

中图分类号: R932; R589

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2023)04-0035-04

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.04.008



柯孜木克颗粒对代谢综合征模型大鼠炎症状态的影响*

马丽娜·阿新拜¹, 陈阳¹, 梅拉·哈万¹, 库丽夏西·马尼², 古丽加娜·奴尔包拉提¹, 兰卫^{1△}

(1. 新疆医科大学中医学院, 新疆 乌鲁木齐 830000; 2. 新疆阿勒泰地区哈萨克医医院, 新疆 阿勒泰 836300)

摘要:目的 探讨柯孜木克颗粒(KZMK)对代谢综合征(MetS)模型大鼠炎症状态的影响。方法 将36只SD大鼠随机分为正常组(等体积生理盐水),模型组(等体积生理盐水),KZMK高、中、低剂量组(70.38, 35.19, 17.6 mg/kg)及二甲双胍组(3 mg/kg),各6只。正常组大鼠饲以普通饲料,其余组饲以高盐高脂高糖饲料12周,以复制MetS大鼠模型。喂饲8周后,6组大鼠灌胃给予相应药物或生理盐水,每日1次,连续4周。采用苏木素-伊红染色,观察大鼠肝脏组织病理形态;采用酶联免疫吸附(ELISA)法检测大鼠血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平;采用免疫组织化学法检测大鼠肝脏组织核因子 κ B(NF- κ B)表达水平。结果 模型组大鼠肝小叶结构不清晰,肝细胞松散、肿胀、紊乱,炎性细胞浸润;KZMK各剂量组上述病理形态均有所改善。与模型组比较,KZMK各剂量组大鼠血清TNF- α 水平均显著降低($P < 0.05$);KZMK各剂量组肝脏组织NF- κ B表达水平均显著降低($P < 0.05$)。结论 KZMK对MetS模型大鼠肝脏组织病理形态有一定的改善作用,作用机制可能与抑制NF- κ B的活化,减轻炎症状态有关。

关键词:柯孜木克颗粒;代谢综合征;炎症状态;细胞因子;大鼠

Effect of Kezimuke Granules on Inflammatory State in Model Rats with Metabolic Syndrome

Malina AXINBAI¹, CHEN Yang¹, Meila HAWAN¹, Kulixiaxi MAN², Gulijana NUERBAOLATI¹, LAN Wei¹

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, China 830000; 2. Kazak Medical Hospital of Altay, Altay, Xinjiang, China 836300)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of Kezimuke Granules (KZMK) on inflammatory state in rats with metabolic syndrome (MetS). **Methods** Thirty-six SD rats were randomly divided into normal group (equal volume of normal saline), model group (equal volume of normal saline), KZMK high-, medium- and low-dose groups (70.38, 35.19, 17.6 mg/kg) and metformin group (3 mg/kg), with six rats in each group. The rats in the normal group were fed with normal diet, and the rats in the other groups were fed with high-salt, high-fat and high-sugar diet for 12 weeks to replicate the MetS rat model. After eight weeks of feeding, rats in six groups were given corresponding drugs or normal saline by gavage once a day for four weeks. The histopathological morphology of liver were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The serum level of tumor necrosis factor- α (TNF- α) was detected by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression level of nuclear factor- κ B (NF- κ B) in rat liver tissue was detected by the immunohistochemistry. **Results** In the model group, the structure of the hepatic lobule was not clear, the hepatocytes were loose, swollen and disorganized with inflammatory cell infiltration. However, the above pathological morphology was improved in KZMK high-, medium- and low-dose groups. Compared with those in the model group, the serum TNF- α level decreased significantly in KZMK high-, medium- and low-dose groups ($P < 0.05$), the expression level of NF- κ B in liver tissue decreased significantly in KZMK high-, medium- and low-dose groups ($P < 0.05$). **Conclusion** KZMK show some ameliorative effect on the histopathological changes of the liver in MetS model rats, and its mechanism may be related to inhibiting the activation of NF- κ B and reducing the inflammatory state.

