

基于GPR119/cAMP/GLP-1通路探讨葛根芩连汤的降糖机制

陈俊^{1,2*}, 钱紫星², 朱梦杨², 林晓², 葛亚梅²

(1. 湖北省中医院, 武汉 430061; 2. 湖北中医药大学, 武汉 430061)

[摘要] 目的:探讨葛根芩连汤(GGQL)对肠道上皮细胞增殖和凋亡的影响,并通过其对细胞环磷酸腺苷(cAMP),G蛋白偶联受体119(GPR119)表达的影响探讨其对胰高血糖素样肽-1(GLP-1)的影响和潜在降糖机制。方法:对25只Wistar大鼠按生药23 g·kg⁻¹,每天2次予以葛根芩连汤灌胃,每只大鼠每天灌胃6 mL,以制备含葛根芩连汤的血清,连续给药7次。用不同浓度葛根芩连汤含药血清(1%,2.5%,5%,7.5%,10%)培养肠道上皮L细胞系NCI-H716细胞;细胞增殖与活性检测(CCK-8)评估细胞增殖水平;流式细胞术检测细胞凋亡水平;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测细胞上清液中GLP-1,cAMP含量;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测GLP-1,GPR119 mRNA水平;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测GLP-1,GPR119蛋白表达水平。结果:与空白组比较,葛根芩连汤明显减少了NCI-H716细胞的增殖($P<0.05$),且随着葛根芩连汤浓度的增加,其抑制作用更加明显;每种浓度的葛根芩连汤均明显促进NCI-H716细胞凋亡($P<0.05$),并且与空白组比较,葛根芩连汤明显提高cAMP,GLP-1,GPR119的表达($P<0.05$)。葛根芩连汤的作用与其浓度呈正相关,其中10%葛根芩连汤表现出最好的作用。结论:葛根芩连汤可有效抑制NCI-H716的增殖并促进其凋亡,其可能通过上调cAMP,GPR119的表达而促进GLP-1的分泌。

[关键词] 葛根芩连汤; 肠道上皮细胞; 环磷酸腺苷(cAMP); 胰高血糖素样肽-1(GLP-1); G蛋白偶联受体119(GPR119); 2型糖尿病

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2022)03-0025-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220207

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211122.1940.004.html>

[网络出版日期] 2021-11-23 10:20

Hypoglycemic Mechanism of Gegen Qinliantang: An Exploration Based on GPR119/cAMP/GLP-1 Pathway

CHEN Jun^{1,2*}, QIAN Zi-xing², ZHU Meng-yang², LIN Xiao², GE Ya-mei²

(1. Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, China;

2. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of Gegen Qinliantang (GGQL) on the proliferation and apoptosis of intestinal epithelial cells as well as on the expression of cyclic adenosine monophosphate (cAMP), G protein-coupled receptor 119 (GPR119), and glucagon-like peptide-1 (GLP-1), so as to explore its potential hypoglycemic mechanism. **Method:** Twenty-five Wistar rats were gavaged with GGQL at the dose of 23 g·kg⁻¹ crude drug, twice a day, which meant that 6 mL was administered into each rat per day for preparing the GGQL-containing serum. After seven consecutive times of administration, the intestinal epithelial L (NCI-H716) cells were cultured with different concentrations (1%, 2.5%, 5%, 7.5%, and 10%) of GGQL. The cell proliferation was evaluated using cell counting kit-8 (CCK-8) and the apoptosis by flow cytometry. The GLP-1 and cAMP contents in cell supernatant were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA and protein GLP-1 and GPR119 levels were assayed by real-time fluorescence quantitative polymerase

[收稿日期] 20210827(014)

[基金项目] 湖北省自然科学基金项目(2018CFB546)

[通信作者] *陈俊,博士,副教授,副主任医师,硕士生导师,从事中医药防治内分泌代谢性疾病的研究,E-mail:chenjun1@hbhctm.com

chain reaction (Real-time PCR) and Western blot, respectively. **Result:** Compared with the control group, GGQL significantly reduced the proliferation of NCI-H716 cells ($P<0.05$). As the GGQL concentration increased, its inhibitory effect became more obvious. GGQL at each concentration significantly promoted the apoptosis of NCI-H716 cells ($P<0.05$). Compared with the control group, GGQL significantly up-regulated the expression of cAMP, GLP-1, and GPR119 ($P<0.05$). The results showed that the effect of GGQL was positively correlated with its concentration, and 10% GGQL exhibited the best effect. **Conclusion:** GGQL effectively inhibits the proliferation of NCI-H716 cells and promotes their apoptosis, and it may promote the secretion of GLP-1 by up-regulating the expression of cAMP and GPR119.

