

## 【药效学评价】

金芪降糖片联合胰岛素激活 PPAR- $\alpha$ /FGF21 信号改善 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗

尹清晟, 范姗姗, 陈 瑞, 张艳军, 庄朋伟\*

天津中医药大学 中药学院, 天津市中药药理学重点实验室, 天津 300193

**摘要:** 目的 考察金芪降糖片联合胰岛素对 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗的改善作用及作用机制。方法 采用高脂饲料喂养联合 ip 3 次小剂量 (35 mg/kg) 链脲霉素制备 2 型糖尿病大鼠模型, 选择空腹血糖值 >11.1 mmol/L 的大鼠进行后续实验。模型大鼠随机分为模型组、金芪降糖片 (0.5 g/kg) 组、胰岛素 (6.5 IU/kg) 组和联合给药 (金芪降糖片 0.5 g/kg+胰岛素 6.5 IU/kg) 组, 另选取 10 只健康大鼠作为对照组。各组均每天给药 1 次, 连续给药 4 周, 检测大鼠餐后 2 h 血糖并进行胰岛素耐量试验 (ITT), Elisa 方法检测大鼠血清成纤维细胞因子 21 (FGF21) 含量, Western Blotting 检测大鼠肝脏 PPAR- $\alpha$  表达情况。结果 与对照组比较, 模型组餐后血糖明显升高 ( $P < 0.01$ ), 胰岛素敏感性、肝脏 PPAR- $\alpha$  均显著降低 ( $P < 0.01$ ), 血清 FGF21 升高, 但无显著性差异; 与模型组比较, 联合给药能明显降低 2 型糖尿病大鼠餐后血糖 ( $P < 0.01$ ), 显著增加胰岛素敏感性 ( $P < 0.05$ ), 显著升高血清 FGF21 含量 ( $P < 0.01$ )、增加肝脏 PPAR- $\alpha$  表达 ( $P < 0.01$ ), 且较两药单用效果更优。结论 金芪降糖片联合胰岛素具有改善 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗、增加胰岛素敏感性的作用, 其机制可能与协同激活 PPAR- $\alpha$ /FGF21 信号有关。

关键词: 2 型糖尿病; 胰岛素抵抗; 金芪降糖片; 胰岛素; FGF21; PPAR- $\alpha$ 

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2018) 08- 1425 - 05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.08.011

Jinqi Jiangtang Tablet combined with insulin ameliorates insulin resistance in type 2 diabetic rats via PPAR- $\alpha$ /FGF21 signal

YIN Qingsheng, FAN Shanshan, CHEN Rui, ZHANG Yanjun, ZHUANG Pengwei

Tianjin Key Laboratory of Pharmacology of Traditional Chinese Medicine, College of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

**Abstract: Objective** To evaluate the effect of Jinqi Jiangtang Tablet (JJT) combined with insulin on insulin resistance (IR) in type 2 diabetic rats and its mechanism. **Methods** The rat model of type 2 diabetes was replicated by high-fat feeding combined with three low-dose (35 mg/kg) ip injection of streptozotocin, and animals with fasting blood glucose value greater than 11.1 mmol/L were selected for follow-up experiments. Model rats were randomly divided into model group, JJT (0.5 g/kg) group, insulin (6.5 IU/kg) group, and combined administration (JJT 0.5 g/kg + insulin 6.5 IU/kg) group. The treatment groups were intervened once daily for four weeks with giving clinical equivalent dose of drugs. At the end of the intervention, the postprandial blood glucose was measured and the insulin tolerance test (ITT) was performed, the level of fibroblast growth factor21 (FGF21) in serum and the expression of PPAR- $\alpha$  in liver was detected by Elisa and Western Blotting respectively. **Results** Compared with control group, postprandial blood glucose was significantly increased in rat of model group ( $P < 0.01$ ), insulin sensitivity and liver PPAR- $\alpha$  expression were significantly decreased ( $P < 0.01$ ), serum FGF21 was increased, but there was no significant difference. As compared with model group, JJT combined with insulin could significantly reduce the level of postprandial blood glucose ( $P < 0.01$ ) and obviously increase insulin sensitivity of the diabetic rat ( $P < 0.05$ ), significantly increase the serum FGF21 level and the

收稿日期: 2018-04-10

基金项目: 长江学者和创新团队发展计划资助项目 (IRT\_14R41)

第一作者: 尹清晟 (1994-), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药学。E-mail: carryable@163.com

\*通信作者: 庄朋伟 (1982-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为中药药理。E-mail: zhuangpengwei@tjutcm.edu.cn

expression of PPAR- $\alpha$  in liver ( $P < 0.01$ ), and these effects were better than the two drugs use alone. **Conclusion** JJT combined with insulin may improve insulin resistance and increase insulin sensitivity in type 2 diabetic rat, and its mechanism may be related to synergistic activation of PPAR- $\alpha$ /FGF21 signaling.