Key words: Kezimuke Granules; metabolic syndrome; inflammatory state; cell factor; rats

世界卫生组织于1998年首次定义代谢综合征(MetS)^[1],并将胰岛素抵抗(IR)、肥胖、血脂异常和高血压联系起来。MetS与表现为慢性低度炎症状态的2型糖尿病、非酒精性脂肪性肝病、心肌梗死和中风的风险增加有关,其为全球性健康问题,是全世界心脑血管病发病率和死亡率攀升的主要原因。MetS具有腹型肥胖和IR这2个主要临床特征,而IR作为核心发病机制,与其他代谢危险因子的增加密切相关^[2]。IR是慢性亚临床

炎症过程,相互影响的胰岛素信号通路和炎症信号通路共同构成了IR复杂的机制网络。因此,IR和炎症反应是MetS的核心机制。柯孜木克颗粒(以下简称KZMK)由沙生蜡菊、黑果越橘、木贼组成,是哈萨克族民间经验方。有研究证实,KZMK能明显改善模型小鼠急性慢性炎症,抑制内源性介质前列腺素 E_2 及5-羟色胺的释放^[3-4]。本研究中采用高盐高糖高脂饲料喂养雄性SD大鼠以建立Mets模型,探讨KZMK减轻炎症反应的

*基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金[2018D01C152]。

第一作者:马丽娜·阿新拜,女,哈萨克族,硕士,讲师,研究方向为代谢综合征的中医诊疗,(电子信箱)malina1988@163.com。

△通信作者:兰卫,男,汉族,博士,教授,研究方向为中药药剂学,(电子信箱)641059126@qq.com。

作用及机制,为该制剂改善 MetS 提供理论证据。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与动物

仪器: Eppendorf 5417R 型台式低温高速离心机(Eppendorf 中国有限公司); LEICA RM2135 型石蜡切片机(德国 Leica 公司); BX53 型光学显微镜(日本 Olympus 公司); Olympus IX71 型倒置荧光显微镜(苏州景通仪器有限公司)。

试剂: KZMK(新疆阿勒泰地区哈萨克医医院药房,组方: 沙生蜡菊 384 g、黑果越橘 115 g、木贼 192 g)。盐酸二甲双胍片(北京索莱宝科技有限公司,批号为 404I021,纯度 $\geq 98.0\%$); 高盐高脂高糖饲料(江苏美迪森生物医药有限公司,成分为 0.5% 胆盐、5% 食用盐、10% 果糖、10% 奶粉、2% 胆固醇、10% 蛋黄粉、10% 熟猪油、52.5% 基础饲料,批号为 MD1203); 核因子 κB (NF- κB) P65 抗体(美国 Affinity Biosciences 公司,批号为 DF7003); SP 超敏免疫组化试剂盒(兔 SP 试剂盒,北京中杉金桥生物技术有限公司,批号为 SP9001); 肿瘤坏死因子(TNF- α) 酶联免疫(ELISA)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号为 ml077385); 苏木素-伊红(HE)染液(武汉 Servicebio 公司,批号为 G1005)。

动物: SD 大鼠,雄性,6~8 周龄,体质量(180 ± 20)g,由新疆医科大学动物实验中心提供,实验动物使用许可证号 SYXK(新)2018-0003。于新疆医科大学动物房饲养,自由饮水,温度 $19 \sim 24\text{ }^{\circ}\text{C}$,相对湿度 60%~70%,12 h 交替光照,适应性喂养 1 周。

1.2 方法

1.2.1 分组与建模

将 36 只 SD 大鼠随机分为正常组(等体积生理盐水),模型组(等体积生理盐水),KZMK 高、中、低剂量组(70.38,35.19,17.6 mg/kg),以及二甲双胍组(3 mg/kg),各 6 只。正常组饲以普通饲料,其余组均饲以高盐高脂高糖饲料^[5-6]12 周,以建立 MetS 大鼠模型。8 周后,各组大鼠灌胃给予相应药物或生理盐水(灌胃体积 10 mg/kg),每日 1 次,连续 4 周。末次给药后 12 h 禁食不禁饮,腹腔注射 10% 水合氯醛溶液以麻醉大鼠,腹主动脉取血 5 mL,静置 1 h 后, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3000 r/min 离心 15 min,分离上层血清。