[Keywords] Gegen Qinliantang (GGQL); intestinal epithelial cells; cyclic adenosine monophosphate (cAMP); glucagon-like peptide-1 (GLP-1); G protein-coupled receptor 119 (GPR119); type 2 diabetes mellitus

糖尿病是一种严重危害人类健康的慢性代谢性疾病,尽管在过去的30年里,全世界糖尿病患者的死亡率和血管并发症发生率显著降低,甚至减少了一半,但糖尿病患者的死亡风险仍然相对增加了2倍^[1],是全球第九大主要死因^[2]。如何有效控制血糖,减少糖尿病并发症的发生和发展仍是目前亟待解决的问题。近年来,肠道内分泌L细胞分泌的G蛋白偶联受体119(GPR119),肠肽激素胰高血糖素样肽-1(GLP-1)逐渐引起了研究者的关注。GPR119在胰腺 β 细胞和肠道L细胞上表达,被激动后使细胞内细胞环磷酸腺苷(cAMP)的浓度增加,进一步促进胰岛素,GLP-1的分泌^[3]。GLP-1在进食后分泌增加,通过增加胰岛素分泌和抑制胰高血糖素释放来降低葡萄糖浓度。同时现代研究表明,GLP-1可以延缓胃排空、抑制食欲、抑制 β 细胞凋亡^[4],并且可显著降低糖尿病患者心血管病风险^[5]。所以,基于GPR119,GLP-1的药物目前已被逐渐开发应用于2型糖尿病的治疗。

葛根芩连汤是出自《伤寒论》的经典名方,配伍以葛根为君药,黄连、黄芩为臣药;甘草为佐使药,本为治疗邪热内陷之协热下利所创,临床研究发现,其可有效降低2型糖尿病患者血糖水平,并可与二甲双胍协同增强2型糖尿病患者的血糖控制^[6]。近年来有动物实验表明,葛根芩连汤可有效改善2型糖尿病大鼠的胰岛素抵抗^[7],并且对糖尿病大鼠左心室舒张功能障碍具有治疗作用^[8]。目前已有药理学研究证实部分中药如黄连及其部分活性成分能有效刺激小鼠GLP-1及胰岛素分泌^[9],然而中药复方对GLP-1影响及其机制研究仍较少。为探索其可能的降糖机制,本研究拟在前期的临床及基础研究上进行体外实验研究,以肠道上皮L细胞系NCI-H716细胞为模型,通过研究葛根芩连汤

对NCI-H716细胞株增殖和凋亡的影响,检测细胞上清液中环磷酸腺苷(cAMP),GLP-1含量,检测细胞表面GLP-1,GPR119 mRNA及蛋白表达等,探讨葛根芩连汤对L细胞分泌GLP-1的影响及促进GLP-1分泌的机制,从而明确经方治疗2型糖尿病的潜在作用靶点,为经方的临床运用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 采用SPF级8周龄雄性Wistar大鼠,动物来源于北京维通利华实验动物技术有限公司,动物质量许可证号SYXK(鄂)2018-0104,本实验获得武汉华联科生物技术有限公司动物伦理委员会批准(批准号HLK-20190612-01),实验过程符合动物伦理相关指导原则。

1.2 药物及试剂 葛根芩连汤,处方为葛根、黄芩、黄连、炙甘草(批号分别为901101,901111,901102,903004),药材饮片由湖北天济中药饮片有限公司提供,并经湖北中医药大学药学院刘合刚教授鉴定为正品;NCI-H716细胞(中国科学院上海细胞库,目录号TCHu210);戊巴比妥钠(美国Sigma公司,批号P3761);DMEM培养基,RPMI-1640培养基(美国Hyclone公司,货号分别为SH30022.01B,SH30809.01B);胎牛血清(美国Gibco公司,货号10270-106);磷酸盐缓冲液(PBS),0.25%胰蛋白酶,细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号分别为P1010,T1350,CA1210);AnnexinV-FITC/PI凋亡检测试剂盒(美国BD公司,货号556547);人cAMP,GLP-1酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(武汉贝茵莱生物科技有限公司,货号分别为HM10168, HM10799);TRIzol(美国Ambion公司,货号15596026);SYBR FAST实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(美

