

滋蔞饮对2型糖尿病模型大鼠的降糖作用及机制研究[△]

刘欣欣^{1,2*}, 白茹², 牛雯颖², 王呈祥^{1#} (1.广西中医药大学基础医学院, 南宁 530000; 2.黑龙江中医药大学研究生院, 哈尔滨 150040)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)21-2968-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.21.18

摘要 目的:研究滋蔞饮对2型糖尿病模型大鼠的降糖作用及其机制,为其临床应用提供理论基础。方法:将80只雄性大鼠高糖高脂饲料喂养4周后,单次腹腔注射链脲佐菌素35 mg/kg复制2型糖尿病大鼠模型,另取10只大鼠作为正常组。将糖尿病模型大鼠随机分为二甲双胍组(阳性对照,0.2 g/kg)、模型组(等体积蒸馏水)和滋蔞饮高、中、低剂量组(14.0、7.0、3.5 g/kg),每组10只。连续灌胃给药2周后,采用全自动血糖仪测定各组大鼠空腹血糖值;采用酶联免疫吸附法测定各组大鼠血清胰岛素水平;采用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)检测各组大鼠胰腺组织中c-Jun氨基末端激酶(JNK)、蛋白激酶B(Akt)和胰岛素受体底物1(IRS-1)mRNA表达水平;Western blot法检测各组大鼠胰腺组织中JNK、Akt、IRS-1蛋白的磷酸化程度。结果:与正常组比较,模型组大鼠空腹血糖、胰腺组织中JNK mRNA的表达水平和JNK、IRS-1蛋白的磷酸化程度均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),血清胰岛素含量、Akt mRNA、IRS-1 mRNA的表达水平和Akt蛋白的磷酸化程度均显著降低($P<0.01$);与模型组比较,二甲双胍组和滋蔞饮高、中剂量组大鼠空腹血糖均显著降低($P<0.05$),二甲双胍组和滋蔞饮高剂量组大鼠血清胰岛素含量均显著升高($P<0.01$),二甲双胍组和滋蔞饮各剂量组大鼠胰腺组织中JNK mRNA的表达水平均显著降低($P<0.01$)、Akt mRNA、IRS-1 mRNA的表达水平均显著升高($P<0.01$);二甲双胍组和滋蔞饮高剂量组大鼠的JNK、IRS-1蛋白的磷酸化程度均显著降低($P<0.01$)、Akt蛋白的磷酸化程度均显著升高($P<0.01$)。结论:滋蔞饮具有明显的降糖作用,其作用机制与降低胰岛组织中JNK和IRS-1蛋白磷酸化程度和升高Akt蛋白磷酸化程度有关。

