

· 配伍 ·

天花粉-黄精药对对糖尿病小鼠糖脂代谢及 肝脏胰岛素抵抗的影响

毕境新¹, 张秋娥², 丁雷¹, 彭川³, 赵庆¹, 秦慧钊¹, 吴丽丽^{4,5}, 秦灵灵⁶, 刘铜华^{1,4,5*}

(1. 北京中医药大学第二临床医学院, 北京 100078; 2. 陕西中医药大学第一临床医学院,

陕西咸阳 712046; 3. 成都中医药大学临床医学院, 成都 610036;

4. 北京中医药大学教育部中医养生学重点实验室, 北京 100029;

5. 北京中医药大学中医养生学研究所, 北京 100029; 6. 北京中医药大学, 北京 100029)

[摘要] 目的: 观察不同配伍比例的天花粉-黄精药对水提物对自发性2型糖尿病小鼠(KKAY小鼠)糖脂代谢的影响, 并基于磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/叉头转录因子1(FoxO1)信号通路探讨天花粉-黄精药对改善胰岛素抵抗的作用机制。方法: 取雄性8周龄C57BL/6J小鼠为正常组, 将同周龄KKAY雌性小鼠根据血糖、体质量随机分为模型组、二甲双胍组、天花粉-黄精药对1:1组(天花粉30g、黄精30g), 天花粉-黄精药对1:3组(天花粉15g、黄精45g), 天花粉-黄精药对1:5组(天花粉10g、黄精50g), 每组各6只。给药8周, 分别于第2周、第4周、第6周、第8周取相同时间点记录小鼠体质量(BW)、空腹血糖(FBG), 第7周进行口服葡萄糖耐量实验(OGTT)。用药结束后, 检测各组小鼠血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平、空腹血清胰岛素(FINS), 计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR); 肝脏组织进行苏木素-伊红(HE)染色和过碘酸-Schiff(PAS)染色, 观察肝脏脂肪分布和糖原含量; 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肝脏PI3K、Akt、FoxO1蛋白及其磷酸化蛋白表达。结果: 与正常组比较, 模型组小鼠进食量、空腹血糖、耐糖量、FINS、HOMA-IR、TC、TG、LDL-C显著升高($P<0.01$), PI3K、Akt、FoxO1蛋白及其磷酸化蛋白表达显著降低($P<0.01$); 与模型组比较, 天花粉-黄精药对水提物各配伍组能明显降低KKAY小鼠空腹血糖及胰岛素抵抗指数($P<0.05$, $P<0.01$), 尤以天花粉、黄精为1:3配伍组最为显著($P<0.01$), 效果相当于二甲双胍; 天花粉-黄精药对水提物各配伍组能明显降低小鼠OGTT各时间点血糖($P<0.05$); 并能显著降低各组小鼠TC、LDL-C($P<0.01$), 1:3组可显著降低小鼠TG($P<0.01$); 各配伍组BW、FINS有下降, 但差异无统计学意义。各给药组小鼠肝脏形态较规则, 脂滴较少, 糖原分布较多; Western blot结果显示天花粉-黄精药对组肝脏PI3K、磷酸化(p)-Akt蛋白表达增加, FoxO1蛋白表达抑制、磷酸化水平增加($P<0.05$)。结论: 天花粉-黄精药对水提物可有效降低KKAY小鼠FBG及TC、LDL-C、HOMA-IR, 尤以天花粉-黄精为1:3配伍比例最佳, 并促进肝脏糖原合成, 减少脂肪变性, 其作用机制可能与调节肝脏PI3K/Akt/FoxO1信号通路相关。

[关键词] 天花粉; 黄精; 2型糖尿病; 胰岛素抵抗; 磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/叉头转录因子(FoxO1)信号通路

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)21-0042-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221503

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220719.1802.009.html>

[网络出版日期] 2022-07-20 14:02

Effect of Trichosanthis Radix-Polygonati Rhizoma on Glucose and Lipid Metabolism and Hepatic Insulin Resistance in KKAY Mice

BI Jingxin¹, ZHANG Qiu'e², DING Lei¹, PENG Chuan³, ZHAO Qing¹, QIN Huizhao¹,
WU Lili^{4,5}, QIN Lingling⁶, LIU Tonghua^{1,4,5*}

[收稿日期] 2022-03-25

[基金项目] 中医药防治内分泌代谢病平台建设与创新中药和保健产品研发基金项目(1130065120002); 中医药防治糖尿病及其并发症学科创新引智基地项目(B20055)

[第一作者] 毕境新, 硕士, 从事中医药防治内分泌代谢疾病的临床与实验研究, E-mail: 18434376808@163.com

[通信作者] * 刘铜华, 博士, 教授, 主任医师, 博士生导师, 从事中医药防治内分泌代谢疾病的临床与实验研究, E-mail: thliu@vip.163.com

- (1. *The Second Clinical Medical School, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China;*
2. *The First Clinical Medical School, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xiayang 712046, China;*
3. *Clinical Medical School, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610036, China;*
4. *Key Laboratory for Chinese Medicine Health Preservation of Ministry of Education, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;*
5. *Institute of Chinese Medicine Health Preservation, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;*
6. *Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)*

