

白虎加人参汤对转基因 2 型糖尿病 MKR 小鼠肠道 TLR4/NF- κ B 信号通路及肠道屏障功能的影响

蒋宛瑾, 谢 聪, 喻 嵘*, 向 琴*, 吴勇军, 刘 秀

湖南中医药大学, 湖南 长沙 410200

摘要:目的 探讨白虎加人参汤对转基因 2 型糖尿病 MKR 小鼠肠道屏障及 Toll 样受体 4 (TLR4)/核转录因子- κ B (NF- κ B) 炎症通路的影响。方法 32 只 MKR 小鼠高脂饮食喂养 4 周, 随机分为模型组, 白虎加人参汤低、高剂量 (13.5、54.0 g/kg) 组, 二甲双胍 (200 mg/kg) 组, 8 只同龄 FVB/N 野生小鼠作为对照组。各组 ig 给药 4 周后, 测定小鼠空腹血糖 (FBG)、口服糖耐量 (OGTT)、血清炎症因子白细胞介素-6 (IL-6)、IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和脂多糖 (LPS) 水平的变化, 苏木精-伊红 (HE) 染色对结肠组织形态进行观察, 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测结肠组织 TLR4、NF- κ B、ZO-1、Claudin-1、Occludin mRNA 表达变化, Western blotting 检测结肠组织 ZO-1、Claudin-1、Occludin 蛋白表达变化。结果 与模型组比较, 给药组小鼠 FBG 水平显著降低 ($P < 0.01$), 白虎加人参汤高剂量组和二甲双胍组小鼠血清 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、LPS 水平明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), TLR4、NF- κ B mRNA 表达明显下调, 结肠上皮黏膜完整性明显改善; 白虎加人参汤高剂量组和二甲双胍组小鼠 ZO-1、Claudin-1、Occludin mRNA 和蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01); 白虎加人参汤低剂量组小鼠 ZO-1、Claudin-1、Occludin mRNA 表达升高 ($P < 0.05$), 但蛋白表达水平无明显差异。结论 白虎加人参汤能降低 MKR 小鼠血清 LPS 含量及炎症相关因子水平, 并调控 TLR4/NF- κ B 信号通路, 通过改善内毒素血症、肠道屏障功能, 减轻肠道炎症反应, 从而改善胰岛素抵抗, 降低血糖水平。

关键词: 白虎加人参汤; 2 型糖尿病; MKR 小鼠; 肠道屏障; 白细胞介素-6; 白细胞介素-1 β ; 肿瘤坏死因子- α ; 脂多糖

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)11-3005-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.11.019

Effect of Baihu and Renshen Decoction on intestinal TLR4/NF- κ B signaling pathway and intestinal barrier in type 2 diabetes MKR mice

JIANG Wan-jin, XIE Cong, YU Rong, XIANG Qin, WU Yong-jun, LIU Xiu

Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410200, China

Abstract: **Objective** To observe the effect of Baihu and Renshen Decoction on intestinal barrier and TLR4/NF- κ B inflammatory signaling pathway in type 2 diabetes MKR mice. **Methods** A total of 32 MKR mice were randomly divided into model group, low dose Baihu and Renshen Decoction group, high dose Baihu and Renshen Decoction group and metformin group after 4 weeks with the high-fat diet. Another eight FVB/N mice were served as control group. After 4-week intragastric administration, fasting blood glucose (FBG), oral glucose tolerance test (OGTT), the levels of interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and lipopolysaccharide (LPS) in serum were examined. The morphological changes of colon tissue were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The mRNA expression of TLR4, NF- κ B, ZO-1, Claudin-1 and Occludin were measured by qRT-PCR method. The protein expression of ZO-1, Claudin-1 and Occludin in colon were measured by Western blotting. **Results** Compared with model group, FBG in each administration group were significantly decreased ($P < 0.01$), serum IL-6, IL-1 β , TNF- α , LPS and TLR4, NF- κ B mRNA expressions were decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in high dose Baihu and Renshen Decoction group and metformin group. The mucosal epithelium integrity was improved. The mRNA and protein expression levels of ZO-1, Claudin-1,

收稿日期: 2019-11-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573956); 中医方证研究转化医学湖南省重点实验室资助 (2018TP1021); 湖南省自然科学基金项目 (2018JJ3394); 湖南省中医药科研计划项目 (201931); 湖南省教育厅科学研究项目 (16C1235); 湖南省教育厅科学研究项目 (18A220); 湖南省研究生科研创新项目 (CX2018B483); 湖南中医药大学校级科研基金项目 (2017-1); 湖南中医药大学大学生研究性学习和创新性实验计划项目 (2017-1)

作者简介: 蒋宛瑾 (1993—), 女, 在读硕士, 研究方向为仲景学说及中医药防治糖尿病的机制研究。Tel: 18786023197 E-mail: 497607011@qq.com

***通信作者** 喻 嵘, 女, 博士生导师, 教授, 主要从事中医药防治内分泌及代谢疾病的研究。E-mail: yuron@21cn.com

向 琴, 女, 实验师, 主要从事代谢性疾病与肠道菌群相关性及中药防治机制研究。E-mail: 003852@hnu.edu.cn

Occludin were increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in high dose Baihu and Renshen Decoction group and metformin group; The mRNA expression levels of ZO-1, Claudin-1, Occludin were increased ($P < 0.05$) in low dose Baihu and Renshen Decoction group, while protein expressions showed no statistical difference. **Conclusion** Baihu and Renshen Decoction can consequently reduce the levels of LPS and pro-inflammatory cytokines in MKR mice, regulate TLR4/NF- κ B signaling pathway. It can significantly improve insulin resistance and reduce blood glucose levels by improving endotoxaemia, ameliorating intestinal injury and attenuating inflammation.