**Key words:** type 2 diabetic; insulin resistance; Jinqi Jiangtang Tablet; insulin; FGF21; PPAR- $\alpha$

胰岛素抵抗是指肝脏、肌肉和脂肪组织等周围靶组织对胰岛素的敏感性降低,是2型糖尿病的重要发病机制之一,增加胰岛素敏感性、改善胰岛素抵抗是预防和治疗2型糖尿病及其并发症的关键环节。

胰岛素是目前临床用于治疗糖尿病最常用的药物,但其不良反应限制它的广泛使用。复方金芪降糖片是由黄连、黄芪、金银花组成的中成药,药理实验证明,金芪降糖片中多种化学成分通过改善糖脂代谢、改善胰岛素抵抗、抗氧化等多个环节发挥协同抗糖尿病作用<sup>[1-3]</sup>。目前临床研究证实,金芪降糖片与西药联合能够更好的降低血糖<sup>[4-6]</sup>、改善胰岛素抵抗<sup>[4-5]</sup>,同时可减少低血糖的发生率<sup>[6]</sup>、减少胰岛素用量<sup>[6]</sup>,在临床上广泛使用。然而,关于金芪降糖片联合西药改善胰岛素抵抗的机制目前还不清楚。近期研究发现,成纤维细胞生长因子21(FGF21)可以明显改善胰岛素抵抗,降低胰岛素浓度<sup>[7-8]</sup>,且作用不依赖于胰岛素,提示对于胰岛素抵抗或者与胰岛素耐受相关的疾病,调节内源性 FGF21 可能是一个潜在的治疗途径。因此,本研究在考察金芪降糖片联合胰岛素改善胰岛素抵抗的基础上,基于 PPAR- $\alpha$ /FGF21 信号初步探讨了其作用机制,以期为临床治疗糖尿病提供新的理论依据。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

SPF 级健康雄性 Wistar 大鼠,体质量(200±10)g,由北京维通利华生物科技股份有限公司提供,实验动物生产许可证号 SCXK(京)2014-0008;饲养于中国医学科学院放射医学研究所,饲养室温度为 20~25 °C,气压恒定,每天 12 h 光照,自由饮水、摄食。

### 1.2 高脂饲料

高脂饲料(HFD H10060:含脂肪、蛋白质、碳水化合物),购于北京华阜康生物科技股份有限公司。

### 1.3 实验仪器

稳豪型(OneTouch Ultra)血糖仪、血糖试纸,购自强生(中国)医疗材料有限公司;凝胶成像分析仪(Cuene Genins); EC250-90 电泳仪(Thermo EC); 匀浆机(IKA/T18); Infinite M200 Pro 型多功能酶标仪(瑞士 TECAN); 3K 15 型离心机(美国 Sigma)。

## 1.4 主要试剂

金芪降糖片,规格 0.56 g/片,批号 10920027,购自天津中新药业集团股份有限公司隆顺榕制药厂;生物合成人胰岛素注射液(诺和灵),批号 J20100117,规格 3 mL/300 IU,丹麦诺和诺德公司;链脲霉素(Streptozocin, STZ),批号 18883-66-4,购自英国 Sigma 公司;FGF-21 试剂盒,购于南京建成生物工程研究所;兔多克隆 PPAR- $\alpha$  抗体(ab8934,英国 Abcam 公司);山羊抗兔 IgG(A20170918396,北京中杉金桥生物技术有限公司);BCA 蛋白含量检测试剂盒,购自原平皓生物技术公司。

## 2 方法

### 2.1 2型糖尿病大鼠模型的制备

4 周龄雄性健康 Wistar 大鼠 70 只,适应性喂养 1 周后,随机分为对照组(10 只)和高脂饲料组(60 只)。高脂饲料组大鼠喂养高脂饲料 3 周后,3 次小剂量(35 mg/mL) ip STZ,每次间隔 2 d,对照组在相同条件下 ip 等体积柠檬酸钠缓冲液(0.1 mol/L, pH 4.5)。末次 ip STZ 1 周后,尾静脉取血检测所有大鼠空腹血糖,血糖值 > 11.1 mmol/L 即为 2 型糖尿病模型成功,剔除未成模大鼠。

