

活血降糖饮对肥胖大鼠摄食行为的调节作用 及海马 CD36 表达的影响^{*}

刘德亮¹ 渠 昕^{1△} 李惠林^{1△} 赵恒侠¹ 楚淑芳¹ 庄伟坤² 张学文³

¹ 深圳市中医院, 广东深圳 518033

² 广州中医药大学第四临床医学院, 广东深圳 518033

³ 陕西中医药大学, 陕西咸阳 712046

摘要 目的 研究活血降糖饮对肥胖和胰岛素抵抗大鼠摄取膳食脂肪偏好的影响并探讨可能的机制。方法 通过高脂高热卡饮食诱导肥胖和胰岛素抵抗大鼠模型, 将模型大鼠分为模型组、中药组、二甲双胍组, 另设正常对照组。药物干预后检测血脂、血糖及血清胰岛素, 并通过双瓶喜好实验检测大鼠对膳食脂肪的偏好, 通过免疫印迹方法检测大鼠海马组织 CD36 蛋白表达。结果 与模型组比较, 各治疗组大鼠体重、血脂、血糖、胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)均明显改善, 对膳食脂肪的偏好明显降低, 海马组织 CD36 蛋白表达明显下调。结论 活血降糖饮的干预可降低肥胖和胰岛素抵抗大鼠在摄食行为中对膳食脂肪的偏好, 其作用机制可能与下调海马组织 CD36 蛋白表达有关。

关键词 活血降糖饮; 饮食偏好; CD36

Effect of Huoxue Jiangtang Decoction on Food Preference and CD36 Expression of Hippocampus in Obese Rats

LIU Deliang¹, QU Xin^{1△}, LI Huilin^{1△}, Zhao Hengxia¹,

Chu Shufang¹, Zhuang Weikun², Zhang Xuewen³

¹Shenzhen Traditional Chinese Medicine Hospital, Shenzhen 518033, China

²Fourth Clinical Medicine Hospital of Guangzhou University of
Traditional Chinese Medicine, Shenzhen 518033, China

³Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

Abstract Objective To investigate the effect and possible mechanism of Huoxue Jiangtang decoction on food preference of obese and insulin resistant rats. **Methods** Obese and insulin resistant rats model were induced by high fat diet. After that, model rats were divided into model group, herb group, and metformin group. Besides, a control group was set. After respective treatment, blood glucose, lipids, and insulin were tested. Preference for fat of rats were examined by two-bottle test and the expression of CD36 protein in hippocampus were tested by western blot. **Results** In contrast to model group, weight, blood glucose level, blood lipid level, and HOMA-IR were decreased in treatment groups. Meanwhile, preference for fat and the expression of hippocampus CD36 protein in treatment groups were also reduced when compared with model group. **Conclusion** Huoxue Jiangtang decoction was effective in ameliorating preference for fat in obese and insulin resistant rats, and the mechanisms may be related to reducing the expression of CD36 protein in hippocampus.

Key words Huoxue Jiangtang decoction; food preference; CD36

^{*} 深圳市科技创新委员会基础研究项目(Na JCYJ20170307154753286); 深圳市医疗卫生三名工程(Na SZSM201512043)

[△] 通信作者, Corresponding author, E-mail: 995125310@qq.com; sztcmlhl@163.com

流行病学调查^[1-2]结果显示,近年来我国肥胖、Ⅱ型糖尿病等代谢性疾病的发病率逐年增加,这与生活水平的提高,饮食结构的改变密切相关。行为学研究^[3-4]发现人和动物对膳食脂肪均有较强的偏好。因此,若能调控摄食行为,控制对膳食脂肪的偏好,减少脂肪摄入,可延缓代谢性疾病的发生和进展^[5]。活血降糖饮是本院协定处方,具有益气养阴、活血通络的作用;前期研究发现其具有良好的降糖、调脂及抑制 β 细胞凋亡等作用。方中含有大量性味苦寒、甘寒的益气养阴清热药物,按中医理论而言,其有滋腻碍胃之嫌,但可能发挥对摄食行为的调控作用。因此,本文对活血降糖饮干预的肥胖大鼠的摄食行为进行研究,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物及饲养