Key words: Baihu and Renshen Decoction; type 2 diabetes mellitus; MKR mice; intestinal barrier; IL-6; IL-1 β ; TNF- α ; lipopolysaccharide

2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 是胰岛 β 细胞功能障碍及胰岛素抵抗引起的代谢疾病, 遗传易感性与多种环境因素共同参与其发病过程, 其发病机制尚未明确。目前认为由脂多糖(LPS)介导的内毒素血症和炎症反应在糖尿病的发生、发展过程中有着重要作用。LPS 来源于革兰阴性菌细胞壁外层, 是一种重要的炎症刺激物。通过损伤的肠上皮屏障渗透进入循环系统, 诱导全身产生慢性低度炎症, 干扰胰岛素在体内的信号传导, 引发胰岛素抵抗和 T2DM^[1]。

白虎加人参汤出自《金匱要略》, 由石膏、知母、炙甘草、人参、粳米组成, 具有清热益气、生津止渴的作用, 现代药理研究和临床应用研究表明该方具有降血糖、改善 T2DM 的作用^[2-3]。本实验以高脂喂养的骨骼肌特异性胰岛素样生长因子-1 受体功能缺失鼠 (MKR 小鼠) 为研究对象, 探讨白虎加人参汤对 MKR 小鼠肠道屏障及炎症因子的影响, 为防治 T2DM 的中医药研究与开发提供理论依据。

1 材料

1.1 动物及高脂饲料

MKR 小鼠, 由美国国立卫生研究院糖尿病研究中心 Dr. D. LeRoith 提供的纯合子 MKR 小鼠, 经自然交配后繁殖的后代用于实验研究, 8 周龄, 体质量 (20 ± 2) g, 饲养于湖南中医药大学 SPF 级实验动物中心, 许可证号 SYXK (湘) 2013-0005; FVB/N 野生小鼠, 8 周龄, 体质量 (20 ± 2) g, 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。所有动物均置于温度 (24 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 (50 ± 10) %、昼夜循环 12 h/12 h 的环境中, 自由饮水和饮食。高脂饲料 (30%猪油、16%麦芽糖、8%蔗糖、0.2%胆碱盐、45.8%普通饲料), 购自武汉鼠来宝生物科技有限公司。

1.2 药物

白虎加人参汤组方药材知母、石膏、炙甘草、粳米、人参饮片购自湖南中医药大学第一附属医院药房, 由湖南中医药大学药学院吴勇军副教授鉴定, 均符合《中国药典》2015 年版标准; 盐酸二甲双胍片,

浙江亚太药业股份有限公司, 批号 A181206。

1.3 试剂

小鼠白细胞介素-6 (IL-6)、IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、LPS ELISA 检测试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司); 动物组织 RNA 提取试剂盒 (北京 TIANGEN 生物技术公司); 逆转录试剂盒 (北京康为世纪生物科技有限公司)。

1.4 仪器

血糖仪及末端全血葡萄糖试剂条 (长沙三诺生物传感股份有限公司); TGL-18R 台式冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); RT-6100 酶标分析仪 (深圳雷杜生命科学股份有限公司); Bio-Rad 电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); PIKO REAL 96 荧光定量 RCP 仪 (美国 Thermo 公司)。

2 方法

2.1 白虎加人参汤制备

白虎加人参汤按组方比例取知母 18 g、石膏 50 g、炙甘草 6 g、粳米 9 g、人参 10 g, 以 8 倍量蒸馏水浸泡 30 min, 煎煮 2 次, 合并煎液, 滤过浓缩至含生药量 2 g/mL 的药液, 置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。提取物中含有钙离子 7.06%、知母多糖 3.83%、芒果苷 2.07%、甘草酸 0.19%、人参总皂苷 0.37%。

2.2 糖尿病小鼠模型的制备及分组

选取 8 周龄 MKR 小鼠 32 只, 高脂饲料喂养 4 周, 根据性别、体质量随机分为 4 组: 模型组, 白虎加人参汤低、高剂量 [按小鼠与人体表面积等效剂量折算法, 折算临床剂量为 13.5 g/(kg·d), 定为低剂量, 4 倍临床剂量定为高剂量, 即 54.0 g/(kg·d)] 组, 二甲双胍组 (200 mg/kg), 同龄 FVB/N 野生小鼠 8 只作为对照组。白虎加人参汤低、高剂量组小鼠分别 ig 给予白虎加人参汤提取物, 二甲双胍组 ig 二甲双胍, 模型组、对照组 ig 给予等体积蒸馏水; 给药体积为 20 mL/kg, 每日定时给药 1 次, 持续 28 d。

