

黄芪散及其拆方对 T2DM 大鼠胰岛素抵抗及肝组织 11 β -HSD1, PEPCK 的影响

李艳, 高英, 高颖, 王春怡, 郝梦娇, 李卫民*

(广州中医药大学 中药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的:通过糖皮质激素联合高脂喂养建立 2 型糖尿病(T2DM)大鼠模型,观察黄芪散及其拆方对 T2DM 大鼠胰岛素抵抗及肝组织 11 β -羟基类固醇脱氢酶 1(11 β -HSD1),磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEPCK) mRNA 与蛋白表达的影响。方法:SD 大鼠适应性饲养 1 周后,将大鼠随机分为正常组,糖皮质激素组(GC),高脂饮食组(HFD),高脂+糖皮质激素复合模型组(HFD+GC),罗格列酮组,黄芪散处方 1 组(HQS-1,2.91 g·kg⁻¹),黄芪散处方 2 组(HQS-2,3.85 g·kg⁻¹)和黄芪散原方组(HQS,2.96 g·kg⁻¹),每组 8 只。正常组和 GC 组大鼠喂以基础饲料,其他各组喂以高脂饲料。同时除正常组和 HFD 组给予等体积的生理盐水外,其他各组大鼠灌胃醋酸泼尼松龙(3.5 mg·kg⁻¹,每天 1 次),并于 1 h 后灌胃相应受试药物。于给药 10 周后,测定各组大鼠空腹血糖(FBG)及胰岛素(FINS)含量,并计算胰岛素敏感指数(ISI);苏木素-伊红(HE)染色法观察各组大鼠肝脏病理变化;实时荧光定量-聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白质免疫印迹(Western blot)法检测肝组织中 11 β -HSD1,PEPCK mRNA 和蛋白表达水平。结果:与正常组比较,HFD+GC 复合模型组大鼠表现为高血糖、高胰岛素血症,肝细胞变性,肝 11 β -HSD1,PEPCK 表达显著性升高($P < 0.01$),病理学检测发现大鼠肝脏组织的病变较为明显。与 HFD+GC 复合模型组比较,各受试药物均不同程度地降低糖尿病大鼠 FBG, FINS 水平,提高 ISI 水平($P < 0.05$, $P < 0.01$),对肝组织病理学形态也有不同程度的改善。比较 HQS-1, HQS-2 和罗格列酮的作用幅度,黄芪散原方对 FINS 水平及肝组织病理形态的改善更明显。HQS 及其拆方均可不同程度地降低肝 11 β -HSD1, PEPCK mRNA 和蛋白水平($P < 0.05$, $P < 0.01$),且黄芪散原方组对 11 β -HSD1 的降低幅度优于其他各组。结论:黄芪散具有提高胰岛素敏感性、改善肝脏病理的作用,其发挥防治糖尿病及改善胰岛素抵抗的作用机制可能与降低 11 β -HSD1 水平有关。

[关键词] 黄芪散; 2 型糖尿病; 胰岛素抵抗; 11 β -羟基类固醇脱氢酶 1

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)15-0136-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017150136

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170511.0934.042.html>

[网络出版时间] 2017-05-11 9:34

Effect of Huangqisan and Its Disassembled Recipes on Insulin Resistance and 11 β -HSD1, PEPCK Levels in Liver Tissues of Type 2 Diabetic Rats

LI Yan, GAO Ying, GAO Ying, WANG Chun-yi, HAO Meng-jiao, LI Wei-min*

(School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Huangqisan and its disassembled recipes on insulin resistance and mRNA and protein expression levels of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase typem 1 (11 β -HSD1), phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) in type 2 diabetic rats induced by glucocorticoid and high fat diet. **Method:** The study was performed after the rats received adaptive feeding for 1 week. Rats were randomly divided into normal control group (CD), glucocorticoid group (GC), high fat diet group (HFD) and combined model group (HFD + GC), rosiglitazone group (Ros), Huangqisan prescription 1 group (HQS-1,

[收稿日期] 20170215(015)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373775,81503375)