### 2.2 分组及给药方法

将空腹血糖值 > 11.1 mmol/L 的大鼠按血糖随机分为 4 组:模型组、金芪降糖片(0.5 g/kg)组、胰岛素(生物合成人胰岛素注射液 6.5 IU/kg)组和联合给药(金芪降糖片 0.5 g/kg+胰岛素 6.5 IU/kg)组,金芪降糖片和胰岛素均为临床等效剂量。金芪降糖片每天固定时间按 1 mL/100 g ig 给药 1 次,对照组、模型组及胰岛素组 ig 给予等量蒸馏水;胰岛素每天按 0.5 mL/100 g ip 给药 1 次,对照组、模型组及金芪降糖片组每天 ip 等量生理盐水,连续给药 4 周。

### 2.3 餐后 2 h 血糖监测

给药结束前,实验动物禁食 12 h,每组大鼠均 ig 2.5 g/kg 葡萄糖溶液,同时给予相应药物,2 h 后,尾静脉取血,血糖仪检测血液葡萄糖含量,观察各治疗组对 2 型糖尿病大鼠餐后血糖的影响。

### 2.4 胰岛素耐量试验(ITT)

给药治疗结束后,大鼠禁食 4 h。ip 胰岛素(0.5

IU/kg), 随后分别在 0、15、30、60、90、120 min 时尾静脉取血检测血糖, 计算曲线下面积 (AUC), 观察各组大鼠胰岛素敏感性。

### 2.5 血清 FGF21 的检测

药物干预 4 周后, 大鼠禁食 12 h, 水合氯醛麻醉, 腹主动脉取血, 3 000 r/min 离心 15 min, 取上层血清。Elisa 试剂盒法检测各药物治疗对 2 型糖尿病大鼠血清 FGF21 的影响。

### 2.6 Western blotting 检测肝脏 PPAR- $\alpha$ 蛋白表达

给药治疗 4 周后, 大鼠禁食 12 h, 水合氯醛麻醉, 取肝脏组织, 匀浆, 提取总蛋白, BCA 试剂盒法进行蛋白定量。蛋白样品经上样, SDS-PAGE 电泳分离, 120 mA 2 h 电转至 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶 TBST 中室温封闭 1 h, 加入一抗 (1:1 000) 兔多克隆 PPAR- $\alpha$  抗体, 4  $^{\circ}$ C 放置过夜。加入辣根过氧化物酶标记的二抗山羊抗兔 IgG (1:1 000), 室温孵育 1 h。利用凝胶成像仪检测分析, 应用 Bio imaging system 图象处理系统分析样品  $\beta$ -actin 和目的条带的灰度值, 考察各药物治疗对肝脏 PPAR- $\alpha$  蛋白表达的影响。

### 2.7 数据统计

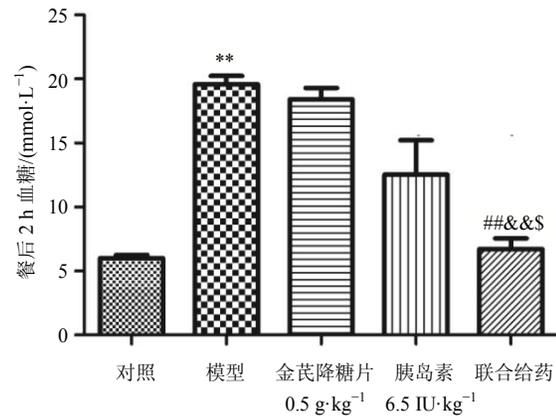
数据均以  $\bar{x} \pm s$  形式表示, 应用 SPSS 17.0 统计软件, 单因素方差分析进行显著性检验, 方差齐时采用 LSD 检验, 方差不齐时采用 Tamhane's T2 检验。

## 3 结果

### 3.1 对 2 型糖尿病大鼠餐后 2 h 血糖的影响

如图 1 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠餐后血糖明显升高, 差异显著 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较,

各给药组均有降低糖尿病大鼠餐后血糖的趋势, 其中联合给药组差异显著 ( $P < 0.01$ ); 与单用金芪降糖片和胰岛素组比较, 联合用药组餐后血糖明显降低, 且差异显著 ( $P < 0.01, 0.05$ )。结果提示, 金芪降糖片联合胰岛素能明显降低 2 型糖尿病大鼠餐后血糖。