2.3 口服葡萄糖耐量试验 (OGTT)

在给药 28 d 后进行 OGTT。禁食 8 h, 每只小鼠 ig 给予 20%葡萄糖 (2 g/kg), 分别于 0、30、60、120 min 从尾梢取血样, 用血糖仪测定血糖值, 并

计算糖耐量曲线下面积 (AUC)。

2.4 血清指标检测

实验结束时所有小鼠禁食过夜,用血糖仪测定空腹血糖值 (FBG) 后,采集血样,2 500 r/min,4 ℃ 离心 10 min 得到血清。参照 ELISA 试剂盒说明书方法测定血清中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、LPS 水平^[4]。

2.5 结肠组织病理形态学观察

取结肠组织,4%多聚甲醛固定,梯度酒精上行脱水,石蜡包埋、切片、贴片,常规 HE 染色,二甲苯透明,中性树胶封片,光镜下观察结肠组织形态学改变并拍摄照片。

2.6 相关基因的实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测

使用 Trizol 法提取小鼠结肠组织 RNA。测定总 RNA 浓度,使用反转录试剂盒转换为 cDNA。引物由上海生工生物工程有限公司合成,各待测基因引物序列见表 1。使用 SYBR 法进行实时定量,PCR 反应条件设定为 95 ℃、10 min;95 ℃、15 s;60 ℃、60 s;40 个循环。以 β -actin 为内参照,使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算相对基因表达水平。

表 1 各检测基因的引物序列

Table 1 Primer sequences

基因名称	引物序列 (5'→3')	长度/bp
Claudin-1	正向引物: AGCCACATTTTGAAGCGTA	127
	反向引物: CCAAAGTGCAAAGACCGTCCA	
Occludin	正向引物: ATCGTGGCTTTTGCTTAAATCATC	114
	反向引物: GGGCTGTTCATCATAAATGTGTT	
ZO-1	正向引物: ACCGAAACCTGTGTATGCTC	175
	反向引物: ATCATTTCCACCAGCTAGTCG	
TLR4	正向引物: AGACACTTTATTTCAGAGCCGTTG	150
	反向引物: AAGGCGATACAATTCCACC	
NF- κ B	正向引物: TAGCCAGCGAATCCAGACCAACA	115
	反向引物: TGGGTCCCGCACTGTACACCT	
β -actin	正向引物: ACATCCGTAAAGACCTCTATGCC	223
	反向引物: TACTCCTGCTTGCTGATCCAC	

2.7 Western blotting 法检测结肠组织紧密连接蛋白表达

取结肠组织标本提取总蛋白,根据蛋白定量的结果,每孔上样 10 μ L,电泳结束后电转移到 NC 膜,4 ℃ 封闭过夜,封闭后加入兔源 ZO-1 (1:1 000)、Occludin (1:1 000)、Claudin-1 (1:1 000)、 β -actin (1:5 000) 一抗,室温孵育 90 min。再加入 HRP 标记的山羊抗小鼠二抗,室温孵育 90 min。使用 ECL 化学发光液与膜孵育 1 min,在暗盒内与

X 胶片曝光 20 min 显影冲洗。以 β -actin 蛋白表达量校正,用 quantity One 专业灰度分析软件进行分析。

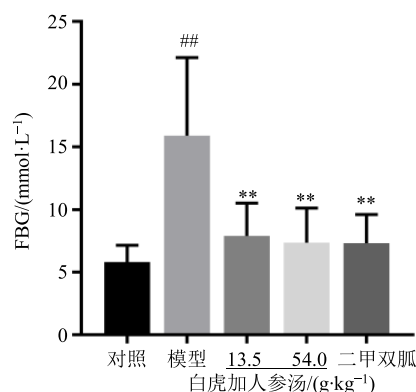
2.8 统计分析

采用 SPSS 21.0 软件统计,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组计量资料符合正态性、方差齐性采用单因素方差分析,组间比较采用 LSD 法。

3 结果

3.1 白虎加人参汤对 MKR 小鼠 FBG 的影响

与对照组比较,模型组小鼠 FBG 明显升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,白虎加人参汤低、高剂量组 and 二甲双胍组小鼠 FBG 水平明显下降 ($P < 0.05$ 、0.01),3 个给药组比较差异不显著。结果见图 1。



与对照组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: ** $P < 0.01$
$P < 0.01$ vs control group; ** $P < 0.01$ vs model group

