

夏枯草提取物对2型糖尿病ZDF大鼠肝糖原代谢的影响

田硕¹, 刘铜华^{2*}, 孙文³, 吴丽丽³, 秦灵灵³, 侯毅⁴, 董笑克⁴, 乐海波⁴, 洪明昭⁵

(1. 陕西中医药大学第一临床医学院, 陕西 咸阳 712000;

2. 北京中医药大学研究生院, 北京 100029;

3. 北京中医药大学教育部中医养生学重点实验室, 北京 100029;

4. 北京中医药大学东方医院, 北京 100078; 5. 深圳市光明新区人民医院, 广东 深圳 518106)

[摘要] 目的: 观察自发性2型糖尿病(T2DM)大鼠 Zucker diabetic fatty(ZDF)(fa/fa)与ZDF(fa/+)及夏枯草提取物干预后,ZDF(fa/fa)肝糖原含量及糖原合成酶(GSY2),葡萄糖-6-磷酸酶(G-6-P)和葡萄糖转运蛋白2(GLUT2)基因表达的影响,探讨其调节肝糖原可能的机制。方法:以ZDF(fa/fa)大鼠16只为动物模型,分为模型组及夏枯草提取物组(12.25 mg·kg⁻¹·d⁻¹),每组8只,另取ZDF瘦型大鼠8只为正常组。每2周测大鼠空腹血糖(FBG)和体重,第8周进行口服葡萄糖耐量试验(OGTT),灌胃给药8周后腹主动脉取血,处死大鼠,留取肝脏组织-80℃储存及蜡块包埋备用。酶联免疫吸附法(ELISA)测定大鼠血清胰岛素(FINS)含量,过碘酸雪夫染色法(PAS染色法)检测肝糖原含量,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)法检测GSY2,G-6-P和GLUT2 mRNA表达。结果:给药8周后,与模型组比较,夏枯草提取物明显增加大鼠肝糖原含量,降低大鼠体重($P < 0.05$, $P < 0.01$)和空腹血糖($P < 0.05$, $P < 0.01$),改善葡萄糖耐量($P < 0.05$),降低HOMA-IR指数($P < 0.01$),上调肝脏组织GSY2,GLU2 mRNA表达($P < 0.05$),下调G-6-P mRNA表达($P < 0.05$)。结论:夏枯草提取物具有增加大鼠肝糖原含量的作用,且能降低大鼠体重、血糖和胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)指数。夏枯草提取物可能通过上调肝脏组织GSY2和GLU2 mRNA表达,下调G-6-P mRNA表达而发挥作用。

[关键词] 夏枯草提取物; Zucker diabetic fatty (ZDF); 2型糖尿病; 肝糖原; 胰岛素抵抗

[中图分类号] R22;R2-031;R285.5;R242 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)10-101-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180815

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180123.1515.003.html>

[网络出版时间] 2018-01-24 17:22

Effect of Prunellae Spica Extracts on Hepatic Glycogen in ZDF Rats

TIAN Shuo¹, LIU Tong-hua^{2*}, SUN Wen³, WU Li-li³, QIN Ling-ling³, HOU Yi⁴,
DONG Xiao-ke⁴, YUE Hai-bo⁴, HONG Ming-zhao⁵

(1. First Clinical Medical College, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712000, China;

2. Graduate School, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

3. Health Cultivation Laboratory of the Ministry of Education, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 4. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China;

5. Guangming New District People's Hospital, Shenzhen 518106, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Prunellae Spica extracts on hepatic glycogen, and the gene expressions of glycogen synthase 2 (GSY2), glucose-6-phosphatase (G-6-P) and glucose transporter 2 (GLUT2) in Zucker diabetic fatty rats (ZDF, fa/fa) and ZDF (fa/+) with spontaneous type 2 diabetes. **Method:** Totally 16 male ZDF (fa/fa) rats were randomly divided into control group (Con) and treatment group

[收稿日期] 20171122(005)

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2014BAI10B04)

[第一作者] 田硕,在读硕士,从事中医药防治内分泌的研究,E-mail:583049134@qq.com

[通信作者] *刘铜华,博士,教授,从事中医药防治糖尿病及其并发症的临床和基础研究,Tel:010-64286642,E-mail:thliu@vip.163.com