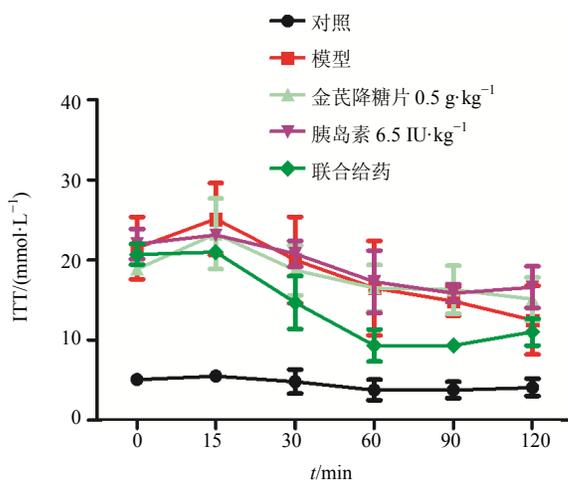
与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: ### $P < 0.01$ ; 与金芪降糖片组比较: && $P < 0.01$ ; 与胰岛素组比较:  $^S P < 0.05$   
\*\* $P < 0.01$  vs control group; ### $P < 0.01$  vs model group; && $P < 0.01$  vs Jinqi Jiangtang Tablet group;  $^S P < 0.05$  vs insulin group

图 1 金芪降糖片联合胰岛素对 2 型糖尿病大鼠餐后血糖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 1 Effect of Jinqi Jiangtang Tablet combined with insulin on postprandial blood glucose in diabetic rats ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

### 3.2 对 2 型糖尿病大鼠胰岛素敏感性的影响

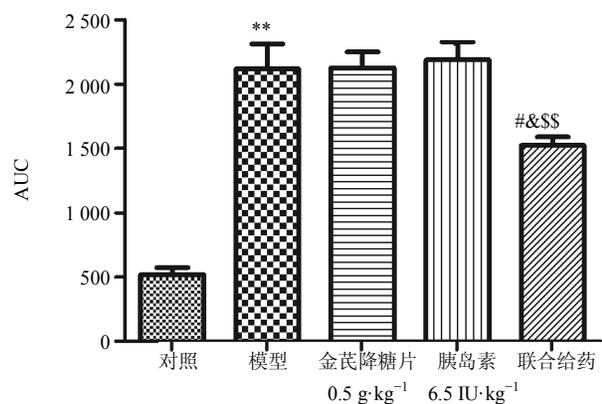
如表 2 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠胰岛素敏感性明显降低 ( $P < 0.01$ ); 单用金芪降糖片、



与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ; 与金芪降糖片组比较: & $P < 0.05$ ; 与胰岛素组比较:  $^{SS} P < 0.01$   
\*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$  vs model group; & $P < 0.05$  vs Jinqi Jiangtang Table group;  $^{SS} P < 0.05$  vs insulin group

图 2 金芪降糖片联合胰岛素对 2 型糖尿病大鼠胰岛素敏感性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 2 Effect of Jinqi Jiangtang Tablets combined with insulin on insulin sensitivity in diabetic rats ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )



胰岛素对 2 型糖尿病大鼠胰岛素敏感性无明显改善作用;与模型组、单用金芪降糖片和胰岛素组比较,联合给药组能明显增加 2 型糖尿病大鼠胰岛素敏感性 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。结果提示,金芪降糖片联合胰岛素有增加 2 型糖尿病大鼠胰岛素敏感性的作用。

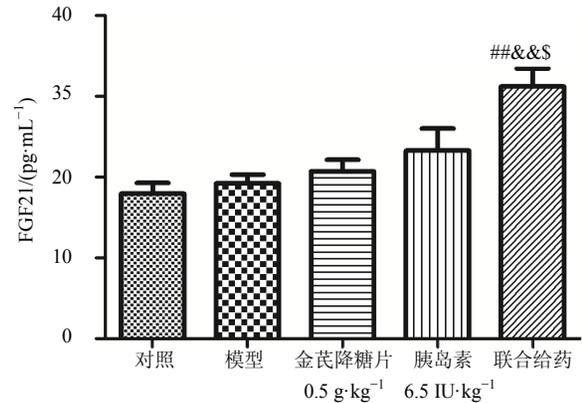
### 3.3 对 2 型糖尿病大鼠血清 FGF21 水平的影响

模型组大鼠血清 FGF21 水平较对照组升高,但无显著性差异;单用金芪降糖片和胰岛素组血清 FGF21 水平较模型组均有升高趋势,但无显著性差异;联合给药组血清 FGF21 水平较模型组明显升高 ( $P < 0.01$ );与单用金芪降糖片和胰岛素组比较,联合给药组血清 FGF21 水平明显升高 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。结果提示,金芪降糖片联合胰岛素较两药单用能明显增加 2 型糖尿病大鼠血清 FGF21 水平。见图 3。

