

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.01.014

实验研究

清化颗粒对糖尿病小鼠葡萄糖转运因子的影响

李俊燕, 王静懿, 徐杰, 陆灏, 陶枫*

(上海中医药大学附属曙光医院, 上海市张衡路 528 号, 201203)

摘要 目的 探讨清化颗粒治疗 2 型糖尿病的可能作用机制。方法 24 只 db/db 糖尿病小鼠随机分为模型对照组和清化颗粒低、中、高剂量组各 6 只, 另设 6 只 db/m 小鼠为空白对照组。清化颗粒低、中、高剂量组分别给予清化颗粒 3.77、7.54、15.08 g/(kg·d) 灌胃, 模型对照组给予生理盐水 10 ml/(kg·d) 灌胃, 空白对照组不做其他处理。各组均连续观察 4 周。实验结束后检测各组小鼠空腹血糖、血清糖化血红蛋白 (HbA1c) 含量及血清胰高血糖素样肽 1 (GLP-1) 浓度, 并检测小鼠回肠组织中葡萄糖转运因子 2 (GLUT2) mRNA 和蛋白水平。结果 与空白对照组比较, 模型对照组小鼠空腹血糖和 HbA1c 含量明显升高, 血清 GLP-1 浓度及回肠组织中 GLUT2 mRNA 和蛋白表达均明显降低 ($P < 0.01$)。与模型对照组比较, 清化颗粒低、中、高剂量组均能下调空腹血糖和 HbA1c 含量, 上调血清 GLP-1 浓度及回肠组织中 GLUT2 mRNA 和蛋白表达, 并且以清化颗粒高剂量组效果最好 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 清化颗粒能降低 db/db 糖尿病小鼠空腹血糖和 HbA1c 水平, 促进 GLP-1 分泌, 其作用机制可能与上调回肠组织中 GLUT2 的表达有关。

关键词 糖尿病; 清化颗粒; 胰高血糖素样肽 1; 葡萄糖转运因子 2

胰高血糖素样肽 1 (glucagon-like peptide 1, GLP-1) 是肠道 L 细胞以营养依赖性方式分泌的一种具有葡萄糖依赖性促胰岛素分泌功能的肠促胰岛素, 具有促进 β 细胞增殖与分化、抑制 β 细胞凋亡、抑制胰高血糖素分泌、抑制胃肠蠕动、调节血糖等作用^[1-3]。以 GLP-1 为基础的药物已在 2 型糖尿病患者的临床治疗中取得良好疗效^[4]。恢复肠道 L 细胞内源性 GLP-1 的分泌已成为 2 型糖尿病药物研发领域的新靶点^[5]。清化颗粒是名老中医蔡淦教授的临床经验方, 在我院已有十余年的临床应用。前期临床和动物研究均证实清化颗粒可降低 2 型糖尿病患者和糖尿病大鼠的血糖水平, 提高血清 GLP-1 的浓度, 从而改善胰岛细胞功能^[6-7]。已有研究证实, 肠道葡萄糖转运因子 2 (GLUT2) 与肠道 L 细胞 GLP-1 的分泌有关^[8]。本研究采用 db/db 糖尿病小鼠模型, 观察清化颗粒对糖尿病小鼠血清

GLP-1 以及回肠组织中 GLUT2 基因和蛋白表达水平的影响, 为清化颗粒治疗 2 型糖尿病提供依据。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级 db/m 小鼠 6 只, 7 周龄, 雄性, 体质量 18~22 g。SPF 级 db/db 糖尿病小鼠 24 只, 7 周龄, 雄性, 体质量 38~42 g。小鼠均购自南京大学模式动物研究所, 实验动物许可证号: SCXK(苏) 2010-0001。

1.2 药物、试剂与仪器

清化颗粒 (组成: 黄连 6 g, 黄芩 12 g, 葛根 30 g) 由上海中医药大学附属曙光医院制剂科制备成浓度为 3.2 g/ml 的溶液。

小鼠糖化血红蛋白 (HbA1c) ELISA 检测试剂盒购自上海西唐公司, 批号: F10611; 小鼠 GLP-1 ELISA 检测试剂盒购自上海西唐公司, 批号: F10563; Trizol 纯化试剂盒为美国 Life technologies 公司产品, 批号: 12183555; cDNA 反转录试剂盒为美国 Thermo 公司产品, 批号: K1622; ABI Power

基金项目: 国家自然科学基金 (81403359); 中国博士后科学基金 (2015M581653); 上海市自然科学基金 (13ZR1442700); 上海市进一步加快中医药事业发展三年行动计划 (ZY3-CCCX-2-4003)

