

桑叶对糖尿病小鼠肝脏 Toll 样受体基因表达的影响

田思敏¹, 柳辰玥¹, 马双双¹, 张弛¹, 赵保胜^{2*}

(1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100102; 2. 北京中医药大学 北京中医药研究院, 北京 100102)

[摘要] **目的:**探讨桑叶水提取物对糖尿病小鼠肝组织 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)基因表达量的影响,并探讨其相关的作用机制。**方法:**ICR 小鼠随机分为正常组(6只),糖尿病组。糖尿病组小鼠利用高脂高糖饲料喂养10周联合多次注射链脲佐菌素(STZ)建立高脂饲养和 STZ 共同诱导的小鼠糖尿病模型。造模成功小鼠随机分为模型组,二甲双胍组(600 mg·kg⁻¹),桑叶高、中、低剂量组(8,4,2 g·kg⁻¹),每组6只,灌胃(ig)给药,每周测空腹血糖,于实验中后期行口服糖耐量实验,ig 给药10周后,测定小鼠血清胰岛素、总胆固醇、甘油三酯和肿瘤坏死因子-α(TNF-α),并应用实时荧光定量 PCR (Real-time PCR)检测小鼠肝组织中 TLR1~9 表达量。**结果:**糖尿病模型小鼠经桑叶水提取物治疗后,进水量减少,显著降低空腹血糖,改善糖耐量,显著降低血脂,增加胰岛素含量,改善胰岛素抵抗,同时降低血清中 TNF-α($P < 0.05$, $P < 0.01$)。Real-time PCR 结果显示,糖尿病小鼠肝脏组织 TLRs 受体中 TLR1, TLR2, TLR3, TLR7, TLR8 和 TLR9 表达明显高于正常组($P < 0.05$, $P < 0.01$), TLR5 表达明显低于正常组;桑叶给药组后,桑叶中剂量组肝组织中的 TLR7, TLR8 和 TLR9 表达量,显著低于模型组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论:**桑叶水提取物的降糖作用可能与抑制糖尿病模型小鼠肝组织中 TLRs 受体有关。

[关键词] 糖尿病; 桑叶水提取物; Toll 样受体; 肿瘤坏死因子-α

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)06-0137-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2017060137

Effect of Mori Folium on Gene Expression of TLRs in Liver of Diabetic Mice

TIAN Si-min¹, LIU Chen-yue¹, MA Shuang-shuang¹, ZHANG Chi¹, ZHAO Bao-sheng^{2*}

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;
2. Beijing Institute of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the regulatory effect of the water extract from Mori Folium on the gene expressions of Toll-like receptors (TLRs) in the liver from diabetic mice, and explore its action mechanism. **Method:** ICR mice were randomly divided into normal group ($n = 6$) and diabetic group. The mice in diabetic group received high-fat and high-sugar fodder for 10 weeks and injection with 100 mg·kg⁻¹ streptozotocin (STZ) for 3 days continuously to establish the diabetic mice models. The successfully modeled mice were then randomly divided into model group, metformin group (600 mg·kg⁻¹), Mori Folium groups (high dose 8 g·kg⁻¹, middle dose 4 g·kg⁻¹, and low dose 2 g·kg⁻¹) for 10 weeks, $n = 6$ in each group. The drugs were given by ig administration, and the fasting blood glucose was detected every week. Oral glucose tolerance test was conducted in the mid and later phases of experiment. After ig administration for 10 weeks, serum insulin (INS), total cholesterol (T-CHO), triglyceride (TG) and tumor necrosis factor-α (TNF-α) were detected, and the expression level of TLR 1-9 in the liver was measured with quantitative real-time PCR. **Result:** After the diabetic model mice were treated with Mori Folium water extract, their water intake was reduced; fasting blood glucose was significantly reduced; glucose tolerance was improved; blood fat was significantly reduced; insulin concentration was dramatically increased; insulin resistance was improved; and serum TNF-α level was reduced ($P < 0.05$, $P <$

[收稿日期] 20160705(015)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81374027)

