

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.11.018

葛根芩连汤对 2 型糖尿病模型大鼠胰岛细胞 IRS-2/PI3K-Akt 通路的影响

周琦¹, 朱向东^{1*}, 仝小林², 王焱¹, 司晓丽¹, 王燕¹

(1. 甘肃中医药大学, 甘肃省兰州市城关区定西东路 35 号, 730000; 2. 中国中医科学院广安门医院)

摘要 目的 探讨葛根芩连汤保护 2 型糖尿病大鼠胰岛细胞的可能作用机制。方法 24 只雄性 ZDF (fa/fa) 大鼠给予高脂饲料诱导 2 型糖尿病模型, 造模成功后随机分为葛根芩连汤组、二甲双胍组、模型组, 每组 8 只。8 只雄性 ZDF (fa/+) 大鼠设为正常组。模型组、正常组给予生理盐水 10 ml/kg 灌胃, 葛根芩连汤组给予葛根芩连汤 13.8 g/kg 灌胃, 二甲双胍组给予盐酸二甲双胍肠溶片 300 mg/kg 灌胃。给药 8 周后检测空腹血糖 (FPG), 采用蛋白免疫印迹法检测胰腺胰岛素受体底物 2 (IRS-2)、磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K) p85、蛋白激酶 B (Akt2)、磷酸化胰岛素受体底物 2 (p-IRS2)、磷酸化磷脂酰肌醇 3 激酶 (p-PI3K) p85、磷酸化蛋白激酶 B (p-Akt2) 的蛋白表达。实时荧光定量 PCR 法检测胰腺 IRS-2、PI3K p85 与 Akt2 mRNA 表达。ELISA 法测定空腹胰岛素 (FINS) 含量, 免疫抑制比浊法测定糖化血红蛋白 (HbA1c) 的百分含量。结果 与模型组比较, 葛根芩连汤组 FPG、FINS 水平及 HbA1c 下降, IRS-2、PI3K p85、Akt2、p-IRS2、p-PI3K p85、p-Akt2 蛋白表达上升, IRS-2、PI3K p85 和 Akt2 mRNA 表达上升 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 葛根芩连汤可能是通过提高 IRS-2/PI3K-Akt 信号转导通路的活性起到保护胰岛 β 细胞的作用。

关键词 2 型糖尿病; 葛根芩连汤; 胰岛素受体底物 2; 磷脂酰肌醇 3 激酶; 蛋白激酶 B

2 型糖尿病 (diabetes mellitus type 2, T2DM) 是一种复杂的糖脂代谢紊乱性疾病。胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 和 β 细胞功能缺陷是 T2DM 发生的重要病理生理机制^[1]。随着对 T2DM 发病机制研究的深入, 人们逐步发现胰岛细胞上同样存在着胰岛素受体及下游信号通路^[2], 并认识到胰岛细胞与外周组织和肝脏一样也存在着胰岛素抵抗^[3-4], 胰岛细胞既是胰岛素分泌的器官也是胰岛素作用的靶器官。胰岛受体底物 (IRS) 蛋白家族介导的 IRS/PI3K-Akt 胰岛素信号转导通路在胰岛细胞生长、增殖、凋亡及胰岛素的分泌代谢过程中起到重要作用^[5]。胰岛细胞胰岛素抵抗导致的胰岛 β 细胞损伤可能是 T2DM 早期发病机制中的重要环节^[6]。T2DM 早期特点与中医“脾瘅”“肠道湿热证”类似, 所以在 T2DM 早期的治疗中运用具有清热燥湿功效的葛根芩连汤, 取得显著的疗效^[7]。前期实验已初步证实, 葛根芩连汤能通过改善糖脂代谢、肝脏与外周组织胰岛素抵抗及胰岛

素敏感度来发挥治疗 T2DM 的作用^[8]。本研究旨在研究葛根芩连汤对 2 型糖尿病 ZDF 大鼠胰岛细胞的保护机制, 为葛根芩连汤防治 T2DM 提供更多的理论依据。

