

·方药研究·

本文引用:向琴,蒋宛瑾,喻嵘,吴勇军,尹业师,刘秀,苏丽清,肖凡,刘旭.白虎加人参汤对2型糖尿病小鼠肠道UCP2、AMPK表达及GLP-1分泌的影响[J].湖南中医药大学学报,2020,40(12):1444-1448.

白虎加人参汤对2型糖尿病小鼠肠道UCP2、AMPK表达及GLP-1分泌的影响

向琴¹,蒋宛瑾¹,喻嵘^{1*},吴勇军¹,尹业师²,刘秀¹,苏丽清¹,肖凡¹,刘旭¹

(1.湖南中医药大学,湖南长沙410208;2.湖南科技学院,湖南永州425199)

〔摘要〕目的 观察白虎加人参汤对2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM) MKR小鼠肠道解偶联蛋白2 (uncoupling protein 2, UCP2)、AMP活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)表达及胰高血糖素样肽-1(glucagon like peptide-1, GLP-1)分泌的影响,探讨其降糖机制。**方法** 将MKR小鼠随机分为模型组和白虎加人参汤低、高剂量组,以FVB小鼠为空白组,中药干预4周后,观察小鼠糖代谢变化;ELISA法检测小鼠血清中胰岛素(insulin,INS)、GLP-1水平;RT-qPCR检测小鼠结肠AMPK、UCP2 mRNA水平;Western blot法检测小鼠结肠P-AMPK α 、UCP2蛋白表达水平;组织形态学观察小鼠结肠组织病理形态及黏液量的变化。**结果** 白虎加人参汤低、高剂量组与模型组比较,均能显著降低MKR小鼠的空腹血糖和INS水平($P<0.01$);并能提高血清GLP-1浓度($P<0.01$, $P<0.05$);上调小鼠结肠AMPK mRNA和P-AMPK α 水平($P<0.01$),下调UCP2 mRNA和蛋白水平($P<0.01$)。白虎加人参汤低、高剂量组均能明显改善MKR小鼠结肠组织病理形态。**结论** 白虎加人参汤可能通过抑制UCP2表达、激活AMPK的表达,促进肠道GLP-1的分泌,发挥治疗T2DM的作用。

〔关键词〕 白虎加人参汤;糖尿病;肠道;胰高血糖素样肽-1;解偶联蛋白2;AMP活化蛋白激酶

〔中图分类号〕R285.5

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2020.12.002

Effects of Baihu and Renshen Decoction on the Expression of UCP2, AMPK and GLP-1 Secretion in Intestinal Tract of Type 2 Diabetic Mice

XIANG Qin¹, JIANG Wanjin¹, YU Rong^{1*}, WU Yongjun¹, YIN Yesi², LIU Xiu¹, SU Liqing¹, XIAO Fan¹, LIU Xu¹

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Hunan University of Science and Engineering, Yongzhou, Hunan 425199, China)

〔Abstract〕 Objective To observe the effects of Baihu and Renshen Decoction on the expression of uncoupling protein 2 (UCP2), 5'-adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK) and the secretion of glucagon like peptide-1 (GLP-1) in type 2 diabetes mellitus (T2DM) MKR mice, and to explore its hypoglycemic mechanism. **Methods** MKR diabetic mice were randomly assigned into a model group and a Baihu and Renshen Decoction low-dose and high-dose group. FVB mice were used as control group. The glucose metabolism of the mice was observed after 4 weeks of Chinese materia medica intervention. The insulin (INS) and GLP-1 levels in mice serum were detected by ELISA; The mRNA levels of AMPK and UCP2 in the colon of mice were detected by RT-qPCR. Western blot was used to detect the expression levels of P-AMPK α and UCP2 protein in the colon of mice. Morphological changes of colonic tissues and mucus quantity were observed histopathologically. **Results** Compared with

〔收稿日期〕2020-09-08

〔基金项目〕国家自然科学基金项目(82074400,82004185);国家重点研发计划项目(2018YFC1704300,2018YFC1704402);中医方证研究转化医学湖南省重点实验室资助(2018TP1021);湖南省自然科学基金项目(2018JJ3394);湖南省中医药科研计划项目(201931);湖南省教育厅科学研究项目(18A220,20K094,20B450);湖南中医药大学校级科研基金项目(2017-1);湖南中医药大学大学生研究性学习和创新性实验计划项目(2017-1,2019-86)。

