

双益方改善2型糖尿病模型大鼠胰岛素抵抗的 药效及作用机制

田春雨^{1*}, 薄海美², 林飞武³, 喇孝瑾¹, 曹慧娟¹, 朱亮¹, 杨雨旸¹, 李继安¹

(1. 华北理工大学中医学院, 河北唐山 063210; 2. 华北理工大学临床医学院, 河北唐山 063210;
3. 河北林益堂药业有限公司, 河北邯郸 056004)

[摘要] **目的:** 进行双益方对2型糖尿病模型大鼠的药效作用实验, 分析其作用机制。**方法:** 采用高脂饲养加25 mg·kg⁻¹剂量链脲佐菌素腹腔注射的方法建立2型糖尿病大鼠模型, 将成模动物随机分为模型组, 二甲双胍组[灌胃(ig), 85 mg·kg⁻¹], 双益方高、中、低(ig, 2 000, 1 000, 500 mg·kg⁻¹)剂量组。进行双益方对2型糖尿病模型大鼠的体重, 饮水量, 饮水量, 二便情况, 血糖, 糖耐量测定(oral glucose tolerance test, OGTT), 糖化血红蛋白(hemoglobin A1c, HbA1c), 糖化血清蛋白(glycosylated serum protein, GSP), 胰岛素等指标的检测, 蛋白免疫印迹法(Western blot)测定肝组织蛋白酪氨酸磷酸酶1B(protein tyrosine phosphatase 1B, PTP1B), 蛋白激酶(Akt), 磷酸化的蛋白激酶(p-Akt), 糖原合成酶激酶-3β(glycogen synthase kinase-3β, GSK-3β), 磷酸化的糖原合成酶激酶-3β(p-GSK-3β)的表达, Western blot测定骨骼肌组织胰岛素受体底物-1(insulin receptor substrate-1, IRS-1), 磷酸化的胰岛素受体底物-1(p-IRS-1), 葡萄糖转运蛋白4(glucose transporter 4, Glut4)表达的影响。**结果:** 与模型组比较, 双益方可降低2型糖尿病模型大鼠的空腹血糖(fasting blood glucose, FBG), HbA1c水平及胰岛素抵抗指数(Homa-IR), 缓解2型糖尿病模型大鼠饮水量多、饮水量多、二便量大及体重减轻的状况($P < 0.05$, $P < 0.01$), 降低血清胰岛素、糖化血清蛋白、糖化血清蛋白及随机血糖($P < 0.05$, $P < 0.01$), 其中双益方高剂量组药效较好; 双益方可显著升高2型糖尿病模型大鼠骨骼肌 p-IRS-1, Glut4 的表达($P < 0.01$, $P < 0.05$); 双益方可显著升高2型糖尿病模型大鼠肝脏 p-Akt 的表达, 显著降低 PTP1B, p-GSK-3β 的表达($P < 0.01$, $P < 0.05$)。**结论:** 双益方可有效调节2型糖尿病模型大鼠糖代谢紊乱, 促进胰岛素分泌, 改善胰岛素抵抗; 调节骨骼肌 PI3K/Akt, 肝脏 Akt/GSK-3β 信号转导通路可能是该复方治疗2型糖尿病的作用机制。

[关键词] 双益方; 2型糖尿病; 胰岛素抵抗; 糖原合成酶激酶-3β(GSK-3β); 磷酸化的糖原合成酶激酶-3β(p-GSK-3β)

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)22-0137-06

[doi] 10.13422/j.cnki.sjfx.2017220137

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170809.1412.074.html>

[网络出版时间] 2017-08-09 14:12

Efficacy and Mechanism of Shuangyi Prescription in Improving Insulin Resistance in Type 2 Diabetes Model Rats

TIAN Chun-yu^{1*}, BO Hai-mei², LIN Fei-wu³, LA Xiao-jin¹, CAO Hui-juan¹,
ZHU Liang¹, YANG Yu-yang¹, LI Ji-an¹

(1. College of Traditional Chinese Medicine, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China; 2. Clinical Medicine College of North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China; 3. Linyitang Pharmaceutical Co. Ltd., Handan 056004, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the pharmacological effect and action mechanism of Shuangyi prescription (SYP) in the treatment of type 2 diabetes rats. **Method:** High fat diet plus 25 mg·kg⁻¹ streptozotocin were intraperitoneally injected to establish type 2 diabetic rats model. The model animals were randomly divided

[收稿日期] 20170629(006)

