

· 药理 ·

增液汤降糖作用实验研究

杨帆, 戚进, 朱丹妮*

(中国药科大学中药复方研究室, 南京 211198)

[摘要] 目的: 研究增液汤的降糖作用及其作用途径。方法: 采用正常小鼠和四氧 (70 mg·kg⁻¹) 诱导的糖尿病模型小鼠, 连续给药 7 d 后, 观察增液汤水提物 (5, 10, 15 mg·kg⁻¹) 对血糖、口服糖耐量、血清胰岛素水平和体重的影响; 采用 MIN6 胰岛细胞观察增液汤水提物 (12.5, 25, 50, 100 μg·mL⁻¹) 对胰岛素分泌的影响。结果: 增液汤可明显降低糖尿病小鼠的血糖, 改善正常小鼠和糖尿病小鼠的糖耐量, 促进胰岛素分泌; 增液汤水提物在高糖 (16.7 mmol·L⁻¹) 环境下能够明显促进 MIN6 胰岛细胞分泌胰岛素。结论: 增液汤能降低糖尿病小鼠的血糖, 改善正常小鼠和糖尿病小鼠的糖耐量, 其作用机制可能与促进胰岛素的分泌有关, 与磺酰脲类降糖药的作用途径不同。

[关键词] 增液汤; 口服糖耐量; MIN6 胰岛细胞; 降糖作用; 格列本脲

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)08-0098-05

Experimental Study on Hypoglycemic Effects of Zengyetang

YANG Fan, QI Jin, ZHU Dan-ni

(Department of Traditional Chinese Prescription, Chinese Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effects and related pathways of Zengyetang on lowering blood glucose. **Method:** The normal mice and alloxan (70 mg·kg⁻¹)-induced diabetic mice were administrated for 7 d in order to investigate the effects of aquatic extract of Zengyetang (5, 10 and 15 mg·kg⁻¹) on the levels of blood glucose, insulin and oral glucose tolerance. Then we investigated the effects of extract (12.5, 25, 50, 100 μg·mL⁻¹) on insulin secretion in MIN6 islet cells. **Result:** After 7 days of administration, the extract could significantly lower blood glucose, and it also could ameliorate the oral glucose tolerance in normal and diabetic mice and improve insulin secretion. Meanwhile, the extract could improve insulin secretion in MIN6 cells with stimulation of 16.7 mmol·L⁻¹ glucose. **Conclusions:** The Zengyetang could lower blood glucose and ameliorate the oral glucose tolerance through improving insulin secretion, whose pathways were maybe different from sulphonylurea hypoglycemic drugs.

[Key words] Zengyetang; oral glucose tolerance; MIN6 islet cells; hypoglycemic effect; glibenclamide

糖尿病是由于胰岛素分泌绝对或相对不足、胰岛素抵抗或者两者皆有而引起的以高血糖为特征的

一种代谢性疾病^[1]。其中, 2 型糖尿病较为常见, 主要表现为胰岛素抵抗和胰岛素相对分泌不足。在 2 型糖尿病早期的治疗中, 促进胰岛素的分泌和提高胰岛细胞对葡萄糖的敏感性十分重要。目前临床应用的口服促胰岛素分泌剂主要有磺酰脲类降糖药和格列奈类降糖药, 它们都是作用于单一的药物靶点, 常常伴有不同程度基于机制的副作用发生^[2]。因此, 寻找新的降糖药物, 尤其是作用机制依赖于生

[收稿日期] 2009-12-07

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目 (30901956)

[通讯作者] 朱丹妮, Tel: (025) 86185157-8001; E-mail: danizhu@163.com

理反应的药物十分迫切,如受血糖调节和不引起体重增加的促胰岛素分泌剂等。

近年来,中医对 2 型糖尿病的研究有了进一步的深入,诸多病证模型研究表明中医证型与胰岛素抵抗有着密切的内在联系^[3]。中医药治疗糖尿病是多环节、多途径的,是综合作用的体现。从中药中寻找新的降血糖药物,对提高患者的整体状况有独特的优势。增液汤始载于清代吴鞠通的《温病条例》,由玄参、生地黄和麦冬(5:4:4)组成。临床上常常以增液汤为基本方用于阴虚热盛型糖尿病,也就是 2 型糖尿病初期的治疗^[3-4]。但是,关于增液汤降糖的临床前药理研究的报道甚少。本研究采用正常小鼠和糖尿病小鼠为模型,观察了增液汤水提物对正常小鼠和糖尿病小鼠血糖和胰岛素水平的影响,并采用 MIN6 细胞进一步观察了其对胰岛 β 细胞分泌胰岛素的影响。

