

玄参多糖对 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢及肝胰岛素信号通路的影响

郑园园^{1,2}, 王 健², 蒋剑平³, 周迪夷⁴, 任菁菁^{1*}

1. 浙江大学附属第一医院 全科医学科, 浙江 杭州 310006

2. 杭州市下城区长庆潮鸣街道社区卫生服务中心, 浙江 杭州 310003

3. 浙江中医药大学附属第一医院, 浙江 杭州 310006

4. 浙江省中西医结合医院, 浙江 杭州 310003

摘要: 目的 探究玄参多糖对 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢及肝胰岛素信号通路的影响。方法 采用链脲佐菌素 (STZ) 注射法制备糖尿病大鼠模型, 随机分成 5 组, 分别为模型组、阳性药二甲双胍 (200 mg/kg) 组及玄参多糖低、中、高剂量 (80、160、320 mg/kg) 组, 另设同龄普通饲料喂养大鼠为对照组; ig 给药 6 周后监测各组大鼠体重及生存状态、空腹血糖 (FBG)、血脂 [总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)]、肝功能 [丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST)]、肾功能 [肌酐 (CREA)、血尿素氮 (BUN)]、糖化血红蛋白 (GHb)、空腹血清胰岛素 (FINS)、C-肽、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 等指标的变化; HE 染色和油红 O 染色评估大鼠肝脏病理学变化及脂肪变性; Western blotting 法检测肝胰岛素信号通路相关蛋白表达。结果 玄参多糖能回升 2 型糖尿病大鼠体重, 改善代谢功能, 降低大鼠 FBG、GHb、ALT、AST、CREA、BUN、TC、TG、LDL-C、MDA 水平, 升高 HDL-C、FINS、C-肽、SOD、CAT、GSH-Px 水平; Western blotting 结果表明玄参多糖能活化 IRS-2/PI3K/Akt 信号通路, 升高过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR- γ)、葡萄糖转运蛋白 4 (GLUT-4) 表达水平。结论 玄参多糖能够改善 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢, 其机制可能跟调控肝胰岛素信号通路有关。

关键词: 玄参多糖; 2 型糖尿病; 糖脂代谢; 肝脏; 胰岛素

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)06-1586-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.06.027

Effects of polysaccharides from *Scrophulariae Radix* on glucolipid metabolism and hepatic insulin signaling pathway in type 2 diabetic rats

ZHENG Yuan-yuan^{1,2}, WANG Jian², JIANG Jian-ping³, ZHOU Di-yi⁴, REN Jing-jing¹

1. Department of General Practice, The First Affiliated Hospital of Zhejiang University, Hangzhou 310006, China

2. Changqing Chaoming Community Health Service Center, Xiacheng District of Hangzhou, Hangzhou 310003, China

3. The First Affiliated Hospital of Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310006, China

4. Zhejiang Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Hangzhou 310003, China

Abstract: Objective To explore effects of polysaccharides from *Scrophulariae Radix* (PFR) on glucolipid metabolism and hepatic insulin signaling pathway in type 2 diabetic rats. **Methods** Diabetic rat models were constructed by STZ injection, and randomly divided into five groups: model group, low, medium and high dose groups (80, 160, 320 mg/kg) of PFR, and positive drug group of metformin (200 mg/kg); In addition, ordinary feed rats of the same age were set as normal group; Body weight and survival status, fasting blood glucose (FBG), blood lipid (TC, TG, HDL-C, LDL-C), liver function (ALT, AST), renal function (CREA, BUN), glycosylated hemoglobin (GHb), insulin secretion (FINS), C-peptide, SOD, MDA, CAT, GSH-Px, and other indicators were detected after drug delivery for six weeks; HE staining and oil red O staining were used to evaluate the pathological changes and steatosis of liver in rats; Western blotting was used to detect the changes of hepatic insulin signaling pathway related protein. **Results** PFR increased the weight of diabetic rats, improved the metabolic function, reduced the content of FBG, GHb, ALT, AST, CREA, BUN, TC, TG, LDL-C, MDA and increased the content of HDL-C, FINS, C-peptide, SOD, CAT and GSH-Px; Western blotting assay

收稿日期: 2019-12-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81703996); 杭州市卫生科技计划项目 (0020191054)

作者简介: 郑园园, 本科, 副主任医师。E-mail: zyy11770370@163.com

*通信作者 任菁菁, 博士, 主任医师, 从事全科医学领域相关研究。E-mail: lisarjj@126.com

showed that PFR could activate IRS-2/PI3K/Akt signaling pathway and increase the protein levels of PPAR- γ and GLUT-4.

Conclusion PFR could improve glucolipid metabolism in type 2 diabetic rats by regulating the hepatic insulin signaling pathway.