〔作者简介〕向琴,女,实验师,在读博士研究生,主要从事代谢性疾病中药防治机制研究。

〔通讯作者〕*喻嵘,女,教授,博士研究生导师,E-mail:yuron@21cn.com。

the model group, the low and high dose groups of Baihu and Renshen Decoction could significantly reduce fasting blood glucose and INS levels in MKR mice ($P<0.01$), increase serum GLP-1 concentration ($P<0.01$, $P<0.05$), up-regulate the mRNA level of colonic AMPK in mice ($P<0.01$), and down-regulate UCP2 mRNA level ($P<0.01$). Meanwhile, it could up-regulate the protein expression level of colonic P-AMPK α in mice ($P<0.01$), and down-regulate the protein expression level of UCP2 ($P<0.01$). In addition, low and high dose groups of Baihu and Renshen Decoction could significantly improve colonic tissue morphology in MKR mice.

Conclusion Baihu and Renshen Decoction may promote the secretion of intestinal GLP-1 and treat T2DM by inhibiting the expression of UCP2 and activating the expression of AMPK.

[**Keywords**] Baihu and Renshen Decoction; diabetes mellitus; intestinal tract; glucagon like peptide-1; uncoupling protein 2; 5'-adenosine monophosphate activated protein kinase

随着经济的快速发展,糖尿病(diabetes mellitus, DM)的发病率和死亡率在世界范围内急剧上升。其中 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 占 DM 总发病率的 90% 左右^[1]。胰岛素(insulin, INS)分泌不足是 T2DM 发病主要因素之一。胰高血糖素样肽-1(glucagon like peptide-1, GLP-1)由肠道 L 细胞分泌,作为主要的促胰岛素激素,可调节葡萄糖诱导的胰腺细胞 INS 分泌^[2]。目前,促进肠道内源性促胰岛素激素的分泌已成为治疗 T2DM 的有效策略^[3]。研究发现^[4-5],L 细胞功能障碍可导致血浆中 GLP-1 浓度下降,其原因与线粒体应激反应有关,细胞中 ATP 生产过剩从而导致线粒体应激,产生超氧化物(ROS),影响 L 细胞功能。因此,平衡 ATP 生产,抑制线粒体应激反应,降低 ROS 生成,是改善 L 细胞功能的重要途径。而 AMP 活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)作为协调代谢和能量的重要蛋白激酶,不仅能抑制 ROS,而且能抑制肠道炎症和调节肠道激素分泌^[6-7]。另一方面,解偶联蛋白 2 (uncoupling protein 2, UCP2) mRNA 在胃肠道中高表达^[8-9],并能负性调节 GLP-1 分泌^[10]。前期研究发现^[11],白虎加人参汤能有效降低小鼠血糖水平,改善肠道炎症反应,但其降糖和调节炎症机制尚未完全阐明。本研究采用 T2DM MKR 小鼠模型,通过观察白虎加人参汤干预前后小鼠血糖代谢和 GLP-1 水平变化,检测小鼠结肠组织 UCP2 和 AMPK 表达水平,观察小鼠结肠组织形态变化,为其治疗 T2DM 提供实验依据。

1 材料

1.1 实验动物

采用 8 周龄雄性 MKR 小鼠。MKR 小鼠为 2 型糖尿病较好的转基因动物模型,由美国国立卫生研究院 Dr. LeRoith 等^[12]于 2001 年建立并馈赠引进,

是骨骼肌特异性胰岛素样生长因子-1 受体功能缺失的非肥胖型小鼠。空白组为 FVB 小鼠,雄性,8 周龄,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证号:SCXK(湘)2016-0006。

1.2 主要药物

白虎加人参汤由知母 18 g,石膏 50 g,炙甘草 6 g,粳米 9 g,人参 10 g 组成,饮片购自湖南中医药大学第一附属医院,由湖南中医药大学药学院吴勇军副教授鉴定为正品。先用清水浸泡饮片 30 min,煎煮 2 次,合并两次滤液,最终浓缩至含生药量 2 g/mL。

1.3 主要试剂和仪器

INS、GLP-1 ELISA 试剂盒(上海酶联生物科技有限公司);RNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司);逆转录试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司;P-AMPK α 抗体、UCP2 抗体(英国 Abcam 公司);PIKO REAL 96 荧光定量 RCP 仪(美国 Thermo 公司);Bio-Rad 凝胶成像系统(美国伯乐公司);Nikon 生物光学显微镜(日本尼康株式会社)。

