

富硒灵芝粗提物对2型糖尿病模型大鼠脂代谢、肝功能及炎症反应的改善作用研究^Δ

杨丹阳^{1*}, 姜涛¹, 周径², 张雪杨³ (1. 四川中医药高等专科学校临床医学院, 四川 绵阳 621000; 2. 绵阳市中心医院内分泌科, 四川 绵阳 621000; 3. 大连医科大学基础教研室, 辽宁 大连 116027)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)03-0364-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.03.17

摘要 目的: 研究富硒灵芝粗提物对2型糖尿病(T2DM)模型大鼠脂代谢、肝功能及炎症反应的改善作用。方法: 将120只大鼠随机分为正常对照组($n=20$, 生理盐水)和造模组($n=100$)。正常对照组大鼠喂养普通饲料, 造模组大鼠喂养高脂饲料。4周后, 造模组大鼠腹腔注射链脲佐菌素溶液(30 mg/kg)复制T2DM模型。将造模成功的90只大鼠再次随机分为模型对照组(生理盐水)、阳性对照组(二甲双胍, 200 mg/kg)和富硒灵芝粗提物低、中、高剂量组(300、600、1 200 mg/kg, 以提取物计), 每组18只。灌胃给药, 每天1次, 每周周一至周六给药。分别于给药4、8周后各组均取一半大鼠, 检测其血清中葡萄糖、胰岛素水平, 并计算胰岛抵抗指数; 采用酶联免疫吸附法检测其血清中肝功能指标[天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT)、碱性磷酸酶(AKP)]、血脂指标[游离脂肪酸(FFA)、总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)]和炎症因子[肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素6(IL-6)、IL-1 β]水平; 苏木精-伊红染色后, 通过显微镜观察其肝组织病理学变化; 并分别采用实时荧光定量-聚合酶链式反应法和Western blot法检测其肝组织中过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPAR α)、过氧化物酶酰基辅酶A氧化酶1(ACOX1)的mRNA和蛋白表达水平。结果: 与正常对照组比较, 模型对照组大鼠在给药4、8周后血清中葡萄糖、胰岛素含量显著增加($P<0.01$), 胰岛素抵抗指数显著升高($P<0.01$); 血清中肝功能指标、血脂指标和炎症因子水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 肝细胞肿胀呈圆形, 且体积较正常对照组明显增大, 肝脏有不同程度的脂肪变性及空泡样变, 并伴有少量炎细胞浸润现象; 肝组织中PPAR α 、ACOX1的mRNA和蛋白表达水平显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型对照组比较, 除富硒灵芝粗提物低剂量组大鼠给药4周后的胰岛素抵抗指数和血清中AST、ALT、IL-6、IL-1 β 水平以及给药8周后血清中葡萄糖、胰岛素、ALT水平和给药4、8周后4个血脂指标水平降低不显著外($P>0.05$), 其余各组大鼠在给药4、8周后上述血清指标水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 给药4、8周后大鼠肝组织病理学变化不同程度减轻; 各给药组大鼠给药4、8周后肝组织中PPAR α 、ACOX1的蛋白和mRNA表达水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论: 富硒灵芝粗提物可上调肝组织中PPAR α 和ACOX1蛋白和mRNA的表达, 促进蓄积的脂肪酸排出, 明显改善T2DM模型大鼠脂肪酸代谢、炎症反应和肝功能。

关键词 富硒灵芝粗提物; 2型糖尿病; 过氧化物酶体增殖物激活受体 α ; 过氧化物酶酰基辅酶A氧化酶1; 大鼠

Study on Improvement Effect of Selenium-enriched *Ganoderma lucidum* Crude Extract on Lipid Metabolism, Liver Function and Inflammatory Response in Type 2 Diabetic Model Rats and Its Mechanism

YANG Danyang¹, JIANG Tao¹, ZHOU Jing², ZHANG Xueyang³ (1. Clinical Medical College, Sichuan College of Traditional Chinese Medicine, Sichuan Mianyang 621000, China; 2. Dept. of Endocrine, Mianyang Hospital of TCM, Sichuan Mianyang 621000, China; 3. Basic Teaching and Research Department, Dalian Medical University, Liaoning Dalian 116027, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of selenium-enriched *Ganoderma lucidum* crude extract on lipid metabolism, liver function and inflammatory response in type 2 diabetic model rats. METHODS: Totally 120 rats were randomly divided into normal control group ($n=20$, normal saline) and model group ($n=100$). Normal control group was fed with normal diet, and model group was fed with high-fat diet. 4 weeks later, model group was given intraperitoneal injection of Streptozotocin solution (30 mg/kg) to induce T2DM model. After modeling, 90 rats were randomly subdivided into model control group (normal saline), positive control group (metformin, 200 mg/kg) and selenium-enriched *G. lucidum* crude extract low-dose, medium-dose and high-dose groups (300, 600, 1 200 mg/kg, calculated by extract), with 18 rats in each group. They were given medicine intragastrically, once a day, from Monday to Saturday. Half of rats in each group were selected 4, 8 weeks after medication; the serum levels of glucose and insulin were detected, and islet resistance index were calculated. The serum levels of liver function indexes (AST, ALT, AKP), blood lipid indexes (FFA, TC, TG, LDL-C) and inflammatory factors (TNF- α , IL-6, IL-1 β) were

^Δ 基金项目: 辽宁省自然科学基金资助项目(No.20150311)

