

糖复康宁提取物对 SGLT2 的抑制作用及降糖作用研究

武卫党¹, 王泽², 魏滋鸿¹, 张星艳³, 李亚卓¹, 刘鸿生⁴, 陈俊杰⁴, 刘昌孝^{1*}, 伊秀林^{1*}

1. 天津药物研究院新药评价有限公司, 国家释药技术及药代动力学重点实验室, 天津 300301
2. 天津中医药大学, 天津 300193
3. 安徽医科大学, 安徽 合肥 230032
4. 天津天中医药科技有限公司, 天津 300190

摘要: 目的 研究糖复康宁提取物对钠离子-葡萄糖协同转运体 2 (SGLT2) 的抑制作用及对二型糖尿病大鼠的降糖作用。方法 通过由转染试剂 Lipo 3 000 介导的转基因方法构建 SGLT2 过表达的 HEK293 细胞株, 考察 0.01、0.03、0.1、0.3、1.0、3.0 mg/mL 糖复康宁提取物对 SGLT2 介导的 α -甲基吡喃葡萄糖苷 (^{14}C -AMG) 摄入的抑制作用; 应用高糖高脂饲料和链脲佐菌素制备二型糖尿病动物模型, ig 低、高剂量 (162、324 mg/kg) 糖复康宁提取物, 每天给药 1 次, 连续给药 5 周, 每周测定空腹血糖值, 给药结束后测定糖耐量。结果 与对照组比较, 0.1、0.3、1.0、3.0 mg/mL 的糖复康宁提取物对 SGLT2 介导的 ^{14}C -AMG 摄入均有显著抑制作用 ($P < 0.05$), IC_{50} 为 0.119 mg/mL; 与模型组比较, ig 162、324 mg/kg 糖复康宁提取物 35 d 后, 二型糖尿病大鼠的空腹血糖显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01), 糖耐量也明显改善 ($P < 0.05$)。结论 糖复康宁提取物对二型糖尿病大鼠发挥显著降糖作用, 其机制可能与抑制 SGLT2 对葡萄糖的重吸收相关。

关键词: 植物提取物; SGLT2; 糖尿病; 降糖作用

中图分类号: R962.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2018)06-0992-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.06.010

Inhibition of Tangfu Kangning extract to SGLT2 and its antidiabetic effects

WU Weidang¹, WANG Ze², WEI Zihong¹, ZHANG Xingyan³, LI Yazhuo¹, LIU Hongsheng⁴, CHEN Junjie⁴, LIU Changxiao¹, YI Xiulin¹

1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research New Drug Evaluation Research Co. LTD, State Key Laboratory of Drug Release Technology and Pharmacokinetics, Tianjin 300031, China
2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China
3. Anhui Medical University, Hefei 230032, China
4. Tianjin Tianzhong Medical Technology Co, Ltd. Tianjin 300190, China

Abstract: Objective To research the inhibition of Tangfu Kangning extracts to SGLT2 and the antidiabetic effects to mice with type II diabetic. **Method** The SGLT2 overexpressed cell line (HEK293-SGLT2) was transfected through Lipo3000. The inhibitory effects of 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, and 3 mg/mL of Tangfu Kangning extracts on SGLT2 mediated ^{14}C -AMG intake were investigated. The animal model of type two diabetes was prepared with high glucose and high fat diet and streptozotocin, ig low and high dose (162, 324 mg/kg) Tangfu Kangning extract to mice, once daily, continuous for five weeks, the fasting blood glucose was measured weekly, and the glucose tolerance was measured after the end of the administration. **Result** Compared with control group, the TangFuKangNing extract of 0.1, 0.3, 1.0, and 3.0 mg/mL had significant inhibitory effects on SGLT2 mediated ^{14}C -AMG intake ($P < 0.05$) and IC_{50} was 0.119 mg/mL. The fasting blood glucose (FBG) of type II diabetes mice treated with the two dosages (162 and 324 mg/kg) of Tangfu Kangning extracts for 35 d were significantly lower than model group ($P < 0.05$ and 0.01). The glucose tolerances of mice treated with Tangfu Kangning extract were also improved ($P < 0.05$). **Conclusion** Tangfu Kangning extracts have significant hypoglycemic effect on type two diabetes rats, and its mechanism may be related to inhibiting the reabsorption of glucose by SGLT2.

