

交泰丸不同配比组方降糖作用及相关机制探讨

袁琳, 李慧姣, 胡娜, 汤鹏, 林敏, 钟霄毓, 陆雄*

(上海中医药大学科技实验中心 细胞生物与组织病理学实验室, 上海 201203)

[摘要] **目的:**研究交泰丸中黄连、肉桂不同配伍比例(10:1, 10:3, 10:6)对 db/db 小鼠的降糖作用及其相关机制。**方法:**12 周龄 db/db 糖尿病小鼠随机分为黄连-肉桂 10:1 组, 10:3 组, 10:6 组(相当于生药 8.4, 10, 12.3 g·kg⁻¹), 阳性药物组(二甲双胍, 0.25 g·kg⁻¹), 模型组, 同月龄 db/m 小鼠作为正常。正常组和模型组以生理盐水灌胃, 阳性药物组以二甲双胍混悬液灌胃, 不同配伍比例交泰丸以相应中药水煎剂灌胃, 每天 1 次。5 周后, 观察小鼠饮水量、进食量、体重的变化, 检测空腹血糖(FBG), 并进行腹腔注射葡萄糖耐量实验(IPGTT)和胰岛素耐量实验(IPITT); 胰岛素免疫组化染色以及电子显微镜观察胰岛 β 细胞形态及超微结构的变化; 蛋白质免疫印迹法(Western blot)分析肝脏、腹部脂肪与肌肉组织中的 AMP 依赖的蛋白激酶(AMPK)与磷酸化 AMPK(p-AMPK)的表达, 以及脂肪和肌肉组织中葡萄糖转运蛋白 4(GLUT4)表达的变化。**结果:**与正常组比较, 模型小鼠体重、饮水量、进食量增加($P < 0.01$), FBG 显著升高($P < 0.01$), 糖耐量与胰岛素耐量各时间点血糖显著升高($P < 0.01$), 胰岛 β 细胞数量及细胞内分泌颗粒数量减少, 肝脏、脂肪和肌肉组织中 p-AMPK 表达降低($P < 0.05$), 脂肪和肌肉组织中 GLUT4 表达降低($P < 0.01, P < 0.05$); 与模型组比较, 交泰丸 3 个不同配比组 FBG 均明显降低($P < 0.05$), IPGTT 和 IPITT 明显改善, 胰岛 β 细胞数量和分泌颗粒较模型组明显增多, 其中以黄连-肉桂 10:1 组方的作用最为明显; 交泰丸 10:1 组能明显增加肝脏、脂肪和肌肉中的 p-AMPK 水平($P < 0.05$), 增加脂肪和肌肉组织中 GLUT4 的表达($P < 0.01, P < 0.05$)。**结论:**黄连-肉桂 10:1, 10:3, 10:6 不同配比的交泰丸对 db/db 小鼠均具有一定降血糖作用, 但以 10:1 比例效果最好, 其作用机制与激活 AMPK, 增加 GLUT4 的表达有关。

[关键词] 交泰丸; 2 型糖尿病; db/db 小鼠; AMP 依赖蛋白激酶; 葡萄糖转运蛋白 4

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)08-0130-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017080130

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170209.1208.020.html>

[网络出版时间] 2017-02-09 12:08

Hypoglycemic Effect of Different Proportions of Jiaotai Pill and Relevant Mechanisms

YUAN Lin, LI Hui-jiao, HU Na, TANG Peng, LIN Min, ZHONG Xiao-yu, LU Xiong*

(Cell Biology and Histopathology Laboratory, Experiment Center for Science and Technology, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the hypoglycemic effect of different proportions of Coptidis Rhizoma and Cinnamonin Cortex (10:1, 10:3, 10:6) in Jiaotai pill and relevant mechanisms. **Method:** The 12-weeks-old db/db mice were randomly divided into Coptidis Rhizoma and Cinnamonin Cortex groups (with the proportions of 10:1, 10:3, 10:6, equal to 8.4, 10, 12.3 g·kg⁻¹ of crude drug), positive drug group (metformin, 0.25 g·kg⁻¹) and the model group. Other db/m mice of the same age were selected into the normal group. The normal group and the model group were given saline solution, intragastric administration, the positive drug group was given

[收稿日期] 20161213(011)

[基金项目] 上海市卫生和计划生育委员会科研项目(201540049);上海市市属博士学科点建设基金项目(B201504);上海中医药大学教委预算内项目(2014YSN21)

[第一作者] 袁琳, 博士, 助理研究员, 从事糖尿病中医方证研究, Tel: 021-51322374, E-mail: yl-shutem@163.com

[通讯作者] * 陆雄, 博士, 研究员, 从事糖尿病方证对应及中医药防治消化系统疾病研究, Tel: 021-51322373, E-mail: xionglu93@126.com