[基金项目] 河北省自然科学基金项目(H2015209025);河北省高等学校科学技术研究项目(QN2015119)

[通讯作者] *田春雨,副教授,博士,从事中药防治糖尿病研究, Tel:13722533361, E-mail:tcy4479@sina.com

into model group, metformin group ($ig, 85 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), SYP high dose group ($ig, 2\ 000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), SYP middle dose group ($ig, 1\ 000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), and SYP low dose group ($ig, 500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Body weight, food intake, water intake, urine, stool, blood glucose, oral glucose tolerance test (OGTT), hemoglobin A1c (HbA1c), glycosylated serum protein (GSP), and insulin of type 2 diabetes rats were studied; Western blot was used to detect protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B), Akt, p-Akt, glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β), p-GSK-3 β expressions in liver tissues; Western blot to detect insulin receptor substrate-1 (IRS-1), p-IRS-1, glucose transporter 4 (Glut4) expressions in skeletal muscle tissues. **Result:** SYP can reduce fasting blood glucose (FBG), HbA1c level and OGTT of type 2 diabetes rats, reduce insulin resistance index. Compared with the model group, SYP can alleviate polydipsia, polyphagia, polyuria, and weight loss conditions in type 2 diabetic rats in each dose group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), SY can reduce insulin, glycated serum protein and random blood glucose ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the effect of SYP was better in the high-dose group; SYP can significantly increase p-IRS-1 and GLUT4 expressions ($P < 0.01$, $P < 0.05$), reduce the expression of PTP1B ($P < 0.01$, $P < 0.05$) in skeletal muscles of type 2 diabetic model rats; SY can significantly increase p-Akt expression, and significantly reduce PTP1B, p-GSK-3 β expressions ($P < 0.01$, $P < 0.05$) in liver of type 2 diabetic model rats. **Conclusion:** SYP can effectively regulate glycometabolic disorders in type 2 diabetes rats, improve insulin resistance. The regulation of skeletal muscle PI3K/Akt and liver Akt/GSK-3 β signaling pathway may be the mechanism of SY in the treatment of type 2 diabetes.

[**Key words**] Shuangyi prescription (SYP); type 2 diabetes mellitus (T2DM); insulin resistance; glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β); p-GSK-3 β

目前全世界范围内 2 型糖尿病的发病率及患病人数多年来持续居高不下,我国近些年来也逐渐成为世界上 2 型糖尿病患者人数最多的国家,由于 2 型糖尿病及其并发症患病的长期性及复杂性,给患者带来身体上及经济上的巨大的病痛和压力负担,因此各国医药学者都在积极研究防治 2 型糖尿病安全、有效的药物。最近 10 年中医药在防治 2 型糖尿病方面取得了重要进展,中医药经过辨证论治治疗可以较好的缓解 2 型糖尿病胰岛素抵抗,改善糖代谢,控制并发症的发生及预后,课题组依据“脾肾亏虚是消渴之本、肺胃有热是消渴之标、肥甘厚味是消渴之因的”病因病机特点,自拟双益方(由黄芪、佩兰、黄连、葛根、山茱萸、桑白皮组成)治疗 2 型糖尿病,方中黄芪健脾、益气,山茱萸涩精、益肾,共为君药,二药补脾、肾亏虚固其本;黄连清胃热,桑白皮泻肺热,为臣药,二药清泻胃、肺之热治其标;葛根生津止渴为佐药;佩兰芳香醒脾、化湿浊,为使药,前期笔者进行了双益方中有效成分含量测定及对 HepG2 细胞胰岛素抵抗的改善作用的研究^[1-5],但双益方治疗 2 型糖尿病的具体药效作用及其作用机制还不明确,为此本实验进行双益方改善 2 型糖尿病模型大鼠胰岛素抵抗作用的实验研究,观察双益方对 2 型糖尿病模型大鼠的糖化血红蛋白、糖化血清蛋白、空腹血糖、糖耐量、胰岛素及胰岛素抵抗指数

(Homa-IR)的影响,研究双益方对模型大鼠肝组织中磷酸化的蛋白激酶(p-Akt),蛋白酪氨酸磷酸酶 1B(protein tyrosine phosphatase 1B,PTP1B),磷酸化的糖原合成酶激酶-3 β (p-GSK-3 β)的表达量及骨骼肌中磷酸化的胰岛素受体底物-1(p-IRS-1),葡萄糖转运蛋白 4(glucose transporter 4,Glut4)表达量的影响,进一步明确双益方治疗 2 型糖尿病的药理作用,分析其作用机制,为其开发利用提供实验依据。

