

滋肾清肝方对 2 型糖尿病模型大鼠的药效及作用机制

田春雨^{1,2*}, 薄海美¹, 曹岩³, 杨雨暘^{1,2}, 喇孝瑾^{1,2}, 郭兰¹,
贾永森^{1,2}, 李继安^{1,2}, 李洁¹, 张碧激¹, 徐雪梅¹

¹华北理工大学; ²河北省中医药防治糖尿病药理分析重点实验室, 唐山 063210;

³唐山市中医医院, 唐山 063000

摘要: 主要研究滋肾清肝方对 2 型糖尿病模型大鼠的药效及作用机制, 为其临床应用及开发奠定基础, 将符合 2 型糖尿病成模标准的大鼠随机分为模型组、二甲双胍组、滋肾清肝方高中低剂量组, 给药 8 周, 观察滋肾清肝方对模型大鼠饮食、体重、空腹血糖、糖耐量、糖化血红蛋白、C-肽、胰高血糖素样肽-1、糖化血清蛋白、胰岛素的影响, Western blot 测定肝组织 AKT、p-AKT、GSK-3 β 、p-GSK-3 β 及骨骼肌组织 p-IRS-1、IRS-1、Glut4 的表达; 结果表明滋肾清肝方可调节 2 型糖尿病模型大鼠糖代谢紊乱, 改善胰岛素抵抗, 调节骨骼肌 PI3K/AKT、肝脏 AKT/GSK-3 β 信号转导通路可能是滋肾清肝方治疗 2 型糖尿病的作用机制。

关键词: 滋肾清肝方; 2 型糖尿病; 药效; 作用机制

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.11.007

Effect and Mechanism of Zishenqinggan Prescription on Type 2 Diabetes Model Rat

TIAN Chun-yu^{1,2*}, BO Hai-mei¹, CAO Yan³, YANG Yu-yang^{1,2}, LA Xiao-jin^{1,2},
GUO Lan¹, JIA Yong-sen^{1,2}, LI Ji-an^{1,2}, LI Jie¹, ZHANG Bi-wei¹, XU Xue-mei¹

¹North China University of Science and Technology; ²Pharmacology Analysis

Key Laboratory for Prevention and Treatment of Diabetes of Traditional Chinese Medicine in Hebei Province, Tangshan 063210, China; ³Tangshan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Tangshan 063000, China

Abstract: This study is to investigate the effect and mechanism of Zishenqinggan prescription (ZSQG) on the treatment of type 2 diabetes, and lay the foundation for its clinical application and further development. T2DM model rats were randomly divided into model group, metformin group, high, middle, low dose of ZSQG group. The effect of ZSQG on body weight, food intake, water intake, urine, stool, blood glucose, OGTT, HbA1c, C-peptide, GLP-1 content, GSP, insulin of rats was studied; Western blot was used to detect AKT, p-AKT, GSK-3 β , p-GSK-3 β expression in liver tissue and to detect p-IRS-1, IRS-1, Glut4 expression in skeletal muscle tissue. ZSQG can effectively regulate sugar metabolic disorders in type 2 diabetic model rat, improve insulin resistance; enhance insulin secretion, regulate skeletal muscle PI3K/AKT, regulate liver AKT/GSK-3 β signaling pathway, which may be the mechanism of ZSQG for the treatment of type 2 diabetes and to improve insulin resistance.

Key words: Zishenqinggan prescription; type 2 diabetes mellitus; effect; mechanism

中医学认为 2 型糖尿病属于“消渴病”的范畴, 其基本病机为“阴虚为本, 燥热为标”, 临床上针对肝肾阴虚、阳热偏亢证候的 2 型糖尿病患者我们采用滋肾清肝方获得了较好的疗效。滋肾清肝方以滋肾清肝、养阴泻浊为组方原则, 切中糖尿病肝肾阴

