

加减小逍散对慢性心理应激 2 型糖尿病小鼠胰岛素抵抗的影响

朱艳芳, 徐志伟, 敖海清, 周江霞, 富文俊, 王文竹(广州中医药大学, 广东 广州 510006)

摘要: **目的** 观察慢性心理应激对 2 型糖尿病(T2DM)小鼠糖脂代谢及胰岛素抵抗(IR)的影响及加减小逍散的作用效果。**方法** 102 只自发性糖尿病(KK)小鼠随机分为 5 组:正常对照(WC)组, 模型(SC)组, 加减小逍散对照(XYS)组, 应激+加减小逍散低剂量(LXYS)组及应激+加减小逍散高剂量(HXYS)组。KK 小鼠用高糖高脂饲料喂养 8 周, 采用电击、夹尾、禁食、禁水、合笼饲养等方法复制慢性心理应激模型。检测各组小鼠空腹血糖(FPG)、血清胰岛素(FINS)以及血脂的胆固醇(CHO)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDL-C)、低密度脂蛋白(LDL-C) 4 项等指标, 计算胰岛素敏感指数(ISI)。**结果** 与 WC 组比较, SC 组的 ISI 明显降低($P < 0.01$), 体质量明显下降 ($P < 0.01$), YYS 组的 FPG 明显降低 ($P < 0.01$)、ISI 明显增强 ($P < 0.05$); 与 SC 组比较, LXYS 组及 HXYS 组的 ISI 明显增强($P < 0.01$), HXYS 组体质量明显升高($P < 0.05$), TG, CHO, LDL-C, 明显降低($P < 0.01, P < 0.05$), HDL-C, 明显升高($P < 0.05$)。**结论** 慢性心理应激能降低 T2DM 小鼠的胰岛素敏感性, 从而加剧其 IR 以及糖脂代谢的紊乱; 加减小逍散不仅能提高 T2DM 小鼠的胰岛素敏感性, 减轻 IR, 同时也能对抗慢性心理应激对 T2DM 小鼠 IR 的不良影响。

关键词: 加减小逍散; 慢性心理应激; 2 型糖尿病; 胰岛素抵抗

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)06-0555-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.06.007

Effect of Modified Xiaoyao San on Insulin Resistance in Type 2 Diabetes Mellitus Mice with Chronic Psychological Stress

ZHU Yanfang, XU Zhiwei, AO Haiqing, ZHOU Jiangxia, FU Wenjun, WANG Wenzhu (Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To observe the influences of chronic psychological stress on glycolipid metabolism disorder and insulin resistant (IR) of type 2 diabetes mellitus (T2DM) mice and the intervention effect of Modified Xiaoyao San (XYS). **Methods** One hundred and two KK mice were randomly divided into 5 groups, normal control group (WC group), model group (SC group), T2DM mice treated with YYS group (XYS group), stress mice treated with low-dose YYS group (LXYS group) and stress mice treated with high-dose YYS group (HXYS group). The KK mice model of T2DM was induced by feeding high-glucose and high-fat forage for 8 weeks, and the model of chronic-psychological-stress was induced by electric shock, clamping the tail, fasting treatment, and raising the male and female mice in the same cage. The observation indexes included fasting plasma glucose (FPG), fasting insulin (FINS), total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C). At last the insulin sensitivity index (ISI) was calculated. **Results** Compared with WC group, SC group had low ISI, body weight and FPG but had high ISI ($P < 0.01$). Compared with SC group, S+LXYS group and S+HXYS group had low HbA1c but had high ISI ($P < 0.01$), HXYS group had high body weight and HDL-C ($P < 0.05$), and had low TG, TC and LDL-C ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Chronic psychological stress can reduce insulin sensitivity and make IR and glycolipid metabolism disorder worse in T2DM KK mice. Modified Xiaoyao San can increase ISI, reduce IR and counteract the harmful influences resulting from chronic psychological stress in T2DM mice.