Key words: Tangfu Kangning extracts; SGLT2; type two diabetes; hypoglycemic effect

收稿日期: 2017-12-07

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (81430096); 天津市科技支撑重点项目 (17YFZCSY01170); 国家青年自然科学基金 (81503154)

第一作者: 武卫党 (1984—), 助理研究员。Tel: (022) 84845243 E-mail: wuweidang1985@126.com

*通信作者: 伊秀林, 研究员。Tel: (022) 84845242 E-mail: yixl@tjipr.com

刘昌孝, 研究员, 博士生导师, 中国工程院院士。E-mail: liuchangxiao@vip.163.com

糖复康宁为黄连、炙鸡内金、地骨皮、菊苣、玉米须、葛根、金钱草、苍术、鬼箭羽、干姜、杜仲、桑叶、人参叶、栀子、山茱萸、焦谷麦芽、海金沙、苦瓜、无花果、食用仙人掌、秦皮、食用鲜芦荟、知母、皂荚、焦白术、桑椹经调制后水提产物,是清热降糖的常用中药方,该方降糖作用的分子机制还不清楚。 Na^+ -葡萄糖协同转运蛋白 2 (SGLT2) 主要存在于近端肾小管 S1 段的表皮细胞上,肾小管中 90% 以上的葡萄糖在 SGLT2 的重吸收作用下进入血液,表明 SGLT2 对血液中葡萄糖的水平具有重要的调节作用^[1]。通过抑制 SGLT2 对葡萄糖的重吸收,从而促进葡萄糖的外排,是降低糖尿病患者血糖水平的一条重要途径^[2-3]。本研究研究糖复康宁降糖复方浸膏对 SGLT2 的抑制作用情况以及降糖效果,为阐明药物的作用机制提供依据。

1 材料

1.1 药物及主要试剂

糖复康宁提取物(天津天中医药科技有限公司,批号 20141201, HPLC 法测定糖复康宁提取物高、低浓度溶液上、中和下层液体中小檗碱含量, $\text{RSD} < 5\%$, 表明溶液均一、稳定; 小檗碱平均质量分数为 2.82 g/kg); 根皮苷(Sigma 公司, 批号 MFCD09037358); ^{14}C 标记的 α -甲基吡喃葡萄糖苷(^{14}C -AMG, 美国 ARC 公司, 批号 141212)。

DMSO、100×青链霉素混合液(北京 Solarbio 公司); DMEM(Hyclone 公司, 批号 AB10137517); 胎牛血清(FBS, Gibco, 批号 1739463); 磷酸缓冲液(PBS, Solarbio, 批号 11310212); ULTIMA Gold 闪烁液(PerkinElmer 公司, 批号 77-15481); Lipofectamine 3 000 转染试剂(Lipo 3 000, Thermo Fisher Scientific, 批号 1753047); G418(Sigma, 批号 11811-031)。缓冲溶液 1 (140 mmol/L 氯化胆碱、2 mmol/L KCl、1 mmol/L MgCl_2 、1 mmol/L CaCl_2 、10 mmol/L HEPES、5 mmol/L Tris); 缓冲溶液 2 (140 mmol/L NaCl、2 mmol/L KCl、1 mmol/L MgCl_2 、1 mmol/L CaCl_2 、10 mmol/L HEPES、5 mmol/L Tris); 缓冲溶液 3 (140 mmol/L 氯化胆碱、2 mmol/L KCl、1 mmol/L MgCl_2 、1 mmol/L CaCl_2 、10 mmol/L HEPES、5 mmol/L Tris、10 mmol/L AMG);