[第一作者] 田思敏,在读硕士,从事中医药防治糖尿病药效与机制研究工作, Tel:18201353428, E-mail:1165365994@qq.com

[通讯作者] * 赵保胜,博士,副研究员,从事中药药效与物质基础研究工作, Tel:13718332362, E-mail:zhaobs1973@163.com

0.01)。Quantitative Real-time PCR data showed that TLR1, TLR2, TLR3, TLR7, TLR8 and TLR9 mRNA expression levels were significantly increased in livers of the diabetic rats ($P < 0.05$, $P < 0.01$, as compared with normal group), and TLR5 expression level in model group was significantly lower than that in normal group. In addition, the expression levels of TLR7, TLR8 and TLR9 in liver of Mori Folium middle dose group were significantly lower than those in model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。 **Conclusion:** The water extract of Mori Folium could ameliorate diabetes, and its mechanism may be partly related to inhibiting the TLRs expression in the liver.

[**Key words**] diabetes; water extract of Mori Folium; Toll-like receptors (TLRs); tumor necrosis factor- α (TNF- α)

现阶段,随着人们生活水平的提高,饮食习惯的改变以及现代人养成的久坐的习惯,均使得患肥胖、糖尿病等代谢性疾病的机率大大增加。目前有研究表明,2型糖尿病发病机制可能与炎症有关^[1],同时,又有报道 Toll 样受体(TLRs)最为明显的就是促进机体内细胞因子的合成和释放,继而引发炎症反应,研究表明,糖尿病的发病机制与 TLRs 的表达有关^[2],TLR1~9 已有明确的生物学功能^[3-4],TLR2, TLR3, TLR4, 研究发现,和糖代谢和糖尿病密切相关^[5]。

桑叶是常用临床用药,《本草纲目》中,李时珍记载道,桑叶汁煎煮作茶,能治疗消渴症^[6]。现代药理研究表明,桑叶提取物均有降糖的作用^[7-8],体内和体外实验研究表明,其主要通过野尻霉素抑制葡萄糖在小肠的吸收^[9-10],从分子机制角度,桑叶降糖机制涉及到腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)通路^[11],抗 β 细胞凋亡^[12],改善磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)信号转导通路^[13]和有过氧化物酶体增生物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs)抑制剂的作用^[14]。目前,关于桑叶降糖作用研究,通过自身免疫调节入手的探究较少,希望通过此实验能够弥补机制研究的空白。本课题组前期研究发现,桑叶对 KKAY2 糖尿病降糖作用较好,其可能是通过增加胰岛素敏感性,减弱胰岛细胞 TLR2, TLR4 基因表达量^[15],本实验以高脂饲料喂养结合多次注射链脲佐菌素(STZ)造糖尿病小鼠模型,观察桑叶水提取物对 STZ 糖尿病模型小鼠的影响,并探讨桑叶水提取物对糖尿病小鼠肝脏组织中 TLRs 受体表达量的影响,为后续的 TLRs 蛋白表达作前期工作,进一步探讨桑叶对小鼠降糖作用靶器官提供相应依据。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 ICR 小鼠 90 只,体重 18~20 g,

购买于斯贝福(北京)生物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2011-0004,动物饲养于北京中医药大学实验动物部标准屏障环境内,许可证号 SYXK(京)2011-0024。本研究获得北京中医药大学实验动物伦理委员会批准(编号 BVCM-4-200160412-2001)。

1.2 药物及试剂 桑叶购自北京仟草中药饮片有限公司,经北京中医药大学中药学院刘春生教授鉴定为桑科植物桑 *Morus alba* 的干燥叶;STZ(美国 Sigma 公司,批号 WXBB6772V),二甲双胍(中美上海施贵宝制药有限公司,批号 AAE3907),血糖试纸(北京怡成生物电子技术有限公司,批号 2211A412),小鼠血清胰岛素酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(美国 Alpco 公司,批号 03899),总胆固醇(T-CHO)测定试剂盒及甘油三酯(TG)测定试剂盒(南京建成生物公司,批号分别为 20151212, 20151216),小鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA 试剂盒(美国 Life Technologies 公司,批号 1782714B),无水葡萄糖(国药集团化学试剂有限公司,批号 20110104),TRizol 试剂(美国 Invitrogen 公司,批号 15596),Revert Aid First Strand cDNA Synthesis 试剂盒(美国 Thermo Scientific 公司,批号 00279105),Power SYBR Green PCR Master Mix(美国 Applied Biosystems 公司,批号 1508501)。