1.4 动物分组及给药

参考前期研究^[11],高脂喂养 4 周后,MKR 小鼠随机分为 3 组:模型组、白虎加人参汤高剂量组、白虎加人参汤低剂量组,每组 8 只。空白组:FVB 小鼠,8 只。白虎加人参汤低、高剂量组给药剂量按小鼠与人体表面积等效剂量折算法:折算临床剂量为 13.5 g/kg,定为低剂量;4 倍临床剂量定为高剂量,即 54 g/kg。模型组和空白组给与等体积蒸馏水,每日灌胃 1 次,连续给药 4 周。

2 方法

2.1 FBG、INS 及 GLP-1 的测定

各组小鼠于末次给药后,禁食不禁水 12 h,尾静脉取血,用血糖仪进行空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)检测;眼球采血后置于 EP 管中,静置 4 h,随后

3 000 r/min, 4 ℃离心 10 min, 取上清, 采用 ELISA 方法检测 INS、GLP-1 的血清含量。

2.2 结肠组织病理形态观察

取结肠组织, 4%多聚甲醛固后进行脱水、石蜡包埋、切片、贴片, 行常规 HE 染色, 显微镜下观察结肠组织病理形态。

2.3 RT-qPCR 检测肠道 AMPK、UCP2 mRNA 相对表达量

结肠组织匀浆后, Trizol 提取组织总 RNA。引物序列由上海生工合成, β -actin 为内参基因。AMPK: 正向引物 5'-CGGGGTCATTCTCTATGCTT-3'; 反向引物 5'-TTTAAACCACTCGTGTTCCCT-3', 片段长度 208 bp; UCP2: 正向引物 5'-AAAGCAGCCTCCAGAACTCC-3'; 反向引物 5'-ATTCTGATTCCTGCTACCTCC-3', 片段长度 110 bp; β -actin: 正向引物 5'-ACATCCGTAAGACCTCTATGCC-3'; 反向引物 5'-TACTCCTGCTTGCTGATCCAC-3', 片段长度 223 bp。使用 SYBR 法进行实时定量, 反应条件为 95 ℃ 10 min; 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 30 s, 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算各组小鼠肠道 AMPK、UCP2 mRNA 相对表达水平。

2.4 Western blot 法检测肠道 P-AMPK α 、UCP2 蛋白表达

提取结肠组织总蛋白后, 电泳分离蛋白, 将蛋白转移到 NC 膜后, 浸入 5%脱脂奶粉过夜。次日室温放置 30 min, 加入一抗(P-AMPK α , 1:1 000 稀释; UCP2, 1:500 稀释; β -actin, 1:5 000 稀释), 室温孵育 90 min, 洗膜 3 次除去过量的一抗稀释液, 再加入 HRP 标记的山羊抗小鼠二抗, 室温孵育 90 min, 再次洗膜后, 进行化学发光反应。采用 quantity one 专业灰

度分析软件进行分析, 将目的蛋白与内参的灰度值的比值作为蛋白的表达值进行统计分析。

2.5 统计学处理

实验数据采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析, 计量资料用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示, 使用单因素方差分析比较各组间差异, 方差齐时使用 LSD 检验法进行两两比较, 多组数据间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 白虎加人参汤对 MKR 小鼠 FBG、INS 及 GLP-1 的影响

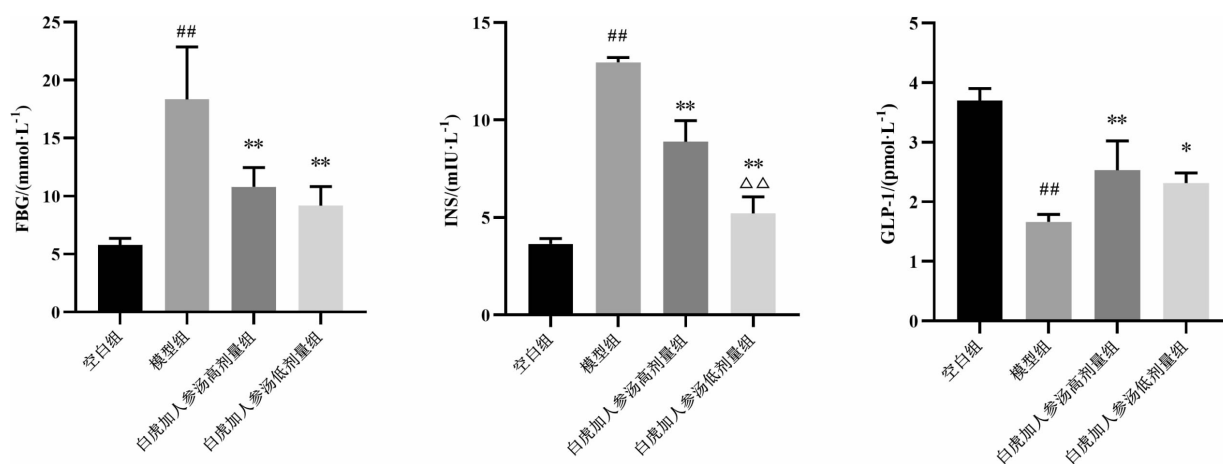
模型组 FBG 和 INS 水平显著高于空白组($P<0.01$), 白虎加人参汤治疗后, 中药高剂量组和低剂量组较模型组 FBG 和 INS 水平均显著降低($P<0.01$), 且低剂量组降低 INS 血清水平更为显著, 两组间比较有统计学差异($P<0.01$)。从 GLP-1 血清浓度来看, 模型组明显低于空白组($P<0.01$), 而白虎加人参汤高剂量组和低剂量显著提高了血清中 GLP-1 浓度($P<0.01$, $P<0.05$)。见图 1。