SPF 级雄性 SD 大鼠 50 只,体重 180~220 g,由广东省医学实验动物中心提供。饲养环境:温度 18~22℃,湿度 40~70%,自由摄食、饮水,自然昼夜节律光照。常规饲料(热量构成为脂肪 13%,蛋白质 23%,碳水化合物 64%)及高脂饲料(热量构成为脂肪 60%,蛋白质 20%,碳水化合物 20%)均购于广东省医学实验动物中心。

1.2 药物及试剂

活血降糖饮(黄芪 30 g,生地 20 g,丹参 30 g,太子参 30 g,五味子 15 g,麦冬 15 g,山药 12 g,黄精 15 g,丹皮 12 g,大黄 16 g,红花 12 g,桃仁 10 g)蒸馏水浸泡 2 h 后,大火煎开,小火继续煎煮 30 min,共 2 次,过滤浓缩为 4 g/ml 药液,4℃ 冰箱保存备用。盐酸二甲双胍片(中美上海施贵宝制药有限公司,国药准字 H20023370)用蒸馏水溶解为浓度 20 mg/ml 药液,4℃ 储存。

1.3 试剂及仪器

总胆固醇(TC)、总三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-c)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-c)、血糖试剂盒购于南京建成生物工程研究所,游离脂肪酸(NEFA)试剂盒购自日本和光纯药工业株式会社,胰岛素放免试剂盒购于北京原子能科学研究所。兔抗大鼠 CD36 多克隆抗体、 β -actin 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司,蛋白抽提试剂盒及辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体购自武汉博士德生物公司。检测仪器包括北京六一仪器厂 DYCZ-24 型垂直板电泳槽等。

1.4 实验方法

1.4.1 动物模型和分组 经过 1 周的适应性喂养后,随机选出 10 只大鼠作为正常对照组,常规饲料喂养,自由进食和饮水。其余大鼠以高脂高热卡饮食喂养 8 周后,筛选出 30 只血脂及胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)异常的作为成模大鼠(根据以上指标计算 95% 可信区间,数据均高于正常范围上线 20% 认为模型成功),将其随机分为模型组、中药组、二甲双胍组,每组 10 只。

1.4.2 动物处理 正常组和模型组以适量体积生理盐水灌胃,中药组以 5 g/(kg·d) 剂量灌服活血降糖饮,二甲双胍组以 200 mg/(kg·d) 剂量灌胃二甲双胍。正常组喂以常规饲料,其他组均继续喂以高脂高热卡饲料。各组干预 8 周后,进行双瓶喜好实验,检测大鼠对膳食脂肪的偏好。1 周后,禁食 24 h,腹腔注射 45 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉后,腹主动脉采血,分离血清,检测血脂、游离脂肪酸、空腹血糖(FPG)、空腹胰岛素(FINS);断头,取脑组织,冰上分离海马组织,经过液氮后保存于-80℃ 冰箱。

1.4.3 指标测量 ①按照说明书检测各血清学指标;②双瓶喜好实验:将标号、称重过的盛有纯水和 20% 亚油酸(LA)的 200 ml 饮水瓶,分别插入鼠笼笼盖左右两端(LA 水在左,纯水在右)1 h,1 h 后交换 2 瓶位置,再过 1 h 后将饮水瓶取下,称重;脂肪偏好度 = $[2h \text{ 20\% 亚油酸饮用量} / (2h \text{ 20\% 亚油酸饮用量} + 2h \text{ 纯水饮用量})] \times 100\%$;③western blot 检测海马组织 CD36 蛋白表达:海马组织总蛋白提取按照蛋白抽提试剂盒说明书操作,考马斯亮蓝 G-250 测定蛋白浓度;10% SDS-PAGE 凝胶电泳(各样品上样量均为 50 μ g),湿转法转膜后,封闭 2 h,一抗 4℃ 孵育过夜(抗体工作浓度为 1:1000),次日经 TBST 洗膜后用二抗孵育 2 h(二抗工作浓度为 1:5000),进行杂交 ECL 化学发光,分析各条带的吸光度值,用蛋白/内参的比值表示各蛋白的表达量。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间差异采用单因素方差分析进行比较,组间多重比较,使用 Bonferroni 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 活血降糖饮对大鼠体重的影响

模型组大鼠体重明显高于正常组,治疗后,中药组和二甲双胍组大鼠体重明显降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 各组大鼠体重比较($n=10, g, \bar{x} \pm s$)