1.2.2 观察指标

血清 TNF- α 水平: 取大鼠血清,采用 ELISA 法检测,严格按相应试剂盒说明书操作。

肝脏组织病理形态: 取大鼠肝脏,在距离边缘 1.0 cm 处切取肝组织($0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm} \times 1.0\text{ cm}$),置 4% 多聚甲醛溶液; 剩余肝组织切成若干块,用冻存管-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。取多聚甲醛溶液中保存的肝组织,常规脱水,

石蜡包埋后,采用石蜡切片机连续切 4 μm 厚片。脱蜡,HE 染色后以中性树胶(50 μL)封片,显微镜下观察并拍照。

NF- κB 表达水平: 采用免疫组织化学法。取大鼠肝脏组织,固定,脱水,切片,滴加兔抗大鼠 NF- κB p65 抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,再滴加二抗,DAB 显色、贴片、脱水、透明、封片,在倒置荧光显微镜下观察并拍照; 采用 Image-Pro Plus 6.0 软件进行图像分析,测定平均光密度值。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计学软件分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,以 $LSD-t$ 检验进行多重比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠肝脏组织病理形态

正常组大鼠的肝脏组织形态正常,特点是肝小叶结构完整清晰,肝细胞索整齐,无肿胀和炎性细胞浸润。模型组大鼠肝小叶结构不清晰,肝细胞松散、肿胀、紊乱,肝脏脂肪变性明显,炎性细胞浸润。KZMK 低剂量组大鼠肝小叶略微完整,肝细胞肿胀较少,炎性细胞浸润较少; KZMK 中剂量组大鼠的肝小叶结构较模型组明显改善,肝细胞肿胀减少; KZMK 高剂量组大鼠肝小叶结构清晰完整,肝细胞索有序,无明显肝细胞肿胀。二甲双胍组肝组织形态介于模型组与 KZMK 各剂量组之间,脂肪变性少见。详见图 1。

2.2 大鼠血清 TNF- α 水平

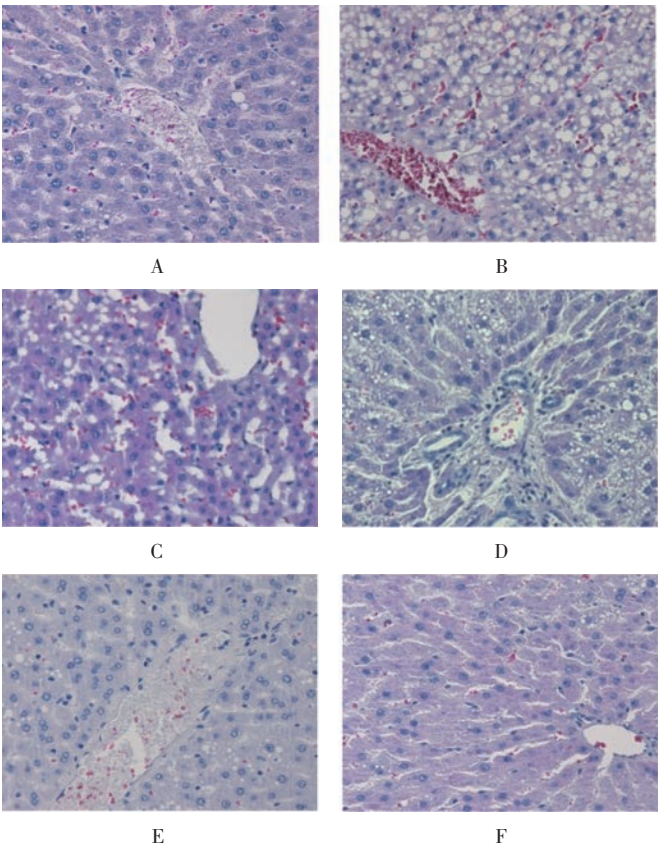
实验结束时,各组所剩大鼠只数不一。与正常组比较,模型组大鼠血清 TNF- α 水平有所升高; 与模型组比较,KZMK 各剂量组大鼠血清 TNF- α 水平均显著降低($P < 0.05$)。详见表 1。