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of the water extracts of *Trichosanthis Radix*-*Polygonati Rhizoma* at different ratios on glucose and lipid metabolism in KKAY mice with spontaneous type 2 diabetes and explore the mechanism of the extract in alleviating insulin resistance based on phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)/forkhead box O1 (FoxO1) signaling pathway. **Method:** The 8-week-old C57BL/6J male mice were taken as the normal control group, and KKAY male mice of the same age were randomly assigned into a model group, a metformin group, *Trichosanthis Radix*-*Polygonati Rhizoma* groups at the ratios of 1:1 (*Trichosanthis Radix* 30 g, *Polygonati Rhizoma* 30 g), 1:3 (*Trichosanthis Radix* 15 g, *Polygonati Rhizoma* 45 g), and 1:5 (*Trichosanthis Radix* 10 g, *Polygonati Rhizoma* 50 g) according to blood glucose level and body weight, with 6 mice in each group. The administration lasted for 8 weeks, and the body weight (BW) and fasting blood glucose (FBG) of mice were recorded at the same time points of the 2nd, 4th, 6th, and 8th weeks, respectively. Oral glucose tolerance test (OGTT) was performed at the 7th week. After drug administration, the serum levels of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), and fasting insulin (FINS) were measured, and homeostasis model assessment-insulin resistance (HOMA-IR) index was calculated. The liver tissue samples were stained with hematoxylin-eosin (HE) and periodic acid-Schiff (PAS) for observation of the fat distribution and glycogen content. The protein levels of PI3K, Akt, p-Akt, FoxO1, and p-FoxO1 in the liver were determined by Western blot. **Result:** Compared with the normal group, the model group showed increased food intake, FBG, glucose tolerance, FINS, HOMA-IR, TC, TG, and LDL-C ($P<0.01$), and down-regulated protein levels of PI3K, Akt, phosphorylation (p)-Akt, FoxO1, and p-FoxO1 in the liver ($P<0.01$). Compared with the model group, *Trichosanthis Radix*-*Polygonati Rhizoma* lowered FBG and HOMA-IR ($P<0.05$, $P<0.01$). In particular, the combination at the ratio of 1:3 showed the best performance ($P<0.01$) comparable to metformin. Furthermore, *Trichosanthis Radix*-*Polygonati Rhizoma* at different ratios lowered blood glucose at different time points of OGTT ($P<0.05$) and TC and LDL-C ($P<0.01$). Additionally, the combination at the ratio of 1:3 reduced TG ($P<0.01$). The liver of mice in the drug administration groups showed regular morphology, with few lipid droplets and rich glycogen. Western blot showed that *Trichosanthis Radix*-*Polygonati Rhizoma* up-regulated the protein levels of PI3K and p-Akt, down-regulated the protein level of FoxO1, and up-regulated the protein level of p-FoxO1 ($P<0.05$). **Conclusion:** *Trichosanthis Radix*-*Polygonati Rhizoma*, especially at the ratio of 1:3, lowered the FBG, TC, LDL-C, and HOMA-IR index, promoted liver glycogen synthesis, and reduced steatosis in KKAY mice, which may be related to the regulation of PI3K/Akt/FoxO1 signaling pathway in the liver.

[Keywords] *Trichosanthis Radix*; *Polygonati Rhizoma*; type 2 diabetes mellitus; insulin resistance; phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)/forkhead box O1 (FoxO1) signaling pathway

2型糖尿病(T2DM)是一种以胰岛β细胞功能障碍和胰岛素抵抗为特征的慢性代谢性疾病,全球

患病率逐年上升,中国是目前糖尿病患病人数最多的国家。糖尿病是致盲、致残、导致心脏病、肾脏衰

竭以及过早死亡的重要原因^[1]。不仅严重威胁人民健康,还给社会经济造成极大负担。寻找安全高效的防治糖脂代谢紊乱的方法,延缓糖尿病及其并发症的进展,对于减轻社会负担、维护患者生命健康有着极为重要的意义。

现代研究表明,胰岛素抵抗 T2DM 发生发展的主要病理机制,很多中药及方剂具有良好的降糖和改善胰岛素抵抗的作用。中药药对是最基础的方剂配伍单位,配伍精简,不仅具备方剂的基本特点和功能主治,而且较单味药而言,能发挥相辅相成、增效、减毒的作用。中药药对相比复方组方简单,具有相互作用及作用靶点较少等优点,是简化方剂、研究复方的基础^[2]。天花粉是植物栝楼的干燥根茎,功效清热泻火,生津止渴,在古今中药治疗糖尿病中应用十分广泛,为治疗糖尿病之要药。黄精为百合科植物黄精的干燥根茎,味甘,补气、养阴、健脾、润肺、益肾,《神农本草经》中列为“上品”,可滋肺胃肾之阴,用于治疗脾胃虚弱、阴虚肺燥、须发早白、精血不足、内热消渴等证,二药均与糖尿病阴虚燥热的核心病机相契合。故本实验选用天花粉、黄精药对作为研究对象,观察其对 2 型自发性糖尿病 KKAY 小鼠的糖脂代谢的影响,并通过不同配伍比例探讨其改善糖尿病最佳配比,在此基础上基于磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)/叉头转录因子 O1(FoxO1)信号通路探讨其改善胰岛素抵抗的作用机制,为深入研究天花粉-黄精药对治疗糖尿病提供实验基础。

