

## 加味葛根芩连汤对2型糖尿病db/db小鼠胰腺组织 TGR5/cAMP/GLP-1信号通路的影响

柳荣<sup>1</sup>, 杨霞<sup>1</sup>, 高艳奎<sup>1</sup>, 王佳慧<sup>1</sup>, 梁永林<sup>1\*</sup>, 朱向东<sup>2</sup>

(1. 甘肃中医药大学基础医学院, 兰州 730000;

2. 宁夏医科大学中医学院, 银川 750000)

**[摘要]** 目的:探讨加味葛根芩连汤对肥胖型2型糖尿病(T2DM)模型小鼠血糖血脂及胰腺组织中G蛋白偶联胆汁酸受体5(TGR5)相关途径的影响。方法:将10只7周龄无特定病原体(SPF)级雄性m/m小鼠及50只7周龄SPF级雄性db/db小鼠在SPF级实验室适应性喂养1周。m/m小鼠作为空白组。成模后随机分为5组,每组10只,分别作为模型组、二甲双胍组(0.2 g·kg<sup>-1</sup>)、加味葛根芩连汤高、中、低剂量组(31.9、19.1、6.4 g·kg<sup>-1</sup>),灌胃体积均为10 mL·kg<sup>-1</sup>,模型组和空白组灌服等体积蒸馏水,1次/d,连续12周。定期检测小鼠空腹血糖(FBG)。药物干预12周后,检测血清中糖化血清蛋白(GSP)、血清葡萄糖(GLU)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平;采用苏木素-伊红(HE)染色观察各组小鼠胰腺组织病理改变,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测胰腺组织TGR5、蛋白激酶A(PKA)、磷酸化(p)-PKA、环磷腺苷效应元件结合蛋白(CREB)、p-CREB、前蛋白转化酶1/3(PC1/3)、胰高糖素样肽-1(GLP-1)蛋白的表达水平,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测胰腺组织环磷腺苷(cAMP)的含量。结果:与空白组比较,模型组小鼠胰腺组织出现病理学改变;小鼠FBG、GSP、GLU、TC、TG、LDL-C水平显著增高( $P<0.01$ ),HDL-C水平明显降低( $P<0.05$ );胰腺组织中TGR5、p-PKA(Thr197)/PKA、p-CREB(Ser133)/CREB、PC1/3、GLP-1蛋白表达水平显著降低( $P<0.01$ );胰腺组织中cAMP的含量显著降低( $P<0.01$ )。与模型组比较,治疗组胰腺组织病变程度减轻,加味葛根芩连汤高剂量组及二甲双胍组均能够明显降低db/db小鼠FBG、GSP、GLU、TC、TG、LDL-C水平( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),显著增高db/db小鼠HDL-C水平( $P<0.01$ );除加味葛根芩连汤中剂量组GLP-1蛋白外,加味葛根芩连汤高、中剂量组及二甲双胍组TGR5、p-PKA(Thr197)/PKA、p-CREB(Ser133)/CREB、PC1/3、GLP-1蛋白表达水平均有不同程度的增加( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );加味葛根芩连汤高、中剂量组及二甲双胍组胰腺组织中cAMP的含量明显增高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。结论:加味葛根芩连汤能够改善T2DM模型db/db小鼠的葡萄糖稳态,其机制可能与调控TGR5/cAMP/GLP-1信号通路相关蛋白表达有关。

**[关键词]** 2型糖尿病; 加味葛根芩连汤; 胆汁酸; G蛋白偶联胆汁酸受体5(TGR5)/环磷腺苷(cAMP)/胰高糖素样肽-1(GLP-1)信号通路

[中图分类号] R2-0;R33;R289;R587.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2023)04-0025-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20222437

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20221115.1155.001.html>

[网络出版日期] 2022-11-16 13:53:34

### Effect of Modified Gegen Qinliantang on TGR5/cAMP/GLP-1 Signaling Pathway in Pancreatic Tissue of Type 2 Diabetes Mellitus db/db Mice

LIU Rong<sup>1</sup>, YANG Xia<sup>1</sup>, GAO Yankui<sup>1</sup>, WANG Jiahui<sup>1</sup>,

LIANG Yonglin<sup>1\*</sup>, ZHU Xiangdong<sup>2</sup>

(1. School of Basic Medicine, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;

2. School of Traditional Chinese Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750000, China)

[收稿日期] 2022-07-20

[基金项目] 甘肃省教育厅产业支撑计划项目(2021CYZC-03);宁夏回族自治区重点研发计划项目(2022CMG02034);甘肃省优秀研究生“创新之星”项目(2022CXZX-734)