关键词 滋蔞饮;2型糖尿病;大鼠;胰岛素;c-Jun氨基末端激酶;蛋白激酶B;胰岛素受体底物1;血糖;作用机制

Study on Hypoglycemic Effect and Mechanism of Zicui Yin on Type II Diabetic Rats

LIU Xinxin^{1,2}, BAI Ru², NIU Wenyang², WANG Chengxiang¹ (1.School of Basic Medicine, Guangxi University of TCM, Nanning 530000, China; 2.College of Graduate, Heilongjiang University of TCM, Harbin 150040, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the hypoglycemic effect and mechanism of Zicui yin on type II diabetic rats, and to provide theoretic basis for clinical application. METHODS: Eighty male rats were fed with high fat/sugar diet for 4 weeks, and then given intraperitoneal injected with streptozotocin (35 mg/kg) to induce type 2 diabetic model. Other 10 rats were included in normal group. Model rats were randomly divided into metformin group (positive control, 0.2 g/kg), model group (constant volume of distilled water), Zicui yin high-dose, medium-dose, low-dose groups (14.0, 7.0, 3.5 g/kg), with 10 rats in each group. After 2 weeks of continuous intragastric administration, the fasting blood glucose of rats in each group was measured by automatic blood glucose meter. The serum insulin level was determined by ELISA. mRNA expression of JNK, Akt and IRS-1 were detected by RT-PCR; The phosphorylation of JNK, Akt and IRS-1 proteins in the pancreatic tissue of rats in each group was detected by Western blot method. RESULTS: Compared with normal group, the fasting blood glucose, mRNA expression of JNK, The phosphorylation of JNK and IRS-1 proteins in the pancreatic tissue of the model group were significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$), while the serum insulin content, mRNA expression of Akt and IRS-1, the phosphorylation of Akt protein were significantly decreased ($P<0.01$). Compared with model group, the fasting blood glucose of rats in metformin group and Zicui yin high-dose and middle-dose groups decreased significantly ($P<0.05$), the serum insulin content of rats in both metformin group and Zicui yin high-dose group increased significantly ($P<0.01$), and mRNA expression of JNK in pancreatic tissue of rats in metformin group and Zicui yin groups decreased significantly ($P<0.01$), while mRNA expression of Akt and IRS-1 increased significantly ($P<0.01$). The phosphorylation of JNK and IRS-1 proteins in metformin group and Zicui yin high-dose group decreased significantly ($P<0.01$), while the phosphorylation of Akt protein were increased significantly ($P<0.01$). CONCLUSIONS: Zicui yin can significantly reduce blood glucose level, the mechanism of which may be related to

[△] 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81703981);2017年博士科研启动基金项目(No.2017BS015)

* 硕士研究生。研究方向:方剂配伍规律及疗效评价。电话:0451-82193425。E-mail:271029578@qq.com

通信作者:主治医师,博士。研究方向:方剂配伍规律及药效物质基础。电话:0771-14733794。E-mail:717791061@qq.com

decreasing the phosphorylation of JNK and IRS-1 proteins and increasing the phosphorylation of Akt proteins in pancreatic islets.

KEYWORDS Zicui yin; Type II diabetes; Rat; Insulin; JNK; Akt; IRS-1; Blood glucose; Mechanism

糖尿病是一种慢性代谢性疾病,以葡萄糖和脂肪代谢紊乱、血浆葡萄糖水平升高为基本特征^[1]。糖尿病病理生理基础为胰岛素分泌不足以及胰岛素的敏感性下降和胰高血糖素活性升高^[2]。据2017年世界糖尿病联盟报道,与2017年相比,预计到2045年,全球糖尿病患者将增长35%左右^[3]。2型糖尿病的发病机制尚不明确,多认为是由胰岛素抵抗和胰岛B细胞功能障碍引起^[4]。胰岛素抵抗是2型糖尿病发病的重要机制之一,是胰岛素无法有效地调节组织和细胞摄取及利用葡萄糖的一种代谢状态^[5]。

c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)是哺乳类动物细胞中丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路的一个亚类,具有干扰胰岛素的作用,能被炎症细胞因子和游离脂肪酸激活^[6-8]。JNK基因在胰岛细胞内的表达会增加胰岛细胞的凋亡,阻碍胰岛素合成信号,抑制胰岛素的生成,导致机体出现胰岛素抵抗,从而影响机体对葡萄糖的吸收和利用。JNK信号通路处于激活状态时,能够降低胰岛素受体底物1(IRS-1)上酪氨酸激酶的活性,抑制IRS-1的磷酸化,从而抑制IRS-1上的酪氨酸残基与蛋白激酶B(Akt)上的亚基结合、抑制Akt的激活,最终导致胰岛素信号转导受阻,抑制胰岛素和葡萄糖激酶的基因转录和合成^[9-11]。因此,抑制JNK的激活对胰岛细胞功能障碍有保护作用^[12]。

双胍类降糖药是临床上最为常用的降糖药物,其长期应用所导致的抗药性及副作用限制了其应用^[13]。传统的中药复方制剂,具有不良反应较少的特点,在治疗糖尿病方面,具有一定的效果^[14]。滋脾饮方(由生黄芪、生地、生山药、山茱萸、生猪胰腺组成)源自张锡纯的《医学衷中参西录》^[15]。现代研究表明,滋脾饮方加地骨皮、天花粉、葛根、黄精、川连加味方药对2型糖尿病、无自觉症状2型糖尿病等均有一定的治疗作用^[16-17]。相关药理研究发现,滋脾饮方能够修复糖尿病模型大鼠损伤的胰岛组织^[18]。基于此,本研究通过建立2型糖尿病模型大鼠,研究滋脾饮对其血糖的干预作用及其作用机制,为滋脾饮临床防治糖尿病提供理论基础和科学依据。