(*Prunellae Spica* extracts, PS). And 8 male ZDF (fa/+) rats were used as normal group (Nor). Treatment group were orally administered with PS (12.25 mg·kg⁻¹·d⁻¹) for 8 weeks. Fasting blood glucose (FBG) and body weight were measured every other week. Oral glucose tolerance test (OGTT) was tested in the 8th week. After 8 weeks, blood was taken from the abdominal aorta, and livers were collected and stored at -80 °C. Fasting serum insulin (FINS) was tested by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), hepatic glycogen amount was tested by Periodic Acid-Schiff stain (PAS stain), GSY2, G-6-P and GLUT2 gene expressions were tested by Real-time PCR. **Result:** Compared with control group, the content of hepatic glycogen, HOMA-IR index and gene expressions of GSY2 and GLU2 were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while the body weight, blood glucose and gene expression of G-6-P were dramatically decreased in PS group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** *Prunellae Spica* extracts can increase the content of hepatic glycogen, and decrease body weight, blood glucose and HOMA-IR index in ZDF rats. *Prunellae Spica* extracts may play an important role in regulating the gene expressions of GSY2, GLU2 and G-6-P.

[**Key words**] extracts of *Prunellae Spica* extracts (PS); Zucker diabetic fatty (ZDF); type 2 diabetes mellitus; hepatic glycogen; insulin resistance

2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)是一种以高血糖为特征的代谢紊乱性疾病,可引起心、脑、肾、眼和神经病变等严重并发症^[1]。其高发病率、高致残率及高死亡率已严重威胁人类的健康与发展,同时造成了巨大的经济负担。研制经济有效的降糖药物已成为当代糖尿病防治的重大课题。糖代谢异常是T2DM的主要病理因素,主要表现为机体对葡萄糖的利用减少和肝糖原输出增多两个方面。机体的糖代谢受一系列酶促反应调控,因此研究糖代谢酶对糖尿病的防治具有重要意义。

现代研究发现夏枯草主要化学成分包括三萜类(主要包括齐墩果酸和熊果酸等)、甾体类、黄酮类和苯丙素类等,具有降血糖、降血压、抗肿瘤等广泛药理作用^[2]。有研究观察到齐墩果酸有增加肝糖原含量的作用^[3],熊果酸具有改善大鼠糖代谢的作用^[4]。但是其作用机制尚未完全清楚。本实验拟通过观察夏枯草提取物对ZDF大鼠肝糖原含量的影响,以及对糖原合成酶(glycogen synthase 2, GSY2),葡萄糖-6-磷酸酶(glucose-6-phosphatase, G-6-P),葡萄糖转运蛋白2(glucose transporter 2, GLUT2)mRNA表达的影响,探讨其对肝糖原及相关糖原代谢酶的作用,以进一步研究其降糖机制。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性糖尿病成模ZDF大鼠ZDF(fa/fa)16只,和ZDF瘦型大鼠ZDF(fa/+)8只,购自北京维通利华实验技术有限公司,合格证号SCXK(京)2016-0006,11周龄,ZDF(fa/fa)糖尿病大鼠体质量320~380 g,ZDF(fa/+)正常组大鼠体质量280~300 g。由中国中医科学院中医基础理论研

究所实验动物中心饲养,饲养于温度(21±2)°C,湿度(60±10)% ,12 h/12 h光照黑暗循环。

1.2 药物 夏枯草由西安康诺化工有限公司药师王杰鉴定为唇形科植物夏枯草 *Prunella vulgaris* 的干燥果穗。夏枯草提取物制备,取夏枯草干燥果穗粉碎为粗粉,加15倍量提取用水,常压下加热回流提取2次,每次1.5 h,过滤,滤液在-80 °C条件下真空浓缩,以上浓缩液,加2倍量95%乙醇充分混匀,静置过夜,过滤,滤液30 °C条件下减压浓缩为相对密度为1.07~1.11的浓缩液,干燥后得黄棕色粉末,即得夏枯草提取物。提取比例30:1,皂苷质量分数21.3%,夏枯草提取物由西安康诺化工有限公司提供,批号KN161009。