1.2 主要仪器

BS124S 分析天平, 瑞士 Sartorius 公司产品; HERAcell 150i 二氧化碳培养箱, 美国 Thermo

Scientific 公司产品; Tri-Carb 2910 TR α/β 射线计数仪, 美国 Perkin Elmer 公司产品; TR-2AR Thermal Robo, 日本亚速旺株式会社产品; 单人超净生物安全柜, 力康生物医疗科技控股有限公司; 艾科·精益血糖仪, 产品批号 3362934, 血糖试纸, 批号 201311027, 艾科生物技术(杭州)有限公司。

1.3 细胞株和动物

人胚肾细胞株(HEK293), 购自中国科学院实验细胞中心。

SD 大鼠, SPF 级, 雌雄各半, 体质量 180~200 g, 购自北京维通利华试验动物技术有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK(京)2012-0001, 试验单位使用许可证号 SYXK(津)2011-0005。

2 方法

2.1 HEK293-SGLT2 转运活性验证

采用由转运试剂 Lipo 3 000 介导的动物细胞转基因方法, 将携带有 SGLT2 转运体基因 CDS 序列的质粒 pcDNA3.1 (+) 同贴壁培养的 HEK293 细胞按试剂盒说明书进行转基因操作, 之后经过筛选培养(DMEM+10% FBS+900 mg/L G418) 得到 SGLT2 过表达细胞株 HEK293-SGLT2。HEK293-SGLT2 细胞株及野生型(wild type, WT) 细胞株, 经过复苏和传代培养(DMEM+10% FBS+青链霉素混合液) 后, 选取生长良好的贴壁细胞用胰酶消化使其分散为单细胞悬液, 用培养基调节细胞密度至 $(1.5 \sim 2.0) \times 10^5/\text{mL}$, 以 1 mL/孔的量接种至 24 孔细胞培养板, 在 37 °C、5% CO_2 、饱和空气湿度的培养箱内培养 2~3 d, 使细胞长满各孔^[1]。

吸走培养板各孔中的培养液, 用缓冲盐溶液 1 清洗 1 次, 之后每孔加入 37 °C 缓冲盐溶液 2 孵育 10 min; HEK293-SGLT2 的底物选择 50 $\mu\text{mol/L}$ ^{14}C -AMG (5 $\mu\text{Ci/mL}$)^[4], 吸走各孔中旧的缓冲溶液, 以每孔 500 μL 含放射性标记探针底物(放标底物)的缓冲盐溶液 2 后开始给药; 给药 15 min 后, 用冷缓冲盐溶液 3 终止反应, 并清洗细胞 3 次^[1, 4]; 每孔添加 400 μL 0.1 mol/L NaOH 裂解细胞; 取细胞裂解液于闪烁瓶中, 添加 3 mL 的闪烁液, 并用 Tri-Carb 2910TR α/β 射线计数仪测定样品中的放射性强度。

HEK293-SGLT2 细胞株及抑制剂组、阴性对照组均设置 3 重复, 其中阴性对照为 WT 细胞株, 抑制剂组为在转运体细胞株的给药混合液中添加了 1 $\mu\text{mol/L}$ 根皮苷^[5]。

2.2 糖复康宁对 SGLT2 的抑制作用

细胞培养基为 DMEM+10% FBS+青链霉素混合液, HEK293-SGLT2 细胞株及野生型细胞株 (WT), 经过复苏和传代培养后, 选取生长良好的贴壁细胞用胰酶消化使其分散为单细胞悬液, 之后用培养基稀释至 $1.5 \times 10^5/\text{mL}$, 以 1 mL/孔的量接种至 24 孔细胞培养板, 在 37 °C、5% CO₂、饱和空气湿度 (95%) 的培养箱内培养 2~3 d 使细胞长满各孔^[6]。

称取 100 mg 糖复康宁提取物用缓冲溶液 2 定容至 10 mL, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清溶液视为 10 mg/mL 的溶液; 用缓冲盐溶液 2 稀释至 6.00、2.00、0.60、0.20、0.06、0.02 mg/mL, 与含 100 μmol/L ¹⁴C-AMG (10 μCi/mL) 的缓冲溶液 2 等体积混合得到给药工作液。

