

蒿甲醚对 C57BL/KsJ-db/db 小鼠糖脂代谢的影响

姜宏卫^{1,2,3*}, 符 玮^{1,2,3}, 马瑜瑾^{1,2,3}, 李利平^{1,2,3}, 付留俊^{1,2,3}, 刘 婕^{1,2,3}, 彭慧芳^{1,2,3},
张颖裕^{1,2,3}, 郭 宇^{1,2,3}, 张知音^{1,2,3}, 李佳熙^{1,2,3}

1. 河南科技大学第一附属医院 内分泌科, 河南科技大学临床医学院, 河南 洛阳 471003
2. 国家代谢病临床医学研究中心分中心 洛阳市内分泌代谢病临床医学研究中心, 河南 洛阳 471003
3. 河南科技大学第一附属医院 糖尿病肾病研究院士工作站, 河南 洛阳 471003

摘要: 目的 研究蒿甲醚对 db/db 小鼠糖脂代谢的影响。方法 取 8 周龄雄性 C57BL/KsJ-db/db 小鼠, 分为模型组 (ig 给予 1% 甲基纤维素) 和蒿甲醚 400、200、100、50 组 (分别 ig 给予 400、200、100、50 mg/kg 蒿甲醚+1% 甲基纤维素), 每组 6 只。另选 6 只雄性 C57BL/KsJ-db/+ 小鼠为对照组, 共给药 4 周。每 2 天测量小鼠体质量; 每 3 天检测小鼠摄食量并评估平均每日摄食量及体质量变化; 每 2 天测定小鼠饮水量; 每 3 天测量小鼠尿量; 每 7 天于禁食 8 h 后, 尾静脉采血, 用罗氏血糖仪及配套试纸分别测量小鼠空腹血糖。通过葡萄糖耐量试验 (IPGTT) 和胰岛素耐量试验 (IPITT) 评估小鼠对葡萄糖的耐受性及对胰岛素的敏感性, 通过生化试剂盒测定小鼠血清总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、游离脂肪酸 (FFA) 水平。HE 染色法观察小鼠胰腺和肝脏的形态改变。Western blotting 法分析小鼠肝脏中 AMP 活化蛋白激酶 (AMPK)、葡萄糖转运蛋白 4 (GLUT-4) 和胰岛素受体 β (IR β) 蛋白的表达。结果 与对照组比较, 模型组小鼠的摄食量、摄水量、尿量均明显升高 ($P < 0.001$)。与模型组比较, 各剂量蒿甲醚均能显著降低小鼠摄水量及尿量 ($P < 0.01$ 、 0.001); 蒿甲醚 400、200、100 mg/kg 均能显著降低小鼠体质量及摄食量, 并呈剂量依赖性 ($P < 0.05$ 、 0.01); 蒿甲醚 400、200、100 mg/kg 均显著降低小鼠空腹血糖水平, 减少 IPGTT 的曲线下面积 (AUCs), 改善小鼠的胰岛素抵抗 ($P < 0.01$ 、 0.001)。与对照组比较, 模型组小鼠的 TC、TG 及 FFA 水平均显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 蒿甲醚可显著降低小鼠血清中的 TC、TG 及 FFA 水平, 并呈剂量依赖性 ($P < 0.05$); 可显著改善 db/db 小鼠的胰岛空泡变性和肝脂肪变性, 使小鼠肝脏中的 AMPK、GLUT-4 及 IR β 蛋白表达增加 ($P < 0.05$)。随着干预时间的延长, 剂量越高的小鼠呈现出较高的死亡率及不良反应发生率。结论 蒿甲醚可显著改善糖尿病小鼠的高脂状态及胰岛素抵抗, 治疗脂肪肝, 可能通过 AMPK 途径上调 GLUT-4 以及 IR β 蛋白的表达发挥作用, 有望用于代谢综合征为主的 2 型糖尿病的治疗。但较高剂量蒿甲醚及较长时间应用会导致较多不良反应的发生。

关键词: 蒿甲醚; 不同剂量; 胰岛素抵抗; AMP 活化蛋白激酶; C57BL/KsJ-db/db 小鼠

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)02-0481-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.02.030

Effects of artemether on glucose and lipid metabolism in C57BL/KsJ-db/db mice

JIANG Hong-wei^{1,2,3}, FU Wei^{1,2,3}, MA Yu-jin^{1,2,3}, LI Li-ping^{1,2,3}, FU Liu-jun^{1,2,3}, LIU Jie^{1,2,3},
PENG Hui-fang^{1,2,3}, ZHANG Ying-yu^{1,2,3}, GUO Yu^{1,2,3}, ZHANG Zhi-yin^{1,2,3}, LI Jia-xi^{1,2,3}

1. Department of Endocrinology, First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, College of Clinical Medicine of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China
2. National Center for Clinical Research of Metabolic Diseases, Luoyang Center for Clinical Research Center of Endocrine and Metabolic Diseases, Luoyang 471003, China
3. Academic Workstation for Diabetic Nephropathy Disease Research of First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China

Abstract: Objective To investigate the effects of different doses of artemether on glycolipid metabolism in C57BL/KsJ-db/db mice.

Methods Eight-week-old male C57BL/KsJ-db/db mice were divided into model group (ig given 1% methylcellulose) and artemether

收稿日期: 2018-08-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (U1404805); 国家自然科学基金资助项目 (81141059)

作者简介: 符 玮 (1992—), 女, 硕士研究生, 研究方向为内分泌疾病临床研究。Tel: 15670360723 E-mail: fuwei9255@163.com

