

## 桑叶治疗 2 型糖尿病药效及其机制研究

赵保胜<sup>1</sup>, 高晓燕<sup>1</sup>, 刘洋<sup>2</sup>, 桂海水<sup>2</sup>, 朱寅荻<sup>2</sup>, 徐瞰海<sup>2\*</sup>

(1. 北京中医药大学科研实验中心, 北京 100029; 2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

**[摘要]** **目的:**探讨桑叶对 KK<sup>Ay</sup> 2 型糖尿病小鼠血糖、胰岛素(Ins)敏感性及胰岛细胞 Toll 样受体 TLR2, TLR4 mRNA 表达的影响,初步探讨其降糖机制。**方法:**KK<sup>Ay</sup>小鼠随机分为模型组、桑叶高、中、低剂量组(分别相当于含生药 3.0, 1.5, 0.75 g·kg<sup>-1</sup>)和二甲双胍组(0.4 g·kg<sup>-1</sup>)。另设 10 只 C57BL6 小鼠为正常对照组。各给药组分别喂饲不同浓度的药物,模型组与对照组均 ig 等容量自来水。连续 4 周,末次给药后 1 h 取血,测定小鼠空腹血糖(FPG)、空腹胰岛素(FIns)含量,分析胰岛素敏感性的变化情况。提取小鼠胰岛细胞总 RNA,Real time-PCR 法测定胰岛细胞 TLR2, TLR4 mRNA 表达。**结果:**桑叶各剂量能明显降低 KK<sup>Ay</sup>小鼠的 FPG( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )、降低血清 Ins 含量( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),明显降低 KK<sup>Ay</sup>小鼠胰岛素抵抗指数与胰岛细胞 TLR2, TLR4 mRNA 表达( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )**结论:**桑叶有较好的降血糖、增强胰岛素敏感性等作用,其作用可能与减弱胰岛细胞 TLR2, TLR4 表达、抑制炎症过程有关。

**[关键词]** 桑叶; 2 型糖尿病; 血糖; 胰岛素抵抗; Toll 样受体 (TLR2, TLR4)

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)20-0263-04

### Effect and Mechanism of *Morus alba* for Treating Non-insulin-dependent Diabetes Mellitus

ZHAO Bao-sheng<sup>1</sup>, GAO Xiao-yan<sup>1</sup>, LIU Yang<sup>2</sup>, GUI Hai-shui<sup>2</sup>, ZHU Yin-di<sup>2</sup>, XU Tun-hai<sup>\*</sup>

(1. Center of Scientific Experiment, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect and pharmacological mechanism of *Morus alba* for treating non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Method:** The KK<sup>Ay</sup> mice were randomly divided into 5 groups: model group, *Morus alba* high, middle and low dose groups (3, 1.5, 0.75 g·kg<sup>-1</sup>) and metformin group (0.4 g·kg<sup>-1</sup>). Model group and control group animals were administrated with the same volume of tap water. Four weeks later, the contents of fasting plasma glucose (FPG), fasting plasma insulin (FIns) were observed, and the insulin sensitivity of mice was analyzed. Total RNA was extracted from island cells and the content of TLR2 and TLR4 was evaluated with Real time-PCR method. **Result:** *Morus alba* of different doses could obviously decrease the amount of FPG ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), decrease the content of insulin, reinforce the sensitivity of rat to exogenous insulin ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ) and decrease the expression of TLR2, TLR4 of KK<sup>Ay</sup> mice islet cells. **Conclusion:** *Morus alba* had significant effect to decrease FPG and improve the sensitivity to exogenous insulin, its effects may be related to the decrease in expression of TLR2, TLR4 and inhibition of inflammation.