1 材料

1.1 仪器

UV-160PC紫外分光光度计(日本Shimadzu公司);NANO 2000紫外分光光度计(美国Thermo公司);AC-CU-CHEK罗氏卓越血糖仪、卓越金锐血糖试纸(德国罗氏诊断有限公司);H-2050R超速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);Exicycler 96荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(韩国Bioneer公司);WD-9413B凝胶成像系统(北京六一仪器厂);ELX-800酶标仪(美国Biotek公司)。

1.2 药品与试剂

生黄芪、生地、生山药、山茱萸购自于黑龙江中医药大学附属第一医院,经黑龙江中医药大学肖洪彬教授鉴定为真品;生猪胰腺购自于哈尔滨市申盛生猪定点屠宰场;盐酸二甲双胍片(澳大利亚艾华大药厂,批号:8066462,规格:0.5 g);胰岛素试剂盒(北京诚林生物科技有限公司,批号:201810);RNase酶抑制剂(批号:RP5602)、总RNA提取试剂盒(批号:RP1001)、Super M-MLV逆转录酶试剂盒(批号:PR6502)均购自北京百泰克生物技术有限公司;十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)制备试剂盒(批号:WLA013)、蛋白提取试剂盒(批号:WLA019)、BCA蛋白定量试剂盒(批号:WLA004)、高敏化学发光试剂盒(批号:WLA003)、JNK一抗(批号:WL01295)、磷酸化JNK(p-JNK)一抗(批号:WL01813)、Akt一抗(批号:WL0003b)、磷酸化Akt(p-Akt)一抗(批号:WLP001a)、IRS-1一抗(批号:WL03123)、山羊抗兔二抗(批号:WLA023)、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(批号:WL01845)均购自沈阳万类生物科技有限公司;磷酸化IRS-1(p-IRS-1)一抗(美国CST科技有限公司,批号:2385s)。

1.3 动物

SPF级SD大鼠90只,体质量200~220 g,购于哈尔滨医科大学实验动物中心,动物生产许可证号:SCXK(黑)2016-001。实验动物饲养环境:温度为20~22℃,相对湿度为50%~65%。本研究经黑龙江中医药大学实验动物伦理委员会批准,所有研究均符合中国伦理委员会有关动物研究指导原则。

2 方法与结果

2.1 滋脾饮的制备

将生黄芪15 g,生地50 g,生山药50 g,山茱萸15 g四味药材加入到10倍量的水中浸泡0.5 h后,煎煮2次,合并水煎液,药液浓缩至质量浓度为0.7 g/mL,于4℃保存备用。取猪胰腺15 g剔除筋膜组织后,液氮速冻后,粉碎成细粉,临用时每1 mL药液中加入0.07 g,混匀,备用。

2.2 2型糖尿病模型大鼠的制备

取90只大鼠,适应性饲养1周后,随机抽取10只作为正常组,每笼5只,给予基础饲料喂养,自由饮水。其余大鼠给予高糖高脂饲料(67%大鼠维持饲料+10%猪油+20%蔗糖+2.5%胆固醇+0.5%胆酸钠),每笼5只,自由饮水。喂养4周后,除正常组大鼠外,其余大鼠禁食不禁水12 h,单次腹腔注射1%链脲佐菌素溶液(STZ)35 mg/kg^[19]造模。分别于注射STZ 3、7 d后,禁食不禁水过夜(约8 h),尾尖取血测定空腹血糖值。当2次空腹血糖值均大于>11.1 mmol/L时,表明造模成功。最后本实

