

黄芪黄酮与葛根黄酮配伍对肝脏糖脂代谢的影响

李艳敏^{1,2}, 范颖^{1,2*}, 刘烨^{1,2}, 郝明芬^{1,2}, 李新³, 刘丽^{1,2}, 訾慧^{1,2}, 李军^{1,2}

- (1. 辽宁中医药大学方剂学科, 沈阳 110847;
2. 辽宁中医药大学省部共建中医脏象理论及应用教育部重点实验室, 沈阳 110847;
3. 辽宁中医药大学数学教研室, 沈阳 110847)

[摘要] 目的:明确黄芪黄酮与葛根黄酮配伍对糖尿病大鼠糖脂代谢的影响。方法:SPF级SD雄性大鼠66只,按血糖随机分为6组,11只/组。除正常组外,其他各组均按 $46\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 予以1次性ip链脲佐菌素(STZ)诱导糖尿病模型。造模同日ig给药,黄芪黄酮组、葛根黄酮组、黄芪黄酮+葛根黄酮组分别给予 $0.039, 0.036, 0.075\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$;阳性药组给予金芪降糖片 $1.47\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$;正常组、模型组ig给予等量蒸馏水 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。各组连续给药30d。分别检测血糖、血清胆固醇(cholesterol, CHO)与甘油三酯(triglyceride, TG)含量,检测肝脏胰岛素(insulin, INS)、葡萄糖转运体4(glucose transporter 4, GLUT4)、脂联素(adiponectin, ADPN)及瘦素(leptin, LEP)浓度。运用单因素方差分析法分析两种药物的单独效应,析因设计方差分析法分析两种药物合用的交互效应。结果:与正常组比较,模型组大鼠血糖、血清CHO, TG均升高($P < 0.05$),肝组织INS, GLUT4, ADPN及LEP浓度均下降($P < 0.05$)。与模型组比较,黄芪黄酮组糖尿病大鼠血糖水平明显降低($P < 0.05$),葛根黄酮组变化不明显,二药合用未呈现协同作用;黄芪黄酮组、葛根黄酮组CHO, TG含量均明显降低,但合用效果不如单味药;黄芪黄酮、葛根黄酮均能明显升高肝组织GLUT4水平($P < 0.05$);二药对肝组织INS, GLUT4及LEP的影响,合用比单味药效果好,二药存在协同作用。结论:黄芪黄酮与葛根黄酮配伍能够协同调节INS, GLUT4及LEP水平而实现改善糖尿病糖脂代谢紊乱的作用。

[关键词] 析因设计; 黄芪黄酮; 葛根黄酮; 中药组分配伍; 糖尿病模型; 糖脂代谢

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)10-0109-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015100109

Effect of Compatibility of Astragalus Flavonoids and Kudzu Flavonoids on Glucose and Lipid Metabolism in Liver Tissue LI Yan-min^{1,2}, FAN Ying^{1,2*}, LIU Ye^{1,2}, HAO Ming-fen^{1,2}, LI Xin³, LIU Li^{1,2}, ZI Hui^{1,2}, LI Jun^{1,2} (1. Prescription Disciplines, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shenyang 110847, China; 2. Key Laboratory of TCM Theory and Applications of Education Ministry, Liaoning University of TCM, Shenyang 110847, China; 3. Department of Mathematics, Liaoning University of TCM, Shenyang 110847, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of compatibility of astragalus flavonoids and kudzu flavonoids on glucose and lipid metabolism in diabetes mellitus (DM) rats. **Method:** Sixty-six SD male rats were randomly divided into six groups according to blood glucose, which was normal group, model group, positive control group, astragalus flavonoids group, kudzu flavonoids group, and astragalus flavonoids and kudzu flavonoids group, 11 rats in each group. In addition to the normal group, the other groups were induced by streptozotocin (STZ, $46\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) to make the DM model. At the same time, the drugs were ig given. Astragalus flavonoid group, kudzu flavonoid group, astragalus flavonoid and pueraria flavonoid group were respectively given at dose of $0.039, 0.036, 0.075\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$; positive control group was given Jinqi Jiangtang tablets at dose of $1.47\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$; normal group and model group were given the same amount of distilled water ($10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$). After administration for 30 days, the levels of blood glucose, serum cholesterol (CHO) and triglyceride (TG) were tested, and hepatic