1.3 仪器 5D-1 型系列血糖仪(北京怡成生物电子技术有限公司),Multiskan FC 型酶标仪及 Biofuge Primo 型离心机(美国 Thermo 公司),CFX96 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 桑叶水提取物 取适量桑叶,加入 10 倍量水,于 85 °C 煎煮 10 h,过滤,浓缩至相当于生药量 3.75 g·mL⁻¹,即得^[16]。

2.2 高脂饮食糖尿病模型的建立 ICR 小鼠适应性饲养 1 周后,随机抽取 6 只作为正常组,给予标准

普通饲料喂养。其余小鼠给予高脂高糖饲料(北京科澳协力饲料有限公司)喂养(饲料配方:20%蔗糖,2.5%胆固醇,10%猪油,1%胆酸钠,66.5%基础饲料)。10 周后,禁食 14 h,连续 3 d 注射 1% STZ 柠檬酸缓冲液(4 °C,0.1 mmol·L⁻¹,pH4.5),剂量分别为 100 mg·kg⁻¹。正常组仅注射等量柠檬酸钠缓冲液。注射后于 5~7 d 后尾静脉剪尾采血,且用血糖仪测定血糖,血糖 > 12 mmol·L⁻¹,确定为糖尿病模型。

2.3 分组和给药 将成模小鼠,根据小鼠空腹血糖数,按随机数表,分为模型组,二甲双胍组(600 mg·kg⁻¹),桑叶高剂量组(8 g·kg⁻¹),桑叶中剂量组(4 g·kg⁻¹)和桑叶低剂量组(2 g·kg⁻¹),每组 6 只。连续灌胃(*ig*) 10 周,每日 1 次,正常组和模型组均 *ig* 等量水。

2.4 饮食和进水量测定 分别在给药第 6 周,第 8 周和第 10 周,6 组小鼠均进食过夜,且测量 24 h 进食量和饮水量。

2.5 口服葡萄糖耐量实验(oral glucose tolerance test,OGTT) 给药第 8 周和第 10 周分别进行空腹 *ig* 葡萄糖耐量实验,各组小鼠禁食不禁水 12 h,*ig* 1% 葡萄糖溶液,分别在 0,15,30,60,90,120,180 min 测定各组小鼠血糖浓度。

2.6 血液和样本收集 上述实验结束后,禁食 14 h 后,各组小鼠摘眼球取血,收集血液样本 0.5 mL,4 °C 离心取上层血清,保存于 -20 °C,待测小鼠血清 T-CHO,TG,胰岛素含量和血清 TNF- α ,均按照试剂说明书严格执行。之后,将肝脏迅速取出,并用锡纸包好,投入液氮,实验结束后,转移至 -80 °C 保存。

2.7 Real-time PCR 法进行肝组织总 RNA 提取 核酸蛋白紫外分光仪检测 RNA 浓度和质量,要求吸光度 A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.0,并检查 RNA 完整性。引物序列从 NCBI 设计,且由北京博迈德基因技术有限公司合成。甘油醛 3-磷酸脱氢酶(GAPDH)引物序列:上游 5'-TCAACAGCAACTCCCCTCTTCCA-3',下游 5'-ACCCTGTTGCTGTAGCCGTATTCA-3'^[17],产物长度 115 bp;TLR1 引物序列:上游 5'-CCAACAGTCAGCCTCAAGCA-3',下游 5'-CATATAGGCAGGGCATCAAAG-3',产物长度 65 bp;TLR2 引物序列:上游 5'-GAGTGCGGACTGTTTCCTT-3',下游 5'-GAGATTTGACGCTTTGTCTGAGG-3',产物长度 148 bp;TLR3 引物序列:上游 5'-GGAGCCAGAAGTGTGCCAAA-3',下游 5'-GAGCTCATTATGTTGCAGGTTCA-3',产物长度 64 bp;TLR4 引物序