组别	体重
正常组	381.22 $\pm$ 59.86
模型组	548.25 $\pm$ 59.39**
中药组	403.89 $\pm$ 62.92 $\Delta\Delta$
二甲双胍组	393.13 $\pm$ 61.11 $\Delta\Delta$

与正常组比较** $P<0.01$;与模型组比较 $\Delta\Delta P<0.01$ 表 2 各组大鼠 FPG、FINS 及 HOMA-IR 比较($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	FPG(mmol/L)	FINS(μ IU/ml)	HOMA-IR
正常组	4.77 $\pm$ 0.83	54.41 $\pm$ 12.58	12.37 $\pm$ 3.99
模型组	6.86 $\pm$ 1.00**	121.51 $\pm$ 15.59**	37.10 $\pm$ 7.32**
中药组	5.40 $\pm$ 1.22 Δ	95.93 $\pm$ 17.46 $\Delta\Delta$	22.74 $\pm$ 5.63 $\Delta\Delta$
二甲双胍组	4.86 $\pm$ 0.98 $\Delta\Delta$	82.86 $\pm$ 18.06 $\Delta\Delta$	18.31 $\pm$ 7.24 $\Delta\Delta$

与正常组比较** $P<0.01$;与模型组比较 $\Delta P<0.05, \Delta\Delta P<0.01$

2.3 活血降糖饮对大鼠血脂水平的影响

与正常组比较,模型组大鼠 TC、TG、LDL-c、NEFA 均明显升高, HDL-c 明显下降($P<0.01$);与模型组比较,中药组和二甲双胍组 TC、TG、LDL-c、NEFA

2.2 活血降糖饮对大鼠 FPG、FINS 以及 HOMA-IR 的影响

模型组大鼠 FPG、FINS、HOMA-IR 均明显高于正常组;治疗后,中药组和二甲双胍组大鼠 FPG、FINS、HOMA-IR 均较模型组有不同程度降低,差异有统计学意义($P<0.05, P<0.01$)。见表 2。

均有不同程度下降,差异有统计学意义($P<0.01$);而中药组和二甲双胍组 HDL-c 与模型组比较无明显变化($P>0.05$)。见表 3。

表 3 各组大鼠血脂比较($n=10, mmol/L, \bar{x} \pm s$)

组别	TC	TG	LDL-c	HDL-c	NEFA
正常组	2.87 $\pm$ 0.70	1.31 $\pm$ 0.62	1.53 $\pm$ 0.48	1.03 $\pm$ 0.18	0.95 $\pm$ 0.29
模型组	5.20 $\pm$ 0.66**	3.18 $\pm$ 0.60**	2.96 $\pm$ 0.57**	0.61 $\pm$ 0.28**	1.99 $\pm$ 0.31**
中药组	2.99 $\pm$ 0.76 $\Delta\Delta$	2.27 $\pm$ 0.52 $\Delta\Delta$	2.10 $\pm$ 0.38 $\Delta\Delta$	0.66 $\pm$ 1.56	1.42 $\pm$ 0.30 $\Delta\Delta$
二甲双胍组	3.05 $\pm$ 0.72 $\Delta\Delta$	2.36 $\pm$ 0.33 $\Delta\Delta$	2.27 $\pm$ 0.45 $\Delta\Delta$	0.64 $\pm$ 0.17	1.47 $\pm$ 0.37 $\Delta\Delta$

与正常组比较** $P<0.01$;与模型组比较 $\Delta\Delta P<0.01$

2.4 活血降糖饮对大鼠脂肪偏好度的影响

与正常组比较,模型组大鼠脂肪偏好度明显增加;与模型组比较,中药组和二甲双胍组脂肪偏好度明显降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。见表 4。

表 4 各组大鼠脂肪偏好度($n=10, \%, \bar{x} \pm s$)

组别	脂肪偏好度
正常组	54.13 $\pm$ 8.69
模型组	75.22 $\pm$ 10.61**
中药组	43.70 $\pm$ 7.10 $\Delta\Delta$
二甲双胍组	49.13 $\pm$ 12.71 $\Delta\Delta$

与正常组比较** $P<0.01$;与模型组比较 $\Delta\Delta P<0.01$

2.5 活血降糖饮对大鼠海马组织 CD36 表达的影响

与正常组比较,模型组大鼠海马组织中 CD36 蛋白表达明显增加;与模型组比较,中药组和二甲双胍组海马组织中 CD36 蛋白表达明显降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。见图 1。