### 3.4 对 2 型糖尿病大鼠肝脏 PPAR- $\alpha$ 蛋白表达的影响

结果显示,与对照组比较,模型组大鼠肝脏 PPAR- $\alpha$  蛋白表达明显降低 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,各给药组肝脏 PPAR- $\alpha$  明显升高 ( $P < 0.05$ );联合给药组较单用金芪降糖片和胰岛素组肝脏 PPAR- $\alpha$  升高更加明显 ( $P < 0.01$ )。结果提示,金芪

降糖联合胰岛素能协同增加 2 型糖尿病大鼠肝脏 PPAR- $\alpha$  含量。见图 4。

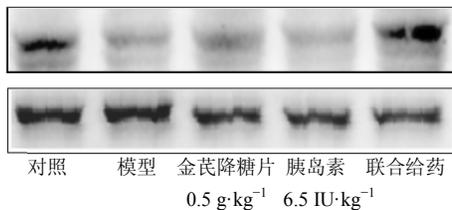


与模型组比较:  $###P < 0.01$ ; 与金芪降糖组比较:  $&&P < 0.01$ ; 与胰岛素组比较:  $SSP < 0.05$

$##P < 0.05$  vs model group;  $&&P < 0.01$  vs Jinqi Jiantang Tablet group;  $SSP < 0.05$  vs insulin group

图 3 金芪降糖片联合胰岛素对 2 型糖尿病大鼠血清 FGF21 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 3 Effect of Jinqi Jiantang Tablets combined with insulin on serum FGF21 in diabetic rats ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )



与对照组比较:  $**P < 0.01$ ; 与模型组比较:  $#P < 0.05$   $###P < 0.01$ ; 与金芪降糖组比较:  $&&P < 0.01$ ; 与胰岛素组比较:  $SSP < 0.01$   
 $**P < 0.01$  vs control group;  $#P < 0.05$   $###P < 0.01$  vs model group;  $&&P < 0.01$  vs Jinqi Jiantang Tablet group;  $SSP < 0.01$  vs insulin group

图 4 金芪降糖片联合胰岛素对糖尿病大鼠肝脏 PPAR- $\alpha$  的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 Effect of Jinqi Jiantang Table combined with insulin on PPAR- $\alpha$  in liver of diabetic rats ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

## 4 讨论

2 型糖尿病是以持续高血糖为主要特征的代谢性疾病,其基本特征为胰岛  $\beta$  细胞功能缺失和胰岛素抵抗<sup>[9]</sup>。胰岛素抵抗不仅是 2 型糖尿病的发病机制之一,更是贯穿于 2 型糖尿病发生、发展的全过程。因此,增加胰岛素敏感性、改善胰岛素抵抗是预防和治疗 2 型糖尿病及其并发症的关键策略。

本研究采用中西药联合治疗的方法,考察金芪降糖片联合胰岛素对 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗的改善作用及其作用机制,以期 of 糖尿病的治疗提供新的理论依据。实验采用高脂喂养联合 3 次小剂量 (35 mg/kg) ip STZ 诱导 2 型糖尿病模型,模型大鼠血糖明显升高,且出现多饮多尿等糖尿病症状,选取空腹血糖  $\geq 11.1$  mmol/L 的大鼠进行后续实验。

药物连续治疗4周后,模型组大鼠餐后2 h血糖明显升高,而给予金芪降糖联合胰岛素治疗能明显降低2型糖尿病大鼠餐后血糖,且比单用金芪降糖和胰岛素降低餐后血糖效果更为显著。ITT结果显示,与对照组比较,模型组大鼠对胰岛素的敏感性明显降低( $P < 0.01$ ),出现明显的胰岛素抵抗,给予金芪降糖片联合胰岛素治疗能增加胰岛素敏感性,改善糖尿病大鼠胰岛素抵抗。然而,目前关于金芪降糖片联合胰岛素改善糖尿病大鼠胰岛素抵抗的机制仍不清楚。