国 KAPA Biosystems 公司, 货号 KM4101); 逆转录酶试剂盒(日本 Takara 公司, 货号 2690A); 蛋白质 Marker(美国 Helix 公司, 货号 P12103); 十二烷基硫酸钠(SDS), TEMED, 过硫酸铵, Tween-20, RIPA(强)组织细胞快速裂解液, BCA 蛋白浓度测定试剂盒(美国 Solarbio 公司, 货号分别为 S8010, T8090, A1030-1, T8220-100, R0010, PC0020); PVDF 转移膜, 化学发光试剂(美国 Millipore 公司, 货号分别为 IPVH00010, WBKLS0500); GLP-1 抗体(英国 Abcam 公司, 货号 Ab23468); GPR119 抗体(美国 Novus 公司, 货号 NBP2-47661); 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体, 山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G 抗体, 山羊抗小鼠 IgG 抗体(武汉贝茵莱生物科技有限公司, 货号分别为 PAB36269, SAB43706, SAB43714)。

1.3 仪器 NovoCyte 型流式细胞仪(美国艾森公司); CFX-Connect 96 型 Real-time PCR 仪, mini protean 3 cell 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司); Tanon-520 型全自动化学发光分析仪(上海天能公司); MK3 型酶标仪(芬兰雷勃公司)。

2 方法

2.1 动物造模及给药 实验方法及造模参照文献[10-11]并加以改进, 采用 25 只 SPF 级 8 周龄雄性 Wistar 大鼠, 适应性喂养 1 周后, 大鼠测量体质量, 按照生药 23 g·kg⁻¹ 灌胃, 计算得所需中药生药总量, 依据《伤寒论》原条文, 葛根-黄芩-黄连-甘草 8:3:3:2。将全部中药浸泡 1 h 后, 加水 4 L, 武火烧开后, 文火煎煮 1 h, 最后再大火浓缩至生药含量 1.15 g·mL⁻¹。25 只大鼠连续灌胃 3.5 d, 每只大鼠每天灌胃 6 mL(分早晚各 3 mL), 每日灌胃 2 次(早晚相隔 12 h, 早 8 时、晚 8 时), 连续给药 7 次。

2.2 标本采集 最后 1 次灌胃后, 用 1% 戊巴比妥钠麻醉, 从腹主动脉采血, 血样静置 3 h 以上, 待血块收缩良好后, 1 500 r·min⁻¹ 离心 15 min(离心半径 9 cm, 下同); 无菌吸取上层含药血清, 56 °C 水浴灭活 30 min 后, 0.22 μm 微孔过滤器滤过除菌, 分装后, -80 °C 保存。

2.3 细胞培养及传代 将冻存的细胞从液氮罐中取出后, 移至 37 °C 水浴中, 使细胞迅速融化。待冻存液完全融化后, 将细胞悬液吸至离心管中, 加入完全培养基 4 mL, 400×g 离心 3 min, 弃上清, 细胞重新悬浮于 1 mL 培养基中, 转移至培养瓶中, 加入完全培养基 4 mL, 置于 37 °C, 5%CO₂ 的培养箱内培养。每 24 h 更换 1 次培养基。

2.4 CCK-8 检测细胞增殖情况 收集细胞, 用不完全培养基调整细胞悬液浓度, 分于 96 孔板, 3×10³ 个/孔, 每孔 100 μL。按照不同分组(空白组, 1%, 2.5%, 5%, 7.5%, 10% 含药血清)加入培养基, 继续培养 24 h。取出细胞培养板, 向每孔加入 CCK-8 溶液 10 μL, 继续培养 4 h。在酶联免疫检测仪 450 nm 处测量各孔的吸光度 A。

2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡 收集各组细胞, 取 1×10⁶ 个培养基重悬的细胞, 400×g, 4 °C 离心 5 min, 弃上清; 加入预冷 PBS 1 mL, 轻轻吹打混匀细胞, 400×g, 4 °C 离心 5 min, 弃上清; 将细胞重悬于 PBS 200 μL; 加入 Annexin V-FITC 10 μL 和 PI 10 μL, 轻轻混匀, 4 °C 避光孵育 30 min; 加入 PBS 300 μL, 随即进行流式检测。

