·论　著·

doi:10.3969/j.issn.1671-038X.2013.12.001

虎杖苷对非酒精性脂肪性肝病胰岛素抵抗及氧化应激影响的实验研究

陈剑明[1,2]，　张声生[1]，　郭前坤[1]，　吴震宇[1]，　高　月[3]，　马增春[3]

([1] 首都医科大学附属北京中医医院　消化中心，北京　100010；[2] 解放军第 251 医院，河北　张家口　075000；[3]解放军军事医学科学院，北京　100850)

摘要：[**目的**]研究虎杖苷治疗对非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)胰岛素抵抗(IR)及氧化应激的影响。[**方法**]健康雄性 SD 大鼠 47 只，随机分为 5 组：正常组(10 只)、模型组(10 只)、虎杖苷大剂量组(9 只)、虎杖苷小剂量组(9 只)和双环醇组(9 只)。正常组予标准饲料，其他 4 组给予高脂饲料造模；5 组共喂养 10 周后，从正常组与模型组中各随机挑选 1 只大鼠，取肝脏做病理切片，证实大鼠 NAFLD 模型的形成。正常组与模型组予以 0.9%氯化钠灌胃，5 ml/次；虎杖苷大、小剂量组分别以 200 mg/(kg·d)、100 mg/(kg·d)的虎杖苷混悬液灌胃；双环醇组以 100 mg/(kg·d)的双环醇混悬液灌胃。给药 4 周，期间各组大鼠统一用标准饲料饲养。次日大鼠禁食 12 h 后，腹腔麻醉，抽取腹主动脉血 5 ml，分离血清，检测大鼠血清中氧化应激因子丙二醛(MDA)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)、羟自由基(-OH)、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)水平及血清总抗氧化能力(T-AOC)水平；试剂盒检测空腹血糖、胰岛素水平，计算 IR 指数(IRI)和胰岛素敏感指数；ELISA 法检测大鼠血清肿瘤坏死因子-α(TNF-a)水平。[**结果**]高脂饮食饲养 10 周后，模型组大鼠血清-OH、MDA、TNF-α 较正常组均显著增高($P<0.05\sim<0.01$)，GST、T-SOD、T-AOC 活性降低($P<0.01$)，与模型组相比，虎杖苷治疗后，-OH、MDA、TNF-α 浓度降低($P<0.05<0.01$)，而 T-SOD 及 T-AOC 的活性恢复($P<0.05\sim<0.01$)，IR 明显改善($P<0.05\sim<0.01$)。[**结论**]IR 和氧化应激关系密切，氧化应激是发生 IR 的重要原因之一，虎杖苷的抗氧化应激效应是改善 IR 的部分机制。

关键词：虎杖苷，脂肪肝；　非酒精性；　氧化应激；　胰岛素抵抗

中图分类号：R 575.5；R 282.71　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1671-038X(2013)12-0617-04

The effects of polydatin on insulin resistance and oxidative stress in nonalcoholic fatty liver disease

CHEN Jian-ming [1,2], *ZHANG Sheng-sheng* [1], *GUO Qian-kun* [1], *WU Zhen-yu* [1], *GAO Yue* [3], *MA Zeng-chun* [3]

([1]Beijing TCM Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100010, China; [2]251Hospital of PLA, Zhangjiakou 075000, China; [3]Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Corresponding author: ZHANG Sheng-sheng, E-mail: zhss2000@163.com

Abstract:[**Objective**]To explore the effect of polydatin on insulin resistance(IR) and oxidative stress of non alcoholic fatty liver disease (NAFLD). [**Methods**] Forty-seven healthy male SD rats were randomly divided into normal group(10 rats), model group(10 rats), high dose of polydatin group (9 rats), low dose of polydatin group(9 rats) and bicyclol group(9 rats). Normal group received standard diet. The other 4 groups were fed with high fat diet. After 10 weeks of feeding, one rat was randomly selected from both

收稿日期：2013-07-31

基金项目：北京市中医科技重点规划项目(No:KJTS2011_01)；北京市卫生系统高层次卫生技术人才培养计划(No:2011-2-13)