虚、肝阳偏亢的病机, 由制首乌、桑椹、桑叶、决明子(3:2:2:1)组成, 制首乌微温, 味甘、涩, 补肝肾、益精血, 为君药; 桑椹, 味甘, 寒, 益肾、滋阴, 为臣药; 桑叶, 苦甘而寒, 清肝、润燥, 止消渴, 决明子甘、苦、咸, 微寒, 清肝明目、润肠通便, 二药为佐使药, 前期对其化学成分及药理作用做了初步研究^[1-4], 本实验主要研究滋肾清肝方对 GK(Goto-Kakizaki)大鼠体重情况、饮食及饮水量、二便情况、空腹血糖(FBG)、糖耐量测定(OGTT)、糖化血红蛋白(HbA1c)、C-肽(C-

收稿日期: 2017-06-20 接受日期: 2017-08-02

基金项目: 科技部国际科技合作项目(2008DFA31050); 河北省中医药管理局科研计划(2016070)

* 通信作者 E-mail: tcy4479@sina.com

peptide, C-P)、胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 含量、糖化血清蛋白 (GSP)、胰岛素 (Insulin)、Western blot 测定肝组织 AKT、p-AKT、GSK-3 β 、p-GSK-3 β 的表达, Western blot 测定骨骼肌组织 PTP1B、p-IRS-1、IRS-1、Glut4 表达的影响, 初步探讨其作用机制。

1 材料与仪器

1.1 试剂、试药

二甲双胍片 (批号: 1407117, 上海施贵宝制药); 三诺血糖试纸 (批号: 2429EN, 三诺公司); HbA1c 检测试剂盒 (批号: 10174006, Norway Axis-shield 公司); GLP-1 试剂盒 (批号: 20150304) 及 GSP 试剂盒 (批号: 20150119) 购自南京建成; C-肽测定试剂盒 (批号: 20150401A, 北京凯诺公司); AKT 一抗 (批号: 14103020)、GSK-3 β 一抗 (批号: 15030920) 购自沈阳万类公司; p-AKT1 一抗 (批号: CJ00101)、p-GSK-3 β 一抗 (批号: CA36131)、PTP1B 一抗 (批号: 11334-1-AP)、Glut 4 一抗 (批号: CJ44121) 均购自 Bioworld 公司; IRS1 一抗 (批号: GR184267-7, Abcam 公司)。制何首乌、桑椹、桑叶、决明子饮片购于唐山市同仁堂药店, 经李继安教授鉴定。

1.2 主要仪器

瑞士 TECAN 公司 M200PRO 酶标仪, 三诺生物公司安稳型血糖仪, 挪威 Nyco II 糖化血红蛋白检测仪, 美国博瑞德 Mini-Protein System 垂直电泳槽。

1.3 动物

SPF 雄性 Wistar 大鼠 (280 \pm 10) g, SPF 雄性 GK (Goto-Kakizaki) 大鼠 (280 \pm 10) g, 上海斯莱克实验动物有限责任公司, 合格证编号 2007000577866, 动物许可证号 SCXK(沪)2012-0002。

2 实验方法

2.1 动物分组与给药

GK 大鼠适应性饲养 1 周后, 给予高脂、高糖饲料喂养 4 周, 以空腹血糖 \geq 11.1 mmol/L、随机血糖 \geq 16.7 mmol/L 为 2 型糖尿病成模标准。将成模的 GK 大鼠随机分为 5 组, 模型组 10 只 (灌胃生理盐水); 滋肾清肝方高、中、低剂量组各 10 只 (分别灌胃滋肾清肝方提取物 1200、600、300 mg/kg), 二甲双胍组 10 只 (灌胃, 85 mg/kg), 连续给药 8 周, Wistar 雄性大鼠 10 只, 作为正常对照组。

2.2 滋肾清肝方提取物加工方法

称取滋肾清肝方中药饮片 (制首乌: 桑椹: 桑叶: 决明子 3: 2: 2: 1), 加 10 倍量 80% 乙醇回流提取 3 次, 每次 2 h, 乙醇提取液经过回收乙醇, 得到复方醇提物; 药材再加 10 倍量水加热提取 2 次, 每次 2 h, 浓缩后得到复方的水提物, 水提物与醇提物混合, 喷雾干燥, 制得复方提取物, 动物灌胃给药时用纯净水制成混悬液。