列:上游 5'-GGAAGGACTATGTGATGTGACCA-3',下游 5'-GCAGAAACATTCGCCAAGCA-3',产物长度 64 bp;TLR5 引物序列:上游 5'-GCTGCAACTGGACCTTTCG-3',下游 5'-CCCAAACAGTCGAGGATTCAA-3',产物长度 58 bp;TLR6 引物序列:上游 5'-GACCTCCACCAAGAACAAAAG-3',下游 5'-GGCATCCGAAGCTCAGATATAGA-3',产物长度 64 bp;TLR7 引物序列:上游 5'-TCTGGCCGTTGAGAGAGTTG-3',下游 5'-ATCAAGCCGTTGTTGGAGA-3',产物长度 53 bp;TLR8 引物序列:上游 5'-TAGAAGTGCTGGACCTGAGC-3',下游 5'-ATCCTAGACGGTGCCTTACC-3',产物长度 69 bp;TLR9 引物序列:上游 5'-GCCTTCGTGTTGTTGATAAG-3',下游 5'-CACCCGCAGCTCGTTATACA-3',产物长度 66 bp。采用 Power SYBR Green Master Mix 试剂盒,20 μ L 反应体系,在 CFX96 Real-time PCR 扩增仪上进行扩增,扩增条件参照说明书。每个样本均设 2 个复孔,取均值。根据 C_t 值,按照 Pfaffl 公式^[18]计算目的基因表达量。

2.8 统计学分析 采用 SAS 9.2 统计软件对数据进行分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 *t* 检验或是 *F* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对糖尿病小鼠一般指标的影响 与正常组比较,模型组小鼠空腹血糖明显升高,体重明显下降;饮食量和进水量都明显多于正常组($P < 0.01$)。与模型组比较,二甲双胍和桑叶给药组中,小鼠的空腹血糖和进水量有明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),体重和进食量均无明显变化。见表 1,2。

3.2 对糖尿病小鼠糖耐量影响 第 8 周和 10 周实验结果表明,与正常组比较,模型组糖尿病小鼠表现出糖耐量异常,其曲线下面积显著高于正常组($P < 0.01$);而桑叶给药组的糖耐量得到明显改善,同时曲线下面积表现出显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见图 1,表 3。

3.3 对糖尿病模型小鼠血液指标影响 模型组的 T-CHO 和 TG 明显高于正常组($P < 0.05$, $P < 0.01$),二甲双胍组和桑叶组均明显低于模型组($P < 0.05$);与正常组比较,模型组的胰岛素含量明显的低于正常组($P < 0.05$),就给药组而言,桑叶组(高、中、低)均明显高于模型组($P < 0.05$),其中高剂量组最为明显,虽然二甲双胍组未出现显著性差异,但是有大于模型组的趋势。就胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)而言,模型组出现了明显得胰岛素

表 1 桑叶水提取物对糖尿病小鼠空腹血糖和体重的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Effect of water extract of Mori Folium on fasting blood glucose and weight in diabetic mice($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	空腹血糖/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$		体重/g	
		给药前	给药第 10 周	给药前	给药第 10 周
正常	-	6.10 ± 1.58	3.8 ± 1.10	47.0 ± 5.02	46.5 ± 3.98
模型	-	17.9 ± 5.33	14.2 ± 6.18 ²⁾	44.3 ± 6.27	41.3 ± 6.12
二甲双胍	0.6	17.4 ± 4.81	6.8 ± 2.03 ⁴⁾	46.6 ± 4.96	43.7 ± 4.27
桑叶	8	17.9 ± 5.85	5.8 ± 1.59 ⁴⁾	46.0 ± 3.36	40.8 ± 3.34
	4	17.8 ± 5.13	9.6 ± 4.60 ⁴⁾	45.3 ± 4.27	43.1 ± 4.93
	2	18.2 ± 5.79	10.5 ± 3.61 ⁴⁾	47.7 ± 8.00	42.9 ± 6.58