实验共取 50 只符合要求的模型大鼠。

2.3 动物分组与给药

将造模成功的 50 只大鼠,按血糖值和体质量随机分为 5 组,滋肾饮高、中、低剂量(14.0、7.0、3.5 g/kg,根据临床用量的 4、2、1 倍换算而得)组、二甲双胍(阳性对照,0.2 g/kg 根据临床用量换算而得)组和模型组,每组 10 只。模型组和正常组大鼠给予等体积蒸馏水,灌胃体积均为 20 mL/kg,每天给药 1 次,连续灌胃给药 2 周。

2.4 各组大鼠体质量的测定

用电子秤测定各组大鼠在给药前和给药 1 周、2 周后体质量变化情况。

2.5 各组大鼠血糖的测定

末次给药后,各组大鼠禁食不禁水过夜(约 8 h),尾尖取血,并用血糖仪测定各组大鼠空腹血糖值。

2.6 各组大鼠血清胰岛素含量的测定

给药结束后大鼠禁食 8 h,腹腔注射 10% 水合氯醛 4 mL/kg 麻醉,腹主动脉取血,分别于肝素钠抗凝管中收集,在 4 °C 下 2 500 r/min 离心 15 min,取上层血清入 1.5 mL 离心管中,−80 °C 冰箱保存,待用。将冻存的血清解冻后,用酶联免疫吸附(ELISA)法检测各组大鼠血清胰岛素含量。

2.7 各组大鼠胰腺组织中 JNK、Akt、IRS-1 mRNA 的测定

每组取 6 只大鼠的胰腺组织,质量均为 100 mg,分别放入玻璃匀浆器中,按照总 RNA 提取试剂盒的试验方法,提取各组大鼠胰腺组织的总 RNA。然后将提取的总 RNA 进行反转录反应,得到其对应的 cDNA,再以 cDNA 为模板,进行扩增,具体试验操作流程依据相关试剂盒操作说明。PCR 反应条件:95 °C 1 min;95 °C 10 s、60 °C 30 s,72 °C 30 s,共 40 个循环。按照 2^{−ΔΔC_t} 相对定量法分析目的基因与内参基因的相对表达水平。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Tab 1 Primer sequence

名称	序列(5'−3')	引物长度, bp	产物长度, bp
JNK 上游引物	GATTGGAGGAGCGAACTAA	20	161
JNK 下游引物	CTGCTGTCTGTATCCGAGGC	20	
Akt 上游引物	TTTATTGGCTACAAGGAACG	20	215
Akt 下游引物	ACAGTCTGAATGCCGGTGGT	20	
IRS-1 上游引物	ACCCAAGGGCTTAGGTCAGA	20	230
IRS-1 下游引物	CCACCACGGAGTCATCCACT	20	
β-actin 上游引物	GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTAGC	25	155
β-actin 下游引物	GGCCGACTCATCTACTCTCTGCTT	25	

2.8 Western blot 法检测各组大鼠胰腺组织中 JNK、Akt、IRS-1 蛋白及其磷酸化蛋白的表达水平

每组取 3 只大鼠的胰腺组织,质量均为 150 mg,分别加入 1 mL 裂解液,在玻璃匀浆器内充分匀浆后,冰浴下静置 30 min,使其完全裂解,4 °C 12 000 r/min 离心 15 min,提取上清液,并用 BCA 法测定蛋白浓度。SDS-PAGE 凝胶电泳分离目的蛋白 JNK、Akt、IRS-1,将电泳分离后的蛋白转移到 NC 膜上,用 5% 的封闭奶粉室温封

闭 30 min 后,分别放入到 JNK、Akt、IRS-1、p-JNK、p-Akt、p-IRS-1 的一抗稀释液(1:500)中,4 °C 孵育过夜。次日, TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。二抗稀释液(1:500)室温孵育 2 h 后, TBST 清洗 3 次,每次 5 min。将 NC 膜放置于化学发光样板上,均匀覆盖 500 μL 发光试剂,放于凝胶成像仪中避光反应 3 min,开始曝光成像。用凝胶成像系统进行灰度分析,β-actin 蛋白为内参蛋白。蛋白磷酸化程度以磷酸化蛋白条带灰度值与非磷酸化蛋白条带灰度值的比值表示^[20-21]。