* 讲师。研究方向: 内科学。E-mail: 434740561@qq.com

detected by ELISA. After HE staining, the histopathological changes of liver tissue were observed by microscopy. mRNA

and protein expressions of peroxisome proliferator activated receptor α (PPAR α) and peroxidase acyl coenzyme A oxidase 1 (ACOX1) in liver tissue were detected by RT-qPCR and Western blot assay. RESULTS: Compared with normal control group, glucose, insulin serum levels and islet resistance index were significantly increased ($P<0.01$); serum liver function indexes, blood lipid indexes and inflammatory factor levels of model control group were increased significantly in model control group after 4 and 8 weeks medication ($P<0.05$ or $P<0.01$). The hepatocyte swelling of model control group was round and the volume was significantly larger than that of blank control group. The liver had different degrees of steatosis and vacuolization, accompanied by a small amount of inflammatory cell infiltration. mRNA and protein expressions of PPAR α and ACOX1 in liver tissue were decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with model control group, except that there was no significant decreased in islet resistance index and AST, ALT, IL-6, IL-1 β serum levels after 4 weeks of medication, and glucose, insulin, ALT serum levels after 8 weeks of medication and the levels of 4 blood lipid indexes after 4 and 8 weeks of medication in selenium-enriched *G. lucidum* crude extract low-dose group ($P>0.05$), above serum indexes of other groups were decreased significantly after 4 and 8 weeks of medication ($P<0.05$ or $P<0.01$). After 4 and 8 weeks of medication, the pathological changes of liver tissue in rats were alleviated in varying degrees. protein and mRNA expressions of PPAR α and ACOX1 in liver tissue were increased significantly after 4 and 8 weeks of medication ($P<0.05$ or $P<0.01$). CONCLUSIONS: Selenium-enriched *G. lucidum* crude extract can up-regulate protein and mRNA expressions of PPAR α and ACOX1 in liver tissue, promote the excretion of accumulated fatty acid and significantly improve fatty acid metabolism, inflammatory response and liver function in T2DM model rats.

KEYWORDS Selenium-enriched *Ganoderma lucidum* crude extract; Type 2 diabetes mellitus; Peroxisome proliferator activated receptor α ; Peroxidase acyl coenzyme A oxidase 1; Rat

糖尿病(Diabetes mellitus, DM)是一种全球性疾病,其发病率呈显著上升趋势,其中2型糖尿病(T2DM)占总发病数的80%以上^[1-2]。T2DM的发病机制非常复杂,与肝损伤、肥胖、高血脂、炎症、胰岛素抵抗等因素均有一定关系,且随着病程的进展,最终会导致机体脂质代谢的紊乱,而过多的脂类沉积会使肝脏负荷过重,引发相关并发症。灵芝是我国中医药宝库中的珍品,具有抗癌、保肝解毒、软化血管、抗衰老的作用^[3]。硒是人体中谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的组成成分,是人体必需的微量元素。灵芝对硒具有高度的富集作用,用富硒水来灌溉灵芝,可明显增加灵芝中硒的含量^[4]。富硒灵芝是以灵芝作为硒的转化载体培养获得的,其兼具灵芝与硒的生物活性。据文献报道,富硒灵芝能有效提高机体免疫力,并且具有降血脂、抗肿瘤、抗氧化、抗衰老等作用^[5-7],可明显改善高脂饮食诱导的非酒精性脂肪肝大鼠的症状,调节固醇调节原件结合蛋白1c(Sterol regulatory binding proteins-1c, SREBP-1c)及乙酰辅酶A羧化酶 α (Acetyl-CoA carboxylase α , ACC α)表达^[8],对非酒精性脂肪肝具有一定的防治作用。但是,目前国内外均未报道其是否具有治疗DM的作用。

真核细胞的脂肪酸 β -氧化是由线粒体和过氧化物酶体共同完成的。过氧化物酶体是饱和/不饱和的极长链脂肪酸进行 β -氧化的唯一场所。研究表明,DM患者线粒体中脂肪酸 β -氧化会增强^[9]。T2DM患者普遍存在血游离脂肪酸(FFA)水平异常升高的现象,过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPAR α)作为配体活化型核转录因子,在T2DM的发病中起着重要作用,过氧化物酶酰基辅酶A氧化酶1(ACOX1)也是脂肪细胞内与脂肪氧化相关的酶,同时也是过氧化物酶体 β -氧化系统的起始酶。故本研究拟建立T2DM大鼠模型,用富硒灵芝粗提

物给药后,检测其肝组织病理学改变以及脂代谢、炎症因子、肝功能的变化,并观察其肝组织中PPAR α 和ACOX1的表达水平变化,为富硒灵芝的开发利用提高参考。

1 材料

1.1 仪器

Multiskan FC全波段酶标仪(美国Thermo Fisher公司);UV5Bio紫外分光光度计(瑞士Mettler-Toledo公司);ABI 7500实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)仪(美国ABI公司)。

1.2 药品与试剂

富硒灵芝粗提物(沈阳市康硒生物工程研究所,批号:20180112,淡黄色粉末状,含硒量为3.162 mg/kg、多糖为5.10 mg/kg);盐酸二甲双胍片(中美上海施贵宝制药有限公司,批号:20180477,规格:0.5 g);链脲佐菌素(STZ,美国Sigma公司,批号:18883-66-4,纯度:99.9%);胆固醇(太原永耀生物科技有限公司,批号:20180046,纯度:99.8%);葡萄糖、胰岛素、FFA、三酰甘油(TG)、血清总胆固醇(TC)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:分别为58367-01-4、11070-73-8、kt30249、20171107、20170564、20170365);白细胞介素1 β (IL-1 β)、IL-6、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT)、碱性磷酸酶(AKP)测定试剂盒(美国Bio-Swamp公司,批号:分别为kt59812、kt40133、kt25328、15364-33-2、15362-12-8、15366-35-1);总RNA提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司,批号:20170203];反转录试剂盒(美国Thermo Fisher公司,批号:163578-12-2);兔抗PPAR α 、ACOX1多克隆抗体(美国Abcam公司);鼠抗 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国

Santa Cruz公司);辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗和HRP标记的羊抗鼠IgG二抗(北京中杉金桥公司);ECL发光试剂盒(美国Millipore公司);引物基因由美国Invitrogen公司合成。