**[Key words]** *Morus alba*; non-insulin-dependent diabetes mellitus; fasting plasma glucose; insulin resistance; TLR2; TLR4

**[收稿日期]** 20120307(227)

**[基金项目]** 国家国际科技合作计划项目(2010DFB33260);北京中医药大学创新团队项目(2011-CXTD-19);北京中医药大学自主选题项目(2010ZYBZZ-JS083)

**[第一作者]** 赵保胜,博士,副研究员,从事中药药效与物质基础研究, Tel:010-64286291, E-mail:zhaobs1973@163.com

**[通讯作者]** \*徐瞰海,教授,从事中药活性成分及质量控制研究, Tel:010-84738628, E-mail:thxu@yahoo.com

2 型糖尿病又称非胰岛素依赖型糖尿病,是由于机体对胰岛素(Ins)不敏感或 Ins 分泌不足引起的代谢紊乱综合征,约占糖尿病患者的 90%。

桑叶是桑科植物桑 *Morus alba* L. 的叶,性味甘、寒。自古以来,中医就用桑叶治疗消渴证。《本草纲目》记载桑叶“汁煎代茗,能止消渴”;现代药理学研究表明,桑叶中含有多糖、黄酮、生物碱和挥发油等多种活性成分,具有较好的降糖<sup>[1-2]</sup>、降脂<sup>[3-4]</sup>等作用,广泛用于糖尿病的治疗。另外,桑叶还具有较好的抗炎<sup>[5]</sup>、抗菌<sup>[6]</sup>和增强免疫力<sup>[7]</sup>等作用。本文采用血液生化法、放射免疫法和定量 PCR 法检测 KK<sup>Ay</sup>小鼠血糖、血清胰岛素含量,并分析胰岛素敏感性及胰岛 TLR2,TLR4 表达变化情况,探讨桑叶的降糖作用及其作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 13 周龄雄性 KK<sup>Ay</sup>小鼠 50 只,体重 30 ~ 33 g,13 周龄雄性 BALB/c 小鼠,体重 22 ~ 25 g,北京华阜康生物科技股份有限公司提供,许可证号 SCXK(京)2009-0015。

**1.2 药物与试剂** 桑叶购于北京卫仁中药饮片厂,经北京中医药大学马泽新教授鉴定为 *Morus alba* L.。北京中医药大学中药学院制成流浸膏,临用时用蒸馏水配成相应质量浓度的混悬液。二甲双胍(中美上海施贵宝制药有限公司,批号 1104121)。胰岛素(Ins,徐州万邦生化制药厂,批号 110812);胰岛素试剂盒(深圳赛尔生物技术有限公司,批号 1125687)。胰岛细胞 Toll 样受体引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成。总 RNA 提取试剂盒、M-MLV Reverse Transcriptase(美国 Promega 公司,批号分别为 18341 和 0403189)。RNAsafe, Oligo(dT) 15, dNTP(北京赛百盛基因技术有限公司)。其他试剂均为市售分析纯。

**1.3 仪器** CX4 Pro 全自动生化分析仪(美国 Beckman);Onetouch Ultra II 稳豪型快速血糖仪(美国强生);KZ4-GC-2016- $\gamma$  放射免疫计数器(克勒格瓦尼上海分析仪器有限公司),7300 Real-time PCR 仪(美国 ABI),Gene Quant II 型核酸定量仪(Pharmacia Biotech,英国),DYY-III 5 型电泳仪(北京市六一仪器厂),SYNGENE-Gene Genius 全自动凝胶成像系统(北京百晶生物技术有限公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组与给药** 50 只 KK<sup>Ay</sup>小鼠适应性喂养 1 周后,按血糖、体重均匀分为模型组、桑叶高(3 g·kg<sup>-1</sup>)、中(1.5 g·kg<sup>-1</sup>)、低剂量组(0.75 g·kg<sup>-1</sup>)和

阳性药二甲双胍组(0.4 g·kg<sup>-1</sup>),每组 10 只。另以 10 只 C57BL/6 小鼠为正常对照组。其中 KK<sup>Ay</sup>小鼠喂饲特殊高脂饮料,正常对照组喂饲正常饲料。各给药组 ig 等体积不同质量浓度的相应药物,模型组与正常组 ig 等容积自来水。1 次/d,共 4 周,每周每组随机取 2 ~ 3 只小鼠测定血糖。