移去细胞培养板内培养液, 用缓冲盐溶液 1 清洗 1 次, 每孔加入 37 °C 缓冲盐溶液 1 孵育 10 min, 以给药工作液置换旧缓冲盐溶液开始给药, 同时设置阴性对照组、HEK293-SGLT2 细胞株组、抑制剂 (根皮苷) 组, 设置方法同“2.1”项; 给药 15 min 后, 用冷缓冲盐溶液 3 终止反应, 并清洗细胞 3 次; 每孔添加 400 μL 0.1 mol/L NaOH 裂解细胞; 取细胞裂解液于上样瓶中, 添加 3 mL 的闪烁液, 并用 Tri-Carb 2910 TR 放射性液体闪烁仪测定样品中的放射性强度。

2.3 糖复康宁对二型糖尿病鼠的降糖作用

通过高糖高脂饲料喂食 SD 大鼠 60 d, 将禁食 18 h (正常饮水) 的大鼠一次 ip 链脲佐菌素 (STZ) 溶液 50 mg/kg, 体积为 1 mL/kg, 继续高糖高脂饲料喂食 3 d 后, 挑选空腹血糖值 >15 mol/L 的大鼠, 再以 25 mg/kg 的剂量进行第二次补注 STZ 溶液, 造模 7 d 后选择造模成功大鼠 (血糖 >15 mmol/L)。

模型成功大鼠随机分为 3 组: 模型组、糖复康宁降糖复方低、高剂量 (162、324 mg/kg) 组, 每组 8 只。每天给药 1 次, 连续给药 5 周, 每周测定各组动物的空腹血糖值, 给药结束后测定糖耐量, 血糖测定采用艾科·精益血糖测定系统。糖耐量试验动物禁食 12 h 后, 先测定空腹血糖, 然后 ig 给予 5 g/kg 的葡萄糖溶液, 其后 0.5、1.0、2.0 h 分别采尾血测血糖^[7]。

2.4 数据处理

将仅含放标底物的转运体细胞的转运值设为 U_C (单位为 DPM), 扣除本底组即 Mock 细胞的转

运值 U_0 , 即 $(U_C - U_0)$ 定义为 100%。以此为标准计算: 阴性对照组/抑制组/糖复康宁提取物的转运值设为 U , 相对转运活性 = $(U - U_0) / (U_C - U_0)$ 。

数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各数值间的差异性分析采用 *t*-test, 用 Microsoft Excel 2010 软件中统计学公式计算。通过 Prism 5.0 软件计算对转运体转运活性的半数抑制浓度 (IC_{50})。

3 结果

3.1 转染细胞株的功能验证

HEK293-SGLT2 细胞株的转运活性均较阴性对照组提高了 4 倍 ($P < 0.05$), 且加入 SGLT2 的抑制剂 1 μmol/L 根皮苷后, 转基因细胞株对 ¹⁴C-AMG 摄入活性明显下降 ($P < 0.05$), 表明 SGLT2 基因已经成功整合并在 HEK293 细胞株的染色体上稳定表达且功能良好, 可用于后续研究。

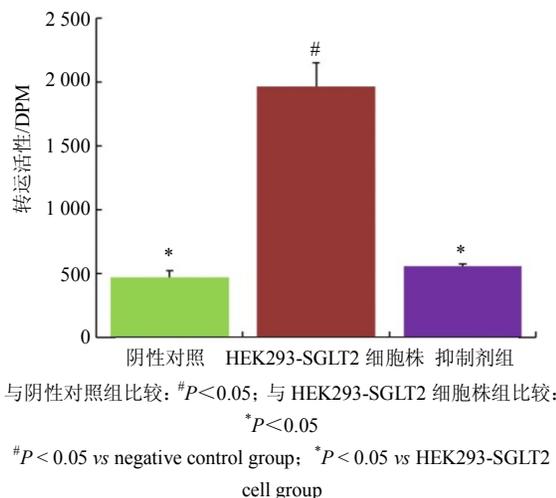


图 1 SGLT2 过表达细胞株的功能验证 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Functional identification of SGLT2-overexpressed cell line ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 糖复康宁对 SGLT2 的抑制作用