1.3 动物

SD大鼠120只,♂,体质量180~200 g,由昆明医科大学实验动物学部提供,动物生产许可证号:SCXK(滇)-K2013-0002,动物使用许可证号:SYXK(滇)K2015-0002。将大鼠适应性喂养2周后用于实验,期间大鼠正常饮食,饲养在通风、温度为15~25℃、湿度为55%~75%、昼夜各12 h交替的环境中。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

将120只大鼠随机分为正常对照组($n=20$)和造模组($n=100$)。正常对照组大鼠喂养普通饲料,造模组大鼠喂养高脂饲料(由10%猪油、2.5%胆固醇、1%猪胆酸盐、20%蔗糖和65.5%常规饲料组成)。4周后,造模组大鼠腹腔注射STZ溶液(30 mg/kg)复制T2DM模型^[10]。于注射2周后,大鼠尾部取血测血糖,若血糖 >16.7 mmol/L则视为造模成功^[11]。将造模成功的90只大鼠随机分为模型对照组、阳性对照组(200 mg/kg)^[12]和富硒灵芝粗提物低、中、高剂量组(300、600、1 200 mg/kg,以提取物计)^[13],每组18只。富硒灵芝粗提物组大鼠灌胃富硒灵芝粗提物溶液(以生理盐水为溶剂),阳性对照组大鼠灌胃二甲双胍溶液(以生理盐水为溶剂),正常对照组和模型对照组大鼠灌胃相同体积的生理盐水,每天给药1次,每周周一至周六给药。

2.2 样本采集及处理

在给药第4、8周后,各组分别取一半大鼠,腹腔注射3.6%水合氯醛溶液(10 mL/kg)麻醉,剪开,暴露腹腔,无菌条件下快速从心脏取血,将收集的血液静置30 min后,以3 500 r/min离心15 min,取上层血清,保存于-80℃超低温冰箱中,待用。然后摘下心脏,剪取上部1/3组织并置于福尔马林中固定保存,用于组织病理形态学观察;将剩余部分肝组织置于-80℃超低温冰箱中保存,用于mRNA和蛋白表达检测。

2.3 指标检测

2.3.1 胰岛素抵抗指数计算 按照相应试剂盒说明书操作,采用紫外分光光度法检测大鼠血清中葡萄糖、胰岛素水平,并计算胰岛素抵抗指数(葡萄糖水平 \times 胰岛素水平/22.5)^[14]。

2.3.2 血清中炎症因子指标测定 按照相应试剂盒说明书操作,分别采用紫外分光光度法检测大鼠血清中血脂指标(FFA、TG、TC和LDL-C)水平;采用酶联免疫吸附法测定大鼠血清中肝功能指标(AST、ALT、AKP)和炎症因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6)水平。

2.3.3 肝组织病理形态学观察 取在4%多聚甲醛溶液中固定72 h的大鼠肝组织,常规制备5 μ m厚切片,然后

行苏木精-伊红(HE)染色,最后在光学显微镜下观察其肝组织病理形态学变化。

2.3.4 肝组织中PPAR α 、ACOX1的mRNA表达水平检测 采用RT-qPCR法。取大鼠肝组织约20 mg,低温下匀浆研磨,按照RNA提取试剂盒按说明书步骤提取总RNA,分析总RNA的纯度。然后以双蒸水稀释定量,取2 μ g总RNA为模板反转录成cDNA。以2 μ L的cDNA为模板进行RT-qPCR分析。引物序列:PPAR α 上游引物序列为5'-TGCAGCCTCAGCCAAGTTGAA-3',下游引物序列为5'-TCCCGAACTTGACCAGCCA-3',产物扩增长度为76 bp;ACOX1上游引物序列为5'-AGGGAA-TTTGGCATCGCAGA-3',下游引物序列为5'-AGGC-CAACAGGTTCCACAAA-3',产物扩增长度为101 bp;内参 β -actin上游引物序列为5'-GCAGATGTGGAT-CAGCAAGC-3',下游引物序列为5'-GCAGCTCAGTA-ACAGTCCGC-3',产物扩增长度为90 bp。反应体系:上、下游引物各0.5 μ L,dNTP 1.6 μ L,Taq DNA聚合酶1 μ L、靶序列DNA 1 μ L、PCR反应缓冲液2 μ L和双蒸水18.4 μ L,总反应体系为25 μ L。扩增条件:95℃预变性2 min;95℃变性10 s,60℃退火30 s,72℃延伸35 s,循环40次;72℃最后再延伸5 min。分别记录目的基因和内参基因的 c_t 值(即每个孔内反映荧光信号强度达到阈值时需要的循环数)。采用 $2^{-\Delta\Delta c_t}$ 法对进行定量分析,每组试验至少重复3次。

2.3.5 肝组织中PPAR α 、ACOX1的蛋白表达水平检测 采用Western blot法。取大鼠肝组织约100 mg,加入RIPA组织裂解液,在冰浴下制成10%匀浆,在4℃下以14 000 r/min离心10 min,吸取上清。采用二喹啉甲酸(BCA)法进行蛋白定量后,取50 μ g总蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。根据分子量切取目标蛋白条带,半干转膜法转移至聚偏氟乙烯膜(PVDF)上,以5%的脱脂牛奶封闭2 h,分别加入PPAR α 、ACOX1多克隆一抗(1:1 000),4℃过夜,洗膜;加入相应HRP标记的二抗(1:20 000),孵育12 h,以TPBS缓冲液洗涤后加入发光聚合物ECL,使用胶片曝光,图片扫描后用Image J软件计算各条带的灰度值,以各目标条带灰度值与内参 β -actin条带灰度值的比值表示目标蛋白的相对表达量,每组实验至少重复3次。

