

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2021.23.011

实验研究

葛根芩连汤加味对 2 型糖尿病模型大鼠骨骼肌 CAP/Cb1/TC10 信号通路的影响

杨霞¹, 王志刚², 周琦¹, 柳荣¹, 朱向东¹✉

1. 甘肃中医药大学, 甘肃省兰州市定西东路 35 号, 730000; 2. 甘肃省天水市中医医院

[摘要] **目的** 探讨葛根芩连汤加味治疗 2 型糖尿病的可能作用机制。**方法** 48 只 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、二甲双胍组及葛根芩连汤加味高、中、低剂量组, 每组 8 只。除空白组外, 其余各组大鼠给予高脂饲料联合链脲佐菌素 (STZ) 诱导建立 2 型糖尿病模型。模型组、空白组给予生理盐水 10 ml/kg 灌胃, 葛根芩连汤高、中、低剂量组分别给予葛根芩连汤加味 27.2、13.6、6.8 g/kg 灌胃, 二甲双胍组给予 0.15 g/kg 盐酸二甲双胍肠溶片灌胃, 各组均每天 1 次。8 周后检测大鼠空腹血糖 (FBG), 血清空腹胰岛素 (FINS)、游离脂肪酸 (FFA), 全血糖化血红蛋白 (HbA1c), 骨骼肌 Cb1 相关蛋白 (CAP)、磷酸化大麻素受体 1 (p-Cb1)、小 GTP 结合蛋白 (TC10)、葡萄糖转运蛋白 4 (GLUT4) 蛋白及 mRNA 表达。HE 染色观察骨骼肌病理形态。**结果** 与模型组比较, 骨骼肌组织病理形态显示随着葛根芩连汤加味剂量的增加, 骨骼肌细胞染色清晰, 细胞质较深, 细胞间距减小, 二甲双胍组和葛根芩连汤加味高剂量组 FBG、FINS、FFA、HbA1c 水平下降, CAP、p-Cb1、TC10、GLUT4 蛋白及 mRNA 表达均升高; 葛根芩连汤加味中剂量组 FBG、FINS、FFA 水平下降, CAP、p-Cb1、GLUT4 蛋白表达升高, CAP、GLUT4 mRNA 表达升高; 葛根芩连汤加味低剂量组 FBG 水平下降, GLUT4 mRNA 表达升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 葛根芩连汤加味可以调节糖脂代谢, 改善胰岛素抵抗, 以高剂量效果最佳, 其作用机制可能与激活骨骼肌 CAP/Cb1/TC10 信号通路有关。**[关键词]** 2 型糖尿病; 葛根芩连汤; 骨骼肌; 衔接蛋白; 原癌基因蛋白; 葡萄糖转运蛋白 4

2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 是一种以持续性高血糖为主要临床特征的代谢性疾病^[1]。T2DM 病因多与禀赋不足、饮食失节、运动失调等有关^[2], 其主要发病机制有胰岛素抵抗 (IR) 和胰岛 β 细胞受损。IR 指胰岛素作用的靶器官 (如肝脏、脂肪组织、骨骼肌) 对胰岛素作用失去了正常的敏感性, 机体对葡萄糖的利用出现障碍, 为了维持血糖的稳定性而代偿性分泌过多的胰岛素引起的高胰岛素血症^[3-4]。在骨骼肌组织中, 胰岛素与其受体相结合, 使受体磷酸化, Cb1 相关蛋白 (CAP)/大麻素受体 1 (Cb1)/小 GTP 结合蛋白 (TC10) 信号通路被启动, 从而影响细胞对葡萄糖的摄入。CAP/Cb1/TC10 胰岛素信号转导通路障碍

会导致葡萄糖摄取和利用率下降^[5]。研究证实, 葛根芩连汤可以调节 T2DM 患者的糖脂代谢, 改善胰岛素敏感性和 IR, 从而提高患者的生活质量^[6], 但具体机制尚不清楚。全小林院士使用葛根芩连汤治疗 T2DM 时, 常加入干姜以防苦寒药物伐胃^[7], 所以本研究用葛根芩连汤加入干姜进行实验。本实验旨在探讨葛根芩连汤对 T2DM 模型大鼠骨骼肌 CAP/Cb1/TC10 信号通路的影响, 探讨其可能的分子作用机制, 为葛根芩连汤防治 T2DM 提供实验依据。本实验符合甘肃中医药大学动物实验伦理要求。

1 材料与方法

1.1 动物

58 只 SPF 级 SD 雄性大鼠, 6~8 周龄, 体质量 200~230 g, 购自甘肃中医药大学动物实验中心, 实验动物生产许可证号: SCXK (甘) 2015-0002, 实验动物使用许可证号: SYXK 甘 2015-0005。于