* 通讯作者: feng.tao@shsgyy-endo.cn, (021) 20256535

SYBR Green PCR Master Mix 购自美国 ABI 公司, 批号: 4367659; GLUT2 抗体为美国 Abcam 公司产品, 批号: ab104622; GAPDH 购自美国 Abcam 公司, 批号: ab181602; RIPA 裂解液为上海碧云天公司产品, 批号: P0013C。

高速冷冻离心机购自德国 HERMLE 公司, 型号: Z-216MK; 血糖仪及试纸购自德国罗氏公司, 型号: Accu-check; 酶标仪购自美国 Biotek 公司, 型号: ELx800; 实时荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司, 型号: ABI-7300; 核酸蛋白分析仪购自美国 Gene 公司, 型号: Nanodrop-2000; Western Blot 电泳和电转系统购自美国 Bio-Rad 公司, 型号: Mini 型; 全自动化学发光图像分析系统购自上海天能公司, 型号: 5200。

1.3 动物分组与干预方法

24 只 db/db 小鼠适应性喂养 1 周后采用随机数字表法分为模型对照组和清化颗粒低、中、高剂量组, 每组 6 只, 6 只 db/m 小鼠为空白对照组。清化颗粒低、中、高剂量组分别给予清化颗粒 3.77、7.54、15.08 g/(kg·d) 灌胃, 模型对照组给予生理盐水 10 ml/(kg·d) 灌胃, 空白对照组不做其他处理。各组均连续观察 4 周。

1.4 观察指标及方法

1.4.1 空腹血糖及血清 HbA1c 含量 各组小鼠检测空腹血糖后腹主动脉取血, 留取血清, 置于 -80℃ 低温冰箱保存备用。血清 HbA1c 检测根据试剂盒操作说明, 加入稀释后的血清样本和底物工作液, 37℃ 孵育 15 min, 490 nm 读取吸光值, 加入酶标抗体工作液, 振荡混匀, 37℃ 孵育 15 min, 加入终止液, 490 nm 处检测吸光值, 制作标准曲线, 根据 OD 值查出相应的 HbA1c 值, 样本 HbA1c 最低检测浓度为 1.5%。

1.4.2 血清 GLP-1 浓度 血清 GLP-1 检测根据试剂盒操作说明, 加入稀释后的血清样本, 37℃ 孵育 40 min, 加入第一抗体工作液, 37℃ 孵育 20 min, 加入酶标抗体工作液, 37℃ 孵育 10 min, 加入底物工作液, 37℃ 暗处孵育 15 min, 加入终止液混匀, 450 nm 读取吸光值, 制作标准曲线, 根据 OD 值查出相应的 GLP-1 值, 样本 GLP-1 最低检测浓度为 0.1 ng/ml。

1.4.3 回肠组织中 GLUT2 mRNA 及蛋白含量 迅速获取回肠组织, 将回肠组织进行研磨, GLUT2 mRNA 检测采用实时荧光定量 PCR 法, 根据 RNA 提取试剂盒说明, 提取样本总 RNA, 核酸蛋白仪

检测其浓度和纯度; 根据反转录试剂盒说明, 合成 cDNA 第一链; 采用 ABI 实时荧光定量 PCR 系统进行荧光定量 PCR 的扩增和检测, GAPDH 作为内参, 引物购自上海生工生物工程有限公司。GLUT2-F: 5'-AATCCCTTGTTTCATGGTTG-3', GLUT2-R: 5'-CGCAATGTACTGGAAGCAGA-3', 扩增片段长度 124bp; GAPDH-F: 5'-TGGAGAAACCTGCCAACT-3', GAPDH-R: 5'-GTTGCTGTTGAAGTCGCA-3', 扩增片段长度 122bp。

GLUT2 蛋白检测采用 Western Blot 法, 回肠组织用 RIPA 裂解液提取总蛋白, 核酸蛋白分析仪检测蛋白浓度和纯度, 加入 30 μg 样品, SDS-PAGE 凝胶电泳后转至 PVDF 膜上, 用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 封闭 1h, 加入 GLUT2 抗体, 4℃ 孵育 2h, TBST 洗膜 3 次, 加入荧光标记的二抗, 4℃ 孵育 1h, 再用 TBST 洗膜 3 次。全自动化学发光图像分析系统进行扫描拍照, 进行条带灰度分析。