1 材料

1.1 动物 清洁级雄性 ICR 小鼠,体重 18~20 g。(扬州大学动物实验中心,动物合格证号 SCXK(苏)2007-0001)

1.2 试剂 格列本脲原料药(北京嘉瑞时代科技有限公司);四氧嘧啶(Sigma);胰岛素放射免疫试剂盒(北京北方生物技术研究所);葡萄糖测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);BCA 蛋白测定试剂盒(碧云天生物技术研究所)。MIN6 胰岛细胞(上海迪奥生物科技有限公司);新生小牛血清(PAA, Austria);BSA(南京生兴生物技术有限公司);DMEM 培养基(Invitrogen);HEPES(南京生兴生物技术有限公司);β-巯基乙醇(上海化学试剂厂)。其他试剂均为分析纯。KRB 缓冲液:119 mmol·L⁻¹ NaCl, 4.74 mmol·L⁻¹ KCl, 2.54 mmol·L⁻¹ CaCl₂, 1.19 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 1.19 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄, 25 mmol·L⁻¹ NaHCO₃, 10 mmol·L⁻¹ HEPES, pH 7.4。玄参 *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. 产地安徽;生地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 产地河南;麦冬 *Ophiopogon japonicus* (Thunb.) Ker-Gawl. 产地四川,由中国药科大学中药复方研究室戚进博士鉴定。

1.3 仪器 酶标仪(Sunrise, TECAN);1/10 万精密天平(METTLER, AE240)。

2 方法

2.1 药材的提取和制备 取玄参、生地和麦冬(共

500 g)按 5:4:4 的比例热回流 2 h,提取两次,合并提取液,减压回收溶剂,冷冻干燥得干粉 335 g,得率为 67%。

2.2 造模 小鼠适应性饲养 1 周后开始试验。小鼠禁食(不禁水)16 h 后,由尾静脉快速注射新鲜配制的四氧嘧啶溶液(70 mg·kg⁻¹,生理盐水溶解),分别在注射后 6, 12, 36 h 给 20% 葡萄糖溶液(0.2 mL/只)。72 h 后从眼眶静脉丛取血,测定其空腹血糖(FBG)。将 FBG > 11.1 mmol·L⁻¹ 的小鼠选为糖尿病模型小鼠。

2.3 对正常小鼠和糖尿病小鼠血糖、糖耐量、血清胰岛素水平和体重的影响

2.3.1 取正常小鼠分为 5 组(每组 10 只),分别为正常对照组(0.25% CMC-Na 溶液)、格列本脲组(2.5 mg·kg⁻¹)、增液汤组(5, 10, 15 生药 g·kg⁻¹,按照临床剂量换算)。ig, 1 次/d,连续 7 d。末次给药前禁食 12 h,给药后检测空腹血糖。口服糖耐量实验在 ig 结束检测血糖后,给小鼠 ig 葡萄糖溶液(2.5 g·kg⁻¹),分别于给葡萄糖后 0, 15, 30, 60, 120 min 检测血糖。

梯形法计算血糖曲线下面积(AUC)

$$AUC = \frac{(C_i + C_{i-1})(t_i - t_{i-1})}{2}$$

2.3.2 取糖尿病小鼠分为 5 组(每组 10 只),分别为糖尿病模型组(0.25% CMC-Na 溶液)、格列本脲组(2.5 mg·kg⁻¹)、增液汤组(5, 10 和 15 g·kg⁻¹)。给药周期及测定空腹血糖和糖耐量同正常小鼠试验。

2.3.3 正常小鼠和糖尿病小鼠禁食 12 h,于第 8 天给药后 ig 葡萄糖溶液(2.5 g·kg⁻¹),给葡萄糖后 15 min 取血,用胰岛素放免试剂盒检测血清胰岛素水平。