基金项目: 甘肃省中医药管理局中医药防治重大疾病科研课题 (GZKZD-2018-01)

✉ 通讯作者: zhuxiangdong33@163.com

SPF 级动物实验室繁殖区饲养, 室内温度 18~22 ℃, 湿度 40%~70%, 光照 10~12 h, 常规饲料喂养, 自由饮水。

1.2 药物

盐酸二甲双胍肠溶片 (0.25 mg/片, 批号 20180612, 贵州天安药业股份有限公司)。葛根芩连汤加味制备: 葛根、黄连、黄芩、炙甘草、干姜按 3:3:3:2:0.5 比例水煎提取。加入 8 倍量蒸馏水, 浸泡 30 min, 煎煮 30 min, 用筛网滤取滤液, 残渣加 8 倍量蒸馏水继续煎煮 30 min, 用筛网过滤后合并两次滤液, 用旋转蒸发仪制成含生药 0.68、1.36、2.72 g/ml 药液。

1.3 主要试剂及仪器

高脂饲料 (组成: 67% 基础饲料+10% 猪油+20% 蔗糖+2.5% 胆固醇+0.5% 胆酸钠, 北京科澳协力饲料有限公司); 山羊抗 IgG (批号: 26616)、TC10 抗体 (批号: Ab32079), 美国 Abcam 公司; TRIeasy™ Total RNA Extraction Reagent (批号: 10606ES60)、Hifair II 1st Strand cDNA Synthesis Super Mix for qPCR (批号: H4901030)、Hifair™ qPCR SYBR Green Master Mix (批号: H3912240), 上海 YESEN 公司; CAP 抗体 (批号: F3010), 美国 Santa Cruz 公司; 磷酸化大麻素受体 1 (p-Cbl) 抗体 (批号: GTX55004)、葡萄糖转运蛋白 4 (GLUT4) 抗体 (批号: GTX33221), 美国 GeneTex 公司; GAPDH 抗体 (批号: YM3215), 美国 Immunoway 公司; 胰岛素 (FINS) 试剂盒 (批号: F3565-A)、游离脂肪酸 (FFA) 试剂盒 (批号: F3200-A), 江苏菲亚生物科技有限公司; 糖化血红蛋白 (HbA1c) 试剂盒 (批号: F3384-A), 南京建成生物工程研究所; BCA 蛋白定量试剂盒 (批号: PC0020)、RIPA 裂解液 (批号: R0010)、甘氨酸 (批号: G8200)、蛋白上样缓冲液 (批号: P1041)、伊红染液 (批号: 20181212)、苏木素染液 (批号: 20190701), 北京索莱宝公司; ECL 发光液 (批号: P36599), 美国 MILLIPORE 公司; 链脲佐菌素 (批号: 1206R023)、多聚甲醛 (批号: 20190129), 北京索莱宝公司; 水合氯醛 (批号: 20190504), 天津市大茂化学试剂厂。

ACCU-CHEK 型血糖仪 (德国罗氏公司); TGL-16 型高速低温台式离心机 (德国 Eppendorf 公司); DYCZ-25D 型双垂直电泳仪、DYCZ-40G 型转膜仪, 北京六一生物科技公司; MiniChemi 610 型

化学发光成像仪 (北京赛智科技有限公司); Step One Plus 型实时定量 PCR 仪 (美国 Thermo 公司); iMark 型酶标仪 (美国 Bio Rad 公司); ND-ONE-W NanoDrop 型核酸浓度测量仪 (美国 Thermo 公司); RX50 型显微镜 (宁波舜宇仪器有限公司); RM2016 生物组织切片机 (德国 LEICA 公司)。

1.4 动物造模、分组及给药

58 只 SD 大鼠采用随机数字表法选取 8 只作为空白组, 饲喂普通饲料。其余 50 只大鼠饲喂高脂饲料, 4 周后禁食不禁水 12 h, 一次性腹腔注射链脲佐菌素 (STZ) 35 mg/kg, 3 天后从尾静脉采血测量随机血糖, 血糖 ≥ 16.7 mmol/L 为造模成功标准, 血糖 < 16.7 mmol/L 的大鼠 3 天后再次腹腔注射 STZ 30 mg/kg, 仍未达标的大鼠则剔除^[8-10]。共 40 只大鼠造模成功, 为每只成模大鼠编号, 并在 Excel 2010 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, 用区组随机分法分为模型组、二甲双胍组及葛根芩连汤加味高、中、低剂量组, 每组 8 只。参照人和动物剂量换算常规算法^[11], 即大鼠给药量为人的 6 倍计算给药剂量, 空白组和模型组灌胃 10 ml/kg 生理盐水; 葛根芩连汤加味高、中、低剂量组分别给予 27.2、13.6、6.8 g/kg 葛根芩连汤加味药液灌胃, 其中中剂量为等效剂量。二甲双胍组给予盐酸二甲双胍肠溶片 0.15 g/kg。各组均每天灌胃 1 次, 共 8 周。