*通信作者 姜宏卫, 博士生导师, 主要从事内分泌临床研究及自噬基础研究。E-mail: jianghw@haust.edu.cn

400, 200, 100, 50 groups (ig given 400, 200, 100, 50 mg/kg artemether respectively + 1% methylcellulose), with six mice in each group. Another six male C57BL/KsJ-db/+ mice were selected as the control group. All groups were administered for 4 weeks. The quality of the mice was measured every 2 d; The food intake of the mice was measured every 3 d and the average daily food intake and body mass changes were evaluated; The amount of water in mice was measured every 2 d; The urine volume of the mice was measured every 3 d; After 8 h of fasting, blood was collected from the tail vein, and the fasting blood glucose of the mice was measured by Roche blood glucose meter and matching test paper every 7 d. Mice were assessed for glucose tolerance and sensitivity to insulin by ip glucose tolerance test (IPGTT) and ip insulin tolerance test (IPITT). The serum total cholesterol (TC), triglyceride (TG), and free fatty acid (FFA) levels of the mice were determined by a biochemical kit. The whole liver of mice was weighed and the morphological changes of the pancreas and liver in mice were observed by HE staining. The expression of AMP-activated protein kinase (AMPK), glucose transporter 4 (GLUT-4), and insulin receptor β (IR β) protein in liver of mice was analyzed by Western blotting. **Results** Compared with the control group, the food intake, water intake, and urine volume of the model group were significantly increased ($P < 0.001$). Compared with the model group, each dose of artemether significantly reduced the water intake and urine volume of the mice ($P < 0.01, 0.001$); Artemether 400, 200, 100 mg/kg can significantly reduce the body weight and food intake in a dose-dependent manner ($P < 0.05, 0.01$); Artemether 400, 200, 100 mg/kg significantly reduced fasting blood glucose levels in mice, reduced the area under the curve of IPGTT (AUCs), and improved insulin resistance in mice ($P < 0.01, 0.001$). Compared with the control group, the TC, TG, and FFA levels of mice in the model group were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, artemether significantly decreased the levels of TC, TG, and FFA in the serum of mice in a dose-dependent manner ($P < 0.05$), and significantly improved islet vacuolar degeneration and hepatic steatosis in *db/db* mice; The protein expression of AMPK, GLUT-4, and IR β in the liver of mice was increased ($P < 0.05$). With the prolongation of the intervention time, the higher the dose of artemether, the higher the mortality rate and the incidence of adverse reactions in mice. **Conclusion** Artemether can significantly improve the high-fat state and insulin resistance of diabetic mice. It can treat fatty liver and may up-regulate the expression of GLUT-4 and IR β protein through the AMPK pathway to exert its effects. It is expected to be used in the treatment of type 2 diabetes mellitus, which is mainly caused by metabolic syndrome. However, higher doses of artemether and longer-term application may lead to more adverse events.

Key words: artemether; different doses; insulin resistance; AMPK; C57BL/KsJ-db/db mice

2型糖尿病是一种以碳水化合物、蛋白质和脂肪代谢紊乱为特征的疾病,其主要的发病机制是胰岛素抵抗^[1]。目前已有多种口服抗糖尿病药物用于治疗2型糖尿病,如磺酰脲类、噻唑烷二酮类、双胍类、 α -糖苷酶抑制剂和二肽基肽酶-IV抑制剂,但这些药物也具有一定的副作用及二次治疗失败率^[2]。因此,天然产物对2型糖尿病的疗效受到越来越多的关注^[3]。

青蒿素是治疗疟疾最有效的药物之一,已成为首选的疟疾一线治疗方法^[4]。青蒿素也可以用于抗肿瘤、抗感染、抗炎、免疫调节等其他领域^[5-8]。近年来,越来越多的研究显示青蒿素在改善糖脂代谢中发挥了重要作用。青蒿素类药物可以在链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠中发挥抗氧化及调血脂的作用,并且具有降低血糖、改善肝肾功能的作用^[9-10]。不仅如此,青蒿素还能够增强 γ -氨基丁酸(GABA)受体信号,使得胰岛 α 细胞向可以分泌胰岛素的 β 细胞转化,使得胰岛素分泌增多,这为1型糖尿病的治疗提供了新的思路^[11]。青蒿素常见的衍生物包括双氢青蒿素(DHA)、蒿甲醚(ATM)、青蒿琥酯

和蒿乙醚^[12]。ATM是青蒿素的一种半合成衍生物,是治疗疟疾的一线用药^[13]。已有研究表明,ATM也可使高脂诱导小鼠的白色脂肪向棕色脂肪转化,从而改善肥胖小鼠的脂代谢,而蒿类提取物可以缓解高脂诱导小鼠的胰岛素抵抗和脂肪肝,并有减轻肝脏脂肪变性和炎症反应的作用^[13-14]。

基于上述研究结果,本课题组进行了初期实验,选用在C57BL/KsJ背景下瘦素受体(leptin receptor, Lepr)自发性突变的小鼠(C57BL/KsJ-db/db),其生物学特性为在1个月时开始贪食及发胖,出现明显的多饮多尿症状,并具有明显的高血糖、高血脂、高胰岛素血症等2型糖尿病特征,是进行2型糖尿病实验研究的理想动物模型。对照组选用同母系背景下基因未突变的正常小鼠(C57BL/KsJ-db/+)。发现ATM对C57BL/KsJ-db/db小鼠具有抗糖尿病及抗肥胖的作用,并且可以使其胰岛素分泌增多,胰岛细胞凋亡减少^[15]。但前期研究样本量较少,ATM剂量单一,干预时间较短。本实验扩大样本量,延长干预时间,以评价ATM的确切疗效,观察不同剂量ATM

对 C57BL/KsJ-db/db 小鼠血糖及脂代谢的作用。

1 材料

1.1 实验动物

健康 SPF 级雄性 C57BL/KsJ-db/db 小鼠 30 只及 C57BL/KsJ-db/+ 小鼠 6 只 (6~8 周) 购于南京君科生物科技有限公司。动物合格证号 201715925。实验动物许可证号 SCXK (苏) 2016-0010。小鼠饲养于河南科技大学第一附属医院新区医院动物饲养中心。饲养条件为 SPF 级, 12 h 昼夜节律, 温度 20~25 °C, 湿度 40%~60%。采用标准化代谢笼饲养, 笼具定期清洗消毒, 每 3 天更换一次垫料。实验前所有小鼠适应性喂养 2 周, 不限制摄食和饮水。