2.9 统计学方法

采用 SPSS 16.0 进行数据处理,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行多组间比较;采用 LSD-*t* 检验进行组间两两比较;以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠体质量的测定结果

给药前,与正常组比较,模型组和各给药组大鼠的体质量均显著降低($P < 0.01$);给药后,与模型组比较,滋肾饮高剂量组大鼠体质量增加,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠体质量的测定结果见表 2。

表 2 各组大鼠体质量的测定结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 2 Determination of body weight in rats of each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量, g/kg	体质量, g		
		给药前	给药 1 周后	给药 2 周后
正常组		463.70 ± 25.87	491.93 ± 29.18	513.76 ± 33.62
模型组		409.98 ± 31.59 [*]	414.35 ± 35.10	413.85 ± 34.43
二甲双胍组	0.2	400.37 ± 40.95 [*]	405.91 ± 47.06	410.76 ± 50.10
滋肾饮高剂量组	14.0	429.74 ± 29.14 [*]	438.77 ± 30.67	435.72 ± 37.55
滋肾饮中剂量组	7.0	399.61 ± 35.98 [*]	400.61 ± 41.58	399.96 ± 43.03
滋肾饮低剂量组	3.5	411.74 ± 17.37 [*]	415.67 ± 16.60	411.96 ± 20.67

注:与正常组比较, ^{*} $P < 0.01$

Note: vs. normal group, ^{*} $P < 0.01$

3.2 各组大鼠血糖的测定结果

给药前,与正常组比较,其余各组大鼠空腹血糖均显著升高($P < 0.01$)。给药后,与模型组比较,二甲双胍组及滋肾饮高、中剂量组大鼠空腹血糖均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各组大鼠血糖测定结果见表 3。

表 3 各组大鼠血糖测定结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 3 Determination of blood glucose in rats of each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量, g/kg	空腹血糖, mmol/L	
		给药前	给药后
正常组		5.48 ± 0.32	5.14 ± 0.53
模型组		23.29 ± 5.58 ^{***}	26.25 ± 4.33
二甲双胍组	0.2	21.24 ± 6.03 ^{***}	9.33 ± 5.19 ^{**}
滋肾饮高剂量组	14.0	21.20 ± 7.21 ^{***}	18.97 ± 6.30 [*]
滋肾饮中剂量组	7.0	22.14 ± 6.32 ^{***}	19.17 ± 7.28 [*]
滋肾饮低剂量组	3.5	22.14 ± 5.36 ^{***}	24.54 ± 4.18

注:与正常组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$

Note: vs. normal group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$; vs. model control group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$

3.3 各组大鼠血清胰岛素含量测定结果

与正常组比较,模型组大鼠血清胰岛素含量显著降低($P<0.01$);与模型组比较,二甲双胍组和滋脾饮高剂量组大鼠血清胰岛素含量均显著升高($P<0.01$)。各组大鼠血清胰岛素含量测定结果见表4。

表4 各组大鼠血清胰岛素含量测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)
Tab 4 Content determination of serum insulin in rats of each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量,g/kg	胰岛素含量,mU/L
正常组		0.642±0.030
模型组		0.595±0.046 [#]
二甲双胍组	0.2	0.702±0.088 ^{**}
滋脾饮高剂量组	14.0	0.661±0.043 ^{**}
滋脾饮中剂量组	7.0	0.624±0.056
滋脾饮低剂量组	3.5	0.641±0.066

注:与正常组比较,[#] $P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$

Note: vs. normal group,[#] $P<0.01$;vs. model group,^{**} $P<0.01$

3.4 各组大鼠胰腺组织中JNK、Akt、IRS-1 mRNA的测定结果

与正常组比较,模型组大鼠胰腺组织中JNK mRNA的表达水平显著升高($P<0.01$),Akt、IRS-1 mRNA的表达水平显著降低($P<0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠胰腺组织中JNK mRNA的表达水平均显著降低($P<0.01$),Akt、IRS-1 mRNA的表达水平均显著升高($P<0.01$)。各组大鼠胰腺组织中JNK、Akt、IRS-1 mRNA的测定结果见表5。