Key words: polysaccharides from *Scrophulariae Radix*; type 2 diabetic; glucolipid metabolism; liver; insulin

2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 是最常见的糖尿病类型, 占有所有糖尿病的 90% 以上^[1]。高血糖、胰岛素分泌缺陷或其生物作用受损是糖尿病的主要特征^[2]。寻找低毒有效的糖尿病治疗药物在全科医学领域也越来越受到重视。玄参为多年生草本植物玄参 *Scrophularia ningpoensis* Hemsl 的干燥块根, 味甘、苦、咸, 性微寒, 归肺、胃、肾经, 具有抗菌抗炎、抗肿瘤、保肝、解热镇痛等药理作用^[3-4]。玄参多糖为玄参的主要成分之一, 具有一定的抗疲劳和抗氧化作用^[5], 目前已有文献报道, 玄参多糖对 T2DM 大鼠具有显著的降糖作用^[6], 然而其具体的作用机制有待进一步阐明。本研究采用链脲佐菌素 (STZ) 加高脂高糖饲料诱导 T2DM 大鼠模型, 通过检测玄参多糖对其各项指标的影响进行综合评价, 探究玄参多糖的降糖作用及具体的作用机制。

1 材料

1.1 动物

6 周龄清洁级 Wistar 大鼠 70 只, 雄性, 体质量 (150 $\pm$ 20)g, 由浙江中医药大学动物实验中心提供, 实验动物许可证号 SYXK (浙) 2018-0012。

1.2 药物与试剂

玄参购自贵州遵义市药材市场, 经浙江中医药大学中药研究所宋捷民教授鉴定为玄参科植物玄参 *Scrophularia ningpoensis* Hemsl 的干燥块根; 玄参多糖参考文献报道^[6], 采用水提醇沉法由本实验室自行提取, 提取后计算其产率为 2.29%, 硫酸苯酚法测得质量分数为 65.8%; 链脲佐菌素 (批号 S0130, 质量分数 $\geq$ 98%)、二甲双胍 (批号 BP227, 质量分数 $\geq$ 98%), 美国 Sigma 公司; 超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、过氧化氢酶 (CAT) 及谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 大鼠糖化血红蛋白 (GHb)、空腹血清胰岛素 (FINS)、C-肽 ELISA 检测试剂盒 (北京诚林生物科技有限公司); 胰岛素受体底物 2 (IRS-2)、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)、蛋白激酶 B (Akt)、磷酸化 Akt (p-Akt)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR- γ)、葡萄糖转运蛋白 4 (GLUT-4)、GAPDH 一抗 (CST 公司); 辣根过氧化物酶标记山

羊抗兔二抗 (Bio-Rad 公司)。

1.3 仪器

ACCUCHEK 型血糖仪 (上海罗氏制药公司); 7020 全自动生化分析仪 (日本日立公司); BSA124S-CW 电子天平 (北京赛多利斯电子有限公司); HHS-11-1 型恒温水浴箱 (上海博迅医疗设备厂); 转移脱色摇床 (姜堰市普康医疗机械厂); PowerPac Basic 电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); 3300 Mini 化学发光成像系统 (CLinX 公司); Infinite M200 PRO 型多功能酶标仪 (奥地利 Tecan 公司); HLC-723G8 全自动糖化血红蛋白分析仪 (上海希森美康医用电子有限公司)。

2 方法

2.1 模型制备

采用 6 周龄清洁级 Wistar 大鼠 70 只, 在专用饲养笼中饲养, 室温 22 $^{\circ}$ C, 相对湿度 65%, 昼夜交替时间 12 h, 自由摄食和饮水。适应环境 1 周后, 将大鼠随机分成对照组 ($n=10$) 和实验组 ($n=60$)。对照组饲以普通饲料; 实验组饲以高脂饲料 4 周后, 所有大鼠禁食 12 h, 尾 iv STZ 30 mg/kg (溶于 0.1 mol/L 枸橼酸缓冲液, pH 4.5) 制备 T2DM 模型。

2.2 分组与给药

注射 STZ 72 h 后, 罗氏血糖仪检测针刺尾静脉取出血样的血糖含量, 选择 50 只血糖水平超过 11.1 mmol/L 的大鼠作为 T2DM 模型大鼠, 随机分为 5 组, 分别为模型组、阳性药二甲双胍组和玄参多糖低、中、高剂量组。其中对照组和模型组 ig 给予 10 mL/(kg·d) 蒸馏水; 玄参多糖低、中、高剂量组给药剂量按玄参人体临床用药上限的 2、4、8 倍量折算, 即 80、160、320 mg/kg; 阳性药组按照 200 mg/kg ig 给予盐酸二甲双胍水溶液。给药组每天 8:30 按照 10 mL/kg ig 给药 1 次, 持续 6 周。