1.5 观察指标及方法

大鼠末次给药后, 禁食不禁水。第二天早晨采集尾静脉血后, 腹腔注射 10% 水合氯醛 (0.3 ml/100 g) 麻醉, 心脏采血, 3~4 ml 置于离心管中, 静置 1 h, 高速离心机 4 ℃、3000 r/min 离心 15 min (离心半径 13.5 cm), 用移液器抽取上层血清, 保存于 -20 ℃ 的冰箱中待用; 2 ml 置于含有 EDTA 的抗凝采血管中, 在 4 ℃ 冰箱中保存。分离骨骼肌, 生理盐水洗去血渍和毛发, 滤纸吸干水分, 2~4 g 置于无 RNA 酶的 EP 管中于 -80 ℃ 冰箱中冻存, 2~3 g 固定于 4% 多聚甲醛溶液中, 4 ℃ 冰箱中保存。

1.5.1 空腹血糖 (FBG) 检测 用血糖仪检测尾静脉血。

1.5.2 血清 FINS、FFA 及全血 HbA1c 含量 采用酶联免疫吸附 (ELISA) 法测定心脏血清 FINS、FFA 以及全血 HbA1c, 操作严格按照说明书进行。

1.5.3 骨骼肌组织病理形态 将固定于 4% 多聚甲醛溶液中的骨骼肌组织按照常规方法石蜡包埋和

切片, 切片厚度约为 4 μm ; 进行 HE 染色, 显微镜下观察骨骼肌组织病理形态。

1.5.4 Western blot 法检测骨骼肌 CAP、p-Cb1、TC10、GLUT4 蛋白表达 取 200 mg 左右大鼠骨骼肌提取总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 加入 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液后加热变性。上样 (上样量为每孔 20~30 μg , 上样体积为 4 μl), 连接电泳仪电源, 开始电泳 (电压参数设置 80 V, 预染蛋白散开后将电压调至 100 V), 当蛋白电泳至玻璃板下方边缘处时停止。转膜, 5% 封闭液 (2 g 脱脂奶粉+40 ml TBST) 室温轻摇封闭 2 h。加入一抗 CAP (1: 1000)、p-Cb1 (1: 1000)、TC10 (1: 1000)、GLUT4 (1: 1000)、GAPDH (1: 2000), 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜, TBST 冲洗 3 或 4 次, 10 min/次, 加入解冻的二抗 (1: 6000), 室温轻摇 2 h 倒掉二抗, 继续用 TBST 清洗 3 或 4 次。加 ECL 发光液, 曝光显影, 根据其曝光的条带用 Image J v1. 8. 0 软件分析处理。并以 GAPDH 条带灰度值为参考, 计算 CAP、p-Cb1、TC10、GLUT4 蛋白的相对表达量。

1.5.5 RT-qPCR 法检测骨骼肌 CAP、Cb1、TC10、GLUT4 mRNA 表达 将大鼠骨骼肌组织进行裂解, 按试剂盒方法提取样本总 RNA, 定量并检测样品 RNA 纯度, 将提取的 RNA 用反转录试剂盒转录为 cDNA, 扩增目的基因, 反应条件设定为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, 39 个循环。引物由 TAKARA 公司合成。引物序列: GAPDH 上游: 5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3', 下游: 5'-ATGGTGCTGAAGACGCCAGTA-3', 扩增片段 143 bp; CAP 上游: 5'-GGGGAGAAAGTGGTCAA GAGG-3', 下游: 5'-TGGGCTCTGCTCGGTATTTT-3', 扩增片段 136 bp; Cb1 上游: 5'-TGTCTCCCA TTTCAAGCAAGGAG-3', 下游: 5'-CATTCGAGCCC

ACGTAGAGGA-3', 扩增片段 178 bp; TC10 上游: 5'-TGGGACTCTATGACACAGCTGGA-3', 下游: 5'-TGAAATGAGGCTGGATTTACCACA-3', 扩增片段 115 bp; GLUT4 上游: 5'-CCGGGACACTATACCCT ATTCA-3', 下游: 5'-AGGACCAGTGTCCCACTCAC TC-3', 扩增片段 138 bp。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 定量法计算各组 mRNA 表达水平。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件, 计量资料呈正态分布, 采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 组间样本比较采用单因素方差分析, 方差齐性的两两比较采用 LSD 法, 方差不齐的两两比较用 Dunnett's 法。以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠 FBG、FINS、FFA、HbA1c 比较