表5 各组大鼠胰腺组织中JNK、Akt、IRS-1 mRNA的测定结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 5 mRNA expression of JNK, Akt and IRS-1 in pancreatic tissue of rats of each group($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量,g/kg	相对表达量		
		JNK mRNA	Akt mRNA	IRS-1 mRNA
正常组		0.49±0.03	2.67±0.23	2.13±0.21
模型组		1.00±0.03 [#]	1.00±0.03 [#]	1.00±0.05 [#]
二甲双胍组	0.2	0.63±0.06 ^{**}	2.06±0.33 ^{**}	1.78±0.16 ^{**}
滋脾饮高剂量组	14.0	0.61±0.07 ^{**}	2.31±0.20 ^{**}	1.50±0.13 ^{**}
滋脾饮中剂量组	7.0	0.79±0.06 ^{**}	1.35±0.16 ^{**}	1.40±0.11 ^{**}
滋脾饮低剂量组	3.5	0.90±0.06 ^{**}	0.98±0.04	1.07±0.04 ^{**}

注:与正常组比较,[#] $P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$

Note: vs. normal group,[#] $P<0.01$;vs. model group,^{**} $P<0.01$

3.5 各组大鼠胰腺组织中JNK、Akt、IRS-1蛋白及其磷酸化测定结果

与正常组比较,模型组大鼠胰腺组织中JNK、IRS-1蛋白的磷酸化程度显著升高($P<0.01$),而Akt蛋白的磷酸化程度显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,滋脾饮高剂量组及二甲双胍组大鼠胰腺组织中JNK和IRS-1蛋白的磷酸化程度显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而Akt蛋白的磷酸化程度显著升高($P<0.01$)。各组大鼠胰腺组织中JNK、Akt、IRS-1蛋白及其磷酸化蛋白表达的电泳图见图1,各组大鼠胰腺组织中JNK、Akt、IRS-1蛋白及其磷酸化蛋白的测定结果见表6。

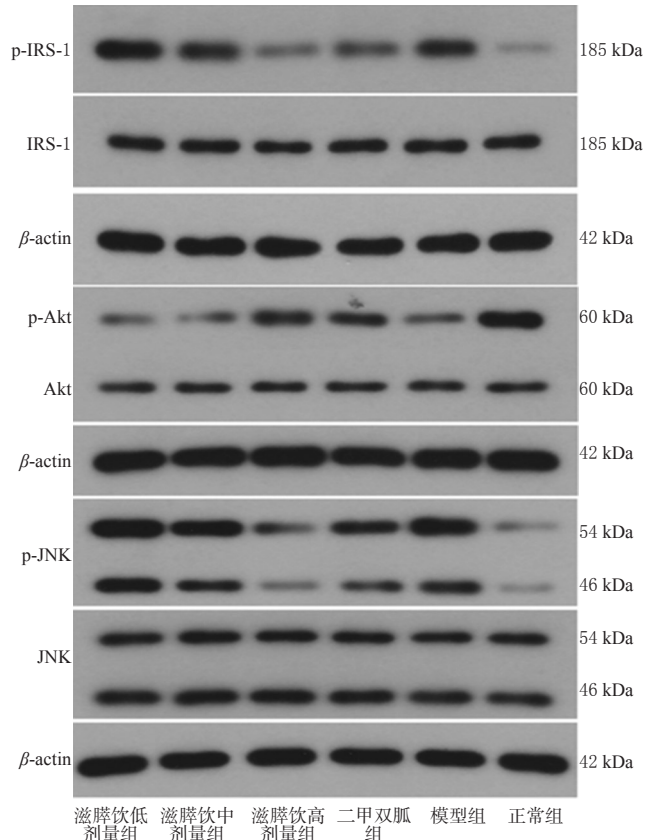


图1 各组大鼠胰腺组织中JNK、Akt、IRS-1蛋白及其磷酸化蛋白表达的电泳图

Fig 1 Electrophoretogram of JNK, Akt, IRS-1 protein expression and their phosphorylated proteins in pancreatic tissue of rats of each group