metformin suspension, intragastric administration, while the Jiaotai pill groups with different proportions were given the corresponding water decoction, intragastric administration, once a day. After 5 weeks, body weight, food and water intake, and fasting blood glucose (FBG) were measured. Intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) and insulin tolerance test (IPITT) were performed. The changes in pancreas islet β cells morphology and ultrastructure were analyzed by immunohistochemistry and under transmission electron microscopy. Western blot was used to analyze the expressions of adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase (AMPK), phosphorylated AMPK in liver, white adipose tissue and skeletal muscle, as well as the expression of glucose transporter 4 (GLUT4) in white adipose tissue and skeletal muscle. **Result:** Compared with the normal group, the db/db mice showed increases in body weight, water and food intake, high fasting blood glucose ($P < 0.01$). IPGTT and IPITT at each time point increased ($P < 0.01$). The numbers of islet β cells and granules in β cells decreased in db/db mice. The expression of phosphorylated AMPK in liver, white adipose tissue and skeleton muscle were lower ($P < 0.05$), and the expression of GLUT4 in adipose tissue and muscle were decreased in db/db mice ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, FBG of the three Rhizoma coptidis and cinnamon groups with different proportions were significantly lower ($P < 0.05$), IPGTT and IPITT were alleviated, the numbers of pancreas islet β cells and granules in β cells were higher than the model group. Among three groups, the effect of Rhizoma coptidis and cinnamon with the proportion of 10:1 was the most obvious. The expression of phosphorylated AMPK was increased in the liver, adipose tissue and muscle of db/db mice treated with Jiaotai pill 10:1 group ($P < 0.05$). And the expression of GLUT4 was also increased in adipose tissue and muscle of Jiaotai pill 10:1 group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Jiaotai pill composed of Rhizoma coptidis and cinnamon with different proportions has a certain effect in decreasing blood glucose, and that with the proportion of 10:1 showed the best effect. Its mechanism is related to activation of AMPK and increase in the expression of GLUT4.

[Key words] Jiaotai pill; type 2 diabetes; db/db mouse; adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase; glucose transporter 4

糖尿病是以高血糖为主要特征的慢性代谢性疾病,长期高血糖可以引起心血管、肾、神经、眼等多脏器损害。近几十年来,糖尿病,尤其是 2 型糖尿病发病率逐年上升,我国已经成为目前世界上糖尿病患者人数最多的国家之一^[1]。糖尿病给我国带来严重经济负担和社会负担,寻找有效阻止或者延缓糖尿病发生发展的药物是目前医学研究的热点。

交泰丸出自明代《韩氏医通》,方由黄连、肉桂两味药物配伍而成,是中医治疗心肾不交证的著名方剂,历来多用于怔忡、失眠、健忘等症。近年来研究发现交泰丸在治疗糖尿病及其并发症中具有明显作用^[2-3],前期研究证实黄连-肉桂 10:1 配比的交泰丸,较其组成单味药降糖作用更为显著^[4]。黄连及其主要成分小檗碱是公认的糖尿病治疗药物^[5],肉桂也具有一定降血糖作用^[6],两药相伍的交泰丸对糖尿病的优势作用是由于中药药效之间的简单叠加,还是具有精当的配伍比例值得深入研究。

2 型糖尿病占糖尿病患病总数 90% 以上,主要是由于肝脏、脂肪、肌肉等葡萄糖利用组织对胰岛素的敏感性降低,胰岛 β 细胞功能的衰竭,从而导致外

周高血糖的发生,外周胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞功能障碍是其主要病理特征^[7]。腺苷酸依赖的蛋白激酶(AMPK)是高度表达于肝、肌肉和脂肪组织的一种丝氨酸/苏氨酸激酶,它被称为细胞代谢感受器,在调节机体葡萄糖、脂质代谢中发挥重要作用,AMPK 的活化后通过调节下游靶器官中葡萄糖转运蛋白 4 (glucose transporter 4, GLUT4) 的表达和转位增加葡萄糖的利用,改善胰岛素抵抗^[8]。

本研究采用自发型 2 型糖尿病模型 db/db 小鼠,通过黄连和肉桂不同配比(10:1, 10:3, 10:6)对 db/db 小鼠进行干预,观察比较不同配伍比例的交泰丸降糖作用、胰岛素抵抗的程度以及对胰岛 β 细胞的影响,确定交泰丸中黄连和肉桂的最佳配伍比例,并基于 AMPK/GLUT4 糖代谢调控途径,研究黄连和肉桂不同配伍比例对小鼠肝脏、肌肉和脂肪组织糖代谢机制的影响。

1 材料

1.1 动物 12 周龄,雌性 C57BL/KSJ-Lepdb (db/db) 小鼠 35 只,体重(39.2 ± 0.47) g,同月龄 db/m 小鼠 7 只,体重(23.5 ± 0.74) g,SPF 级。购自美国

Jackson 实验室,饲养于上海中医药大学实验动物中心 SPF 级实验室,许可证号 SYXK(沪)2014-0008。本研究所涉及的动物相关操作均在上海中医药大学动物伦理委员会的批准下进行(审查号 SZY2013032)。

1.2 药物与试剂 交泰丸组成药物黄连(产于四川,批号 120220),肉桂(产于广西,批号 120206)购于上海养和堂中药饮片有限公司。黄连、肉桂不同配伍比例(10:1,10:3,10:6)制备方法:分别取肉桂 1.5,4.5,9 g 置于圆底烧瓶中,加 6 倍体积蒸馏水浸泡 2 h 后,采用挥发油提取器微沸提取 5 h,待提取液冷却后收集用蒸馏法提取肉桂挥发油。剩余肉桂药渣与 15 g 黄连水煎煮,水煎剂冷却后与挥发油混合定容,分装保存备用^[4]。中药制备过程由上海中医药大学科技实验中心分析测试实验室协助完成。二甲双胍片(中美上海施贵宝制药有限公司,批号 H20023370);葡萄糖注射液(上海长征富民金山制药有限公司,批号 H3102227);胰岛素兔抗鼠一抗(博士德公司,批号 20081200);RIPA 裂解液,Complete,磷酸酶抑制剂,BCA 蛋白定量试剂盒,聚山梨酯-20,SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒,SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5×)(碧云天公司,批号分别为 C1053, ST5c6, S1873, P0012S, ST825, P0012A, P0015);Page Ruler™ Prestained Protein Ladder(立陶宛 Fermentas 公司,批号 00074743),PMSF(美国 Amresco 公司,批号 1403B06),GLUT4(英国 Abcam 公司,批号 ab65267),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH,上海康成生物工程公司,批号 KC-5G4);AMPK α 1phospho(pT183)/AMPK α 2(pT172),兔单抗 AMPK α 1(美国 Epitomics 公司,批号分别 YI-01-21-06C, YG-12-15-02C);HRP 偶联山羊抗兔 IgG 二抗(妙通生物公司,批号 98261),HRP 偶联山羊抗小鼠 IgG 二抗(上海明睿生物科技有限公司,批号 97910),超敏 ECL 化学发光试剂盒(碧云天生物技术研究所,批号 P0018)。