2.3 检测指标与方法

2.3.1 基本指标的检测方法

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; 使用血糖仪测定各组大鼠空腹血糖 (FBG); 采用 HbA1c 检测仪检测; 实验结束前禁食不禁水 10 h 后, 用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠, 从腹主动脉取血 6 mL, 离心分离血清 (3000 rpm, 15 min), 按照试剂盒说明书测定 C-肽 (C-peptide, C-P)、胰高血糖素样肽-1 (GLP-1)、糖化血清蛋白 (GSP)、胰岛素, 同时冻存肝、骨骼肌供 Western blot 实验使用^[5-7]。

2.3.2 Western blot 测定肝组织 AKT、p-AKT、GSK-3 β 、p-GSK-3 β 的表达

取 120 mg 大鼠的肝组织, 匀浆后, 加入 1 mL Western 及 IP 细胞裂解液, 测定蛋白浓度。取 50 μ g 蛋白, 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 AKT、p-AKT、GSK-3 β 、p-GSK-3 β 一抗中, 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, Bio-Rad Image Lab 软件分析。

2.3.3 Western blot 测定骨骼肌组织 PTP1B、p-IRS-1、IRS-1、Glut4 表达

取 120 mg 大鼠肌肉, 方法同 2.3.2, 然后将 PMSF 膜置于 p-IRS-1、IRS-1、PTP1B、Glut4 一抗中, 放入 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 化学发光试剂盒显色, Bio-Rad Image Lab 软件分析。

2.4 数据分析

采用 SPSS 21.0 软件分析数据, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组组间比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组大鼠的一般状况

正常组的大鼠状态良好,皮毛有光泽,饮食、尿量正常、体重增加,粪便呈麦粒状;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,滋肾清肝方组以上情况均有所缓解或改善。

3.1.1 滋肾清肝方对 T2DM 大鼠体重情况及饮食、饮水量的影响

给药前,各组大鼠的体重、饮食及饮水量无显著性差异;与正常组比较,模型组大鼠饮水量显著提高($P < 0.05$);4周后,与正常组比较,模型组大鼠体重均显著降低($P < 0.05$);8周后,与正常组比较,模型组大鼠体重、饮食及饮水量均出现显著性差异($P < 0.05, P < 0.01$),模型组大鼠体重显著降低,饮食及饮水量显著升高;与模型组比较,滋肾清肝方各剂量组在一定程度上能够缓解2型糖尿病大鼠多饮、多食及体重减轻的状况($P < 0.05, P < 0.01$)。

表1 滋肾清肝方对大鼠体重均重、饮食饮水量的影响($n = 10, \bar{x} \pm s$)

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

组别 Group	给药前 Before administration			给药4周后 4 weeks after administration			给药8周后 8 weeks after administration		
	体重 Body weight (g)	饮食 Food-intake (g/kg body weight)	饮水 Water-intake (mL/kg body weight)	体重 Body weight (g)	饮食 Food-intake (g/kg body weight)	饮水 Water-intake (mL/kg body weight)	体重 Body weight (g)	饮食 Food-intake (g/kg body weight)	饮水 Water-intake (mL/kg body weight)
模型组 Model group	352.50 ± 15.28	67.27 ± 2.85	100.47 ± 3.78	405.12 ± 17.11	66.75 ± 2.74	151.18 ± 6.85 ^{##}	370.66 ± 16.28 ^{##}	75.99 ± 2.63 [#]	168.83 ± 7.25 ^{##}
二甲双胍组 Metformin group	360.33 ± 14.25	73.86 ± 2.98	61.05 ± 2.74	396.25 ± 14.28	58.04 ± 2.41	78.86 ± 3.28 ^{**}	414.83 ± 18.78 ^{**}	57.74 ± 2.02 [*]	87.65 ± 3.38 ^{**}
滋肾清肝方高剂量组 High dose of ZSQG group	356.77 ± 14.36	74.80 ± 2.27	76.30 ± 2.58	364.24 ± 12.85 [*]	70.65 ± 2.85	106.76 ± 4.25 ^{**}	406.17 ± 16.75 [*]	54.12 ± 2.78 ^{**}	98.48 ± 4.28 [*]
滋肾清肝方中剂量组 Middle dose of ZSQG group	377.22 ± 13.28	61.37 ± 2.07	67.74 ± 2.10	396.72 ± 15.27	58.04 ± 2.79	84.02 ± 3.54 [*]	422.27 ± 19.28 ^{**}	57.72 ± 2.63 [*]	92.09 ± 3.58 ^{**}
滋肾清肝方低剂量组 Low dose of ZSQG group	351.10 ± 12.58	72.43 ± 1.78	80.72 ± 2.46	382.76 ± 14.86 [*]	74.52 ± 1.95	139.33 ± 6.41 [#]	393.80 ± 16.792 ^{#*}	71.66 ± 2.85 [#]	126.96 ± 5.28 [#]
正常组 Control group	358.95 ± 11.78	71.18 ± 2.12	72.53 ± 2.42	432.88 ± 18.48	70.85 ± 2.56	88.25 ± 3.85 [*]	498.88 ± 21.27 ^{**}	63.01 ± 2.57 [*]	98.21 ± 4.27 ^{**}