表 1 示, 与空白组比较, 模型组 FBG、FINS、FFA、HbA1c 显著升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 二甲双胍组和葛根芩连汤加味高剂量组 FBG、FINS、FFA、HbA1c 水平, 葛根芩连汤加味中剂量组 FBG、FINS、FFA 水平, 葛根芩连汤加味低剂量组 FBG 水平显著下降 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与二甲双胍组比较, 葛根芩连汤加味中、高剂量组 FBG 水平, 葛根芩连汤加味低剂量组 FBG、FINS、HbA1c 水平显著上升 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与葛根芩连汤加味高剂量组比较, 葛根芩连汤加味中剂量组 FBG 水平, 葛根芩连汤加味低剂量组 FBG、FFA 水平显著上升 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与葛根芩连汤加味中剂量组比较, 葛根芩连汤加味低剂量组 FBG 水平显著上升 ($P<0.01$)。

2.2 各组大鼠骨骼肌组织病理结果

图 1 示, 空白组大鼠骨骼肌中细胞形态结构正

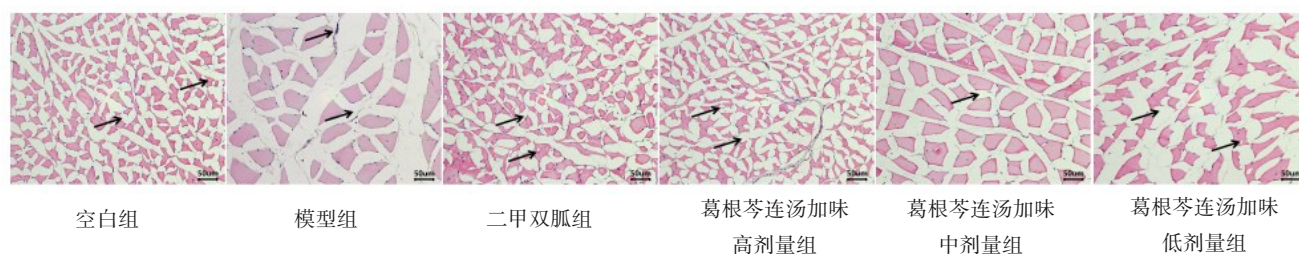
表 1 各组大鼠 FBG、FINS、FFA、HbA1c 水平比较

($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	FBG/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	FINS/ $\text{mU}\cdot\text{L}^{-1}$	FFA/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	HbA1c/每 10 g 血红蛋白吸光度值
空白组	8	4.55 $\pm$ 0.89	20.45 $\pm$ 3.15	825.94 $\pm$ 122.92	50.01 $\pm$ 7.96
模型组	8	23.11 $\pm$ 1.61 ^{a)}	27.39 $\pm$ 2.65 ^{a)}	1163.44 $\pm$ 169.48 ^{a)}	73.30 $\pm$ 7.99 ^{a)}
二甲双胍组	8	13.66 $\pm$ 1.15 ^{c)}	21.33 $\pm$ 2.28 ^{c)}	913.44 $\pm$ 159.72 ^{c)}	52.92 $\pm$ 7.11 ^{c)}
葛根芩连汤加味高剂量组	8	14.93 $\pm$ 1.13 ^{c) d)}	22.72 $\pm$ 3.00 ^{c)}	875.94 $\pm$ 128.25 ^{c)}	58.93 $\pm$ 9.67 ^{b)}
葛根芩连汤加味中剂量组	8	16.24 $\pm$ 0.94 ^{c) e) f)}	23.99 $\pm$ 2.95 ^{b)}	988.44 $\pm$ 176.58 ^{b)}	61.43 $\pm$ 7.89
葛根芩连汤加味低剂量组	8	18.13 $\pm$ 1.53 ^{c) e) g) h)}	24.53 $\pm$ 3.21 ^{d)}	1068.13 $\pm$ 182.58 ^{f)}	66.03 $\pm$ 9.82 ^{d)}

注: FBG, 空腹血糖; FINS, 空腹胰岛素; FFA, 游离脂肪酸; HbA1c, 糖化血红蛋白。

a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与模型组比较, $P<0.01$; d) 与二甲双胍组比较, $P<0.05$; e) 与二甲双胍组比较, $P<0.01$; f) 与葛根芩连汤加味高剂量组比较, $P<0.05$; g) 与葛根芩连汤加味高剂量组比较, $P<0.01$; h) 与葛根芩连汤加味中剂量组比较, $P<0.01$ 。



注：箭头所指为细胞空隙和空泡。

图1 各组大鼠骨骼肌组织病理形态 (HE 染色, ×400)