2.6 ELISA 测定 cAMP, GLP-1 含量 测定 cAMP 含量: 准备小试管 6 只, 依次编好号码, 先在各小试管中加入对照品稀释液 100 μL, 依次稀释 320, 160, 80, 40 nmol·L⁻¹, 在酶标包被板上设对照品孔, 依次加入不同浓度的对照品 50 μL。在酶标包被板上待测样品孔中先加样品 40 μL, 然后再加生物素标记的抗 cAMP 抗体 10 μL。每孔加入酶标试剂 50 μL, 空白孔除外, 用封板膜封板后置 37 °C 温育 30 min, 将 30 倍浓缩洗涤液用蒸馏水 30 倍稀释后备用。揭掉封板膜, 弃去液体甩干, 每孔加满洗涤液, 静置 30 s 后弃去, 如此重复 5 次, 拍干。每孔先加入显色剂 A 50 μL, 再加入显色剂 B 50 μL, 轻轻震荡混匀, 37 °C 避光显色 10 min。每孔加终止液 50 μL, 终止反应。以空白孔调零, 450 nm 波长依序测量各孔的吸光度 A。检测范围 4~320 nmol·L⁻¹, 灵敏度 ≤ 0.8 nmol·L⁻¹。测定 GLP-1 含量: 准备小试管 6 只, 依次编好号码, 先在各小试管中加入对照品稀释液 100 μL, 依次稀释为 1 000, 500, 250, 125, 62.5, 0 ng·L⁻¹ 的质量浓度。余步骤同上, 检测范围 12.5~1 000 ng·L⁻¹。灵敏度 ≤ 2.5 ng·L⁻¹。

2.7 Real-time PCR 检测细胞表面 GPR119, GLP-1 mRNA 表达 取细胞沉淀 1×10⁶ 个/组织样本 100 mg, 使用 TRIzol 试剂 1 mL 提取总 DNA, 并使用逆转录酶试剂盒合成 cDNA, 将制备好的 cDNA 进行 PCR 扩增, PCR 扩增条件为 95 °C 预变性 3 min, 1 个循环; 95 °C 变性 5 s, 56 °C 退火 10 s, 72 °C 延伸 25 s, 40 个循环。采用 2^{-ΔΔC_T} 方法计算各组小鼠肠道 GPR119, GLP-1 mRNA 相对表达水平。引物由武汉天一辉远生物科技有限公司合成, 引物序列见表 1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
GPR119	上游 TCTCCGTACTGTGTCTGTT	233
	下游 GCACCTTCTTCACTCCTA	
GLP1	上游 AGCGAGGGGAAAGAAG	98
	下游 GGCGATAACCAGAGCA	
GAPDH	上游 CCACTCCTCCACCTTTG	106
	下游 CACCACCTGTTGCTGT	

2.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 GLP-1, GPR119蛋白表达 将蛋白质 20 μg 悬浮在十二烷基硫酸钠样品缓冲液中并煮沸 5 min。用含有聚丙烯酰胺的 12% 十二烷基硫酸钠分离等量的总蛋白质,然后电转移到聚偏二氟乙烯膜。在室温下用封闭缓冲液将膜饱和 1 h,并在 4 °C 下与抗 GLP-1(1:1 000),GPR119(1:2 000)的抗体孵育过夜。然后,用 Tris 缓冲盐水洗涤膜,并在室温下在山羊抗兔 IgG 二级抗体(1:2 万)或山羊抗小鼠 IgG 二级抗体(1:2 万)中培养 2 h。使用增强化学发光底物缓冲液通过比色反应观察免疫反应性。使用 Gel-Doz-EZ 成像仪扫描细胞膜,通过 TANON GIS 软件读取相关条带灰度值,以 GAPDH 作为内参,计算相对含量。

2.9 统计学分析 实验数据采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用单因素方差分析比较各组间差异, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 NCI-H716 细胞增殖的影响 与空白组比较,不同浓度葛根芩连汤组 NCI-H716 细胞的增殖明显降低($P < 0.05$),且随着葛根芩连汤药物浓度的增加,抑制作用更加明显。见表 2。