2.3 体质量及生存状态监测

在药物干预结束的第 6 周, 测定各组大鼠体质量, 上代谢笼监测各组大鼠 12 h 的饮水量、摄食量和尿量。

2.4 空腹血糖 (FBG) 测定

在给药的第 6 周末, 各组大鼠禁食 8 h, 眼眶静脉丛取血, 3 500 r/min, 离心 15 min, 取血清, 采

用罗氏血糖仪测定大鼠 FBG 水平。

2.5 血脂、肝功能、肾功能生化指标测定

在第 6 周末次给药前 10 h, 大鼠禁食不禁水, 给药 2 h 后, 3%戊巴比妥钠麻醉; 腹主动脉采血, 3 500 r/min 离心 15 min, 取血清, -20 °C 保存, 全自动生化分析仪测定大鼠血清中总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST)、肌酐 (CREA)、血尿素氮 (BUN) 水平。

2.6 GHb、FINS、C-肽水平测定

利用全自动糖化血红蛋白分析仪, 采用高效液相色谱仪法检测 GHb; 按照酶联免疫检测试剂盒操作流程测定 FINS 和 C-肽水平。

2.7 SOD、MDA、CAT 及 GSH-Px 的测定

用相应的试剂盒测定大鼠血清中 SOD、MDA、CAT 及 GSH-Px 水平。

2.8 肝脏组织监测

大鼠给药 6 周取血后迅速分离肝脏, 于冰上取部分组织用于石蜡切片, 进行常规 HE 染色, 观察大鼠肝脏病理学改变情况。油红 O 染色, 观察大鼠肝脏脂肪变性情况。余下部分置于 -80 °C 冻存, 用于后续 Western blotting 检测。

2.9 相关蛋白测定

Western blotting 法检测大鼠肝脏中 IRS-2、PI3K、Akt、p-Akt、PPAR- γ 及 GLUT-4 蛋白的表达情况。取组织样品置于培养皿中, 用干净的剪刀将组织块尽量剪碎, 加入 1 mL 冷 Lysis Buffer, 组织匀浆机中进行匀浆 (3 $\times$ 20 s), 使组织尽量碾碎, 冰上静置裂解 15~30 min 放入离心管中, 12 000 $\times$ g, 4 °C 离心 5 min, 取上清转移至新的预冷的离心管中。采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度后, 处理蛋

白后上样。用 SDS-PAGE 分离总蛋白, 湿转法转移至 PVDF 膜上。将一抗按照说明书上特定比例用 5% 脱脂奶粉稀释之后, 加到膜上, 使其完全盖住膜, 置于摇床上, 4 °C 孵育过夜, 二抗室温孵育 2 h 后显影。采用 Image J 对蛋白条带进行灰度值分析。

2.10 统计学处理

实验结果用 SPSS 22.0 统计软件进行分析, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间分析采用 LSD-*t* 检验, 多组间均数比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 玄参多糖对 T2DM 大鼠体质量、饮水量、摄食量和尿量的影响

如表 1 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠体质量显著降低 ($P < 0.01$), 12 h 的饮水量、摄食量和尿量均显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001)。与模型组比较, 玄参多糖中、高剂量组和二甲双胍组大鼠体质量显著增加 ($P < 0.05$); 玄参多糖各剂量组和二甲双胍组大鼠 12 h 的饮水量、摄食量和尿量均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.2 玄参多糖对 T2DM 大鼠 FBG 和血脂的影响

给药 6 周后检测各组小鼠 FBG 和血脂水平, 结果见表 2, 与对照组比较, 模型组大鼠 FBG、TC、TG 及 LDL-C 水平均显著升高 ($P < 0.01$), HDL-C 水平显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 玄参多糖中、高剂量组和二甲双胍组大鼠 FBG、TG 水平显著升高 ($P < 0.05$); 玄参多糖高剂量组和二甲双胍组大鼠 TC 水平显著升高 ($P < 0.05$); 玄参多糖各剂量组和二甲双胍组大鼠 HDL-C 水平显著升高, LDL-C 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.3 玄参多糖对 T2DM 大鼠肝、肾功能指标的影响

给药 6 周后检测玄参多糖对大鼠肝、肾功能各指标的影响, 结果如表 3 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠血清 ALT、AST、CREA 及 BUN 水平平均