1.3 仪器 罗康全活力型血糖检测仪(德国罗氏诊断公司),TECHAI-12 透射电子显微镜(PHILIP 公司),Power Wave xs2 型全波长酶标仪(美国 Bio-Tek 公司),RM2235 型切片机,TP1020 型自动脱水机及 UC7 型超薄切片机(德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 分组与给药 db/db 小鼠禁食 12 h 后测空腹血糖(FBG),按 FBG 随机分为模型组,交泰丸 10:1 组(黄连-肉桂 10:1),10:3 组,10:6 组和二甲双胍

组,每组 7 只;另外 7 只同月龄 db/m 小鼠作为正常组。按照 70 kg 成人用量的 9 倍量换算,交泰丸 10:1 组(黄连-肉桂 10:1),10:3 组,10:6 组用药量分别相当于生药量 8.4,10,12.3 g·kg⁻¹;二甲双胍用药量为 0.25 g·kg⁻¹,正常组和模型组灌胃等量生理盐水。各组小鼠每日以 10 mL·kg⁻¹灌胃 1 次,用药 5 周。

2.2 一般指标观察 观察小鼠精神状况、反应、体毛色泽,记录进食量、饮水量以及体重变化。

2.3 腹腔注射葡萄糖耐量实验(IPGTT)和胰岛素耐量实验(IPITT) 给药 5 周后,禁食不禁水 12 h,检测 FBG;腹腔注射 1 g·kg⁻¹葡萄糖注射液,于注射后 15,30,60,120 min 尾静脉取血检测血糖。葡萄糖耐量实验后,小鼠给以充足饮食饮水饲养 2 d,于第 3 天禁食不禁水 2 h,腹腔注射 1 U·kg⁻¹胰岛素注射液,分别于注射后 0,15,30,60,120 min 尾静脉取血检测血糖水平。

2.4 胰腺胰岛素免疫组化染色 用药 5 周末,小鼠麻醉后,打开腹腔,在脾脏和十二指肠之间分离胰腺,10%中性福尔马林固定 24 h,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,于切片机上以 4 μ m 厚度切片。取切片脱蜡,乙醇水化,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗后,3%过氧化氢孵育,胰岛素一抗 1:1 000 于 37 $^{\circ}$ C 湿盒中孵育 1 h,PBS 清洗,滴加二抗室温孵育 1 h,PBS 清洗,DAB 显色,水洗后,苏木素复染,脱水后,中性树胶封片,在 200 倍光镜下选取 5 个有胰岛的区域进行拍照,采用 Image J 图像分析软件,测定出现棕黄色免疫反应的阳性区域积分吸光度 IA 值。

2.5 胰腺超微组织结构观察 取靠近脾脏的胰尾部做透射电镜观察。切取脾脏附近胰腺组织 1 mm³ 大小数块,2.5%戊二醛固定液 4 $^{\circ}$ C 固定 2 h 以上,0.1 mol·L⁻¹ PBS 充分洗涤后,1%锇酸后固定 2 h,饱和醋酸铀块染,常规梯度乙醇脱水,环氧树脂 618 包埋,首先 1 μ m 半薄切片,天青蓝染色,在光镜下观察定位胰岛,然后 70 nm 超薄切片,柠檬酸铅 2 次染色,干燥后在透射电子显微镜下观察。

2.6 蛋白质免疫印迹(Western blot)检测 取脂肪组织、肝脏以及腓肠肌组织,于离心管中 -80 $^{\circ}$ C 低温保存。称取肝脏、腓肠肌或脂肪组织 100 mg 置于 1.5 mL 离心管中,加入裂解液于冰上超声匀浆后,4 $^{\circ}$ C,14 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,吸取上清液。采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白浓度并将蛋白浓度调平后,98 $^{\circ}$ C 水浴锅内放置 5 min 使其变性。SDS-PAGE 凝胶电泳,250 mA,70 min 转移至 PVDF

膜,5% 脱脂奶粉封闭 1 h。AMPK (1:1 000), p-AMPK (1:1 000), GLUT4 (1:500) 一抗于 4 °C 孵育过夜, TBST 清洗, 过氧化物酶标记的二抗 1:3 000 室温孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次, 超敏 ECL 发光剂显色。将膜固定于光片夹中, 暗室压片 1 min。实验数据用 image-J 软件分析处理。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 18.0 进行统计分析。实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间均数的比较采用单因素的方差分析, 并用 LSD 程序进行两两比较, 以