[第一作者] 柳荣,在读博士,从事中医不同治法防治糖尿病的效应机制研究,E-mail:2240065473@qq.com

[通信作者] \*梁永林,博士,教授,主任医师,从事中医基础理论研究,E-mail:875532437@qq.com

**[Abstract] Objective:** To discuss the effect of modified Gegen Qinliantang (MGQT) on blood glucose and lipids and Takeda G protein-coupled receptor 5 (TGR5)-related pathways in pancreatic tissue of obese type 2 diabetes mellitus (T2DM) mice. **Method:** A total of 10 male specific pathogen free (SPF) m/m mice (7 weeks old) and 50 male SPF (7 weeks old) were adaptively fed for one week in SPF laboratory. The m/m mice were included in the blank group. T2DM was induced in the 50 db/db mice. The model mice were randomized into the model group, metformin group ( $0.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), high-dose, medium-dose, and low-dose ( $31.9, 19.1, 6.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) MGQT groups, with 10 in each group, and the drug dose was  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ . The model group and the blank group received distilled water of the same volume. The administration lasted 12 weeks (once/day). Fasting blood glucose (FBG) was detected regularly. After 12 weeks of administration, serum levels of glycated serum protein (GSP), serum glucose (GLU), total cholesterol (TC), triglycerides (TG), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) were detected. Pathological changes in the pancreatic tissue were based on hematoxylin-eosin (HE) staining. Western blot was used to determine the protein expression of TGR5, protein kinase A (PKA), phosphorylated (p)-PKA, cyclic-AMP response element binding protein (CREB), p-CREB, proprotein convertase 1/3 (PC1/3), and glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in pancreatic tissues. The level of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) in pancreatic tissue was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Result:** Compared with the blank group, the model group had pathological changes in pancreatic tissue, high levels of FBG, GSP, GLU, TC, TG, and LDL-C ( $P < 0.01$ ), low level of HDL-C ( $P < 0.05$ ), low protein expression of TGR5, p-PKA (Thr197)/PKA, p-CREB (Ser133)/CREB, PC1/3, and GLP-1 in pancreatic tissue ( $P < 0.01$ ), and low content of cAMP in the pancreas ( $P < 0.01$ ). Pancreatic tissue lesion in the treatment groups were milder than that in the model group. Both the high-dose MGQT and metformin can reduce the levels of FBG, GSP, GLU, TC, TG, and LDL-C in db/db mice ( $P < 0.05, P < 0.01$ ) and increase the level of HDL-C ( $P < 0.01$ ). Except the GLP-1 protein in the medium-dose MGQT group, the protein expression of TGR5, p-PKA (Thr197)/PKA, p-CREB (Ser133)/CREB, PC1/3, and GLP-1 in the high-dose and medium-dose MGQT groups and the metformin group increased compared with that in the model group ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). The content of cAMP in the pancreatic tissue of the high-dose and medium-dose MGQT groups and the metformin group was raised compared with that in model group ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). **Conclusion:** MGQT can improve the glucose homeostasis in db/db mice with T2DM by regulating TGR5/cAMP/GLP-1 signaling pathway-related protein expression.

**[Keywords]** type 2 diabetes mellitus; modified Gegen Qinliantang; bile acid, G protein-coupled receptor 5/cyclic adenosine monophosphate/glucagon-like peptide-1

2型糖尿病(T2DM)是以高血糖状态、胰岛 $\beta$ 细胞功能受损、胰岛素分泌相对或绝对不足及胰岛素抵抗为主要特征的一种疾病,可导致多器官损伤和多种并发症<sup>[1]</sup>。调查研究显示,近年来T2DM的发病率逐年上升,已严重威胁我国人民生命健康<sup>[2]</sup>。目前,现代西医药治疗虽能控制其症状,但存在低血糖、胃肠道不适、骨折、心力衰竭等风险<sup>[3]</sup>。中医药在防治糖尿病及其并发症方面优势明显,探讨中医药治疗T2DM的具体机制,对研究T2DM具有重要意义。

胆汁酸(BA)是胆汁的主要组成成分,胆汁酸相关信号传导可降低肝胆盐负荷,改善胰岛素敏感性,调节葡萄糖代谢,脂质代谢,控制能量消耗并具

有抗炎作用。胆汁酸受体5(TGR5)是第1个已知的胆汁酸特异性G蛋白偶联受体,作为代谢调节剂可参与机体能量消耗,葡萄糖代谢,脂质代谢和机体免疫<sup>[4]</sup>。研究发现,通过激活TGR5可调节环磷腺苷(cAMP)/蛋白激酶A(PKA)/环磷腺苷效应元件结合蛋白(CREB)途径刺激胰高糖素样肽-1(GLP-1)释放可影响胰岛素分泌,改善胰岛 $\beta$ 细胞功能<sup>[5]</sup>。葛根芩连汤出自《伤寒论》,被历代医家用于治疗湿热泄利,现代医家以中医“异病同治”为指导思想,将此方用于治疗肥胖型T2DM肠道湿热证,屡获佳效<sup>[6]</sup>。课题组前期研究初步证实加味葛根芩连汤能通过调节胆汁酸受体法尼醇X受体(FXR)影响肥胖型T2DM模型大鼠肝糖异生<sup>[7]</sup>。但其是否通过调控

TGR5/cAMP 信号途径刺激 GLP-1 释放从而影响 T2DM, 其具体机制尚不明确。故本次研究以 T2DM 模型小鼠 db/db 小鼠为模型, 通过观察 db/db 小鼠胰腺组织中 TGR5/cAMP/GLP-1 信号通路相关基因和蛋白表达水平, 探讨加味葛根芩连汤对调控 db/db 小鼠糖脂代谢与 TGR5/cAMP/GLP-1 信号通路之间的关系, 为进一步研究 T2DM 提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 动物** 10 只 7 周龄 SPF 级雄性 m/m 小鼠, 体重(20±5) g, 50 只 7 周龄 SPF 级雄性 db/db 小鼠, 体重(40±5) g, 购于常州卡文斯实验动物有限公司, 实验动物质量合格证编号 202020968。小鼠饲养于甘肃中医药大学实验动物中心 SPF 级屏障实验室, 各组小鼠选用 SPF 级普通鼠饲料, 正常饮水饮食饲养。实验动物使用许可证号 SYXK(甘)2020-0009; 实验室温度 21~25 °C, 相对湿度 50%~60%, 光照 12 h/12 h 明暗交替。实验方案经甘肃中医药大学动物实验伦理委员会批准, 批准编号 2020-274。