1.2 药物、试剂及仪器

ATM (质量分数 98%, 批号 170812S) 和甲基纤维素 (质量分数 99%, 批号 170703B) 由南京道斯夫生物科技有限公司提供, 样品风干后存储于 4 °C 冰箱。1% 甲基纤维素溶解在蒸馏水中, 加热至 80 °C 并搅拌, 4 °C 储存。ATM 悬浮于 1% 甲基纤维素, 每天干预前新鲜制备。血清胆固醇 (TC) 生化试剂盒、血清三酰甘油 (TG) 生化试剂盒、血清游离脂肪酸 (FFA) 生化试剂盒 (南京建成生物科技有限公司); 简易血糖仪、血糖试纸 (美国罗氏公司); 电子天平 [梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司]; 超声细胞粉碎机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); 台式高速冷冻离心机 (Heal Force 公司); 酶标检测仪 (BioTeK 公司); 全自动生化分析仪 (深圳雷杜生命科学股份有限公司); 磁力搅拌仪 (博奥机械制造有限公司); 电热鼓风干燥箱 (上海博迅实业公司医疗设备厂); 光学显微镜 (日本 Olympus 公司)。AMP 活化蛋白激酶 (AMPK)、葡萄糖转运蛋白 4 (GLUT-4) 和胰岛素受体 β (IR β) 蛋白抗体购自 Abcam 公司。

2 方法

2.1 分组及给药

采用随机数字表法将小鼠随机分为对照组、模型组及 ATM400、200、100、50 组, 每组 6 只。ATM 各剂量组小鼠分别 ig 给予 1% 甲基纤维素悬浮的 ATM 400、200、100、50 mg/kg, 对照组和模型组小鼠 ig 给予等体积 1% 甲基纤维素, 共给药 4 周。

2.2 体质量、摄食量、饮水量、尿量及空腹血糖检测

从给药第 1 天起, 每 2 天称量各组小鼠体质量, 精确到 0.01 g, 每 3 天记录各组小鼠摄食量, 每 2 天应用刻度水瓶量取小鼠饮水量, 每 3 天量

取小鼠尿量, 并定期清洗更换水瓶及尿瓶。每 7 天测定小鼠空腹血糖, 于禁食 8 h 后尾静脉采血, 用罗氏血糖仪及配套试纸检测。指标共检测 31 d, 计算。

2.3 ip 葡萄糖耐量实验 (IPGTT) 及 ip 胰岛素耐量实验 (IPITT)

首次给药前和末次给药 12 h 后各检测 1 次 IPGTT 和 IPITT。IPGTT: 各组小鼠更换垫料并禁食 12 h, 按 1.0 g/kg 剂量 ip 给予葡萄糖, 尾静脉采血, 用罗氏血糖仪及配套试纸分别测量空腹及 15、30、60、120 min 5 个时间点血糖, 计算曲线下面积 (AUC)。IPITT: 各组小鼠更换垫料并禁食 12 h, 按 0.25 U/kg 剂量 ip 给予正规胰岛素, 尾静脉采血分别测量空腹及 15、30、60、120 min 5 个时间点血糖, 并计算 AUC。

2.4 标本采集

实验第 31 天, 所有小鼠禁食 12 h 后, 采用乙醚麻醉。摘眼球取血, 收集全血并分离血清用于生化分析。小鼠处死后取出整肝、整脾和胰腺, 整肝、整脾称定质量, 精确至 0.01 g, 冲洗, 一部分立即冻结在液氮中, 并存储在 -80 °C 备用。其他储存于福尔马林中, 所有操作尽可能无菌。

2.5 血清指标分析

小鼠血清标本二次离心, 取上清置于全自动生化分析仪, 测定 TC、TG 及 FFA 水平。

2.6 形态学观察

采用 HE 染色观察胰腺及肝脏形态变化: 68 °C 干燥箱中烤片 30 min, 迅速置于二甲苯 I 和 II 中进行脱蜡, 各 10 min; 无水乙醇 I 和 II 各 5 min; 依次在 95%、80%、75% 的梯度乙醇中放置各 5 min; 蒸馏水冲洗 3~5 min; 苏木素中染 30 s 后自来水冲洗 3 min; 0.2% 的盐酸乙醇分化数秒, 自来水冲洗; 伊红染 10 s 后自来水冲洗 10 min; 80%、95% 乙醇及无水乙醇 I 和 II 中各放置 1 min; 二甲苯透明, 中性树胶封片; 在光学显微镜下观察。

2.7 Western blotting 法检测 AMPK、GLUT-4 和 IR β 蛋白表达水平

将冷冻的肝脏解冻, 在冰冷的裂解缓冲液用马达驱动的 Teflon 杵匀浆。BCA 法测定蛋白质质量浓度。取 30~50 μ g 总蛋白进行 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 将凝胶转移到硝酸纤维素膜上。5% 脱脂奶粉中封闭 1 h。一抗以 1:1 000~1:2 000 稀释。将膜与一抗在 4 °C 温育 16 h。在 PBS 和 0.01%

聚山梨酯-20 中洗膜, 用 BCIP/NBT 碱性磷酸酶比色试剂盒进行显色, 使用 Image J 软件进行相关蛋白的半定量分析。

2.8 统计学分析

用 Graph Pad Prism 5.0 及 Photoshop 7.0 对实验数据进行整理并做图, 采用 SPSS 20.0 软件处理, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验比较两组间的数据。多组间对比采用非参数检验。

3 结果

3.1 ATM 对小鼠体质量、摄食量、饮水量及尿量的影响

在实验过程中, 给药 4、13、22 d 后, ATM400

组小鼠各死亡 1 只。给药 4、13 d 后 ATM200 组小鼠各死亡 1 只。给药 8 d 后, ATM100 小鼠死亡 1 只。用剩余小鼠相关检测数据进行统计分析。

如表 1 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠的体质量显著升高 ($P < 0.001$), 而体质量增长率无明显差异。与模型组比较, ATM 各给药组小鼠的体质量增长率显著降低 ($P < 0.05$)。

测量不同干预组小鼠的总食物摄入量、水摄入量和总尿量, 并在干预结束后计算平均摄食量、平均饮水量和平均尿量, 进行组间对比。如表 2~4 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠的平均摄食量、平均饮水量和平均尿量均显著增加 ($P < 0.001$)。与

表 1 ATM 对 db/db 小鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Effect of ATM on body weight of db/db mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	体质量/g					增长率/%
		第 0 天	第 8 天	第 16 天	第 24 天	第 28 天	
对照	—	20.61±0.66	21.40±0.84	22.01±0.91	22.20±0.86	23.53±0.92	14.23±4.80
模型	—	41.86±3.59***	44.51±4.23***	46.06±5.45***	45.35±6.48***	45.27±6.26***	7.86±7.79
ATM50	50	46.55±0.52	45.80±1.03	45.43±2.00	44.93±3.19	45.09±2.55	0.66±2.14 [#]
ATM100	100	44.34±5.84	42.30±5.62	41.87±5.43	42.69±5.34	43.55±5.57	-1.74±0.81 [#]
ATM200	200	41.02±3.19	40.04±3.65	39.72±4.02	39.36±3.29	39.36±3.51	-4.10±3.11 [#]
ATM400	400	44.08±2.11	43.75±1.47	41.80±2.98	41.03±2.57	40.93±2.14	-7.13±2.46 [#]