1 材料

1.1 药物 双益方中黄芪、黄连、桑白皮、山茱萸、佩兰、葛根饮片均购于唐山市同仁堂药店,经田春雨副教授鉴定均为正品,符合 2015 年版《中国药典》规范。

1.2 试剂 二甲双胍片(上海施贵宝药业,批号 1407117);血糖试纸(三诺生物公司,批号 2429EN);胰岛素试剂盒(美国密理博公司,批号 2586749D);Akt 一抗,GSK-3 β 一抗(沈阳万类生物科技有限公司,批号分别为 14103020,15030920);p-Akt1(phospho S473)一抗,p-GSK-3 β (phospho S9)一抗,PTP1B 一抗,Glut4 一抗,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)Antibody(美国 Bioworld 公司,批号分别为 CJ00101, CA36131, 11334-1-AP, CJ44121, AA56133);Anti-IRS1 抗体,Anti-IRS1(phospho Y612)抗体,Anti-MEK1/2 抗体,Anti-ERK1 + ERK2

antibody, p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) Antibody (英国 Abcam 公司, 批号分别为 GR46705-20, GR184267-7, ab178876, GR197011, GR185138-5)。

1.3 仪器 M200PRO 型酶标仪(瑞士 Tecan 公司); 安稳型血糖仪(三诺生物公司); Nycocard Reader II 型糖化血红蛋白检测仪(挪威 Axis-shield 公司); Universal Hood II Trans-Blot Turbo Transfer System(美国博瑞德公司); ChemiDocCxr System 成像系统, Mini-Protean Tetra System 电泳槽(美国博瑞德公司)。

1.4 动物 SPF 雄性 Wistar 大鼠, 8 周龄, 体重(290 ± 10)g, 购自军事医学科学院(0000383)。动物合格证号 SCXK(军)2014-0001。本实验获得华北理工大学实验动物伦理委员会批准(201521)。

2 方法

2.1 双益方提取方法 称取双益方中中药饮片(黄芪-山茱萸-黄连-桑白皮-葛根-佩兰 5:5:4:4:3:2), 加用 6 倍量的 30% 乙醇热回流提取 2 次, 每次 1.5 h, 提取液浓缩干燥, 灌胃时分别将双益方提取物配置成高、中、低剂量混悬液给药。

2.2 动物分组与给药 大鼠适饲养 1 周后, 给予高脂、高糖饲料喂养 4 周, 按照 25 mg·kg⁻¹ 剂量链脲佐菌素腹腔注射, 建立 2 型糖尿病大鼠模型, 以空腹血糖 ≥ 11.1 mmol·L⁻¹, 随机血糖 ≥ 16.7 mmol·L⁻¹ 为 2 型糖尿病成模标准^[6]。将成模的大鼠随机分为 5 组, 模型组 10 只[灌胃(ig)生理盐水]; 双益方高、中、低剂量组各 10 只(分别 ig 双益方提取物 2 000, 1 000, 500 mg·kg⁻¹, 根据预实验筛选^[5]将双益方成人用量换算成大鼠中剂量), 二甲双胍组 10 只(ig, 85 mg·kg⁻¹), 连续给药 8 周, 另取 Wistar 雄性大鼠 10 只, 作为正常组。

2.3 一般检测指标及方法 记录各组大鼠给药前后的体重变化、饮食及饮水量、二便情况、毛色等情况。给药 0, 4, 8 周测定各组大鼠空腹血糖; 第 4, 8 周给药后, 大鼠禁食 10 h, 灌胃葡萄糖 2.0 g·kg⁻¹, 测定给药后 0, 30, 60, 120 min 的血糖值, 计算曲线下面积(AUC), $AUC = [(FBG + BG_{30\min}) \times 15/60 + (BG_{30\min} + BG_{60\min}) \times 15/60 + (BG_{60\min} + BG_{120\min}) \times 30/60]$; 采用糖化血红蛋白检测仪检测; 大鼠终末期胰岛素抵抗指数(Homa-IR)按照参考文献[3]方法计算; 按照试剂盒说明书测定 C-肽(C-peptide, C-P), 糖化血清蛋白(GSP), 胰岛素, 同时冻存肝、骨骼肌供蛋白免疫印迹(Western blot)实验使用。