[第一作者] 李艳,在读博士,从事中药新药的研究与开发研究,Tel:13560258358,E-mail: apple2008yan@qq.com

[通讯作者] *李卫民,博士,教授,从事中药新药的研究与开发研究,Tel:020-39358290,E-mail: liweimin@gzucm.edu.cn

2.91 g·kg⁻¹), Huangqisan prescription 2 group (HQS-2, 3.85 g·kg⁻¹), and Huangqisan original prescription group (HQS, 2.96 g·kg⁻¹), 8 rats in each group. The rats in CD and GC groups were fed with basic diet, and other groups were fed with high-fat diet. The rats in CD and HFD groups were given with the same volume of normal saline, and the rats in other groups were given with prednisolone acetate (3.5 mg·kg⁻¹) by intragastric administration once a day, and then the corresponding testing drugs were given one hour later by intragastric administration. After intervention by drugs for 10 weeks, fasting blood glucose (FBG), insulin levels and insulin sensitivity index (ISI) of all rats were measured. The liver pathological changes were observed by HE staining; and the mRNA and protein expression levels of 11 β -HSD1 and PEPCK in liver tissues were detected by Real-time PCR and Western blot methods. **Result:** As compared with CD group, the rats in HFD + GC model group showed hyperglycemia, hyperinsulinemia, hepatocyte degeneration, and increased expression of 11 β -HSD1 and PEPCK ($P < 0.01$), and pathological examination showed that the pathological changes of liver tissues were obvious. As compared with HFD + GC model group, each treatment group could decrease FPG and insulin levels, increase ISI to some degree, and also improve pathological morphology to some degree. The effect of HQS original prescription on insulin level and pathological morphology was superior to other groups. In addition, HQS and its disassembled recipes could reduce 11 β -HSD1 and PEPCK mRNA and protein expression levels to different degrees ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the effect of Huangqisan original prescription was still superior to other groups. **Conclusion:** HQS could enhance insulin sensitivity and improve liver pathology, and its mechanism for preventing and treating diabetes and improving insulin resistance was probably related to reducing 11 β -HSD1 mRNA and proteins expression levels.

[**Key words**] Huangqisan; type 2 diabetic; insulin resistance; 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase typem 1 (11 β -HSD1)

2 型糖尿病 (T2DM) 的发病机制包括胰岛 β 细胞功能受损, 肝糖生成增加, 胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR), 游离脂肪酸增加和中枢神经递质功能紊乱等。目前大量研究表明, IR 是糖尿病发病的核心环节^[1], 其作用是指胰岛素作用的靶器官 (脂肪、肝脏、骨骼肌) 对胰岛素的敏感性下降, 产生的生物效应低于正常状态。因此建立适当的 IR 模型对 2 型糖尿病的病理机制研究及寻找治疗药物至关重要。

近年来研究发现, 中医药在改善 IR 方面有着独特的疗效。黄芪散和黄芪葛根汤 (文中简称黄芪散处方 2) 均为中药古方, 分别出自《圣济总录》和《证治汇补》, 临床上均可治疗消渴病。2 个方中均含有黄芪-葛根药对, 区别在于黄芪散方中具有一味泻肺的桑白皮。既往研究发现, 黄芪黄酮^[2]、葛根素^[3]、桑白皮黄酮 1-脱氧野尻霉素 (DNJ)^[4] 均具有显著改善胰岛素抵抗作用。前期基础研究证明, 黄芪散及黄芪葛根汤均可改善糖尿病大鼠胰岛素抵抗, 但在调节糖脂代谢方面却各有特点^[5-7]。笔者推测两方的差异可能是由养阴泻肺的桑白皮引起的, 故本次实验将引入另外一个方剂—黄芪-葛根-桑白皮 (2:1:1) (文中简称黄芪散处方 1)。基于前期笔者

已经成功建立了氢化可的松 (HCSS) 诱导的胰岛素抵抗小鼠模型^[8] 和链脲佐菌素 (STZ) 联合高脂喂养诱导的 2 型糖尿病大鼠模型^[5]。为此, 本课题将参考 Shpilberg 等^[9] 的方法, 建立可加速糖尿病形成的糖皮质激素联合高脂喂养诱导的胰岛素抵抗大鼠模型, 探讨黄芪散及其拆方对 T2DM 大鼠胰岛素 (FINS), 胰岛素敏感指数 (ISI), 肝组织病理形态, 以及肝脏 11 β -羟基类固醇脱氢酶 1 (11 β -HSD1), 磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (PEPCK) 的 mRNA 及蛋白水平的影响, 以期研究黄芪散防治糖尿病及临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠, 雄性, 体重 180 ~ 220 g, SPF 级, 购于广东省医学实验动物中心, 合格证号 SCXK (粤)2013-0002。动物饲养于广东药科大学实验动物中心 SPF 级动物房, 饲养温度 (24 \pm 2) $^{\circ}$ C, 湿度 50% ~ 70%, 采用 12 h:12 h 昼夜间断照明; 自由进食饮水。本研究所涉及的动物相关操作均在广东药科大学动物伦理委员会的批准下进行 (批准号 gdpulac20150130)。