与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$
*** $P < 0.001$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group

表 2 ATM 对 db/db 小鼠摄食量的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Effect of ATM on food intake of db/db mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	摄食量/g						平均摄食量/%
		第 0 天	第 6 天	第 12 天	第 18 天	第 24 天	第 30 天	
对照	—	20.58	18.20	19.23	17.48	17.20	19.40	18.68±1.29
模型	—	37.12	41.43	46.08	39.65	40.87	40.27	40.90±2.94***
ATM50	50	34.00	32.11	42.58	41.06	39.65	35.28	37.09±4.09
ATM100	100	30.50	19.21	34.76	27.61	32.37	35.14	29.93±5.95 ^{#a}
ATM200	200	37.48	24.08	28.93	22.95	22.37	26.14	27.00±5.67 ^{#aa}
ATM400	400	39.05	22.87	16.82	14.22	12.60	20.34	20.99±9.63 ^{#aa}

与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: [#] $P < 0.01$; 与 ATM50 组比较: ^a $P < 0.05$ ^{aa} $P < 0.01$
*** $P < 0.001$ vs control group; [#] $P < 0.01$ vs model group; ^a $P < 0.05$ ^{aa} $P < 0.01$ vs ATM50 group

表 3 ATM 对 db/db 小鼠饮水量的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Effect of ATM on daily water intake of db/db mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	饮水量/mL					平均饮水量/mL
		第 0 天	第 8 天	第 16 天	第 24 天	第 28 天	
对照	—	12.50	15.83	14.17	15.00	15.83	14.67±1.39
模型	—	75.00	80.00	79.00	84.00	84.00	80.40±3.78***
ATM50	50	60.00	16.00	27.00	23.00	36.00	30.67±18.43 ^{###}
ATM100	100	63.00	18.00	26.25	15.00	26.20	29.69±19.27 ^{##}
ATM200	200	63.33	26.00	19.00	22.00	23.00	30.67±18.43 ^{##}
ATM400	400	65.00	10.00	14.00	10.00	12.00	22.20±23.98 ^{##}

与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$
*** $P < 0.001$ vs control group; ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs model group

表 4 ATM 对 db/db 小鼠尿量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of ATM on urine volume of db/db mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	尿量/mL						平均尿量/mL
		第 0 天	第 6 天	第 12 天	第 18 天	第 24 天	第 30 天	
对照	—	15.50	17.20	16.60	19.80	20.10	18.40	17.93±1.82
模型	—	58.30	68.00	62.00	56.00	60.00	65.00	61.55±4.42***
ATM50	50	26.33	5.60	5.60	12.50	20.00	18.75	14.80±8.37###
ATM100	100	27.00	5.00	6.25	5.75	5.75	6.75	9.42±8.63###
ATM200	200	25.83	6.00	4.00	5.00	2.60	6.00	8.24±8.71###
ATM400	400	25.00	2.00	1.00	1.25	1.50	2.00	5.46±9.58###

与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: ### $P < 0.001$
 *** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs model group

模型组比较, 除 ATM50 组外, 其余各组小鼠的平均摄食量均明显下降 ($P < 0.05$)。与 ATM50 组比较, ATM400、ATM200、ATM100 组小鼠平均摄食量明显下降 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与模型组比较, ATM 各剂量组小鼠饮水量在干预第 8 天后出现下降趋势, 与对照组小鼠的饮水量基本持平 (表 3), 尿量在干预第 6 天后出现下降趋势 (表 4), ATM 各给药组小鼠的平均饮水量和平均尿量较模型组比较均明显下降 ($P < 0.001$), 但不同剂量组之间无显著差异。

3.2 ATM 对小鼠空腹血糖及干预终点 IPGTT 的影响

如表 5 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠空腹血糖均明显增高 ($P < 0.001$)。与模型组比较, 在第 21 天时, ATM 各剂量组小鼠空腹血糖均下降 ($P < 0.05$)。在干预终点时, 与模型组比较, 除 ATM50 组外, 其余 ATM 各剂量组小鼠空腹血糖均明显下降 ($P < 0.001$)。在干预终点给予葡萄糖负荷后, 各组小鼠血糖在 30~60 min 达到高峰, 而 ATM 各剂量组小鼠在

各时间点均表现出较低血糖水平。通过计算 AUC 可发现, 与对照组比较, 模型组小鼠 AUC 明显增多 ($P < 0.001$)。与模型组比较, 除 ATM50 组外, 其余 ATM 各剂量组小鼠的 AUC 均显著减少 ($P < 0.01$)。进一步进行 ATM 各剂量组间 AUC 对比发现, ATM400 组小鼠的 AUC 与 ATM100、ATM50 组相比均减少 ($P < 0.05$), ATM200 组小鼠的 AUC 较 ATM50 组相比减少 ($P < 0.05$, 表 6)。

3.3 ATM 对小鼠干预终点 IPITT 的影响

干预终点 IPITT 结果如表 7 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠 AUC 明显增大 ($P < 0.001$)。与模型组比较, ATM 各剂量组小鼠各时间点血糖值均呈现较低水平, ATM100、ATM200 和 ATM400 组小鼠的 AUC 显著减少 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。进一步进行 ATM 各剂量组间 AUC 对比发现, ATM400 组小鼠的 AUC 与 ATM100、ATM50 组比较均减少 ($P < 0.05$), ATM200 组小鼠的 AUC 较 ATM50 组相比减少 ($P < 0.05$)。

表 5 ATM 对 db/db 小鼠空腹血糖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Effect of ATM on fasting blood glucose of db/db mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	空腹血糖/(mmol·L ⁻¹)				
		第 0 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
对照	—	6.38±0.97	6.47±0.84	7.17±1.02	5.65±1.06	7.82±0.93
模型	—	22.98±6.21***	16.54±5.23***	19.18±8.79***	23.62±7.61***	29.40±4.08***
ATM50	50	17.63±4.76	18.28±7.90	22.40±7.80	9.38±4.44#	20.25±12.05
ATM100	100	19.18±3.84	11.78±6.61	17.33±12.88	7.25±3.79###	16.20±5.40###
ATM200	200	26.98±8.86	20.60±10.59	16.96±11.19	11.54±5.88#	15.00±7.48###
ATM400	400	23.10±8.41	14.53±2.00	11.73±2.12	8.77±3.17###	9.30±3.55###