表6 各组大鼠胰腺组织中JNK、Akt、IRS-1蛋白及其磷酸化蛋白的测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 6 Protein expression and phosphorylation of JNK, Akt, IRS-1 in pancreatic tissue of rats of each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量,g/kg	磷酸化程度		
		p-JNK/JNK	p-Akt/AKT	p-IRS-1/IRS-1
正常组		0.42±0.05	1.56±0.14	0.51±0.10
模型组		1.40±0.13 [#]	0.55±0.08 [#]	1.42±0.20 [#]
二甲双胍组	0.2	0.84±0.07 ^{**}	1.07±0.15 ^{**}	0.85±0.07 ^{**}
滋脾饮高剂量组	14.0	0.49±0.07 ^{**}	1.35±0.12 ^{**}	0.74±0.11 [*]
滋脾饮中剂量组	7.0	1.32±0.18	0.71±0.18	1.27±0.09
滋脾饮低剂量组	3.5	1.48±0.14	0.63±0.06	1.52±0.08

注:与正常组比较,[#] $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$

Note: vs. normal group,[#] $P<0.01$;vs. model group,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$

0.01

4 讨论

糖尿病属于中医“消渴”范畴,多由饮食失节、情志失调、劳累过度等因素所致,其主要病机为阴津亏损、燥热偏胜,临床表现为多食、多饮、多尿、消瘦、乏力的症状^[1]。滋脾饮方由生黄芪、生地、生山药、山茱萸、生猪胰腺组成,方中重用黄芪助脾运以升清,助肾之气化与封

藏以固摄精微;生地滋阴,助肾中之阴上潮以润肺;山药健脾益气,使脾气旺而阴自升,与生地合用共奏养阴生津之功;山茱萸封固肾关,益肾收敛,以助生地山药敛阴生津;猪胰脏以脏补脏,为血肉有情之品,重补脾胰且能润肺升水以止渴,诸药合用共奏益气养阴、清热生津之功^[22]。

本研究发现,模型组大鼠血清胰岛素含量低于正常组,滋脾饮干预后,大鼠血清胰岛素的含量高于模型组,说明滋脾饮能够刺激胰岛细胞分泌胰岛素。模型组大鼠 JNK mRNA 的表达水平高于正常组, Akt、IRS-1 mRNA 的表达水平低于正常组,滋脾饮干预后, JNK mRNA 的表达低于模型组,提示滋脾饮能够抑制 JNK mRNA 的表达。IRS 是胰岛素信号转导途径中的重要上游分子,其表达水平的下降可使胰岛素信号转导减弱,从而导致胰岛素的效能降低^[23]。本实验结果表明,与模型组大鼠比较,滋脾饮干预后大鼠 Akt、IRS-1 mRNA 的相对表达量均高于模型组大鼠,提示滋脾饮能够上调大鼠 Akt、IRS-1 mRNA 的表达水平从而增强胰岛素信号的转导,提升胰岛素的效能。与模型组比较,滋脾饮干预后, JNK、IRS-1 蛋白的磷酸化程度低于模型组; Akt 蛋白的磷酸化程度高于模型组,提示滋脾饮能够阻碍 JNK 信号的激活,上调 IRS-1 mRNA 表达,降低 IRS-1 蛋白的表达,从而促进胰岛素与其受体结合,提高 IRS-1 mRNA 表达和 IRS-1 磷酸化进程,增强 Akt 的活化,增强胰岛素分泌水平,从而达到了降血糖的目的。

综上所述,滋脾饮能够降低 2 型糖尿病大鼠的血糖水平,其机制可能与抑制 JNK 信号通路的激活,降低 JNK、IRS-1 蛋白磷酸化程度和上调 Akt 蛋白磷酸化程度有关。

参考文献

[1] 罗泽萍,李丽,潘立卫,等.桑寄生醇提物改善 2 型糖尿病模型小鼠血糖水平及其肝肾并发症的作用及机制研究[J].中国药房,2019,30(6):796-801.

[2] 徐划萍,陆大江. 2 型糖尿病患者有氧踏车运动干预的疗效[J].中国老年学杂志,2011,21(11):1982-1983.