1 材料

1.1 动物

雄性 ZDF (fa/fa) 大鼠 24 只及雄性 ZDF (fa/+) 大鼠 8 只, 购自北京维通利华实验技术有限公司, 实验动物许可证号: SCXK 京 2012-0001, 7~8 周龄, 体重 (200 ± 20) g。大鼠在 SPF 级屏障环境中饲养, 由甘肃中医药大学实验动物中心饲养 (实验动物设施许可证号: SYXK 甘 2015-0005)。饲养条件: 温度 (23 ± 2) °C、湿度 (55 ± 5) %、12 h/12 h 光照黑暗循环, 自由饮水摄食。

1.2 药品

盐酸二甲双胍肠溶片 (250 mg/片, 贵州天安药业股份有限公司, 批号 20160646)。葛根芩连汤制备: 根据前期预实验结果将葛根、黄芩、黄连、炙甘草按照 3 : 3 : 2 : 2 的比例进行水煎提取。加入 8 倍量的水, 浸泡 30 min, 葛根先煎 30 min,

基金项目: 中国博士后科学基金 (2014M560168)

* 通讯作者: 1317365093@qq.com, 15339312501

再和其余药物共煎 30 min, 用纱布滤取滤液, 残渣加 8 倍量水继续煎煮 30 min, 用纱布过滤后合并两次滤液, 使用旋转蒸发仪制成含生药 1.38 g/ml 的浓缩液^[9]。

1.3 主要试剂与仪器

LabDiet 5008 大鼠高脂饲料 (阆立 (上海) 生物科技有限公司, 批号 FEB11162/3_2]; 磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K) p85、蛋白激酶 B (Akt2)、HRP 羊抗鼠 IgG (H + L)、HRP 羊抗兔 IgG (H + L) 抗体 (美国 GeneTex 公司, 批号分别为: 821700022、40450、42781、42731); 胰岛素受体底物 2 (IRS-2)、磷酸化胰岛素受体底物 2 (p-IRS2)、磷酸化磷脂酰肌醇 3 激酶 (p-PI3K) p85、磷酸化蛋白激酶 B (p-Akt2 Thr308) 抗体 (美国 Abcam 公司, 批号分别为: GR219213-5、GR282501-5、GR194710-50、GR43522-43); β -actin 抗体 (美国 Immuno Way 公司, 批号: B3301); ECL 超敏发光液、PVDF 膜 (美国 Millipore 公司, 批号分别为: 1515601、R6KA9704H); GoScriptTM 反转录试剂盒、GoTaq[®] qPCR Master Mix 荧光定量试剂盒 (美国 Promega 公司, 批号分别为: 0000240839、0000229426); 动物组织总 RNA 提取试剂盒 (离心柱型) 天根生化科技 (北京) 有限公司, 批号: Q5419]; 胰岛素 (INS) ELISA 测定试剂盒 (中生北控股有限公司, 批号: 150519); 糖化血红蛋白 (HbA1c) 测定试剂盒 (挪威 AXIS-SHIELD 公司, 批号: FHHBS100)。Advantage 型血糖仪 (德国罗氏公司); T10BS25 型分散机 (德国 IKA 公司); 5427R 低温高速离心机 (德国 Eppendorf 公司); Infinite2000 PRO 全波长多功能微孔板分析系统 (瑞士 TECAN 公司); Power PacTM Basic 垂直电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); Chemi-Doc-IT610 化学发光成像系统 (美国 UVP 公司); ABI ViiATM 7 实时荧光定量 PCR 系统 (美国 ABI 公司); UV1100 紫外分光光度计 (上海天美科学仪器有限公司); RE52CS 真空旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂)。

2 方法

2.1 动物造模及分组

大鼠适应性喂养 3 天后, 将 8 只雄性 ZDF (fa/ +) 大鼠设为正常组, 给予生理盐水 10 ml/kg 灌胃, 普通饲料喂养。24 只雄性 ZDF (fa/fa) 大鼠给予高脂饲料诱导 3 周, 取不同两日随机血糖 ≥ 16.7 mmol/L 者为成模大鼠^[10]。24 只大鼠均造模