3.2 白虎加人参汤对 MKR 小鼠结肠病理形态的影响

观察到 MKR 小鼠黏膜表面上皮层减少、脱落, 炎性细胞浸润, 以及黏膜层厚度不均匀(图 2), 而白虎加人参汤可改善 MKR 小鼠的上述形态变化, 使得黏膜变得厚度均匀而完整。

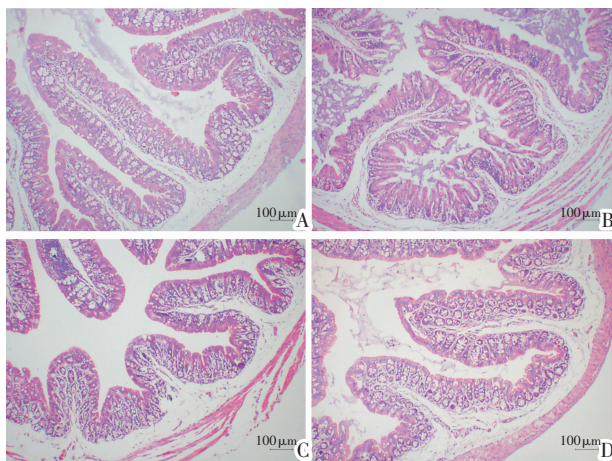
3.3 白虎加人参汤对 MKR 小鼠结肠 AMPK、UCP2 mRNA 表达的影响

与空白组比较, 模型组 AMPK mRNA 表达显著降低($P<0.01$), 而 UCP2 mRNA 表达升高显著($P<0.01$)。与模型相比, 白虎加人参汤高剂量组和低剂量组显著上



注: 与空白组相比, ^{##} $P<0.01$; 与模型组相比, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$; 与白虎加人参汤高剂量组相比, ^{ΔΔ} $P<0.01$

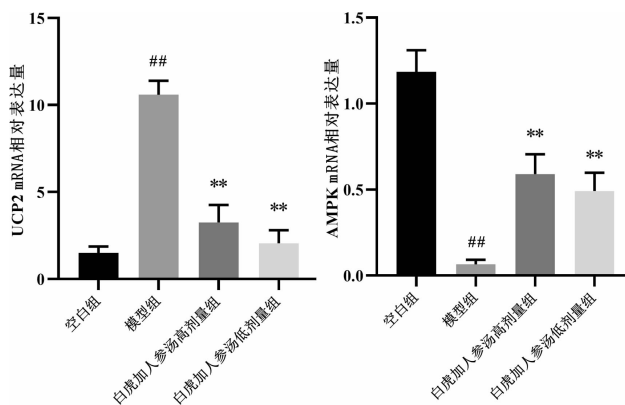
图 1 白虎加人参汤对 MKR 小鼠血清中 FBG、INS 及 GLP-1 水平的影响



注:A.空白组;B.模型组;C.白虎加人参汤高剂量组;D.白虎加人参汤低剂量组

图 2 白虎加人参汤对 MKR 小鼠结肠病理形态的影响 (HE 染色,×100)

调了AMPK mRNA 的表达($P<0.01$);显著下调UCP2 mRNA 表达($P<0.01$),白虎加人参汤高剂量组稍优于低剂量组,但无统计学意义。见图 3。