**1.2 药物** 加味葛根芩连汤由葛根 24 g, 黄芩 9 g, 黄连 9 g, 炙甘草 6 g, 干姜 1.5 g 组成<sup>[8]</sup>。购自兰州惠仁堂大药房, 由甘肃中医药大学杨扶德教授鉴定为正品。制备方法: 按 8:3:3:2:0.5 的比例<sup>[8]</sup>称取葛根、黄芩、黄连、炙甘草、干姜饮片, 加入 8 倍量的蒸馏水, 浸泡 30 min, 先煎葛根 30 min, 再纳入其余药物共煎 30 min, 用筛网滤取滤液, 残渣加 8 倍量蒸馏水继续煎煮 30 min, 用筛网过滤后合并 2 次滤液, 浓缩成含生药质量浓度 2 g·mL<sup>-1</sup> 的药液备用。盐酸二甲双胍购自上海九鼎化学科技有限公司, 批号 YKCFZOB, 取药剂 0.2 g·kg<sup>-1</sup> 加蒸馏水混合为含生药 2 g·mL<sup>-1</sup> 的药液备用。

**1.3 试剂** 苏木素-伊红(HE)染色试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司, 批号分别为 G1120、20200702); 辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G 抗体、HRP 标记山羊抗鼠 IgG 抗体、 $\beta$ -微管蛋白( $\beta$ -tubulin)抗体(美国 ImmunoWay 公司, 批号分别为 B0202、B0101、B3001); TGR5 抗体、PKA 抗体、磷酸化(p)-PKA Thr197 抗体、CREB 抗体、p-CREB Ser133 抗体、前蛋白转化酶 1/3(PC1/3)抗体、GLP-1 抗体(英国 Abcam 公司, 批号分别为 GR3374634-6、GR3298799-5、GR219460-4、GR3353517-10、GR3231215-10、GR3392310-5、GR3397551-1); 鼠 cAMP 酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海

酶联生物科技有限公司, 批号 2021111); 血清葡萄糖(GLU)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)测定试剂盒(深圳雷杜生命科学股份有限公司, 批号分别为 20210816、20210913、20210803、20210907、20210714); 糖化血清蛋白(GSP)测定试剂盒(长春汇力生物技术有限公司, 批号 2021003)。

**1.4 仪器** Accu-Chek<sup>®</sup> Performa 型血糖仪(德国罗氏公司); 5424R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); SK-O180-E 型摇床(美国 Scilogex 仪器); RM2016 型轮转式切片机(德国 Leica 公司); KD-BM 型生物组织包埋机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司); Power Pac<sup>™</sup> Basic 型垂直电泳仪及转膜仪(美国 Bio-Rad 公司); SpectraMax<sup>®</sup> i3x 多功能酶标仪(上海美谷分子仪器有限公司); Chemray 800 型全自动生化分析仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司)。

## 2 方法

**2.1 分组及给药** 10 只 7 周龄 SPF 级雄性 m/m 小鼠作为空白组。50 只 7 周龄 SPF 级雄性 db/db 小鼠取不同两日随机血糖  $\geq 16.7$  mmol·L<sup>-1</sup> 者为模型成功<sup>[9]</sup>。50 只 db/db 小鼠均成模, 无死亡。此后使用随机数字表法分为 5 组, 每组 10 只, 分别作为模型组、二甲双胍组、加味葛根芩连汤(中药)高、中、低剂量组。根据人与小鼠体表面积换算法进行换算, 中药高、中、低剂量组分别按 31.9、19.1、6.4 g·kg<sup>-1</sup> 剂量灌胃, 二甲双胍组按 0.2 g·kg<sup>-1</sup> 剂量灌胃, 空白组及模型组灌服等体积蒸馏水, 每日 1 次, 连续 12 周。

**2.2 标本采集** 给药治疗 12 周后, 对小鼠进行麻醉后摘眼球取血, 使用采血管保存, 使用低温离心机以 3 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min(离心半径 13.5 cm, 下同), 分离血清, 分装后冻存。安乐死小鼠, 剖开小鼠腹部, 迅速分离小鼠胰腺组织, 分为 2 部分, 一部分经生理盐水冲洗后放入 4% 多聚甲醛中进行固定, 以备后续 HE 检测; 另一部分经生理盐水冲洗干净后置于冻存管内, 并立即放入液氮中冷冻, 随后转移至 -80 °C 冰箱内保存, 用于后续蛋白免疫印迹法(Western blot)、ELISA 等实验检测。

**2.3 小鼠空腹血糖(FBG)测定** 小鼠禁食不禁水 8 h 以上, 检测时酒精消毒小鼠尾部, 尾尖静脉采血法, 用罗氏血糖仪采集第 2 滴血检测血糖。

**2.4 HE 染色观察小鼠胰腺组织病理变化** 取出在 4% 多聚甲醛中固定好的胰腺组织, 磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗, 乙醇脱水, 二甲苯透明, 浸蜡包埋切片,

脱蜡水化染色,脱水封片后片显微镜下拍照观察胰腺超微结构。

**2.5** 全自动生化仪检测小鼠血清中GSP、GLU、TC、TG、HDL-C、LDL-C含量 取小鼠血清,使用全自动生化检测仪检测小鼠血清中GSP、GLU、TC、TG、HDL-C、LDL-C含量。

**2.6** Western blot检测小鼠腺组织中TGR5、PKA、p-PKA、CREB、p-CREB、PC1/3、GLP-1蛋白表达 提取胰腺组织蛋白,使用BCA蛋白定量试剂盒计算浓度并将各样本浓度调整为一致。加适量5×Loading buffer沸水中变性。按照试剂盒说明书配胶后电泳并转膜、封闭,将一抗稀释至合适浓度(TGR5, 1: 1 000; PKA, 1: 500; p-PKA, 1: 500; CREB, 1: 500; p-CREB, 1: 5 000; PC1/3, 1: 1 000; GLP-1, 1: 2 000;β-tubulin, 1: 5 000),放入裁好的条带,室温孵育2 h,4℃过夜。加二抗(1:6 000),室温孵育2 h。滴加ECL混合液于膜上,使用化学发光成像系统曝光,显影后用Quantity one图像分析软件进行扫描分析,并使用Image J软件进行数据分析。