$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 不同配比交泰丸对 db/db 小鼠体重、饮水量及进食量的影响 与正常组比较, db/db 糖尿病小鼠饮水量、进食量、体重均明显增加 ($P < 0.01$)。给药 5 周末, 二甲双胍、交泰丸 10:1 组饮水量较模型组明显减少 ($P < 0.05$), 10:3 与 10:6 组有降低的趋势, 但没有统计学差异。与模型组比较, 各给药组的进食量和体重没有明显变化。见表 1。

表 1 不同配比交泰丸对 db/db 小鼠饮水量、进食量、体重的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | 体重/g | 饮水量/mL | 进食量/g |
|----------|-----------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 正常 | - | 28.7 ± 0.31 | 3.7 ± 0.31 | 3.9 ± 0.28 |
| 模型 | - | 36.4 ± 0.37 ¹⁾ | 15.0 ± 1.30 ¹⁾ | 9.5 ± 1.54 ¹⁾ |
| 二甲双胍 | 0.25 | 36.7 ± 0.26 | 8.1 ± 0.73 ²⁾ | 8.1 ± 1.25 |
| 交泰丸 10:1 | 8.4 | 36.2 ± 0.49 | 10.2 ± 1.40 ²⁾ | 7.4 ± 0.97 |
| 交泰丸 10:3 | 10 | 38.6 ± 0.32 | 11.7 ± 1.43 | 9.2 ± 0.39 |
| 交泰丸 10:6 | 12.3 | 38.7 ± 0.39 | 12.9 ± 1.86 | 7.9 ± 1.43 |

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 不同配比交泰丸对 db/db 小鼠 FBG 的影响

12 周龄 db/db 小鼠与正常 db/m 小鼠比较, FBG 明显升高 ($P < 0.01$); 用药之前, 模型组与各用药组的 FBG 没有差异; 5 周以后, 与模型组比较, 交泰丸 3 个不同配比组、二甲双胍组的 FBG 都明显降低 ($P < 0.01$), 其中以交泰丸 10:1 组 FBG 最低 (较模型组比较降低 44%), 并与 10:6 组比较有明显差异 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 不同配比交泰丸对 db/db 小鼠 FBG 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 2 Effect of different proportions of Jiaotai pill on FBG in db/db mice ($\bar{x} \pm s, n = 7$) mmol·L⁻¹

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | 用药前 | 用药 5 周 |
|----------|-----------------------|---------------------------|-----------------------------|
| 正常 | - | 4.2 ± 0.51 | 5.1 ± 0.69 |
| 模型 | - | 15.4 ± 1.76 ¹⁾ | 24.5 ± 1.69 ¹⁾ |
| 二甲双胍 | 0.25 | 15.4 ± 1.82 | 14.9 ± 1.27 ²⁾ |
| 交泰丸 10:1 | 8.4 | 15.4 ± 1.80 | 13.6 ± 1.68 ²⁾ |
| 交泰丸 10:3 | 10 | 15.5 ± 1.86 | 15.8 ± 2.34 ²⁾ |
| 交泰丸 10:6 | 12.3 | 15.6 ± 1.87 | 16.4 ± 2.74 ^{2,3)} |

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$;与交泰丸 10:1 组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

3.3 不同配比交泰丸对 db/db 小鼠 IPGTT 的影响

在 IPGTT 实验中, 模型组 db/db 小鼠在各时间点的血糖值都明显高于正常组 ($P < 0.01$), 说明存在严重的糖耐量异常; 而与模型组比较, 交泰丸 3 个不同比例组、二甲双胍组在葡萄糖注射后 30, 60, 120 min 的血糖值都明显降低 ($P < 0.05$); 而在第 15 min 时只有交泰丸 10:1 组血糖值与模型组比较明显降

低 ($P < 0.01$), 与交泰丸 10:3 组及 10:6 组比较也明显降低 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 不同配比交泰丸对 db/db 小鼠 IPGTT 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 3 Effect of different proportions of Jiaotai pill on IPGTT in db/db mice ($\bar{x} \pm s, n = 7$) mmol·L⁻¹

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | 0 min | 15 min | 30 min | 60 min | 120 min |
|----------|-----------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 正常 | - | 4.2 ± 0.69 | 9.9 ± 2.42 | 9.0 ± 2.07 | 7.1 ± 0.97 | 5.3 ± 1.23 |
| 模型 | - | 24.5 ± 1.69 ¹⁾ | 31.0 ± 2.64 ¹⁾ | 41.8 ± 4.00 ¹⁾ | 44.1 ± 4.59 ¹⁾ | 33.8 ± 4.61 ¹⁾ |
| 二甲双胍 | 0.25 | 14.9 ± 1.27 ³⁾ | 25.0 ± 3.11 | 29.3 ± 2.75 ²⁾ | 21.3 ± 1.27 ³⁾ | 15.0 ± 1.83 ³⁾ |
| 交泰丸 10:1 | 8.4 | 13.6 ± 1.68 ³⁾ | 19.5 ± 2.16 ³⁾ | 25.6 ± 2.26 ³⁾ | 22.3 ± 2.89 ³⁾ | 17.7 ± 2.42 ³⁾ |
| 交泰丸 10:3 | 10 | 15.8 ± 2.34 ³⁾ | 25.1 ± 2.14 ⁴⁾ | 26.8 ± 3.11 ³⁾ | 24.6 ± 2.42 ³⁾ | 15.9 ± 2.30 ³⁾ |
| 交泰丸 10:6 | 12.3 | 16.4 ± 2.74 ^{3,4)} | 24.6 ± 3.00 ⁴⁾ | 26.6 ± 3.80 ³⁾ | 23.8 ± 2.65 ³⁾ | 17.0 ± 3.33 ³⁾ |