2.4 统计学方法

采用SPSS 19.0统计学软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间数据比较采用单因素方差分析,若方差齐时两组间比较采用LSD检验,若方差不齐时则采用Tamhane' T2法。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 胰岛素抵抗指数测定结果

与正常对照组比较,模型对照组大鼠在给药4、8周后血清中葡萄糖、胰岛素含量显著增加($P < 0.01$),胰岛素抵抗指数显著升高($P < 0.01$)。与模型对照组比较,

阳性对照组和富硒灵芝粗提取物中、高剂量组大鼠在给药4、8周后血清中葡萄糖和胰岛素含量均显著减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),胰岛素抵抗指数含量均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);并且富硒灵芝粗提取物低剂量组大鼠在

给药4周后血清中葡萄糖和胰岛素含量显著减少($P < 0.05$),在给药8周后胰岛素抵抗指数含量显著降低($P < 0.05$),各组大鼠胰岛素抵抗指数测定结果见表1。

3.2 血清中肝功能指标水平测定结果

表1 给药4、8周后各组大鼠胰岛素抵抗指数测定结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Determination result of insulin resistance index of rats in each group after 4 and 8 weeks of medication($\bar{x} \pm s$)

组别	n	葡萄糖,mmol/L		胰岛素,mU/mL		胰岛素抵抗指数	
		给药4周	给药8周	给药4周	给药8周	给药4周	给药8周
正常对照组	10	4.89±1.45	4.94±1.67	14.38±3.03	14.58±3.31	3.14±0.87	3.22±0.92
模型对照组	9	18.23±3.12**	17.99±3.67**	23.59±5.79**	22.67±5.35**	19.19±3.45**	18.21±3.21**
阳性对照组	9	8.26±1.56 [#]	5.89±1.88 ^{##}	15.62±3.86 ^{##}	15.26±4.02 ^{##}	6.66±2.01 ^{##}	4.03±1.02 ^{##}
富硒灵芝粗提取物低剂量组	9	14.03±2.89 [#]	16.59±3.05	19.28±4.23 [#]	19.26±6.26	18.64±4.05	10.28±2.03 [#]
富硒灵芝粗提取物中剂量组	9	11.98±2.23 [#]	14.02±3.06 [#]	19.22±2.96 [#]	16.83±3.45 [#]	12.55±3.66 [#]	6.26±3.02 [#]
富硒灵芝粗提取物高剂量组	9	11.67±2.93 [#]	8.54±2.06 [#]	18.17±3.98 [#]	15.68±3.47 [#]	9.47±2.77 [#]	5.98±1.85 [#]

注:与正常对照组比较,** $P < 0.01$;与模型对照组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, ** $P < 0.01$; vs. model control group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

与正常对照组比较,模型对照组大鼠在给药4、8周后血清中AKP、AST和ALT水平均显著升高($P < 0.01$)。与模型对照组比较,阳性对照组和富硒灵芝粗提取物中、高剂量组大鼠在给药4、8周后血清中AKP、AST

和ALT水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且富硒灵芝粗提取物低剂量组大鼠在给药4、8周后血清中AKP和给药8周后血清中的ALT水平显著降低($P < 0.05$),各组大鼠血清中肝功能指标测定结果见表2。

表2 给药4、8周后各组大鼠血清中AKP、AST和ALT水平测定结果($\bar{x} \pm s, U/L$)

Tab 2 Determination result of serum levels of AKP, AST and ALT of rats in each group after 4 and 8 weeks of medication($\bar{x} \pm s, U/L$)

组别	n	AKP		AST		ALT	
		4周	8周	给药4周	给药8周	给药4周	给药8周
正常对照组	10	80.63±11.23	81.35±8.39	24.19±13.21	22.59±13.92	36.20±17.38	35.41±19.25
模型对照组	9	118.39±18.83**	117.38±16.37**	173.69±31.51**	157.83±28.71**	69.45±20.37**	67.36±16.33**
阳性对照组	9	110.56±12.13 [#]	100.87±10.58 [#]	56.26±22.30 ^{##}	48.59±19.58 ^{##}	40.15±17.98 ^{##}	36.23±19.02 ^{##}
富硒灵芝粗提取物低剂量组	9	105.64±11.45 [#]	110.58±14.25 [#]	156.49±34.01	120.30±20.15	63.88±19.20	55.06±15.26 [#]
富硒灵芝粗提取物中剂量组	9	102.87±10.09 [#]	95.66±13.78 [#]	143.89±23.54 [#]	89.66±23.2 [#]	58.26±18.02 [#]	49.88±10.02 [#]
富硒灵芝粗提取物高剂量组	9	99.63±12.52 ^{##}	86.43±11.67 ^{##}	120.71±21.73 [#]	82.18±20.11 ^{##}	52.77±18.36 [#]	41.58±14.45 [#]

注:与正常对照组比较,** $P < 0.01$;与模型对照组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, ** $P < 0.01$; vs. model control group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

3.3 血清中血脂指标水平测定结果

与正常对照组比较,模型对照组大鼠在给药4、8周后血清中FFA、TC、TG和LDL-C水平均显著升高($P < 0.01$);与模型对照组比较,阳性对照组和富硒灵芝粗提

物中、高剂量组大鼠在给药4、8周后血清中FFA、TC、TG、LDL-C水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),但富硒灵芝粗提取物低剂量组大鼠差异无统计学意义($P > 0.05$),各组大鼠血清中血脂指标水平测定结果见表3。

表3 给药4、8周后各组大鼠血清中FFA、TC、TG和LDL-C水平测定结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Determination result of serum levels of FFA, TC, TG and LDL-C of rats in each group after 4 and 8 weeks of medication($\bar{x} \pm s$)