Keywords: Modified Xiaoyao San; Chronic psychological stress; Type 2 diabetes mellitus; Insulin resistance

收稿日期: 2013-06-27

作者简介: 朱艳芳, 女, 博士, 主治医师, 研究方向: 内分泌代谢性疾病的中医药防治研究。Email: zhuyanfang@gzucm.edu.cn。通讯作者: 徐志伟, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 肝藏象理论及中医药防治应激损伤相关疾病研究。Email: gxzww@gzucm.edu.cn。

基金项目: 广东省中医药强省课题(20121230); 广东省教育厅重点实验室课题(AAF433111A50); 广州中医药大学中医药科研创新基金项目(K0100074)。

胰岛素抵抗(IR)是2型糖尿病(T2DM)的主要发病机制之一,伴随着T2DM发生、发展的全过程,同时也是肥胖、高血压和血脂异常等多种代谢疾病的重要病理基础。有关IR发生的机制非常复杂,目前还不十分明确。慢性心理应激是T2DM发生、发展的重要影响因素,情志因素在T2DM发病过程中的影响已得越来越多的医家的认同,逍遥散等疏肝方药在临床上也常用于防治T2DM^[1-4],但对逍遥散防治T2DM机制的深入研究尚未见诸报道。本研究观察了慢性心理应激对2型糖尿病小鼠糖脂代谢与胰岛素敏感性的影响以及加减逍遥散的治疗作用。

1 材料与方法

1.1 动物 自发性糖尿病(KK)小鼠,102只,SPF级,8周龄,体质量22~32 g,北京华阜康生物科技有限公司,动物质量合格证许可证号:SCXK(京)2029-0004。在广州中医药大学SPF级实验动物房高糖高脂饲料适应性饲养2周。

1.2 材料及试剂 高糖高脂饲料,北京华阜康生物科技有限公司;电击箱(自制);CSB-E05071m华美小鼠胰岛素试剂盒(产品编号:c24013729)、CSB-E08141m华美小鼠糖化血红蛋白试剂盒(产品编号:D27013921)华美生物工程有限公司;雅培血糖试纸(FreeStyle),美国雅培公司;血脂检测试剂盒,北京北化康泰公司。

1.3 仪器 雅培FreeStyle Freedom血糖仪,美国雅培公司;TECAN TYPE酶标仪,南京华东电子集团医疗装备有限责任公司;微量有机分析专用超纯水机,颐洋企业发展有限公司;UV-7504型单光束紫外可见分光光度计,上海欣茂仪器有限公司;恒温生化培养箱,宁波江南仪器厂。

1.4 加减逍遥散制备 当归45 g,白芍45 g,柴胡45 g,茯苓45 g,白术45 g,炙甘草23 g,川芎45 g,醋香附45 g,薄荷23 g。前8味药加水3000 mL,浸泡1 h,武火急煎,水开后文火再煎20 min,然后加入薄荷再煎10 min,得到药汁1000 mL,二煎加水2500 mL,武火煎开后,文火再煎30 min,得到药汁1000 mL,两次药汁混合,恒温水浴箱70℃浓缩至360 mL(含生药量1 g·mL⁻¹),再取其中280 mL,继续浓缩至140 mL(含生药量2 g·mL⁻¹)。4℃冰箱密封保存备用。

1.5 方法

1.5.1 T2DM模型复制^[5] 各组小鼠均以高糖高脂饲料连续喂养8周以复制T2DM模型。

1.5.2 慢性心理应激模型复制^[6] 电击(30 V,0.1 Hz,每次持续10 min);夹尾(长尾夹内衬4层棉纱,夹住小鼠尾尖3厘米处,每次持续10 min);合笼饲养(将同一组的两笼小鼠合成一笼饲养,每次持续24 h);禁食(给水不给食,每次持续24 h);禁水(给食不给水,每次持续24 h)。以上5种应激方法每天随机安排一种,连续6周。

1.5.3 动物分组及给药 采用随机数字表法,根据小鼠初始血糖值排序,102只小鼠随机分为5组:正常对照(WC)组19只,模型(SC)组19只,逍遥散(XYS)组21只,应激+加减逍遥散低剂量(LXYS)组21只及应激+加减逍遥散高剂量(HXYS)组22只,均灌胃给药。其中WC组给予0.5 mL生理盐水,XYS组给予逍遥散水煎液(40 g·kg⁻¹);SC组灌胃后0.5 mL生理盐水,1 h给予慢性应激刺激;LXYS组灌胃0.5 mL(相当于20 g·kg⁻¹体质量)逍遥散水煎液(20 g·kg⁻¹),1 h后给予慢性应激刺激;HXYS组灌胃逍遥散水煎液(40 g·kg⁻¹),1 h后给予慢性应激刺激。