1 材料

1.1 动物 雄性 KKAY 小鼠 30 只,8 周龄,SPF 级,同周龄雄性 C57BL/6J 小鼠 6 只。购自华阜康生物科技股份有限公司[合格证号 SCXK(京)2019-0008]。饲养于北京中医药大学 SPF 级动物研究实验室。饲养环境及条件为温度(24±2)℃,湿度(50±10)%,12 h/12 h 光黑循环,所有小鼠自由摄食饮水,正常组小鼠进食正常饲料,模型组、二甲双胍组及天花粉、黄精各组进食 KK 鼠料。本实验已通过北京中医药大学动物伦理审查,批准编号 BUCM-202108002-3130。

1.2 药物 按天花粉-黄精分别为 1:1、1:3、1:5 的配伍比例,配置天花粉-黄精药对配方 1 组(天花粉 30 g、黄精 30 g)、配方 2 组(天花粉 15 g、黄精 45 g)、配方 3 组(天花粉 10 g、黄精 50 g)。所有药材购于云南煜新农业科技有限公司,经中国科学院大学纪运恒研究员鉴定为正品,符合 2015 年版《中华人民

共和国药典》规范。根据小鼠与成人的体表面积换算公式,各组小鼠按以上比例灌胃等效剂量均为 8 g·kg⁻¹·d⁻¹。制法为上述 3 组不同配伍比例药对,分别加水共煎 3 次,每次 1 h,首次 12 倍量水,第 2、3 次各加 10 倍量水,合并煎液,200~300 目过滤,减压浓缩(-0.10~-0.06 MPa, 50~70 ℃)至相对密度为 1.15~1.35(60 ℃)的稠膏,出膏率约 34.8%,减压干燥(-0.10~-0.06 MPa, 50~68 ℃),粗碎备用。

1.3 试剂 胰岛素放免试剂盒(北京华英生物技术研究所,批号 HY-D0001);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒、过碘酸-Schiff(PAS)染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号分别为 G1120、G1281);PI3K p85、Akt、磷酸化(p)-Akt(Thr308)、FoxO1、p-FoxO1(Ser256)、β-肌动蛋白(β-actin)抗体(美国 CST 公司,货号分别为 4257、4685、13038、2880、9461、3700);辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G 二抗(英国 Abcam 公司,货号 ab6721)。

1.4 仪器 3-30K 型低温离心机(美国 Sigma 公司);BX53 型光学显微镜(日本 Olympus 公司);E9032 型酶标仪(美国 Promega 公司);HWS-24 型电热恒温水浴槽(上海一恒恒温设备厂);ISEQ00010 型 PVDF 膜(0.22 μm)(美国 Millipore 公司);Mini-PROTEAN Tera System 型垂直电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);DYCZ-40D 型转膜仪(北京六一生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组与给药 适应性喂养 1 周后,连续 2 d 固定时间尾尖采血法检测空腹血糖(FBG),随机血糖≥11.1 mmol·L⁻¹成模,根据血糖、体质量,采用分层抽样法,将小鼠分为 4 组,每组 6 只。分别为模型组,天花粉-黄精药对配方 1 组、配方 2 组、配方 3 组(小鼠按上述比例等效剂量灌胃均为 8 g·kg⁻¹·d⁻¹)。同周龄雄性 C57BL/6J 小鼠 6 只,为正常组。正常组及模型组予去离子水灌胃,所有小鼠灌胃体积均为 10 mL·kg⁻¹。每日 1 次,连续 8 周。

2.2 空腹血糖、体质量与口服葡萄糖耐量实验 每 2 周检测小鼠体质量、空腹血糖,第 7 周行葡萄糖耐量实验。分别检测小鼠 0、30、60、120 min 血糖,计算曲线下面积。

2.3 血清生化指标检测 第 8 周末次给药后,禁食不禁水 12 h,进行摘眼球取血,静置 4 h 后,3 000 r·min⁻¹、4 ℃离心 15 min(离心半径 13.5 cm,下同),吸取上清,检测血脂四项、空腹血清胰岛素(FINS)含量,并计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)=