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 2~5 同)。

表 2 桑叶水提取物对糖尿病小鼠进食量影响(第 10 周)($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effect of water extract of Mori Folium on food and water in diabetic mice(10th week) ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	进食量	进水量
正常	-	6.2 ± 1.40	9.5 ± 3.48
模型	-	11.5 ± 3.11 ²⁾	35.8 ± 13.71 ²⁾
二甲双胍	0.6	7.2 ± 2.88 ³⁾	11.9 ± 4.69 ⁴⁾
桑叶	8	10.8 ± 2.86	19.7 ± 6.59 ³⁾
	4	11.6 ± 1.59	19.9 ± 6.57 ³⁾
	2	11.4 ± 2.73	16.4 ± 3.64 ³⁾

表 3 给药第 10 周桑叶水提取物对糖尿病模型小鼠糖耐量影响(120 min, 曲线下面积)($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effect of water extract of Mori Folium on Oral glucose tolerance test in 10th week in diabetic mice(120 min, AUC) ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	糖耐量曲下面积
正常	-	20.5 ± 2.44
模型	-	64.4 ± 11.62 ²⁾
二甲双胍	0.6	25.9 ± 7.09 ⁴⁾
桑叶	8	39.1 ± 14.14 ⁴⁾
	4	50.1 ± 12.04 ³⁾
	2	49.5 ± 11.64 ³⁾

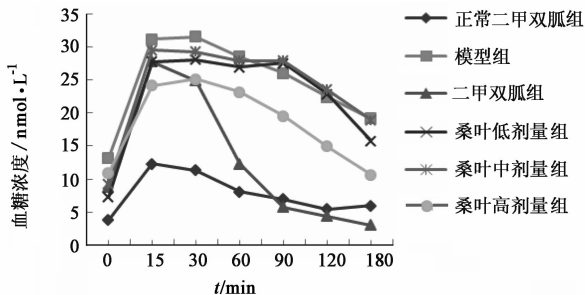


图 1 给药第 8 周桑叶水提取物对糖尿病模型小鼠糖耐量的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 1 Oral glucose tolerance test in 8th week($\bar{x} \pm s, n=6$)

抵抗,但是二甲双胍和桑叶高剂量组均能够显著性

表 4 桑叶水提取物对糖尿病模型小鼠血液指标影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Effect of water extract of Mori Folium on related blood indexes in diabetic mouse in diabetic mice($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	T-CHO/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	TG/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	胰岛素含量/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	HOMA-IR	TNF- α / $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	-	4.7 ± 1.13	1.1 ± 0.17	0.25 ± 0.07	0.10 ± 0.04	4.09 ± 0.70
模型	-	7.6 ± 2.06 ²⁾	1.3 ± 0.18 ¹⁾	0.14 ± 0.03 ³⁾	0.30 ± 0.06 ⁴⁾	9.87 ± 2.40 ⁴⁾
二甲双胍	0.6	5.5 ± 1.74	1.4 ± 0.33	0.18 ± 0.03 ³⁾	0.15 ± 0.05 ⁴⁾	6.78 ± 0.56 ²⁾
桑叶	8	5.1 ± 1.35 ³⁾	0.9 ± 0.33 ³⁾	0.33 ± 0.10 ³⁾	0.17 ± 0.02 ⁴⁾	7.87 ± 2.80
	4	5.6 ± 0.64 ³⁾	1.0 ± 0.27	0.29 ± 0.10 ³⁾	0.27 ± 0.05	6.65 ± 1.41 ³⁾
	2	6.5 ± 1.41 ³⁾	0.9 ± 0.32 ³⁾	0.23 ± 0.06 ³⁾	0.19 ± 0.09	5.84 ± 1.67 ⁴⁾

地减少胰岛素抵抗($P < 0.01$)。就模型组 TNF- α , 其含量高于正常组,同时给药后,能够显著性的降低($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 4。