表1 加味葛根芩连汤对db/db小鼠血糖的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

| 组别     | 剂量/g·kg <sup>-1</sup> | 干预前                      | 干预1月后                    | 干预2月后                    | 干预3月后                    |
|--------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 空白组    |                       | 5.72±1.22                | 6.17±0.83                | 6.82±0.85                | 6.47±1.60                |
| 模型组    |                       | 19.97±3.24 <sup>2)</sup> | 23.25±4.18 <sup>2)</sup> | 27.37±3.81 <sup>2)</sup> | 31.48±1.48 <sup>2)</sup> |
| 二甲双胍组  | 0.2                   | 20.25±3.65 <sup>2)</sup> | 23.17±3.89               | 25.47±3.41               | 28.27±1.75 <sup>4)</sup> |
| 中药高剂量组 | 31.9                  | 20.32±2.64 <sup>2)</sup> | 23.17±2.65               | 25.82±2.23               | 28.32±2.30 <sup>4)</sup> |
| 中药中剂量组 | 19.1                  | 20.82±2.98 <sup>2)</sup> | 25.42±2.28               | 27.75±1.54               | 30.45±1.50               |
| 中药低剂量组 | 6.4                   | 20.32±4.58 <sup>2)</sup> | 25.05±1.99               | 28.53±1.45               | 31.23±0.83               |

注:与空白组比较<sup>1)</sup>P<0.05,<sup>2)</sup>P<0.01;与模型组比较<sup>3)</sup>P<0.05,<sup>4)</sup>P<0.01(表2-表5同)

**3.2** 对db/db小鼠糖代谢的影响 与空白组比较,db/db小鼠血清中GSP、GLU水平显著增高(P<0.01);与模型组比较,二甲双胍组及中药高、中剂量组均能够明显降低db/db小鼠血清中GSP、GLU水平(P<0.05,P<0.01)。见表2。

**3.3** 对db/db小鼠脂代谢的影响 与空白组比较,db/db小鼠血清中TC、TG、LDL-C水平显著增高(P<0.01),HDL-C水平明显降低(P<0.05);与模型组比较,中药高剂量组及二甲双胍组均能显著降低db/db小鼠血清中TC、TG、LDL-C水平(P<0.01),增高db/db小鼠血清中HDL-C水平(P<0.01),中药中剂量组能显著降低db/db小鼠血清中TG水平(P<0.01),增高db/db小鼠血清中HDL-C水平(P<0.01),中药中剂量组TC、LDL-C及中药低剂量组

**2.7** ELISA检测胰腺组织中cAMP的含量及活性

取小鼠胰腺组织,加入提取缓冲液,研磨匀浆后,低温离心机3 000 r·min<sup>-1</sup>离心15 min取上清。采用小鼠cAMP ELISA试剂盒对各组胰腺组织cAMP进行含量检测,实验步骤按试剂盒说明书操作。

**2.8** 统计学处理 实验所得计量资料采用SPSS 24.0软件进行统计处理,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析(One-way ANOVA),方差齐时组间比较用最小显著性差异法(LSD)检验,方差不齐选用Tamhane's T2检验,P<0.05为差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1** 对db/db小鼠血糖的影响 药物干预前,与空白组比较,模型组及各给药组的FBG均显著升高(P<0.01);药物干预过程中,模型组小鼠FBG增长迅速,各给药组的FBG虽有增长,但增长较为缓慢;药物干预3月后,与空白组比较,模型组FBG显著升高(P<0.01);与模型组比较,加味葛根芩连汤高剂量组及二甲双胍组FBG显著下降(P<0.01)。见表1。

表2 加味葛根芩连汤对db/db小鼠糖代谢的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

| 组别     | 剂量/g·kg <sup>-1</sup> | GSP                     | GLU                      |
|--------|-----------------------|-------------------------|--------------------------|
| 空白组    |                       | 3.51±0.78               | 6.03±1.23                |
| 模型组    |                       | 5.78±0.45 <sup>2)</sup> | 33.38±0.97 <sup>2)</sup> |
| 二甲双胍组  | 0.2                   | 4.38±0.62 <sup>4)</sup> | 27.34±2.89 <sup>4)</sup> |
| 中药高剂量组 | 31.9                  | 4.76±0.54 <sup>4)</sup> | 28.94±1.27 <sup>4)</sup> |
| 中药中剂量组 | 19.1                  | 4.71±0.77 <sup>4)</sup> | 30.20±4.38 <sup>3)</sup> |
| 中药低剂量组 | 6.4                   | 5.67±0.46               | 32.84±2.91               |

TC、TG、LDL-C表达水平降低,HDL-C表达水平增高,但差异无统计学意义。见表3。

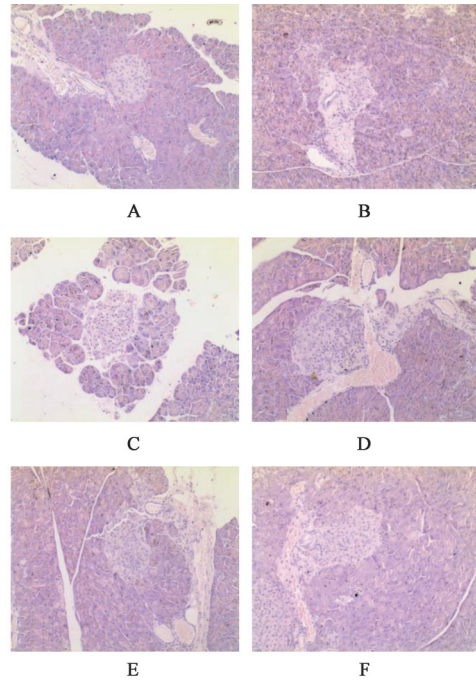
**3.4** 对db/db小鼠胰腺组织病理形态的影响 空白组小鼠胰腺结构完整,细胞排列整齐,外分泌部导