成功。为每只成模大鼠编号, 并在 Excel 中使用 Random 函数为每个编号选取一个随机数字, 将随机数字按大小排序, 用区组随机分法将成模大鼠分为模型组、葛根芩连汤组、二甲双胍组, 每组 8 只。模型组给予生理盐水灌胃, 葛根芩连汤组给予葛根芩连汤 13.8 g/kg 灌胃, 二甲双胍组给予盐酸二甲双胍肠溶片 300 mg/kg 灌胃。各组大鼠均按照 10 ml/kg 进行灌胃给药, 共给药 8 周。

2.2 标本收集

末次给药后, 禁食不禁水 10 h, 取尾静脉血检测空腹血糖 (FPG)。给予 10% 水合氯醛溶液 (3 ml/kg) 麻醉成功后, 腹主动脉取血, 将全血分为两部分, 一部分 4℃ 保存, 用于 HbA1c 检测, 另一部分静置后, 4℃ 4000 r/min 离心 5 min, 取血清 -20℃ 保存, 用于空腹胰岛素 (FINS) 含量的检测。分离胰腺, 用预冷的生理盐水洗清血迹后用滤纸吸去水分, 置于冻存管内 -80℃ 保存。

2.3 血液生化指标检测

ELISA 法测定 FINS 含量, 免疫抑制比浊法测定 HbA1c 百分含量, 均由北京华英生物技术研究所以进行检测。

2.4 Western blot 法检测胰腺 IRS-2、p-IRS2、PI3K p85、p-PI3K p85、Akt2、p-Akt2 蛋白表达

取各组大鼠胰腺提取总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 加入 4 × 蛋白上样缓冲液后加热变性。各组取 30 μ g 总蛋白上样, 在 SDS-PAGE 凝胶上电泳分离 (浓缩胶恒压 80 V, 分离胶恒压 100 V), 300 mA 恒流湿转至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉 (磷酸化蛋白使用 5% BSA) 室温轻摇封闭 2 h, 加入一抗, 室温轻摇 1 h 后放入 4℃ 冰箱过夜, PBST 洗膜 4 次, 8 min/次, 加入二抗室温轻摇 2 h 后使用 PBST 洗膜 4 次, 8 min/次, 加 ECL 超敏发光液, 化学发光成像系统曝光后分析目的蛋白条带灰度值, 并以 β -actin 条带灰度值为参考, 计算 IRS-2、PI3K p85、Akt2、p-IRS2、p-PI3K p85、p-Akt2 蛋白的相对表达量。

2.5 RT-qPCR 法检测 IRS-2、PI3K p85 和 Akt2 mRNA 表达

按动物组织总 RNA 提取试剂盒 (离心柱型) 操作说明书提取胰腺组织总 RNA, 使用紫外分光光度计测定 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值验证 RNA 纯度, 使用 GoScriptTM 反转录试剂盒将 mRNA 转录为 cDNA。按照 GoTaq[®] qPCR Master Mix 荧光定量试剂盒操作说明书配置反应体系, 在 ABI ViiATM 7 实时荧光定量 PCR 仪以三步法进行 PCR 反应, 反应程序设置

如下: 95℃ 预变性 10 min; 95℃ 变性 15 S, 60℃ 退火延伸 1 min; 延伸程序 95℃ 15 S、60℃ 15 S、95℃ 15 S。40 个循环后采集荧光信号, 重复 3 次实验。聚合酶链反应引物由 TaKaRa 宝日医生物技术(北京)有限公司合成, IRS-2 上游引物: 5'-TCTGC-CAGCACCTACGCAA-3', 下游引物: 5'-TGAG-CAGCGTTGTTGGAA-3'; PI3K p85 上游引物: 5'-CATTCCGGTGATCTCTATACCTTTG-3', 下游引物: 5'-TTGCTTTGACCTGACCCATCT-3'; Akt2 上游引物: 5'-ATGGACTTCCGGTCAGGTTCA-3', 下游引物: 5'-GCCCTTGCCAGCTTCA-3'; β 肌动蛋白(β-actin) 上游引物: 5'-CCTCTATGCCAACA-CAGTGC-3', 下游引物: 5'-AAGGGTGTAAACG-CAGCTC-3'。用参照基因 ΔΔCT 法计算基因的相对表达量, 用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示。