表 1 玄参多糖对 T2DM 大鼠体质量、饮水量、摄食量和尿量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1 Effects of PFR on body weight, water intake, food intake and urine volume in type 2 diabetic rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	体质量/g	饮水量/mL	摄食量/g	尿量/mL
对照	—	438.6 $\pm$ 3.9	37.1 $\pm$ 3.0	21.8 $\pm$ 3.4	17.3 $\pm$ 2.2
模型	—	358.1 $\pm$ 13.1 ^{##}	240.9 $\pm$ 31.9 ^{##}	49.5 $\pm$ 7.0 ^{##}	206.0 $\pm$ 15.3 ^{###}
二甲双胍	200	376.8 $\pm$ 11.1 [*]	171.3 $\pm$ 11.2 [*]	30.8 $\pm$ 2.4 [*]	151.0 $\pm$ 14.2 [*]
玄参多糖	80	367.1 $\pm$ 7.2	187.7 $\pm$ 9.6 [*]	36.5 $\pm$ 3.9 [*]	171.7 $\pm$ 11.9 [*]
	160	377.6 $\pm$ 7.4 [*]	204.1 $\pm$ 14.6 [*]	32.4 $\pm$ 3.1 [*]	170.0 $\pm$ 7.6 [*]
	320	388.7 $\pm$ 6.9 [*]	180.7 $\pm$ 15.9 [*]	27.5 $\pm$ 2.7 ^{**}	136.1 $\pm$ 13.3 [*]

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$, 下表同

^{###} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group, same as below tables

表 2 玄参多糖对 T2DM 大鼠 FBG 和血脂的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of PFR on blood glucose and lipid in type 2 diabetic rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	FBG/ (mmol·L ⁻¹)	TC/ (mmol·L ⁻¹)	TG/ (mmol·L ⁻¹)	HDL-C/ (mmol·L ⁻¹)	LDL-C/ (mmol·L ⁻¹)
对照	—	5.7±0.5	0.85±0.22	0.38±0.17	1.06±0.47	0.93±0.41
模型	—	28.2±2.5 ^{##}	3.61±1.06 ^{##}	1.36±0.29 ^{##}	0.37±0.13 ^{##}	2.76±0.67 ^{##}
二甲双胍	200	20.2±2.4 [*]	1.98±0.46 [*]	0.50±0.15 [*]	0.99±0.35 [*]	1.46±0.39 [*]
玄参多糖	80	22.9±2.1	2.38±0.64	0.84±0.17	0.71±0.31 [*]	1.72±0.41 [*]
	160	21.9±1.2 [*]	2.58±0.35	0.80±0.21 [*]	0.78±0.19 [*]	1.62±0.31 [*]
	320	19.0±1.3 [*]	1.93±0.57 [*]	0.63±0.21 [*]	1.07±0.34 ^{**}	1.54±0.22 [*]

表 3 玄参多糖对 T2DM 大鼠 ALT、AST、CREA 以及 BUN 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effects of PFR on ALT, AST, CREA and BUN in type 2 diabetic rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	CREA/(mmol·L ⁻¹)	BUN/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	45.05± 3.02	159.53± 7.28	16.80±2.96	6.0±0.8
模型	—	190.71± 9.72 ^{##}	320.25±10.22 ^{##}	62.43±6.44 ^{##}	17.5±2.8 ^{##}
二甲双胍	200	158.96±11.08 [*]	219.62±13.72 [*]	44.56±5.20 [*]	8.6±2.3 [*]
玄参多糖	80	175.45± 8.96	268.51±10.39	52.48±5.34	10.8±1.5 [*]
	160	161.60±10.71 [*]	240.57±10.75 [*]	48.46±5.33 [*]	10.8±3.0 [*]
	320	151.34± 8.89 [*]	193.93±11.12 [*]	45.47±3.10 [*]	8.8±2.5 [*]

显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较,玄参多糖中、高剂量组和二甲双胍组大鼠血清 ALT、AST 及 CREA 水平显著降低 ($P < 0.05$);玄参多糖低、中、高剂量组和二甲双胍组大鼠血清 BUN 水平显著降低 ($P < 0.05$)。

3.4 玄参多糖对 T2DM 大鼠 GHb、FINS 和 C-肽的影响

如表 4 所示,与对照组比较,模型组大鼠 GHb 水平显著升高 ($P < 0.01$),而 FINS 和 C-肽的水平显著降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较,玄参多糖中、高剂量组和二甲双胍组大鼠 GHb 水平显著降低 ($P < 0.05$),FINS 水平显著升高 ($P < 0.05$);玄参多糖低、中、高剂量组和二甲双胍组大鼠中 C-肽水

平显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01)。

3.5 玄参多糖对 T2DM 大鼠氧化应激水平的影响

如表 5 所示,与对照组比较,模型组大鼠 SOD、CAT 和 GSH-Px 水平显著降低 ($P < 0.01$),MDA 水平显著升高 ($P < 0.01$),表明 T2DM 大鼠体内的抗氧化能力明显下降。与模型组比较,玄参多糖低、中、高剂量和二甲双胍均能显著升高 SOD、CAT 和 GSH-Px 水平 ($P < 0.05$ 、0.01),同时显著降低 MDA 水平 ($P < 0.05$),作用效果呈现剂量依赖性。