表3 加味葛根芩连汤对db/db小鼠脂代谢的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

| 组别     | 剂量/g·kg <sup>-1</sup> | TC                      | TG                      | HDL-C                   | LDL-C                   |
|--------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 空白组    |                       | 2.65±0.55               | 1.43±0.55               | 2.03±0.13               | 0.04±0.01               |
| 模型组    |                       | 3.92±0.49 <sup>2)</sup> | 4.80±0.65 <sup>2)</sup> | 1.44±0.57 <sup>1)</sup> | 0.33±0.08 <sup>2)</sup> |
| 二甲双胍组  | 0.2                   | 3.12±0.17 <sup>4)</sup> | 1.64±0.56 <sup>4)</sup> | 2.10±0.13 <sup>4)</sup> | 0.09±0.03 <sup>4)</sup> |
| 中药高剂量组 | 31.9                  | 3.16±0.21 <sup>4)</sup> | 1.93±0.63 <sup>4)</sup> | 2.49±0.36 <sup>4)</sup> | 0.08±0.03 <sup>4)</sup> |
| 中药中剂量组 | 19.1                  | 3.47±0.14               | 2.41±0.99 <sup>4)</sup> | 2.07±0.26 <sup>4)</sup> | 0.20±0.04               |
| 中药低剂量组 | 6.4                   | 3.62±0.67               | 4.26±0.45               | 1.88±0.38               | 0.22±0.06               |

管排列整齐,内分泌部胰岛形状规则,细胞胞浆饱满,无变性坏死,无炎性细胞浸润;与空白组比较,模型组小鼠胰腺组织中可见胰岛细胞空泡变性,细胞萎缩变形, $\beta$ 细胞体积减小、部分样本的胰腺组织外分泌部间质中可见淋巴细胞浸润;与模型组比较,治疗组胰腺组织中内分泌部胰岛细胞空泡变性和细胞萎缩变形均有减轻,胰岛形状随着药物浓度增大逐渐恢复正常,细胞萎缩的现象均明显减轻,胰腺组织外分泌部间质中淋巴细胞浸润减轻,整体病变程度明显轻于模型组小鼠。二甲双胍组效果最好,接近空白组。见图1。

**3.5 对db/db小鼠胰腺组织中TGR5、PKA、p-PKA、CREB、p-CREB、PC1/3、GLP-1蛋白表达的影响** 与空白组比较,模型组小鼠胰腺组织中TGR5、PC1/3、GLP-1蛋白表达水平显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较,除中药中剂量组GLP-1蛋白外,中药高、中剂量组及二甲双胍组胰腺组织中TGR5、PC1/3、GLP-1蛋白表达水平均有不同程度的增加( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。采用磷酸化蛋白与总蛋白的变化比值来证明磷酸化蛋白的变化,与空白组比较,模型组小鼠胰腺组织中PKA、CREB磷酸化蛋白与总蛋白比值均显著降低( $P<0.01$ ),与模型组比较,除中药低剂量组CREB磷酸化蛋白与总蛋白比值无明显变化



注:A.空白组;B.模型组;C.二甲双胍组;D.中药高剂量组;E.中药中剂量组;F.中药低剂量组(图2同)

图1 加味葛根芩连汤对db/db小鼠胰腺组织病理形态的影响(HE, ×100)

Fig. 1 Effect of modified Gegen Qinliantang on pathological morphology of pancreas in db/db mice (HE, ×100)

外,各用药组PKA、CREB磷酸化蛋白与总蛋白比值明显增加( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。见表4、图2。

表4 加味葛根芩连汤对db/db小鼠胰腺组织中TGR5、PKA、CREB、PC1/3、GLP-1蛋白表达水平的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 4 Effect of modified Gegen Qinliantang on protein expression levels of TGR5, PKA, CREB, PC1/3 and GLP-1 in pancreatic tissue of db/db mice ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

| 组别     | 剂量/g·kg <sup>-1</sup> | TGR5/ $\beta$ -tubulin  | p-PKA(Thr197)/PKA       | p-CREB(Ser133)/CREB     | PC1/3/ $\beta$ -tubulin | GLP-1/ $\beta$ -tubulin |
|--------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 空白组    |                       | 0.73±0.04               | 1.58±0.08               | 0.63±0.02               | 0.64±0.03               | 0.81±0.06               |
| 模型组    |                       | 0.34±0.03 <sup>2)</sup> | 0.59±0.03 <sup>2)</sup> | 0.30±0.02 <sup>2)</sup> | 0.27±0.04 <sup>2)</sup> | 0.61±0.06 <sup>2)</sup> |
| 二甲双胍组  | 0.2                   | 0.66±0.04 <sup>4)</sup> | 1.22±0.08 <sup>4)</sup> | 0.52±0.05 <sup>4)</sup> | 0.52±0.03 <sup>4)</sup> | 0.72±0.04 <sup>4)</sup> |
| 中药高剂量组 | 31.9                  | 0.59±0.03 <sup>4)</sup> | 1.15±0.06 <sup>4)</sup> | 0.50±0.04 <sup>4)</sup> | 0.50±0.03 <sup>4)</sup> | 0.71±0.01 <sup>4)</sup> |
| 中药中剂量组 | 19.1                  | 0.49±0.03 <sup>4)</sup> | 0.87±0.06 <sup>4)</sup> | 0.35±0.02 <sup>3)</sup> | 0.33±0.02 <sup>3)</sup> | 0.59±0.02               |
| 中药低剂量组 | 6.4                   | 0.38±0.03               | 0.72±0.03 <sup>3)</sup> | 0.32±0.02               | 0.29±0.03               | 0.55±0.02               |