1.5.4 指标检测 (1)空腹血糖(FPG):禁食8 h后,尾静脉采血测血糖。(2)ELISA法检测血清胰岛素(INS):给药结束后各组大鼠禁食8 h摘眼球采血。4000 r·min⁻¹离心10 min,分离血清。胰岛素敏感指数采用李光伟^[6]方法计算:ISI=ln(1/FBG×FINS)。(3)ELISA法检测血脂中胆固醇(CHO)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDL-C)、低密度脂蛋白(LDL-C)4项,给药结束后各组大鼠禁食8 h摘眼球采血。4000 r·min⁻¹离心10 min,分离血清待测。

1.6 统计学处理方法 采用SPSS19.0统计软件,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠造模前后体质量与空腹血糖比较 见表1。各组小鼠造模前体质量及空腹血糖值比较,差异均无统计学意义。经过6周造模及给药后,与WC组相比较,SC组小鼠体质量明显下降($P < 0.01$),空腹血糖有所升高,但差异无统计学意义;而XYS组体质量虽有所下降,但差异无统计学意义,空腹血糖下降,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与SC组比较,HXYS组体质量明显升高($P < 0.05$);空腹血糖差异无统计学意义;LXYS组的体质量及空腹血糖差异均无统计学意义。

2.2 各组小鼠血清胰岛素(INS)与胰岛素敏感指数比较 见表2。与WC组比较,SC组INS稍上升,但

表 1 各组小鼠模型复制前后体质量及空腹血糖比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of body weight and FBG in different groups

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹	体质量/g		空腹血糖 /mmol·L ⁻¹	
			造模前	造模后	造模前	造模后
WC 组	19	0	30.57 ± 2.43	35.06 ± 2.26	9.68 ± 3.24	14.00 ± 4.32
SC 组	19	0	30.22 ± 3.26	31.06 ± 2.92 ^{**}	9.74 ± 3.22	14.21 ± 5.39
XYS 组	21	40	30.47 ± 2.52	33.58 ± 2.81	10.15 ± 2.12	11.46 ± 3.71 ^{**}
LXYS 组	21	20	30.35 ± 2.07	33.08 ± 1.76	9.17 ± 2.53	13.62 ± 5.97
HXYS 组	22	40	29.38 ± 2.98	33.34 ± 2.29 ^Δ	9.8 ± 3.02	13.21 ± 4.60

注：与 WC 组比较，^{**} $P < 0.01$ ；与 SC 组比较，^Δ $P < 0.05$ 。

差异无统计学意义($P > 0.05$)，XYS 组 INS 均明显降低($P < 0.01$)；与 SC 组比较， LXYS 组 INS 水平降低($P < 0.05$)，HXYS 组 INS 水平降低更为显著($P < 0.01$)，但 LXYS 组与 HXYS 组比较，差异无统计学意义($P > 0.05$)。与 WC 组比较， SC 组 ISI 明显降低($P < 0.01$)，XYS 组则明显升高($P < 0.05$)；与 SC 相比较， LXYS 组与 HXYS 组 ISI 均有明显升高($P < 0.01$)，但 LXYS 组与 HXYS 组比较，差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表2 各组血清胰岛素(INS)及胰岛素敏感指数(ISI)比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of blood INS and ISI in different groups

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹	INS/nIU·mL ⁻¹	ISI
WC 组	19	0	34026.59 ± 3431.28	-13.07 ± 0.23
SC 组	19	0	35141.21 ± 2916.79	-13.32 ± 0.19 ^{**}
XYS 组	21	40	24057.94 ± 3193.59 ^{**}	-12.53 ± 0.17 [*]
LXYS 组	21	20	30338.32 ± 1325.38 ^Δ	-12.93 ± 0.22 ^{ΔΔ}
HXYS 组	22	40	29725.32 ± 3871.58 ^{ΔΔ}	-12.88 ± 0.12 ^{ΔΔ}

注：与 WC 组比较，^{**} $P < 0.01$ ；与 SC 组比较，^{ΔΔ} $P < 0.001$ ，^Δ $P < 0.05$ 。

2.3 各组小鼠血脂TG、CHO、LDL-C、HDL-C 比较 见表 3。与 WC 组比较，SC 组小鼠TG、CHO 均明显升高($P < 0.05$)，HDL-C 明显降低($P < 0.05$)，LDL-C 差异无统计学意义($P > 0.05$)；XYS 组 CHO、LDL-C 均明显降低，HDL-C 则明显升高(均 $P < 0.01$)，TG 也有所降低($P < 0.05$)。与 SC 组比较，LXYS 组 TG、CHO、LDL-C 均有所降低，HDL-C 则