3.6 玄参多糖对 T2DM 大鼠肝脏病理学的影响

如图 1 所示,对照组大鼠肝脏组织结构清晰,肝细胞形态饱满,排列整齐,没有明显的脂质空泡。而模型组大鼠肝脏组织则出现显著的病理改变,主

表 4 玄参多糖对 T2DM 大鼠 GHb、FINS 和 C-肽的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effects of PFR on GHb, FINS and C-peptide in type 2 diabetic rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	GHb/%	FINS/(pg·mL ⁻¹)	C-肽/(pmol·mL ⁻¹)
对照	—	5.0±0.7	13.79±2.27	0.68±0.12
模型	—	11.9±1.7 ^{##}	5.57±1.22 ^{##}	0.11±0.04 ^{##}
二甲双胍	200	6.6±0.6 [*]	9.10±1.11 [*]	0.51±0.16 ^{**}
玄参多糖	80	8.9±0.8	6.29±1.02	0.23±0.10 [*]
	160	8.3±1.3 [*]	9.19±1.48 [*]	0.43±0.10 ^{**}
	320	6.8±0.7 [*]	10.97±1.68 [*]	0.56±0.14 ^{**}

表 5 玄参多糖对 T2DM 大鼠 SOD、MDA、CAT 和 GSH-Px 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 5 Effects of PFR on SOD, MDA, CAT and GSH-Px in type 2 diabetic rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	SOD/(U·L ⁻¹)	MDA/(nmol·mL ⁻¹)	CAT/(IU·mL ⁻¹)	GSH-Px/(μmol·L ⁻¹)
对照	—	46.8±4.2	6.0±1.6	77.9±7.1	185.4±7.5
模型	—	26.9±3.4 ^{##}	15.5±1.1 ^{##}	32.1±7.2 ^{##}	88.4±8.1 ^{##}
二甲双胍	200	42.4±4.6 [*]	9.8±2.0 [*]	64.3±7.3 [*]	131.3±11.0 [*]
玄参多糖	80	38.2±3.3 [*]	10.9±1.6 [*]	44.2±7.6 [*]	98.2±8.9 [*]
	160	41.4±4.4 [*]	9.5±1.4 [*]	46.5±8.2 [*]	171.1±6.8 [*]
	320	44.4±6.1 [*]	8.9±1.8 [*]	68.2±10.5 [*]	194.9±9.1 ^{**}

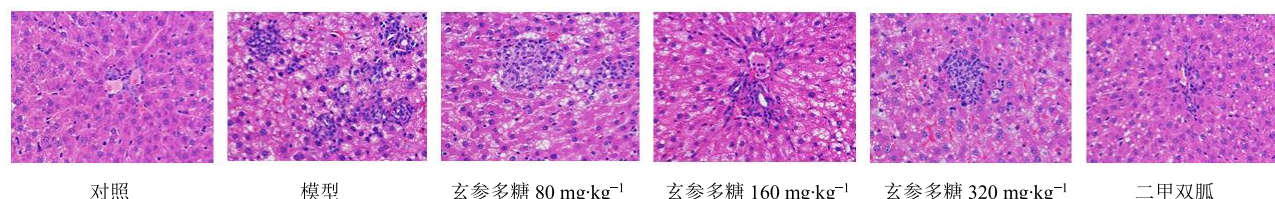


图 1 玄参多糖对 T2DM 大鼠肝脏组织病理学影响 (×400)

Fig. 1 Histopathological effects of PFR on liver of type 2 diabetic rats (×400)

要特征为肝组织结构紊乱,肝细胞形态发生改变,体积明显增大,可见大量的脂质空泡产生,胞浆明显变得疏松。玄参多糖各剂量和二甲双胍均能在不同程度上改善此种病变,使肝脏组织逐渐趋于正常。

3.7 玄参多糖对 T2DM 大鼠肝脏脂肪变性的影响

油红 O 染色能够使组织细胞中的脂质液滴呈现橘红色,使细胞核呈现蓝色。如图 2 所示,对照组大鼠肝脏组织中未出现明显的红色脂质液滴,而在模型组大鼠肝脏中则观察到大面积被染红的脂质液滴,表明 T2DM 大鼠发生脂肪变性。而玄参多糖各剂量组大鼠肝脏中脂质液滴的数量随着剂量的增加逐渐减少。