作者简介：陈剑明，男，医学博士，主治医师，从事消化内科临床与实验研究

通讯作者：张声生，E-mail:zhss2000@163.com

normal group and model group. The liver pathological slices were observed to confirm the establishment of NAFLD of rats. The rats in each group were treated for 4 weeks. After treatment, rats were sacrificed to measure oxidative stress factors malondialdehyde(MDA), superoxide dismutase(T-SOD), hydroxyl radical(-OH), glutathione -S- transferase (GST), total antioxidant capacity of T-AOC level, fasting blood glucose, fasting insulin, insulin resistance index and insulin sensitive index. ELISA was used to measure the serum TNF-α level. [**Results**]Serum hydroxyl radical, MDA, TNF-α in the model group were significantly higher than those in the control group($P<0.05$, <0.01). SOD, T-SOD and T-AOC activity were decreased in model group compared to control group($P<0.01$). After the treatment with polydatin, hydroxyl radical, MDA, the concentration of TNF-α were decreased($P<0.01$), and SOD, T-SOD and T-AOC activity were reversed($P<0.01$). IR was also improved significantly($P<0.01$). [**Conclusion**] There is close relationship between IR and oxidative stress, suggesting that oxidative stress is one of the important causes of IR. Polydatin relieves IR partly via anti-oxidative stress.

Key words: polydatin; non-alcoholic fatty liver; oxidative stress; insulin resistance

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease,NAFLD)是一种无过量饮酒史、饮酒折含乙醇量<140 g/周(女性<70 g/周),以肝实质细胞脂肪变和脂肪贮积为特征的临床病理综合征[1-2],发病机制尚未完全明了,目前认为胰岛素抵抗(IR)触发的脂质代谢紊乱是NAFLD重要发病机制[3-6]。近年来的研究认为氧化应激与IR密切相关[7],可能是导致IR主要原因[8-10]。中医药治疗本病具有一定的优势,虎杖是治疗中医"胁痛""黄疸"的常用药物,它具有降糖、抗炎、止血及保肝降脂作用[11-16]。虎杖苷作为虎杖的主要有效成分,目前已被用于肺病、血管病变、糖尿病及肝脏等相关疾病的实验研究[11-18]。有研究表明杖苷对NAFLD具有一定的疗效[19-20],本研究拟应用虎杖苷治疗由长期高脂饮食导致的NAFLD大鼠,深入探讨虎杖苷能否改善NAFLD大鼠IR状态及氧化应激水平。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 健康雄性SD大鼠47只,体重(160±20)g,SPF级,由解放军军事医学科学院实验动物中心提供[合格证号:SCXK-(军)2007-004]。

1.1.2 药物与试剂 虎杖苷(≥98%,HPLC,购自江苏泽朗医药科技有限公司,批号ZL20110815),双环醇(国药准字H20040467,批号:111210,规格:25 mg×18片,北京协和药厂)。高脂饲料由军事医学科学院配制提供(配方:10%猪油+2%胆固醇+88%标准饲料)。丙二醛(MDA)测定试剂盒(购于南京建成生物研究所,批号110715)、羟自由基(-OH)测定试剂盒(购于南京建成生物研究所,批号110715)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)试剂盒(购于南京建成生物研究所,批号110704)、胰岛素放免试剂盒(北京华英生物技术研究所,批号071226)、拜耳拜安易血糖试纸(军事医学科学院提供,CS774K)、肿瘤坏死因子α(TNF-α)ELISA试剂盒(军事医学科学院提供,批号:20100613)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立和分组 SD大鼠47只。正常喂养1周后,随机分为5组:正常组(10只)、模型组(10只)、虎杖苷大剂量组(9只)、虎杖苷小剂量组(9只)和双环醇组(9只),5组间大鼠体重差异无统计学意义($P>0.05$)。正常组予标准饲料,其他4组给予高脂饲料,造模期间实验动物自由饮水和进食,动物房保持安静,自然采光,温度25℃左右。共喂养10周后,从正常组与模型组中各随机挑选1只大鼠,取肝脏做病理切片,正常组大鼠肝脏切片作对照,以证实模型组大鼠NAFLD造模成功。