**2.2 胰岛素耐量实验**<sup>[8]</sup> 小鼠非禁食状态下,测尾静脉血糖(0 min),然后立即 ip 普通胰岛素 1 U·kg<sup>-1</sup>,注射后 15,30,45,60 min 尾静脉采血测血糖。以 0 min 血糖值为基值,分别计算各时点血糖均值与 0 min 血糖均值的比值,比值越大,表明血糖下降得越少,对胰岛素敏感性越差。

**2.3 空腹血糖(FPG)、空腹胰岛素(FIns)检测和胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)计算** 末次给药后 1 h,麻醉小鼠,打开腹腔,分离腹主动脉并取血,3 000 r·min<sup>-1</sup>,离心 15 min,取血清用于检测 FPG 和 FIns 含量。采用 HOMA-IR 评估胰岛素抵抗程度<sup>[9]</sup>。HOMA-IR 评分越高,表示胰岛素抵抗程度越重。

$$\text{HOMA-IR} = \text{FPG} \times \text{FIns} / 22.5$$

**2.4 胰腺细胞中 TLR2,TLR4 mRNA 表达测定** 小鼠处死后,迅速取出胰腺,充分匀浆,液氮内研磨,严格按照 Trizol 试剂盒提取总 RNA,行逆转录,ABI 7300 型 Real-time PCR 仪进行实时定量 PCR,PCR 条件:45 °C 2 min,95 °C 10 min,95 °C 15 s,60 °C 1 min,50 个循环。引物序列如下:TLR2, sense: 5'-AAGAGGAAGCCCAAGAAAGC-3', anti-sense: 5'-CGATGGAATCGATGATGTTG-3'; TLR4, sense: 5'-ACCTGGCTGGTTTACACGTC-3', anti-sense: 5'-CTGCCAGAGACATTGCA-GAA-3'; GAPDH, sense: 5'-GTCGTGGAGTCTACTGTTGTTTC-3', anti-sense: 5'-GTCATCATACTTGGCAGGTTTC-TC-3'。基因表达采用 2<sup>- $\Delta\Delta Ct$</sup> 法进行定量。相对定量方法是比较经过处理的样品和未经处理的样品目标转录本之间的表达差异,是实时定量 PCR 实验中分析基因表达相对变化的一种简便方法<sup>[10-11]</sup>,其含义是指将对照组待测指标值视为 1,其他各组相对于 1 的相对值。

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{样本}} - Ct_{\text{内参}})_{\text{受试组}} - (Ct_{\text{样本}} - Ct_{\text{内参}})_{\text{对照组}}$$

**2.5 数据统计** 应用以 SPSS 10.0 统计分析软件,计量数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较用完全随机设计资料的方差分析,若方差分析有显著性则进一步进行均数间的两两比较, $P < 0.05$  为有统计意义。

## 3 结果

**3.1 对 FPG, FIns 及胰岛素抵抗指数的影响** 桑叶不同剂量可明显降低小鼠 FPG ( $P < 0.05$  或  $P <$

0.01),二甲双胍组小鼠 FPG 较模型组明显降低,显示出较好的降糖作用( $P < 0.01$ )。桑叶高、中剂量可降低小鼠血清 FIns 含量( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),而低剂量对 FIns 含量无明显影响。同时,桑叶不同

剂量均显著降低小鼠的胰岛素抵抗指数(与模型组比较, $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),表明桑叶主要通过降低机体的胰岛素抵抗指数、增加机体组织对 Ins 的敏感性发挥降血糖作用。见表 1。

表 1 桑叶对  $KK^{Ay}$  小鼠 FPG, FIns, HOMA-IR 的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	FPG/ $mmol \cdot L^{-1}$	FIns/ $U \cdot L^{-1}$	HOMA-IR
正常	-	$6.44 \pm 0.42^{2)}$	$27.63 \pm 3.40^{2)}$	$7.94 \pm 1.30^{2)}$
模型	-	$28.08 \pm 3.31$	$49.02 \pm 8.60$	$61.22 \pm 13.21$
二甲双胍	0.40	$13.13 \pm 2.13^{2)}$	$34.37 \pm 6.78^{2)}$	$18.86 \pm 8.05^{2)}$
桑叶	3.00	$16.61 \pm 4.23^{2)}$	$39.18 \pm 5.35^{2)}$	$28.97 \pm 9.03^{2)}$
	1.50	$19.16 \pm 5.85^{2)}$	$42.04 \pm 2.33^{1)}$	$35.64 \pm 10.84^{2)}$
	0.75	$21.22 \pm 6.78^{1)}$	$45.51 \pm 4.85$	$43.14 \pm 15.34^{1)}$