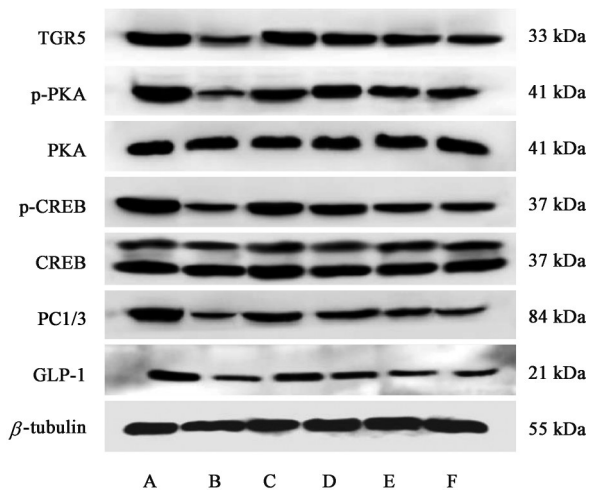


图2 db/db小鼠胰腺组织中TGR5/cAMP/GLP-1信号通路蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of key proteins of TGR5/cAMP/GLP-1 signaling pathway in pancreatic tissue of db/db mice

### 3.6 对db/db小鼠胰腺组织中cAMP含量的影响

与空白组比较,模型组小鼠cAMP含量显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较,中药高、中剂量组及二甲双胍组cAMP含量明显升高( $P<0.05, P<0.01$ ),中药低剂量组cAMP含量虽有升高趋势,但差异无统计学意义。见表5。

表5 加味葛根芩连汤对db/db小鼠胰腺组织中cAMP含量的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 5 Effect of modified Gegen Qinliantang on camp content in pancreatic tissue of db/db mice ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

| 组别     | 剂量/g·kg <sup>-1</sup> | cAMP/nmol·L <sup>-1</sup> |
|--------|-----------------------|---------------------------|
| 空白组    |                       | 62.27±5.31                |
| 模型组    |                       | 27.17±11.34 <sup>2)</sup> |
| 二甲双胍组  | 0.2                   | 55.08±8.15 <sup>4)</sup>  |
| 中药高剂量组 | 31.9                  | 47.38±9.45 <sup>4)</sup>  |
| 中药中剂量组 | 19.1                  | 37.06±13.01 <sup>3)</sup> |
| 中药低剂量组 | 6.4                   | 31.75±7.06                |

## 4 讨论

糖尿病是一种以血糖水平升高为特征的慢性代谢性疾病,超过90%的糖尿病患者为T2DM,其发病机制较为复杂,与遗传、环境及胰岛β细胞功能障碍等密切相关<sup>[10]</sup>。《黄帝内经》中与糖尿病相关的论述有“消渴”“脾瘅”及“消瘅”。葛根芩连汤可治疗太阳表邪未解,里热蒸肺迫肠,津液外泄之症。糖尿病多由长期过食肥甘厚味,胃肠积热,消谷伤津耗液而致。现代医家常使用葛根芩连汤古方新用治疗肥胖型糖尿病,收效甚佳<sup>[6]</sup>。方中葛根可生津润燥,黄芩、黄连性味苦寒可清湿热,甘草补脾养

胃,调和诸药。全小林教授治疗T2DM时,因方中黄连、黄芩等苦寒药物的剂量较大易损伤脾胃,故佐以辛温之干姜,制其苦寒之性,且黄连、黄芩苦寒清热,干姜辛温,温中散寒,又符辛开苦降之意<sup>[11-12]</sup>。诸药合用,共同发挥清肠燥湿之功。临床实践也证实了葛根芩连汤可调节T2DM血糖、血脂代谢,改善胰岛功能等<sup>[13]</sup>。对于古代医籍中的剂量换算历来说法不一,本研究将加味葛根芩连汤分为高、中、低剂量3组,分别为1两等于15、9、3g,观察加味葛根芩连汤在不同的剂量换算下治疗T2DM的疗效<sup>[8]</sup>。

T2DM出现血糖升高是由胰岛衰竭及胰岛素作用减弱等因素之间的复杂作用所导致,胰岛衰竭的特征是胰岛素分泌反应失调和GLP-1释放异常<sup>[14]</sup>。肠道来源的肠促胰岛素激素GLP-1可通过调节胰岛细胞功能、机体饱腹感等调控葡萄糖代谢<sup>[15]</sup>。而PC1/3具有将胰岛素原转化为胰岛素和将血糖素转化为GLP-1的功能,其功能障碍可能诱发胰岛素和GLP-1的异常释放<sup>[16]</sup>。胆汁酸是胆固醇的代谢产物,在人体代谢调节中占据重要地位<sup>[17]</sup>。近二十年来,研究发现胆汁酸可调控糖核调节激素的分泌,在葡萄糖稳态中具有重要作用。研究证明胆汁酸受体TGR5的激活可导致能量消耗,进而改善糖脂代谢,被认为是治疗T2DM的潜在靶点<sup>[18]</sup>。激活的TGR5受体可刺激GLP-1的释放,调节胰岛素分泌并改善胰腺功能<sup>[18]</sup>。研究发现,胰岛β细胞上的TGR5激活可以增加胰岛素分泌<sup>[18]</sup>。胆汁酸牛磺脱氧胆酸(TUDCA)可通过激活TGR5受体调节cAMP/PKA/CREB通路刺激胰岛素分泌<sup>[15]</sup>。另一项研究表明,TGR5激动剂可通过cAMP/cAMP激活的交换蛋白(Epac)/磷脂酶C(PLC)途径增加细胞内Ca<sup>2+</sup>浓度从而刺激β细胞胰岛素分泌<sup>[19]</sup>。此外,TGR5也可作用于胰岛α细胞。研究表明,TGR5激动剂在胰腺中的刺激作用主要是由于从α细胞中释放的GLP-1以旁分泌方式作用于β细胞<sup>[20]</sup>。cAMP可在Gs蛋白偶联受体激活后被刺激性Gα蛋白(Gsα)激活,从而诱导下游蛋白PKA的激活,激活的PKA可诱导下游cAMP反应元件结合蛋白CREB激活<sup>[21]</sup>。研究发现,CREB可调节胰高血糖素原和PC1/3的转录,导致肠道L细胞中成熟GLP-1的产生增加<sup>[22]</sup>。PC1/3可在胰腺α细胞中表达,其释放的GLP-1可以以旁分泌方式作用于相邻β细胞以控制胰岛素分泌<sup>[23]</sup>。综上所述,胆汁酸受体TGR5激活可刺激增加cAMP,从而激活PKA并磷酸化和激