3.4 对糖尿病小鼠肝组织 TLR1-9 基因表达量的影响 实验结果显示,与正常组比较,TLR1, TLR2, TLR3, TLR7, TLR8 和 TLR9 mRNA 表达明显高于正常组($P < 0.05, P < 0.01$),但是 TLR5 明显低于正常组($P < 0.05, P < 0.01$)。给药 10 周后,肝组织中的 TLR7, TLR8 和 TLR9 表达量,桑叶中剂量组明显降低($P < 0.05, P < 0.01$),相对于模型组比较。见表 5。

表 5 桑叶水提取物对糖尿病小鼠肝组织 TLR1 ~ 9 基因表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Effect of water extract of Mori Folium on TLR1 ~ 9 gene expressions in diabetic mouse ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TLR1	TLR2	TLR3	TLR4	TLR5
正常	-	1.0 ± 0.00	1.0 ± 0.00	1.0 ± 0.00	1.0 ± 0.00	1.0 ± 0.00
模型	-	1.8 ± 0.77 ¹⁾	1.9 ± 0.62 ²⁾	1.5 ± 0.48 ¹⁾	1.7 ± 1.19	0.4 ± 0.34 ²⁾
二甲双胍	0.6	1.0 ± 0.40	0.8 ± 0.49 ⁴⁾	0.8 ± 0.39 ³⁾	1.3 ± 1.70	1.4 ± 0.84 ³⁾
桑叶	8	1.2 ± 0.26	1.4 ± 0.64	1.2 ± 0.52	1.5 ± 0.96	0.8 ± 0.51
	4	1.3 ± 0.87	1.4 ± 0.52	1.1 ± 0.60	1.3 ± 1.37	0.7 ± 0.50
	2	1.8 ± 0.68	1.9 ± 0.64	1.2 ± 0.52	1.9 ± 0.96	0.6 ± 0.46

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TLR6	TLR7	TLR8	TLR9
正常	-	1.0 ± 0.00	1.0 ± 0.00	1.0 ± 0.00	1.0 ± 0.00
模型	-	1.1 ± 0.63	1.6 ± 0.62 ¹⁾	2.0 ± 0.93 ¹⁾	1.8 ± 0.71 ¹⁾
二甲双胍	0.6	0.7 ± 0.41	0.8 ± 0.13 ³⁾	0.8 ± 0.40 ³⁾	0.5 ± 0.15 ³⁾
桑叶	8	1.3 ± 0.47	0.9 ± 0.11	1.2 ± 0.67	0.5 ± 0.38 ⁴⁾
	4	0.9 ± 0.48	0.9 ± 0.17 ³⁾	0.8 ± 0.32	0.6 ± 0.35 ³⁾
	2	1.3 ± 0.47	1.8 ± 0.18	2.8 ± 0.67	1.2 ± 0.34

4 讨论

本实验通过高糖高脂饲料结合 STZ 制造糖尿病小鼠模型,观察桑叶水提取物对其治疗作用和对 Toll 样受体影响的初步研究,且与二甲双胍进行了药效比较。通过桑叶治疗的糖尿病小鼠,空腹血糖降低,同时血清胰岛素模型组高,相应地,HOMA-IR 也较低;从 OGTT 实验结果来看,能够有效的减小曲线下面积,说明桑叶水提取物能在一定程度上对胰岛细胞有修复作用。

本课题组前期实验中,桑叶对 KKAy2 型糖尿病小鼠有较好降血糖作用,其机制可能是通过抑制胰岛细胞 TLR2,TLR4 表达,从而抑制炎症的发生,但是炎症因子的影响在实验中并未得到量化的体现,同时不同糖尿病小鼠模型和不同组织之间 TLRs 表达量是否有差异也有待进一步研究。炎症反应在 2 型糖尿病中扮演着很重要的角色,其中包含 TNF- α ,而且肝脏不同于其他组织,巨噬细胞在肝脏里广泛地分布着,大概占整个细胞数的 10% 以上^[19]。TNF- α 作为炎症因子,具有较强的生物学活性并且作用广泛,TNF- α 参与糖尿病发生和发展,同时,它主要是由巨噬细胞产生,分布在血管内皮细胞,对胰岛细胞有直接影响^[20];桑叶水提取物能够显著性地减少血清中的 TNF- α ,推测桑叶水提取物可以有效抑制巨噬细胞分泌的炎性介质。