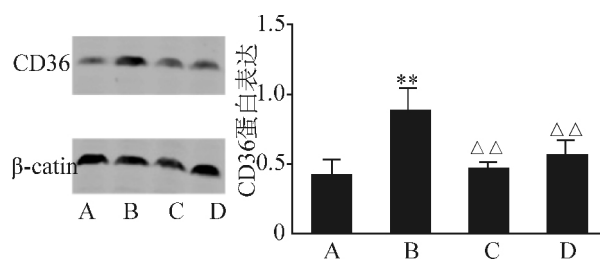
A: 正常组; B: 模型组; C: 中药组; D: 二甲双胍组
与正常组比较** $P<0.01$;与模型组比较 $\Delta\Delta P<0.01$

图 1 各组大鼠海马组织 CD36 蛋白表达

3 讨论

摄食是人体维持生命的重要生理行为,过量摄取高脂高热卡饮食会增加代谢性疾病的发生^[6]。根据《黄帝内经》中“未病先防,既病防变”的思想,可通过抑制对膳食脂肪的偏好控制高脂饮食的摄入量,从而

预防代谢性疾病的发生和进展。

传统中医理论认为“胃气”与人的健康关系密切，而食欲由“胃气”决定。因此，注意顾护“胃气”，也就增加了食欲。对“胃气”的抑制，多出现在一些中药的不良反应中，比如滋阴药，大多“滋腻碍胃”。文献研究发现中药对食欲抑制有间接作用，比如 Wang J 等^[7]学者证实了苦寒药和滋阴药有“碍胃”之嫌，在应用黄连生脉饮（黄连、黄芪、党参、麦冬、五味子、丹参、苦参、当归、酸枣仁）治疗早搏的过程中，患者出现食欲减退。中医多以“三消”理论指导治疗糖尿病，主要以益气养阴、活血化瘀为主，常应用滋腻碍胃的滋阴药和苦寒药。

本科室协定方活血降糖饮由黄芪、生地、丹参、太子参、黄精、五味子、麦冬、山药、丹皮、红花、桃仁、大黄等药物组成，具有益气养阴，清热泻浊，活血通络的功效，临床上用于治疗Ⅱ型糖尿病，治疗后患者多食易饥症状明显改善。本研究结果表明，经活血降糖饮治疗后，肥胖大鼠脂肪偏好明显降低，说明活血降糖饮对肥胖大鼠摄食行为中的饮食偏好具有调控作用。

CD36 是一种完整的细胞膜糖蛋白，其在细胞表面和溶酶体内部均有表达。CD36 属于 B 族清道夫受体家族的多功能蛋白，其在脊椎动物的多种细胞均有表达，如巨噬细胞、血小板、微血管内皮细胞、脂肪细胞、骨骼肌细胞、肠上皮细胞、肝细胞等^[8]。CD36 同时具有识别、转运游离脂肪酸的多种功能。Laugette F 等^[9]学者利用 CD36 基因敲除（CD36^{-/-}）小鼠，通过双瓶喜好实验研究发现，与野生型小鼠相比，在排除了嗅觉和触觉等影响因素后，CD36^{-/-}小鼠对 2% 亚油酸的偏好显著减弱，且不能区别富含亚油酸的溶液和对照溶液，而 CD36^{-/-}小鼠对甜味的喜好和对苦味的厌恶感仍然存在，其结果说明 CD36 对于脂类的识别起着重要作用。临床研究^[10]结果则表明，在肥胖人群中，CD36 表达增加的个体与 CD36 表达减少的个体相比，身高体重指数较高，膳食脂肪的摄入也较多。

中枢神经系统中关于 CD36 的研究较少，目前的研究发现 CD36 在中枢神经系统中具有多种功能，有研究^[11]表明，CD36 可能参与中性粒细胞吞噬作用的调控，有助于减轻缺血后的炎症反应，促进组织修复，还有研究^[12]发现 CD36 缺失可以延缓阿尔茨海默病认知功能的恶化。同时，有研究^[13]表明 CD36 参与脂质感知，但是具体作用机制仍不明确。