表 3 各组小鼠血脂 4 项结果比较($\bar{x} \pm s$, mmol·L⁻¹)

Table 3 Comparison of blood lipids in different groups

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹	TG	CHO	LDL-C	HDL-C
WC 组	19	0	0.78 ± 0.25	3.30 ± 0.41	1.68 ± 0.38	1.88 ± 0.34
SC 组	19	0	0.94 ± 0.31 [*]	3.52 ± 0.36 [*]	1.68 ± 0.21	1.75 ± 0.27 [*]
XYS 组	21	40	0.66 ± 0.20 [*]	2.53 ± 0.39 ^{**}	0.92 ± 0.34 ^{**}	2.63 ± 0.41 ^{**}
LXYS 组	21	20	0.76 ± 0.22 ^Δ	2.72 ± 0.41 ^Δ	1.28 ± 0.33 ^Δ	2.01 ± 0.42 ^Δ
HXYS 组	22	40	0.66 ± 0.28 ^{ΔΔ}	2.58 ± 0.32 ^{ΔΔ}	1.13 ± 0.23 ^Δ	2.03 ± 0.39 ^Δ

注：与 WC 组比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ ；与 SC 组比较，^Δ $P < 0.05$ ，^{ΔΔ} $P < 0.01$ 。

有所升高(均 $P < 0.05$)；HXYS 组TG、CHO 均明显降低($P < 0.01$)，LDL-C 也有所降低($P < 0.05$)，HDL-C 则有所升高($P < 0.05$)。

3 讨论

慢性心理应激属于中医情志内伤病范畴，情志致病常先伤肝，导致肝疏泄功能失常，继而伤及心、脾，气血功能失调，津液输布失职，便可发为消渴。逍遥散出自宋代《太平惠民和剂局方》，是疏肝健脾的经典名方，成方以来备受历代医家推崇，临床应用甚广。本实验根据 T2DM 的病机特点，在逍遥散原方基础上减去了温燥的生姜，加入了川芎与香附以增强全方理气和血之功，适用于 T2DM 初期肝气郁滞、气血不和兼见脾虚的病机阶段。

T2DM 是以高血糖与高胰岛素血症为主要临床表现，以胰岛素抵抗和 / 或胰岛素分泌不足为主要病理变化的一组糖、脂肪及蛋白质代谢紊乱的疾病^[7-9]。涉及的危险因素包括相关基因遗传多态性、社会心理应激、年龄、性别、肥胖和生活方式等^[8]。本实验模型复制过程中涉及遗传、慢性心理应激及饮食等三方面因素，重点观察比较慢性心理应激因素对 T2DM 发病过程的影响及中药加减逍遥散的干预作用效果。

本实验显示，与 WC 组比较，SC 组空腹胰岛素虽无明显变化，但胰岛素敏感指数明显降低；相反XYS 组空腹胰岛素水平明显降低，而胰岛素敏感指数则明显升高。说明慢性心理应激可降低 T2DM 小鼠的胰岛素敏感性，加重 IR，而加减逍遥散能够直接提高 T2DM 小鼠的胰岛素敏感性，降低 IR。此外，与 SC 组比较，LXYS 组及 HXYS 组空腹胰岛素均明显降低，而胰岛素敏感指数则明显升高，说明加减逍遥散能对抗慢性心理应激加剧 T2DM 小鼠 IR 的作用。

肥胖是 T2DM 发生的重要因素，机体在 IR 存在的情况下极易引起脂质代谢的异常，胰岛素中具有促进脂蛋白分解的成分，因此糖尿病患者血液中的甘油三酯(TG)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)等均会出现显著升高^[10]。现有研究结果显示，正常人出现血脂异常的概率大约在 30 % ~ 40 %之间，然而 T2DM 患者发生血脂异常的概率则可达 74 %以上^[11]。脂质代谢紊乱是 T2DM 患者体内物质代谢紊乱的主要表现之一，而这种脂质代谢紊乱又很容易导致 T2DM 患者相关并发症的发生与发展。因此，血脂水平变化情况也常被用作衡量 T2DM 病情变化与 IR 轻重程度的重要间接指标。

(下转第 592 页)