FGF-21 是最新发现的和糖脂代谢有关的因子<sup>[10]</sup>,其主要在肝脏中表达<sup>[11]</sup>,研究发现,FGF21可以改善胰岛素敏感性,增加胰岛 $\beta$ 细胞的存活<sup>[12]</sup>,内源性 FGF-21 基因表达水平受 PPAR- $\alpha$  调节<sup>[13-14]</sup>。因此,本实验检测了各组大鼠血清 FGF21 的含量和肝脏 PPAR- $\alpha$  的表达情况,结果发现,模型组血清 FGF21 含量较对照组升高,该结果与文献报道一致<sup>[15-16]</sup>,推测可能为一种代偿性升高。金芪降糖片联合胰岛素治疗后,实验动物血清 FGF21 含量和肝脏 PPAR- $\alpha$  的表达均明显升高,提示金芪降糖片联合胰岛素可能协同调控了 PPAR- $\alpha$ /FGF21 信号通路。

本研究通过实验动物表明,金芪降糖片联合胰岛素能改善糖尿病大鼠胰岛素抵抗状态,增加胰岛素敏感性,其机制可能是金芪降糖片联合胰岛素协同调控了 PPAR- $\alpha$ /FGF21 信号通路。

#### 参考文献

- [1] 王月,王涛,吴建霞,等.金芪降糖片组分体外抗糖尿病的作用及机制[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(16):105-109.
- [2] 袁雪海,吕楠,靳学海,等.新工艺金芪降糖片降糖和调脂作用研究[J].中草药,2015,46(21):3219-3222.
- [3] Day C. Traditional plant treatments for diabetes mellitus: pharmaceutical foods [J]. Br J Nutr, 1998, 80(1): 5-6.
- [4] 殷雪芹.金芪降糖片联合吡格列酮片治疗2型糖尿病高胰岛素血症的临床疗效[J].海峡药学,2016,28(2):107-108.
- [5] 顾文元.金芪降糖片与格列齐特联合治疗2型糖尿病的临床观察[J].天津医科大学学报,2004,1(10):87-89.
- [6] 陈绪忠.金芪降糖片联合胰岛素治疗胰岛素抵抗患者低血糖发作临床研究[J].中医学报,2014,29(2):192-194.
- [7] Kharitonov A, Wroblewski V J, Koester A, et al. The metabolic state of diabetic monkeys is regulated by fibroblast growth factor-21 [J]. Endocrinology, 2007, 148: 774-781.
- [8] Coskun T, Bina H A, Schneider M A, et al. Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice [J]. Endocrinology, 2008, 149: 6018-6027.
- [9] Patti M E, Butte A J, Crunkhorn S, et al. Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1 [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(14): 8466-8471.
- [10] Kharitonov A, Wroblewski V J, Koester A, et al. The metabolic state of diabetic monkeys is regulated by fibroblast growth factor-21 [J]. Endocrinology, 2007, 148(2): 774-781.
- [11] Nishimura T, Nakatake Y, Konishi M, et al. Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver [J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1492: 203-206.
- [12] Wente W, Efanov A M, Brenner M, et al. Fibroblast growth factor-21 improves pancreatic beta-cell function and survival by activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Akt signaling pathways [J]. Diabetes, 2006, 55(9): 2470-2478.
- [13] Inagaki T, Dutchak P, Zhao G, et al. Endocrine regulation of the fasting response by PPAR alpha-mediated induction of fibroblast growth factor 21 [J]. Cell Metab, 2007, 5(6): 415-425.
- [14] Oishi K, Uchida D, Ohkura N, et al. PPAR- $\alpha$  deficiency augments a ketogenic diet-induced circadian PAI-1 expression possibly through PPAR $\gamma$  activation in the liver [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 401(2): 313-318.
- [15] 薛静静,李婷,王彦.小檗碱对2型糖尿病大鼠血清成纤维细胞生长因子21的影响[J].中西医结合心脑血管病杂志,2016,14(14):1603-1605.
- [16] Chave A O, Molina-Carrion M, Abdul-Ghani M A, et al. Circulating fibroblast growth factor-21 is elevated in impaired glucose tolerance and type 2 diabetes and correlates with muscle and hepatic insulin resistance [J]. Diabetes Care, 2009, 32(8): 1542-1546.