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$;与交泰丸 10:1 组比较⁴⁾ $P < 0.05$ (表 4 同)。

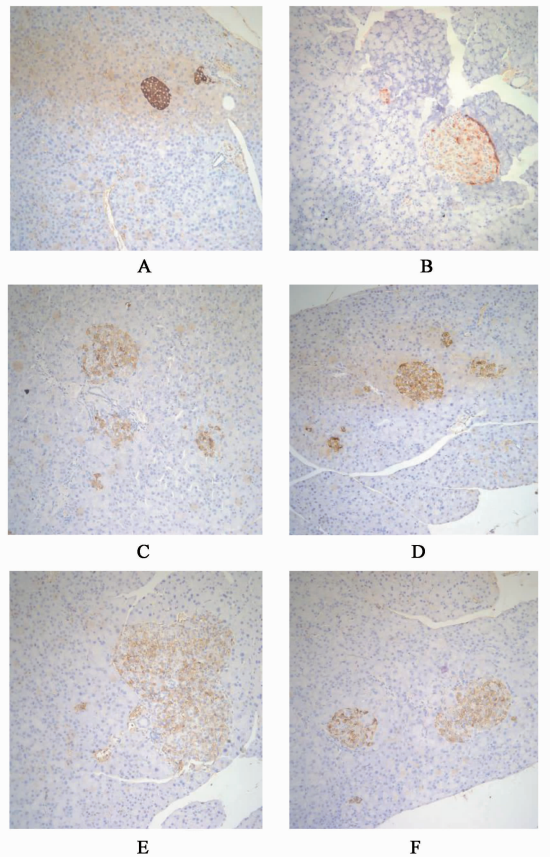
3.4 不同配比交泰丸对 db/db 小鼠 IPITT 的影响
模型组 db/db 小鼠在各时间点的血糖值都明显高于正常组 ($P < 0.01$), 说明外周组织胰岛素敏感性下降; 而与模型组比较, 交泰丸 3 个不同比例组、二

甲双胍组在胰岛素注射后各检测时间点血糖值都明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), 其中以交泰丸 10:1 组作用最为明显, 第 120 min 时其血糖值较模型组降低 65%, 且明显低于 10:6 组 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 不同配比交泰丸对 db/db 小鼠 IPITT 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

| 组别 | 剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | 0 min | 15 min | 30 min | 60 min | 120 min |
|----------|-------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 正常 | - | 6.3 ± 0.40 | 5.9 ± 0.49 | 4.2 ± 0.49 | 3.3 ± 0.40 | 4.0 ± 0.26 |
| 模型 | - | 25.3 ± 2.24 ¹⁾ | 26.5 ± 1.83 ¹⁾ | 24.8 ± 2.02 ¹⁾ | 19.1 ± 2.83 ¹⁾ | 16.5 ± 3.12 ¹⁾ |
| 二甲双胍 | 0.25 | 18.2 ± 2.65 ²⁾ | 16.9 ± 2.71 ³⁾ | 13.9 ± 2.65 ³⁾ | 8.9 ± 2.38 ³⁾ | 6.1 ± 1.58 ³⁾ |
| 交泰丸 10:1 | 8.4 | 19.3 ± 2.18 | 19.1 ± 2.40 ²⁾ | 14.7 ± 2.02 ³⁾ | 8.1 ± 1.09 ³⁾ | 5.8 ± 0.50 ³⁾ |
| 交泰丸 10:3 | 10 | 19.7 ± 2.25 | 19.6 ± 2.24 ²⁾ | 14.2 ± 1.63 ³⁾ | 8.3 ± 1.24 ³⁾ | 7.0 ± 0.61 ³⁾ |
| 交泰丸 10:6 | 12.3 | 19.8 ± 2.93 | 19.8 ± 3.23 ²⁾ | 15.6 ± 2.57 ³⁾ | 9.6 ± 1.58 ³⁾ | 8.2 ± 1.60 ^{3,4)} |

3.5 不同配比交泰丸对 db/db 小鼠胰岛形态及超微结构的影响 正常组胰腺内胰岛形态规则、结构完整, 胰岛素免疫组化结果显示胰岛内 β 细胞数量多且密集, 细胞质染色深, 提示胰岛素合成功能旺盛; 模型组 db/db 小鼠胰岛形态不规则, 可见外分泌腺侵入胰岛, 部分胰岛面积代偿性增加, 胰岛素表达平均 IA 值明显低于正常组 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 各给药组胰岛形态均有所改善, 胰岛形态结构较为完整, 其中交泰丸 10:1 组和二甲双胍组胰岛素表达平均 IA 值明显高于模型组 ($P < 0.05$)。见图 1, 表 5。透射电子显微镜观察各组小鼠胰岛超微结构。正常组胰岛内, β 细胞位于胰岛中央部, 数目较多, 细胞内分泌颗粒圆形, 数量丰富, 均有界膜包被, 有电子密度致密的芯, 并且界膜与芯间隙较宽; α 细胞位于胰岛周边部, 数量较少, α 细胞内分泌颗粒芯电子密度较大, 与界膜之间的间隙较窄。模型组胰岛内可见含有大量酶原颗粒、粗面内质网发达的腺泡细胞侵入; β 细胞数量以及细胞内分泌颗粒明显减少, 细胞内有空泡形成, α 细胞数量相对增多。与模型组比较, 各用药组胰岛超微结构均有一定改善, 其中交泰丸 10:1 组最为明显, 胰岛形态较为完整, 胰岛 β 细胞数量及细胞内颗粒数量明显增多, 细胞内空泡减少。见图 2。