图 1 白虎加人参汤对糖尿病 MKR 小鼠 FBG 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

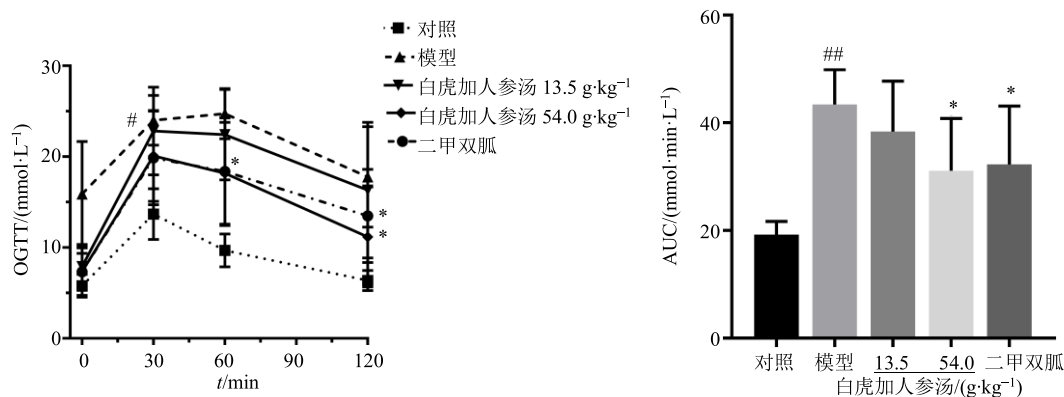
Fig. 1 Effects of Baihu and Renshen Decoction on FBG of MKR mice with diabetes ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.2 白虎加人参汤对 MKR 小鼠 OGTT 的影响

各组小鼠 ig 给予葡萄糖负荷后血糖水平持续升高,30 min 时各组小鼠血糖浓度达到峰值,模型组小鼠血糖浓度最高,与对照组比较差异显著 ($P < 0.05$),表明其口服葡萄糖耐量异常;与模型组比较,白虎加人参汤高剂量组和二甲双胍可显著抑制小鼠口服葡萄糖负荷后的血糖升高 ($P < 0.05$)。AUC 结果显示,与模型组比较,白虎加人参汤高剂量组和二甲双胍组 AUC 降低 ($P < 0.05$),且两组间差异无显著性,提示白虎加人参汤能够改善小鼠口服葡萄糖耐量异常。结果见图 2。

3.3 白虎加人参汤对 MKR 小鼠血清中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、LPS 的影响

各组小鼠血清中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、LPS 测定结果见图 3。与对照组比较,模型组小鼠血清

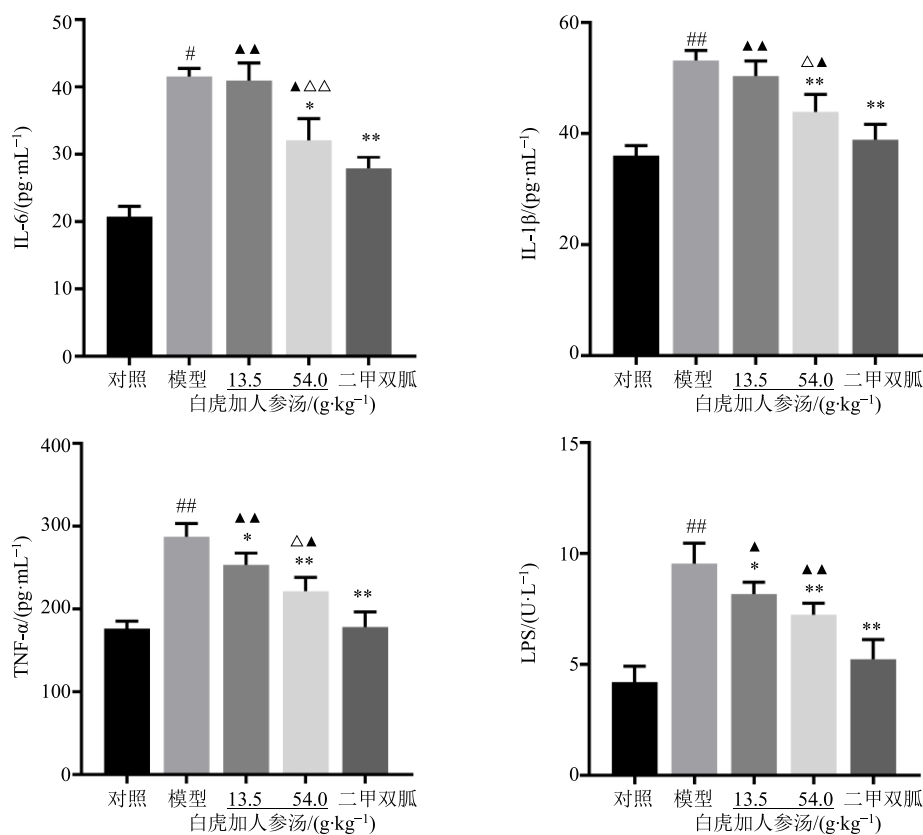


与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$

$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ vs model group

图 2 白虎加人参汤对糖尿病 MKR 小鼠 OGTT 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 2 Effects of Baihu and Renshen Decoction on OGTT of MKR mice with diabetes ($\bar{x} \pm s, n = 8$)



与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与二甲双胍组比较: ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$; 与白虎加人参汤低剂量组比较: △ $P < 0.05$ △△ $P < 0.01$, 下图同

$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group; ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ vs metformin group; △ $P < 0.05$ △△ $P < 0.01$ vs low dose of Baihu and Renshen Decoction group, same as below figures