Toll 样受体在机体的先天性免疫和获得性免疫中发挥着重要的识别作用,其作为一类病原识别受体在炎症中也有重要作用,其在鼠中,有 13 种受体,分别是 TLR1 ~ TLR9 和 TLR11 ~ TLR13^[21]。在自身免疫糖尿病的发展中,TLRs 信号通路非常的复杂,已经有研究证实,TLR2 和 TLR4 的表达,配体、信号通

路和功能激活在糖尿病患者中都有明显的升高,这可能与处于前炎症状态有关^[22]。对于非肥胖型糖尿病小鼠而言,TLR1,TLR2,TLR3,TLR4 和 TLR9 mRNA 的表达量也均有显著上升^[23]。当 2 型糖尿病患者注射低剂量胰岛素 2 h 后,检测到 TLR1,TLR2,TLR4,TLR7 和 TLR9 mRNA 的表达量明显地受到抑制^[24]。在本实验糖尿病模型组,TLR1,TLR2,TLR3,TLR7,TLR8 和 TLR9 表达明显高于正常组,模型组小鼠的 TLRs 受到功能性激活。经过 10 周给药后,桑叶高、中剂量组中,TLR7,TLR8 和 TLR9 表达明显低于模型组,其表达量受到抑制,这可能与抗炎作用有关,TLRs 在的肝脏中的表达,不同的疾病激活不同 TLRs,其中主要涉及到 TLR2,TLR3,TLR4,TLR5 和 TLR9 等^[25];TLR7 的激活能够促进糖尿病小鼠自身免疫糖尿病,而抑制 TLR7 可以从一定程度上有预防作用^[26];研究表明,敲除 TLR9 基因的自发免疫糖尿病小鼠能够避免疾病的发生^[27]。通过初步筛选,TLR7 和 TLR9 的表达量,在造模给药后,有一定程度的抑制,提示,桑叶水提取物对糖尿病的治疗作用可能与 TLR 信号通路有关,其可能通过阻断 TLR 信号通路介导多种炎症和细胞因子的形成,本文研究结果与文献报道一致,因此,桑叶治疗糖尿病也有可能通过自身免疫炎症调节作用,但是目前桑叶水提取物作用于 TLRs 炎症信号通路的机制研究较少,鉴于髓分化因子 88 (MyD88) 激活 NF- κ B 同时与 TLRs 有关,MyD88 与 TLR1,TLR2,TLR4,TLR5,TLR6,TLR7 和 TLR9 有相互作用^[28],还需要进一步对相关的下游蛋白验证以及和体外实验的补充和完善。

[参考文献]