FBG×FINS·22.5^{-1[3-4]}。

2.4 HE和PAS染色观察肝脏组织病理变化 小鼠取材后,肝脏组织部分于4%多聚甲醛中固定,取固定后的肝脏组织,分别用浓度渐次升高的乙醇进行梯度脱水,二甲苯浸渍、石蜡浸蜡后,进行包埋。根据试剂盒所提供步骤进行HE和PAS染色,中性树脂胶进行封固后,镜下观察小鼠肝脏组织形态学及糖原分布。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肝组织PI3K、Akt、FoxO1蛋白及其磷酸化水平 从超低温冰箱中取黄豆粒大小冻存的肝脏组织,分别放入加有2粒钢珠的2 mL微型离心管中,加入细胞裂解液,于研磨机中进行充分研磨,冰上静置裂解30 min后,4℃、12 000 r·min⁻¹离心15 min,吸取上清,根据吸光度绘制标准曲线,考马斯亮蓝法进行蛋白定量,沸水煮5 min,低温冰箱保存备用。按步骤做胶,上样量每孔15 μL,80 V 30 min,100 V 50 min电泳使蛋白跑开。湿转法进行转膜,将胶置于PVDF膜上,外层由滤纸、海绵压紧,于电转液中100 V转膜50 min,电转完成后,50转摇床室温封闭1 h,加入稀释后的一抗(1:1 000)4℃孵育过夜。TBST漂洗3次;二抗(1:4 000)室温孵育1 h。TBST漂洗3次,避光与ECL超敏发光液反应2 min。显影,采用Image J 6.0分析条带灰度值。

2.6 统计学处理 采用SPSS 21.0进行数据统计分析,所有实验数据均为计量资料,用 $\bar{x}\pm s$ 表示,数据经检验均符合正态分布,采用单因素方差分析最小显著性差异法(LSD)-*t*法检验各组间差异, $P<0.05$

表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对KKAy小鼠一般情况的影响 正常组小鼠体型正常,行为敏捷;与正常组比较,模型组小鼠体型肥胖,活动减少,进食量显著增多($P<0.01$)。与模型组比较,各给药组均能明显降低KKAy小鼠的平均进食量($P<0.05, P<0.01$),其中以二甲双胍组最为显著($P<0.01$),天花粉-黄精药对3个配伍组中配方1、配方2组效果较为显著($P<0.01$)。见表1。

表1 天花粉-黄精药对对KKAy小鼠平均进食量的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Effect of Trichosanthis Radix and Polygonati Rhizoma (TP) on average food intake of KKAy mice in each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	平均进食量/g
正常组		4.14±0.44
模型组		6.66±0.42 ²⁾
二甲双胍组	0.25	5.13±0.54 ⁴⁾
配方1组	8	5.67±0.37 ⁴⁾
配方2组	8	5.79±0.25 ⁴⁾
配方3组	8	5.95±0.69 ³⁾

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-表7同)

3.2 对KKAy小鼠体质量的影响 给药前,与正常组比较,模型组KKAy小鼠体质量明显升高($P<0.05$);给药后,各组小鼠体质量均有增长,各给药组与模型组小鼠体质量比较差异无统计学意义。见表2。

表2 天花粉-黄精药对对KKAy小鼠体质量的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of TP on KKAy mice body weight ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	0周	2周	4周	6周	8周
正常组		26.95±0.82	27.99±0.98	29.54±0.52	30.75±0.60	31.75±0.83
模型组		37.80±1.46 ²⁾	40.47±2.44 ²⁾	42.21±0.58 ²⁾	43.95±1.27 ²⁾	46.10±0.53 ²⁾
二甲双胍组	0.25	38.70±1.24	38.58±0.79	40.46±1.82	42.04±1.35	44.22±1.96
配方1组	8	39.05±2.23	38.73±0.77	41.15±1.36	43.53±0.99	44.75±0.97
配方2组	8	38.95±1.14	38.00±1.34	41.87±1.85	43.21±1.28	45.01±1.63
配方3组	8	39.19±1.42	38.63±1.90	41.37±2.38	44.67±2.46	44.25±1.63

3.3 对KKAy小鼠空腹血糖的影响 研究结果显示给药前,与正常组比较,模型组小鼠空腹血糖显著升高($P<0.01$);与模型组比较,第2周和第4周,二甲双胍组及天花粉-黄精配方2组空腹血糖明显降低($P<0.05, P<0.01$),第4周时,配方2组和配方3组空腹血糖明显降低,差异有明显统计学意义

($P<0.05, P<0.01$),第8周时,天花粉-黄精各配伍组及二甲双胍组空腹血糖均显著降低,差异有显著统计学意义($P<0.01$),尤以配方2组最为明显,效果与二甲双胍相当。见表3。

3.4 对KKAy小鼠糖耐量的影响 与正常组比较,模型组小鼠较正常组各时间点血糖显著升高($P<$

表3 天花粉-黄精药对对KKAy小鼠空腹血糖的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	0周	2周	4周	6周	8周
正常组		4.45±0.48	4.20±0.87	5.13±0.49	5.20±0.60	5.13±0.50
模型组		9.17±2.24 ²⁾	11.25±2.59 ²⁾	14.43±1.66 ²⁾	13.43±2.42 ²⁾	15.95±3.18 ²⁾
二甲双胍组	0.25	8.72±0.97	7.42±1.38 ⁴⁾	9.17±2.39 ⁴⁾	7.58±1.42 ⁴⁾	7.43±0.67 ⁴⁾
配方1组	8	9.37±1.85	9.55±2.48	12.10±3.54	10.58±4.30	9.65±1.50 ⁴⁾
配方2组	8	9.05±1.76	8.05±1.90 ³⁾	10.42±2.29 ⁴⁾	9.95±1.70 ³⁾	7.92±2.08 ⁴⁾
配方3组	8	8.77±1.36	9.07±2.72	11.22±2.93 ³⁾	11.22±2.40	10.58±2.24 ⁴⁾