GLUT2 免疫组化实验按照试剂盒说明书操作, 石蜡切片脱蜡至水。PBS 冲洗 3 次, 滴加适当比例稀释的 GLUT2 抗体, 孵育 2h, PBS 冲洗, 滴加二抗, DAB 显色, 显微镜下观察 (400×)。阴性对照不加一抗。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件对数据进行处理, 计量数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠空腹血糖及 HbA1c 含量比较

表 1 示, 与空白对照组比较, 其余各组小鼠空腹血糖和 HbA1c 含量均明显升高 ($P < 0.01$)。与模型对照组比较, 清化颗粒低、中、高剂量组小鼠空腹血糖和 HbA1c 均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与清化颗粒低剂量组比较, 清化颗粒中剂量组 HbA1c 和清化颗粒高剂量组空腹血糖、HbA1c 降低更明显 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 各组小鼠空腹血糖及糖化血红蛋白含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	空腹血糖 (mmol/L)	糖化血红蛋白 (%)
空白对照组	6	4.36 ± 0.12	20.34 ± 2.12
模型对照组	6	16.49 ± 1.61*	37.12 ± 2.92*
清化颗粒低剂量组	6	13.79 ± 1.31*△	32.10 ± 1.10*△△
清化颗粒中剂量组	6	13.42 ± 1.04*△△	29.12 ± 2.97*△△△
清化颗粒高剂量组	6	12.06 ± 0.86*△△△	27.11 ± 1.07*△△△△

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型对照组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$; 与清化颗粒低剂量组比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$

2.2 各组小鼠血清 GLP-1 浓度比较

表 2 示, 与空白对照组比较, 其余各组小鼠血清 GLP-1 浓度均不同程度降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型对照组比较, 清化颗粒低、中、高剂量组小鼠血清 GLP-1 浓度均明显升高 ($P < 0.01$)。与清化颗粒低剂量组比较, 清化颗粒中、高剂量组小鼠血清 GLP-1 浓度升高更明显 ($P < 0.01$)。

表 2 各组小鼠血清 GLP-1 浓度比较 (pmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	GLP-1
空白对照组	6	16.23 $\pm$ 2.20
模型对照组	6	5.05 $\pm$ 1.26 **
清化颗粒低剂量组	6	7.90 $\pm$ 1.89 ** Δ
清化颗粒中剂量组	6	10.19 $\pm$ 0.76 ** Δ $\blacktriangle$
清化颗粒高剂量组	6	14.89 $\pm$ 2.27 ** Δ $\blacktriangle$

注: GLP-1, 胰高血糖素样肽 1; 与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型对照组比较, $\Delta P < 0.01$; 与清化颗粒低剂量组比较, $\blacktriangle P < 0.01$

2.3 各组小鼠回肠组织中 GLUT2 mRNA 及蛋白含量比较

表 3 示, 与空白对照组比较, 其余各组小鼠回肠组织中 GLUT2 mRNA 及蛋白含量均明显降低 ($P < 0.01$)。与模型对照组比较, 清化颗粒低、中、高剂量组小鼠回肠组织中 GLUT2 mRNA 及蛋白含量明显增加 ($P < 0.01$)。清化颗粒中、高剂量组小鼠回肠组织中 GLUT2 mRNA 及蛋白含量较清化颗粒低剂量组增加更明显 ($P < 0.01$)。免疫组化分析各组小鼠回肠组织中的 GLUT2 蛋白表达见图 1。

表 3 各组小鼠回肠组织中 GLUT2 mRNA 和蛋白水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	相对 mRNA 表达量	相对蛋白表达量
空白对照组	6	3.36 $\pm$ 0.54	0.76 $\pm$ 0.03
模型对照组	6	1.00 $\pm$ 0.09 *	0.12 $\pm$ 0.06 *
清化颗粒低剂量组	6	1.46 $\pm$ 0.01 * Δ	0.18 $\pm$ 0.07 * Δ
清化颗粒中剂量组	6	2.17 $\pm$ 0.03 * Δ $\blacktriangle$	0.27 $\pm$ 0.04 * Δ $\blacktriangle$
清化颗粒高剂量组	6	2.69 $\pm$ 0.12 * Δ $\blacktriangle$	0.48 $\pm$ 0.03 * Δ $\blacktriangle$

注: GLUT2, 肠道葡萄糖转运因子 2; 与空白对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型对照组比较, $\Delta P < 0.01$; 与清化颗粒低剂量组比较, $\blacktriangle P < 0.01$