组别	n	FFA, μ mol/L		TC, mmol/L		TG, mmol/L		LDL-C, mmol/L	
		给药4周	给药8周	给药4周	给药8周	给药4周	给药8周	给药4周	给药8周
正常对照组	10	256.29±59.28	270.38±67.78	1.36±0.23	1.42±0.28	0.47±0.07	0.50±0.08	0.15±0.03	0.16±0.04
模型对照组	9	490.14±99.37**	485.48±97.73**	2.20±0.37**	2.02±0.35**	0.91±0.19**	0.87±0.22**	0.37±0.09**	0.37±0.11**
阳性对照组	9	278.28±61.25 ^{##}	289.32±69.02 ^{##}	1.53±0.33 ^{##}	1.67±0.28 ^{##}	0.55±0.11 ^{##}	0.57±0.09 ^{##}	0.21±0.04 [#]	0.18±0.04 ^{##}
富硒灵芝粗提取物低剂量组	9	440.55±100.22	402.36±89.33	1.98±0.45	1.89±0.32	0.81±0.29	0.77±0.19	0.36±0.08	0.35±0.15
富硒灵芝粗提取物中剂量组	9	410.43±93.28 [#]	360.76±71.03 ^{##}	1.88±0.20 [#]	1.67±0.19 [#]	0.76±0.14 [#]	0.68±0.19 [#]	0.28±0.09 [#]	0.24±0.04 [#]
富硒灵芝粗提取物高剂量组	9	396.83±85.10 [#]	321.73±76.38 ^{##}	1.75±0.13 [#]	1.61±0.17 [#]	0.72±0.10 [#]	0.58±0.16 [#]	0.23±0.07 [#]	0.20±0.05 ^{##}

注:与正常对照组比较,** $P < 0.01$;与模型对照组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, ** $P < 0.01$; vs. model control group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

3.4 血清中炎症因子水平测定结果

与正常对照组比较,模型对照组大鼠在给药4、8周

后血清中TNF- α 、IL-6和IL-1 β 水平均显著升高($P < 0.01$);与模型对照组比较,阳性对照组和富硒灵芝粗提

物中、高剂量组大鼠在给药4、8周后血清中TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平均显著降低($P < 0.05$),富硒灵芝粗提物低剂量组大鼠在给药4周后血清中TNF- α 水平以及给药

8周后血清中TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平显著降低($P < 0.05$),各组大鼠血清中炎症因子水平测定结果见表4。

3.5 肝组织病理学观察结果

表4 给药4、8周后各组大鼠血清中TNF- α 、IL-6和IL-1 β 水平测定结果($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

Tab 4 Determination result of serum levels of TNF- α , IL-6 and IL-1 β of rats in each group after 4 and 8 weeks of medication ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	n	TNF- α		IL-6		IL-1 β	
		给药4周	给药8周	给药4周	给药8周	给药4周	给药8周
正常对照组	10	1 634.27 \pm 240.56	1 700.52 \pm 271.38	744.81 \pm 88.44	725.78 \pm 75.18	210.27 \pm 34.29	220.61 \pm 32.48
模型对照组	9	2 789.52 \pm 367.12**	2 612.30 \pm 289.27**	1 672.69 \pm 189.65**	1 538.95 \pm 165.48**	734.27 \pm 77.24**	699.73 \pm 81.43**
阳性对照组	9	1 896.88 \pm 253.63##	1 793.55 \pm 256.65##	956.32 \pm 102.54##	852.24 \pm 85.16##	335.26 \pm 26.39##	253.06 \pm 33.02##
富硒灵芝粗提物低剂量组	9	2 326.56 \pm 333.26 ^e	2 206.32 \pm 276.45 ^e	1 555.32 \pm 198.57	1 398.75 \pm 187.23 ^e	700.05 \pm 80.26	555.28 \pm 67.84 ^e
富硒灵芝粗提物中剂量组	9	2 234.98 \pm 214.86 ^e	1 986.78 \pm 183.26 ^e	1 455.26 \pm 139.78 ^e	1 203.58 \pm 120.54 ^e	650.86 \pm 55.89 ^e	455.69 \pm 59.60 ^e
富硒灵芝粗提物高剂量组	9	2 145.72 \pm 223.71## ^e	1 827.81 \pm 192.75## ^e	1 267.18 \pm 135.87 ^e	956.61 \pm 96.47## ^e	450.18 \pm 44.77 ^e	310.66 \pm 49.10## ^e

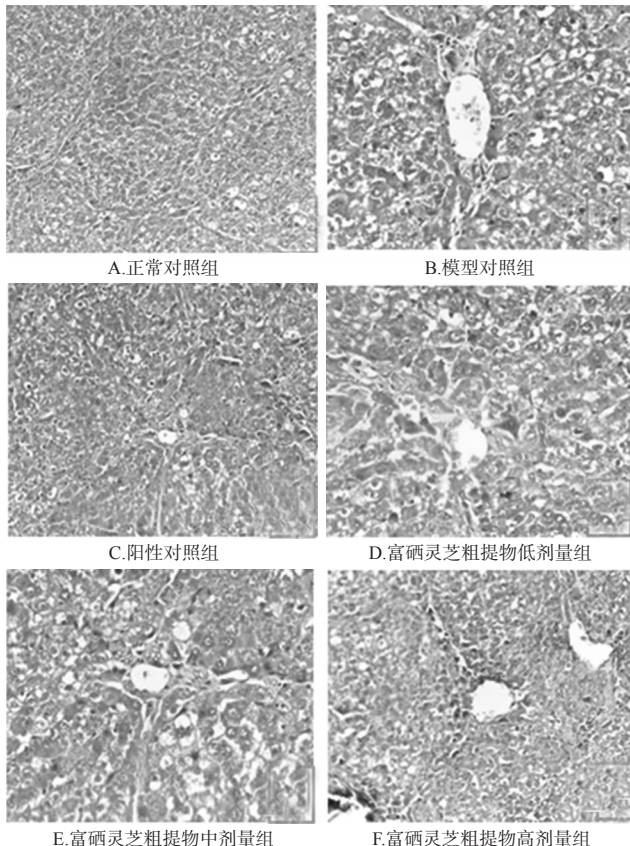
注:与正常对照组比较,** $P < 0.01$;与模型对照组比较,^e $P < 0.05$,## $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, ** $P < 0.01$; vs. model control group, ^e $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