[收稿日期] 20141008(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81273653)

[第一作者] 李艳敏, 硕士, 从事中药复方配伍规律及其效应机制研究, Tel:024-31207165, E-mail:xinyue112233@yeah.net

[通讯作者] *范颖, 博士生导师, 教授, 从事方剂配伍规律研究, Tel:024-31207104, E-mail:lnzyfy@126.com

insulin (INS), glucose transporter 4 (GLUT4), adiponectin (ADPN), and leptin (LEP) were tested as well. One-way ANOVA was used to analyze the single effect of astragalus flavonoids and kudzu flavonoids on glucose and lipid metabolism, and factorial design analysis of variance was used to analyze their interactions as well. **Result:** In DM rats, the contents of blood glucose, CHO and TG were statistically increase ($P < 0.05$), and the concentrations of hepatic INS, GLUT4, ADPN and LEP were statistically decreased ($P < 0.05$). Astragalus flavonoids could reduce blood glucose level in rats effectively ($P < 0.05$), while the effect of kudzu flavonoids was not obvious, and there was no synergistic effect between the two drugs. Both astragalus flavonoids and kudzu flavonoids could reduce serum TG and CHO, but the combined effect was not obvious compared to any single drug, and there were antagonistic effects between the two drugs. Both astragalus flavonoids and kudzu flavonoids could raise the level of hepatic GLUT4 ($P < 0.05$). In terms of hepatic INS, GLUT4 and LEP levels, the combined effects were better than any single drug, it showed that there were synergistic effects between the two drugs on them. **Conclusion:** Compatibility of astragalus flavonoids and kudzu flavonoids could improve the glucose and lipid metabolism by regulating INS, GLUT4 and LEP levels synergistically.

[**Key words**] factorial design; astragalus flavonoids; kudzu flavonoids; compatibility of medicine components; diabetes model; glucose and lipid metabolism

黄芪、葛根是古今医家治疗消渴的常用中药。研究表明,黄酮类化合物是黄芪、葛根中的主要活性成分,具有降糖降脂等作用^[1-4]。由黄芪、葛根组成的黄芪葛根汤(始见于《证治汇补》)具有改善糖尿病血糖、血脂等作用^[5]。本文在考察黄芪黄酮与葛根黄酮降糖降脂作用的基础上,重点探讨黄芪黄酮与葛根黄酮对肝脏糖脂代谢的影响,阐释二者在调节糖尿病大鼠血糖、血脂以及肝脏胰岛素(INS),葡萄糖转运体(GULT4),脂联素(ADPN),瘦素(LEP)过程中是否存在关联性,进而明确中药组分配伍的协同与拮抗或各自为用等关系,为临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 66 只 SPF 级 SD 大鼠,雄性,体重(240 ± 20) g,购于辽宁长生生物技术有限公司,合格证号 SCXK(辽)2010-0001。

1.2 药品及试剂 蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根,产地内蒙古;野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根,产地广西,一次性购于辽宁贵今生物医药有限公司,由辽宁中医药大学鉴定教研室李峰教授鉴定为正品。黄芪黄酮、葛根黄酮提取于辽宁中医药大学中药复方药物代谢分析实验室;金芪降糖片(0.42 g/片,天津中新药业集团股份有限公司隆顺榕制药厂,批号 1112724,国药准字 Z10920027)。聚酰胺树脂(国药集团化学试剂有限公司,批号 20120911),95%乙醇(沈阳市富康消毒药剂厂),STZ(Sigma 公司,批号 04M1357),胆固醇

(CHO),甘油三酯(TG)生化试剂盒(四川迈克生物科技股份有限公司,批号 0413021,0513031),INS, GLUT4,ADPN,LEP 酶联免疫(ELISA)检测试剂盒(AMEKO,批号 201211)。

1.3 仪器 SHB-ⅢA 型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司),RE-3000 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),UV505 型紫外-可见分光光度计(安徽皖仪科技股份有限公司),稳豪型血糖检测仪[强生(中国)医疗器材有限公司],BL610 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),TDL-5-4 型离心机(上海安亭科学仪器厂),DY89-2 型电动玻璃匀浆机(宁波新芝生物科技股份有限公司),TBA-40FR 型生化分析仪[东芝医疗系统(中国)有限公司],WS 2-261-79 型电热恒温水浴箱(北京长安科学仪器厂),550 型微孔板酶标仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 模型建立 按 46 mg·kg⁻¹ 给予 SD 大鼠 1 次性 ip 2% 的 STZ(用 0.1 mol·L⁻¹,pH 4.2 的柠檬酸钠缓冲液配制)。造模第 7 天,大鼠尾静脉取血测定随机血糖值。随机血糖 ≥ 16.8 mmol·L⁻¹ 确定为模型成功。