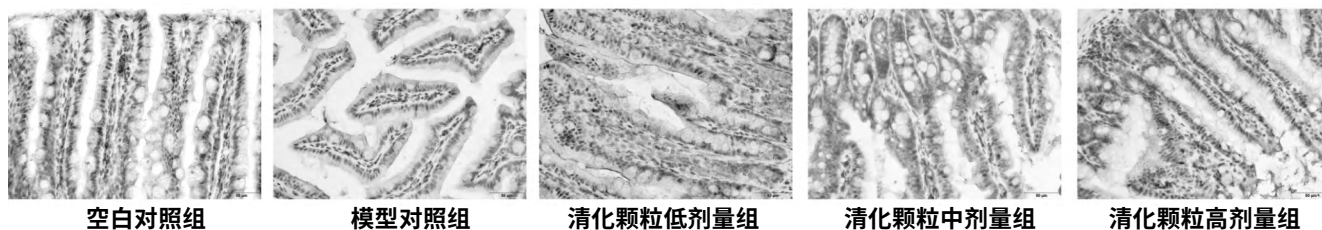


图 1 各组小鼠回肠组织葡萄糖转运因子 2 免疫组化图 (400 $\times$)

3 讨论

报道, 中国 18 岁以上成年人糖尿病的发病率已达 11.6%, 绝对患者数突破亿人^[1], 已成为继肿瘤、心脑血管疾病之后威胁人类健康和生命安全的第三位重大疾病。GLP-1 由胰高血糖素原基因表达, 在肠黏膜的 L 细胞中, 前激素转化酶将胰高血糖素原剪切为其羧基端的肽链序列, 肠道 L 细胞上存在刺激 GLP-1 分泌的特殊感受器^[4-5]。研究证实, GLUT2 在生理状态时位于小肠基底膜, 当小肠肠腔在高糖状态时, 能于数分钟内易位至空肠顶膜参与葡萄糖吸收, GLUT2 这种易化扩散机制对葡萄糖的吸收是主动转运的 3~5 倍^[6-11]。因此, GLUT2 在小肠葡萄糖吸收中的作用十分重要。目前已经证实, GLUT2 是胃肠道 L 细胞上促进 GLP-1 分泌的重要感受器之一^[8]。

随着中药广泛应用于 2 型糖尿病的临床治疗中, 越来越多的研究发现某些中药有效成分、单味中药及中药复方均可通过影响 GLP-1 水平而达到调节血糖的作用, 常用的药物有葛根芩连汤^[12]、黄连素^[13]、大黄素^[14]等。目前, 2 型糖尿病中超重/肥胖比例逐渐升高, 饮食失节可致脾胃运化失司, 积湿蕴热, 情志失调可致气机郁结, 郁而化火, 此两者皆耗伤气阴, 导致消渴的发生发展。如《素问·奇病论》云“此人必数食甘美而多肥也, 肥者令人内热, 甘者令人中满, 故其气上溢, 转为消渴。”又如《灵枢·五变》云“怒则气上逆, 胸中蓄积, 血气逆留, ……转而为热, 热则消肌肤, 故为消瘴。”此阶段应重在清郁热, 故选用味苦之品以清泻内热。清化颗粒由李东垣《脾胃论》首方“补脾胃泻阴火升阳汤”化裁而来, 药味精练, 体现了其“泻阴火”的学术思想; 方以黄连、黄芩为君药, “泻其有余”, 葛根为佐药, 取其“升阳降火”之意。

本研究结果表明, 清化颗粒能明显降低 db/db 糖尿病小鼠的空腹血糖和 HbA1c 水平, 提高血清 GLP-1 水平; 同时, 清化颗粒各剂量组均可显著上

调 db/db 糖尿病小鼠回肠组织中 GLUT2 的 mRNA 和蛋白的表达水平, 并且以中、高剂量效果更好, 提示清化颗粒可能通过影响 GLUT2 的表达来促进 GLP-1 的分泌, 进而改善胰岛细胞功能, 为 GLUT2 在 2 型糖尿病发病机制中的功能研究提供一定的实验基础和理论依据。

参考文献

- [1] MOFFETT RC, PATTERSON S, IRWIN N, et al. Positive effects of GLP-1 receptor activation with liraglutide on pancreatic islet morphology and metabolic control in C57BL/KsJ db/db mice with degenerative diabetes [J]. Diabetes Metab Res Rev, 2015, 31(3): 248-255.
- [2] SHAH M, VELLA A. Effects of GLP-1 on appetite and weight [J]. Rev Endocr Metab Disord, 2014, 15(3): 181-187.
- [3] ZHANG Y, CHEN Y, CHENG J, et al. DPP IV inhibitor suppresses STZ-induced islets injury dependent on activation of the IGF1R/Akt/mTOR signaling pathways by GLP-1 in monkeys [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 456(1): 139-144.
- [4] EZCURRA M, REIMANN F, GRIBBLE FM, et al. Molecular mechanisms of incretin hormone secretion [J]. Curr Opin Pharmacol, 2013, 13(6): 922-927.
- [5] TASYUREK MH, ALTUNBAS HA, CANATAN H, et al. GLP-1-mediated gene therapy approaches for diabetes treatment [J]. Expert Rev Mol Med, 2014, 16: e7. doi:

10.1017/erm.2014.7.