正常对照组大鼠肝组织正常,未受到明显损伤,肝细胞大小均匀、排列整齐,几乎观察不到炎症细胞及细胞中的脂肪颗粒沉淀。而模型对照组大鼠肝组织中多数肝小叶的结构轮廓模糊或基本消失,肝细胞肿胀、呈圆形且体积较明显增大;有不同程度的脂肪变性及空泡

样变,并伴随少量炎性细胞浸润。给药后,各给药组大鼠肝组织中炎性细胞浸润减少,形态恢复明显,脂肪变性程度及细胞肿胀减轻,但仍有小部分面积脂肪颗粒堆积,且给药8周后变化情况较给药4周后更加明显,大鼠肝组织病理形态学观察结果见图1。

给药4周:



给药8周:

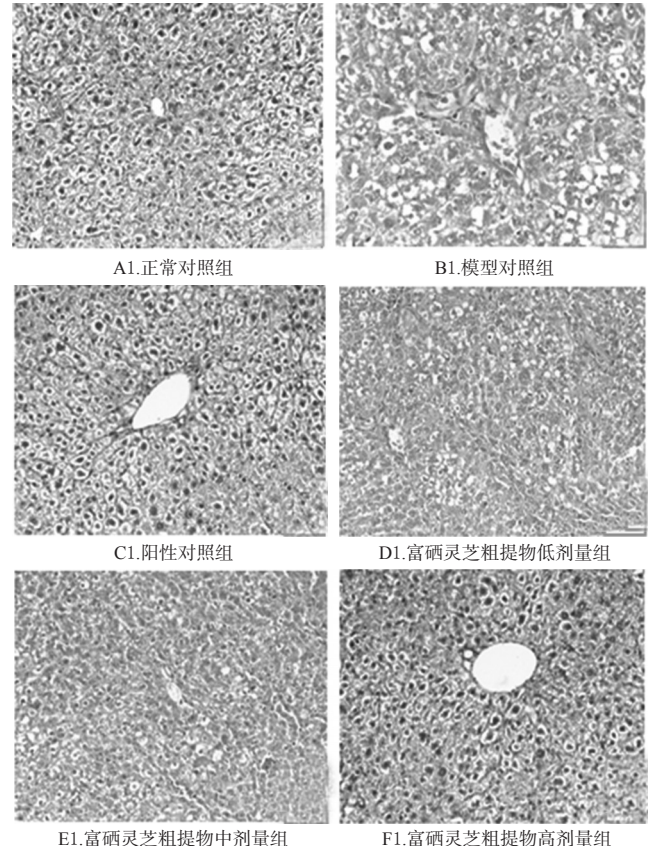


图1 给药4、8周后各组大鼠肝组织HE染色图($\times 400$)

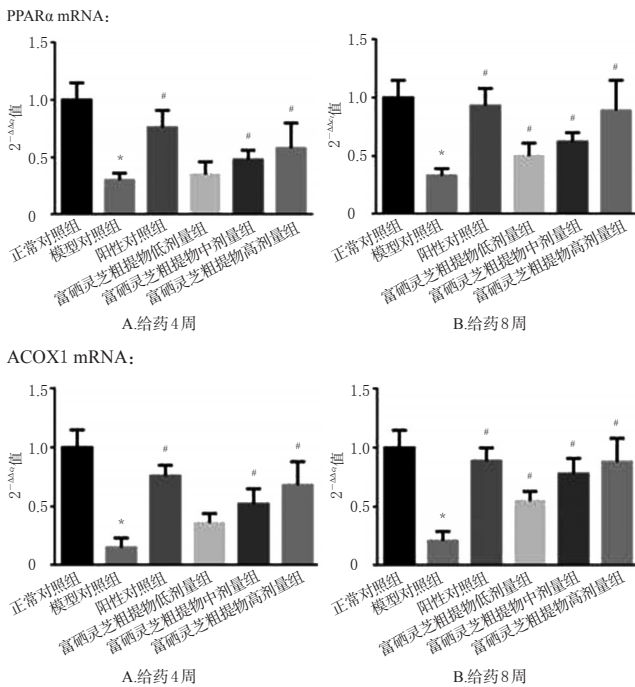
Fig 1 HE staining of liver tissue of rats in each group after 4 and 8 weeks of medication ($\times 400$)

3.6 肝组织中PPAR α 、ACOX1的mRNA表达水平测定结果

与正常对照组比较,模型对照组大鼠在给药4、8周

后肝组织中PPAR α 、ACOX1的mRNA表达水平均显著降低($P < 0.05$)。与模型对照组比较,阳性对照组和富硒灵芝粗提物中、高剂量组大鼠在给药4、8周后肝组织中

PPAR α 、ACOX1的 mRNA 表达水平以及富硒灵芝粗提物低剂量组大鼠给药8周后肝组织中 PPAR α 、ACOX1的 mRNA 表达水平均显著升高($P<0.05$),各组大鼠肝组织中 PPAR α 、ACOX1的 mRNA 表达水平测定结果见图2。



注:与正常对照组比较,* $P<0.05$;与模型对照组比较,# $P<0.05$

Note: vs. normal control group,* $P<0.05$; vs. model control group, $^{\#}P<0.05$

图2 给药4、8周后各组大鼠肝组织中 PPAR α 和 ACOX1的 mRNA 表达水平测定结果

Fig 2 mRNA expressions of PPAR α and ACOX1 in liver tissue of rats in each group after 4 and 8 weeks of medication