2.3.4 实验期间每天称量小鼠体重。

2.4 MIN6 胰岛细胞培养 MIN6 胰岛细胞(< passage 40)置于 20% 新生小牛血清的 DMEM 培养基(含 0.1 g·L⁻¹ 链霉素、100 U·mL⁻¹ 青霉素和 5 μL·L⁻¹ β-巯基乙醇)中,37℃,5% CO₂,饱和湿度条件下培养。每 3 d 更换 1 次培养基,当细胞密度达到 90% 时,即可传代和用于实验。

2.5 促胰岛素分泌实验 取 5 × 10⁴ 个/mL 细胞 500 μL 接种于 24 孔板中,37℃,5% CO₂,饱和湿度下培养。72 h 后,进行胰岛素分泌实验。弃上清,加入 300 μL 含 0.2% BSA 和 2.8 mmol·L⁻¹ 葡萄糖的

KRB 缓冲液, 37 °C 孵箱中放置 1 h。加入 300 μL 含不同浓度受试物的 KRB 缓冲液 (2.8 mmol·L⁻¹ 或 16.7 mmol·L⁻¹ 葡萄糖), 37 °C 孵箱中放置 1 h, 将培养板放置冰上终止反应。将上清液转移至 eppendorf 管中, 2 000 r·min⁻¹ × 3 min, 离心, 去除细胞碎片。取上清液 50 μL 加入 350 μL KRB 缓冲液稀释, 再采用胰岛素放免试剂盒检测胰岛素含量。弃去剩余上清液, 室温空气干燥 15 min, 加入 100 μL 冰冷的 0.2 mol·L⁻¹ NaOH 溶液裂解细胞, 取 10 μL 的裂解液进行蛋白含量测定 (BCA 试剂盒)。胰岛素含量表示为 μU·mg protein⁻¹·min⁻¹。

2.6 统计学方法 所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计采用方差分析及 Student's *t* 检验。以 $P < 0.05$ 表示显著性差异。

3 结果

3.1 对正常小鼠和糖尿病小鼠血糖的影响 在连续给药 7 d 后, 增液汤对正常小鼠的血糖没有影响, 但能够明显降低四氧吡嗪诱导的糖尿病小鼠升高的血糖, 结果见表 1。

表 1 增液汤水提物对正常小鼠和糖尿病小鼠血糖的影响 ($\bar{x} \pm s$ $n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	血糖 /mmol·L ⁻¹	
		正常小鼠	糖尿病小鼠
正常对照	-	6.42 ± 0.87	-
模型	-	-	21.81 ± 1.18 ²⁾
格列本脲	2.5 × 10 ⁻³	5.33 ± 0.60 ¹⁾	14.56 ± 5.13 ⁴⁾
增液汤水提物	5	6.11 ± 0.85	15.42 ± 2.61 ⁴⁾
	10	6.23 ± 0.92	19.81 ± 2.44 ³⁾
	15	6.21 ± 0.85	13.70 ± 3.56 ⁴⁾

注: 与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (下同)。

3.2 对正常小鼠糖耐量的影响 结果显示, 增液汤能够明显降低血糖。与正常对照组比较, 增液汤水提物在 10 g·kg⁻¹ 和 15 g·kg⁻¹ 剂量时可明显促进糖的消除(图 1A)。随着增液汤水提物浓度的升高, 血糖 AUC 值降低(图 1B), 提示增液汤能够改善正常小鼠的糖耐量。

3.3 对糖尿病小鼠糖耐量的影响 结果显示, 与对照组比较, 模型组血糖水平明显增高。与模型组比较, ig 葡萄糖后 15 ~ 30 min 内, 增液汤水提物能够明显降低血糖。同时, 增液汤水提物降低了血糖 AUC(图 2), 提示其能够改善糖尿病小鼠受损的糖耐量。