图 3 白虎加人参汤对糖尿病 MKR 小鼠血清中 IL-6、IL-1β、TNF-α、LPS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 3 Effects of Baihu and Renshen Decoction on levels of IL-6, IL-1β, TNF-α, and LPS in serum of MKR mice with diabetes ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平均显著升高 ($P<0.01$); 各给药组对血清中炎症因子水平的影响较模型组均呈现降低趋势, 其中白虎加人参汤高剂量组、二甲双胍组小鼠血清 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平均显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01); 白虎加人参汤低剂量组可降低小鼠血清 TNF- α 水平 ($P<0.05$), 也可降低 IL-6、IL-1 β 水平, 但差异无统计学意义; 白虎加人参汤低、高剂量组血清 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平高于二甲双胍组 ($P<0.05$ 、 0.01); 由此可知, 白虎加人参汤高剂量组优于低剂量组 ($P<0.05$ 、 0.01), 二甲双胍组优于白虎加人参汤组。小鼠血清 LPS 的结果显示, 模型组小鼠血清中的 LPS 量明显高于对照组, 差异显著 ($P<0.01$); 白虎加人参汤低、高剂量组与模型组相比均能显著降低小鼠血清

内 LPS 的量 ($P<0.05$ 、 0.01), 但效果不如二甲双胍组明显 ($P<0.05$ 、 0.01)。

3.4 白虎加人参汤对 MKR 小鼠结肠组织病理学改变的影响

对照组小鼠结肠黏膜上皮结构完整, 边界清晰, 结肠肠腺形态正常, 排列整齐规则, 无充血、水肿和剥脱等变化, 未见炎性细胞浸润。模型组小鼠结肠黏膜上皮结构破坏, 可见区域充血、水肿, 结肠黏膜缺损, 肠腺变形排列紊乱, 伴有炎性细胞浸润。经治疗后小鼠结肠黏膜均有不同程度修复, 上皮结构相对完整, 白虎加人参汤高剂量组和二甲双胍组小鼠肠腺排列相对整齐, 水肿、充血不明显, 炎症细胞浸润显著减少; 低剂量组仍可见部分肠腺排列不规则和炎症细胞浸润。结果见图 4。

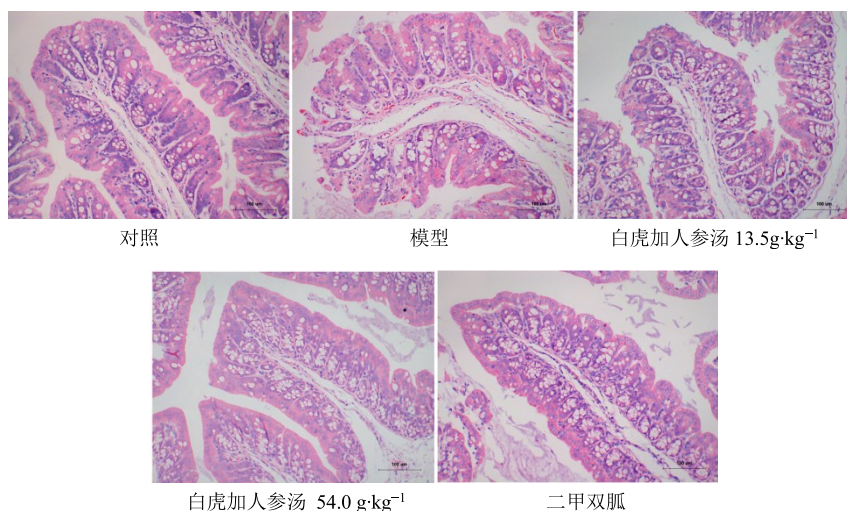


图 4 白虎加人参汤对糖尿病 MKR 小鼠结肠组织病理学改变的影响 (HE 染色, $\times 200$)

Fig. 4 Effects of Baihu and Renshen Decoction on pathologic morphology of colonic tissues of MKR mice with diabetes (HE staining, $\times 200$)

3.5 白虎加人参汤对 MKR 小鼠肠道组织 TLR4、NF- κ B mRNA 表达的影响

模型组 TLR4、NF- κ B mRNA 表达明显高于对照组, 差异显著 ($P<0.01$); 各给药组 TLR4、NF- κ B mRNA 表达与模型组相比明显下调, 差异显著 ($P<0.05$ 、 0.01)。结果见图 5。

3.6 白虎加人参汤对 MKR 小鼠结肠组织 ZO-1、Claudin-1、Occludin mRNA 表达的影响

与对照组比较, 模型组小鼠结肠组织 ZO-1、Claudin-1、Occludin mRNA 表达水平明显降低 ($P<0.05$ 、 0.01); 白虎加人参汤低、高剂量组 ZO-1、Claudin-1、Occludin mRNA 表达高于模型组 ($P<0.05$ 、 0.01), 但低于二甲双胍组 ($P<0.05$ 、 0.01);