注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ (表 2 同)。

**3.2 对胰岛素耐量的影响** 注射 Ins 后,正常对照组与二甲双胍组小鼠各时点 FPG 与 0 min 比值较小,模型组小鼠各时点 FPG 与 0 min 比值较大;桑叶不同剂量均明显降低  $KK^{Ay}$  小鼠各时点 FPG 与 0 min 比值,表明桑叶可明显增强  $KK^{Ay}$  小鼠对外源性 Ins 的敏感性,表现为明显的抗 IR 作用。见图 1。

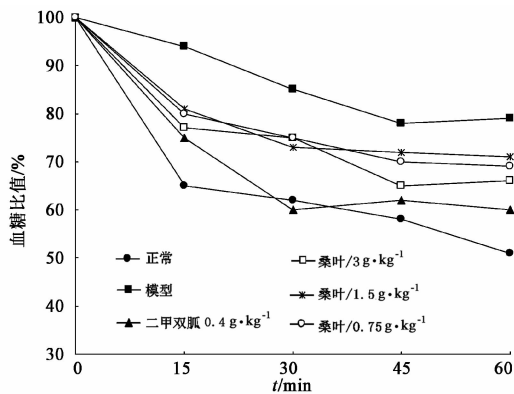


图 1 桑叶对  $KK^{Ay}$  小鼠胰岛素耐量的影响

### 3.3 对胰岛细胞 TLR2, TLR4 mRNA 表达的影响

$KK^{Ay}$  小鼠胰岛细胞 TLR2, TLR4 mRNA 表达明显升高( $P < 0.01$ ),桑叶不同剂量明显降低胰岛细胞 TLR2, TLR4 mRNA 表达( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),而阳性药二甲双胍对 TLR2, TLR4 mRNA 表达影响不明显,提示桑叶降血糖作用可能与 TLR2, TLR4 及其信号通路有关。而二甲双胍的降血糖作用与之无关。见表 2。

## 4 讨论

糖尿病是一组以多饮、多食、多尿及身体消瘦为主要临床表现的全身性的内分泌代谢性疾病,中医学称之为消渴证。中医认为消渴病是由于燥热偏盛、阴津亏耗所致的热盛阴伤之病,治疗消渴病的治

表 2 桑叶对  $KK^{Ay}$  小鼠胰岛细胞 TLR2, TLR4 mRNA 表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	TLR2	TLR4
正常	-	$1.02 \pm 0.15^{2)}$	$1.03 \pm 0.09^{2)}$
模型	-	$3.23 \pm 0.62$	$2.85 \pm 0.31$
二甲双胍	0.40	$3.66 \pm 0.27$	$2.52 \pm 0.20$
桑叶	3.00	$1.89 \pm 0.17^{2)}$	$1.33 \pm 0.19^{2)}$
	1.50	$2.00 \pm 0.26^{1)}$	$1.72 \pm 0.08^{2)}$
	0.75	$3.08 \pm 0.33$	$1.92 \pm 0.15^{1)}$

则是滋阴清热、益气养阴<sup>[12]</sup>。机体持续性的高血糖会殃及全身组织、器官和细胞,并引发慢性并发症<sup>[13]</sup>,因此,降低机体血糖水平是治疗糖尿病的首要目标。2型糖尿病患者除了高血糖外,常表现为糖耐量异常、Ins 敏感性下降等症状,同时存在脂质代谢紊乱和胰岛素耐量异常,实验室指标表现为 TC, TG, LDL 升高、HDL 降低等。

近年来,炎症在 IR 形成过程中的作用越来越受到人们的重视。研究认为 IR 是一个慢性亚临床炎症过程,与 IR 相关的炎症因子主要有肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )、白介素 6(IL-6)和游离脂肪酸(FFA)等<sup>[14]</sup>。目前用中药抗炎进而改善 IR 机制仍不确定。