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: Compared with control group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; Compared with model group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$.

表2 滋肾清肝方对模型大鼠排尿量(urine output, mL/kg 体重)、排便量(defecation, g/kg 体重)的影响($n = 10, \bar{x} \pm s$)

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

组别 Group	Urine output (mL/kg body weight)	Defecation (g/kg body weight)
正常组 Control group	48.86 ± 2.21	1.58 ± 0.07
模型组 Model group	83.22 ± 4.41 ^{##}	3.46 ± 0.12 [#]
滋肾清肝方高剂量组 High dose of ZSQG group	56.05 ± 2.63 [*]	1.99 ± 0.08 [*]
滋肾清肝方中剂量组 Middle dose of ZSQG group	59.25 ± 2.78 [*]	2.60 ± 0.06 [*]
滋肾清肝方低剂量组 Low dose of ZSQG group	79.17 ± 3.96 [#]	3.30 ± 0.09
二甲双胍组 Metformin group	43.77 ± 2.07 ^{**}	1.63 ± 0.05 [*]

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: Compared with control group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; Compared with model group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$.

3.1.2 滋肾清肝方对 T2DM 大鼠二便的影响

给药 8 周后,与正常组比较,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,滋肾清肝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($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

3.2 滋肾清肝方对 T2DM 大鼠 FBG、HbA1c 的影响

与正常组比较,模型组大鼠 FBG、HbA1c 增高($P < 0.01$, $P < 0.05$);给药 8 周后,与模型组比较,滋肾清肝方各剂量组均可降低 2 型糖尿病模型 GK 大鼠 FBG、HbA1c 水平,以滋肾清肝方高剂量组效果较好($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

表 3 滋肾清肝方对模型大鼠 FBG、HbA1c 的影响($n = 10, \bar{x} \pm s$)
Table 3 Effect of ZSQG on FBG and HbA1c in each group ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	0 d FBG (mmol/L)	28 d FBG (mmol/L)	28 d HbA1c (%)	56 d FBG (mmol/L)	56 d HbA1c (%)
正常组 Control group	4.98 ± 0.25	5.01 ± 0.26	3.69 ± 0.20	5.12 ± 0.30	3.52 ± 0.18
模型组 Model group	15.18 ± 1.87 ^{##}	19.08 ± 2.48 ^{##}	6.04 ± 0.57 [#]	21.33 ± 3.52 ^{##}	6.82 ± 0.37 [#]
滋肾清肝方低剂量组 Low dose of ZSQG group	15.68 ± 1.78 ^{##}	12.11 ± 2.45 ^{##*}	5.38 ± 0.46 ^{##}	13.08 ± 1.26 ^{##*}	5.30 ± 0.25 ^{##}
滋肾清肝方中剂量组 Middle dose of ZSQG group	16.02 ± 2.01 ^{##}	10.25 ± 1.19 ^{##*}	5.06 ± 0.52 ^{##}	9.52 ± 1.43 ^{##*}	5.02 ± 0.21 ^{##}
滋肾清肝方高剂量组 High dose of ZSQG group	15.96 ± 2.14 ^{##}	7.58 ± 1.62 ^{**}	4.92 ± 0.65 [*]	7.12 ± 1.04 ^{**}	4.85 ± 0.18 [*]
二甲双胍组 Metformin group	16.01 ± 1.88 ^{##}	6.17 ± 1.27 ^{**}	4.86 ± 0.93 [*]	6.22 ± 1.15 ^{**}	4.70 ± 0.24 [*]

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: Compared with control group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; Compared with model group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$.