注:与空白组相比,^{##} $P<0.01$;与模型组相比,^{**} $P<0.01$

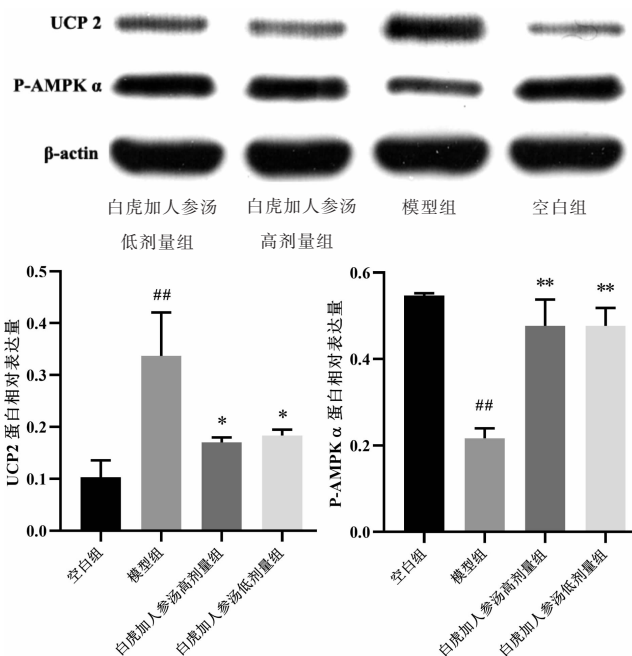
图 3 白虎加人参汤对 MKR 小鼠结肠组织 UCP2、AMPK mRNA 相对表达量的影响

3.4 白虎加人参汤对 MKR 小鼠结肠 P-AMPK α 、UCP2 蛋白表达的影响

模型组结肠 UCP2 蛋白表达较空白组显著上升($P<0.01$),而 P-AMPK α 蛋白表达较空白组显著下降($P<0.01$)。白虎加人参汤高剂量组和低剂量组干预后,不仅显著上调 P-AMPK α 蛋白表达($P<0.01$),而且显著下调 UCP2 蛋白表达($P<0.05$),但白虎加人参汤高剂量组和低剂量组之间无明显差异。见图 4。

4 讨论

糖尿病因其发病年轻化、病因复杂、病程长且难治愈等特点,已经严重威胁人类健康。GLP-1 是肠



注:与空白组相比,^{##} $P<0.01$;与模型组相比,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$

图 4 白虎加人参汤对 MKR 小鼠结肠组织 UCP2、P-AMPK α 蛋白表达的影响

道 L 细胞分泌的具有葡萄糖依赖性促胰岛素分泌功能的肠促胰岛素^[13]。因其不仅能刺激胰岛 β 细胞呈葡萄糖依赖性地分泌 INS,还能调节胰岛 β 细胞的增殖和抗凋亡,且具有低血糖发生率较低等优点,已成为目前降糖药物研究最具潜力的作用靶点之一^[14]。据报道^[10,15],肠道 L 细胞的 UCP2 与 GLP-1 分泌密切相关,肠黏膜细胞内 UCP2 升高可能是肠源性 GLP-1 分泌的负调节因子。另有研究发现,导致血浆 GLP-1 下降机制的主要原因是 L 细胞功能障碍^[4]。细胞中 ATP 生产异常和 ROS 的产生,可能影响 L 细胞分泌功能^[5,16-17]。而 AMPK 不仅能改善炎症,还能通过上调 UCP2 的表达激活线粒体解耦联,从而降低线粒体 ROS 的产生^[18]。除此之外,AMPK 的激活还能促进线粒体合成,增加线粒体数量,从而改善细胞能量代谢功能。由此可见,肠道 UCP2 和 AMPK 的表达与 L 细胞分泌 GLP-1 关系密切,可能是促进 GLP-1 分泌防治 T2DM 的重要靶点。

糖尿病属中医学“消渴”范畴。白虎加人参汤由知母、石膏、炙甘草、粳米、人参组成,为汉代张仲景创立,是治疗肺胃热盛,津气两伤的“消渴”经方,具有清热益气、生津止渴的功效。前期实验研究发现^[11],白虎加人参汤能显著改善 MKR 小鼠糖代谢和胰岛素抵抗,降低血清中炎症因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平,并能上调结肠组织中 ZO-1、Claudin-1、Occludin 的表达,重建肠道黏膜完整性。通过本次实验发现,