2.2 药物制备 将中药饮片黄芪、葛根分别加入 10,8,6 倍体积水煎煮 2.5,2,1.5 h,3 次所得煎液合并,加热浓缩至质量浓度为 1 g·mL⁻¹。向浓缩液中加入 3 倍体积的 95%乙醇进行醇沉,取上清液;用旋转蒸发器减压浓缩蒸干。将干燥物加入到处处理好的聚酰胺树脂柱上,先用水洗脱,再用 75%乙醇洗脱,收集醇洗脱液用旋转蒸发器减压浓缩蒸干,并干燥成粉

末,即为黄芪黄酮(得率 1.43%,紫外分光光度法测得含量为 26.82%),葛根黄酮(得率 2.56%,紫外分光光度法测得含量为 47.22%)。药液配制:将黄芪黄酮、葛根黄酮用蒸馏水溶解,质量浓度分别为 1 mL 液体含黄芪生药量 0.27 g,葛根生药量 0.135 g。4 ℃ 保存,备用。

2.3 分组处理 将 66 只大鼠按血糖随机分为 6 组,即正常组,模型组,阳性药组(金芪降糖片),黄芪黄酮组,葛根黄酮组,黄芪黄酮 + 葛根黄酮组,每组 11 只。除正常组外,其他各组均予以造模。造模同日 *ig* 给药。按成人(70 kg 体重计算)日服黄芪生药量 30 g,葛根生药量 15 g,根据体表面积,大鼠等效为成人 6.3 倍量,即每日给予大鼠 *ig* 黄芪黄酮 0.039 g·kg⁻¹,葛根黄酮 0.036 g·kg⁻¹,黄芪黄酮 + 葛根黄酮 0.075 g·kg⁻¹;正常组、模型组给予等量蒸馏水 10 mL·kg⁻¹;阳性药组给予金芪降糖片 1.47 g·kg⁻¹。各组连续给药 30 d。

2.4 标本采集 造模第 30 天,以 10% 水合氯醛溶液 4 mL·kg⁻¹ 体重 *ip* 麻醉动物;腹主动脉取血,3 000 r·min⁻¹,4 ℃,离心 10 min,取上清;摘取肝脏

组织,称取 0.1 g 的肝组织,剪碎,加 9 倍量 0.9% 氯化钠溶液,冷冻研磨,3 000 r·min⁻¹ 离心 20 min,取上清,于 -80 ℃ 保存备检。

2.5 指标检测 随机血糖(血糖仪检测);血清 CHO, TG (生化分析仪检测);肝脏 INS, GLUT4, ADPN, LEP 浓度(ELISA 法检测)。

2.6 统计学处理 药物组间比较采用单因素方差分析加两两比较(LSD 法);分析 2 种药物间合用的效应采用析因设计方差分析。数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对糖尿病大鼠血糖与血清 CHO, TG 的影响 与正常组比较,模型组大鼠血糖,血清 CHO 及 TG 明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,黄芪黄酮组血糖,血清 CHO, TG 浓度均明显降低,葛根黄酮组血清 CHO, TG 浓度明显降低,二药合用未呈现协同作用;对 2 项血脂指标计算加权综合评分^[6],结果显示,黄芪黄酮、葛根黄酮均有明显作用,但二药合用效果不如单味药。见表 1。

表 1 糖尿病大鼠血糖与血清 CHO, TG 测定结果及综合评分($\bar{x} \pm s, n = 11$)