3.7 肝组织中 PPAR α 、ACOX1的蛋白表达水平测定结果

与正常对照组比较,模型对照组大鼠在给药4、8周后肝组织中 PPAR α 、ACOX1蛋白表达水平均显著降低($P<0.01$)。与模型对照组比较,各给药组大鼠在给药4、8周后肝组织中 PPAR α 、ACOX1蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),各组大鼠肝组织中 PPAR α 、ACOX1蛋白电泳图见图3、测定结果见表5。

4 讨论

由于T2DM的发病机制较为复杂,包括了肝损伤、肥胖、高血脂、炎症、胰岛素抵抗等,所以在本次实验中笔者采用高脂高糖饮食合并注射STZ(50 mg/kg)的方法复制T2DM大鼠模型。STZ注射后,模型对照组大鼠出现了高血糖、炎症反应、高脂血症以及明显的胰岛素抵抗等现象;并且HE染色结果也发现,造模后大鼠肝组织中多数肝小叶的结构轮廓模糊或基本消失,肝细胞的形

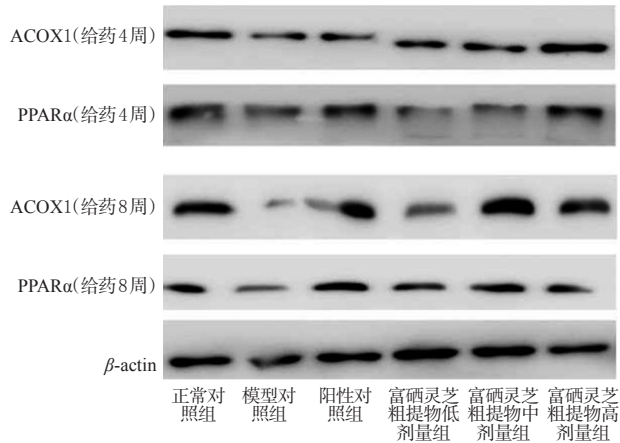


图3 给药4、8周后各组大鼠肝组织中 PPAR α 和 ACOX1蛋白表达电泳图

Fig 3 Electrophoresis of PPAR α and ACOX1 protein expressions in liver tissues of rats in each group after 4 and 8 weeks of medication

表5 给药4、8周后各组大鼠肝组织中 PPAR α 和 ACOX1蛋白表达水平测定结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 5 Protein expressions of PPAR α and ACOX1 in liver tissues of rats in each group after 4 and 8 weeks of medication($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PPAR α		ACOX1	
		给药4周	给药8周	给药4周	给药8周
正常对照组	10	1.23 \pm 0.32	0.89 \pm 0.28	0.92 \pm 0.14	1.22 \pm 0.13
模型对照组	9	0.45 \pm 0.12**	0.41 \pm 0.08**	0.38 \pm 0.19**	0.43 \pm 0.15**
阳性对照组	9	0.98 \pm 0.11 ^{##}	0.96 \pm 0.12 ^{##}	0.93 \pm 0.11 ^{##}	1.08 \pm 0.21 ^{##}
富硒灵芝粗提物低剂量组	9	0.65 \pm 0.13 [#]	0.64 \pm 0.13 [#]	0.68 \pm 0.20 [#]	0.73 \pm 0.13 ^{##}
富硒灵芝粗提物中剂量组	9	0.74 \pm 0.25 ^{##}	0.77 \pm 0.23 ^{##}	0.78 \pm 0.27 ^{##}	0.98 \pm 0.26 ^{##}
富硒灵芝粗提物高剂量组	9	0.89 \pm 0.31 ^{##}	0.92 \pm 0.30 ^{##}	0.88 \pm 0.35 ^{##}	1.32 \pm 0.38 ^{##}

注:与正常对照组比较,** $P<0.01$;与模型对照组比较, $^{\#}P<0.05$, $^{\# \#}P<0.01$

Note: vs. normal control group, ** $P<0.01$; vs. model control group, $^{\#}P<0.05$, $^{\# \#}P<0.01$

态膨胀肿大,出现了许多炎症病灶,并伴有出现在胞质中的大量脂滴空泡,种种现象都说明T2DM大鼠造模成功。

据文献记载,灵芝中存在多种对人体功能有明显作用效果的生理调节因子,这些生理调节因子可以促进多种细胞因子的合成、抗损伤、减轻炎症反应、调节机体内环境平衡并促进受损肝细胞恢复。另外,灵芝还具有明显的抗肿瘤、免疫调节以及改善某些老年性疾病等作用^[15-17]。脂代谢紊乱贯穿了从DM的发生到慢性并发症发展的全过程,T2DM患者群普遍存在FFA水平异常升高的现象。本研究结果也发现,T2DM模型大鼠血清中FFA等血脂水平明显升高。用富硒灵芝粗提物对T2DM大鼠进行灌胃给药后,发现富硒灵芝粗提物能够促进模型大鼠肝组织中脂肪颗粒的排出、调节血脂异常。同时,随着给药时间的积累,上述症状改善效果更加明显,这提示富硒灵芝粗提物对T2DM模型大鼠具有