1.2 药物及试剂 黄芪散原方 [黄芪-葛根-桑白皮 (1:2:1)], 黄芪散处方 1 [黄芪-葛根-桑白皮

(2:1:1)]和黄芪散处方 2[黄芪-葛根(2:1)]提取物,本实验室委托河北省邯郸市晨光生物科技集团股份有限公司按本课题组提供的提取工艺流程制备。黄芪、葛根、桑白皮药材均购自广州清平药材市场,由广州中医药大学高英主任中药师鉴定分别为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* 的干燥根、豆科植物野葛 *Pueraria lobata* 的干燥根、桑科植物桑 *Moru salba* 的干燥根皮。黄芪散及其拆方药材粉碎后,8 倍量 70% 乙醇加热回流提取 3 次,每次 1.5 h。合并提取液浓缩,上 AB-8 型大孔树脂,依次用水和不同体积分数乙醇洗脱,收集相应的洗脱液,减压回收乙醇,冷冻干燥得黄芪散及其拆方提取物。肝素(江苏万邦生化医药股份有限公司,批号 1408102);葡萄糖试剂盒(上海荣盛生物药业有限公司,批号 20150804147);大鼠 FINS 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(武汉华美生物工程有限公司,批号 T02019065);Total RNA 提取试剂盒,PrimeScript[®] RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒及 SYBR[®] Premix Ex Taq[®] II 试剂盒(日本 Takara 生物公司,货号分别为 9108/9109, RR047A, RR820A);11 β -HSD 抗体,PEPCK 抗体(美国 Santa 公司,批号分别为 Sc-19257, Sc-74823);HRP-羊抗兔(Boeter 公司,批号 BA1054);醋酸泼尼松龙(大连美仑生物技术有限公司,批号 D0719A);罗格列酮(东京化成工业株式会社,批号 5MM4N-OB)。

1.3 饲料 高脂饲料,购自广东省医学实验动物中心。依据《保健食品检验与评估技术规范》要求,高脂饲料配方为蔗糖 20%,猪油 15%,胆固醇 1.2%,胆酸钠 0.2%,酪蛋白 10%,磷酸氢钙 0.6%,石粉 0.4%,预混料 0.4%,基础饲料 52.2%。基础饲料由广东药科大学实验动物中心提供。

1.4 仪器 RT-2100C 型自动酶标仪(美国赛默飞世尔科技公司),1-15k 型冷冻离心机(上海天美科学仪器有限公司),CFX96[™] 型实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 扩增仪(美国 Bio-Rad 公司),化学发光成像系统(上海天能公司)。

2 方法

2.1 动物分组与给药 雄性 SD 大鼠,适应性饲养 1 周后,根据体重,将大鼠随机分为 8 组,分别为正常组(CD),糖皮质激素组(GC),高脂饮食组(HFD),高脂+糖皮质激素复合模型组(HFD+GC),罗格列酮组(Ros),黄芪散处方 1 组(HQS-1),黄芪散处方 2 组(HQS-2)和黄芪散原方组(HQS),

每组 8 只。CD 和 GC 组大鼠喂以基础饲料,其他各组喂以高脂饲料。除 CD 和 HFD 组给予等体积的生理盐水外,其他各组大鼠于隔日晨 8 点~10 点以醋酸泼尼松龙(3.5 mg·kg⁻¹,1 次/d)灌胃^[10],并于 1 h 后灌胃相应受试药物。根据临床等效剂量以及结合前期的实验,确定黄芪散处方 1 的给药剂量为 2.91 g·kg⁻¹,黄芪散处方 2 的剂量为 3.85 g·kg⁻¹,黄芪散原方的剂量为 2.96 g·kg⁻¹,罗格列酮的剂量^[11]为 3 mg·kg⁻¹。

2.2 一般指标检测 实验过程中每天观察大鼠进食、活动情况等变化并记录,每周称体重 1 次。于给药 10 周末,禁食 12 h,眼底静脉丛取血,4 ℃ 以 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清用于测定空腹血糖(FBG);ELISA 法测定 FINS,并计算 ISI,ISI = ln[1/(FINS × FBG)]。实验结束时,动物处死,迅速取出附睾脂肪、肝脏,-80 ℃ 冷冻保存。同时计算附睾脂肪系数。

$$\text{附睾脂肪系数} = \text{附睾脂肪质量} / \text{体重} \times 100\%$$

2.3 肝脏形态学观察 取距肝大叶边缘 5 mm 处的肝组织置于 10% 的甲醛溶液中固定,常规石蜡包埋,切片,苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察肝脏病理学变化程度。