本研究结果发现，活血降糖饮具有良好的减重、调脂和减轻胰岛素抵抗的作用，这与本课题组以往研究结果类似。同时本研究还发现经高脂饮食诱导的

肥胖和胰岛素抵抗大鼠对膳食脂肪偏好明显增加，其海马组织中 CD36 蛋白表达也明显上调。经中药和二甲基胍干预后，这种改变被纠正。活血降糖饮下调海马组织 CD36 蛋白表达可能是其调控大鼠对膳食脂肪偏好的作用机制之一，但这两者之间的关联，以及胞内信号转导和蛋白表达的调控等具体作用机制，仍需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] YANG W, LU J, WENG J, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China[J]. N Engl J Med, 2010, 362(12):1090-1101.
- [2] TAKEDA M, IMAIZUMI M, SAWANO S, et al. Long-term optional ingestion of corn oil induces excessive caloric intake and obesity in mice[J]. Nutrition, 2001, 17(2):117-120.
- [3] TSURUTA M, KAWADA T, FUKUWATARI T, et al. The orosensory recognition of long-chain fatty acids in rats[J]. Physiol Behav, 1999, 66(2):285-288.
- [4] DREWNOWSKI A. Why do we like fat? [J]. J Am Diet Assoc, 1997, 97(7Suppl):S58-S62.
- [5] GETZ GS, REARDON CA. Nutrition and cardiovascular disease[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007, 27(12):2499-2506.
- [6] DESPRES JP, LEMIEUX I, BERGERON J, et al. Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008, 28(6):1039-1049.
- [7] WANG J, WANG Z, TANG G. TCM treatment of extrasystole with huanglian shengmai yin—a report of 357 cases [J]. J Tradit Chin Med, 2003, 23(1):35-37.
- [8] HAJRI T, ABUMRAD NA. Fatty acid transport across membranes: relevance to nutrition and metabolic pathology[J]. Annu Rev Nutr, 2002, 22(1):383-415.
- [9] LAUGERETTE F, Passilly-Degrace P, Patris B, et al. CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions [J]. J Clin Invest, 2005, 115(11):3177-3184.
- [10] PEPINO MY, LOVE-GREGORY L, KLEIN S, et al. The fatty acid translocase gene CD36 and lingual lipase influence oral sensitivity to fat in obese subjects[J]. J Lipid Res, 2012, 53(3):561-566.
- [11] BALLESTEROS I, CUARTERO MI, PRADILLO JM, et al. Rosiglitazone-induced CD36 up-regulation resolves inflammation by PPARgamma and 5-LO-dependent pathways[J]. J Leukoc Biol, 2014, 95(4):587-598.

（下转第 28 页）

- [6] 向建华,毛良平,韩鹏凯,等.沙美特罗替卡松联合金水宝胶囊治疗中度非急性发作期支气管哮喘 100 例临床观察[J].西部中医药,2013,26(5):97-99.
- [7] 裴复阳,柳明坤,宋晓萍,等.金水宝对支气管哮喘患者免疫功能的影响[J].航空航天医学杂志,2016,27(11):1349-1350.
- [8] 平丽红,曾令涛.金水宝胶囊联合麻黄桂枝汤加减辨治老年支气管哮喘急性发作期的疗效[J].中国老年学杂志,2015,35(8):2069-2070.
- [9] 王学亮,周传麟,卞明菊,等.金水宝胶囊对支气管哮喘患者几种免疫细胞因子的影响[J].中华肺部疾病杂志(电子版),2015,8(2):59-60.
- [10] 段兴,孙锋,沈柏蕊,等.金水宝胶囊联合布地奈德福莫特罗粉吸入剂治疗支气管哮喘的疗效观察[J].中国医院用药评价与分析,2017,17(3):321-323.
- [11] 王庆军,王燕.金水宝胶囊联合沙美特罗替卡松粉吸入剂对支气管哮喘患者临床疗效、肺功能及细胞免疫因子的影响[J].中国现代医学杂志,2017,27(7):117-120.
- (收稿日期:2017-12-15)

(上接第 25 页)

- [12] PARK L, WANG G, ZHOU P, et al. Scavenger receptor CD36 is essential for the cerebrovascular oxidative stress and neurovascular dysfunction induced by amyloid-beta [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(12): 5063-5068.
- [13] Su X, ABUMRAD NA. Cellular fatty acid uptake: a pathway under construction [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2009, 20(2): 72-77.
- (收稿日期:2017-11-30)