2.4 Western blot 测定肝组织 PTP1B, Akt, p-Akt, GSK-3 β , p-GSK-3 β 的表达 取大鼠新鲜肝组织 130 mg, 加入细胞裂解液 1 mL, BCA 法测定蛋白浓度。取蛋白 50 μ g, 混合蛋白上样缓冲液, 100 $^{\circ}$ C 金属浴热浴 5 min。10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 100 V, 300 mA 湿转 0.5 h, PMSF 膜用封闭液封闭 2 h, Western 洗涤液清洗, 然后将 PMSF 膜置于 PTP1B, Akt, p-Akt, GSK-3 β , p-GSK-3 β 一抗中(抗体工作液 1:1 000), 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育 12 h, Western 洗涤液清洗, 二抗孵育 1 h, Western 洗涤液清洗, ECL 化学发光试剂盒中显色, 并采用 Bio-Rad Image Lab 软件分析。

2.5 Western blot 测定骨骼肌组织 p-IRS-1, IRS-1, Glut4 表达 取大鼠肌肉 130 mg, 同 2.4 项方法进行操作, 然后将 PMSF 膜置 p-IRS-1, IRS-1, Glut4 一抗(1:1 000)中, 放入冰箱 4 $^{\circ}$ C 孵育 12 h, Western 洗涤液清洗, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗中孵育 1 h, Western 洗涤液清洗, ECL 化学发光试剂盒显色, Bio-Rad 软件分析^[7-9]。

2.6 统计学方法 采用 SPSS 21.0 分析软件分析数据, 数据测定结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验进行组间比较。P < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠的一般状况比较 正常组的大鼠状态较好, 饮食、体重正常; 模型组大鼠毛色杂乱并且无光泽, 有少量脱毛现象, 与正常组比较, 进食量、尿量、饮水量增加, 体重减轻, 粪便较稀。与模型组比较, 双益方组可改善 2 型糖尿病大鼠饮食、体重及毛色等情况, 正常组毛色变好有光泽, 饮食量增加, 体重增加。见表 1。

3.1.1 双益方对 T2DM 大鼠体重情况及饮食、饮水量的影响

3.1.2 双益方对 T2DM 大鼠二便的影响 给药 8 周后, 与正常组比较, 2 型糖尿病模型组大鼠的排尿量、排便量显著增加(P < 0.05, P < 0.01); 与模型组比较, 双益方各剂量组在一定程度上能够降低 2 型糖尿病大鼠排尿量、排便量(P < 0.05, P < 0.01)。见表 2。

3.2 双益方对 T2DM 大鼠空腹血糖(FBG), 糖化血红蛋白(HbA1c)的影响 与正常组比较, 模型组大鼠 FBG, HbA1c 增高(P < 0.05, P < 0.01); 给药 8 周后, 与模型组比较, 双益方各剂量组均可降低 2 型糖尿病模型大鼠 FBG, HbA1c 水平, 其中双益方高剂量组药效较好(P < 0.05, P < 0.01)。见表 3。

表 1 双益方对各组大鼠体重、饮食、饮水量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of SYP on body weight, food intake, water intake in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	给药前			给药 2 周		
		体重/g	进食量/g·kg ⁻¹	饮水量/mL·kg ⁻¹	体重/g	进食量/g·kg ⁻¹	饮水量/mL·kg ⁻¹
正常	-	359.36 ± 12.66	72.58 ± 2.34	71.08 ± 2.77	390.15 ± 10.16	73.03 ± 2.65	70.28 ± 2.22
模型	-	345.38 ± 14.16	68.19 ± 2.25	96.53 ± 4.83	375.39 ± 13.12	67.25 ± 2.05 ¹⁾	98.36 ± 4.11
双益方	2 000	356.77 ± 13.22	73.63 ± 2.92	72.68 ± 2.83	331.62 ± 11.35	66.77 ± 2.36	58.22 ± 2.80
	1 000	360.06 ± 12.12	71.68 ± 2.72	66.86 ± 2.59	368.48 ± 14.03	64.05 ± 2.82	82.28 ± 3.79 ³⁾
	500	357.22 ± 13.06	70.28 ± 1.97	71.29 ± 2.80	366.35 ± 12.33	63.35 ± 2.27	117.12 ± 5.18 ⁴⁾
二甲双胍	85	353.19 ± 13.11	71.56 ± 2.51	65.35 ± 2.09	366.37 ± 13.16	59.05 ± 2.76	63.97 ± 1.98