活 CREB 以增加 PC1/3 转录。PC1/3 将胰高血糖素前体剪接至 GLP-1, 刺激胰岛素分泌, 故 TGR5 的激活可通过 cAMP/PKA/CREB 依赖性途径调节 GLP-1 刺激胰岛素分泌。

本实验选择 T2DM 模型小鼠 db/db 小鼠, 为瘦素基因敲除小鼠, 具有高血糖、高血脂等症状, 是研究 T2DM 的理想模型动物之一<sup>[24]</sup>。本实验选择阳性对照药物二甲双胍是治疗 T2DM 的一线药物, 在调节糖脂代谢中发挥重要作用<sup>[25]</sup>。据报道, 二甲双胍可控制肠道胆汁酸吸收, 并刺激 GLP-1 分泌<sup>[26]</sup>。此外, 已有研究发现二甲双胍可通过调节 BA/TGR5/GLP-1 信号通路治疗 T2DM<sup>[27]</sup>。故本实验选择二甲双胍为阳性对照药物。FBG 是检测糖尿病的最常用指标, 可反应机体胰岛  $\beta$  细胞功能及胰岛素的分泌功能状态。GSP 是血糖和血清中多种蛋白质(其中约 70% 是白蛋白)之间非酶促反应的产物。GSP 的测定也称为果糖胺测定, 能反映近期 2~3 周的平均血糖水平, 为较长时间血糖控制水平提供依据<sup>[28]</sup>。GLU 是诊断糖尿病的最主要检查项目之一。研究发现, 胰岛素敏感性和分泌与 GLU 的增加呈负相关<sup>[29]</sup>。同时检测 GSP、GLU 可反映机体葡萄糖代谢状况。本实验观察到 db/db 小鼠 FBG、GSP、GLU 水平增高, 提示 T2DM 模型 db/db 小鼠存在糖代谢紊乱。药物干预过程中, 随着 db/db 小鼠周龄增加 FBG 增长迅速, 各给药组的 FBG 虽有增长, 但增长较为缓慢, 说明加味葛根芩连汤及二甲双胍可抑制 db/db 小鼠葡萄糖代谢状态进一步恶化。使用加味葛根芩连汤及二甲双胍给药 12 周后, 加味葛根芩连汤各剂量组及二甲双胍组 db/db 小鼠 FBG、GSP、GLU 表达水平与模型组比较降低, 提示加味葛根芩连汤及二甲双胍可调节 db/db 小鼠糖代谢紊乱。TC、TG、HDL-C、LDL-C 为血脂四项, 是检测体内脂质水平的重要指标, 可反映机体脂质代谢状况。本实验观察到 db/db 小鼠 TC、TG、LDL-C 水平增高, HDL-C 水平降低, 提示 T2DM 模型 db/db 小鼠存在脂代谢紊乱。加味葛根芩连汤各剂量组及二甲双胍组均能够降低 db/db 小鼠血清中 TC、TG、LDL-C 水平, 增高 HDL-C 水平, 提示加味葛根芩连汤及二甲双胍可调节 db/db 小鼠脂代谢紊乱。

本实验结果显示, db/db 小鼠胰腺组织中胰岛细胞萎缩、变形, 胆汁酸相关通路 TGR5/cAMP/GLP-1 通路关键蛋白表达水平降低, 提示 T2DM 模型 db/db 小鼠存在胰岛功能受损及胆汁酸 TGR5 相关通路被抑制现象。加味葛根芩连汤及二甲双胍给药 12 周

后, db/db 小鼠胰岛萎缩变形减轻, 胰岛形状恢复, 胆汁酸相关通路 TGR5/cAMP/GLP-1 通路关键蛋白表达水平增加, 提示加味葛根芩连汤及二甲双胍可改善胰腺功能, 使胰岛受损状况好转, 激活胆汁酸 TGR5 相关通路。其中, 加味葛根芩连汤高剂量组及二甲双胍组效果最佳, 加味葛根芩连汤组疗效具有剂量依赖性, 本实验中所选剂量中疗效随剂量增加而效果更佳。综上所述, 加味葛根芩连汤可调控 T2DM 糖脂代谢, 并具有剂量依赖性, 其可能是通过激活胆汁酸 TGR5 受体, 调控 cAMP/PKA/CREB 途径, 影响 GLP-1 的分泌, 从而改善胰腺功能, 进而调节 T2DM 糖脂代谢。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] 陈锋, 张帆, 郝二伟, 等. 中药多糖防治糖尿病及其并发症的作用机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(12): 256-266.
- [2] 欧璐, 李晓琴, 李宇, 等. 加味黄连温胆汤治疗新诊 2 型糖尿病痰(湿)热互结证临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(1): 128-134.
- [3] 史丽伟. 新消渴方调控 AMPK 信号通路改善 2 型糖尿病肝脏胰岛素抵抗的机制研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2019.
- [4] DONKERS J M, ROSCAM ABBING R L P, VAN DE GRAAF S F J. Developments in bile salt based therapies: A critical overview[J]. Biochem Pharmacol, 2019, 161(3): 1-13.
- [5] VETTORAZZI J F, RIBEIRO R A, BORCK P C, et al. The bile acid TUDCA increases glucose-induced insulin secretion via the cAMP/PKA pathway in pancreatic beta cells[J]. Metab, 2016, 65(3): 54-63.
- [6] 张昌林, 吴荣焕, 盛泓沁, 等. 基于网络药理学的葛根芩连汤治疗 2 型糖尿病的效应机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(19): 179-188.
- [7] ZHOU Q, SONG N, WANG S Q, et al. Effect of Gegen Qinliantang on hepatic gluconeogenesis in ZDF rats with type 2 diabetes mellitus based on the farnesol X receptor/ceramide signaling pathway regulating mitochondrial metabolism and endoplasmic reticulum stress[J]. Evid Based Complement Altern Med, 2021, doi:10.1155/2021/9922292.
- [8] TONG X L, ZHAO L H, LIAN F M, et al. Clinical observations on the dose-effect relationship of gegen qin lian decoction on 54 out-patients with type 2 diabetes[J]. J Tradit Chin Med, 2011, 31(1): 56-59.
- [9] 施岚尔. 基于自噬调控研究降糖三黄片对胰岛  $\beta$  细