常, 胞质染色均一较深, 无炎性细胞浸润。与空白组大鼠相比, 模型组大鼠骨骼肌细胞染色清晰, 胞质染色较浅, 可见少量的炎性细胞浸润, 细胞间距较大。与模型组相比, 二甲双胍组和葛根芩连汤加味高、中、低剂量组大鼠骨骼肌细胞染色清晰可见, 胞质染色较深, 细胞间距随着葛根芩连汤加味剂量的增大而减小, 且葛根芩连汤加味高剂量组和二甲双胍组接近空白组, 染色均匀, 细胞空泡显著减少。

2.3 各组大鼠骨骼肌组织中 CAP、p-Cb1、TC10、GLUT4 蛋白表达比较

表2示, 与空白组比较, 模型组大鼠骨骼肌中 CAP、p-Cb1、TC10、GLUT4 蛋白表达显著下降 ($P<0.01$); 与模型组比较, 二甲双胍组和葛根芩连汤加味高剂量组 CAP、p-Cb1、TC10、GLUT4 蛋白表达, 葛根芩连汤加味中剂量组 CAP、GLUT4、p-Cb1 蛋白表达均显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与二甲双胍组比较, 葛根芩连汤加味高剂量组 p-Cb1 蛋白表达显著升高 ($P<0.01$), 葛根芩连汤加味低剂量组 CAP、p-Cb1、TC10、GLUT4 蛋白表达显著下降 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与葛根芩连汤加味高剂量组比较, 葛根芩连汤加味中剂量组 p-Cb1、TC10 蛋白表达, 葛根芩连汤加味低剂量组

CAP、p-Cb1、TC10、GLUT4 蛋白表达均显著下降 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与葛根芩连汤加味中剂量组比较, 葛根芩连汤加味低剂量组 CAP 蛋白表达下降 ($P<0.05$)。各组大鼠骨骼肌 CAP、p-Cb1、TC10、GLUT4 蛋白电泳图见图2。

2.4 各组大鼠骨骼肌组织 CAP、Cb1、TC10、GLUT4 mRNA 表达比较

表3示, 与空白组比较, 模型组大鼠骨骼肌中 CAP、Cb1、TC10、GLUT4 mRNA 表达显著下降 ($P<0.01$)。与模型组比较, 二甲双胍组、葛根芩连汤加味高剂量组 CAP、Cb1、TC10、GLUT4 mRNA 表达, 葛根芩连汤加味中剂量组 CAP、GLUT4 mRNA 表达, 葛根芩连汤加味低剂量组 GLUT4 mRNA 表达均显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与二甲双胍组比较, 葛根芩连汤加味高剂量组 Cb1 mRNA 表达, 葛根芩连汤加味低剂量组 CAP、TC10、GLUT4 mRNA 表达显著下降 ($P<0.05$)。与葛根芩连汤加味高剂量组比较, 葛根芩连汤加味中剂量组 Cb1、TC10、GLUT4 mRNA 表达, 葛根芩连汤加味低剂量组 CAP、Cb1、GLUT4、TC10 mRNA 表达下降 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。葛根芩连汤加味中、低剂量组各指标比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

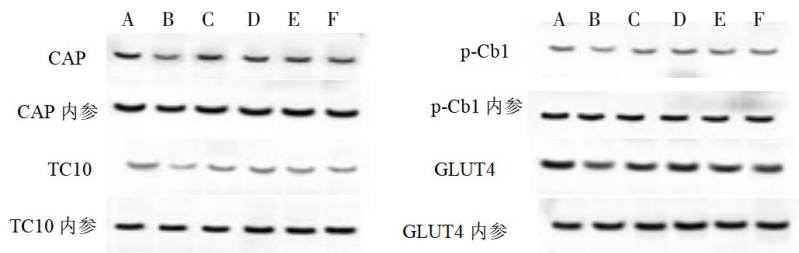
表2 各组大鼠骨骼肌组织 CAP、p-Cb1、TC10、GLUT4 蛋白相对表达量比较

(/GAPDH, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	CAP	p-Cb1	TC10	GLUT4
空白组	8	0.542±0.014	0.705±0.021	0.795±0.037	1.327±0.028
模型组	8	0.397±0.019 ^{a)}	0.566±0.024 ^{a)}	0.654±0.029 ^{a)}	0.944±0.015 ^{a)}
二甲双胍组	8	0.472±0.029 ^{c)}	0.618±0.010 ^{c)}	0.719±0.017 ^{c)}	1.178±0.082 ^{c)}
葛根芩连汤加味高剂量组	8	0.495±0.015 ^{c)}	0.656±0.011 ^{c) e)}	0.746±0.027 ^{c)}	1.218±0.055 ^{c)}
葛根芩连汤加味中剂量组	8	0.461±0.015 ^{c)}	0.605±0.033 ^{b) g)}	0.690±0.022 ^{f)}	1.136±0.065 ^{c)}
葛根芩连汤加味低剂量组	8	0.423±0.024 ^{e) g) h)}	0.586±0.013 ^{c) g)}	0.668±0.017 ^{c) g)}	1.051±0.103 ^{d) g)}