2.4 Real-time PCR 法测定肝组织中 11 β -HSD, PEPCK mRNA 表达 按照 Trizol 说明书提取肝脏组织中总 RNA,核算测定仪测定总 RNA 浓度和纯度,吸光度 A₂₆₀/A₂₈₀ 在 1.8~2.1 为好。按照反转录试剂盒,以总 RNA 1 g 为模板,反转录合成 cDNA,然后取 cDNA 产物进行以 β -肌动蛋白(β -actin)为内参的 PCR 反应。其中 β -actin 的上游引物 5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3',下游引物 5'-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG-3',其扩增引物长度 274 bp;11 β -HSD1 的上游引物 5'-GCTCTGGG TGGACTGGACAT-3',下游引物 5'-GTTGACCT CCATGCTTCTTCGC-3',其扩增产物长度 132 bp;PEPCK 的上游引物 5'-ACGCCGACCTCCC TTACGAAAT-3',下游引物 5'-GTGCTTGCTGGTTT GCTCCTAG-3',其扩增产物长度 148 bp。反应体系为 25 μ L,反应条件为 95 ℃ 变性 30 s,60 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 40 s,40 个循环。用 C_t 表示,采用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 法对目的基因结果进行数据分析。

2.5 蛋白质免疫印迹(Western blot)法测定肝组织中 11 β -HSD,PEPCK 蛋白水平 各组大鼠肝组织称质量适量,用小剪刀剪成细小的碎片(冰上操作),按照每 20 mg 组织加入裂解液 150~250 μ L 的比例

加入裂解液。用玻璃匀浆器匀浆,直至充分裂解。充分裂解后,12 000 × g 离心 10 min,取上清,BCA 法测定蛋白浓度,−80 ℃ 冻存备用。10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白样品,用 1 × TBS 漂洗一次。加入封闭缓冲液,置于振荡摇床中进行封闭(室温,80 r·min⁻¹,2 ~ 4 h)。弃封闭液,加入用一抗稀释液稀释的一抗杂交溶液,置于 4 ℃ 杂交过夜,第 2 天在振荡摇床中进行杂交(室温,80 r·min⁻¹,1 h)。回收一抗杂交液,用 TBST 洗膜 3 次(置于振荡摇床中,室温,80 r·min⁻¹,10 min/次)。弃 TBST,加入用一抗稀释液稀释的二抗杂交溶液,置振荡摇床中杂交(室温,80 r·min⁻¹,1 h)。弃二抗溶液,用 TBST 洗膜 3 次(置于摇床中,室温,80 r·min⁻¹,10 min/次)。根据膜的大小,适量滴加 ECL 工作液到膜上,放置 1 min。利用凝胶成像系统采集图像和进行图像分析。

2.6 统计学分析 采用 Stat View 统计软件对数据进行统计分析,所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 T2DM 大鼠体重和附睾脂肪系数的影响 与 CD 组比较,HFD 和 HFD + GC 组大鼠体重和附睾脂肪系数明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),且 HFD + GC 组升高幅度优于 HFD 组,表明糖皮质激素联合高脂喂养可使糖尿病大鼠伴有肥胖特征。与 HFD + GC 复合模型组比较,HQS,HQS-1 和 HQS-2 组均可明显降低大鼠体重和附睾脂肪系数($P < 0.05$, $P < 0.01$),但 3 个处方之间对体重的控制无差异性;Ros 大鼠的体重却没有降低。以上表明 HQS 及其拆方均可有效控制大鼠体重,且优于罗格列酮。见表 1。

表 1 黄芪散及其拆方对 T2DM 大鼠体重和附睾脂肪系数的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Table 1 Effect of Huangqisan and its disassembled recipes on body weight and epididymal fat coefficient in T2DM rats($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	体重/g			附睾脂肪系数/%
		给药 0 周	给药 6 周	给药 10 周	
CD	-	431.60 ± 38.69	564.01 ± 51.24	618.72 ± 59.91	1.74 ± 0.27
GC	-	423.56 ± 19.46	524.23 ± 32.01	569.15 ± 29.64	1.84 ± 0.36
HFD	-	431.00 ± 30.85	632.61 ± 48.73 ¹⁾	699.60 ± 55.04 ¹⁾	2.48 ± 0.71 ²⁾
HFD + GC	-	426.10 ± 42.71	614.02 ± 66.50 ¹⁾	666.40 ± 78.60 ¹⁾	2.85 ± 0.68 ²⁾
Ros	0.003	427.30 ± 41.31	614.50 ± 64.76	691.50 ± 84.70	2.16 ± 0.63 ⁴⁾
HQS-1	2.91	426.81 ± 34.15	510.70 ± 51.09 ³⁾	556.41 ± 53.79 ³⁾	1.84 ± 0.40 ⁴⁾
HQS-2	3.85	428.70 ± 34.66	483.20 ± 50.27 ⁴⁾	514.00 ± 52.96 ⁴⁾	1.59 ± 0.39 ⁴⁾
HQS	2.96	419.20 ± 28.95	474.87 ± 51.24 ⁴⁾	525.23 ± 42.24 ⁴⁾	1.77 ± 0.51 ⁴⁾