不同质量浓度的糖复康宁提取物对 SGLT2 的抑制作用如图 2 所示, 与对照组比较, 0.1、0.3、1.0、3.0 mg/mL 的糖复康宁提取物对 SGLT2 介导的 ¹⁴C-AMG 摄入均有显著的抑制作用 ($P < 0.05$); Prism 5.0 软件计算显示 (图 3), 糖复康宁提取物对 SGLT2 的抑制作用的 IC_{50} 为 0.119 mg/mL, 表明抑制作用较强。

3.3 糖复康宁提取物对糖尿病大鼠血糖的影响

血糖变化情况如表 1 所示, 二型糖尿病大鼠给药 35 d 期间, 模型组血糖均高于正常值, 且无显著性变化; 给药 14 d 后, 高剂量组血糖明显下降, 与

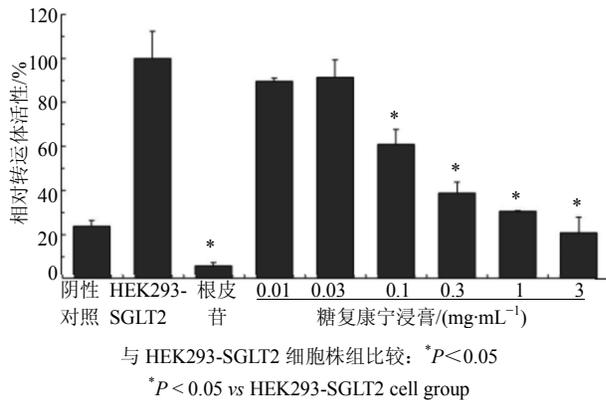


图2 不同浓度的糖复康宁提取物对SGLT2转运活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Inhibition of different concentration of TangFuKangNing extract to SGLT2 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

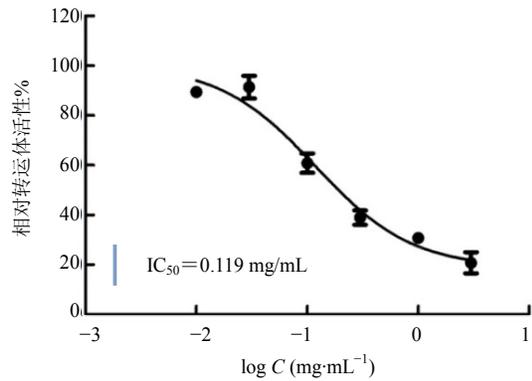


图3 糖复康宁提取物对SGLT2抑制作用IC₅₀计算结果($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 IC₅₀ determination of TangFuKangNing extract by Prism 5.0 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表1 二型糖尿病模型大鼠口服糖复康宁提取物期间的血糖变化 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Changes of type two diabetic mice after orally administrated with different dosage of TangFuKangNing extract ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

| 组别 | 剂量/(mg·kg ⁻¹) | 空腹血糖值 (mmol·L ⁻¹) | | | | | | 下降率% |
|---------|---------------------------|-------------------------------|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|-------|
| | | 给药 0 d | 给药 7 d | 给药 14 d | 给药 21 d | 给药 28 d | 给药 35 d | |
| 模型 | — | 21.14±4.27 | 21.58±5.34 | 21.20±4.07 | 21.62±4.27 | 21.80±4.60 | 21.73±4.02 | |
| 糖复康宁提取物 | 162 | 22.50±5.33 | 21.68±3.33 | 20.50±2.32 | 18.79±2.58 | 18.21±2.27 | 18.26±1.61* | 18.44 |
| | 324 | 22.43±5.51 | 18.40±2.93 | 16.84±3.89* | 15.52±4.29** | 14.45±3.87** | 13.20±4.45** | 41.15 |

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

模型组比较具有显著差异 ($P < 0.05, 0.01$); 给药 35 d 后, 低剂量组血糖明显降低, 与模型组比较具有显著差异 ($P < 0.05$); 低、高两个剂量组血糖与给药前比较下降百分率分别为 18.44% 和 41.15%。

糖耐量测定结果如表 2 所示, 给药 35 d 后, 低、高剂量组糖尿病大鼠给药后糖耐量与模型组比较显著改善 ($P < 0.05$)。结果提示, 糖复康宁提取物对二型糖尿病大鼠发挥降糖作用。