0.01);与模型组比较,二甲双胍组及天花粉-黄精药对各配伍组在各时间点血糖均明显降低($P<0.05$,

$P<0.01$),AUC显著降低($P<0.01$),但各给药组之间差异无统计学意义。见表4。

表4 天花粉-黄精药对对KKAy小鼠糖耐量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	0 min/mmol·L ⁻¹	30 min/mmol·L ⁻¹	60 min/mmol·L ⁻¹	120 min/mmol·L ⁻¹	AUC
正常组		5.03±0.55	12.92±1.75	8.82±1.69	6.10±1.13	17.38±1.94
模型组		15.83±1.81 ²⁾	31.62±1.90 ²⁾	29.95±2.06 ²⁾	22.22±2.97 ²⁾	53.34±3.14 ²⁾
二甲双胍组	0.25	7.11±0.82 ⁴⁾	25.52±3.02 ⁴⁾	18.27±3.98 ⁴⁾	10.18±2.31 ⁴⁾	33.33±5.02 ⁴⁾
配方1组	8	9.85±2.68 ³⁾	30.72±2.39	15.60±4.31 ⁴⁾	9.30±2.02 ⁴⁾	34.17±5.01 ⁴⁾
配方2组	8	7.28±1.20 ⁴⁾	27.25±3.63 ⁴⁾	17.07±3.51 ⁴⁾	9.83±1.19 ⁴⁾	33.17±4.86 ⁴⁾
配方3组	8	8.78±2.65 ⁴⁾	26.05±2.79 ⁴⁾	20.13±3.24 ⁴⁾	9.90±2.71 ⁴⁾	35.28±4.67 ⁴⁾

3.5 对KKAy小鼠FINS及HOMA-IR的影响 与正常组比较,模型组小鼠较正常组FINS、HOMA-IR水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠血清FINS水平下降,但差异无统计学意义;各给药组HOMA-IR明显下降($P<0.05, P<0.01$),其中配方2组最为明显,与二甲双胍位于同一水平($P<0.01$)。见表5。

3.6 对KKAy小鼠血脂的影响 与正常组比较,模型组小鼠TC、TG、LDL-C均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,天花粉-黄精药对各配伍组小鼠TC、LDL-C显著降低($P<0.01$),天花粉-黄精配方2组TG水平较模型组显著降低($P<0.01$),HDL-C各组

表5 天花粉-黄精药对对KKAy小鼠FINS及HOMA-IR的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	FINS/mU·L ⁻¹	HOMA-IR
正常组		8.60±0.57	2.01±0.22
模型组		15.92±2.64 ²⁾	10.90±2.37 ²⁾
二甲双胍组	0.25	10.02±1.19	3.40±1.13 ⁴⁾
配方1组	8	12.75±2.65	5.03±1.59 ³⁾
配方2组	8	12.25±0.61	3.39±1.06 ⁴⁾
配方3组	8	12.86±1.39	5.14±1.89 ³⁾

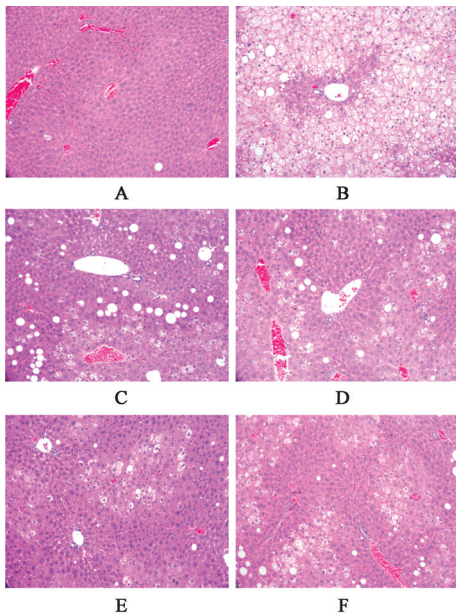
差异无统计学意义。见表6。

表6 天花粉-黄精药对对KKAy小鼠血脂的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TC	TG	HDL-C	LDL-C
正常组		3.98±0.21	1.07±0.16	2.59±0.34	0.38±0.03
模型组		4.74±0.56 ²⁾	2.12±0.37 ²⁾	2.30±0.30	0.60±0.07 ²⁾
二甲双胍组	0.25	3.88±0.50 ⁴⁾	1.36±0.39	2.44±0.34	0.52±0.10
配方1组	8	3.12±0.54 ⁴⁾	1.49±0.19	2.00±0.27	0.35±0.11 ⁴⁾
配方2组	8	3.16±0.53 ⁴⁾	1.39±0.21 ⁴⁾	2.23±0.49	0.27±0.06 ⁴⁾
配方3组	8	3.28±0.28 ⁴⁾	1.63±0.18	1.95±0.19	0.36±0.05 ⁴⁾