3.8 玄参多糖对 T2DM 大鼠肝胰岛素信号通路相关蛋白表达的影响

Western blotting 法检测大鼠肝脏组织 IRS-2/PI3K/Akt 信号通路相关蛋白以及 PPAR-γ 和 GLUT-4 蛋白的表达情况。结果如图 3 所示,与对照组比较,模型组大鼠肝脏 IRS-2、PI3K、p-Akt、PPAR-γ 及

GLUT-4 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.001$)。与模型组比较,玄参多糖各剂量组大鼠肝脏 IRS-2、PI3K、p-Akt、PPAR-γ 及 GLUT-4 蛋白表达水平均显著上调 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001),并表现出剂量依赖性。

4 讨论

T2DM 是由多种因素导致的代谢性疾病^[7],随病情的发展患者会出现肝肾损伤、坏疽、视网膜脱落等一系列的并发症^[8-9]。目前临床上治疗 T2DM 的方法主要为口服化学药物或者 sc 胰岛素的方法来控制血糖。中药治疗相比于化学药治疗有更好的治疗优势,可以减轻患者毒副作用,增强患者集体免疫功能^[10]。由于 STZ 能够选择性地破坏 β 细胞上转运蛋白的转录,激活免疫应答和巨噬细胞抗原的改变,进而导致 β 细胞结构的破坏及细胞的损伤^[11-12],因此,本研究采用 STZ 和高脂高糖饲料诱导制备 T2DM 大鼠模型,探究玄参多糖对 T2DM 大鼠糖脂代谢的影响,并进一步阐明其作用机制。实验结果

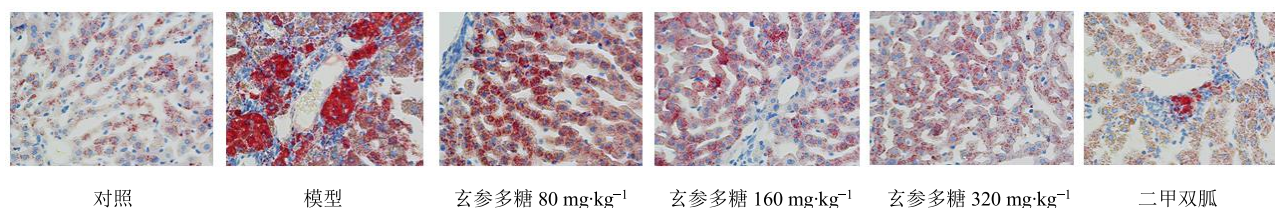
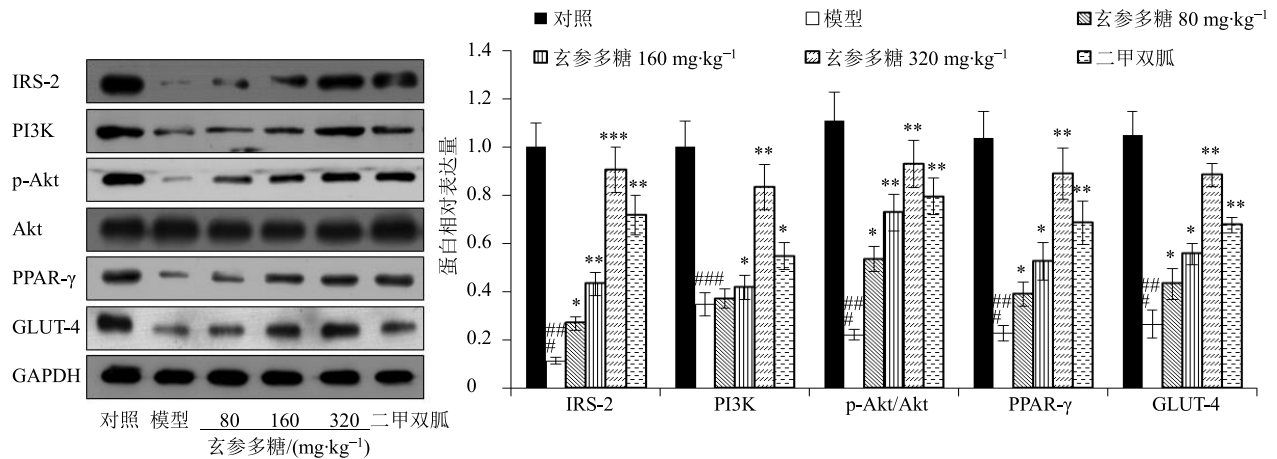


图 2 玄参多糖对 T2DM 大鼠肝脏脂肪变性的影响 (×400)

Fig. 2 Effects of PFR on hepatic steatosis in type 2 diabetic rats (×400)



与对照组比较: ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$
 ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group