2.3 大鼠肝脏组织 NF- κB 表达水平

与正常组比较,模型组大鼠肝脏组织 NF- κB 表达水平显著升高($P < 0.05$)。与模型组比较,KZMK 各剂量组 NF- κB 表达水平均显著降低($P < 0.05$)。详见表 1。

3 讨论

据估计,全世界有 20%~30% 成年人患有 MetS^[7],且发病年龄趋于年轻化。近年来,我国的 MetS 患病率(19.58%~33.9%)与世界水平持平^[8]。现代社会以久坐的生活方式为特点,加之人们缺乏体育活动,尤其是饮食习惯的改变,导致 MetS 的发病率不断上升^[9]。因此,MetS 的预防和治疗至关重要。MetS 是多系统病理生理过程的集合体,而不是单一的疾病实体,它是由环境因素、遗传因素及慢性全身性炎症状态相互作用引发的一组临床症候群^[10]。具体而言,存在腰围增加、高甘油三酯血症($> 150\text{ mg/dL}$ 或已开始药物治疗)、低高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)血症($< 40\text{ mg/dL}$ 或已开始药物治疗)、血压升高(收缩压 $> 130\text{ mmHg}$ 和/或舒张压 $> 85\text{ mmHg}$,



A. 正常组 B. 模型组 C. 二甲双胍组 D. KZMK 低剂量组
E. KZMK 中剂量组 F. KZMK 高剂量组

图1 大鼠肝脏组织病理形态(HE, ×200)

A. Normal group B. Model group C. Metformin group D. KZMK low-dose group E. KZMK medium-dose group F. KZMK high-dose group

Fig. 1 Histopathological morphology of liver in rats (HE, ×200)

表1 各组大鼠血清TNF-α及肝脏组织NF-κB水平比较(̄X ± s)

Tab. 1 Comparison of TNF-α level in serum and NF-κB level in liver tissue of rats in each group (̄X ± s)

组别	剂量(mg/kg)	TNF-α(ng/mL)	NF-κB
正常组(n=6)		0.63 ± 0.01	136.53 ± 13.53
模型组(n=3)		0.67 ± 0.02	152.49 ± 10.82*
二甲双胍组(n=4)	3.0	0.63 ± 0.03	137.56 ± 6.36
KZMK低剂量组(n=6)	17.6	0.57 ± 0.07*	137.54 ± 2.94*
KZMK中剂量组(n=5)	35.19	0.60 ± 0.06*	137.32 ± 7.12*
KZMK高剂量组(n=5)	70.38	0.56 ± 0.04*	137.17 ± 13.74*
F值		8.559	1.281
P值		0.019	0.306

注:与正常组比较,*P < 0.05;与模型组比较,*P < 0.05。

Note: Compared with those in the normal group,*P < 0.05; Compared with those in the model group,*P < 0.05.

或已开始抗高血压治疗)、空腹血糖升高(>100 mg/dL或已开始药物治疗)中的3个因素即为MetS^[11]。

MetS的组分共同增加了罹患心血管疾病、2型糖尿病、脂肪肝变性和肥胖相关癌症等疾病的风险。同时

MetS是全身性系统性的低度炎症状态。因此,慢性全身炎症状态与MetS相关,且起着介导IR的作用^[12]。脂肪细胞中的脂肪组织由于脂质大量积累而不断肥大,由于组织和细胞应激及缺氧,从而引起脂肪细胞坏死,同时巨噬细胞浸润,分泌TNF-α、白细胞介素(IL)-6等促炎性介质,其引发的局部炎症会扩散成全身炎症^[12],同时诱导脂肪细胞和周围组织中的IR^[13]。总而言之,当机体出现MetS时,TNF-α、IL-6等炎症因子水平可能会相应升高^[14]。前期研究证实以高盐高脂高糖饲料喂养SD大鼠8周可复制MetS大鼠模型,该模型存在明显的IR、糖脂代谢紊乱,在病因学、全身疾病背景方面均与人类MetS发病极为相似,是研究MetS发病机制较理想的一种动物模型。同时,早期监测TNF-α等炎症因子水平,能及早发现并干预MetS及相关系统性疾病^[15]。本研究中发现,与模型组相比,KZMK各剂量组大鼠肝组织肝小叶结构改善,肝细胞肿胀程度减轻,炎性细胞浸润减少,脂肪泡减少,说明KZMK能改善MetS模型大鼠肝脏组织病理形态;与模型组比较,KZMK各剂量组血清TNF-α水平均显著降低,说明KZMK能降低MetS模型大鼠炎症因子水平,改善其炎症状态。