1.3 试剂及仪器 血糖试纸(日本京都公司,批号GT1941);戊巴比妥钠(德国默克公司,批号57330);大鼠胰岛素酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(美国Alpco公司,批号80-INSRTU-E01);苏木素,PAS染色试剂盒(Solarbio公司,批号分别为G1140,NO20160530);逆转录试剂盒(美国Promega公司,批号00002315333);GoTaq® PCR Master Mix(美国Thermo公司,批号00076581)。

GT-1810型血糖仪(日本京都公司),Avantij-25I型低温真空高速离心机(美国Beckman公司),L340099型光学显微镜(日本Olympus公司);7500型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国Applied Biosystems公司);MULT+型酶标仪(美国Promega公司)。

2 方法

2.1 动物模型的建立 适应性喂养1周后,尾尖取

血法测随机血糖,以不连续 2 d 随机血糖均 $\geq 11.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,且血糖水平稳定为 T2DM 成模大鼠^[5],共 16 只。

2.2 分组及给药 以雄性 ZDF(fa/+)大鼠 8 只为正常组。ZDF 成模大鼠 ZDF(fa/fa) 16 只按体质量及空腹血糖(FBG)分层随机分为模型组和夏枯草提取物组,每组 8 只。夏枯草提取物组予夏枯草提取物粉末用蒸馏水溶解并超声至完全溶解,按 $12.25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 标准以 $0.01 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 体积灌胃,该剂量根据 2015 年版《中国药典》记载临床最大成人剂量^[6]以及人鼠等效剂量换算(体表面积折算法);模型组和正常组每日灌服等量蒸馏水,连续 8 周。大鼠每周测 FBG,每 2 周称重 1 次普通饲料自由择食,正常饮水。

2.3 观察指标及检测方法

2.3.1 观察大鼠一般情况 实验期间观察大鼠精神状态、毛色及活动情况;每周检测大鼠 FBG 水平,每 2 周测大鼠体质量,检测前 12 h 禁食不禁水,次日清晨尾尖取血法测 FBG。

2.3.2 口服葡萄糖耐量实验(OGTT) 给药 8 周末,各组大鼠禁食 12 h 后(期间自由饮水),于第 2 天清晨 8:00 开始称体质量,尾尖取血法测 FBG。按 $2.0 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 给予葡萄糖灌胃,并分别于糖负荷后 30, 60, 120 min 采取血样标本,根据所测得 FBG 值绘制 OGTT 曲线及计算曲线下面积曲线下面积(AUC)。

$$\text{AUC} = 0.5(\text{FBG } 0 \text{ min} + \text{FBG } 30 \text{ min})/2 + 0.5 \times (\text{FBG } 30 \text{ min} + \text{FBG } 60 \text{ min})/2 + 1 \times (\text{FBG } 60 \text{ min} + \text{FBG } 120 \text{ min})/2$$

2.3.3 标本的采集与处理 灌胃 8 周后,所有大鼠禁食 12 h,称体质量,予 1% 戊巴比妥钠 $0.04 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 腹腔注射麻醉,腹主动脉取血, $3\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min,分离血清, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冻存备用。取肝组织 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冻存,另取 4% 的多聚甲醛固定,石蜡包埋、切片。

2.3.4 血清胰岛素水平测定及胰岛素抵抗指数计算 大鼠胰岛素 ELISA 试剂盒检测血清胰岛素,采用 $25 \text{ }\mu\text{L}$ 体系,依次加入对照品、控制样品和待检血清样品 $25 \text{ }\mu\text{L}$,每孔加入酶标抗体 $75 \text{ }\mu\text{L}$,在摇床上室温孵育 2 h,洗板 6 次,按每孔加入底物液 $100 \text{ }\mu\text{L}$,在摇床上室温反应 30 min,每孔加入终止液 $100 \text{ }\mu\text{L}$ 。在酶标仪上于 450 nm 检测吸光度 A。根据标准品 A 与浓度绘制标准曲线,计算血清胰岛素含量。计算 HOMA-IR 指数胰岛素抵抗指数, $\text{HOMA-IR} = \text{FBG} \times \text{空腹胰岛素}/22.5$ ^[4]。