Toll 样受体(TLRs)是一种模式识别受体,在外界因素刺激下,TLRs 启动炎症信号通路,扩大宿主对微生物感染的防御免疫,过表达则使炎症因子分泌增加,产生炎症,并通过抑制胰岛素受体活性加重 IR<sup>[15]</sup>。已证明,TLR2, TLR4 通过核因子  $\kappa B$ (NF- $\kappa B$ )信号途径使炎症因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的表达增高,促成了 IR 的形成<sup>[16-17]</sup>。因此,TLRs 介导的慢性

炎症可能是导致机体 IR 的启动因子。

本实验结果表明,桑叶可有效降低  $KK^{Ay}$  小鼠血糖,明显改善胰岛素耐量,表现为较好的抗 2 型糖尿病作用。实验显示, $KK^{Ay}$  小鼠胰岛细胞 TLR2,TLR4 mRNA 表达较正常组小鼠明显升高,表明 TLRs 及其信号通路可能参与了胰岛素抵抗的病理形成过程。桑叶水提物明显降低 TLR2,TLR4 mRNA 表达,提示其降糖作用可能与降低 TLR2,TLR4 mRNA 表达、抑制炎症发展有关。其确切机制有待于进一步研究。

### [参考文献]

[1] 方飞,吴新荣,罗明俐,等. 桑叶有效部位对胰岛素抵抗 HepG2 细胞体外糖代谢的影响[J]. 广东药学院学报, 2011, 27(6):637.

[2] 徐健飞,义祥辉,陈全斌. 桑叶不同化学成分的降糖作用研究[J]. 广西植物, 2010, 30(2):284.

[3] 谢惠萍,刘以农,郭明. 桑叶提取物降血脂作用的动物试验研究[J]. 中国现代医药杂志, 2006, 8(11):48.

[4] 卢建峰,闫学红. 桑叶降血糖作用研究[J]. 中国现代医生, 2009, 47(13):81.

[5] 王福文,朱燕,胡志力,等. 桑叶片的药效学研究[J]. 时珍国医国药, 2004, 15(2):65.

[6] 肖艳芬,黄燕,甄汉深,等. 桑椹、桑叶水煎液体外抗菌作用的实验研究[J]. 广西中医学院学报, 2009, 12(3):48.

[7] 游元元,万德光,杨文字,等. 四种桑类药材对小鼠免疫功能的影响[J]. 中药药理与临床, 2008, 24(3):83.

[8] 张玲玲,黄澜,徐艳峰. 小檗碱对 2 型糖尿病 ICR 小鼠模型的治疗作用[J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(1):23.

[9] 徐怡,王保华,李柯,等. 黄芪多糖的胰岛素增敏作用及其对蛋白酪氨酸磷酸酯酶 1B 的影响[J]. 武汉大学学报:医学版, 2010, 31(3):288.

[10] Winer J, Jung C K, Shackel I, et al. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes *in vitro*[J]. Anal Biochem, 1999, 270(1): 41.

[11] Schmittgen T D, Zakrajsek B A, Mills A G, et al. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods[J]. Anal Biochem, 2000, 285(2):194.

[12] 王北婴,李仪奎. 中药新药研制开发技术与方法[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2001: 595.

[13] 黄崇刚,徐嘉红,刘剑毅,等. 糖尿病心宁对 2 型糖尿病大鼠模型的作用[J]. 重庆中草药研究, 2005, 52(2):23.

[14] 张永鹏,刘静,靳国印,等. 糖平煎对 2 型糖尿病大鼠炎症细胞因子的干预作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21):235.

[15] Hotamisligil G S. Inflammation and metabolic disorders[J]. Nature, 2006, 444(7121):860.

[16] Song M J, Kim K H, Yoon J M, et al. Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 4:739.

[17] Poggi M, Baste Iica D, Gua I P, et al. C3H/HeJ mice carrying a toll - like receptor 4 mutation are protected against the development of insulin resistance in white adipose tissue in response to a high-fat diet[J]. Diabetologia, 2007, 50:1267.

[责任编辑 何伟]