2.6 统计学方法

采用 SPSS 24.0 统计软件处理, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间样本比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 各组大鼠 FPG、FINS、HbA1c 含量比较

表 1 示, 与正常组比较, 模型组 FPG、FINS、HbA1c 升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 二甲双胍组和葛根芩连汤组 FPG、FINS、HbA1c 下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与二甲双胍组比较, 葛根芩连汤组 HbA1c 下降 ($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠 FPG、FINS、HbA1c 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	FPG (mmol/L)	FINS (μIU/ml)	HbA1c (%)
正常组	8	3.97 ± 0.52	8.85 ± 1.41	4.60 ± 0.99
模型组	8	21.15 ± 6.97*	22.85 ± 2.74*	9.43 ± 0.48*
二甲双胍组	8	14.15 ± 6.51 ^Δ	17.56 ± 4.33 ^Δ	8.63 ± 0.20 ^Δ
葛根芩连汤组	8	13.58 ± 5.33 ^Δ	15.46 ± 4.73 ^{ΔΔ}	7.76 ± 0.42 ^{ΔΔ▲}

注: FPG, 空腹血糖; FINS, 空腹胰岛素; HbA1c, 糖化血红蛋白; 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与二甲双胍组比较, $\Delta P < 0.01$ 。

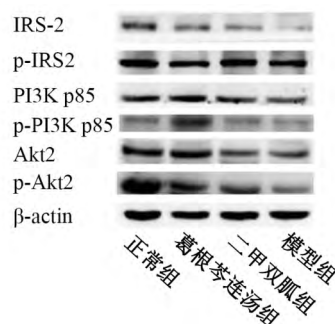
表 2 各组大鼠胰腺 IRS-2、p-IRS2、PI3K p85、p-PI3K p85、Akt2、p-Akt2 蛋白表达比较 (/β-actin, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	IRS-2	p-IRS2	PI3K p85	p-PI3K p85	Akt2	p-Akt2
正常组	8	0.60 ± 0.02	0.81 ± 0.02	0.63 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.90 ± 0.07	0.67 ± 0.03
模型组	8	0.17 ± 0.01*	0.64 ± 0.01*	0.52 ± 0.01*	0.11 ± 0.00	0.44 ± 0.01*	0.22 ± 0.02*
二甲双胍组	8	0.36 ± 0.01 ^{ΔΔ}	0.71 ± 0.03 ^{ΔΔ}	0.60 ± 0.02 ^{ΔΔ}	0.14 ± 0.02	0.45 ± 0.01	0.40 ± 0.03 ^{ΔΔ}
葛根芩连汤组	8	0.48 ± 0.03 ^{ΔΔ▲▲}	0.78 ± 0.02 ^{ΔΔ▲▲}	0.77 ± 0.01 ^{ΔΔ▲▲}	0.25 ± 0.01 ^{ΔΔ▲}	0.85 ± 0.01 ^{ΔΔ▲▲}	0.31 ± 0.03 ^{ΔΔ▲▲}

注: IRS-2, 胰岛素受体底物 2; p-IRS2, 磷酸化胰岛素受体底物 2; PI3K p85, 磷脂酰肌醇 3 激酶 p85; p-PI3K p85, 磷酸化磷脂酰肌醇 3 激酶 p85; Akt2, 蛋白激酶 B; p-Akt2, 磷酸化蛋白激酶 B; 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与二甲双胍组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

3.2 各组大鼠胰腺 IRS-2、PI3K p85、Akt2、p-IRS2、p-PI3K p85、p-Akt2 蛋白表达比较

表 2 示, 与正常组比较, 模型组 IRS-2、p-IRS2、PI3K p85、Akt2、p-Akt2 表达下降 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 二甲双胍组 IRS-2、PI3K p85、p-IRS2、p-Akt2 表达和葛根芩连汤组 IRS-2、p-IRS2、PI3K p85、Akt2、p-PI3K p85、p-Akt2 表达升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与二甲双胍组比较, 葛根芩连汤组 IRS-2、PI3K p85、Akt2、p-IRS2、p-PI3K p85 表达升高, p-Akt2 表达下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。