- 胞的保护作用及其机制[D]. 广州:广州中医药大学, 2021.
- [10] KYROU I, TSIGOS C, MAVROGIANNI C, et al. Sociodemographic and lifestyle-related risk factors for identifying vulnerable groups for type 2 diabetes: A narrative review with emphasis on data from Europe [J]. *BMC Endocr Disord*, 2020, 20(1):134.
- [11] 赵林华, 连凤梅, 姬航宇, 等. 全小林教授运用不同剂量葛根芩连汤治疗2型糖尿病验案[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(4):249-251.
- [12] 王贺, 王镁. 基于调节肠道菌群探讨清热类方治疗糖尿病的研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(3):238-244.
- [13] 王焯, 周琦, 朱向东, 等. 葛根芩连汤对自发肥胖型2型糖尿病ZDF大鼠FFA及NF- $\kappa$ B/IRS2通路的影响[J]. *上海中医药大学学报*, 2017, 31(6):65-69.
- [14] BROWN M R, MATVEYENKO A V. It's what and when you eat: An overview of transcriptional and epigenetic responses to dietary perturbations in pancreatic islets [J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13(3):1-13.
- [15] KLEN J, DOLŽAN V. Glucagon-like peptide-1 receptor agonists in the management of type 2 diabetes mellitus and obesity: The impact of pharmacological properties and genetic factors[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(7):3451.
- [16] NI Z, WANG Y, SHI C, et al. Islet MC4R regulates PC1/3 to improve insulin secretion in T2DM mice via the cAMP and  $\beta$ -arrestin-1 pathways [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2022, 7:1-15.
- [17] CHIANG J Y L, FERRELL J M. Bile acid receptors FXR and TGR5 signaling in fatty liver diseases and therapy[J]. *Am J Physiol Gastrointest*, 2020, 318(3):554-573.
- [18] MACZEWSKY J, KAISER J, GRESCH A, et al. TGR5 activation promotes stimulus-secretion coupling of pancreatic  $\beta$ -cells via a PKA-dependent pathway [J]. *Diabetes*, 2019, 68(2):324-336.
- [19] BALA V, RAJAGOPAL S, KUMAR D P, et al. Release of GLP-1 and PYY in response to the activation of G protein-coupled bile acid receptor TGR5 is mediated by Epac/PLC- $\epsilon$  pathway and modulated by endogenous H<sub>2</sub>S [J]. *Front Physiol*, 2014, 5(11):420.
- [20] LIU L, ZHANG J, CHENG Y, et al. Gut microbiota: A new target for T2DM prevention and treatment [J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13(8):1-19.
- [21] DA SILVA J A, FIGUEIREDO L S, CHAVES J O, et al. Effects of tauroursodeoxycholic acid on glucose homeostasis: Potential binding of this bile acid with the insulin receptor[J]. *Life Sci*, 2021, 285(10):1-10.
- [22] LEE J H, WEN X, CHO H, et al. CREB/CRTC2 controls GLP-1-dependent regulation of glucose homeostasis[J]. *FASEB J*, 2018, 32(3):1566-1578.
- [23] SAIKIA M, HOLTER M M, DONAHUE L R, et al. GLP-1 receptor signaling increases PCSK1 and  $\beta$  cell features in human  $\alpha$  cells[J]. *JCI Insight*, 2021, 6(3):1-17.
- [24] 唐艺丹, 王鲜忠, 张姣姣. II型糖尿病动物模型构建的研究进展[J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(6):870-876.
- [25] XIE C, HUANG W, YOUNG R L, et al. Role of bile acids in the regulation of food intake, and their dysregulation in metabolic disease[J]. *Nutrients*, 2021, 13(4):1104.
- [26] SANSOME D J, XIE C, VEEDFALD S, et al. Mechanism of glucose-lowering by metformin in type 2 diabetes: Role of bile acids [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2020, 22(2):141-148.
- [27] 穆国华. 黄连-肉桂治疗T2DM的临床应用及对基于肠道菌群的BA/TGR5/GLP-1通路影响[D]. 北京:北京中医药大学, 2021.
- [28] SUO M, WEN D, WANG W, et al. Comparative study on hemoglobin A1c, glycosylated albumin and glycosylated serum protein in aplastic anemia patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(5):1-33.
- [29] PHAM D D, LEE Y S, CUI S, et al. The mean of fasting, 1-h, and 2-h plasma glucose levels is superior to each separate index in predicting diabetes [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2021, 172(1):108650.

[责任编辑 孙丛丛]