1.2.2 给药 正常组与模型组予以0.9%氯化钠灌胃,5 ml/次,虎杖苷大、小剂量组分别以200 mg/(kg·d)、100 mg/(kg·d)的虎杖苷混悬液灌胃,双环醇组以100 mg/(kg·d)的双环醇混悬液灌胃[21]。治疗持续4周,期间各组大鼠统一用标准饲料喂养。

1.2.3 血标本的采集与检测 治疗结束后,次日大鼠禁食12 h后,用10%戊巴比妥钠以0.35 ml/100 g浓度腹腔注射麻醉,腹主动脉取血5 ml,14℃,3 000 r/min离心10 min,分离血清。①试剂盒检测大鼠血清中氧化应激因子水平[丙二醛(MDA),总超氧化物歧化酶(T-SOD)、羟自由基(-OH)、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)及血清总抗氧化能力(T-AOC)水平];②试剂盒检测空腹血糖(FBG)、胰岛素(FINS)水平,计算IR指数(IRI)和胰岛素敏感指数(ISI);③采用ELISA法检测大鼠血TNF-α

水平。

1.3 统计学处理方法

应用 SPSS 15.0 软件进行单因素方差统计分析（ANOVA），数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。

2 结果

2.1 各组血清 MDA，T-SOD、-OH、GST 及 T-AOC 水平的比较

结果见表 1。

2.2 各组 FBG、FINS、ISI、IRI、TNF-α 水平的比较

结果见表 2。

3 讨论

有国外研究表明，在 NAFLD 的发生发展过程中，IR 贯穿始终，而由此诱发的诸多病理改变如脂质代谢失衡、脂质过氧化应激等等，其中氧化应激又与 IR 密切[7]，相关研究表明，过氧化应激可能是诱发以及加重 IR 的主要原因[8-10]。有学者认为，IR 是机体在细胞水平对 ROS 产生过多的一种生理防御性机制[4]：一方面，ROS 通过多种途径影响胰岛素信号传导通路导致 IR；另一方面，ROS 可以激活 IKK/NF-B 和 JNK 炎症信号传导通路，引起炎症因子（如 TNF-α 的释放并干扰胰岛素信号传导通路，释放 TNF-α 进一步诱导 ROS 并扩大炎症通路的开放，ROS-炎症-ROS 正反馈效应最终导致 IR 的发生发展[22]。故寻找具改善机体过氧化应激及 IR 的有效药物，是目前国内研究的热门话题。虎杖是治疗中医“胁痛”“黄疸”的常用药物，它具有降糖、抗炎、止血及保肝降脂作用[11-16]。虎杖苷作为虎杖的主要有效成分，目前已被用于肺病、血管病变、糖尿病及肝脏等相关疾病的实验研究[11-18]。故本研究选用虎杖苷对高脂饮食诱导脂肪肝大鼠模型所产生的 IR 以及大鼠机体过氧化应激状态进行实验探索。

依据本实验结果，我们发现喂养 14 周后（高脂饲料喂养 10 周，后 4 周改为标准饲料饲养），模型组与正常组比较，模型组大鼠的有害过氧化因子（MDA 及-OH）的血清水平升高（$P<0.01$），而抗氧化的保护性因子（T-SOD、GST T-AOC）的血清水平降低（$P<0.01$），血清 TNF-α 的生成水平升高（$P<0.01$），提示高脂饮食诱导的脂肪肝大鼠模型体内存在过氧化应激状态。研究还发现，模型组与正常组比较，模型组大鼠的血胰岛素水平显著增高（$P<0.01$），而 IRI 显著降低（$P<0.01$），提示模型组大鼠出现高胰岛素血症和 IR。而我们通过虎杖苷治疗 4 周后，发现虎杖苷可以有效改善 IR（$P<0.05$，<0.01），降低 FINS 和 FBG 水平（$P<0.05$，<0.01），提高 ISI（$P<0.05$，<0.01）。与此同时，各治疗组与模型组在过氧化应激状态的评价发现，通过虎杖苷、双环醇的治疗后，2 种药物均可以有效降低血清中的有害过氧化因子（MDA 及-OH）的生成水平（$P<0.05$，<0.01），提高过氧化保护性因子（T-SOD、GST 及 T-AOC）的生成水平（$P<0.05$，<0.01），降低血清 TNF-α 的生成水平（$P<0.05$，<0.01），从而起到抗氧化的药物效应。