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	给药 4 周			给药 8 周		
		体重/g	进食量/g·kg ⁻¹	饮水量/mL·kg ⁻¹	体重/g	进食量/g·kg ⁻¹	饮水量/mL·kg ⁻¹
正常	-	427.71 ± 16.30	68.47 ± 2.17	84.15 ± 3.52	494.72 ± 20.11	61.94 ± 2.85	94.53 ± 4.14
模型	-	400.03 ± 15.09	64.41 ± 2.31	147.06 ± 5.39 ²⁾	366.58 ± 15.10 ²⁾	73.40 ± 2.21 ¹⁾	164.51 ± 7.11 ²⁾
双益方	2 000	359.12 ± 11.73 ³⁾	68.33 ± 2.18	102.34 ± 4.28 ^{1,3)}	402.16 ± 15.62 ³⁾	52.26 ± 2.82 ^{1,3)}	94.21 ± 4.53 ³⁾
	1 000	391.58 ± 14.13	55.91 ± 2.45	80.96 ± 3.13 ³⁾	418.15 ± 17.17 ⁴⁾	55.54 ± 2.81 ³⁾	88.18 ± 3.86 ⁴⁾
	500	377.61 ± 13.70 ³⁾	72.16 ± 2.18	135.05 ± 5.52 ²⁾	389.78 ± 15.65 ^{1,3)}	69.19 ± 2.73 ¹⁾	122.61 ± 5.82 ¹⁾
二甲双胍	85	391.14 ± 13.17	55.95 ± 2.27	74.45 ± 3.82 ⁴⁾	410.74 ± 17.68 ⁴⁾	55.33 ± 2.15 ³⁾	83.33 ± 3.82 ⁴⁾

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 2~8 同)。

表 2 双益方对各组大鼠二便的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of SYP on urine output and defecation in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	排尿量/mL·kg ⁻¹	排便量/g·kg ⁻¹
正常	-	46.55 ± 2.15	1.41 ± 0.05
模型	-	82.81 ± 4.02 ²⁾	3.38 ± 0.13 ¹⁾
双益方	500	53.46 ± 2.12 ³⁾	1.92 ± 0.07 ³⁾
	1 000	56.82 ± 2.33 ³⁾	2.52 ± 0.08 ³⁾
	2 000	76.46 ± 3.86 ²⁾	3.18 ± 0.08
二甲双胍	85	41.15 ± 2.18 ⁴⁾	1.55 ± 0.06 ³⁾

表 3 双益方对各组大鼠 FBG, HbA1c 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of SYP on FBG and HbA1c in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	FBG/mmol·L ⁻¹				HbA1c/%	
		0 周	2 周	4 周	8 周	4 周	8 周
正常	-	5.14 ± 0.27	5.09 ± 0.22	5.12 ± 0.27	5.15 ± 0.31	3.53 ± 0.19	3.54 ± 0.17
模型	-	16.89 ± 1.73 ²⁾	17.83 ± 2.23 ²⁾	18.42 ± 2.61 ²⁾	21.78 ± 3.16 ²⁾	6.17 ± 0.85 ¹⁾	6.87 ± 0.48 ¹⁾
双益方	500	16.71 ± 1.71 ²⁾	15.36 ± 1.76 ²⁾	13.15 ± 2.11 ^{2,3)}	12.11 ± 1.13 ^{2,3)}	5.76 ± 0.49 ²⁾	5.55 ± 0.31 ²⁾
	1 000	16.87 ± 1.64 ²⁾	14.22 ± 1.87 ²⁾	10.67 ± 1.43 ^{2,3)}	9.03 ± 1.21 ^{2,3)}	5.53 ± 0.51 ²⁾	5.12 ± 0.22 ²⁾
	2 000	16.95 ± 1.95 ²⁾	12.08 ± 2.02 ²⁾	7.67 ± 1.68 ⁴⁾	7.21 ± 1.12 ⁴⁾	4.95 ± 0.57 ³⁾	4.78 ± 0.21 ³⁾
二甲双胍	85	16.99 ± 1.87 ²⁾	10.12 ± 1.61 ^{2,4)}	6.33 ± 1.22 ⁴⁾	6.21 ± 1.14 ⁴⁾	4.37 ± 0.63 ³⁾	4.20 ± 0.19 ³⁾