3.7 对 KKAY 小鼠肝脏组织病理学变化的影响

HE 结果显示,正常组小鼠肝脏形态、结构正常,无明显脂肪病变;模型组肝小叶肝索结构逐渐消失,肝细胞发生肿大变性,出现较多脂肪空泡及脂质沉积。与模型组比较,天花粉-黄精药对各配伍组肝小叶结构损害较小,肝细胞形态损伤较少,脂肪病变较轻,尤以配方2组改善最为明显。见图1。PAS 结果显示,正常组小鼠可见肝糖原含量较多,染色较深,均匀分布,无脂肪空泡产生;与正常组比较,模型组小鼠肝脏内脂肪空泡较多,染色稀薄不均;与模型组比较,天花粉-黄精药对各组肝糖原含量稍多,尤以配方2组较为明显,较模型组相比脂肪变性较轻。见图2。



注:A.正常组;B.模型组;C.二甲双胍组;D.配方1组;E.配方2组;F.配方3组(图2同)

图1 天花粉-黄精药对 KKAY 小鼠肝脏结构变化的影响 (HE, ×200)

Fig. 1 Effect of TP on liver structural changes in KKAY mice (HE, ×200)

3.8 对 KKAY 小鼠肝脏 PI3K、Akt、FoxO1 蛋白及其磷酸化表达水平的影响 与正常组比较,模型组小鼠肝脏 PI3K、p-Akt/Akt、p-FoxO1/FoxO1 蛋白表达量明显减少 ($P < 0.01$);与模型组比较,天花粉-黄精药对配方2组小鼠肝脏组织 PI3K、p-Akt/Akt、p-FoxO1/FoxO1 明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见图3、表7。

4 讨论

在中医理论指导下,通过对中药进行合理有效的配伍组成药对,治疗临床不同病症,是中医药治

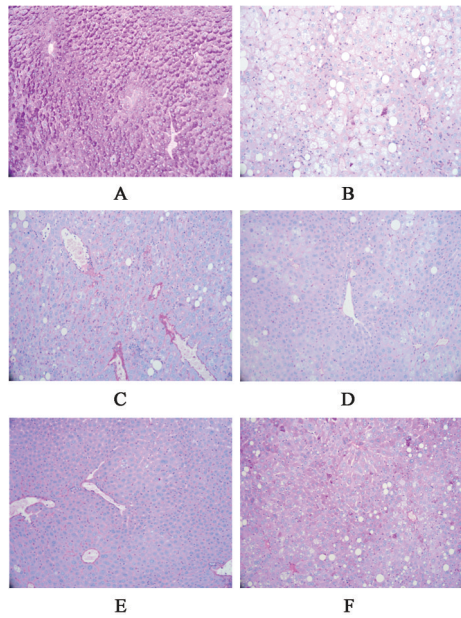
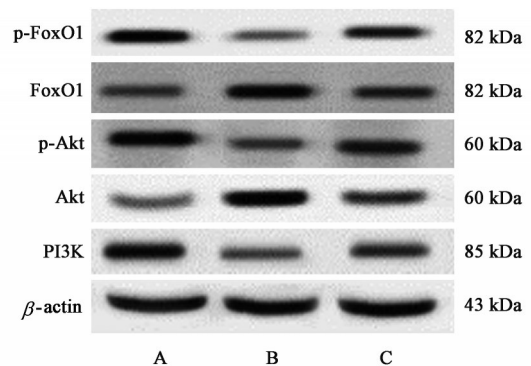


图2 天花粉-黄精药对 KKAY 小鼠肝脏糖原含量变化的影响 (PAS, ×200)

Fig. 2 Effect of TP on liver structure changes of rats in KKAY mice (PAS, ×200)



注:A.正常组;B.模型组;C.配方2组

图3 各组小鼠肝脏组织 PI3K、Akt、p-Akt、FoxO1、p-FoxO1 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of PI3K, Akt, p-Akt, FoxO1 and p-FoxO1 protein expressions in liver tissues of mice in each group

表7 天花粉-黄精药对 KKAY 小鼠肝组织相关靶蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 7 Effect of TP on liver related target proteins in KKAY mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	PI3K /β-actin	p-Akt /Akt	p-FoxO1 /FoxO1
正常组		0.93±0.08	3.12±0.67	1.62±0.13
模型组		0.46±0.04 ²⁾	0.93±0.13 ²⁾	0.59±0.20 ²⁾
配方2组	8	0.69±0.07 ⁴⁾	1.80±0.22 ³⁾	1.00±0.07 ³⁾