很好的改善作用。

DM病的发生发展过程与炎症免疫反应关系密切,在T2DM状态下,患者体内血清中脂多糖(LPS)及炎症因子(如TNF- α 、IL-1 β 等)处于高水平,而炎症反应会加重胰岛素抵抗和代谢障碍,因此,T2DM也可认为是一种慢性低度自身炎症性疾病。其次,胰岛素作用缺陷引起的葡萄糖利用障碍,使得组织只能更多地依赖体内脂质氧化提供能量^[18]。机体血清中随着脂肪动员增强而产生的大量FFA,FFA是PPAR α 的天然配体^[19],而PPAR α 是过氧化物增殖激活酶受体家族最早发现的蛋白之一,其在肝组织特别是在肝细胞的线粒体中含量非常丰富,且作用多种多样,既能够调节机体的抗氧化能力,也可以增强肝细胞表面的受体敏感性,还可以调节线粒体脂肪酸催化酶的表达,催化脂肪酸的 β -氧化,从而使得机体中脂肪酸和TG的生成量降低,达到降血脂的效果^[20]。作为脂肪酸 β -氧化的另外一个核心酶,ACOX1是脂肪酸 β -氧化系统中的起始酶,其负责整个过程启动,由于 β -氧化在脂肪酸的分解过程中占有非常重要的地位^[21-22], β -氧化是脂肪酸的分解最主要的途径,因此,对PPAR α 和ACOX1的研究具有深刻的意义。本研究结果显示,富硒灵芝粗提物可以通过上调T2DM模型大鼠肝组织中PPAR α 、ACOX1的mRNA和蛋白表达,促进大鼠肝组织中脂肪酸的 β -氧化,从而减少肝组织中的脂质沉积。

综上所述,富硒灵芝粗提物可改善T2DM模型大鼠肝脏组织中的脂肪分解代谢,调节肝功能,减轻炎症反应。其作用机制可能是上调肝组织中PPAR α 、ACOX1的mRNA及蛋白的表达,促进脂肪酸的 β -氧化。

参考文献

[1] 侯清涛,李芸,李舍予,等.全球糖尿病疾病负担现状[J].中国糖尿病杂志,2016,24(1):92-96.

[2] 张路霞,王海燕.从流行病学的角度探讨我国糖尿病肾病的发病趋势及对策[J].中华内科杂志,2010,49(9):804-805.

[3] 单永平.灵芝多糖抗癌机制研究进展[J].健康必读杂志,2011(7):348.

[4] 叶丽云,解凡,赵丽丽,等.硒对不同时期开袋灵芝主要活性成分的影响[J].浙江大学学报(农业与生命科学版),2017,43(4):462-468.

[5] 王关林,尚德静.富硒灵芝的营养成分及其抗氧化能力研究[J].营养学报,2001,23(1):73-75.

[6] 吴会清.灵芝多糖对S180荷瘤小鼠血清细胞因子水平与脏器指数的影响[J].中国药房,2014,25(35):3273-3275.

[7] 贾亚敏,武俊紫,胡跃高,等.富硒灵芝多糖调节SCD1,PPAR α 改善非酒精性脂肪肝大鼠症状[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(3):102-106.

[8] 贾亚敏,武俊紫,胡跃高,等.富硒灵芝多糖改善高脂饮食诱导的非酒精性脂肪肝大鼠症状[J].基础医学与临床,

2016,36(9):1193-1198.

[9] 叶蔚.不同糖耐量人群血浆脂肪酸谱与胰岛素抵抗[J].中华内分泌代谢杂志,2004,20(3):197-199.

[10] 沈亚非,徐焱成.高糖高脂膳食和链脲佐菌素诱导2型糖尿病模型的建立[J].中华实用诊断与治疗杂志,2006,20(9):649-650.

[11] 王景尚,孙明月,黄烨,等. α -硫辛酸对血糖波动状态下2型糖尿病大鼠血管内皮细胞功能及PI3K/Akt/GSK-3 β 通路的影响[J].中国全科医学,2017,20(24):2965-2971.

[12] 程静,向明,吴涛,等.南苜蓿总皂苷对2型糖尿病大鼠糖脂代谢及胰岛细胞的作用[J].中国医院药学杂志,2016,36(19):1625-1628.

[13] 武俊紫,贾亚敏,沈平瑞,等.富硒灵芝调控大鼠乙酰辅酶A羧化酶 α 表达治疗非酒精性脂肪肝的研究[J].天然产物研究与开发,2014,26(7):1086-1092.

[14] ISOKUORTTI E, ZHOU Y, PELTONEN M, et al. Use of HOMA-IR to diagnose non-alcoholic fatty liver disease: a population-based and inter-laboratory study[J]. *Diabetologia*, 2017, 60(10):1-10.

[15] 徐静,李楠,王俊红,等.2型糖尿病合并非酒精性脂肪肝大鼠肝脏SIRT1、UCP2表达的变化[J].南方医科大学学报,2012,32(5):726-729.

[16] LI K, ZHUO C, TENG C, et al. Effects of Ganoderma lucidum polysaccharides on chronic pancreatitis and intestinal microbiota in mice[J]. *Int J Bioll Macromol*, 2016, 93(PtA):904-912.

[17] JIANG D, WANG L, ZHUO T, et al. Restoration of the tumor-suppressor function to mutant p53 by Ganoderma lucidum polysaccharides in colorectal cancer cells[J]. *Oncology Reports*, 2017, 37(1):594-600.

[18] GASTALDELLI A, GAGGINI M, DEFRONZO RA. Role of adipose tissue insulin resistance in the natural history of T2DM: results from the san antonio metabolism study [J]. *Diabetes*, 2017, 66(4):815-815.

[19] HASHIMOTO H, YAMAMOTO M, SUGIURA E, et al. Adiponectin deficiency-induced diabetes increases TNF α and FFA via downregulation of PPAR α [J]. *J Vet Med Sci*, 2018, 80(4):662-666.

[20] 胡越. PPAR α 激动剂降血脂作用的研究进展[J].中国药科大学学报,2016,47(1):118-124.

[21] THOMPSON AM, ITRUJILLO JM. Dulaglutide: the newest GLP-1 receptor agonist for the management of type 2 diabetes[J]. *Ann Pharmacother*, 2015, 49(3):351-359.

[22] 全巧云,葛存锦,郑世华. PPAR α 及Acox1在酒精性脂肪肝中的表达[J].华中科技大学学报(医学版),2016,45(3):288-291.

(收稿日期:2018-06-15 修回日期:2018-12-12)

(编辑:林 静)