3.4 双益方对 T2DM 大鼠胰岛素、糖化血清蛋白 (GSP) 及随机血糖的影响 与模型组比较,双益方能降低 2 型糖尿病大鼠血清胰岛素、糖化血清蛋白及随机血糖 ($P < 0.05, P < 0.01$),其中,双益方高剂量组药效较好。见表 5。

3.5 双益方对 T2DM 大鼠肝 PTP1B 蛋白表达的影

3.3 双益方对 T2DM 大鼠 AUC 及 Homa-IR 的影响 与正常组比较,模型组各时段血糖值均较正常组显著升高,120 min 时血糖值仍居高位。8 周后,模型组大鼠 AUC 明显升高;与模型组比较,双益方可显著降低 2 型糖尿病大鼠 AUC ($P < 0.01$),以双益方高剂量组效果较好 ($P < 0.01$)。2 型糖尿病模型组大鼠的 Homa-IR 显著升高,双益方各剂量组可显著降低 2 型糖尿病模型大鼠的 Homa-IR。见表 4。

响 与正常组比较,模型组大鼠的 PTP1B 在肝中的表达显著增加 ($P < 0.01$);与模型组比较,双益方组的 PTP1B 在肝中的表达显著降低 ($P < 0.01, P < 0.05$)。见图 1,表 6。

3.6 对各组大鼠肝组织 Akt, p-Akt, GSK-3 β , p-GSK-3 β 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组

表 4 给药 4,8 周后双益方对 T2DM 大鼠 AUC 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of SYP on AUC in each group 4, 8 weeks after administration ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

mmol·L⁻¹

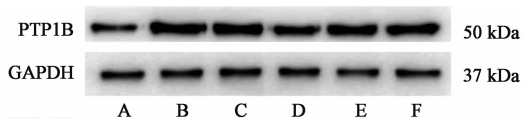
组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Homa-IR		AUC	
		4 周	8 周	4 周	8 周
正常	-	0.423 4 ± 0.001 7	0.414 5 ± 0.001 5	11.89 ± 0.58	12.11 ± 0.50
模型	-	1.446 5 ± 0.016 5 ¹⁾	1.456 5 ± 0.011 2 ¹⁾	43.67 ± 2.45 ²⁾	47.32 ± 2.64 ²⁾
双益方	500	0.939 8 ± 0.014 7	1.020 1 ± 0.011 9	25.43 ± 1.63 ^{2,4)}	24.54 ± 1.64 ^{2,4)}
	1 000	0.820 7 ± 0.007 6 ³⁾	0.778 5 ± 0.008 6 ³⁾	22.53 ± 1.21 ^{1,4)}	21.45 ± 2.23 ^{1,4)}
	2 000	0.638 6 ± 0.007 3 ³⁾	0.612 8 ± 0.011 2 ³⁾	16.53 ± 1.53 ⁴⁾	15.43 ± 1.57 ⁴⁾
二甲双胍	85	0.515 8 ± 0.005 7 ³⁾	0.546 3 ± 0.006 9 ³⁾	15.57 ± 0.96 ⁴⁾	14.24 ± 1.67 ⁴⁾

表 5 双益方对 2 型糖尿病模型大鼠血清胰岛素, GSP, 随机血糖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effect of SYP on Serum insulin, GSP and random blood glucose in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	剂量/mg·kg ⁻¹	血清胰岛素/mU·L ⁻¹	GSP/mmol·L ⁻¹	随机血糖/mmol·L ⁻¹
正常	-	412.85 ± 11.56	1.41 ± 0.13	5.69 ± 0.42
模型	-	675.28 ± 19.25 ²⁾	1.84 ± 0.07 ²⁾	19.73 ± 1.13 ²⁾
双益方	500	575.16 ± 19.58 ³⁾	1.62 ± 0.11 ³⁾	11.62 ± 0.48 ³⁾
	1 000	531.78 ± 20.18 ³⁾	1.59 ± 0.09 ³⁾	8.82 ± 0.52 ⁴⁾
	2 000	479.85 ± 15.27 ⁴⁾	1.51 ± 0.08 ⁴⁾	7.92 ± 0.51 ⁴⁾
二甲双胍	85	465.27 ± 17.46 ⁴⁾	1.48 ± 0.08 ⁴⁾	7.82 ± 1.01 ⁴⁾

大鼠肝脏组织中的 Akt, p-Akt 表达显著降低, GSK-3β, p-GSK-3β 的表达显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 双益方组肝组织中的 Akt, p-Akt 表达量显著升高, GSK-3β, p-GSK-3β 的表达量显著降低 ($P < 0.01, P < 0.05$)。见图 2, 表 7。