注:与 CD 组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与 HFD + GC 组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2 ~ 4 同)。

3.2 对 T2DM 大鼠 FBG,FINS 及 ISI 水平的影响 与 CD 组比较,GC 组,HFD 组和 HFD + GC 复合模型组大鼠 FBG,FINS 水平均升高,ISI 明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),且 HFD + GC 组变化幅度高于其他组,表明糖皮质激素联合高脂喂养对糖尿病大鼠胰

岛素抵抗的作用更显著。与 HFD + GC 组复合模型组比较,HQS,HQS-1,HQS-2 和 Ros 组的 FBG,FINS 均有所降低,ISI 明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),且 HQS 组变化幅度优于其他拆方组,表明 HQS 可以较好地改善糖尿病大鼠胰岛素抵抗。见表 2。

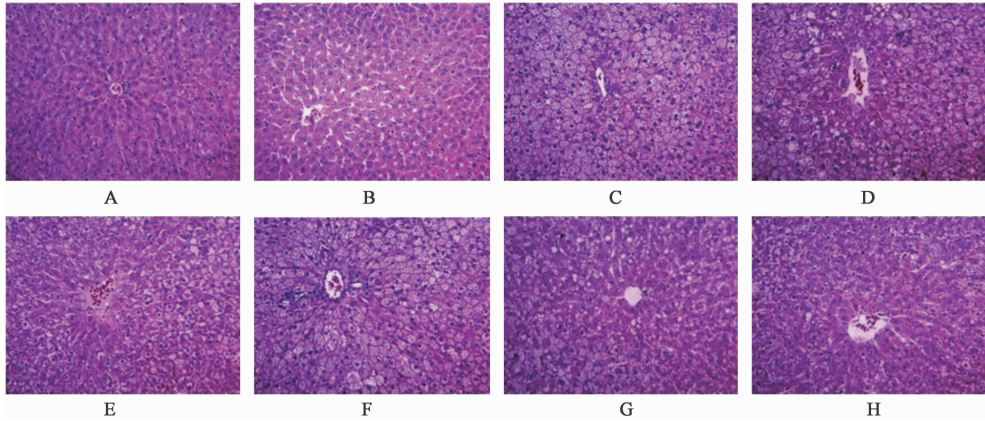
表 2 黄芪散及其拆方对 T2DM 大鼠 FBG,FINS 及 ISI 水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Table 2 Effect of Huangqisan and its disassembled recipes on FBG, FINS, ISI in T2DM rats($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	FBG/mmol·L ⁻¹	FINS/mU·L ⁻¹	ISI
CD	-	7.19 ± 0.33	140.58 ± 54.87	-6.77 ± 0.37
GC	-	9.05 ± 0.94 ²⁾	233.40 ± 33.11 ²⁾	-7.64 ± 0.16 ²⁾
HFD	-	8.69 ± 0.90 ¹⁾	223.30 ± 41.87 ²⁾	-7.55 ± 0.23 ²⁾
HFD + GC	-	9.65 ± 0.54 ²⁾	233.31 ± 41.14 ²⁾	-7.70 ± 0.16 ²⁾
Ros	0.003	7.99 ± 0.59 ⁴⁾	176.06 ± 25.34 ⁴⁾	-7.21 ± 0.13 ⁴⁾
HQS-1	2.91	8.29 ± 0.79 ³⁾	177.81 ± 40.14 ³⁾	-7.26 ± 0.27 ⁴⁾
HQS-2	3.85	8.51 ± 1.01 ³⁾	118.60 ± 22.10 ⁴⁾	-6.90 ± 0.26 ⁴⁾
HQS	2.96	7.96 ± 0.59 ⁴⁾	103.02 ± 17.20 ⁴⁾	-6.69 ± 0.16 ⁴⁾

3.3 对 T2DM 大鼠肝脏病理的影响 所有造模大鼠的肝脏形态与 CD 组比较具有不同程度的病理改变,尤其是 HFD + GC 复合模型组大鼠病理变化最明显,可见肝小叶中肝细胞脂肪变性明显,肝细胞中充满脂滴,细胞核偏于一侧,小叶中也可见点状坏死区