3.3 滋肾清肝方对 T2DM 大鼠 OGTT 的影响

正常组大鼠灌服葡萄糖后 120 min 血糖水平基本恢复正常,模型组各时段血糖值均较正常组明显升高,120 min 时血糖值未明显减低。给药 8 周后,

与正常组相比,模型组大鼠的 AUC 显著升高($P < 0.01$);与模型组相比,滋肾清肝方可显著降低 2 型糖尿病大鼠 AUC($P < 0.01$),以滋肾清肝方高剂量组效果较好($P < 0.01$)。

表 4 给药 8 周后滋肾清肝方对 T2DM 大鼠 OGTT 的影响($n = 10, \bar{x} \pm s, \text{mmol/L}$)

Table 4 Effect of ZSQG prescription on OGTT in each group 8 weeks after administration ($n = 10, \bar{x} \pm s, \text{mmol/L}$)

组别 Group	0 min (mmol/L)	30 min (mmol/L)	60 min (mmol/L)	120 min (mmol/L)	AUC (mmol/L/h)
正常组 Control group	5.12 ± 0.30	7.51 ± 0.28	6.90 ± 0.82	5.23 ± 0.55	12.82 ± 0.47
模型组 Model group	21.33 ± 3.52 ^{##}	23.82 ± 1.22 ^{##}	25.69 ± 1.48 ^{##}	23.26 ± 1.35 ^{##}	48.14 ± 2.77 ^{##}
滋肾清肝方低剂量组 Low dose of ZSQG group	13.08 ± 1.26 ^{##*}	15.22 ± 1.97 ^{##**}	10.33 ± 1.85 ^{##**}	9.22 ± 1.51 ^{##**}	23.24 ± 1.78 ^{##**}
滋肾清肝方中剂量组 Middle dose of ZSQG group	9.52 ± 1.43 ^{##*}	11.58 ± 1.91 ^{##**}	9.89 ± 1.76 ^{##**}	9.01 ± 1.85 ^{##**}	20.09 ± 2.11 ^{##**}
滋肾清肝方高剂量组 High dose of ZSQG group	7.12 ± 1.04 ^{**}	8.25 ± 1.78 ^{**}	8.51 ± 1.57 ^{##**}	7.38 ± 1.81 ^{**}	15.97 ± 1.99 ^{**}
二甲双胍组 Metformin group	6.22 ± 1.15 ⁴⁾	7.52 ± 1.46 ⁴⁾	8.15 ± 1.13 ^{1,4)}	7.07 ± 1.30 ⁴⁾	14.96 ± 1.75 ⁴⁾

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: Compared with control group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; Compared with model group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$.

3.4 滋肾清肝方对 T2DM 大鼠空腹 C-P 及 Homa-IR 指数的影响

与正常组比较,模型组大鼠 C-P 水平显著降低

($P < 0.05$),Homa-IR 显著升高($P < 0.05$);与 2 型糖尿病模型组比较,滋肾清肝方各剂量组可显著提高 C-P 水平($P < 0.05$),降低 Homa-IR($P < 0.05$)。

3.5 滋肾清肝方对 T2DM 大鼠 GLP-1、血清胰岛素、GSP 的影响

与正常组比较,模型大鼠的 GLP-1 含量显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,滋肾清肝方各剂量组均能促进 2 型糖尿病模型大鼠 GLP-1 的分泌,显著提高其含量($P < 0.05, P < 0.01$)。与正常组比较,模型大鼠血清胰岛素、GSP 显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,滋肾清肝方各剂量组均能降低 2 型糖尿病大鼠血清胰岛素、糖化血清蛋白($P < 0.05, P <$

0.01),其中滋肾清肝方高剂量组效果较好。

3.6 Western blot 测定肝组织 AKT、p-AKT、GSK-3 β 、p-GSK-3 β 的表达

与正常组比较,模型组大鼠肝脏组织 AKT、p-AKT 显著降低,GSK-3 β 、p-GSK-3 β 的表达显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,滋肾清肝方组肝组织 AKT、p-AKT 的表达量显著升高,GSK-3 β 、p-GSK-3 β 的表达量显著降低($P < 0.01, P < 0.05$)。