2.3.5 肝糖原染色 用 PAS 染色法测定肝糖原含

量,取肝组织石蜡切片脱蜡至水,去离子水浸洗后,浸入过碘酸溶液中,室温放置 8 min,自来水冲洗 1 次,去离子水浸洗 2 次。样本放入 Schiff 试剂,避光浸染 15 min,自来水冲洗 10 min,用苏木素染色液复染细胞核 2 min,再用 1% 盐酸-乙醇分化;自来水冲洗 10 min 返蓝,逐级常规乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。显微镜下肝糖原显示为紫红色糖原颗粒,细胞核显示为蓝色,细胞质显示为深浅不一的红色。显微镜观察并拍照,用 Image-Pro Plus 6.0 软件统计肝糖原含量。

2.3.6 Real-time PCR 检测 GSY2, G-6-P, GLUT2 mRNA 表达 取冻存肝脏组织,用 trizol 提取总 RNA,使用逆转录试剂盒进行逆转录,得到 cDNA。PCR $20 \text{ }\mu\text{L}$ 反应体系:引物 $18 \text{ }\mu\text{L}$ + 样品 $2 \text{ }\mu\text{L}$,置于 Applied Biosystems 7500 Real-time PCR System 进行反应,反应条件: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 min; $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min(共 40 次循环); $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 s 溶解。反应条件参照说明书设定,再以内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)校正,求得目的基因相对表达水平。引物由北京百奥思科生物医学技术有限公司合成,见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Sequence of primer

引物	序列	长度/bp
GSY2	上游 5'-CCCTACCGGTACGGTATTT-3'	151
	下游 5'-ATCTGAAAGCCTCTCGGTGC-3'	
G-6-P	上游 5'-CGTCACCTGTGAGACTGGAC-3'	144
	下游 5'-ACGACATTCAAGCACCGGAA-3'	
GLUT2	上游 5'-GCATCGCCACACCTAAAGGA-3'	162
	下游 5'-GGGCACTGGTCTTTTCCTTGG-3'	
GAPDH	上游 5'-GTTACCAGGGCTGCCTTCTC-3'	168
	下游 5'-GGGTTTCCCGTTGATGACC-3'	

2.4 统计学方法 所有数据采用 SPSS 16.0 软件进行单因素方差分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,针对不符合正态分布数据,两两比较使用两个独立样本的非参数检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对 ZDF 大鼠一般情况及体质量的影响 给药 8 周期间,正常组大鼠毛色光滑,饮食饮水正常,垫料干燥,模型组大鼠明显出现多食、多饮、多尿的症状,垫料潮湿,夏枯草提取物组大鼠较模型组状态有较明显的改善。

3.2 对 ZDF 大鼠体质量的影响 与正常组比较,模型组及夏枯草提取物组大鼠体质量明显升高

($P < 0.05, P < 0.01$), 证明 ZDF (fa/fa) 大鼠模型稳定; 给药前, 夏枯草提取物组大鼠体质量与模型组无统计学差异, 与模型组比较, 治疗第 4~8 周, 夏枯草

提取物明显降低大鼠体质量 ($P < 0.05, P < 0.01$), 表明夏枯草提取物具有改善 ZDF (fa/fa) 大鼠肥胖状态的作用。见表 2。

表 2 夏枯草提取物对 ZDF 大鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of *Prunellae Spica* extracts on level of body weight in ZDF rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	给药前	2 周	4 周	6 周	8 周
正常	-	297.88 ± 2.01	310.57 ± 3.48	321.95 ± 2.44	346.00 ± 2.20	359.00 ± 6.57
模型	-	346.56 ± 5.21 ²⁾	365.16 ± 6.09 ²⁾	373.43 ± 4.99 ²⁾	380.37 ± 6.76 ²⁾	386.00 ± 8.04 ²⁾
夏枯草提取物	12.25	344.47 ± 17.3	354.73 ± 15.28	355.10 ± 17.35 ³⁾	359.87 ± 17.94 ³⁾	369.87 ± 23.97 ³⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~7 同)。