白虎加人参汤高剂量组在上调 Claudin-1 mRNA 表达方面优于低剂量组 ($P<0.05$)。结果见图 6。

3.7 白虎加人参汤对 MKR 小鼠结肠组织 ZO-1、Claudin-1、Occludin 蛋白表达的影响

模型组 ZO-1、Claudin-1、Occludin 蛋白含量在结肠组织中均下降, 与对照组相比具差异显著 ($P<0.05$); 与模型组比较, 白虎加人参汤高剂量组和二甲双胍组小鼠结肠组织中 Claudin-1、Occludin 蛋白表达均升高 ($P<0.05$), 两组相比差异不显著; 白虎加人参汤高剂量组中 ZO-1 蛋白表达以及低剂量组中 ZO-1、Claudin-1、Occludin 蛋白表达有一定升高趋势, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。结果见图 7。

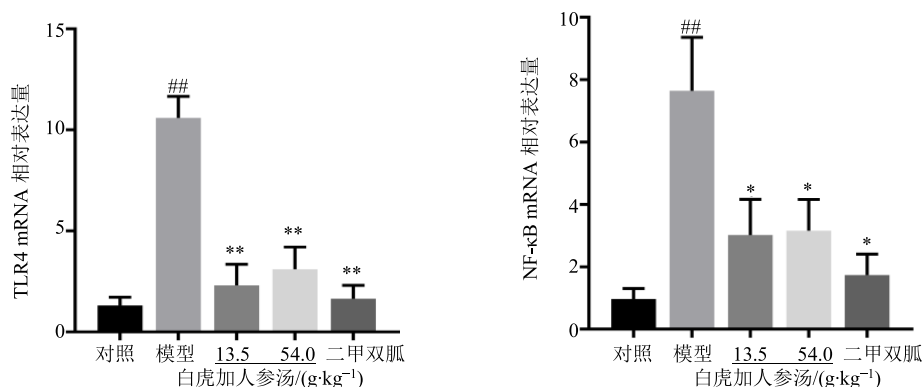


图 5 白虎加人参汤对糖尿病 MKR 小鼠结肠组织中 TLR4、NF-κB mRNA 相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 5 Effects of Baihu and Renshen Decoction on mRNA expression of TLR4 and NF-κB in colon tissue of MKR mice with diabetes ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

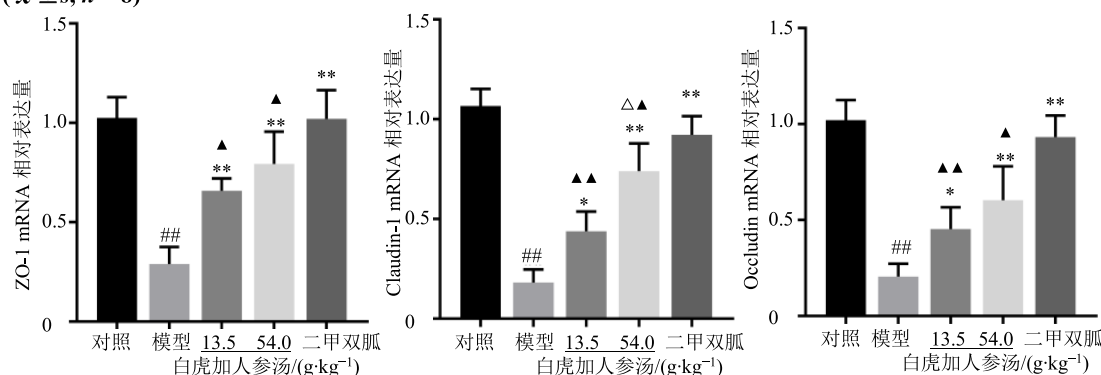


图 6 白虎加人参汤对糖尿病 MKR 小鼠结肠组织紧密连接蛋白 ZO-1、Claudin-1、Occludin mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

4 讨论

低水平炎症状态是 T2DM 的特征之一,在胰岛素抵抗状态下,IL-6、IL-1 β 、TNF- α 等炎症因子水平升高^[5-6]。LPS 是炎症启动的诱导因子,也是内毒素发挥效应的主要物质,在诱导相关代谢性疾病发生中具有重要作用,被命名为“代谢性内毒素”^[7]。在高脂饮食喂养的小鼠中,LPS 出现低水平且缓慢上升的现象,形成代谢性内毒素血症,并发生肥胖、胰岛素抵抗和炎症反应,证明了代谢性内毒素血症可能是机体代谢低水平慢性炎症和胰岛素抵抗的重要环节^[8]。

肠黏膜屏障功能破坏则可能是触发代谢性内毒素血症的重要因素。Occludin、ZO-1、Claudin-1 等紧密连接蛋白是肠黏膜上皮细胞间的连接蛋白,可封闭细胞间隙,保持肠黏膜的完整性,阻挡物质穿过细胞间隙,具有屏障作用^[9-10]。LPS 是革兰阴性菌细胞壁的组成部分,当肠道内革兰阴性菌增加,其所产生的大量 LPS 与单核巨噬细胞的 CD14 形成

复合物激活 TLR4,通过髓样分化分子 88 (MyD88) 一系列反应进一步激活 NF-κB,促进炎症因子的合成和释放^[11-12],造成肠道黏膜局部炎症反应,损伤肠上皮细胞紧密连接,增加肠壁通透性,细菌、内毒素及大分子物质等发生跨膜位移进入体循环,导致循环 LPS 水平升高和全身慢性低度炎症反应,加重胰岛素抵抗和 β 细胞功能受损^[13]。