A. 正常组; B. 模型组; C. 二甲双胍组; D-F. 双益方高、中、低剂量组 (图 2, 3 同)

图 1 双益方对 T2DM 大鼠肝 PTP1B 表达的影响

Fig. 1 Effect of SYP on PTP1B expression in liver of T2DM rats in each group

表 6 双益方对 T2DM 大鼠肝 PTP1B 蛋白相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Comparison of PTP1B protein expression in liver and skeletal muscle of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	PTP1B/GAPDH
正常	-	2.96 ± 0.10
模型	-	5.50 ± 0.21 ¹⁾
双益方	2 000	3.73 ± 0.16 ³⁾
	1 000	5.28 ± 0.19
	500	5.09 ± 0.21
二甲双胍	85	4.54 ± 0.18

3.7 对 各 组 大 鼠 骨 骼 肌 组 织 p-IRS-1, IRS-1, Glut4 蛋白表达的影响 与正常组比较, 2 型糖尿病模型

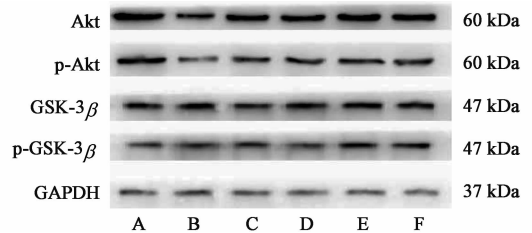


图 2 对 各 组 大 鼠 肝 组 织 Akt, p-Akt, GSK-3β, p-GSK-3β 蛋白的表达

Fig. 2 AKT, p-AKT, GSK-3β, p-GSK-3β expressions in liver of each group

大鼠骨骼肌中的 IRS-1, p-IRS-1, Glut4 表达量显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 双益方大鼠骨骼肌中的 p-IRS-1, Glut4 表达量显著升高 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 3, 表 8。

4 讨论

本实验结果表明, 双益方灌胃 8 周后, 可在一定程度上缓解 2 型糖尿病大鼠多饮、多食、多尿、多便、身体消瘦的状况, 提示双益方可改善 2 型糖尿病大鼠的体内代谢、控制体重。

糖化血红蛋白在临床上常被用作诊断糖尿病、衡量糖尿病治疗疗效的权威指标, 是衡量 2 型糖尿病患者血糖长期控制情况的重要指标之一, 而糖化血清蛋白则是衡量 2 型糖尿病患者血糖近两个月内控制情况的监测指标; Homa-IR 是临床上用于评价 2 型糖尿病患者胰岛素抵抗情况的常用指标。本实验

表 7 各组大鼠肝脏 Akt, p-Akt, GSK-3 β , p-GSK-3 β 相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Comparisons of Akt, p-Akt, GSK-3 β , p-GSK-3 β protein expressions in liver of rats in each groups ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Akt/GAPDH	p-Akt/Akt	GSK3 β /GAPDH	p-GSK3 β /GSK3 β
正常	-	11.70 ± 0.52	0.82 ± 0.04	4.48 ± 0.14	0.65 ± 0.05
模型	-	6.09 ± 0.23 ²⁾	0.60 ± 0.04 ¹⁾	5.96 ± 0.21 ¹⁾	0.48 ± 0.03 ¹⁾
双益方	500	13.18 ± 0.53 ⁴⁾	0.66 ± 0.04	6.04 ± 0.13	0.95 ± 0.04 ⁴⁾
	2 000	9.41 ± 0.36 ³⁾	0.64 ± 0.04	6.09 ± 0.20	0.59 ± 0.03
二甲双胍	1 000	11.13 ± 0.48 ⁴⁾	0.61 ± 0.05	6.03 ± 0.15	0.83 ± 0.04 ⁴⁾
	85	9.34 ± 0.41 ³⁾	0.63 ± 0.05	4.74 ± 0.16 ³⁾	0.82 ± 0.04 ³⁾

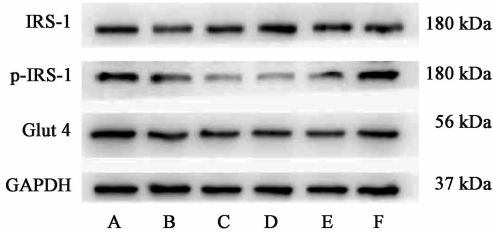


图 3 对各组大鼠肝组织 IRS-1, p-IRS-1, Glut4 蛋白的表达
Fig. 3 Protein expression of IRS-1, p-IRS-1, Glut4 in skeletal muscle in each groups