A. 正常组; B. 模型组; C. 二甲双胍组; D. 交泰丸 10:1 组; E. 交泰丸 10:3 组; F. 交泰丸 10:6 组 (图 2~4 同)

图 1 不同配比交泰丸对 db/db 小鼠胰岛素蛋白的影响 (免疫组化, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of different proportions of Jiaotai pill on insulin protein in db/db mice (IHC, $\times 200$)

3.6 不同配比交泰丸对 db/db 小鼠肝脏、脂肪组织、肌肉 AMPK, p-AMPK 的蛋白表达的影响 检测肝脏中 AMPK 与 p-AMPK 的表达, 正常组、模型组及各用药组肝脏中总 AMPK 蛋白表达没有差异。与正常组比较, 模型组 db/db 小鼠的 p-AMPK 的表达明显减少 ($P < 0.05$); 而交泰丸 10:1 组, 10:3 组与二甲双胍组的 p-AMPK 与模型组比较明显增加

($P < 0.05$), 交泰丸 10:6 组与模型组比较有上升的趋势, 但没有统计学差异。而在脂肪组织中, 各组 AMPK 总蛋白无明显差异, 与正常组比较, 模型组

表 5 不同配比交泰丸对 db/db 小鼠胰腺胰岛素蛋白 (IA) 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 5 Effect of different proportions of Jiaotai pill on expression of insulin protein (IA) in pancreas of db/db mice ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | 胰岛素蛋白 |
|----------|-----------------------|----------------------------|
| 正常 | - | 0.764 ± 0.17 |
| 模型 | | 0.211 ± 0.09 ¹⁾ |
| 二甲双胍 | 0.25 | 0.476 ± 0.17 ²⁾ |
| 交泰丸 10:1 | 8.4 | 0.481 ± 0.23 ²⁾ |
| 交泰丸 10:3 | 10 | 0.340 ± 0.15 |
| 交泰丸 10:6 | 12.3 | 0.278 ± 0.11 |

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

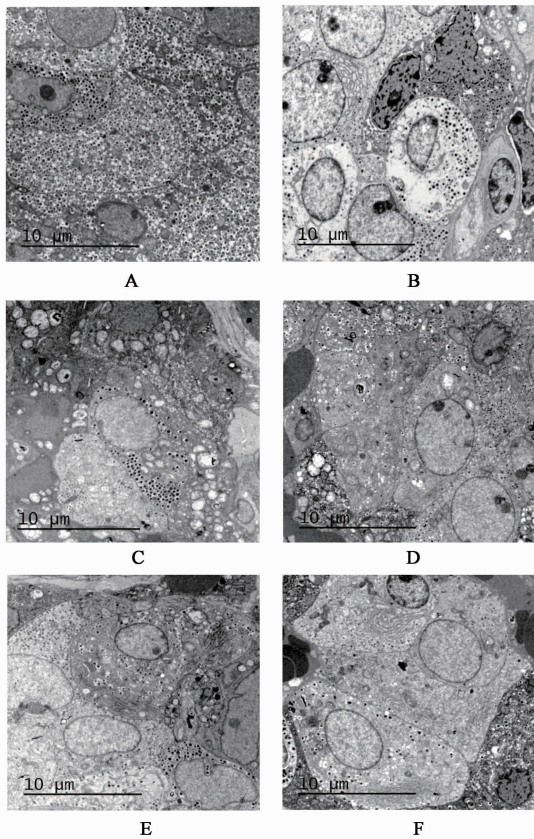


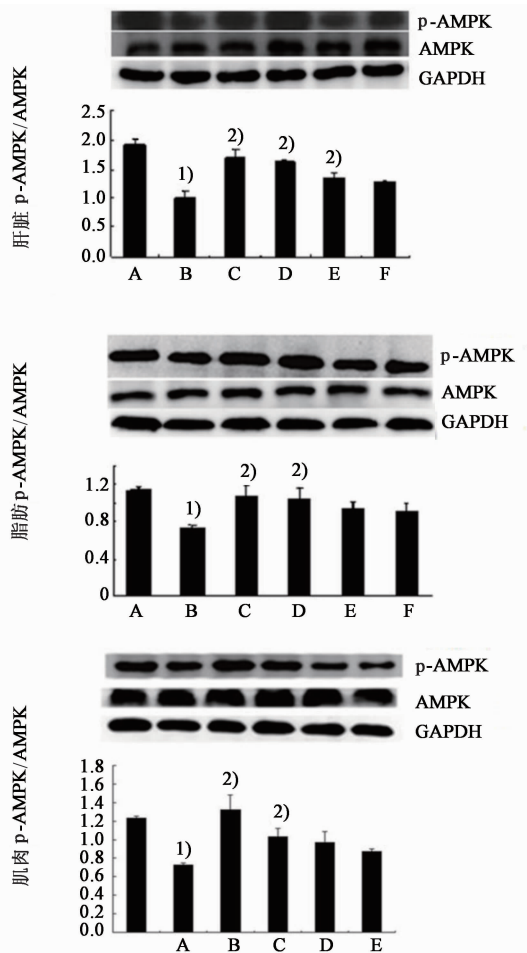
图 2 不同配比交泰丸对 db/db 小鼠胰岛超微结构的影响 (电镜扫描, ×6 000)