3.3 对 ZDF 大鼠 FBG 的影响 与正常组比较, 模型组 FBG 水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比

较, 在给药第 4 周后, 夏枯草提取物可降低 FBG 水平 ($P < 0.05$), 见表 3。

表 3 夏枯草提取物对 ZDF 大鼠 FBG 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effect of *Prunellae Spica* extracts on level of FBG in ZDF rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	给药前	2 周	4 周	6 周	8 周
正常	-	3.74 ± 0.76	4.78 ± 0.35	4.64 ± 0.45	5.04 ± 0.30	6.34 ± 0.62
模型	-	16.20 ± 1.56 ²⁾	17.95 ± 1.45 ²⁾	24.08 ± 0.77 ²⁾	25.93 ± 1.14 ²⁾	29.17 ± 1.59 ²⁾
夏枯草提取物	12.25	13.74 ± 4.24	14.40 ± 4.12	20.91 ± 2.04 ³⁾	23.01 ± 2.24 ³⁾	25.17 ± 4.61 ³⁾

3.4 对 ZDF 大鼠糖耐量的影响 与正常组比较, 模型组各时间点的血糖, AUC 均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 夏枯草提取物组 60, 120 min

时血糖明显降低 ($P < 0.05$), 其糖耐量曲线下面积 AUC 明显降低 ($P < 0.05$)。表明夏枯草提取物具有改善 ZDF (fa/fa) 大鼠葡萄糖耐量的作用。见表 4。

表 4 夏枯草提取物对 ZDF 大鼠糖耐量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Effect of *Prunellae Spica* extracts on glucose tolerance in ZDF rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	血糖/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$				AUC
		0 min	30 min	60 min	120 min	
正常	-	4.80 ± 0.52	7.30 ± 0.38	7.73 ± 0.53	5.58 ± 0.71	13.43 ± 0.53
模型	-	24.11 ± 0.71 ²⁾	32.16 ± 1.57 ²⁾	31.71 ± 1.46 ²⁾	28.38 ± 1.59 ²⁾	60.08 ± 1.91 ²⁾
夏枯草提取物	12.25	20.91 ± 2.04 ⁴⁾	29.74 ± 3.42	28.53 ± 2.40 ³⁾	25.99 ± 2.13 ³⁾	54.48 ± 4.02 ³⁾

3.5 对 ZDF 大鼠胰岛素水平及 HOMA-IR 的影响 与正常组比较, 模型组血清胰岛素增多, HOMA-IR 升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 夏枯草提取物可降低血清胰岛素水平和 HOMA-IR ($P < 0.01$)。表明夏枯草提取物具有提高 ZDF (fa/fa) 大鼠胰岛素敏感性, 改善其胰岛素抵抗的作用。见表 5。

表 5 夏枯草提取物对 ZDF 大鼠 FINS 水平及 HOMA-IR 指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 5 Effect of *Prunellae Spica* extracts on FINS levels and HOMA-IR in ZDF rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	胰岛素/ $\text{mU} \cdot \text{L}^{-1}$	HOMA-IR
正常	-	15.59 ± 1.37	4.41 ± 0.72
模型	-	22.58 ± 1.78 ²⁾	29.22 ± 2.06 ²⁾
夏枯草提取物	12.25	18.27 ± 2.82 ⁴⁾	20.69 ± 5.92 ⁴⁾

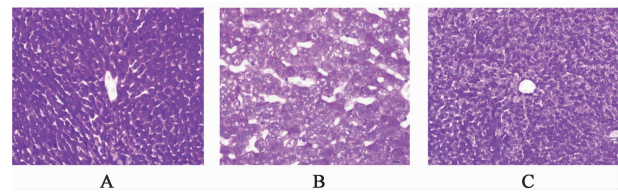
3.6 对 ZDF 大鼠肝糖原含量的影响 与正常组比较, 模型组肝脏糖原染色面积显著减少 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 夏枯草提取物组肝脏糖原染色面积显著增加 ($P < 0.01$)。表明夏枯草提取物具有提高 ZDF (fa/fa) 大鼠肝糖原含量的作用, 见表 6。各组