图 3 玄参多糖 T2DM 大鼠肝胰岛素信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 3 Effects of PFR on expression of insulin signaling pathway related protein in type 2 diabetic rat ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

显示,模型组大鼠的血糖显著升高,体质量明显减轻,生存状态监测实验结果显示模型组大鼠表现出多饮、多食、多尿的典型 T2DM 症状,表明造模成功。而玄参多糖能够有效地改善这些症状,初步揭示玄参多糖具有抗 T2DM 的药理活性。

T2DM 是一种由于体内胰岛素分泌不足或出现胰岛素抵抗而引发的慢性代谢性疾病。T2DM 患者普遍伴随着不同程度的脂代谢紊乱,高血脂又会引起胰岛素抵抗^[13]。目前临床上以 GHb、FINS 和 C-肽水平作为 T2DM 诊断和治疗的重要检测指标^[14-15],因此分析血清中脂蛋白水平及 GHb、FINS 和 C-肽的变化对于 T2DM 的诊断具有重要价值。本研究结果显示,玄参多糖干预后能够显著降低 T2DM 大鼠 TC、TG 及 LDL-C 水平,升高 HDL-C 水平,有效升高 FINS 和 C-肽的分泌量,降低 GHb 水平。上述指标的变化进一步证明了玄参多糖对 T2DM 大鼠糖脂代谢的回调作用。

T2DM 患者通常会引发肝功能损伤^[16],ALT 和 AST 是位于肝细胞中的酶,当肝细胞受损时,这些酶会释放到血液循环中,因此 ALT 和 AST 是最常用于评估病毒性肝炎相关肝脏疾病严重程度的指标^[17]。另外,30%~40%的糖尿病患者会伴发肾脏损伤,即为糖尿病肾病^[18],糖尿病肾病是导致糖尿病患者终末期肾衰竭及死亡的主要原因,血清中 CREA 和 BUN 水平是肾功能的主要检测指标^[19]。本研究结果显示,模型组大鼠 ALT、AST、CREA 及 BUN 水平均显著升高,表明 T2DM 大鼠出现肝肾损伤,而

玄参多糖能够显著降低这 4 项指标,表明玄参多糖对 T2DM 大鼠的肝、肾损伤有一定的改善作用。

氧化应激是糖尿病及其并发症发生、发展的因素之一^[20],氧化应激是指活性分子和活性氧簇等的过度生成和(或)清除减少,从而造成体内自由基的生成和抗氧化防御系统之间的严重失衡。SOD 是主要的清除氧自由基的抗氧化酶之一,能够反映机体抗氧化能力的强弱^[21]。MDA 水平可反映机体内脂质过氧化程度,是氧自由基攻击生物膜中不饱和脂肪酸而形成的脂质过氧化物,从而反映出细胞损伤的程度^[22]。CAT 能够清除细胞生化过程中产生的 H₂O₂,对控制细胞内的氧化还原平衡等各方面发挥着重要作用^[23]。GSH-Px 和 SOD 作用一样,是广泛存在于体内的重要催化氧化酶,可以清除氧自由基^[24]。本研究结果显示,玄参多糖干预后能够显著升高 T2DM 大鼠血清中 SOD、CAT 和 GSH-Px 水平,同时降低 MDA 水平,表明玄参多糖能够有效降低 T2DM 大鼠的氧化应激水平,增强其抗氧化能力。

肝脏对维持血糖稳定具有重要的作用,是糖代谢最主要器官之一,本研究中 HE 染色及油红 O 染色结果显示玄参多糖能够有效改善 T2DM 大鼠肝脏生物病理学改变及脂肪变性。肝脏糖代谢异常会导致胰岛素抵抗,IRS-2/PI3K/Akt 信号通路是胰岛素在肝脏发挥生理效应的主要信号转导通路^[25]。此外,PPAR-γ 是配体激活的核转录因子,在胰岛素抵抗的发病机制中起着关键的作用,脂肪组织是 PPAR-γ 激动剂的重要作用靶点,而 GLUT-4 功能异

常和葡萄糖转运机制障碍是脂肪组织产生胰岛素抵抗的重要原因。本研究通过检测 IRS-2/PI3K/Akt 信号通路相关蛋白及 PPAR- γ 和 GLUT-4 蛋白表达水平的变化,探究玄参多糖对胰岛素信号通路的影响。结果显示,玄参多糖能够活化 T2DM 大鼠肝脏中 IRS-2/PI3K/Akt 信号通路,同时上调 PPAR- γ 和 GLUT-4 蛋白的表达水平。

综上所述,玄参多糖能够改善 T2DM 大鼠糖脂代谢,其机制可能跟调控肝胰岛素信号通路有关。而玄参多糖调控 T2DM 大鼠糖脂代谢的作用是否涉及其他信号通路仍需课题组进一步的研究。