Fig. 2 Effect of different proportions of Jiaotai pill on pancreas ultrastructure in db/db mice (SEM, ×6 000)

小鼠 p-AMPK 蛋白表达明显减少 ($P < 0.05$); 各给药组 p-AMPK 蛋白与模型组比较都有所上调, 其中二甲双胍组、交泰丸 10:1 组的 p-AMPK/AMPK 与模型组比较有统计学差异 ($P < 0.05$)。在骨骼肌组织中检测 AMPK 与 p-AMPK 蛋白表达, 结果与脂肪组织中的结果相似。见图 3。

3.7 不同配比交泰丸对 db/db 小鼠脂肪和肌肉组织中 GLUT4 的表达的影响

检测脂肪组织中



与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$

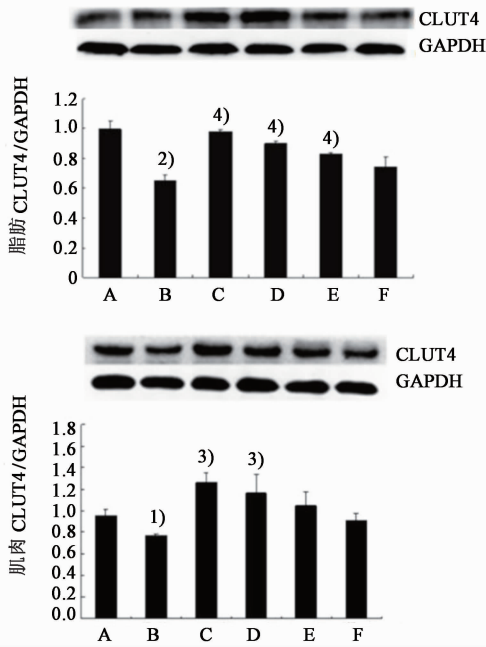
图 3 不同配比交泰丸对 db/db 小鼠肝脏、脂肪组织与肌肉组织 p-AMPK 与 AMPK 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of different proportions of Jiaotai pill on expression of p-AMPK, AMPK in liver, adipose tissue and muscle in db/db mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

GLUT4 蛋白的表达, 与正常组比较, 模型组 GLUT4 蛋白含量明显减少 ($P < 0.01$); 各给药组 GLUT4 蛋白含量与模型组比较均上调, 其中二甲双胍组、交泰丸 10:1 组、交泰丸 10:3 组脂肪组织 GLUT4 蛋白含量有显著性差异 ($P < 0.01$)。在骨骼肌组织中, 模型组 GLUT4 蛋白表达较正常组明显减少 ($P < 0.05$), 而在各用药组中, 交泰丸 10:1 组、二甲双胍组的 GLUT4 蛋白较模型组明显增加 ($P < 0.05$)。见图 4。

4 讨论

db/db 小鼠是公认的自发型 2 型糖尿病模型, 其是由于位于 4 号染色体的瘦素受体基因缺乏而出现类似人类 2 型糖尿病症状, 正如本实验结果显示, db/db 小鼠存在明显的多饮、多食、肥胖、高血糖、胰岛素抵抗及胰岛 β 细胞破坏症状^[9]。胰岛素抵抗



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⁾ $P < 0.01$

图 4 不同配比交泰丸对 db/db 小鼠脂肪组织与肌肉组织 GLUT4 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of different proportions of Jiaotai pill on expression of GLUT4 in adipose tissue and muscle in db/db mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

和胰岛 β 细胞功能障碍是 2 型糖尿病的两大主要特征。在本实验中,经过黄连、肉桂不同配比组成的交泰丸 5 周的治疗,各用药组的空腹血糖、葡萄糖耐量以及胰岛素耐量均有所改善,而其中以黄连-肉桂 (10:1) 配伍比例作用最为明显,它能够明显减少 db/db 小鼠饮水量,而 10:3 和 10:6 组未出现明显作用;在降低 FBG 方面,交泰丸 10:1 组降血糖作用明显优于 10:6 组。在葡萄糖耐量实验中,葡萄糖注射后 15 min,只有交泰丸 10:1 组明显降低 db/db 小鼠血糖,且作用优于 10:3 和 10:6 组;而胰岛素耐量实验也证实胰岛素注射后交泰丸 10:1 组的降糖率最高,这些都说明黄连-肉桂 10:1 配伍能显著改善 2 型糖尿病小鼠的胰岛素抵抗,增加胰岛素敏感性。尽管存在外周组织胰岛素抵抗,但是胰岛 β 细胞数量减少和功能障碍是决定 2 型糖尿病发病的关键因素^[7],保护 β 细胞功能对延缓和阻止糖尿病的发生发展有非常重要的意义^[10]。本实验中通过胰腺组织胰岛素免疫组化和透射电子显微镜检测,结果显示黄连肉桂 10:1 组对 db/db 小鼠胰岛保护作用最为明显,胰岛形状较为规则,胰岛内胰岛素 β 细胞数目增多,并且细胞内分泌颗粒增加。