表 1 各组血清 MDA、T-SOD、-OH、GST 及 T-AOC 水平的比较 $\bar{x}\pm s$

组别	n	MDA	T-SOD	GST	T-AOC	-OH
正常组	9	4.21±0.05$^{2)}$	167.95±9.05$^{2)}$	31.82±1.60$^{2)}$	2.10±0.10$^{2)}$	270.50±17.98$^{2)}$
模型组	9	9.07±0.71	83.68±3.28	19.93±0.99	1.01±0.28	327.20±11.56
虎杖苷大剂量组	9	6.39±0.58$^{1)}$	113.01±8.30$^{2)3)}$	27.31±1.54$^{1)}$	1.89±0.22$^{2)}$	298.60±12.33$^{1)}$
虎杖苷小剂量组	9	7.42±0.72$^{3)}$	94.85±7.78$^{4)}$	21.02±2.39	1.37±0.13$^{1)3)}$	302.90±16.15$^{1)}$
双环醇组	9	5.28±0.40$^{2)}$	135.67±5.49$^{2)}$	25.05±1.98$^{2)}$	1.81±0.17$^{2)}$	292.78±11.73$^{2)}$

与模型组比较，$^{1)}P<0.05$，$^{2)}P<0.01$；与双环醇组比较，$^{3)}P<0.05$。

表 2 各组 FBG、FINS、ISI、IRI、TNF-α 水平的比较 $\bar{x}\pm s$

组别	n	FBG/(mmol·L^{-1})	FINS/(U·ml^{-1})	IRI	ISI	TNF-α/(U·ml^{-1})
正常组	9	4.23±0.48$^{2)}$	14.83±2.65$^{2)}$	2.76±0.55$^{2)}$	0.016±0.004$^{2)}$	300.708±11.304$^{2)}$
模型组	9	5.72±0.35	26.67±2.73	6.77±0.66	0.006±0.001	412.045±15.857
虎杖苷大剂量组	9	4.81±0.26$^{1)3)}$	17.97±3.14$^{1)3)}$	3.93±0.72$^{2)3)}$	0.016±0.004$^{2)3)}$	349.990±26.750$^{2)3)}$
虎杖苷小剂量组	9	5.23±0.25	22.63±2.44	5.03±0.64$^{1)}$	0.011±0.002	389.680±13.790$^{1)4)}$
双环醇组	9	6.39±1.80	22.94±2.50$^{1)}$	6.46±1.52	0.007±0.001	325.314±8.533$^{2)}$

与模型组比较、[1] $P<0.05$，[2] $P<0.01$；与双环醇组比较，[3] $P<0.05$，[4] $P<0.01$。

依据本研究结果显示，虎杖苷治疗后IR模型大鼠的氧化应激状态和血清TNF-α水平的负面变化，结合有关文献对IR与过氧化应激的病理机制，我们认为虎杖苷改善IR的治疗效果部分可能来源于其抗氧化效应。

参考文献

[1] 张声生．非酒精性脂肪性肝病中医诊疗共识意见(2009，深圳)[C]．中国中西医结合消化杂志，2010，18(4)：276－279.

[2] 范建高．非酒精性脂肪肝的临床流行病学研究[J]．中华消化杂志，2002，22(2)：106－107.

[3] YAO H T，CHANG Y W，LAN S J，et al. The inhibitory effect of Polyunsaturated fatty acids on human CYP enzymes[J]. Life Sci，2006，79：2432－2440.