注: CAP, Cbl 相关蛋白; p-Cb1, 磷酸化大麻素受体1; TC10, 小GTP结合蛋白; GLUT4, 葡萄糖转运蛋白4。

a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与模型组比较, $P<0.01$; d) 与二甲双胍组比较, $P<0.05$; e) 与二甲双胍组比较, $P<0.01$; f) 与葛根芩连汤加味高剂量组比较, $P<0.05$; g) 与葛根芩连汤加味高剂量组比较, $P<0.01$; h) 与葛根芩连汤加味中剂量组比较, $P<0.05$ 。



注：A，空白组；B，模型组；C，二甲双胍组；D，葛根芩连汤加味高剂量组；E，葛根芩连汤加味中剂量组；F，葛根芩连汤加味低剂量组。CAP，Cbl 相关蛋白；p-Cb1，磷酸化大麻素受体 1；TC10，小 GTP 结合蛋白；GLUT4，葡萄糖转运蛋白 4。

图 2 各组大鼠骨骼肌 CAP、p-Cb1、TC10、GLUT4 蛋白电泳图

表 3 各组大鼠骨骼肌组织中 CAP、Cb1、TC10、GLUT4 mRNA 表达比较 (2^{-ΔΔCT}, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	CAP	Cb1	TC10	GLUT4
空白组	8	1.000±0.032	1.001±0.052	1.001±0.038	1.001±0.054
模型组	8	0.651±0.073 ^{a)}	0.817±0.033 ^{a)}	0.835±0.017 ^{a)}	0.753±0.028 ^{a)}
二甲双胍组	8	0.848±0.068 ^{c)}	0.875±0.021 ^{b)}	0.915±0.046 ^{b)}	0.881±0.027 ^{c)}
葛根芩连汤加味高剂量组	8	0.895±0.053 ^{c)}	0.937±0.027 ^{c) d)}	0.929±0.028 ^{c)}	0.908±0.015 ^{c)}
葛根芩连汤加味中剂量组	8	0.800±0.065 ^{c)}	0.854±0.032 ^{f)}	0.855±0.049 ^{e)}	0.852±0.027 ^{c) e)}
葛根芩连汤加味低剂量组	8	0.736±0.054 ^{d) f)}	0.843±0.027 ^{f)}	0.841±0.016 ^{d) e)}	0.813±0.028 ^{b) d) f)}

注：CAP，Cbl 相关蛋白；p-Cb1，磷酸化大麻素受体 1；TC10，小 GTP 结合蛋白；GLUT4，葡萄糖转运蛋白 4。

a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ ；d) 与二甲双胍组比较， $P<0.05$ ；e) 与葛根芩连汤加味高剂量组比较， $P<0.05$ ；f) 与葛根芩连汤加味高剂量组比较， $P<0.01$ 。

3 讨论

《素问·奇病论篇》云：“有病口甘者……此五气之溢也，名曰脾瘅。……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”，提示过食肥甘厚味，可导致体内中满内热进而发为“脾瘅”，最终转为“消渴”。仝小林院士认为，T2DM 早期归属于“脾瘅”范畴，并结合多年临床经验总结出，脾瘅多因患者过食肥甘厚味导致胃纳太过而脾运不及，积于中焦，形成中满，以中满内热为核心病机，其病理中心在胃肠^[12]。脾与胃互为表里关系。脾在体合肉，主四肢，如《素问·太阴阳明论篇》曰：“四肢皆禀气于胃而不得至经，必因于脾乃得禀也。今脾病不能为胃行其津液，四肢不得禀水谷气，气日以衰，脉道不利，筋骨肌肉皆无气以生，故不用焉”。由此可见，T2DM 与肢体骨骼肌功能密切相关。

葛根芩连汤加味方中葛根甘辛性凉，入脾胃经，生津止渴，升阳止泻；黄芩、黄连清热燥湿，尤长于清中焦湿热；为避免苦寒伤胃，佐以辛温之干姜，制其苦寒之性，防止苦寒败胃；甘草和中且调和诸药，诸药相伍，外解表热，内清里热，清热

燥湿，生津润燥。从葛根芩连汤的配伍来看，具有清肠燥湿的功效，切中 T2DM 早期“中满内热，湿热内阻”的病机。研究表明，葛根芩连汤具有调节糖脂代谢、抗胰岛β细胞损伤^[13]，抗氧化活性^[14]，调节肠道菌群和改善胰岛素抵抗等作用^[15]，可有效治疗 T2DM。