参考文献

- [1] 杨晓波,梁家利. 中医药治疗 2 型糖尿病胰岛素抵抗研究进展 [J]. 河北中医, 2019, 41(2): 316-320.
- [2] 韦继红. 糖尿病健康教育的研究与进展 [J]. 当代医学, 2013, 19(13): 14-15.
- [3] 杜晓煌,方勇飞,李莉. 玄参主要成分生物活性研究进展 [J]. 中国药房, 2015, 26(15): 2158-2160.
- [4] 白宇. 玄参的药味药理学初步研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2014.
- [5] 陈莉华,廖微,肖斌,等. 玄参多糖体外清除自由基和抗氧化作用的研究 [J]. 食品工业科技, 2013, 34(7): 86-89.
- [6] 赵洪伟,张宁,李自辉,等. 玄参多糖对 2 型糖尿病大鼠降糖作用的研究 [J]. 中医药信息, 2017, 34(5): 8-12.
- [7] 苏卓,郭诚,梁韬. 杜仲多糖对链脲佐菌素致糖尿病小鼠的作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(14): 159-162.
- [8] 桑小溪. 糖尿病肾病发病机制的研究进展 [J]. 当代医学, 2019, 25(17): 193-194.
- [9] 郭静,孟庆海,殷秋忆,等. 通塞脉片对实验性糖尿病足模型大鼠的作用研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(11): 2091-2096.
- [10] 徐红. 浅谈治疗糖尿病中药的研究与开发 [J]. 糖尿病新世界, 2019, 22(12): 194-195.
- [11] 宓文佳,陈素红,吕圭源,等. 铁皮石斛根提取物对 2 型糖尿病模型小鼠的降糖作用研究 [J]. 中药药理与临床, 2015, 31(1): 125-129.
- [12] 鞠霖杰,温小花,舒变. 红景天苷对胰岛 β 细胞保护作用研究及机制探讨 [J]. 南京中医药大学学报, 2016, 32(5): 456-460.
- [13] 李晓冰,裴兰英,陈玉龙,等. 山药多糖对链脲菌素糖尿病大鼠糖脂代谢及氧化应激的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(2): 420-422.
- [14] 魏婷婷. 2 型糖尿病患者糖化血红蛋白和 C 肽水平与肝功能异常关系评价 [J]. 心血管外科杂志: 电子版, 2019, 8(4): 80-81.
- [15] 杨宝珠,马国平. 2 型糖尿病慢性并发症发生率相关因素分析 [J]. 卫生职业教育, 2019, 37(21): 126-127.
- [16] 黄泽禹,陈娟,陈清杰. 小檗碱调控线粒体功能改善 2 型糖尿病引起的肝脏脂质代谢紊乱 [J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2019, 48(1): 53-57.
- [17] Khattab H, Fouad A, Hamza M, et al. Relation of ALT and AST levels to the histopathological changes in liver biopsies of patients with chronic hepatitis C genotype 4 [J]. *Arab J Gastroenterol*, 2015, 16(2): 50-53.
- [18] 彭静. 黄精皂苷对糖尿病肾病大鼠肾损伤的保护作用及 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响 [J]. 中成药, 2019, 41(10): 2518-2521.
- [19] 张瑶,黄乙芸,王少清. 营养不良-炎症综合征与糖尿病肾病患者病情进展的关系研究 [J]. 标记免疫分析与临床, 2018, 25(6): 877-881.
- [20] 李晓冰,任玉梅,张立赞,等. 当归芍药散对糖尿病早期肾损伤大鼠氧化应激的影响 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(9): 2082-2084.
- [21] Chen H B, Feng R Z, Guo Y, et al. Hypoglycemic effects of aqueous extract of *Rhizoma Polygonati Odorati* in mice and rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2001, 74(3): 225-229.
- [22] 张绪东,蒋伟哲,焦阳,等. 龙眼参黄酮抗心肌缺血再灌注引起的脂质过氧化损伤的研究 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(3): 607-609.
- [23] 吴晓岚,黄波,刘永林,等. 复方中药组分抗糖尿病大鼠糖的过氧化作用 [J]. 中国冶金工业医学杂志, 2019, 36(5): 584-585.
- [24] Chung S S, Kim M, Youn B S, et al. Glutathione peroxidase3 mediates the antioxidant effect of peroxisome proliferator-activated receptor γ in human skeletal muscle cells [J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(1): 20-30.
- [25] 陈冻呀,熊静芳,徐燕芳,等. 肝糖异方通过上调肝脏 IRS2/PI3K 信号通路改善肝硬化大鼠的胰岛素抵抗 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(4): 883-886.