与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ### $P < 0.001$
 *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ### $P < 0.001$ vs model group

表 6 ATM 对 db/db 小鼠干预终点 IPGTT 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 6 Effect of ATM on IPGTT endpoints of db/db mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	血糖/(mmol·L ⁻¹)					AUC/ (mmol·min·L ⁻¹)
		0 min	15 min	30 min	60 min	120 min	
对照	—	7.83±1.08	11.95±2.67	11.13±0.71	10.27±1.52	5.82±1.02	1125.00± 99.42
模型	—	29.40±4.08	33.30±0.00	33.30±0.00	33.30±0.00	32.10±2.04	3930.75± 87.34***
ATM50	50	25.08±6.19	33.30±0.00	32.98±0.65	32.63±1.35	30.73±3.55	3819.38±201.37
ATM100	100	20.28±3.90	33.08±0.45	33.10±0.40	26.70±2.98	19.15±2.02	3168.94±177.79###
ATM200	200	16.06±6.69	28.14±7.31	31.98±2.95	27.68±3.76	27.32±5.98	3327.30±361.29###a
ATM400	400	9.30±3.56	20.57±1.88	26.07±1.62	21.20±1.31	16.37±0.95	2409.75± 53.69###aaab

与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$; 与 ATM50 组比较: ^a $P < 0.05$ ^{aaa} $P < 0.001$; 与 ATM100 组比较: ^b $P < 0.05$
*** $P < 0.001$ vs control group; ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group; ^a $P < 0.05$ ^{aaa} $P < 0.001$ vs ATM50 group; ^b $P < 0.05$ vs ATM100 group

表 7 ATM 对 db/db 小鼠干预终点 IPITT 的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Table 7 Effect of ATM on IPITT endpoints of db/db mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	血糖/(mmol·L ⁻¹)					AUC/ (mmol·min·L ⁻¹)
		0 min	15 min	30 min	60 min	120 min	
对照	—	8.65±0.99	6.95±1.07	6.27± 1.17	6.20±1.22	4.62±0.41	727.63± 73.68
模型	—	31.26±2.84	33.30±0.00	31.96± 1.88	31.90±2.61	32.46±1.15	3 862.35± 165.16***
ATM50	50	27.05±5.94	29.88±3.96	30.43± 3.41	30.68±3.04	28.13±4.89	3 559.69± 424.71
ATM100	100	17.18±8.79	26.08±7.99	28.28± 5.74	28.30±5.82	18.40±6.56	2 981.63± 606.17#
ATM200	200	24.02±8.88	22.36±8.81	16.14±10.07	14.32±9.31	15.76±8.92	1 995.90±1 070.55###a
ATM400	400	9.63±3.10	17.10±5.44	16.07± 4.37	12.83±1.47	11.03±0.81	1 598.75± 260.77###aaab

与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$; 与 ATM50 组比较: ^a $P < 0.05$ ^{aaa} $P < 0.001$; 与 ATM100 组比较: ^b $P < 0.05$

*** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group; ^a $P < 0.05$ ^{aaa} $P < 0.001$ vs ATM50 group; ^b $P < 0.05$ vs ATM100 group

3.4 ATM 对小鼠血清 TC、TG 及 FFA 的影响

与对照组比较, 模型组小鼠的 TG、TC 和 FFA 水平均显著升高 ($P < 0.01$, 图 1)。与模型组比较, 除 ATM 50 组外, 其余 ATM 不同剂量组小鼠的 TG、TC 水平显著下降 ($P < 0.05$), ATM400 组与 ATM200 组小鼠的 FFA 水平较模型组相比显著下降 ($P < 0.05$)。进一步进行 ATM 各剂量组间对比, 发现 ATM400 组小鼠的 TG、TC 及 FFA 水平较 ATM50 组显著下降 ($P < 0.05$), TG、FFA 水平较 ATM100 组显著下降 ($P < 0.05$)。ATM200 组小鼠的 TC、FFA 水平较 ATM50 组显著下降 ($P < 0.05$)。

3.5 ATM 对小鼠肝脏及脾脏质量的影响

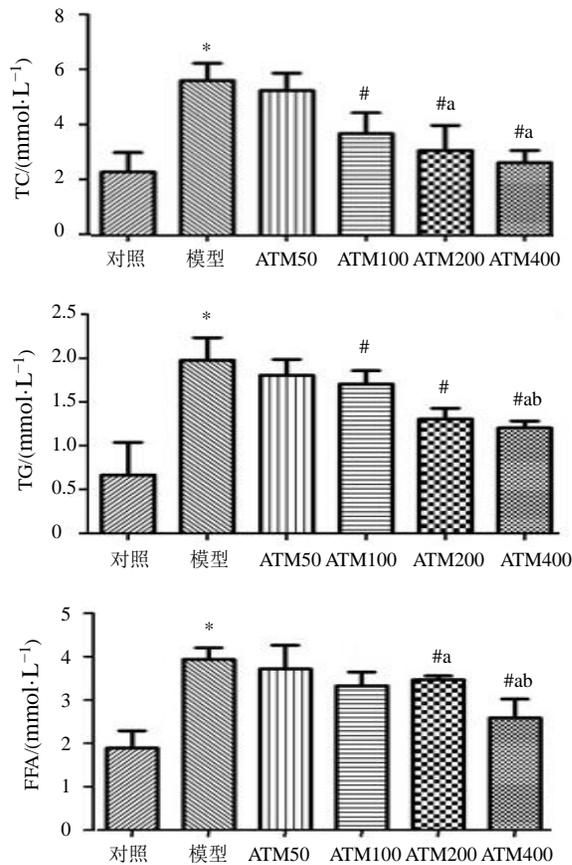
结果 (图 2) 可见对照组小鼠肝脏体积较小, 切面较红润, 而模型组小鼠肝脏体积较大, 切面可见红黄相间条纹状外观。ATM 剂量的增加, 小鼠肝脏体积逐渐减小, 切面较红润, 红黄相间条纹状外观减少。但各剂量 ATM 干预后小鼠肝脏质量与模