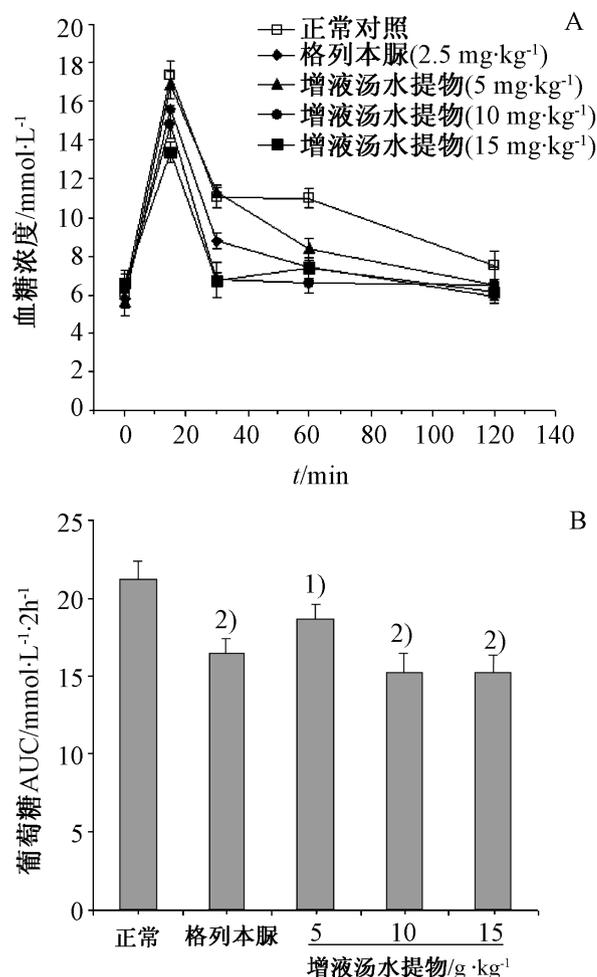


图 1 增液汤水提物对正常小鼠糖耐量的影响 (A. 血糖曲线; B. 血糖 AUC)

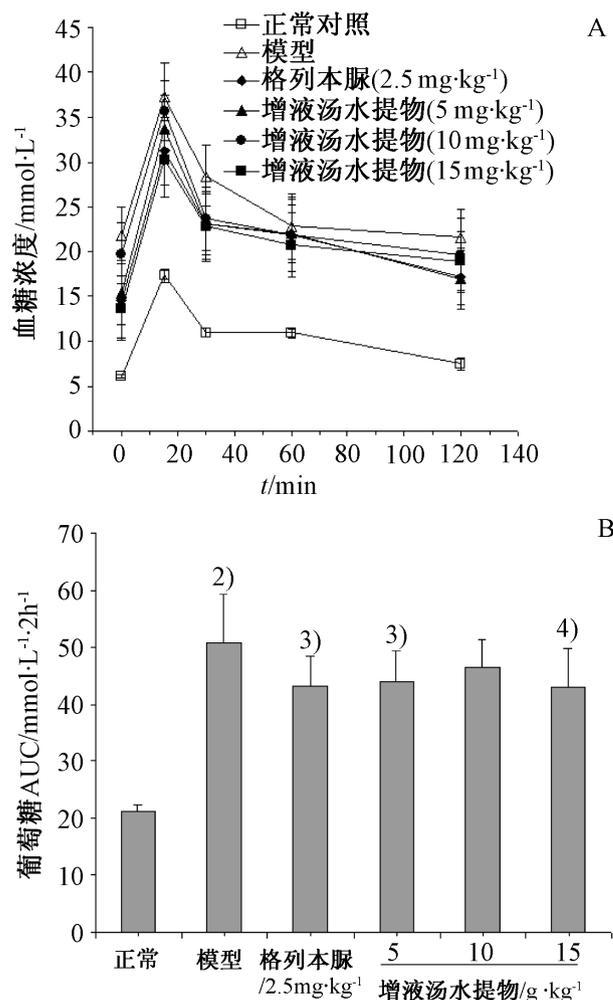


图 2 增液汤水提物对糖尿病小鼠糖耐量的影响 (A. 血糖曲线; B. 血糖 AUC)

