脂舒调达肝气,开启中焦脾胃枢纽,使气机升降有序,运化正常,达到化解祛除湿痰瘀,改善糖尿病 GK 大鼠胰岛微循环对血糖波动及肠道 GLP-1 分泌水平的影响,为保持糖尿病血糖稳态,增加肠道 GLP-1 分泌水平,减少大血管病变并发症提供实验依据,为寻找更优的预防和治疗糖尿病大血管病变及糖尿病心血管并发症提供理论依据。

参考文献:

- [1] LOZANO R, NAGHAVI M, FOREMAN K, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the global burden of disease study 2010[J]. The Lancet, 2012, 380(9859): 2095-2128.
- [2] VOS T, FLAXMAN A D, NAGHAVI M, et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the global burden of disease study 2010[J]. The Lancet, 2012, 380(9859): 2163-2196.
- [3] KIM S R, LEE Y, LEE S G, et al. Urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase, an early marker of diabetic kidney disease, might reflect glucose excursion in patients with type 2 diabetes[J]. Medicine, 2016, 95(27): e4114.
- [4] ABDELNASEER M, ELFAYOMI N, ESMAIL E H, et al. Relationship between matrix metalloproteinase -9 and common carotid artery intima media thickness[J]. Neurol Sci, 2016, 37(1): 117-122.
- [5] ARSENAULT B J, KOHLI P, LAMBERT G, et al. Emerging cardiovascular disease biomarkers and incident diabetes mellitus risk in statin-treated patients with coronary artery disease (from the treating to new targets [TNT]

- study)[J]. *Am J Cardiol*, 2016, 118(4):494-498.
- [6] 冯晓桃,刘毅,王文健. 从“脾主化”理论论治 2 型糖尿病[J]. *时珍国医国药*, 2015, 26(12):2973-2974.
- [7] 富晓旭,高泓,刘桢,等. 从胰岛微循环探索“脾气散精”环节对血糖稳态的调节机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(2):214-219.
- [8] 周秀娟,张攀,朱建伟,等. 基于“脾气散精”理论探讨调节胰岛微循环及血糖波动的方法[J]. *中医杂志*, 2018, 59(17):1470-1473.
- [9] 卓兴卫,朱健伟,富晓旭,等. 基于“玄府郁闭-胰岛微循环障碍”探讨糖尿病患者血糖波动的调控[J]. *中医杂志*, 2020, 61(11):1010-1012.
- [10] FAVARO E, GRANATA R, MICELI I, et al. The ghrelin gene products and exendin-4 promote survival of human pancreatic islet endothelial cells in hyperglycaemic conditions, through phosphoinositide 3-kinase/Akt, extracellular signal-related kinase (ERK)1/2 and cAMP/protein kinase A (PKA) signalling pathways [J]. *Diabetologia*, 2012, 55(4):1058-1070.
- [11] 刘晓瑞,刘桢,张翥宇,等. 基于“脾胰同源”应用养阴益气活血法减少血糖波动干预糖尿病大血管病变的研究[J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(1):160-164, 280.
- [12] 沈桂祥. 何绍奇谈糖尿病的中医治疗[J]. *中医药通报*, 2006, 5(6):25-26.
- [13] 周明阳,杨兰,富晓旭,等. 血糖变化与中医升降出入理论的关系[J]. *中医杂志*, 2017, 58(18):1612-1613, 1620.
- [14] 富晓旭,刘桢,高泓,等. “脾气散精”环节在机体糖调节中发挥核心作用的理论探讨[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2021, 27(3):398-399, 426.
- [15] 丁喆,谢文皎,王柔钧,等. 三生调脂舒治疗高血压的临床疗效及其对颈动脉内中膜的影响[J]. *临床合理用药杂志*, 2019, 12(30):60-62.
- [16] 杨海燕,金艳蓉,谭前伟. 三生调脂舒对非酒精性脂肪性肝病患者脂代谢紊乱及氧化应激的影响[J]. *中西医结合肝病杂志*, 2017, 27(6):343-345.
- [17] ZHANG G B, LI Q Y, CHEN Q L, et al. Network pharmacology: a new approach for Chinese herbal medicine research[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013:621423.
- [18] HAO D C, XIAO P G. Network pharmacology: a Rosetta Stone for traditional Chinese medicine[J]. *Drug Dev Res*, 2014, 75(5):299-312.
- [19] EDWARDS K L, STAPLTON M, WEIS J, et al. An update in Incretin-based therapy: a focus on glucagon-like peptide-1 receptor agonists[J]. *Diabetes Technol The*, 2012, 14(10):951-967.
- [20] NOYAN-ASHRAF M H, MOMEN M A, BAN K, et al. GLP-1R agonist liraglutide activates cytoprotective pathways and improves outcomes after experimental myocardial infarction in mice[J]. *Diabetes*, 2009, 58(4): 975-983.
- [21] WU T, RAYNER C K, JONES K, et al. Dietary effects on incretin hormone secretion[J]. *Vitam Horm*, 2010, 84:81-110.
- [22] MOSSELLO E, BALLINI E, BONCINELLI M, et al. Glucagonlike peptide -1, diabetes, and cognitive decline: possible pathophysiological links and therapeutic opportunities[J]. *Exp Diabetes Res*, 2011, 2011:281674.
- [23] 许晓娜,乔虹. 胰高血糖素样多肽-1 在 2 型糖尿病治疗中的新进展[J]. *东南大学学报(医学版)*, 2017, 36(2): 270-274.
- [24] IKEDA Y, NAGASE N, AI T, et al. Neuroprotection by dipeptidyl-peptidase-4 inhibitors and glucagonlike peptide -1 analogs via the modulation of AKT-signaling pathway in Alzheimer's disease[J]. *World J Biol Chem*, 2021, 12(6):104-113.
- [25] 郑文文,郑超,周心禾. GLP1R 基因多态性与中国汉族人群 2 型糖尿病风险及血糖、血脂、胰岛功能的关系[J]. *温州医科大学学报*, 2021, 51(11):896-901.