大鼠肝脏组织经 PAS 染色后, 光镜下可见正常组大鼠肝细胞结构致密完整, 排列整齐, 未见明显脂滴,

糖原染成紫红色,细胞间及细胞内染色明显饱满、均匀;模型组大鼠肝脏细胞结构破坏,排列紊乱,有大量脂滴形成,紫红色糖原颗粒明显减少,分布稀疏且不均匀。与模型组比较,夏枯草提取物改善肝脏细胞破坏,减少脂滴形成,肝糖原颗粒较模型组增多,分布比较均匀,但不及正常组(图 1)。表明夏枯草提取物不仅具有提高 ZDF(fa/fa)大鼠肝糖原含量的作用,而且具有调节糖脂代谢,减少肝细胞破坏的作用。

表 6 夏枯草提取物对 ZDF 大鼠肝糖原染色面积的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Table 6 Effect of *Prunellae Spica* extracts on hepatic glycogen amounts in ZDF rats($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	PAS 染色相对面积
正常	-	0.402 ± 0.008
模型	-	0.218 ± 0.010 ²⁾
夏枯草提取物	12.25	0.270 ± 0.012 ⁴⁾



A. 正常组; B. 模型组; C. 夏枯草提取物组

图 1 夏枯草提取物对 ZDF 大鼠肝糖原染色的影响(PAS, ×200)
Fig. 1 Effect of *Prunellae Spica* extracts on hepatic glycogen in ZDF rats(PAS, ×200)

3.7 对 ZDF 大鼠 GSY2, G-6-P, GLU2 mRNA 表达的影响 与正常组比较,模型组肝组织 GSY2, GLUT2 mRNA 表达显著降低($P < 0.01$), G-6-P mRNA 表达显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,夏枯草提取物显著降低肝组织 G-6-P mRNA 表达($P < 0.01$),并提高 GSY2, GLU2 mRNA 表达($P < 0.01$)。表明夏枯草提取物不仅具有提高 ZDF(fa/fa)大鼠肝糖原含量的作用,而且可能具有调节糖脂代谢,减少肝细胞破坏的作用。见表 7。

表 7 夏枯草提取物对 ZDF 大鼠 GSY2, G-6-P, GLU2 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 7 Effect of *Prunellae Spica* extracts on GSY2, G-6-P and GLU2 mRNA in ZDF rats($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	GSY2	G-6-P	GLU2
正常	-	1.25 ± 0.32	0.20 ± 0.14	0.91 ± 0.28
模型	-	0.28 ± 0.11 ²⁾	0.94 ± 0.16 ²⁾	0.07 ± 0.01 ²⁾
夏枯草提取物	12.25	0.85 ± 0.49 ⁴⁾	0.44 ± 0.06 ⁴⁾	0.37 ± 0.19 ⁴⁾

4 讨论

T2DM 发病机制复杂,包括胰岛素绝对缺乏和胰岛素抵抗(IR)导致的胰岛素相对缺乏,IR 程度逐渐加重也是 T2DM 特征之一^[7]。当肝 IR 时,胰岛素促进肝糖原合成、抑制肝糖原输出的能力下降,使肝脏糖异生和肝糖原分解增加,肝糖原合成减少和外周组织对葡萄糖的利用减少,导致病理性高血糖^[8]。

夏枯草,《本草纲目》^[9]记载:味苦、辛,性寒,归肝、胆经,无毒。2015 年版《中国药典》收录的夏枯草为唇形科植物夏枯草的干燥果穗,其药理作用广泛,具有清肝泻火、明目、散结消肿的功能。有研究显示夏枯草可能通过修复 β 细胞,调节糖脂代谢或增加胰岛素敏感性等机制起到的降糖作用^[10-11],夏枯草水提物可以通过抑制肠道 α -糖苷酶类而延缓糖尿病小鼠单糖吸收^[12]。齐墩果酸可能通过增加肝糖原合成和抑制糖苷酶活性而起到改善糖耐量的作用。熊果酸有改善糖尿病大鼠糖脂代谢的作用。ZDF 大鼠是自发的肥胖 T2DM 动物模型,有明显的糖脂代谢紊乱,糖耐量异常,高胰岛素血症,同时出现胰岛素耐量增加和胰岛素敏感性降低,是理想的研究胰岛素抵抗的动物模型^[13]。本实验结果显示,经过 8 周干预,夏枯草提取物可以改善模型大鼠的一般情况,第 4 周起明显降低模型大鼠的体质量和空腹血糖,显著改善模型大鼠第 8 周葡萄糖耐量,降低模型大鼠血清胰岛素水平,并提高 HOMA-IR 指数,显著增加模型大鼠肝糖原含量。