疗疾病的特色。中药药对相比复方组方简单,具有相互作用及作用靶点较少等优点,是简化方剂、研究复方的基础。从配伍经典、疗效确切的药对入

手,对其量效关系、作用机制等进行深入研究,对于优化药对在方剂中的配伍组成具有重要意义^[5]。

在中医药治疗消渴的长期的临床实践中,很多中药进行配伍后在降糖方面显示出突出疗效,形成很多降糖经典药对,成为方剂中发挥降糖作用的核心。天花粉、黄精在古今临床中被广泛用来治疗糖尿病,也是导师刘铜华教授在糖尿病临床治疗中总结出来的降糖药对,与大部分糖尿病患者阴虚燥热的病机相契合,有较高的临床应用及研究价值。天花粉在古今被广泛用来治疗糖尿病,为治疗糖尿病之要药^[6],赵磊等^[7]通过对比古今治疗消渴的方剂,发现663首古方中天花粉使用频次最高;且在治疗糖尿病相关现代中成药中,天花粉使用频次仍位居前二。黄精在古代也被广泛用于治疗消渴,古籍记载其“获天地之精”“得坤土之精粹”,历来被认为是补益类中药中的上品,并经现代多项研究证实具有多种降糖活性成分,可通过多种降糖机制发挥降糖效果^[8-10]。对天花粉、黄精药对进行药效学、最佳配伍比例及作用机制的研究,对于优化该药对的临床应用,提高中医药治疗糖尿病的临床疗效,具有重要价值。

T2DM最主要的特征是外周组织对体内胰岛素反应不足导致的胰岛素抵抗^[11-12]。肝脏是胰岛素发挥作用和胰岛素抵抗的主要靶器官,胰岛素胰岛素抵抗状态下,肝脏糖异生增强、糖原分解加快,发生高血糖、血脂异常等一系列糖脂代谢紊乱^[13-14]。FoxO1是介导糖异生的关键信号分子,在胰岛素调节肝脏糖异生的信号通路中起重要作用^[15]。研究表明,FoxO1失调导致T2DM患者肝脏糖异生增加。胰岛素通过激活PI3K/Akt信号通路使FoxO1蛋白磷酸化和降解^[16],磷酸化后的FoxO1被转移到细胞核之外,可抑制其糖异生转录活性^[17]。葡萄糖6-磷酸酶(G6PC)和磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(PEPCK)是刺激糖异生和糖原分解的关键酶^[18-19],当FoxO1被抑制时,G6PC和PEPCK的转录也会受到抑制,从而减少肝糖异生^[20-22]。FoxO1糖异生转录程序的效力已通过对肝脏FoxO1调节遗传缺陷的小鼠的研究得到证实。缺乏肝脏FoxO1的小鼠表现出空腹低血糖和肝葡萄糖输出(HGP)降低^[23],即使在高脂喂养的小鼠中肝脏FoxO1 mRNA表达降低40%也足以降低基础HGP^[24]。

本实验采用的KKAy小鼠,是在多基因遗传作用下的自发型T2DM小鼠^[25],是目前公认的研究T2DM的理想动物模型。经天花粉-黄精药对干预

8周后,天花粉、黄精药对各配伍组小鼠血糖、OGTT、胰岛素抵抗指数及TC、LDL-C均明显下降,HE、PAS染色显示肝脏形态结构及糖原含量有所改善,脂肪病变减轻,说明天花粉-黄精药对可有效改善糖尿病小鼠糖脂代谢和胰岛素抵抗,其中天花粉、黄精1:3配伍组可显示出更好的降糖、降脂效果,推测可能为天花粉-黄精药对最佳配伍比例;在此基础上,通过检测该组小鼠肝脏PI3K/Akt/FoxO1信号通路相关蛋白表达,探索该药对改善糖脂代谢及改善胰岛素抵抗的作用机制。结果显示,与模型组相比,天花粉-黄精药对组可上调PI3K、p-Akt、抑制FoxO1的蛋白表达,并促进FoxO1磷酸化表达,通过调节糖异生,达到改善肝脏胰岛素抵抗的效果。依据相关文献对于天花粉临床应用的考察,发现其常用剂量范围在10~30 g^[26];而黄精作为一种药食两用中药,其安全性及降糖方面的药用价值均得到广泛验证^[10],推测增大其相对用量,可增加该药对在降糖方面功效的发挥。故本实验在导师临床常用配方1的剂量基础上,增设2个剂量组,通过加大黄精的相对用量,探索该药对可达的最佳降糖效果。以及天花粉-黄精相应的最佳剂量配比。结果显示,在3个剂量组中,配方2组降糖效果较为突出,推测可能与黄精的主要降糖活性成分-黄精多糖随着剂量增加溶出率相应增加有关。值得注意的是,配方3通过进一步增加黄精的相对用量,降糖效果并没有得到进一步改善,可能与黄精降糖有效成分所起作用已达饱和、黄精用量过大滋腻碍胃,反而对降糖产生负面作用等因素有关。此外,实验过程中还观察到,天花粉-黄精药对3个配伍组小鼠与模型组比较,进食量均有不同程度的减少,因此,该药对降糖作用的发挥,除了本实验上述降糖机制外,也可能与其通过调控小鼠摄食中枢、减少进食量,进而影响血糖水平有关。

本实验基于天花粉、黄精在临床治疗糖尿病中的广泛应用,结合导师的临床经验,对天花粉-黄精药对的药效、最佳剂量配比及作用机制作了初步探究,可为临床应用提供相应依据。天花粉、黄精是否存在其他更佳配伍比例、其降糖活性成分随配伍比例是否发生变化、是否通过其他作用机制发挥降糖作用等,还有待进一步探究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 吕若琦. 最新版“全球糖尿病地图”里的中国景象[J].