MetS的特点是慢性低度炎症状态,其起因是各种炎症信号通路的激活,导致NF-κB、Jun N-末端激酶和炎症小体的激活,这些通路汇聚到一起,减少胰岛素信号转导,并在代谢组织中诱导炎症反应。激活的NF-κB进入细胞核后,与炎症基因的转录起始区进行特异性结合,启动转录,介导TNF-α、IL-1等炎症因子的释放^[16]。NF-κB信号可诱导大量炎症趋化因子、细胞因子的产生,由此形成低度炎症环境。NF-κB的活化对TNF-α、IL-1、IL-1β、IL-6等炎症因子的产生是必需的,NF-κB激活后,促进上述因子转录,使其大量合成并加速分泌。同时TNF-α又使NF-κB活化,活化后的NF-κB进入细胞核,如此往复,加剧组织和细胞的炎症损伤^[17]。因此,对于MetS的防治,炎症启动因素的控制及炎症因子之间平衡的恢复至关重要^[18]。抑制NF-κB的活化或降低NF-κB水平很可能有助于改善MetS炎症状态。本研究中,与模型组比较,各给药组大鼠肝组织NF-κB表达水平均降低,即发挥了抑制NF-κB活化的作用,在一定程度上抑制MetS模型大鼠炎症反应,有利于MetS的防治。

MetS的最佳治疗方法是改变生活方式,但对患者来说难度较大,故还需配合药物治疗。西医主要使用胰岛素增敏剂、他汀类药物、肾素-血管紧张素系统(RAS)受体阻滞剂等,常见副作用包括体质量增加、胰岛素敏感性降低、体液潴留、影响骨骼等。中医药方面,柴芪汤^[7,19-20]、小柴胡汤^[21]、黄连温胆汤^[22]等均为长

期用于临床治疗 MetS 的方剂。KZMK 中沙生蜡菊盛产于新疆,杨金香等^[23]研究发现,其中的芹菜素可作用于不同信号通路,抑制 TNF- α 、IL-6 等炎症因子的产生,进而减轻肝脏炎性病变;黑果越橘属新疆特色药材,其能增强胰岛素敏感性,激活肝脏—磷酸腺苷(AMP)依赖性蛋白激酶,抑制葡萄糖产生,进而改善 IR^[24];木贼别名接骨草,姜秀娟等^[25]发现其能减轻非酒精性脂肪性肝病大鼠肝细胞炎性反应,改善其肝脏功能。综上所述,KZMK 能通过抑制 NF- κ B 的活化,减少 TNF- α 的产生,改善炎症状态及肝组织病变程度,有利于 MetS 的防治。

本研究中,KZMK 在一定程度上可改善 MetS 模型大鼠肝脏组织肝小叶结构,缓解肝细胞肿胀,减少炎症细胞浸润,进而改善肝脏组织病理形态。同时对 MetS 模型大鼠肝脏组织中 NF- κ B 的活化有一定的抑制作用。本研究为 KZMK 用于 MetS 的防治提供了理论证据。下一步将加大样本量、延长用药疗程进一步研究该药的治疗机制。