AMPK 是一种参与多种代谢过程关键的蛋白激

酶,其活性受细胞内 AMP/ATP 调控,当细胞内/外原因引起 ATP 消耗增加和(或)生成减少而 AMP 增多时,AMPK 激活。活化的 AMPK 激活下游靶蛋白,开启细胞内的分解代谢,关闭合成代谢,因此 AMPK 被称为细胞的“代谢感受器”,其在肝葡萄糖生成和周围组织(肌肉和脂肪)的葡萄糖摄取的调节中发挥重要作用,AMPK 已经成为治疗 2 型糖尿病的重要靶点^[11]。AMPK 的分布广泛,主要存在于机体的骨骼肌、脂肪组织、肝脏以及胰腺组织中,是由 α, β, γ 3 个亚基构成的异源三聚体, α 亚基中的数个位点都可以被磷酸化,其中 α 亚基第 172 位苏氨酸 (Thr172) 磷酸化对 AMPK 的活性调节最为重要^[12]。本实验结果显示,各组小鼠的肝脏、肌肉、脂肪组织中总 AMPK 蛋白没有变化,与模型组比较,交泰丸 10:1 组磷酸化 AMPK 蛋白含量明显增加。而黄连-肉桂 10:3 交泰丸组仅在肝脏中具有明显增加 p-AMPK 表达的作用。外周组织利用葡萄糖的能力下降是 2 型糖尿病糖代谢异常的主要表现之一,激活的 AMPK 通过增加 GLUT4 的表达以及膜转位促进肌肉和脂肪组织中葡萄糖摄取,从而促进葡萄糖的利用^[13]。在本实验中,经过不同配比的交泰丸 5 周的治疗,各组小鼠脂肪和肌肉组织中 GLUT4 蛋白含量较模型组都有增加趋势,其中交泰丸 10:1 组的作用最为显著。这些结果提示,黄连-肉桂 10:1 配比的交泰丸的降血糖机制与增加肌肉和脂肪组织 AMPK 活化,促进 GLUT4 蛋白表达有关。

交泰丸最早见于明代《韩氏医通》,其后清代王士雄在《四科简要方》中提出方名,并明确提出黄连与肉桂的比例为 10:1。从方义上看,黄连性味苦寒,入心经,用量重清泻亢盛心火;肉桂其性辛甘大热,入肾经,用量为黄连的十分之一,既可温肾阳,又可制约黄连苦寒伤阳之性,因此本方寒热相伍,具有交通心肾的作用。前期研究表明黄连肉桂配伍的交泰丸较其组成的单味药具有更明显的降糖作用,本实验结果显示黄连与肉桂 10:1 配比能达到较好的降糖效果。国内有实验研究表明,在黄连、肉桂不同的配伍比例中,肉桂的含量越高,黄连所含的各生物碱的量降低越多^[14];而黄连的比例变化也会影响肉桂中有效成分的溶出^[15]。这些研究都表明交泰丸降糖作用并非黄连、肉桂药效的简单叠加,而是有着科学的比例配伍意义,值得进一步开发和利用。

[参考文献]

[1] YUE J, MAO X, XU K, et al. Prevalence, awareness, treatment and control of diabetes mellitus in a Chinese

- population[J]. PLoS One, 2016, 11(4): e0153791.
- [2] 邹欣,刘德亮,陆付耳,等. 交泰丸对 2 型糖尿病大鼠胰腺脂肪沉积和胰岛细胞凋亡的影响[J]. 中国中药杂志,2014,39(11):2106-2111.
- [3] 陈广,陆付耳,杨华静,等. 加味交泰丸对大鼠糖尿病视网膜病变的防治作用及其机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(6): 183-187.
- [4] HU N, YUAN L, LI H J, et al. Anti-diabetic activities of Jiaotaiwan in db/db mice by augmentation of AMPK protein activity and upregulation of GLUT4 expression [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, doi: 10.1155/2013/180721.
- [5] WANG H, MU W, SHANG H, et al. The antihyperglycemic effects of *Rhizoma coptidis* and mechanism of actions: a systematic reviews and pharmacological research [J]. Biomed Res Int, 2014, doi: 10.1155/2014/798093.
- [6] Medagama A B. The glycaemic outcomes of Cinnamon, a review of the experimental evidence and clinical trials [J]. Nutr J,2015, 16(14):108-119.
- [7] Weir G C, Bonner-Weir S. Islet β cell mass in diabetes and how it relates to function, birth, and death [J]. Ann N Y Acad Sci, 2013, 128(1): 92-105.
- [8] 黄鸣清,许文,褚克丹,等. 基于 GLUT4 转位的中药及活性成分改善胰岛素抵抗研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(16): 343-346.
- [9] Hummel K P, Dickie M M, Coleman D L. Diabetes, a new mutation in the mouse [J]. Science, 1966, 153(3740):1127-1128
- [10] Remedi M S, Emfinger C. Pancreatic β -cell identity in diabetes[J]. Diabetes Obes Metab, 2016, 18(S1): 110-116.
- [11] Miglianico M, Nicolaes G A, Neumann D. Pharmacological targeting of AMP-activated protein kinase and opportunities for computer-aided drug design [J]. J Med Chem,2016,59(7):2879-2893.
- [12] Hardie D G, Ross F A, Hawley S A. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012,13(4):251-262.
- [13] Zorzano A, Fandos C, Palacín M. Role of plasma membrane transporters in muscle metabolism [J]. Biochem J, 2000,349(3):667-688.
- [14] 陈广,陆付耳,李伶俐,等. 肉桂与黄连不同配伍比例对交泰丸中小檗碱含量的影响[J]. 医药导报, 2013, 32(3): 353-355.
- [15] 陈广,陆付耳,董慧,等. 肉桂与黄连不同配伍比例对交泰丸水煎剂中肉桂醛溶出率的影响[J]. 中医杂志, 2013, 54(8): 694-696.

[责任编辑 周冰冰]