- 江苏卫生保健,2020(2):56.
- [2] 李建波,张莉,张洁. 药对配伍理论及相关研究概述[J]. 中医杂志,2013,54(15):1335-1340.
- [3] 胡玉立,丁雷,李梅,等. 玉米须多糖对糖尿病大鼠的糖脂代谢及PGC-1 α 蛋白糖异生信号通路的影响[J]. 环球中医药,2021,14(6):1000-1006.
- [4] 秦帅,秦灵芝,吴丽丽,等. 青钱柳对糖尿病小鼠肝脏糖脂代谢影响及机制研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2020,22(10):3443-3449.
- [5] 唐于平,段金廛,郭盛,等. 药对量效关系研究的认识与思考[J]. 南京中医药大学学报,2009,25(1):21-23,26.
- [6] 丁建营,刘春娟,郭建军,等. 天花粉化学成分的药理活性及其提取与检测方法研究进展[J]. 中国药房,2018,29(13):1859-1864.
- [7] 赵磊,慕杨娜,梁茂新. 消渴(糖尿病)古今用药对比研究[J]. 北京中医药大学学报,2016,39(9):769-773.
- [8] 王艺,彭国庆,江新泉,等. 黄精多糖对糖尿病大鼠模型的保护机制研究[J]. 中医药导报,2017,23(2):8-16.
- [9] 张娇,王元忠,杨维泽,等. 黄精属植物化学成分及药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志,2019,44(10):1989-2008.
- [10] 闫鸿丽,陆建美,王艳芳,等. 黄精调节糖代谢的活性及作用机理研究进展[J]. 中国现代中药,2015,17(1):82-85.
- [11] PETERSEN M C, SHULMAN G I. Mechanisms of insulin action and insulin resistance[J]. *Physiol Rev*, 2018,98(4):2133-2223.
- [12] CZECH M P. Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes [J]. *Nat Med*, 2017, 23 (7) : 804-814.
- [13] 刘妍,常丽萍,高怀林. 胰岛素抵抗的发病机制研究进展[J]. 世界中医药,2021,16(11):1671-1674.
- [14] 白颖,暴雪丽,赵丹丹,等. 中医药干预胰岛素抵抗机制研究进展[J]. 世界中医药,2021,16(7):1156-1160,1165.
- [15] HAEUSLER R A, HARTIL K, VAITHEESVARAN B, et al. Integrated control of hepatic lipogenesis versus glucose production requires FoxO transcription factors [J]. *Nat Commun*,2014,5:5190.
- [16] ALTOMONTE J, RICHTER A, HARBARAN S, et al. Inhibition of Foxo1 function is associated with improved fasting glycemia in diabetic mice [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*,2003,285(4):E718-E728.
- [17] BRUNET A, BONNI A, ZIGMOND M J, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor [J]. *Cell*, 1999,96(6):857-868.
- [18] MATSUMOTO M, POCAI A, ROSSETTI L, et al. Impaired regulation of hepatic glucose production in mice lacking the forkhead transcription factor Foxo1 in liver [J]. *Cell Metab*,2007,6(3):208-216.
- [19] WU Y, PAN Q, YAN H, et al. Novel mechanism of foxo1 phosphorylation in glucagon signaling in control of glucose homeostasis [J]. *Diabetes*, 2018, 67 (11) : 2167-2182.
- [20] LANGLET F, HAEUSLER R A, LINDÉN D, et al. Selective inhibition of FoxO1 activator/repressor balance modulates hepatic glucose handling [J]. *Cell*, 2017,171(4):824-835.
- [21] PUIGSERVER P, RHEE J, DONOVAN J, et al. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 α interaction [J]. *Nature*, 2003, 423 (6939):550-555.
- [22] LIN H V, ACCILI D. Hormonal regulation of hepatic glucose production in health and disease [J]. *Cell Metab*,2011,14(1):9-19.
- [23] MATSUMOTO M, POCAI A, ROSSETTI L, et al. Impaired regulation of hepatic glucose production in mice lacking the forkhead transcription factor Foxo1 in liver [J]. *Cell Metab*,2007,6(3):208-216.
- [24] SAMUEL V T, CHOI C S, PHILLIPS T G, et al. Targeting FoxO1 in mice using antisense oligonucleotide improves hepatic and peripheral insulin action [J]. *Diabetes*,2006,55(7):2042-2050.
- [25] 陈薇宇,李双蕾,谢婧,等. 2型糖尿病KK Δ y小鼠动物模型的研究进展[J]. 临床医药文献电子杂志,2017,4(54):10681-10682.
- [26] 宋宁,王新苗,樊俐慧,等. 天花粉的临床应用及其用量探究[J]. 长春中医药大学学报,2020,36(3):433-435.

[责任编辑 周冰冰]