型组相比无统计学差异。与模型组比较, ATM 各剂量组小鼠脾脏质量显著增加 ($P < 0.05$)。这表明 ATM 可能作用于脾脏, 从而清除感染的红细胞, 但可能导致脾脏点状贫血, 使脾脏代偿增大。

3.6 ATM 对小鼠肝脏及胰岛形态的影响

对照组小鼠肝脏细胞排列规律, 可见肝小叶与中央汇管, 无空泡变性 (图 3)。模型组小鼠肝脏细胞脂滴空泡面积较大, 肝细胞体积增大, 细胞形态发生改变。ATM50 组小鼠肝脏脂滴空泡面积仍较大, 肝脏细胞排列紊乱, 但肝脏细胞较模型组增多。ATM100 组小鼠肝脏脂滴空泡面积明显减小, 脂滴空泡较少, 肝脏细胞增多, 排列较 ATM50 组好转。ATM200 组小鼠脂滴空泡面积较小, 空泡数量减少, 细胞排列较整齐, 肝脏细胞明显增多。

对照组小鼠胰岛面积适中, 胰岛细胞分布规律且密集, 岛内无空泡变性 (图 3)。模型组小鼠胰岛边界不清, 岛内空泡变性较多, 细胞减少。ATM50



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与 ATM50 组比较: #a $P < 0.05$; 与 ATM100 组比较: #b $P < 0.05$, 下同
* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; #a $P < 0.05$ vs ATM50 group; #b $P < 0.05$ vs ATM100 group, same as below

图 1 ATM 对 db/db 小鼠血清 TC、TG 及 FFA 的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Fig. 1 Effects of ATM on TC, TG, and FFA of db/db mice ($\bar{x} \pm s$)

组小鼠胰岛边界较不清, 岛内空泡变性, 但岛内细胞较模型组增多。ATM100 组小鼠胰岛边界较清晰, 岛内空泡变性减少, 岛内细胞增多。ATM200 组小鼠胰岛面积较大, 胰岛边界完全清晰, 空泡变性减少, 岛内细胞更为致密。

3.7 ATM 对小鼠肝脏中 AMPK、GLUT-4 和 IR β 蛋白表达的影响

与对照组比较, 模型组小鼠肝脏中 AMPK、GLUT-4 及 IR β 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$, 图 4), 而 ATM 干预后, 随着剂量的逐渐增加, 小鼠肝脏中 AMPK、GLUT-4 及 IR β 蛋白表达逐渐增高。

3.8 小鼠的不良反应发生率

随着 ATM 干预时间的延长, 小鼠的死亡率逐渐升高。除 ATM50 组外, 其他 ATM 组小鼠均出现不同数量的死亡情况, 其中 ATM100 组小鼠的死亡率为 16.67%, ATM200 组小鼠死亡率为 33.3%, ATM400 组小鼠死亡率为 50.0%, 由此可见小鼠的死亡率随着 ATM 剂量的升高呈上升趋势。并且随着干预时间的延长死亡率逐渐增加。

4 讨论

近年来青蒿素在治疗疟疾、抗肿瘤、抗病毒等方面的机制不断被深入挖掘及探讨^[5,16]。而青蒿素及其衍生物在代谢综合征方面的疗效受到关注。青蒿素衍生物 ATM 可以作用于胰岛 α 细胞上的 ARX 受体, 使其向胰岛 β 样细胞转化, 促进胰岛素的分泌, 从而有望用于治疗 1 型糖尿病^[11]。本课题组对其进行了深入研究, 并首次采用了以胰岛素抵抗、肥胖、糖尿病肾病为特征的经典 2 型糖尿病模型

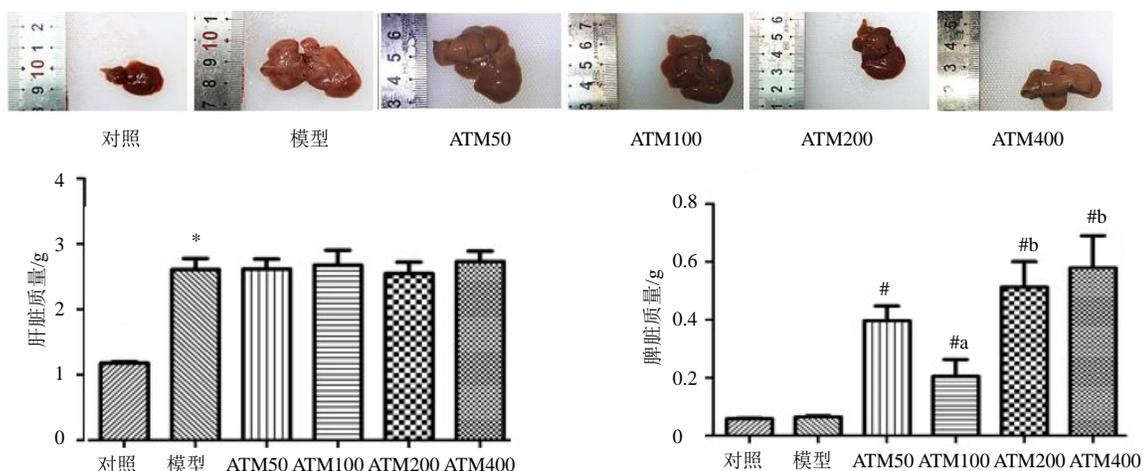


图 2 ATM 对 db/db 小鼠肝脏及脾脏质量的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Fig. 2 Effect of ATM on weight of liver and spleen of db/db mice ($\bar{x} \pm s$)

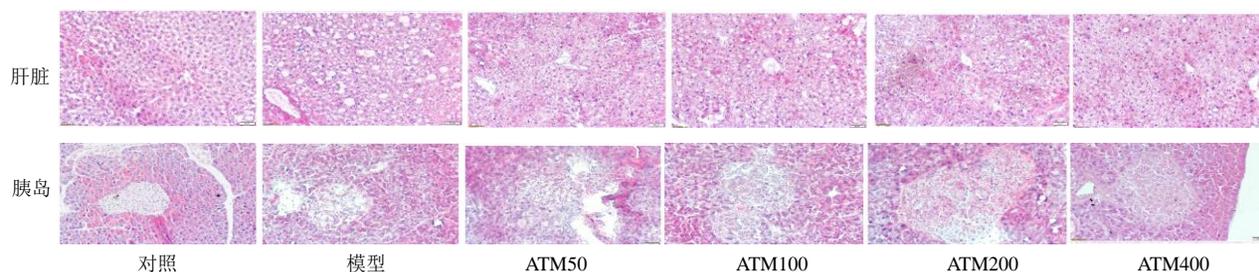


图 3 ATM 对 db/db 小鼠肝脏和胰岛形态的影响 (HE, ×200)