表 8 各组大鼠骨骼肌 IRS-1, p-IRS-1, Glut4 蛋白相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 8 Comparisons of IRS-1, p-IRS-1, Glut4 protein content in skeletal muscle of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	IRS-1/GAPDH	p-IRS-1/IRS-1	Glut4/GAPDH
正常	-	0.44 ± 0.15	0.57 ± 0.03	0.95 ± 0.14
模型	-	0.29 ± 0.05 ¹⁾	0.30 ± 0.01 ¹⁾	0.51 ± 0.05 ¹⁾
双益方	2 000	0.64 ± 0.11 ⁴⁾	0.22 ± 0.02	0.63 ± 0.13
	1 000	0.52 ± 0.09 ³⁾	0.30 ± 0.02	0.55 ± 0.10
二甲双胍	500	0.43 ± 0.09 ³⁾	0.97 ± 0.01 ⁴⁾	0.76 ± 0.09 ³⁾
	85	0.47 ± 0.10 ³⁾	0.28 ± 0.02	0.69 ± 0.11 ³⁾

信号转导来发挥改善胰岛素抵抗、调节糖代谢的作用。

骨骼肌作为胰岛素作用的重要靶器官,对机体糖代谢也发挥着重要的调节作用,餐后大部分葡萄糖的由骨骼肌摄取,骨骼肌 PI3K 通路即 InsR—IRS-1—PI3K—Akt—GLUT4—细胞内糖代谢,其中 IRS-1, GLUT4 等因子起正调控作用。实验表明双益方可使 2 型糖尿病大鼠骨骼肌中 p-IRS-1, GLUT4 的表达量显著升高,说明双益方可能通过调节骨骼肌胰岛素信号转导来发挥改善胰岛素抵抗、调节糖代谢的作用。

本实验进一步明确了双益方对 2 型糖尿病大鼠的药效作用,分析了其可能的作用机制,为该复方的进一步临床应用提供了实验依据。

[参考文献]

[1] 田春雨,薄海美,喇孝瑾,等. 正交设计法优选双益降糖方中小檗碱的提取工艺[J]. 河北联合大学学报:医学版,2013,15(1):51-52.
[2] 田春雨,薄海美,喇孝瑾,等. 正交设计法优选双益降

结果表明,双益方可有效的降低 2 型糖尿病患者的糖化血红蛋白及糖化血清蛋白指标,降低空腹血糖及 AUC,降低 2 型糖尿病大鼠胰岛素及 Homa-IR,提示双益方可改善 2 型糖尿病胰岛素抵抗,调节糖代谢。

实验表明双益方可使 2 型糖尿病大鼠肝中 p-Akt 的表达量显著升高,PTP1B, GSK-3 β 的表达量显著降低,说明双益方可能通过调节肝组织胰岛素

糖方中葛根素的提取工艺[J]. 河北联合大学学报:医学版,2013,15(2):158-159.

[3] 田春雨,薄海美,喇孝瑾,等. 双益方、组方中药及其有效成分对 HepG2 细胞胰岛素抵抗的改善作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(18):233-237.
[4] 崔鹏,田春雨,张艳萍,等. 双益方对 2 型糖尿病大鼠 SOD、MDA、FFA 影响的实验研究[J]. 时珍国医国药,2013,23(8):1840-1842.
[5] 刘志霞,张艳平,吴范武,等. 双益方改善 2 型糖尿病大鼠糖、脂代谢及作用机制的初步研究[J]. 辽宁中医杂志,2012,24(2):221-224.
[6] 田春雨,薄海美,白静,等. 芪桑降糖方对 2 型糖尿病大鼠糖代谢及脂代谢的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(21):207-209.
[7] 李霞,周智广,亓海英,等. 用空腹 C 肽代替胰岛素改良 Homa 公式评价胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞功能[J]. 中南大学学报:医学版,2004,29(4):419-423.
[8] 陈树. 胰高糖素样多肽 1-老年 2 型糖尿病治疗的新靶点[J]. 实用医院临床杂志,2014,11(1):22-25.
[9] 陈学,龙静,杜梅英,等. 糖化血红蛋白及糖化血清蛋白与 2 型糖尿病的相关性研究[J]. 中国医刊,2015,50(7):72-75.

[责任编辑 邹晓翠]