[3] CHO NH, SHAW JE, KARURANGA S, et al. IDF diabetes atlas: global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2018. DOI:10.1016/j.diabres.2018.02.023.

[4] 孙丰卉,王秋虹,邱宗林,等.中医药治疗 2 型糖尿病胰岛素抵抗的机制研究进展[J].医学综述,2018,24(20):4068-4077.

[5] 刘颖慧,牟新,周迪夷,等.基于 JNK 信号通路探讨桑叶有效成分改善胰岛素抵抗的机制研究[J].中国中药杂志,2019,44(5):1019-1025.

[6] AGUIRRE V, UCHIDA T, YENUSH L, et al. The c-Jun NH₂-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser 307[J]. *J Biol Chem*, 2000. DOI: 10.1074/

jbc.275.12.9047.

[7] SHOTAMISLIGIL GS. The role of TNF alpha in adipocyte metabolism[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 1999. DOI: 10.1006/scdb.1998.0273.

[8] BODEN G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM[J]. *Diabetes*, 1997, 46(1): 3-10.

[9] 马艳佳.电针对 T2DM 大鼠血清 SOD、MDA 以及骨骼肌 JNK1-IRS1 含量影响的实验研究[D].北京:北京中医药大学,2017.

[10] 郑南,谢宁,张佩青,等.御唐丸对糖尿病大鼠胰腺组织 IRS-1 基因表达和蛋白磷酸化的影响[J].中国医药导报,2018,15(30):11-18.

[11] ROPER MG, QIAN WJ, ZHANG BB, et al. Effect of the insulin mimetic L-783, 281 on intracellular Ca²⁺ and insulin secretion from pancreatic beta-cells[J]. *Diabetes*, 2002. DOI:10.2337/diabetes.51.2007.s43.

[12] KANETO H, XU G, SONG KH, et al. Activation of the hexosamine pathway leads to deterioration of pancreatic beta cell function through the induction of oxidative stress[J]. *Bio Chem*, 2001. DOI: 10.1074/jbc.M104115200.

[13] 张思敏,韩学尧,纪立农.二甲双胍治疗 2 型糖尿病的药物基因组学研究进展[J].中国糖尿病杂志,2017,25(8):760-764.

[14] 谢红艳,谢春光,高泓.中药复方对 2 型糖尿病血管病变患者 hsCRP、IL-6 的影响[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(10):209-212.

[15] 张锡纯.《医学衷中参西录》[M].石家庄:河北人民出版社,1974:158.

[16] 黄美珍.滋脾饮加味治疗 II 型糖尿病 46 例疗效观察[J].四川中医,2002,20(7):397-401.

[17] 郭乃刚,黄福斌.自拟术兰滋脾饮治疗无自觉症状 2 型糖尿病 32 例[J].四川中医,2013,31(10):91-93.

[18] 许冬霞.滋脾饮对 2 型糖尿病大鼠胰岛病理结构的影响[J].实用中医药杂志,2018,34(2):138-140.

[19] 陆少君,曾伟斌,臧林泉. 2 型糖尿病大鼠模型制备实验研究[J].广东药科大学学报,2017,33(5):624-628.

[20] 秦合伟,刘萍.冠心病抗动脉粥样硬化作用机制与 SDF-1/CX-CR4 生物轴失衡相关性的研究[J].中华中医药杂志,2014,29(5):1558-1562.

[21] 张志鑫,李彦杰,秦合伟,等.基于 P13K/Akt/m TOR 信号通路调控巨噬细胞自噬探讨黄芪甲苷抗动脉粥样硬化的作用机制[J].中草药,2017,48(17):3575-3581.

[22] 冯觉平,陈继贵,袁响林,等.氟尿嘧啶对大鼠血糖代谢及胰腺病理结构的影响[J].中华胃肠外科杂志,2010,13(12):935-938.

[23] 于淼,朴春丽,南征.解毒通络调肝散对实验性糖尿病大鼠肝脏 IRS-2 表达的影响[J].中国实用医药,2010,5(28):105-107.

(收稿日期:2019-05-26 修回日期:2019-08-01)

(编辑:唐晓莲)