表2 葛根芩连汤对 NCI-H716 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of Gegen Qinliantang (GGQL) on cell proliferation in NCI-H716 cell ($\bar{x} \pm s, n=3$) %

组别	体积分数/%	12 h	24 h
空白		99.99±0.95	99.99±0.99
葛根芩连汤	1	90.25±1.11 ¹⁾	83.37±0.69 ¹⁾
	2.5	85.96±0.95 ¹⁾	82.94±0.74 ¹⁾
	5	80.07±0.76 ¹⁾	71.57±0.74 ¹⁾
	7.5	71.46±0.73 ¹⁾	68.55±1.10 ¹⁾
	10	72.23±0.64 ¹⁾	65.81±0.74 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$ (表 3~6 同)。

3.2 对 NCI-H716 细胞凋亡的影响 与空白组比较,不同浓度的葛根芩连汤均明显促进 NCI-H716 细胞凋亡($P < 0.05$),10% 的葛根芩连汤组凋亡率最高。见表 3。

表3 葛根芩连汤对 NCI-H716 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of GGQL on cell apoptosis in NCI-H716 cell ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	凋亡率/%
空白		7.07±0.27
葛根芩连汤	1	14.40±0.72 ¹⁾
	2.5	18.33±1.54 ¹⁾
	5	24.52±1.00 ¹⁾
	7.5	30.53±0.36 ¹⁾
	10	35.98±1.14 ¹⁾

3.3 对 NCI-H716 细胞分泌 cAMP, GLP-1 的影响 与空白组比较,不同浓度的葛根芩连汤均明显提高了 GLP-1 和 cAMP 的分泌量($P < 0.05$),其表达水平与葛根芩连汤的浓度呈正相关。见表 4。

表4 葛根芩连汤对 NCI-H716 细胞分泌 cAMP, GLP-1 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of GGQL on cell secretion of cAMP and GLP-1 in NCI-H716 cell ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	cAMP/nmol·L ⁻¹	GLP-1/ng·L ⁻¹
空白		56.60±0.50	148.44±3.32
葛根芩连汤	1	65.23±0.24 ¹⁾	194.65±1.52 ¹⁾
	2.5	78.47±0.31 ¹⁾	246.84±1.26 ¹⁾
	5	96.75±0.45 ¹⁾	264.89±0.60 ¹⁾
	7.5	101.27±0.49 ¹⁾	280.07±1.73 ¹⁾
	10	104.03±0.65 ¹⁾	334.81±0.85 ¹⁾

3.4 对 NCI-H716 细胞 GPR119, GLP-1 mRNA 表达的影响 与空白组比较,不同浓度的葛根芩连汤组均明显升高 GPR119, GLP-1 mRNA 的表达($P < 0.05$)。见表 5。

3.5 对 NCI-H716 细胞 GLP-1, GPR119 蛋白表达的影响 与空白组比较,不同浓度的葛根芩连汤均增加 GLP-1 和 GPR119 蛋白表达的水平($P < 0.05$),并存在剂量依赖性。见图 1,表 6。

4 讨论

2 型糖尿病是一种以慢性炎症、胰岛素抵抗和胰岛细胞损伤为特征的代谢性疾病,以慢性血糖升高为主要临床表现,若长期血糖控制不佳,极易引发多种并发症,严重影响生活质量,甚至导致死亡。GLP-1 是一种肠源性糖调节激素,由胰高血糖素原

表5 葛根芩连汤对NCI-H716细胞GPR119, GLP-1 mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of GGQL on GPR119 and GLP-1 mRNA expression in NCI-H716 cell ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	GPR119	GLP-1
空白		1.00±0.02	1.00±0.04
葛根芩连汤	1	1.38±0.03 ¹⁾	1.46±0.06 ¹⁾
	2.5	1.61±0.05 ¹⁾	2.14±0.10 ¹⁾
	5	2.07±0.17 ¹⁾	3.59±0.06 ¹⁾
	7.5	2.66±0.36 ¹⁾	4.84±0.50 ¹⁾
	10	3.06±0.25 ¹⁾	6.63±0.42 ¹⁾