肝脏是糖原合成和分解的重要场所,通过调节肝糖原合成和分解,缓冲进食与空腹对血糖水平的影响,使血糖保持相对稳定,保证组织器官正常生理功能。有研究证实糖尿病患者肝糖原含量较健康人明显减少^[14]。肝糖原代谢过程受到一系列复杂的酶促反应调节。当血糖水平较高时,血液中不能被完全消耗的葡萄糖以糖原的形式储存起来;当血糖水平较低时,糖原分子又会经酶促反应最终水解成单个的葡萄糖分子维持葡萄糖稳态^[15]。在这个过程中,葡萄糖合成酶(GSY)和 G-6-P 分别是糖原合成和分解的重要限速酶。GSY 已鉴定出骨骼肌型(GSY1)和肝型(GSY2)2 种同功酶,且 GSY2 仅存在于肝组织中^[16]。G-6-P 是一种水解磷酸化合物的磷酸酶,在糖原分解和糖异生的最后一步反应中扮演重要的角色^[17]。在肝组织中,它通过水解 G-6-P 释放葡萄糖入血。本实验观察到,与正常组比较,干预 8 周后,模型组大鼠肝糖原含量明显下降,

GSY2 mRNA 明显降低,而 G-6-P mRNA 明显升高;与模型组比较,夏枯草提取物组大鼠肝糖原含量显著增加,上调 GSY mRNA 表达量,同时下调 G-6-P mRNA 表达量。提示夏枯草提取物具有促进肝糖原合成而抑制肝糖原分解,从而提高肝组织糖原含量的作用。

而葡萄糖转运进入肝细胞的过程需要 GLUT 的介导。GLUT 是细胞膜上的跨膜糖蛋白,介导细胞内外的葡萄糖相互转运^[18],主要依靠与钠耦联的主动转运或易化扩散,这种转运功能取决于细胞的类型与代谢状态^[15,19]。肝脏是 GLUT2 主要分布组织之一,GLUT2 占肝细胞葡萄糖载体蛋白的 97% 以上,主要负责肝脏组织中的葡萄糖的转运^[20]。在血糖正常时,GLUT2 分子对葡萄糖转运能力较低;但伴随血糖浓度升高,GLUT2 对葡萄糖转运能力也随之升高^[21]。当机体血糖水平升高时,GLUT2 顺浓度梯度将葡萄糖转运进入肝细胞,提高组织对葡萄糖利用率,以降低血糖;其数量减少或活性下降可使肝葡萄糖摄取减少,输出增加,加重肝 IR。另一方面,GLUT2 分子也是葡萄糖刺激胰岛素分泌的一个关键因子,Motoyoshi 等^[22]发现 GLUT2 和葡萄糖激酶在啮齿类动物细胞系中是葡萄糖刺激胰岛素分泌的必要条件。当 GLUT2 表达量或活性降低时,胰岛 β 细胞受葡萄糖刺激分泌胰岛素的能力下降。本实验中,模型组大鼠 GLUT2 mRNA 表达量较正常组明显下降,夏枯草提取物明显提高模型组大鼠 GLUT2 mRNA 表达量。表示夏枯草提取物可能通过上调 GLUT2 mRNA 表达量从而调节肝脏糖代谢,提高组织对葡萄糖利用率,以及改善胰岛 β 细胞功能。

综上所述,夏枯草提取物可能通过调节 ZDF (fa/fa) 大鼠肝组织 GSY2, G-6-P, GLUT2 mRNA 表达,提高了组织对葡萄糖的利用率,同时促进肝糖原合成,抑制肝糖原分解,增加肝糖原含量,同时改善胰岛 β 细胞功能。从而改善 ZDF 大鼠 IR。

[参考文献]

[1] CHEN L, Magliano D J, Zimmet P Z. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus-present and future perspectives [J]. Nat Rev Endocrinol, 2011, 2012, 8(4):228-236.