表 5 给药 8 周后滋肾清肝方对模型大鼠 C-P、Homa-IR、GLP-1、Insulin、GSP 的影响($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Table 5 Effect of ZSQG on C-P, Homa-IR, GLP 1, Insulin, GSP after 8 weeks administration ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	C-P (pg/mL)	Homa-IR	GLP-1 (nmol/L)	Insulin (mU/L)	GSP (mmol/L)
正常组 Control group	232.25 ± 10.69	0.4252 ± 0.0016	908.55 ± 55.72	420.52 ± 10.11	1.38 ± 0.14
模型组 Model group	190.6 ± 16.82 [#]	1.4515 ± 0.0102 [#]	502.32 ± 38.99 ^{##}	687.78 ± 21.78 ^{##}	1.78 ± 0.08 ^{##}
滋肾清肝方低剂量组 Low dose of ZSQG group	216.47 ± 12.62	1.0118 ± 0.0122	735.62 ± 50.25 [*]	562.15 ± 20.71 [*]	1.60 ± 0.10 [*]
滋肾清肝方中剂量组 Middle dose of ZSQG group	228.96 ± 15.38	0.7790 ± 0.0097 [*]	835.96 ± 40.52 ^{**}	548.63 ± 23.65 [*]	1.57 ± 0.11 [*]
滋肾清肝方高剂量组 High dose of ZSQG group	240.25 ± 16.85 [*]	0.6115 ± 0.0108 [*]	851.93 ± 48.71 ^{**}	488.67 ± 16.88 ^{**}	1.48 ± 0.07 ^{**}
二甲双胍组 Metformin group	245.21 ± 15.27 [*]	0.5453 ± 0.0078 [*]	866.07 ± 45.38 ^{**}	478.56 ± 18.34 ^{**}	1.45 ± 0.09 ^{**}

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: Compared with control group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; Compared with model group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$.

表 6 各组大鼠肝脏 AKT、p-AKT、GSK-3 β 、p-GSK-3 β 相对表达量的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Comparisons of AKT, p-AKT, GSK-3 β , p-GSK-3 β protein content in liver of rats from each group ($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	AKT/GAPDH	p-AKT/AKT	GSK3 β /GAPDH	P-GSK3 β /GSK3 β
正常组 Control group	3.68 ± 0.16 ^{**}	0.73 ± 0.03 ^{**}	1.52 ± 0.05 ^{**}	0.56 ± 0.02 [*]
模型组 Model group	1.83 ± 0.08 ^{##}	0.17 ± 0.01 ^{##}	2.79 ± 0.11 ^{##}	0.33 ± 0.01 [#]
二甲双胍组 Metformin group	2.70 ± 0.12 ^{**}	0.41 ± 0.02 ^{**}	1.75 ± 0.07 ^{**}	0.42 ± 0.02 [*]
滋肾清肝方高剂量组 High dose of ZSQG group	2.45 ± 0.11 ^{**}	0.39 ± 0.01 ^{**}	1.80 ± 0.06 ^{**}	0.41 ± 0.02 [*]
滋肾清肝方中剂量组 Middle dose of ZSQG group	2.05 ± 0.10 [*]	0.30 ± 0.02 ^{**}	1.79 ± 0.05 ^{**}	0.36 ± 0.01
滋肾清肝方低剂量组 Low dose of ZSQG group	1.96 ± 0.09 [#]	0.28 ± 0.01 [*]	1.70 ± 0.04 ^{**}	0.34 ± 0.01

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: Compared with control group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; Compared with model group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$.