Fig. 3 Effect of ATM on liver and islet morphology of db/db mice (HE, ×200)

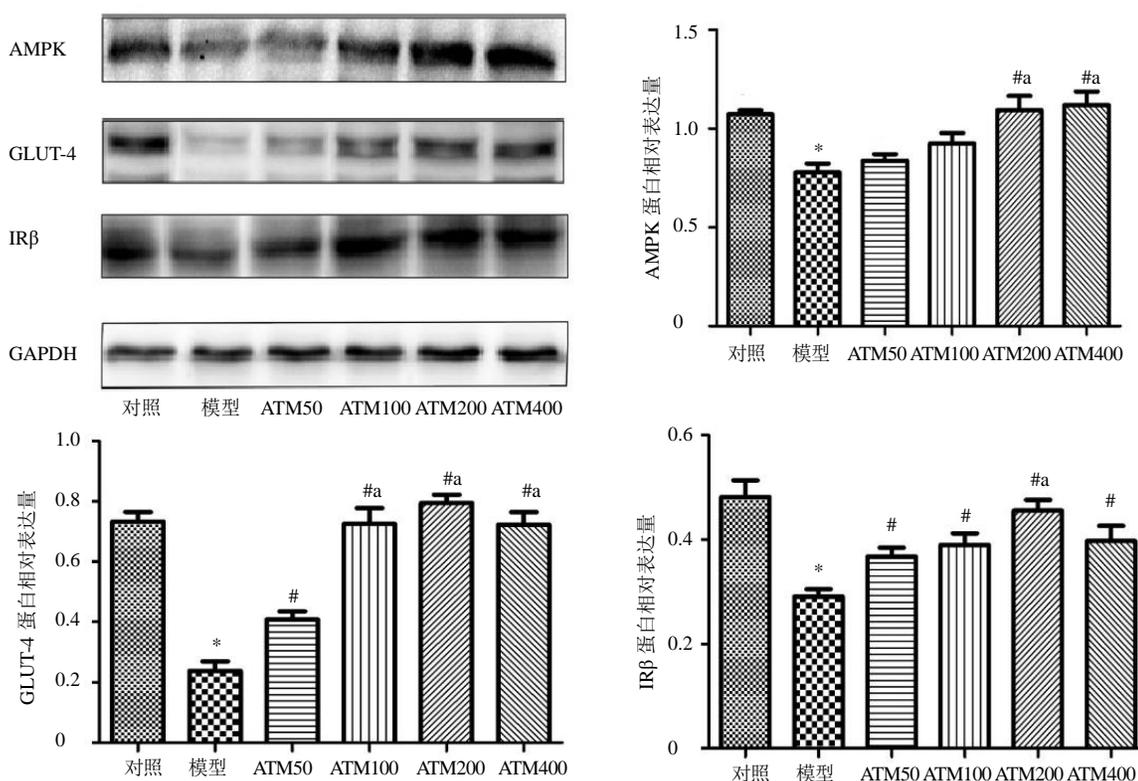


图 4 ATM 对 db/db 小鼠肝脏中 AMPK、GLUT-4 和 IRβ 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 4 Effect of ATM on protein expression of AMPK, GLUT-4, and IRβ in liver of db/db mice ($\bar{x} \pm s$)

C57BL/KsJ-db/db 小鼠，证实了 ATM 可以降低 C57BL/KsJ-db/db 小鼠体质量增长率、空腹血糖水平，改善胰岛素抵抗，但干预剂量仅选用 ATM 200 mg/kg。本实验增加了样本量，延长干预时间至 4 周，并设置了 4 个不同剂量组相比较，结果表明小鼠体质量及摄食量的减少与 ATM 剂量的增加呈正相关，这与之前青蒿素可使脂肪转化从而降低体质量，改善高脂症状的研究结论相一致^[13]。有研究也证实，青蒿琥酯可抑制脂肪细胞的合成^[17-18]。本研究中 IPGTT 及 IPITT 结果显示，延长干预时间后，不同剂量组小鼠的 AUC 面积呈现明显差异。并且，

小鼠肝脏脂肪变性、胰岛空泡变性可随着 ATM 干预剂量的增加而逐渐好转。ATM 改善小鼠糖脂代谢的机制可能基于对 AMPK 通路的影响，从而提高 GLUT-4 及 IRβ 蛋白表达水平，增加葡萄糖外转运及胰岛 β 细胞受体。当 AMPK 通路激活时，可以下调几种生物合成途径，例如糖异生和肝脏中的脂肪酸合成，并开启 ATP 的几种分解代谢途径，诸如葡萄糖摄取（GLUT-4 的上调）和糖酵解的产生^[19-20]。研究显示青蒿素类衍生物可通过上调 AMPK 通路改善非酒精性脂肪肝的病变^[21]，这与本研究结果类似。进一步说明了青蒿素类药物可通过 AMPK 通路改善

糖脂代谢紊乱。

本实验中观测到 ATM 可明显改善小鼠多饮及多尿症状。有研究显示青蒿素及其类似物可减轻糖尿病肾病的炎症反应,降低尿白蛋白,一定程度上缓解糖尿病肾病的发展^[22-23]。但 ATM 明显减少尿量对于机体有无副作用仍需进一步研究。

在干预过程中及干预末期发现 ATM 剂量越高,小鼠的死亡率更高,脾脏质量也呈增长趋势。分析小鼠的死因可能主要是消化道症状导致的进食量下降,其中也发生个别小鼠低血糖及抽搐现象。目前青蒿素对于代谢综合征的研究选用剂量均较低,且干预时间较短或干预频率较低(1次/周),然而青蒿素的长期和低剂量暴露可能诱导自由基清除剂,导致青蒿素的治疗效率降低^[24]。本研究采用每天固定剂量给药的方法维持 ATM 在小鼠体内稳定血药浓度,但过大剂量的 ATM 可导致较为明显的消化道症状。同时,疟疾的发病机制主要是疟原虫作用于红细胞,而脾脏是红细胞过滤的功能单位^[25],当 ATM 作用于机体时,可作用于脾脏,阻断宿主对脾脏内红细胞提供营养,从而清除感染的红细胞,但可能导致脾脏点状贫血^[23],基于此分析可能 ATM 使小鼠脾脏贫血,脾脏代偿增大。