[2] 李咏梅,肖冰梅. 夏枯草的药用研究概述[J]. 中国医药指南, 2013, 11(19):479-480.

[3] 洪峰,胡静娜. 齐墩果酸对糖尿病大鼠糖耐量及肝糖原的影响[J]. 海峡药学, 2013, 25(2):27-29.

[4] 石亚静,张欢,李云翠,等. 熊果酸对糖尿病大鼠一般表征和糖脂代谢的影响[J]. 中国执业药师, 2016, 13

(7):25-30.

[5] 中国 2 型糖尿病防治指南(2013 年版)[J]. 中国糖尿病杂志, 2014, 22(8):2-42.

[6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015:1233-1234.

[7] 张敬升,王晓婉,张广霞,等. 小檗碱对 3T3-L1 前脂肪细胞及其胰岛素抵抗模型的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(22):145-149.

[8] 施亚雄. 肝脏胰岛素抵抗[J]. 中华糖尿病杂志, 2010, 2(4):308-309.

[9] 李时珍. 本草纲目[M]. 北京:人民卫生出版社, 1979:957.

[10] 李晔,籍保平,郑杰,等. 夏枯草提取物对链脲菌素致糖尿病 ICR 小鼠血糖及血脂影响[J]. 食品科学, 2006, 27(6):212-215.

[11] ZHENG J, HE J, JI B. Antihyperglycemic activity of *Prunella vulgaris* L. in streptozotocin-induced diabetic mice [J]. Asia Pac J Clin Nutr, 2007, 16(Suppl 1):427-431.

[12] 吴慧平,陈美娟,邵明,等. 夏枯草水提物延缓正常 ICR 小鼠单糖吸收作用研究[J]. 中药材, 2010, 33(5):782-785.

[13] 奚赛飞,斯徐伟,朱科燕,等. ZDF (fa/fa) 大鼠的糖脂代谢特点与胰岛素抵抗特性[J]. 实验动物与比较医学, 2014, 34(2):102-106.

[14] Tomiyasu M, Obata T, Nishia Y, et al. Monitoring of liver glycogen synthesis in diabetic patients using carbon-13MR spectroscopy [J]. Eur J Radiol, 2010, 73(2):300-304.

[15] Mueckler M. Facilitative glucose transporters [J]. Eur J Biochem, 1994, 219(3):713-725.

[16] 方璐. 翼手目蝙蝠糖原合成酶 Gys1 基因克隆及分子进化研究[D]. 上海:华东师范大学, 2015.

[17] 刘德敏,方显峰,孙颖,等. 氯化锂对大鼠肝细胞葡萄糖 6 磷酸酶基因表达的影响[J]. 天津医科大学学报, 2006(1):14-16.

[18] 刘志红. 葡萄糖转运蛋白[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2000(2):153-158.

[19] Mueckler M, Caruso C, Baldwin S A, et al. Sequence and structure of a human glucose transporter [J]. Science, 1985, 229(4717):941-945.

[20] 展玉泉. 长期高蛋白饮食对营养性肥胖大鼠肝脏 IRS2 和 GLUT2 表达的影响[D]. 济南:山东大学, 2011.

[21] 关秋华,刘德惠. 葡萄糖转运蛋白与 2 型糖尿病[J]. 中国实验动物学杂志, 2000, 10(3):47-54.

[22] Motoyoshi S, Shirohani T, Araki E, et al. Cellular characterization of pituitary adenoma cell line (At20 cell) transfected with insulin, glucose transporter type2 (GLUT2) and glucokinase genes; insulin secretion in response to physiological concentrations of glucose [J]. Diabetologia, 1998, 41(12):1492-1501.

[责任编辑 张丰丰]