[1] Donath M Y, Shoelson S E. Type 2 diabetes as an

- inflammatory disease [J]. Nat Rev Immunol, 2011, 11 (2):98-107.
- [2] 袁婷,关晓菲,卢文冉,等. Toll样受体的内源性激活在糖尿病及糖尿病肾病中的作用——TLRs表达、激活促进DM和DN的发生、发展[J]. 中国免疫学杂志, 2015, 31(8):1124-1128.
- [3] 吴珺,鲁一兵,刘超. Toll样受体和糖尿病[J]. 国际内分泌代谢杂志, 2008, 28(2):116-118.
- [4] 章超群,武晓旭,吴永贵,等. 白芍总苷对糖尿病大鼠肾组织Toll样受体信号通路调节的研究[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(3):58-63.
- [5] WU L H, HUANG C C, Adhikarakunnathu S, et al. Loss of toll-like receptor 3 function improves glucose tolerance and reduces liver steatosis in obese mice [J]. Metabolism, 2012, 61(11):1633-1645.
- [6] 白华.《神农本草经》桑叶考证[J]. 内蒙古中医药, 2016, 35(1):102-103.
- [7] 曾聪彦,李乐愚,梅全喜,等. 桑叶降血糖作用研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(1):192-194.
- [8] 王娅,李嘉盈. 桑叶抗糖尿病活性成分研究[J]. 安徽医药, 2016, 20(3):425-428.
- [9] Vichasilp C, Nakagawa K, Sookwong P, et al. Development of high 1-deoxynojirimycin (DNJ) content mulberry tea and use of response surface methodology to optimize tea-making conditions for highest DNJ extraction [J]. Food Sci Technol, 2012, 45(2):226-232.
- [10] 唐明敏,刘洋,田思敏,等. 桑叶不同提取部位对 α -葡萄糖苷酶抑制活性体外研究[J]. 新疆医科大学学报, 2015, 38(6):711-714.
- [11] MA X, Iwanaka N, Masuda S, et al. *Morus alba* leaf extract stimulates 5'-AMP-activated protein kinase in isolated rat skeletal muscle [J]. J Ethnopharmacol, 2009, 122(1):54-59.
- [12] ZHANG Y, REN C, LU G, et al. Anti-diabetic effect of mulberry leaf polysaccharide by inhibiting pancreatic islet cell apoptosis and ameliorating insulin secretory capacity in diabetic rats [J]. Int Immunopharmacol, 2014, 22(1):248-257.
- [13] Ann J Y, Eo H, Lim Y. Mulberry leaves (*Morus alba* L.) ameliorate obesity-induced hepatic lipogenesis, fibrosis, and oxidative stress in high-fat diet-fed mice [J]. Genes Nutr, 2015, 10(6):1-13.
- [14] Naowaboot J, Chung C H, Pannangpetch P, et al. Mulberry leaf extract increases adiponectin in murine 3T3-L1 adipocytes [J]. Nutr Res, 2012, 32(1):39-44.
- [15] 赵保胜,高晓燕,刘洋,等. 桑叶治疗2型糖尿病药效及其机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(20):263-266.
- [16] Park M Y, Lee K S, Sung M K. Effects of dietary mulberry, Korean red ginseng, and banaba on glucose homeostasis in relation to PPAR-alpha, PPAR-gamma, and LPL mRNA expressions [J]. Life Sciences, 2005, 77(26):3344-3354.
- [17] Batra A, Pietsch J, Fedke I, et al. Leptin-dependent toll-like receptor expression and responsiveness in preadipocytes and adipocytes [J]. Am J Pathol, 2007, 170(6):1931-1941.
- [18] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. Nucleic Acids Res, 2001, 29(9):e45.
- [19] Esser N, Legrand-Poels S, Piette J, et al. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2014, 105(2):141-150.
- [20] Lappas M. NOD1 expression is increased in the adipose tissue of women with gestational diabetes [J]. J Endocrinol, 2014, 222(1):99-112.
- [21] 李丽燕. Toll样受体的研究进展[J]. 临床医学工程, 2011, 18(3):93-96.
- [22] Dasu M R, Devaraj S, Park S, et al. Increased toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects [J]. Diabetes Care, 2010, 33(4):861-868.
- [23] Shimizu S, Kurashige Y, Nishimura M, et al. Involvement of toll-like receptors in autoimmune sialoadenitis of the non-obese diabetic mouse [J]. J Oral Pathol Med, 2012, 41(7):517-523.
- [24] Ghanim H, Mohanty P, Deopurkar R, et al. Acute modulation of toll-like receptors by insulin [J]. Diabetes Care, 2008, 31(9):1827-1831.
- [25] Schwabe R F, Seki E, Brenner D A. Toll-like receptor signaling in the liver [J]. Gastroenterology, 2006, 130(6):1886-1900.
- [26] Lee A S, Ghoreishi M, CHENG W K, et al. Toll-like receptor 7 stimulation promotes autoimmune diabetes in the NOD mouse [J]. Diabetologia, 2011, 54(6):1407-1416.
- [27] WONG F S, HU C, ZHANG L, et al. The role of Toll-like receptors 3 and 9 in the development of autoimmune diabetes in NOD mice [J]. Ann N Y Acad Sci, 2008, 1150(2):146-148.
- [28] Patra M C, Choi S. Recent progress in the development of Toll-like receptor (TLR) antagonists [J]. Expert Opin Ther Pat, 2016, 26(6):719-730.

[责任编辑 周冰冰]