综上所述,本研究发现 ATM 可显著降低 db/db 小鼠体质量,改善高脂状态及胰岛素抵抗,治疗脂肪肝,可能通过 AMPK 途径上调 GLUT-4 以及 IR β 蛋白的表达,有望用于代谢综合征为主的 2 型糖尿病的治疗。但基于剂量较高会引起明显的不良反应,而剂量较低则诱导自由基,ATM 进一步应用的剂量及应用时长仍需斟酌。本课题组将进一步评价青蒿素不同剂型对代谢综合征的疗效及不良反应发生情况,深入研究青蒿素调节糖脂代谢的机制,同时将进行小样本临床试验评价青蒿素在 2 型糖尿病人群中的疗效。

参考文献

- [1] Nolan C J, Ruderman N B, Kahn S E, et al. Insulin resistance as a physiological defense against metabolic stress: Implications for the management of subsets of type 2 diabetes [J]. *Diabetes*, 2015, 64(3): 673-686.
- [2] Tahrani A A, Barnett A H, Bailey C J. Pharmacology and therapeutic implications of current drugs for type 2 diabetes mellitus [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2016, 12(10): 566-592.
- [3] Prabhakar P K, Doble M. A target based therapeutic approach towards diabetes mellitus using medicinal plants [J]. *Curr Diabetes Rev*, 2008, 4(4): 291-308.
- [4] Nosten F, White N J. Artemisinin-based combination treatment of falciparum malaria [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2007, 77(Suppl 6): 181-192.
- [5] Efferth T. From ancient herb to versatile, modern drug: *Artemisia annua* and artemisinin for cancer therapy [J]. *Semin Cancer Biol*, 2017, 46: 65-83.
- [6] Lu P, Zhang F C, Qian S W, et al. Artemisinin derivatives prevent obesity by inducing browning of WAT and enhancing BAT function [J]. *Cell Res*, 2016, 26(10): 1169-1172.
- [7] Lam N S, Long X, Su X Z, et al. Artemisinin and its derivatives in treating helminthic infections beyond schistosomiasis [J]. *Pharmacol Res*, 2018, 71(7): 35-38.
- [8] Shi C, Li H, Yang Y, et al. Anti-inflammatory and immunoregulatory functions of artemisinin and its derivatives [J]. *Mediat Inflamm*, 2015, doi: 10.1155/2015/435713.
- [9] Ahmad W, Khan I, Khan M A, et al. Evaluation of antidiabetic and antihyperlipidemic activity of *Artemisia indica* linn (aerial parts) in Streptozotocin induced diabetic rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 151(1): 618-623.
- [10] Ghazanfar K, Ganai B A, Akbar S, et al. Antidiabetic activity of artemisia amygdalina decne in Streptozotocin induced diabetic rats [J]. *Biomed Res Int*, 2015, doi: 10.1155/2014/185676.
- [11] Li J, Casteels T, Frogne T, et al. Artemisinins target GABAA receptor signaling and impair α cell identity [J]. *Cell*, 2017, 168(1/2): 86-100.
- [12] Klayman D L. Qinghasu (artemisinin): An antimalarial drug from China [J]. *Science*, 1985, 228(4703): 1049-1055.
- [13] An J, Minie M, Sasaki T, et al. Antimalarial drugs as immune modulators: New mechanisms for old drugs [J]. *Annual Rev Med*, 2017, 68(1): 317-330.
- [14] Eun K K, Keon-Hee K, Won H R, et al. *Artemisia annua* leaf extract attenuates hepatic steatosis and inflammation in high-fat diet-fed mice [J]. *J Med Food*, 2016, 19(3): 290-299.
- [15] Guo Y, Fu W, Xin Y, et al. Anti-diabetic and anti-obesity effects of artemether in db/db mice [J]. *Biomed Res Inter*, 2018, doi: 10.1155/2018/8639523.
- [16] Efferth T. Beyond malaria: The inhibition of viruses by artemisinin-type compounds [J]. *Biotechnol Adv*, 2018, doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.01.001.
- [17] Jang B C. Artesunate inhibits adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes by reducing the expression and/or

- phosphorylation levels of C/EBP- α , PPAR- γ , FAS, perilipin A, and STAT-3 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 474(1): 220-225.
- [18] Lee J, Kim M H, Lee J H, *et al.* Artemisinic acid is a regulator of adipocyte differentiation and C/EBP δ expression [J]. *J Cell Biochem*, 2012, 113(7): 2488-2499.
- [19] Hardie D G. The AMP-activated protein kinase pathway-new players upstream and downstream [J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(23): 5479-5487.
- [20] Hardie D G. Minireview: The AMP-activated protein kinase cascade: The key sensor of cellular energy status [J]. *Endocrinology*, 2003, 144(12): 5179-5183.
- [21] Wang Z Q, Zhang X H, Yu Y, *et al.* Artemisia scoparia extract attenuates non-alcoholic fatty liver disease in diet-induced obesity mice by enhancing hepatic insulin and AMPK signaling independently of FGF21 pathway [J]. *Metabol Clin Exper*, 2013, 62(9):1239-1249.
- [22] Wu X, An P, Ye B, *et al.* Artemisinin ameliorated proteinuria in rats with adriamycin-induced nephropathy through regulating nephrin and podocin expressions [J]. *J Tradit Chin Med*, 2014, 34(1): 63-68.
- [23] Yuan D S, Chen Y P, Tan L L, *et al.* Artemisinin: A panacea eligible for unrestrictive use? [J]. *Front Pharmacol*, 2017, doi: 10.3389/fphar.2017.00737.
- [24] Buffet P A, Safeukui I, Deplaine G, *et al.* The pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria in humans: Insights from splenic physiology [J]. *Blood*, 2011, 117(2): 381-392.
- [25] White N J. Malaria parasite clearance [J]. *Malar J*, 2017, doi: 10.1186/s12936-017-1731-1.