域。CD 组大鼠小叶中可见中央动脉及周围肝细胞围城的肝板结构,未见明显病理改变。Ros 组大鼠可见肝细胞中脂肪变性明显,肝细胞中充满了小泡样脂滴。HQS 和 HQS-2 组大鼠肝细胞中可见轻微的脂肪变性。见图 1。



A. CD 组;B. GC 组;C. HFD 组;D. HFD + GC 组;E. Ros 组;F. HQS-1 组;G. HQS-2 组;H. HQS 组(图 2 同)

图 1 黄芪散及其拆方对各组大鼠肝脏病理学的影响(HE, × 100)

Fig.1 Effect of Huangqisan and its disassembled recipes on tissue pathologic morphology in each rats(HE, × 100)

3.4 对 T2DM 大鼠肝脏 11β-HSD1 和 PEPCK mRNA 的影响 与 CD 组比较,HFD + GC 复合模型组大鼠肝组织中的 11β-HSD1 和 PEPCK mRNA 水平显著升高($P < 0.01$);与 HFD + GC 复合模型组比较,HQS, HQS-1, HQS-2 和 Ros 组 11β-HSD1 和 PEPCK mRNA 水平均有不同程度的降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),且 HQS 对其降低幅度更明显。见表 3。

比较,HQS, HQS-1, HQS-2 和 Ros 组 11β-HSD1 和 PEPCK 蛋白水平均有不同程度的降低($P < 0.05$),且 HQS 对 11β-HSD1 蛋白水平的降低幅度更明显。见图 2,表 4。

表 3 黄芪散及其拆方对 T2DM 大鼠肝脏组织 11β-HSD1 和 PEPCK mRNA 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of Huangqisan and its disassembled recipes on mRNA expression of 11β-HSD and PEPCK in T2DM rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	11β-HSD1	PEPCK
CD	-	1.02 ± 0.02	1.01 ± 0.04
GC	-	1.09 ± 0.09	0.77 ± 0.10
HFD	-	1.20 ± 0.04	0.76 ± 0.10
HFD + GC	-	2.32 ± 0.01 ²⁾	1.33 ± 0.13 ²⁾
Ros	0.003	1.77 ± 0.01 ³⁾	1.07 ± 0.01
HQS-1	2.91	1.19 ± 0.05 ⁴⁾	0.91 ± 0.05 ³⁾
HQS-2	3.85	1.36 ± 0.01 ⁴⁾	1.14 ± 0.10
HQS	2.96	1.13 ± 0.02 ⁴⁾	0.76 ± 0.02 ⁴⁾

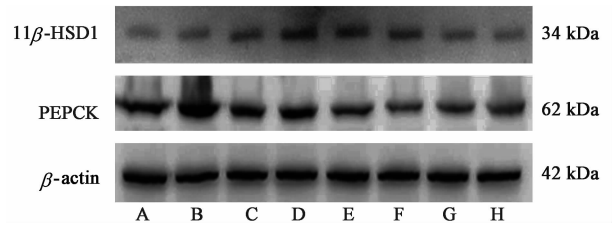


图 2 各组大鼠 11β-HSD 和 PEPCK 蛋白表达电泳

Fig.2 Electropherogram of 11β-HSD and PEPCK

4 讨论

随着人们生活方式的现代化和经济水平的迅速发展,糖尿病的发病率呈现不断增长的趋势,已成为严重影响全球居民健康的重要疾病。据统计,2014 年全球约有 3.87 亿糖尿病患者,预计到 2035 年将增长 55%,达到 6 亿^[12]。因此,糖尿病发病率的增加已经给国家和人民带来了沉重的经济负担。

糖尿病属于中医“消渴”的范畴,临床表现为多尿、多饮、多食及形体消瘦。《素问·奇病论》对消渴的记载:“此人必数食甘美而多肥也,肥者令人内热,甘者令人中满,故其气上溢,转为消渴。”中医治疗消渴,主要认为消渴与情志失调、饮食不节和劳欲过度等有关,由此也将消渴分为燥热炽盛型、阴气两虚型、阴虚火旺型和阴阳两虚型等,而后又发展至

3.5 对 T2DM 大鼠肝脏 11β-HSD1 和 PEPCK 蛋白表达的影响 与 CD 组比较,HFD + GC 复合模型组大鼠的肝组织中的 11β-HSD1 和 PEPCK 蛋白水平明显升高($P < 0.05$);与 HFD + GC 复合模型组