- [6] 陶枫, 姚政, 陆灏, 等. 健胰方影响 2 型糖尿病患者肠促胰岛素 GLP-1 表达的临床观察 [J]. 中国药房, 2007, 18(12): 934-936.
- [7] 陶枫, 朱蕴华, 陆灏. 健胰清化方对 2 型糖尿病模型大鼠胰岛素 mRNA 表达的影响 [J]. 实用糖尿病杂志, 2007, 3(3): 44-45.
- [8] AU A, GUPTA A, SCHEMBRI P, et al. Rapid insertion of GLUT2 into the rat jejunal brush-border membrane promoted by glucagon-like peptide 2 [J]. Biochem, 2002, 367(pt 1): 247-254.
- [9] CHAN JC, ZHANG Y, NING G. Diabetes in China: a societal solution for a personal challenge [J]. Lancet Diabetes Endocrinol, 2014, 2(12): 969-979.
- [10] KELLETT GL. Sugar absorption in the intestine: the role of GLUT2 [J]. Annu Rev Nutr, 2008, 28: 35-54. doi: 10.1146/annurev.nutr.28.061807.155518. Review.
- [11] LOSTAO MP, BERJON A, BARBER A, et al. On the multiplicity of glucose analogues transport systems in rat intestine [J]. Rev Esp Fisiol, 1991, 47(4): 209-216.
- [12] 武志黔. 葛根芩连汤对 2 型糖尿病大鼠的表征作用及其与 GLP-1 相关的生物学基础 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2014.
- [13] 吕秋菊, 曹淑强, 蒲强红. 黄连素对糖尿病大鼠分泌 GLP-1 的影响 [J]. 内江科技, 2010, 31(12): 64.
- [14] 周丽嫦, 徐艳燕, 陈伟标, 等. 大黄素通过激活 PPAR δ 促进胰高血糖素样肽 1 分泌的研究 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2011, 9(21): 142-144.

Effect of Qinghua Granule (清化颗粒) on Glucose Transporter of Diabetes Mellitus Mice

LI Junyan, WANG Jingyi, XU Jie, LU Hao, TAO Feng

(Shuguang Hospital affiliated to Shanghai University of Chinese Medicine, Shanghai 201203)

ABSTRACT Objective To explore possible mechanism of Qinghua Granule (清化颗粒) treating type 2 diabetic mellitus. **Methods** Randomly divided 24 db/db mice with diabetes into the model control group and the Qinghua Granule low, middle and high dose group, with 6 in each group. Set another 6 db/m mice as the blank control group. The Qinghua Granule low, middle and high dose groups were respectively given Qinghua Granule 3.77, 7.54 and 15.08 g/(kg · d) for gavage. The model control group was given normal saline 10 ml/(kg · d) for gavage. The blank control group had no other management. All groups were continuously observed for four weeks. After the management, examined levels of fasting blood-glucose, serum hemoglobin A1c (HbA1c), serum glucagon-like peptide-1 (GLP-1) concentration and the expression of glucose transporter2 (GLUT2) mRNA and protein in ileum tissue. **Results** Compared with the blank control group, fasting blood-glucose and HbA1c levels of mice in the model control group remarkably increased while serum GLP-1 concentration, the expression of GLUT2 mRNA and protein in ileum tissue all remarkably decreased ($P < 0.01$). Compared with that in the model control group, in the Qinghua Granule low, middle and high dose groups, levels of fasting blood-glucose and HbA1c all decreased, while serum GLP-1 concentration, the expression of GLUT2 mRNA and protein in ileum tissue increased. The Qinghua Granule high dose group had the best effect ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Qinghua Granule could decrease levels of fasting blood-glucose and HbA1c of db/db mice with diabetes and promote secretion of GLP-1. Its function may be related to increase of the expression of GLUT2 in ileum tissue.

Keywords diabetes; Qinghua Granule; glucagon-like peptide1; glucose transporter2

(收稿日期: 2016-03-01; 修回日期: 2016-07-13)

编辑: 邓 媛