注: IRS-2, 胰岛素受体底物 2; p-IRS2, 磷酸化胰岛素受体底物 2; PI3K p85, 磷脂酰肌醇 3 激酶 p85; p-PI3K p85, 磷酸化磷脂酰肌醇 3 激酶 p85; Akt2, 蛋白激酶 B; p-Akt2, 磷酸化蛋白激酶 B; β-actin, β 肌动蛋白。

图 1 各组大鼠胰腺 IRS-2、p-IRS2、PI3K p85、p-PI3K p85、Akt2、p-Akt2 蛋白表达电泳图

3.3 各组大鼠胰腺 IRS-2、PI3K p85 及 Akt2 mRNA 表达比较

表 3 示, 与正常组比较, 模型组 IRS-2、PI3K p85、Akt2 mRNA 表达下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, 葛根芩连汤组 IRS-2、PI3K p85、Akt2 和二甲双胍组 PI3K p85 mRNA 表达升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与二甲双胍组比较, 葛根芩连汤组 IRS-2、PI3K p85、Akt2 mRNA 表达升高 ($P < 0.01$)。

表 3 各组大鼠胰腺 IRS-2、PI3K p85 及 Akt2 mRNA 表达比较 ($2^{-\Delta\Delta CT}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	IRS-2	PI3K p85	Akt2
正常组	8	1.000	1.000	1.000
模型组	8	0.062 ± 0.186 ^{**}	0.404 ± 0.156 [*]	0.164 ± 0.135 [*]
二甲双胍组	8	0.105 ± 0.391	0.781 ± 0.043 [△]	0.145 ± 0.038
葛根芩连汤组	8	0.292 ± 0.074 ^{△△}	1.402 ± 0.174 ^{△△}	0.220 ± 0.008 ^{△△}

注: IRS-2, 胰岛素受体底物 2; PI3K p85, 磷脂酰肌醇 3 激酶 p85; Akt2, 蛋白激酶 B; 与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与二甲双胍组比较, $\Delta P < 0.01$

4 讨论

葛根芩连汤出自张仲景《伤寒论》，曰“太阳病，桂枝证，医反下之，利遂不止。脉促者，表未解也；喘而汗出者，葛根黄芩黄连汤主之”。方中葛根升津润燥，除内热；黄芩、黄连清热燥湿；甘草甘缓和中。全方解表清里，清热止利，被历代医家用来治疗湿热所致的泄泻与痢疾。有学者认为，T2DM 早期多因患者过食肥甘厚味导致胃纳太过而脾运不及，进而积于中焦，脾不运化而生湿，湿郁日久而化热，湿热内阻而致肠道湿热，体内痰湿积聚，血糖调节受损，与《黄帝内经》所描述的“脾瘅”极为相似^[1]。《素问·奇病论》云：“有病口甘者，病名为何？何以得之？岐伯曰：此五气之溢也，名曰脾瘅。夫五味入口，藏于胃，脾为之行其精气。精液在脾，故令人口甘也。此肥美之所发也。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。”防治 T2DM 早期病症的关键点在于清热燥湿，使用具有清肠燥湿之效的葛根芩连汤治疗 T2DM 早期病症切中其“中满内热，湿热内阻”的病机，是经方新用，症、证、病结合的辨治模式的具体体现^[7,12]。研究证实，葛根芩连汤可以有效降低 T2DM 大鼠 FPG、甘油三酯、总胆固醇，改善肝胰岛素抵抗，提高大鼠抗氧化酶活性，调节大鼠糖耐量，从而达到防治 T2DM 的作用^[8,13]。