胰岛素信号转导通路对维持机体葡萄糖稳态发挥重要作用^[16-18]。在骨骼肌中，葡萄糖的摄取主要通过 GLUT4 膜的易位来调节，胰岛素信号转导通路 CAP/Cb1/TC10 在葡萄糖的摄取、糖原的合成中起到重要作用^[19]。已有研究显示，CAP 与胰岛素刺激下的 Cb1 磷酸化和 GLUT4 膜转位密切相关^[20]。Cb1 的磷酸化水平与葡萄糖的摄取量相关，增加 Cb1 的磷酸化水平可以促进糖原的合成和脂肪的代谢^[21]。TC10 的激活对于胰岛素刺激的葡萄糖摄取和 GLUT4 的易位至关重要，胰岛素激活的 TC10 可能直接产生细胞骨架重排，促进 GLUT4 的易位^[22-23]。GLUT4 是骨骼肌细胞转运葡萄糖的主要蛋白，当受到胰岛素刺激时，产生一系列信号，GLUT4 构象发生改变，能够促进葡萄糖摄取，促进糖原的合成，并且调节脂质代谢^[20,24]。

本实验结果显示，模型组大鼠骨骼肌病理形态

结构改变, FBG、FINS、FFA、HbA1c 显著升高, 提示用高脂饲料喂养联合腹腔注射 STZ 的方法可以成功复制 T2DM 模型。对 T2DM 模型大鼠给予不同剂量的葛根芩连汤加味治疗 8 周后, 均可不同程度地降低大鼠体内糖脂类指标, 改善 IR, 表明葛根芩连汤加味可以调节糖脂代谢且效果显著。模型组大鼠骨骼肌组织中 CAP、p-Cb1、TC10 及 GLUT4 蛋白呈现低表达, 经葛根芩连汤加味干预后, T2DM 大鼠骨骼肌组织中 CAP、p-Cb1、TC10、GLUT4 蛋白及 mRNA 表达水平均有不同程度的升高, 以葛根芩连汤加味高剂量组最为显著。与二甲双胍组比较, 葛根芩连汤加味高剂量组 p-Cb1 蛋白及 Cb1 mRNA 表达升高; 葛根芩连汤加味低剂量组 CAP、TC10、GLUT4 蛋白及 mRNA 表达下降, p-Cb1 蛋白表达下降。因此, 葛根芩连汤加味可能通过激活 CAP/Cb1/TC10 信号转导通路, 促进葡萄糖的摄取, 促进糖原的合成, 调节脂质代谢, 改善胰岛素抵抗, 从而防治 T2DM 的发生发展。

综上, 葛根芩连汤加味可以调节糖脂代谢, 改善胰岛素抵抗, 其机制可能与激活 CAP/Cb1/TC10 信号通路有关。本实验仅探讨了葛根芩连汤加味对 CAP/Cb1/TC10 信号转导通路的影响, 但糖脂代谢和 IR 所涉及的信号通路和生物学因素非常复杂, 需进一步验证。