3.4 对正常小鼠和糖尿病小鼠血清胰岛素水平的影响 结果显示, 与模型组比较, 增液汤水提物能够明显提高正常小鼠和糖尿病小鼠的血清胰岛素水平, 结果见表 2。

表 2 增液汤水提物对正常小鼠和糖尿病小鼠血清胰岛素的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / $g \cdot kg^{-1}$	血清胰岛素 / $\mu U \cdot mL^{-1}$	
		正常小鼠	糖尿病小鼠
正常对照	-	29.75 \pm 4.87	-
模型	-	-	11.81 \pm 4.18
格列本脲	2.5×10^{-3}	38.05 \pm 5.60 ²⁾	18.56 \pm 5.13 ⁴⁾
增液汤水提物	5	35.11 \pm 5.85 ¹⁾	15.42 \pm 3.61 ³⁾
	10	37.23 \pm 5.92 ²⁾	17.81 \pm 4.44 ⁴⁾
	15	37.78 \pm 4.85 ²⁾	18.70 \pm 5.56 ⁴⁾

表 3 增液汤水提物对正常小鼠和糖尿病小鼠体重的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / $g \cdot kg^{-1}$	体重 / g					
		正常小鼠			糖尿病小鼠		
		给药前	给药后	体重变化	给药前	给药后	体重变化
正常对照	-	26.56 \pm 2.11	26.88 \pm 3.43	0.32 \pm 2.25	-	-	-
模型	-	-	-	-	19.38 \pm 3.31	16.88 \pm 3.43	- 2.50 \pm 2.25
格列本脲	2.5×10^{-3}	28.00 \pm 6.55	30.22 \pm 4.32	2.22 \pm 5.43 ²⁾	17.00 \pm 6.51	19.50 \pm 4.78	2.50 \pm 6.35 ²⁾
增液汤水提物	5	24.67 \pm 3.27	25.88 \pm 4.34	1.21 \pm 4.37 ¹⁾	20.66 \pm 3.12	20.83 \pm 2.12	0.17 \pm 3.45
	10	25.29 \pm 2.21	23.28 \pm 6.51	- 2.01 \pm 4.31	18.17 \pm 4.78	16.17 \pm 6.56	- 2.00 \pm 7.67
	15	26.22 \pm 3.56	25.00 \pm 5.34	- 1.22 \pm 3.56	19.75 \pm 3.55	18.13 \pm 4.76	- 1.62 \pm 5.32

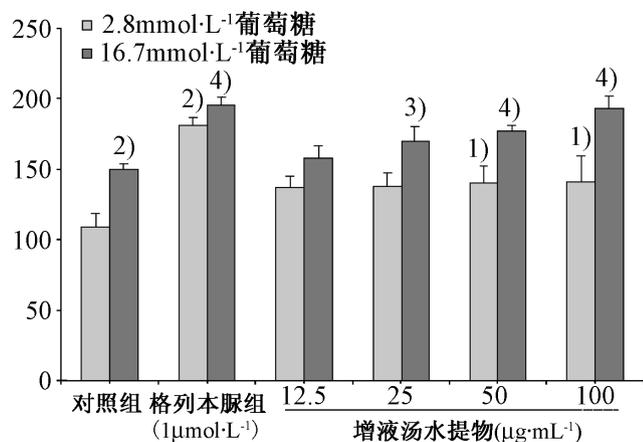


图 3 增液汤水提物对葡萄糖刺激的 MIN6 胰岛细胞分泌胰岛素的影响

注: 与对照组 (2.8 mmol · L⁻¹ 葡萄糖) 相比¹⁾ $P < 0.05$,
²⁾ $P < 0.01$; 与对照组 (16.7 mmol · L⁻¹ 葡萄糖) 相比³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

2 型糖尿病是一种异质性疾病, 具有双重病理机制, 即胰岛素分泌缺陷和胰岛素抵抗^[5]。其中胰岛细胞功能缺陷在 2 型糖尿病发生和发展过程中起重要作用, 也是 2 型糖尿病早期的病理特征。胰岛素的分泌分为相时期和相时期, 在静脉注射葡萄糖后, 相胰岛素迅速分泌并于 10 ~ 15 min 内达峰; 若葡萄糖负荷持续存在, 随后相胰岛素开始分泌, 1 h 左右达峰^[6]。胰岛素分泌异常首先表现

3.5 对正常小鼠和糖尿病小鼠体重的影响 结果显示, 与格列本脲组比较, 增液汤水提物不会引起糖尿病小鼠体重增加, 提示增液汤在发挥作用的同时不会引起脂质代谢的紊乱, 结果见表 3。