IRS-2 是维持胰岛 β 细胞功能的重要信号蛋白，其缺乏将会导致胰岛 β 细胞数量减少^[14]。IRS-2 介导的 PI3K-Akt 胰岛素信号转导通路在胰岛细胞生长、增殖及凋亡中起到重要作用。当胰岛素与胰岛 β 细胞上的胰岛素受体结合后，会导致其自身的磷酸化并使 IRS-2 酪氨酸位点磷酸化。酪氨酸磷酸化的 IRS-2 与 PI3K 的调节亚基 p85 结合，进而激活 PI3K。活化的 PI3K 将磷脂酰肌醇-1-磷酸转化为磷脂酰肌醇-2-磷酸和磷脂酰肌醇-3-磷酸，并作为其第二信使激活 Akt。活化的 Akt 可通过不同的下游底物调节胰岛 β 细胞大小、数量及胞内的

基因转录^[15-16]。有实验证实肥胖的过程中，脂肪组织会分泌大量的炎症细胞因子，并激活细胞因子信号传导抑制因子 (SOCSs) 的表达，过量的 SOCSs 会和 IRS-1、IRS-2 结合，阻断胰岛素对胰岛素抵抗的磷酸化和 IRS-1、IRS-2 酪氨酸位点磷酸化，进而抑制 PI3K-Akt 信号通路的激活，导致胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞损伤^[17-18]。

本研究结果显示，与正常组大鼠相比，模型组大鼠 FPG、FINS、HbA1c 显著升高，胰腺 IRS-2、PI3K p85、Akt2、p-IRS2、p-Akt2 蛋白表达，IRS-2、PI3K p85、Akt2 mRNA 表达显著下降。给予葛根芩连汤治疗 8 周后，葛根芩连汤组大鼠 FPG、FINS、HbA1c 水平下降，胰腺 IRS-2、PI3K p85、Akt2、p-IRS2、p-PI3K p85、p-Akt2 蛋白表达，IRS-2、PI3K p85、Akt2 mRNA 表达显著升高，提示葛根芩连汤可减轻 ZDF 大鼠胰岛素抵抗，通过提高 IRS-2/PI3K-Akt 信号转导通路的活性达到保护胰岛 β 细胞的作用。

胰岛 β 细胞功能受损和胰岛素抵抗所涉及的信号通路错综复杂，本实验仅探讨了葛根芩连汤对 IRS-2/PI3K-Akt 胰岛素信号转导通路的影响，有关葛根芩连汤对胰岛 β 细胞的保护机理仍需进行后续实验进行验证，以期能为葛根芩连汤防治 T2DM 提供更多的实验依据。

参考文献

- [1] VAN DE WEIJER T, SCHRAUWEN-HINDERLING VB, SCHRAUWEN P. Lipotoxicity in type 2 diabetic cardiomyopathy [J]. Cardiovasc Res, 2011, 92(1): 10-18.
- [2] HARBECK MC, LOUIE DC, HOW LANG J, et al. Expression of insulin receptor mRNA and insulin receptor substrate-1 in pancreatic islet beta-cells [J]. Diabetes, 1996, 45(6): 711-717.
- [3] KAHN SE. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of type 2 diabetes [J]. Diabetologia, 2003, 46(1): 3-19.
- [4] 赵家伟, 马凤海, 罗梅, 等. 胰岛 β 细胞胰岛素抵抗的证据 [J]. 中华内分泌代谢杂志, 2005, 21(4): 408-409.

- [5] 舒适, 宋菊敏. 胰岛素受体底物-1/-2 与胰岛素信号转导 [J]. 医学综述, 2008, 14(5): 723-725.
- [6] OZCAN U, CAO Q, YILMAZ E, et al. Endoplasmic reticulum stress kinks obesity, insulin action, and type 2 diabetes [J]. Science, 2004, 306(5695): 457-461.
- [7] 赵林华, 连凤梅, 姬航宇, 等. 全小林教授运用不同剂量葛根芩连汤治疗 2 型糖尿病验案 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 249-251.
- [8] 李颖萌, 范雪梅, 王义明, 等. 葛根芩连汤对 2 型糖尿病大鼠的治疗作用及其机制探讨 [J]. 药学学报, 2013, 48(9): 1415-1421.
- [9] 武志黔, 郝改梅, 何洁, 等. 葛根芩连汤对 2 型糖尿病大鼠表征的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(11): 106-110.
- [10] ETGEN GJ, OLDHAM BA. Profiling of Zucker diabetic fatty rats in their progression to the overt diabetic state [J]. Metabolism, 2000, 49(5): 684-688.
- [11] 赵锡艳, 王松, 周强, 等. 全小林教授应用葛根芩连汤治疗 2 型糖尿病辨治思路 [J]. 环球中医药, 2012, 5(12): 918-920.
- [12] 全小林, 周强, 刘文科. 经方新用的思索 [J]. 中医杂志, 2011, 52(11): 901-903.
- [13] 熊淑平, 章常华, 邓永兵, 等. 葛根芩连汤改善 KK-Ay 糖尿病小鼠糖脂代谢作用的实验研究 [J]. 时珍国医