[4] MARSHALL J C. The gut as a potential trigger of exercise-induced inflammatory responses[J]. Can J Physiol Pharmacol，1998，76：479－484.

[5] ENOMOTO N，ILEJIMA K，BRADFORD B U，et al. Role of Kupffer cells and gut-derived endotoxins inalcoholic liver injury[J]. J Gastroenterol Hepatol，2000，15(Suppl)：D20－D25.

[6] DAY C P. Non-alcoholic steatohepatitis (NASH)：where are we now and where are we going? [J]. Gut，2002，50：585－588.

[7] WITTMANN I，NAGY J. Are insulin resistance and atherosclerosis the consequences of oxidative stress [J]. Diabetologia，1996，39：1002－1003.

[8] HOUSTIS N，Rosen E D，LANDER E S. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. [J]. Nature，2006，440(7086)：944－948.

[9] ERIKSSON J W. Metabolic stress in insulin's target cells leads to ROS accumulation-a hypothetical common pathway causing insulin resistance. [J]. FEBS Lett，2007，581：3734－3742.

[10] FRIDLYAND L E，PHILIPSON L H. Reactive species and early manifestation of insulin resistance in type 2 diabetes. [J]. Diabetes Obes Metab，2006，8：136－145.

[11] 张 煜，丘 芬，金 钊，等．虎杖酒制品抗炎镇痛作用研究[J]．辽宁中医杂志，2012，39(11)：2293－2295.

[12] 贾玉梅，王君明，崔 瑛．基于二苯乙烯类为主要活性成分的虎杖药理作用研究进展[J]．中国实验方剂学杂志，2011，17(9)：263－269.

[13] 王月刚，金春华，黄海潇，等．虎杖苷对烧伤血清和LPS作用下大鼠平滑肌细胞蛋白激酶C活性的影响[J]．第四军医大学学报，2006，27(21)：1960－1962.

[14] 王月刚，金春华，黄海潇，等．虎杖苷对缺血缺氧下平滑肌细胞蛋白激酶C的影响[J]．中国药理学通报，2005，21(4)：461－464.

[15] 郭胜蓝，孙莉莎，欧阳石，等．虎杖苷对大鼠急性脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]．时珍国医国药，2005，16(5)：414－416.

[16] 王鸣慧，牛雯颖，韩翠翠，等．虎杖不同提取物对急性血瘀大鼠血液流变学的影响[J]．中医药信息，2010，27(5)：27－29.

[17] 杨 玲，邱丽君，周 琪，等．虎杖对栓塞性肺动脉高压动物的作用[J]．中国血液流变学杂志，2008，18(1)：24－26.

[18] 王 萌，李志超，王剑波．虎杖苷对低氧所致大鼠肺微血管内皮细胞损伤的保护作用[J]．西北药学杂志，2011，26(3)：185－189.

[19] 张 霖，陈育尧，孙学刚，等．虎杖苷对非酒精性脂肪肝大鼠保护作用及机制研究[J]．陕西中医，2010，31(6)：756－758.

[20] 张 霖，吕志平．虎杖苷对非酒精性脂肪肝大鼠胰岛素抵抗和血清肿瘤坏死因子影响的实验研究[J]．时珍国医国药，2010，21(4)：1007－1008.

[21] 莫成林，李 烨，李 燕．双环醇对小鼠慢性酒精性肝损伤的保护作用[J]．中华医学杂志，2005，85(48)：3409－3413.

[22] MOSJOLAWA T，KUKIDOME D，SONODA K，et al. Impact of mitochondrial RDS production in the pathogenesis of insulin resistance. [J]. Diabetes Res Clin Pract，2007，77(Suppl 1)：161－164.

作者须知

本刊已正式使用具有网上投稿、网上审稿、网上查询及在线编辑等功能的现代化稿件远程处理系统。请作者登陆本刊采编平台网站：zgzxy. cnjournals. net，在作者投稿区进行投稿。

《中国中西医结合消化杂志》编辑部