参考文献

- [1] 葛均波, 徐永健, 王辰. 内科学[M]. 9版. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 761-762.
- [2] 朱妍. 中药联合生活方式对 IGT 人群转化率的影响[D]. 北京: 中国中医科学院, 2010.
- [3] 栾金红, 赵龙刚. 浅谈 2 型糖尿病胰岛素抵抗的中医策略[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(18): 196-197.
- [4] 刘国萍, 缪珩. 肝脏胰岛素抵抗的分子机制[J]. 临床荟萃, 2009, 24(17): 1561-1562.
- [5] 钟婷婷, 高士争, 赵素梅. CAP/Cb1 通路的研究进展[J]. 中国医药科学, 2012, 2(7): 44-46.
- [6] 范尧夫, 曹雯, 胡咏新, 等. 葛根芩连汤对新发 2 型糖尿病胰岛素抵抗的影响研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2017, 26(2): 115-117, 121.
- [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] 席秋江, 韩莉, 楼小亮. 糖尿病大鼠模型的实验室研究[J]. 江西医药, 2017, 52(12): 1295-1296, 1299.
- [9] 林燕超, 吴佩文, 林东. 链脲佐菌素诱导 SD 大鼠糖尿病模型的影响因素[J]. 中国社区医师, 2017, 33(35): 7-8, 11.
- [10] 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.
- [11] 邵义祥. 医学实验动物学教程[M]. 南京: 东南大学出版社, 2016: 221-224.
- [12] 全小林. 糖络杂病论[M]. 北京: 科学出版社, 2014: 28-29.
- [13] 王烨. 基于肠道菌群及 LPS/TLR-4/NF- κ B 信号通路探讨葛根芩连汤治疗 T2DM 代谢性内毒素血症的疗效机制[D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2018.
- [14] 周琦. 葛根芩连汤对自发 2 型糖尿病 ZDF 大鼠胰岛细胞 IRS-2/PI3K/Akt 信号通路的影响[D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2018.
- [15] DEMIR I, KIYMAZ N, GUDU BO, et al. Study of the neuroprotective effect of ginseng on superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) levels in experimental diffuse head trauma [J]. Acta Neurochir (Wien), 2013, 155(5): 913-922.
- [16] TATAR M, BARTKE A, ANTEBI A. The endocrine regulation of aging by insulin-like signals[J]. Science, 2003, 299(5611): 1346-1351.
- [17] RIZZA RA, MANDARINO LJ, GERICH JE. Dose-response characteristics for effects of insulin on production and utilization of glucose in man [J]. Am J Physiol, 1981, 240(6): E630-E639.
- [18] MATTHEWS DR, HOSKER JP, RUDENSKI AS, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man [J]. Diabetologia, 1985, 28(7): 412-419.
- [19] 钟婷婷, 高士争, 赵素梅. CAP/Cb1 通路的研究进展[J]. 中国医药科学, 2012, 2(7): 44-46.
- [20] BAUMANN CA, RIBON V, KANZAKI M, et al. CAP defines a second signaling pathway required for insulin-stimulated glucose transport [J]. Nature, 2000, 407(6801): 202-207.
- [21] 杨桂枝. c-Cbl 相关蛋白 CAP 的研究进展[J]. 四川解剖学杂志, 2004, 12(1): 36-37.
- [22] WATSON RT, SHIGEMATSU S, CHIANG SH, et al. Lipid raft microdomain compartmentalization of TC10 is required for insulin signaling and GLUT4 translocation [J]. J Cell Biol, 2001, 154(4): 829-840.
- [23] CHIANG SH, BAUMANN CA, KANZAKI M, et al. Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10 [J]. Nature, 2001, 410(6831): 944-948.
- [24] CORMONT M, LE MY. The role of small G-proteins in the regulation of glucose transport (review) [J]. Mol Membr Biol, 2001, 18(3): 213-220.

Effect of Modified *Gegen Qinlian Decoction* (葛根芩连汤) on the CAP/Cb1/TC10 Signaling Pathway in the Skeletal Muscle of Type 2 Diabetes Model Rats

YANG Xia¹, WANG Zhigang², ZHOU Qi¹, LIU Rong¹, ZHU Xiangdong¹

1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou, 730000; 2. Tianshui Hospital of Traditional Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of modified *Gegen Qinlian Decoction* (葛根芩连汤, MGQD) in the treatment of type 2 diabetic (T2D). **Methods** Forty-eight SD rats were randomly divided into blank group, model group, metformin group, and MGQD high, medium and low dose groups, with eight rats in each group. Except of the blank group, the rats were given a high-fat diet combined with streptozotocin (STZ) to induce the model of T2D. The model group and the blank group were given normal saline (10 ml/kg) by gavage; the MGQD at the dose of 27.2 g/kg, 13.6 g/kg, 6.8 g/kg were given by gavage in the MGQD high, medium and low dose groups, respectively; the metformin group was administered with a dose of 0.15 g/kg metformin hydrochloride enteric-coated tablets; the interventions in all the groups were administered once daily. After 8 weeks, the levels of the fasting blood glucose (FBG), the serum fasting insulin (FINS), free fatty acids (FFA), and glycated hemoglobin (HbA1c), as well as the protein and mRNA expression of skeletal muscle Cbl-related protein (CAP), phosphorylated cannabinoid receptor 1 (p-Cb1), the small GTP binding protein (TC10), and the glucose transporter 4 (GLUT4) were assessed. Pathological morphological changes of the skeletal muscle were observed by HE staining. **Results** Compared to those in the model group, the skeletal muscle cells were stained clearly; the cytoplasm was deeper; and the cell spacing decreased as the dosage of MGQD increased; the levels of FBG, FINS, FFA and HbA1c in the metformin group and the MGQD high dose group significantly declined, while the protein and mRNA expression of CAP, p-Cb1, TC10, and GLUT4 significantly increased; the levels of FBG, FINS and FFA in the MGQD medium dose group significantly decreased, while the protein expression of CAP, p-Cb1, GLUT4 and the mRNA expression of CAP, GLUT4 increased; the FBG level in the MGQD low dose group was declined, while the mRNA expression of GLUT4 increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** MGQD can regulate glucose and lipid metabolism and improve insulin resistance, and the effect is best with highest dose. Its mechanism may be related to the activation of CAP/ Cb1/ TC10 signaling pathway in the skeletal muscle.

Keywords type 2 diabetes; *Gegen Qinlian Decoction* (葛根芩连汤); skeletal muscle; adaptor protein; proto-oncogene protein; glucose transporter 4

(收稿日期: 2021-03-05; 修回日期: 2021-08-04)

[编辑: 王利芬]