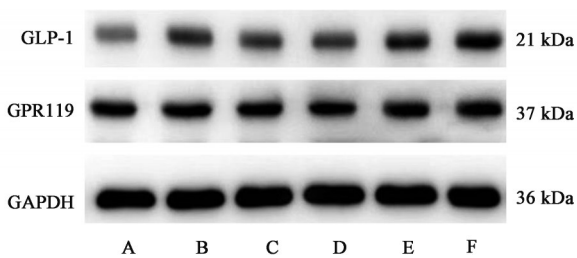


图1 各组GLP-1, GPR119蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of GLP-1 and GPR119 protein expression in each group

表6 葛根芩连汤对NCI-H716细胞GLP-1, GPR119蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of GGQL on expression of GLP-1 and GPR119 protein in NCI-H716 cell ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	GPR119/GAPDH	GLP-1/GAPDH
空白		0.535±0.002	0.181±0.001
葛根芩连汤	1	0.564±0.000 ¹⁾	0.325±0.001 ¹⁾
	2.5	0.580±0.001 ¹⁾	0.345±0.003 ¹⁾
	5	0.607±0.004 ¹⁾	0.365±0.002 ¹⁾
	7.5	0.641±0.004 ¹⁾	0.436±0.002 ¹⁾
	10	0.683±0.001 ¹⁾	0.557±0.001 ¹⁾

基因合成,通过肠内分泌L细胞分泌^[12],其受体广泛分布于胃肠道、胰腺、心脏、肾脏等多个器官^[13]。研究发现, GLP-1可在餐后期间以葡萄糖依赖性方式增加胰岛β细胞的胰岛素分泌^[14],此外, GLP-1可抑制胰高血糖素释放,并通过中枢机制促进饱腹感并延迟胃排空,减少餐后血糖波动^[4]。另外,有学者发现,低水平的GLP-1也是2型糖尿病的重要危险因素,2型糖尿病患者的空腹和餐后GLP-1水平显著降低,因此多种GLP-1受体激动剂(GLP-1RA)已经开发并应用于临床^[15]。由于其葡萄糖依赖性降糖机制,临床单独使用发生低血糖风险较低,并且通过大量实验研究证明, GLP-1RA对心脏和血管产生直接作用,并通过调节血糖、降低血压、控制血脂、

减少氧化应激等间接作用,可有效降低心血管病高危患者的心血管病风险^[5]。目前有研究表明, GLP-1RA对肾脏结局具有有益影响^[16],从长期来看, GLP-1RA有望防止糖尿病患者肾功能恶化^[17]。GPR119是一种G蛋白偶联受体,主要在人类的胰腺β细胞和胃肠道(肠内分泌细胞)中表达^[18], GPR119的激活会导致细胞内cAMP水平升高和肠促胰岛素释放,包括GLP-1, GIP和GLP-2^[19],在动物实验中证实GPR119激动剂会产生降低葡萄糖的作用,并伴有食物摄入减少和体质量减轻,目前已经有GPR119激动剂进入临床实验,是治疗2型糖尿病药物的新的靶点。本项研究表明,不同浓度葛根芩连汤均可显著提高NCI-H716细胞分泌GLP-1, cAMP,上调NCI-H716细胞对GLP-1和GPR119表达,且与药物浓度呈正相关,这表明葛根芩连汤的降糖作用可能与其激活GPR119-cAMP-GLP-1通路有关。

从现代药理学研究来看,葛根芩连汤全方由葛根、黄芩、黄连、甘草4味中药组成,其主要成分包括葛根素、葛根异黄酮、黄芩苷、小檗碱、甘草酸、甘草黄酮等^[20]。全方可通过多靶点、多个信号通路来发挥其改善胰岛素抵抗、改善糖脂代谢、抗氧化、抗炎等多种作用^[21-22]。本实验表明葛根芩连汤可通过上调GPR119, cAMP水平促进GLP-1表达发挥其降糖作用,然而中药降低血糖、改善胰岛素抵抗的机制是十分复杂的,是否有其他通路及靶点可促进GLP-1或胰岛素分泌及葛根芩连汤适用的中医证型仍需要进一步探索,以期更好地运用于临床治疗。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] STANDL E, KHUNTI K, HANSEN T B, et al. The global epidemics of diabetes in the 21st century: current situation and perspectives [J]. Eur J Prev Cardiol, 2019, 26(2): 7-14.

[2] ZHENG Y, LEY S H, HU F B. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications [J]. Nat Rev Endocrinol, 2018, 14(2): 88-98.