表2 糖复康宁提取物对二型糖尿病大鼠模型糖耐量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of TangFuKangNing extract on glucose tolerance of type two diabetic mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

| 组别 | 剂量/(mg·kg ⁻¹) | 餐后血糖/(mmol·L ⁻¹) | | |
|---------|---------------------------|------------------------------|------------|-------------|
| | | 餐后 0 h | 餐后 1 h | 餐后 2 h |
| 模型 | — | 28.96±2.25 | 28.05±2.39 | 27.30±2.20 |
| 糖复康宁提取物 | 162 | 29.59±2.82 | 27.48±2.07 | 23.05±2.37* |
| | 324 | 28.50±3.55 | 24.80±3.34 | 20.53±2.64* |

与模型组比较: * $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs model group

4 讨论

原尿中大于 90% 葡萄糖在肾近曲小管的刷状缘细胞上的葡萄糖转运体 SGLT2 的作用下重新进入到血液, 因此 SGLT2 对血糖具有重要的调节作用, 是糖尿病治疗的一个重要靶点。开发 SGLT2 的抑制剂, 抑制肾小管对葡萄糖的重吸收, 增加葡

萄糖的排泄, 达到降低糖尿病患者血糖的水平是治疗糖尿病的一条重要途径, 目前针对 SGLT2 的糖尿病治疗药物有达格列净、卡格列净、依帕列净等^[3, 8]。

糖复康宁是一种由 24 味药材组成的中药复方, 是清热降糖的常用中药方, 本研究结果显示, 0.1、0.3、1.0、3.0 mg/mL 的糖复康宁提取物对 SGLT2

转运活性有显著抑制作用, IC_{50} 为 0.119 mg/mL; 且可以显著降低二型糖尿病大鼠空腹血糖, 改善糖耐量。结果表明, 糖复康宁提取物对二型糖尿病大鼠发挥显著降糖作用, 其机制可能与抑制 SGLT2 转运活性相关。

糖复康宁提取物中成分十分复杂, 具体是哪一种成分在起作用还有待进一步研究; 中药发挥降糖作用的机制可能是多靶点, 本研究只是从一各方面阐述了糖复康宁提取物降糖的作用机制, 其他靶点还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Han S, Hagan D L, Taylor J R, et al. Dapagliflozin, a selective SGLT2 inhibitor, improves glucose homeostasis in normal and diabetic rats [J]. *Diabetes*, 2008, 57(6): 1723-1729.
- [2] Gallo L A, Wright E M, Vallon V. Probing SGLT2 as a therapeutic target for diabetes: Basic physiology and consequences [J]. *Diab Vasc Dis Res*, 2015, 12(2): 78-89.
- [3] Chao E C, Henry R R. SGLT2 inhibition--a novel strategy for diabetes treatment [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9(7): 551-559.
- [4] Wu W, Dong Y, Gao J, et al. Aspartate-modified doxorubicin on its N-terminal increases drug accumulation in LAT1-overexpressing tumors [J]. *Can Sci*, 2015, 106(6): 747-756.
- [5] Cai W, Jiang L, Xie Y, et al. Design of SGLT2 Inhibitors for the treatment of type 2 diabetes: A history driven by biology to chemistry [J]. *Med Chem*, 2015, 11(4): 317-328.
- [6] Kanai Y, Lee W S, You G, et al. The human kidney low affinity Na^+ /glucose cotransporter SGLT2. Delineation of the major renal reabsorptive mechanism for D-glucose [J]. *J Clin Invest*, 1994, 93(1): 397-404.
- [7] 孙桂菊, 王少康, 张小强, 等. II型糖尿病大鼠模型的建立及糖尿病并发症相关指标测定 [J]. *实验动物与比较医学*, 2003. 23(2): 79-82.
- [8] 熊 听, 隆 敏, 蔡雷琴, 等. 一种新型的降糖药物——SGLT2 抑制剂研究进展 [J]. *重庆医科大学学报*, 2016(11): 1172-1176.