参考文献

- [1] ALBERTI KG, ZIMMET PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation[J]. Diabet Med, 1998, 15(7): 539-553.
- [2] LANN D, LEROITH D. Insulin resistance as the underlying cause for the metabolic syndrome[J]. Med Clin N Am, 2007, 91(6): 1063-1077.
- [3] 阿斯亚·拜山伯, 库丽夏西·马尼, 白杰, 等. 新疆哈萨克族传统医药柯孜木克颗粒的急性毒性及抗炎作用研究[J]. 新疆中医药, 2007, 25(6): 28-31.
- [4] 库丽夏西·马尼, 古丽沙尼·再然, 阿斯亚·拜山伯. 哈萨克民药柯孜木克颗粒的抗炎作用机制研究[J]. 中国社区医师(医学专业), 2012, 14(18): 5-6.
- [5] 何勇, 陈晓雯. 代谢综合征动物诱发模型的研究进展[J]. 江西中医学院学报, 2009, 21(3): 92-94.
- [6] 李建生, 赵敏, 余海滨, 等. 代谢综合征大鼠模型的建立与评价及增龄因素的影响[J]. 中国老年学杂志, 2005, 25(12): 1490-1492.
- [7] PRASUN P. Mitochondrial dysfunction in metabolic syndrome[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2020, 1866(10): 165838.
- [8] 郭海健, 念馨, 梁友芳, 等. 基于多中心横断面调查的中国人群代谢综合征的流行情况及危险因素[J]. 中华疾病控制杂志, 2019, 23(7): 796-801.
- [9] EMAMIAN MH, HASHEMI H, FOTOUHI A. Predicted 10-year risk of cardiovascular disease in the islamic republic of iran and the body mass index paradox[J]. East Mediterr Health J, 2020, 26(12): 1465-1472.
- [10] 付雨, 兰丽珍. 代谢综合征患者血清肿瘤坏死因子- α 的水平及意义[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(43): 145-146.
- [11] ALBERTI KG, ECKEL RH, GRUNDY SM, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: A joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the study of Obesity[J]. Circulation, 2009, 120(16): 1640-1645.
- [12] ENGIN A. The pathogenesis of obesity-associated adipose tissue inflammation[J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 960: 221-245.
- [13] SOUMAYA K. Molecular mechanisms of insulin resistance in diabetes[J]. Adv Exp Med Biol, 2012, 771: 240-251.
- [14] GRUNDY SM, BREWER JR HB, CLEEMAN JI, et al. Definition of metabolic syndrome: Report of the national heart, lung, and blood institute / american heart association conference on scientific issues related to definition[J]. Circulation, 2004, 109(3): 433-438.
- [15] 张立平, 刘晶, 王颖. 健脾疏肝法防治代谢综合征时机的探讨[J]. 北京中医药大学学报, 2011, 34(9): 617-622.
- [16] LI Q, VERMA IM. NF- κ B regulation in the immune system[J]. Nat Rev Immunol, 2002, 2(10): 725-734.
- [17] GARBOSSA SG, FOLLI F. Vitamin D, sub-inflammation and insulin resistance. A window on a potential role for the interaction between bone and glucose metabolism[J]. Rev Endocr Metab Disord, 2017, 18(2): 243-258.
- [18] 张继红, 丁永红, 石孟琼, 等. 火麻仁油对代谢综合征大鼠 NF- κ B/MCP-1/CCR2 信号通路及促炎因子表达影响[J]. 中药药理与临床, 2018, 34(4): 117-122.
- [19] 王颖, 张立平, 孙宏峰. 柴芪汤治疗肝郁脾虚型代谢综合征患者临床疗效观察[J]. 天津中医药, 2021, 38(9): 1133-1137.
- [20] 聂玮, 张立平, 杜因鹏. 中青年人群中代谢综合征中医证候特点研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2018, 27(2): 115-118.
- [21] 刘凯利, 阮君, 尚浩南, 等. 小柴胡汤和解少阳枢机不利防治代谢综合征组分疾病[J]. 现代中西医结合杂志, 2021, 30(22): 2496-2500.
- [22] 刘莉, 李卫忠, 邹国良, 等. 黄连温胆汤治疗代谢综合征研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(17): 190-196.
- [23] 杨金香, 朱妍妍, 李鸿晔, 等. 基于系统药理学分析沙生蜡菊治疗 II 型糖尿病的活性成分预测及机制研究[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2021, 39(2): 240-251.
- [24] TAKIKAWA M, INOUE S, HORIO F, et al. Dietary anthocyanin-rich bilberry extract ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity via activation of AMP-activated protein kinase in diabetic mice[J]. J Nutr, 2010, 140(3): 527-533.
- [25] 姜秀娟, 王旭辉, 丁晓猛, 等. 木贼对食饵性脂肪肝大鼠肝细胞增殖与凋亡的影响[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(5): 1163-1164.

(收稿日期: 2022-05-10; 修回日期: 2022-09-17)