本研究中使用的 MKR 小鼠是良好的 T2DM 模型,在出生 5 周左右即可表现出明显的胰岛素抵抗,糖耐量异常、胰岛 β 细胞功能紊乱以及炎症分子含量的改变^[14-15]。结果显示,与对照组相比,模型组 MKR 小鼠血清炎症因子 (IL-6、IL-1 β 、TNF- α) 和 LPS 水平升高,结肠组织 TLR4、NF-κB mRNA 表达上调,紧密连接蛋白 Occludin、ZO-1 及 Claudin-1 mRNA 和蛋白表达下调,提示高脂喂养的 2 型糖尿病 MKR 小鼠存在炎症通路的激活和肠黏膜屏障功能降低。

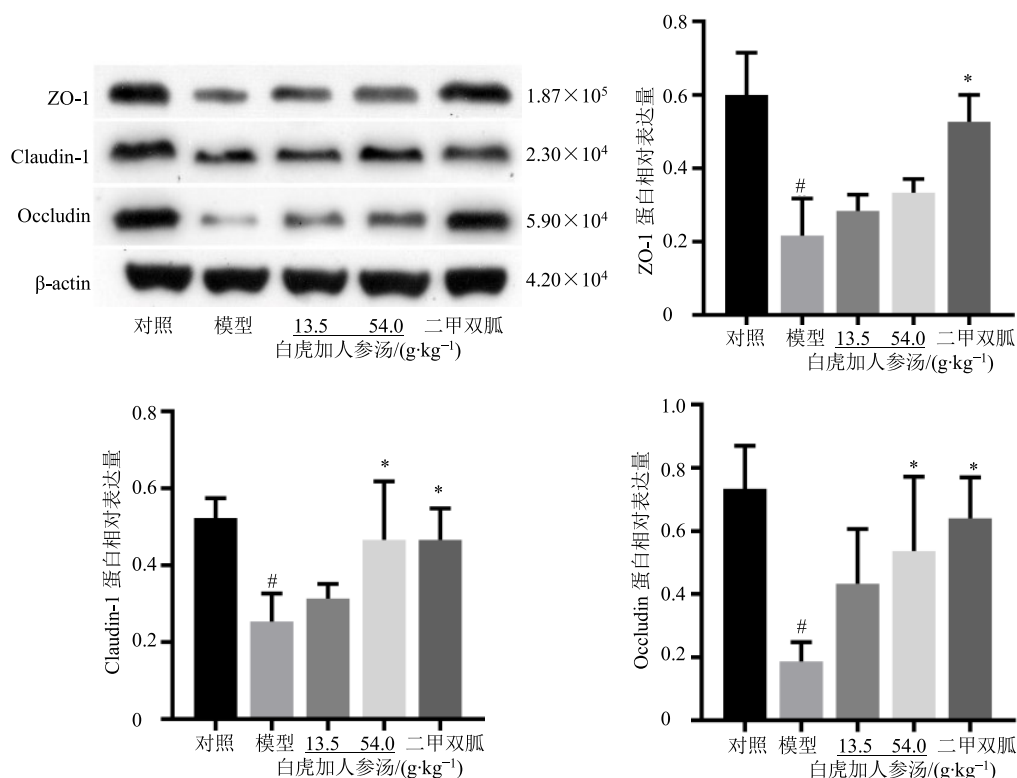


图 7 白虎加人参汤对糖尿病 MKR 小鼠结肠组织紧密连接蛋白 ZO-1、Claudin-1、Occludin 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Fig. 7 Effects of Baihu and Renshen Decoction on protein expression of ZO-1, Claudin-1, and Occludin in colon tissue of MKR mice with diabetes ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

糖尿病属于中医“消渴”的范畴,《素问·奇病论篇》^[16]中记载此病名为“脾瘕”“消中”,认为此病的发生是由于“数食甘美而多肥”而致“内热”“中满”,胃热上蒸于肺,“故其气上溢,转为消渴”,形成肺胃热盛伤津之候。汉代张仲景创立白虎加人参汤,用于治疗肺胃热盛,津气两伤之“消渴”,方中生石膏辛寒,功擅清热;知母苦寒而润,泄火滋阴;炙甘草、粳米益气和缓,生津且固护脾胃;人参益气生津;各药配伍清热益气、生津止渴、使胃热去、胃阴还、烦渴自解。经白虎加人参汤干预, MKR 小鼠血清中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平降低,且随着剂量增加效果更明显;结肠组织 TLR4、NF- κ B mRNA 表达下调。说明白虎加人参汤下调 TLR4/NF- κ B 信号通路,减轻局部炎症反应,减少炎症因子的产生。本研究还发现白虎加人参汤可上调 MKR 小鼠结肠组织 ZO-1、Claudin-1、Occludin mRNA 表达和 Claudin-1、Occludin 蛋白表达,重建肠道黏膜完整性,降低血清 LPS 水平,故白虎加人参汤具有一定改善肠黏膜屏障损伤和内毒素血症的作用。但白虎加人参汤对 ZO-1 的蛋白表达无显著影响,其机制有待进一步研究。