3.7 Western blot 测定骨骼肌组织 PTP1B、p-IRS-1、IRS-1、Glut4 表达

与正常组比较,模型组大鼠的 PTP1B 在骨骼肌中的表达显著增加($P < 0.01$);与模型组比较,滋肾

清肝方组骨骼肌 PTP1B 的表达显著降低($P < 0.01, P < 0.05$)。

与正常组比较,模型大鼠骨骼肌 IRS-1、p-IRS-1、GLUT4 的表达量显著降低($P < 0.01$),骨骼肌中

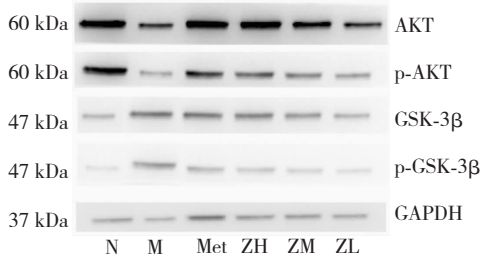


图1 各组大鼠肝组织 AKT、p-AKT、GSK-3 β 、p-GSK-3 β 蛋白的表达

Fig. 1 The expression of AKT, p-AKT, GSK-3 β , p-GSK-3 β in liver of each group

PTP1B 的表达量显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 滋肾清肝方大鼠骨骼肌中 p-IRS-1、GLUT4 的表达量显著升高 ($P < 0.01, P < 0.05$)。

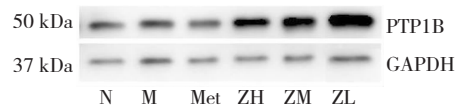


图2 滋肾清肝方对大鼠骨骼肌 PTP1B 表达的影响

Fig. 2 PTP1B expression in skeletal muscle of rats from each group

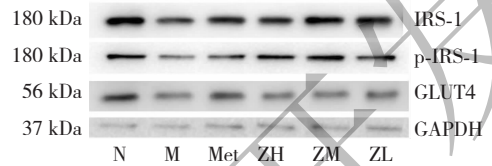


图3 骨骼肌 IRS-1、p-IRS-1、Glut4 的表达

Fig. 3 Protein expression of IRS-1, p-IRS-1, Glut4 in skeletal muscle of each group

表7 大鼠骨骼肌 PTP1B、IRS-1、p-IRS-1、Glut-4 蛋白相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 7 Comparisons of PTP1B, IRS-1, p-IRS-1, Glut-4 protein content in skeletal muscle of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	PTP1B/GAPDH	IRS-1/GAPDH	p-IRS-1/IRS-1	GLUT4/GAPDH
正常组 Control group	1.13 \pm 0.05 **	3.89 \pm 0.15 **	0.72 \pm 0.03 **	3.32 \pm 0.14 **
模型组 Model group	4.02 \pm 0.18 ##	1.02 \pm 0.05 ##	0.20 \pm 0.01 ##	1.10 \pm 0.05 ##
二甲双胍组 Metformin group	1.21 \pm 0.06 **	2.58 \pm 0.10 **	0.51 \pm 0.02 **	2.41 \pm 0.11 **
滋肾清肝方低剂量组 Low dose of ZSQ group	2.05 \pm 0.10 # *	2.05 \pm 0.09 # *	0.38 \pm 0.01 # *	1.83 \pm 0.09 # *
滋肾清肝方中剂量组 Middle dose of ZSQ group	1.78 \pm 0.07 **	2.34 \pm 0.09 *	0.46 \pm 0.02 **	2.11 \pm 0.10 **
滋肾清肝方高剂量组 High dose of ZSQ group	1.25 \pm 0.05 **	2.56 \pm 0.11 **	0.52 \pm 0.02 **	2.40 \pm 0.13 **

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: Compared with control group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; Compared with model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

4 讨论与结论

GK (Goto-Kakizaki) 大鼠是典型的 2 型糖尿病实验动物模型, 具有明显的糖代谢紊乱及胰岛素抵抗的特点。本实验证实滋肾清肝方可显著降低 GK 大鼠 FBG、HbA1c 水平, 提高 C-P 水平, 表明滋肾清肝方可调节 GK 大鼠的糖代谢紊乱, 改善胰岛素抵抗。滋肾清肝方在一定程度上可缓解 2 型糖尿病大鼠多饮、多食、多尿、多便、身体消瘦的状况。本实验证实滋肾清肝方能促进 GK 大鼠 GLP-1 的分泌, 提高其含量。