Table 1 Measurement results of blood glucose, serum CHO and TG and composite score in DM rats ($\bar{x} \pm s, n = 11$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	血糖/mmol·L ⁻¹	CHO/mmol·L ⁻¹	TG/mmol·L ⁻¹	血脂综合评分
正常	-	6.14 ± 0.60 ¹⁾	1.23 ± 0.16 ¹⁾	0.48 ± 0.11 ¹⁾	0.789 ± 0.12 ¹⁾
模型	-	28.38 ± 2.46	1.55 ± 0.08	1.09 ± 0.14	0.278 ± 0.08
金芪降糖片	1.47	26.49 ± 4.29	1.22 ± 0.19 ¹⁾	0.59 ± 0.36 ¹⁾	0.744 ± 0.23 ¹⁾
黄芪黄酮	0.039	19.42 ± 6.01 ¹⁾	1.31 ± 0.20 ¹⁾	0.48 ± 0.06 ¹⁾	0.734 ± 0.16 ¹⁾
葛根黄酮	0.036	27.02 ± 5.69	1.26 ± 0.12 ¹⁾	0.59 ± 0.11 ¹⁾	0.715 ± 0.10 ¹⁾
黄芪黄酮 + 葛根黄酮	0.075	23.29 ± 5.78 ¹⁾	1.29 ± 0.12 ¹⁾	0.68 ± 0.23 ¹⁾	0.650 ± 0.10 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

3.2 对糖尿病大鼠肝脏 INS, GLUT4, ADPN, LEP 的影响 与正常组比较,模型组大鼠肝脏 INS, GLUT4, ADPN, LEP 水平均明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,黄芪黄酮、葛根黄酮组肝脏 GLUT4 水平均明显升高;二药合用上调 GLUT4, INS, LEP 水平效果明显优于单味药,二者存在协同作用。对 INS, GLUT4, ADPN, LEP 4 项指标计算加权综合评分^[6],黄芪黄酮组有明显作用($P < 0.05$),葛根黄酮组作用不明显,合用效果优于单味药,二药有协同作用。见表 2。

4 讨论

肝脏是糖脂代谢的中枢,调节肝脏相关激素和

脂肪因子水平,有助于稳态调节糖脂代谢,进而改善糖尿病。研究证实,INS 能够刺激肝脏摄取葡萄糖和游离脂肪酸;而在 INS 刺激下, GLUT4 可由细胞内转运至细胞膜,协助葡萄糖快速进入组织细胞^[7]。ADPN 和 LEP 均由脂肪细胞分泌,是十分重要的脂肪因子,可作用于肝脏等靶器官,参与糖脂代谢的调节。ADPN 作为一种胰岛素增敏因子,可通过增强游离脂肪酸氧化,提高肝脏的胰岛素敏感性,调节脂代谢^[8];LEP 在肝脏中可通过激活 PI3K 而发挥调节脂代谢的作用,还可直接作用于其在胰岛 β 细胞上的受体,调节 INS 在靶组织的敏感性^[9-10]。

本实验结果显示,模型组大鼠血糖,血脂水平升

表 2 糖尿病大鼠肝脏 INS, GLUT4, ADPN, LEP 测定结果及综合评分 ($\bar{x} \pm s, n = 11$)

Table 2 Measurement results of hepatic INS, GLUT4, ADPN and LEP and composite score in DM rats ($\bar{x} \pm s, n = 11$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	INS /mU·L ⁻¹	GLUT4 /μg·L ⁻¹	ADPN /μg·L ⁻¹	LEP /μg·L ⁻¹	综合评分
正常	-	9.84 ± 0.74 ¹⁾	9.22 ± 0.21 ¹⁾	9.40 ± 2.85 ¹⁾	9.24 ± 0.54 ¹⁾	0.756 ± 0.080 ¹⁾
模型	-	7.37 ± 1.02	6.14 ± 0.22	7.11 ± 1.92	6.41 ± 0.08	0.131 ± 0.022
金芪降糖片	1.47	7.73 ± 0.87	6.23 ± 0.24	7.18 ± 1.96	6.78 ± 0.24	0.182 ± 0.043 ¹⁾
黄芪黄酮	0.039	7.47 ± 0.97	6.41 ± 0.44 ¹⁾	8.22 ± 2.89	6.62 ± 0.17	0.201 ± 0.056 ¹⁾
葛根黄酮	0.036	7.24 ± 0.63	6.42 ± 0.26 ¹⁾	7.74 ± 2.00	6.49 ± 0.13	0.167 ± 0.035
黄芪黄酮 + 葛根黄酮	0.075	8.97 ± 0.80 ¹⁾	8.56 ± 0.27 ¹⁾	8.38 ± 2.00	8.24 ± 0.28 ¹⁾	0.564 ± 0.032 ¹⁾