综上所述,白虎加人参汤对 MKR 小鼠炎性相关信号通路 TLR4/NF- κ B 具有明显调控作用,并能修复肠黏膜屏障,是其抑制血清炎症因子水平和 LPS 水平,降低血糖,缓解 T2DM 的重要机制之一。另外,最近几年多项研究表明^[17-21], T2DM 患者和高脂饮食诱导的 T2DM 小鼠均发现肠道菌群紊乱、结构改变导致肠道屏障结构和功能受损、炎症及代谢性内毒素血症的发生,由此推测肠道菌群与 T2DM 的发生发展密切相关。白虎加人参汤是否通过改变肠道菌群结构和影响特定菌种改善内毒素血症、肠道屏障功能和肠道炎症反应,从而达到改善胰岛素抵抗,降低血糖水平的目的,将在后期研究中进行深入探讨。

参考文献

- [1] Caricilli A, Saad M. The role of gut microbiota on insulin resistance [J]. *Nutrients*, 2013, 5(3): 829-851.
- [2] 张保国, 刘庆芳. 白虎加人参汤药理研究及其临床应用 [J]. *中成药*, 2012, 34(5): 918-921.
- [3] 侯亚莉, 张雨, 林梅. 白虎加人参汤 2 型糖尿病患者氧化应激水平与胰岛素敏感性的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2017, 33(5): 192-194.

- [4] Zhuang P, Shou Q, Lu Y, *et al.* Arachidonic acid sex-dependently affects obesity through linking gut microbiota-driven inflammation to hypothalamus-adipose-liver axis [J]. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Mol Basis Dis*, 2017, 1863(11): 2715-2726.
- [5] Donath M Y, Shoelson S E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(2): 98-107.
- [6] Khodabandehloo H, Gorgani-Firuzjaee S, Panahi G, *et al.* Molecular and cellular mechanisms linking inflammation to insulin resistance and β -cell dysfunction [J]. *Transl Res*, 2015, 167(1): 228-256.
- [7] Cani P D, Amar J, Iglesias M A, *et al.* Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance [J]. *Diabetes*, 2007, 56(7): 1761-1772.
- [8] Cani P D, Osto M, Geurts L, *et al.* Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity [J]. *Gut Microb*, 2012, 3(4): 279-288.
- [9] Camilleri M, Madsen K, Spiller R, *et al.* Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2012, 24(6): 503-512.
- [10] Saitoh Y, Suzuki H, Tani K, *et al.* Structural insight into tight junction disassembly by *Clostridium perfringens* enterotoxin [J]. *Science*, 2015, 347(6223): 775-778.
- [11] Mir S M, Ravuri H G, Pradhan R K, *et al.* Ferulic acid protects lipopolysaccharide-induced acute kidney injury by suppressing inflammatory events and upregulating antioxidant defenses in Balb/c mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 100(4): 304-315.
- [12] Feng D, Wang Y, Liu Y, *et al.* DC-SIGN reacts with TLR-4 and regulates inflammatory cytokine expression via NF- κ B activation in renal tubular epithelial cells during acute renal injury: DC-SIGN/TLR-4 regulates NF- κ B activation [J]. *Clin Exper Immunol*, 2018, 191(1): 107-115.
- [13] Hameed I, Masoodi S R, Mir S A, *et al.* Type 2 diabetes mellitus: From a metabolic disorder to an inflammatory condition [J]. *World J Diabetes*, 2015, 6(4): 598-612.
- [14] 喻 嵘, 成细华, 胡 伟, 等. 骨骼肌特异性胰岛素样生长因子 1 及胰岛素双受体功能缺失鼠糖尿病发病及其相关炎症因子的变化 [J]. 中国组织工程研究, 2007, 11(45): 9075-9078.
- [15] 胡 伟, 喻 嵘, 成细华, 等. MKR 转基因糖尿病小鼠血糖血脂与血清炎症因子 CRP、IL-6、TNF- α 的相关性分析 [J]. 基础医学与临床, 2009, 29(9): 987-988.
- [16] 田代华. 黄帝内经素问 [M]. 北京: 人民卫生出版, 2005.
- [17] Sato J, Kanazawa A, Ikeda F, *et al.* Gut dysbiosis and detection of “live gut bacteria” in blood of Japanese patients with type 2 diabetes [J]. *Diabetes Care*, 2014, 37(8): 2343-2350.
- [18] 别明江, 刘 祥, 潘素华, 等. 糖尿病模型小鼠的肠道菌群与血糖关系的探讨 [J]. 现代预防医学, 2005, 32(11): 23-25.
- [19] 章常华, 马广强, 邓永兵, 等. 葛根芩连汤对 KK-Ay 糖尿病小鼠血浆中 LPS、TNF- α 、IL-6 及肠道菌群的影响 [J]. 中草药, 2017, 48(8): 1611-1616.
- [20] Moreira A P B, Texeira T F S, Ferreira A B, *et al.* Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia [J]. *Br J Nutr*, 2012, 108(5): 801-809.
- [21] 郑礼胜, 邵 文, 兰新新, 等. 基于肠道菌群新靶点的中药防治糖尿病研究进展 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(8): 1173-1181.