3.6 对葡萄糖刺激的 MIN6 胰岛细胞分泌胰岛素的影响 结果显示, 在高糖 (16.7 mmol · L⁻¹) 环境下, 与对照组比较, 增液汤水提物在 50 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 和 100 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 时均可明显促进胰岛素的分泌 (图 3)。与格列本脲组比较, 增液汤水提物在低糖 (2.8 mmol · L⁻¹) 环境下促进胰岛素分泌的作用不明显。

为相胰岛素分泌延迟或者消失, 产生的血糖负荷不能在相时期完全消除, 从而导致胰岛素抵抗的发生。而血糖内环境稳态的破坏, 首先表现为口服糖耐量受损, 进一步表现出糖尿病的特征^[7]。

本实验研究发现, 增液汤对正常小鼠血糖无影响, 但能明显降低四氧诱导的糖尿病小鼠升高的血糖。进一步的口服糖耐量实验表明, 增液汤对血糖有明显的抑制作用, 能够改善正常小鼠和糖尿病小鼠的糖耐量。尤其在 ig 葡萄糖后 15 ~ 30 min 内, 糖尿病小鼠血糖迅速下降 (图 2A), 提示增液汤可能促进了相胰岛素的分泌来消除血糖, 同时也发现增液汤能够明显提高 15 min 时血清胰岛素水平。且增液汤在 50, 100 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 时能够明显促进胰岛细胞分泌胰岛素, 进一步说明增液汤水提物具有促进胰岛素分泌的作用。

目前临床应用的口服促胰岛素分泌剂主要有磺酰脲类降糖药和格列奈类降糖药, 它们都是作用于胰岛细胞膜外侧的特异受体—SU 受体 (sulfonyleurea receptor, SUR), 引起 K_{ATP} 通道关闭和 Ca²⁺ 通道开放, 最终促进胰岛素的分泌^[8]。在发挥疗效的同时常常会伴有不同程度基于机制的副作用发生, 如引起空腹低血糖和患者体重的增加, 磺酰脲

类降糖药甚至会出现原发性或继发性失效^[2]。

作者在试验中发现,在高糖($16.7 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)环境下,与对照组相比,增液汤水提物在 $50, 100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时均可明显促进胰岛素的分泌。与格列本脲组相比,增液汤水提物在低糖($2.8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)环境下促进胰岛素分泌的作用不明显(图 3)。提示增液汤促进胰岛素分泌的作用受葡萄糖调节的。同时,增液汤水提物在发挥降糖作用的同时也不会引起糖尿病小鼠体重的增加(表 3)。这些说明增液汤可能不是通过作用于 SUR 发挥降糖作用的。

综上所述,增液汤能够通过促进胰岛素的分泌来降低糖尿病小鼠的血糖,改善正常小鼠和糖尿病小鼠的糖耐量,其作用机制可能与磺酰脲类降糖药不同。

[参考文献]

- [1] Kahn S E. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of type 2 diabetes[J]. *Diabetologia*, 2003, 46: 3.
- [2] David E Moller. New drug targets for type 2 diabetes and

the metabolic syndrome[R]. *Nature*, 2001, 414: 821.

- [3] 马德权, 赵永爱. 2 型糖尿病胰岛素抵抗中医药研究进展[J]. *中国误诊学杂志*, 2006, 6(11): 2060.
- [4] 吴卫明. 消渴证治一得[J]. *现代中医药*, 2007, 27(1): 32.
- [5] Thirpathy D, Carlsson M, Almgren P, et al. Insulin secretion and insulin sensitivity in relation to glucose tolerance: Lessons from the botnia study[J]. *Diabetes*, 2000(6): 49.
- [6] Jay S. Diabetes Mellitus: Pathogenesis and Treatment Strategies[R]. *J Med Chem*, 2004, 47: 4113.
- [7] Muhammad A, Abdul G, Masafumi M, et al. The relative contributions of insulin resistance and beta cell failure to the transition from normal to impaired glucose tolerance varies in different ethnic groups [J]. *Diabetes & metabolic syndrome*, 2007, 1: 105.
- [8] Chen W P, Chi T C, Chuang L M, et al. Resveratrol enhances insulin secretion by blocking K_{ATP} and K_v channels of beta cells [J]. *European Pharmacology*, 2007, 568: 269.

[责任编辑 何伟]