高, 肝脏 INS, ADPN, GLUT4 水平下降, 与文献报道一致^[11-12]。此外, 模型组大鼠肝脏 LEP 水平降低, 与文献报道不尽相同^[13-15], 可能是由于 STZ 所致实验性糖尿病大鼠的体重明显下降, 外周皮下脂肪含量显著减少而致 LEP 分泌量降低。黄芪黄酮与葛根黄酮配伍降糖降脂作用未呈现协同增效; 上调肝脏 INS, LEP, GLUT4 水平则存在协同作用; 而上调肝脏 4 项综合指标, 二药呈见协同增效作用。

故总体而言, 黄芪黄酮与葛根黄酮配伍应用可以通过调节 INS, GLUT4, ADPN 及 LEP 水平, 改善糖尿病大鼠肝脏糖脂代谢紊乱状态。二药对上述指标调节的效应强度不尽相同, 并且在改善 INS, GLUT4 及 LEP 水平方面, 合用则呈现协同增效, 提示两药作用靶点既有差异性, 亦有共同性, 其作用机制有待于今后进一步深入研究。

[参考文献]

[1] 罗舟, 苏明智, 颜鸣, 等. 蒙古黄芪的化学成分研究[J]. 中草药, 2012, 43(3): 458-462.

[2] 刘逢芹, 刘田云, 李贵海, 等. 分光光度法和 HPLC 法测定野葛藤总黄酮及葛根素含量[J]. 中药材, 2005, 28(10): 36-37.

[3] 李楠, 范颖, 贾旭鸣, 等. 黄芪不同有效部位对糖尿病模型大鼠血清胰岛素、脂联素的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 144-146.

[4] 张再超, 叶希韵, 徐敏华, 等. 葛根黄酮降血糖防治糖尿病并发症的实验研究[J]. 华东师范大学学报: 自然科学版, 2010, 2: 77-81, 126.

[5] 王春怡, 陈艳芬, 李卫民, 等. 黄芪葛根汤对糖尿病及胰岛素抵抗小鼠血糖的影响[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(11): 2731-2732.

[6] 李新, 范颖. 基于多指标正交设计考察黄芪有效部位干预糖尿病模型大鼠的药效机制及其交互关系[J]. 北京中医药大学学报, 2013, 14(7): 457-461.

[7] Ramalingam L, Oh E, Thurmond D C. Novel roles for insulin receptor (IR) in adipocytes and skeletal muscle cells via new and unexpected substrates[J]. Cell Mol Life Sci, 2013, 70(16): 2815-2834.

[8] Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase[J]. Nat Med, 2002, 8(11): 1288-1295.

[9] Huang W, Dedousis N, Bhatt B A, et al. Impaired activation of phosphatidylinositol 3-kinase by leptin is a novel mechanism of hepatic leptin resistance in diet-induced obesity[J]. J Biol Chem, 2004, 279(21): 21695-21700.

[10] Marzena Wójcik, Małgorzata Chmielewska-Kassassir, Karolina Grzywnowicz, et al. The relationship between adipose tissue-derived hormones and gestational diabetes mellitus (GDM)[J]. Endokrynol Pol, 2014, 65(2): 134-142.

[11] 田刚, 周翔, 刘巨永, 等. 2 型糖尿病大鼠模型 GLUT4 mRNA 表达的研究[J]. 天津医药, 2005, 33(8): 511-512.

[12] 李晓红, 王瑶, 董利平. 2 型糖尿病合并非酒精性脂肪肝患者的胰岛素、血脂及脂联素的变化[J]. 山东医药, 2008, 48(7): 85-87.

[13] 李鸿娟, 张东辉, 刘海津. 吡格列酮联合二甲双胍对 2 型糖尿病患者胰岛素抵抗及脂肪细胞因子水平的影响[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(9): 2416-2417.

[14] 金智生, 汝亚琴, 李娟娥, 等. 红芪多糖对实验性大鼠糖尿病胰岛素抵抗瘦素的影响[J]. 中西医结合心血管病杂志, 2010, 8(10): 1215-1217.

[15] 杜同信, 王自正, 王书奎, 等. 1 型糖尿病患儿血清瘦素与 C-肽水平的关系[J]. 临床儿科杂志, 2001, 19(6): 350-351.

[责任编辑 聂淑琴]