[3] CHU Z L, CARROLL C, ALFONSO J, et al. A role for intestinal endocrine cell-expressed G protein-coupled receptor 119 in glycemic control by enhancing glucagon-like Peptide-1 and glucose-dependent insulinotropic peptide release [J]. Endocrinology, 2008, 149(5): 2038-2047.

- [4] MEIER J J. GLP-1 receptor agonists for individualized treatment of type 2 diabetes mellitus [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2012, 8(12):728-742.
- [5] ANDREASEN C R, ANDERSEN A, KNOP F K, et al. How glucagon-like peptide 1 receptor agonists work [J]. *Endocr Connect*, 2021, 10(7):200-212.
- [6] RYUK J A, LIXIA M, CAO S, et al. Efficacy and safety of Gegen Qinlian decoction for normalizing hyperglycemia in diabetic patients: a systematic review and Meta-analysis of randomized clinical trials [J]. *Complement Ther Med*, 2017, 33:6-13.
- [7] 陈永强, 龚淑芳, 黄鑫, 等. 葛根芩连汤对胰岛素抵抗大鼠脂肪组织 FASN 酶活性及其基因表达和甲基化水平影响的初步研究 [J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(2):398-405.
- [8] HAN J, WANG Z, XING W, et al. Effect of Gegen Qinlian decoction on cardiac gene expression in diabetic mice [J]. *Int J Genomics*, 2017, doi: 10.1155/2017/7421761.
- [9] 魏世超, 徐丽君, 邹欣, 等. 黄连有效成分及其组合物对荷糖小鼠胰岛素和胰高血糖素样肽 1 (GLP-1) 分泌影响的初步研究 [J]. *中国医院药学杂志*, 2017, 37(14):1343-1347.
- [10] 章常华, 邓可众, 于梅, 等. 葛根芩连汤含药血清对 HepG2 肝细胞胰岛素抵抗模型糖代谢的调节作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(5):120-123.
- [11] 刘文科. 从 G 蛋白偶联受体 119 表达探讨清热降浊方调控 GLP-1 分泌的分子机制 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2013.
- [12] ESCALADA F J. The physiology of glucagon-like peptide-1 and its role in the pathophysiology of type 2 diabetes mellitus [J]. *Med Clin*, 2014, 143(2):2-7.
- [13] RICARDO-SILGADO M L, MCRAE A, ACOSTA A. Role of enteroendocrine hormones in appetite and glycemia [J]. *Obes Med*, 2021, 23:100332.
- [14] REED J, BAIN S, KANAMARLAPUDI V. Recent advances in understanding the role of glucagon-like peptide 1 [J]. *F1000Res*, 2020, 9:239.
- [15] LASTYA A, SARASWATI M R, SUASTIKA K. The low level of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) is a risk factor of type 2 diabetes mellitus [J]. *BMC Res Notes*, 2014, 7:849.
- [16] KAWANAMI D, TAKASHI Y. GLP-1 receptor agonists in diabetic kidney disease: from clinical outcomes to mechanisms [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11:967.
- [17] VENETI S, TZIOMALOS K. Is there a role for glucagon-like peptide-1 receptor agonists in the management of diabetic nephropathy? [J]. *World J Diabetes*, 2020, 11(9):370-373.
- [18] OVERTON H A, FYFE M C, REYNET C. GPR119, a novel G protein-coupled receptor target for the treatment of type 2 diabetes and obesity [J]. *Br J Pharmacol*, 2008, 153(1):76-81.
- [19] ZHAO J, ZHAO Y, HU Y, et al. Targeting the GPR119/ incretin axis: a promising new therapy for metabolic-associated fatty liver disease [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2021, 26(1):32.
- [20] 陈俊, 陈聪, 彭小芝, 等. 基于 UPLC-Q/TOF-M/MS 的葛根黄芩黄连汤主要成分分析及鉴定 [J]. *中药材*, 2019, 42(9):2074-2078.
- [21] 张昌林, 吴荣焕, 盛泓沁, 等. 基于网络药理学的葛根芩连汤治疗 2 型糖尿病的效应机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(19):179-188.
- [22] 王雅婷, 兰丽珍. 葛根芩连汤治疗糖尿病骨质疏松大鼠的效果及机制 [J]. *世界中医药*, 2020, 15(12):1724-1728.

[责任编辑 周冰冰]