国药, 2016, 27(9): 2090-2092.

- [14] KUBOTA N, TOBE K, TERAUCHI Y, et al. Disruption of insulin receptorsubstrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory β -cell hyperplasia [J]. Diabetes, 2000, 49(11): 1880-1889.
- [15] LIN P, CHENG H, ROBERTS TM, et al. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer [J]. Nat Rev Drug Discov, 2009, 8(8): 627-644.
- [16] PENDE M, KOZMA SC, JAQUET M, et al. Hypoinsulinaemia, glucose intolerance and diminished beta-cell size in S6K1-deficient mice [J]. Nature, 2000, 408(6815): 994-997.
- [17] LEBRUN P, COGNARD E, BELLON-PAUL R, et al. Constitutive expression of suppressor of cytokine signaling-3 in skeletal muscle leads to reduced mobility and overweight in mice [J]. Diabetologia, 2009, 52(10): 2201-2212.
- [18] YASPELKIS BB 3RD, KVASHA IA, FIGUEROA TY. High-fat feeding increases insulin receptor and IRS-1 co-immunoprecipitation with SOCS-3, IKK α /beta phosphorylation and decreases PI-3kinase activity in muscle [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2009, 296(6): R1709-R1715.

Effect of *Gegen Qinlian Decoction* (葛根芩连汤) on IRS-2/PI3K-Akt Pathway in Islet Cells of Type 2 Diabetes Model Rats

ZHOU Qi¹, ZHU Xiangdong¹, TONG Xiaolin², WANG Ye¹, SI Xiaoli¹, WANG Yan¹

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou, 730000; Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Gegen Qinlian Decoction* (葛根芩连汤) in protecting islet cells of newly diagnosed type 2 diabetic rats. **Methods** A total of 24 male ZDF (fa/fa) rats were given high-fat diet to induce type 2 diabetes mellitus. After the model was successfully established, the rats were randomly divided into *Gegen Qinlian Decoction* group, metformin group, model group, with 8 rats in each group. 8 male ZDF (fa/+) rats were used as negative control group. The model group and negative control group were given by gavage with normal saline 10 ml/kg, and *Gegen Qinlian Decoction* group was given by gavage with *Gegen Qinlian Decoction* 13.8 g/kg. Metformin group was given by gavage with metformin 300 mg/kg. After 8 weeks of administration, the expression of IRS-2, PI3K p85, Akt2, p-IRS2, p-PI3K p85 and p-Akt2 in the pancreas was detected by Western blot. The expression of IRS-2, PI3K p85 and Akt2 mRNA was detected by RT-qPCR. The content of FINS was determined by ELISA. The percentage of HbA1c was determined by TINIA. **Results** Compared with model group, the FPG level, FINS levels and HbA1c ratio was declined, and IRS-2, PI3K, Akt protein expression, mRNA expression ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) and p-IRS2, p-PI3K p85, p-Akt2 protein expression ($P < 0.01$) was increased in *Gegen Qinlian Decoction* group. **Conclusion** *Gegen Qinlian Decoction* may be through the enhancement of IRS-2/PI3K-Akt pathway to achieve the role of protection of pancreatic β -cells.

Keywords *Gegen Qinlian Decoction* (葛根芩连汤); diabetes mellitus type 2; IRS-2; PI3K; Akt

(收稿日期: 2017-10-10; 修回日期: 2018-01-24)

编辑: 王利芬