表 4 黄芪散及其拆方对 T2DM 大鼠肝脏组织 11 β -HSD1 和 PEPCK 蛋白水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effect of Huangqisan and its disassembled recipes on proteins expression of 11 β -HSD and PEPCK in T2DM rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	11 β -HSD1/ β -action	PEPCK/ β -action
CD	-	0.20 \pm 0.05	0.60 \pm 0.21
GC	-	0.29 \pm 0.01	0.86 \pm 0.13 ¹⁾
HFD	-	0.31 \pm 0.07	0.70 \pm 0.16
HFD + GC	-	0.37 \pm 0.08 ¹⁾	0.88 \pm 0.23 ¹⁾
Ros	0.003	0.24 \pm 0.04 ³⁾	0.69 \pm 0.08 ³⁾
HQS-1	2.91	0.24 \pm 0.04 ³⁾	0.55 \pm 0.17 ³⁾
HQS-2	3.85	0.13 \pm 0.04 ³⁾	0.54 \pm 0.17 ³⁾
HQS	2.96	0.07 \pm 0.04 ³⁾	0.67 \pm 0.03 ³⁾

从肝论治、从脾论治、从痰论治和从欲论治,且临床疗效明确^[13]。目前化药药物在治疗糖尿病中承担了举足轻重的作用,但随之而来的不良反应和安全性问题也不容乐观。中医药治疗糖尿病体现“治未病”、整体观念思想,相对西药能更好的防止糖尿病的发生和发展^[14]。

糖尿病是一种由多种病因引起的疾病,受遗传因素、社会因素、生活方式及环境因素等相互作用的影响。糖尿病的发病因素很多,机制复杂。11 β -HSD1 是目前医学对 T2DM 的研究热点^[15],研究认为 11 β -HSD1 可导致肝、脂肪、骨骼肌等局部组织糖皮质激素浓度过高,通过拮抗胰岛素效应,参与 T2DM 的发病机制,是糖皮质激素影响糖脂代谢的关键环节^[16]。11 β -HSD1 在肝脏中含量最高^[17],在肝脏中过表达 11 β -HSD1 的小鼠表现出脂质代谢障碍和胰岛素抵抗状态,通过调节糖皮质激素水平,进而影响糖异生关键酶 PEPCK 的活性。同时,临床研究中也发现 11 β -HSD1 抑制剂可明显改善肥胖及 T2DM 患者的胰岛素抵抗状态,因此 11 β -HSD1 抑制剂也被认为是目前治疗 T2DM 的前景药物之一^[18]。

建立合适的糖尿病动物模型对于研究糖尿病及其并发症的发病机制具有重要的作用。目前啮齿类动物糖尿病模型包括自发性糖尿病动物模型、诱发性糖尿病动物模型和基因工程糖尿病动物模型,各自具有不同的研究要求和特点^[19]。考虑实验费用和更接近人类糖尿病发病机制的动物模型,目前使用最多的是 STZ,高脂高糖饲料造模。本次动物模型参考文献[9],建立可加速糖尿病形成的糖皮质激素联合高脂饲料 SD 大鼠模型。临床和动物研究表明,无论是血液循环中还是细胞水平上糖皮质

激素过量,都会导致糖尿病的发展^[20]。慢性持续的糖皮质激素会直接作用胰岛细胞,诱导胰岛素抵抗。除了糖皮质激素自身的作用外,游离脂肪酸水平增加和脂肪堆积也将会导致全身胰岛素抵抗,这或许就是在疾病发展背后存在共同驱动力,尽管高脂饮食和糖皮质激素各自都会诱导胰岛素抵抗^[21],但是将 2 者联合起来共同刺激的研究却非常少。因此本研究所建立的动物模型更接近人类 T2DM 的临床症状,同时也为糖尿病患者如果不均衡饮食将导致糖皮质激素含量升高提供一定依据。本次研究发现复合模型组大鼠体重,FBG 及 FINS 含量显著升高,表明造模成功。

中药复方在防治糖尿病及其并发症方面有其独特的优势,既能控制糖尿病时的高血糖,又对其并发症有较好的作用,往往可以达到标本兼治的目的。黄芪散组方的 3 味药材黄芪、葛根、桑白皮在防治糖尿病、肥胖、脂肪肝等代谢综合征的研究已多有报道^[2-4]。两方均以黄芪-葛根药对入方,用以益气生津,治疗气阴不足证。黄芪散方中尚有清泻肺热的桑白皮,黄芪与葛根药对的比例与黄芪葛根汤相反,益气生津的同时重在清肺和养阴,而黄芪葛根汤则重在益气。本文对黄芪散及其拆方改善胰岛素抵抗作用进行了比较。结果发现黄芪散可以有效控制糖尿病大鼠体重,降低附睾脂肪系数,降低 FINS 含量,提高 ISI,改善肝脏病理形态改变,在一定程度上优于其他拆方组。以上表明黄芪散其发挥防治糖尿病及胰岛素抵抗的作用机制可能与降低 11 β -HSD1 水平有关。