滋肾清肝方可使 2 型糖尿病大鼠骨骼肌中 p-IRS-1、GLUT4 的表达量显著升高 ($P < 0.01, P <$

0.05), PTP1B 的表达显著降低 ($P < 0.01, P < 0.05$), 说明滋肾清肝方可能通过调节骨骼肌胰岛素信号转导改善胰岛素抵抗, 调节糖代谢。滋肾清肝方可使 2 型糖尿病大鼠肝中 p-AKT 的表达量显著升高, GSK-3 β 的表达量显著降低 ($P < 0.01, P < 0.05$), 说明滋肾清肝方可能通过调节肝组织胰岛素信号转导改善胰岛素抵抗, 调节糖代谢。

本实验表明滋肾清肝方能降低 2 型糖尿病大鼠血清胰岛素、GSP 及 HbA1c 含量, 调节 2 模型大鼠糖代谢, 改善胰岛素抵抗, 调节肝及骨骼肌组织胰岛素信号转导通路, 进一步明确了复方的药效作用, 分析了复方的作用机制, 为该复方的临床应用及开发推广奠定了基础。

参考文献

- 1 Tian CY(田春雨), Bo HM(薄海美), La XJ(喇孝瑾), *et al.* Determination of plasma concentration of seven constituents of Zishenqinggandaiping formula and study of pharmacokinetics in rats. *Chin J Exp Tradit Med Formul* (中国实验方剂学杂志), 2015, 21(13):77-81.
 - 2 Li JA, Han SY, Tian CY, *et al.* The effects of DAIPING (Diabalance) granula on the glycolipid metabolism and PTP1B expression in liver of type 2 diabetes rats. *New Med*, 2012, 14(1):21-24.
 - 3 Bo HM(薄海美), Tian CY(田春雨), Bo JZ(薄建柱), *et al.* Simultaneous determination of 18 constituents of Zishenqinggandaiping formula by UPLC-ESI-MS/MS method. *Chin J Exp Tradit Med Formul* (中国实验方剂学杂志), 2015, 21(14):52-55.
 - 4 Bo HM(薄海美), Tian CY(田春雨), Bo JZ(薄建柱), *et al.* Study on the effect of Zishenqingganjiangtang Compound on PTP1B and oxidative stress in T2DM rats. *Chin J Exp Tradit Med Formul* (中国实验方剂学杂志), 2015, 21:111-113.
 - 5 Li X(李霞), Zhou ZG(周智广), Qi HY(齐海英), *et al.* Replacement of insulin by fasting C-peptide in modified homeostasis model assessment to evaluate insulin resistance and islet β cell function. *J Central South Univ, Med Sci*(中南大学学报, 自科版), 2004, 29:419-423.
 - 6 Chen S(陈树). GLP-1 is a novel treatment target for elder patients with type 2 diabetes. *Pract J Clin Med* (实用医院临床杂志), 2014, 11(1):22-25.
 - 7 Chen X(陈学), Long J(龙静), Du HY(杜梅英), *et al.* The study of correlation between glycosylated hemoglobin and glycosylated serum protein and type 2 diabetes mellitus. *Chin J Med* (中国医刊), 2015, 50(7):72-75.
-
- (上接第 1840 页)
- 20 Gao HT(高慧亭), Xu LS(徐丽姝), Li DF(李东风), *et al.* Effects of glucagon-like peptide-1 on liver oxidative stress, TNF- α and TGF- β 1 in rats with non-alcoholic fatty liver disease. *J South Med Univ* (南方医科大学学报), 2013, 33:1661-1664.
 - 21 Delas HN, Valero MM, Martin FB, *et al.* Molecular factors involved in the hypolipidemic and insulin-sensitizing effects of a ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) extract in rats fed a high-fat diet. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2017, 42:209-215.
 - 22 Hao L, Lu X, Sun M, *et al.* Protective effects of L-arabinose in high-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome in rats. *J Food Nutr Res*, 2015, 59:28886.
 - 23 Chu X, Guo Y, Xu B, *et al.* Effects of tannic acid, green tea and red wine on hERG channels expressed in HEK293 cells. *PLoS One*, 2015, 10(12):e0143797.
 - 24 Gao H, Long Y, Jiang X, *et al.* Effects of Yerba Mate tea (*Ilex paraguariensis*) on vascular endothelial function and liver lipoprotein receptor gene expression in hyperlipidemic rats. *Fitoterapia*, 2013, 84:264-272.