[参考文献]

[1] XIA W, WANG S, Spaeth A M, et al. Insulin resistance-associated interhemispheric functional connectivity alterations in T2DM: a resting-state fmri study[J]. Biomed Res Int, 2015, doi: 10.1155/2015/719076.

[2] 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(10):144-146.

[3] 曹莉,顾振纶,茅彩萍. 葛根素对糖尿病小鼠胰岛素抵抗的影响[J]. 中草药,2006,37(6):901-904.

[4] 肖冰心,王倩,樊利青,等. 葛根黄酮提高桑白皮降糖活性及其机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(15):149-153.

[5] 王春怡,李卫民,高英. 黄芪葛根汤对 T2DM 大鼠胰岛素抵抗及 PPAR- γ mRNA 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(5):152-155.

- [6] 陈艳芬,王春怡,李卫民,等. 古方黄芪散降糖作用的实验研究[J]. 广东药学院学报,2010,26(1):73-76.
- [7] 罗娇艳,高英,王春怡,等. 黄芪散及黄芪葛根汤调脂作用研究[J]. 中药新药与临床药理,2013,24(3):221-226.
- [8] 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.
- [9] Shpilberg Y, Jacqueline L, Beaudry, et al. A rodent model of rapid-onset diabetes induced by glucocorticoids and high-fat feeding [J]. *Dis Models Mech*, 2012,5(5):671-680.
- [10] LIAO C, TING L, YU L, et al. Salvianolic acid B prevents bone loss in prednisone-treated rats through stimulation of osteogenesis and bone marrow angiogenesis [J]. *PLoS One*,2012,7(4):1-17.
- [11] Rameshwar J, Hamendra S P, Sunanda P, et al. Amelioration of corticosteroid-induced type 2 diabetes mellitus by rosiglitazone is possibly mediated through stimulation of thyroid function and inhibition of tissue lipid peroxidation in mice [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*,2007,101(3):177-180.
- [12] International Diabetes Federation. IDF diabetes atlas sixth edition poster update 2014 [EB/OL]. 2014-11-10. <http://www.idf.org/diabetesatlas/update-2014>.
- [13] 陈书明. 中医治疗及饮食调理消渴症 21 例[J]. 中国中医药现代远程教育,2013,25(17):35-36.
- [14] 范琳燕. 中医“治未病”理念在糖尿病并发症防治中的临床研究[J]. 世界中西医结合杂志,2016,11(4):544-546.
- [15] Ryu J H, Kim S, Lee J A, et al. Synthesis and optimization of picolinamide derivatives as a novel class of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 beta-HSD1) inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015,25(8):1679-1683.
- [16] Andreas S, Ruth A, Brian R W, et al. Tissue-specific dysregulation of cortisol regeneration by 11 β HSD1 in obesity: has it promised too much? [J]. *Diabetologia*, 2014, 57(6):1100-1110.
- [17] Stuart A M, Zaki K H, Craig L D, et al. Glucocorticoids and 11 β -HSD1 are major regulators of intramyocellular protein metabolism [J]. *J Endocrinol*, 2016, 229(3):277-286.
- [18] Pereira C D, Azevedo I, Monteiro R, et al. 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1: relevance of its modulation in the pathophysiology of obesity, the metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus [J]. *Diabetes Obes Metab*,2012,14(10):869-881.
- [19] Deise R B, Astrid W, Roberto P, et al. The chronic care model for type 2 diabetes: a systematic review[J]. *Diabetol Metab Syndr*, 2016,8:1-7.
- [20] WANG Y, Nakagawa Y, LIU L, et al. Tissue-specific dysregulation of hexose-6-phosphate dehydrogenase and glucose-6-phosphate transporter production in db/db mice as a model of type 2 diabetes [J]. *Diabetologia*, 2011,54(2):440-450.
- [21] Karatsoreos I N, Bhagat S M, Bowles N P, et al. Endocrine and physiological changes in response to chronic corticosterone: a potential model of the metabolic syndrome in mouse [J]. *Endocrinology*, 2010, 151(5):2117-2127.

[责任编辑 周冰冰]