白虎加人参汤不仅能不同程度地降低血糖,还能显著增加 GLP-1 在血清中的含量。为了进一步了解白虎加人参汤降糖和促 GLP-1 分泌机制,我们观察了各组小鼠结肠组织形态、结肠组织 UCP2 和 AMPK mRNA 和蛋白的表达水平。结果显示,白虎加人参汤显著下调结肠组织中 UCP2 mRNA 和蛋白的表达,且上调 AMPK mRNA 和蛋白的表达,并能使结肠黏膜层变得厚度均匀而完整,促进肠道细胞黏液物质的分泌。

综上所述,白虎加人参汤能显著降低 T2DM MKR 小鼠的 FBG 水平,提高血清 GLP-1 的浓度,上调结肠组织中 UCP2 和 AMPK 的 mRNA 和蛋白表达水平。提示白虎加人参汤促进 MKR 小鼠 GLP-1 分泌的作用机制之一,可能与肠道 UCP2 和 AMPK 的水平有关。当然,其促进 GLP-1 分泌的机制可能是多方面、多层次、多环节的结果,因此,还需对白虎加人参汤降糖和促 GLP-1 分泌的具体机制进行进一步的研究和探讨。

参考文献

- [1] DONG Y S, XING Y, SUN J, et al. Baicalein alleviates liver oxidative stress and apoptosis induced by high-level glucose through the activation of the PERK/Nrf2 signaling pathway[J]. *Molecules*, 2020,25(3):599.
- [2] SRIVASTAVA S, PANDEY H, SINGH S K, et al. GLP 1 regulated intestinal cell's insulin expression and selfadaptation before the onset of type 2 diabetes[J]. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2019, 9(2): 325-330.
- [3] BUSE J B, NAUCK M, FORST T, et al. Exenatide once weekly versus liraglutide once daily in patients with type 2 diabetes (DURATION-6): A randomised, open-label study[J]. *The Lancet*, 2013,381(9861):117-124.
- [4] GNIULI D, CALCAGNO A, DALLA LIBERA L, et al. High-fat feeding stimulates endocrine, glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP)-expressing cell hyperplasia in the duodenum of Wistar rats[J]. *Diabetologia*, 2010,53(10):2233-2240.
- [5] SUN Y N, JIN C X, ZHANG X Y, et al. Restoration of GLP-1 secretion by Berberine is associated with protection of colon enterocytes from mitochondrial overheating in diet-induced obese mice [J]. *Nutrition & Diabetes*, 2018, 8(1): 53.
- [6] JONES R, MOLLOY M P. Metformin, microbiome and protection against colorectal cancer[J/OL]. *Digestive Diseases and Sciences*, 2020 [2020-06-12]. doi:10.1007/s10620-020-06390-4.<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10620-020-06390-4>.
- [7] SUN X, ZHU M J. AMP-activated protein kinase: A therapeutic target in intestinal diseases[J]. *Open Biology*, 2017, 7(8):170104.
- [8] NEDERGAARD J, CANNON B. The 'novel' 'uncoupling' proteins UCP2 and UCP3: What do they really do Pros and cons for suggested functions[J]. *Experimental Physiology*, 2003, 88(1): 65-84.
- [9] MATTIASSON G, SULLIVAN P G. The emerging functions of UCP2 in health, disease, and therapeutics[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2006, 8(1/2): 1-38.
- [10] ZHANG H, LI J, LI Z, et al. Increased GLP-1 response after gavage-administration of glucose in UCP2-deficient mice[J]. *Hormone and Metabolic Research*, 2012,44(2):86-90.
- [11] 蒋宛瑾,谢 聪,喻 嵘,等.白虎加人参汤对转基因 2 型糖尿病 MKR 小鼠肠道 TLR4/NF- κ B 信号通路及肠道屏障功能的影响[J]. *中草药*, 2020,51(11):3005-3012.
- [12] FERNANDEZ A M. Functional inactivation of the IGF-1 and insulin receptors in skeletal muscle causes type 2 diabetes[J]. *Genes & Development*, 2001, 15(15): 1926-1934.
- [13] BAGGIOL L, DRUCKER D J. Biology of incretins: Glp-1 and gip[J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(6): 2131-2157.
- [14] 陈 哲,楚淑芳,李惠林,等.基于 GLP-1 的中药降糖作用研究进展[J]. *现代中药研究与实践*, 2019,33(4):79-82.
- [15] CHEN Y, LI Z Y, YANG Y, et al. Uncoupling protein 2 regulates glucagon-like peptide-1 secretion in L-cells[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2012, 18(26): 3451.
- [16] ARANIAS T, GROSFELD A, POITOU C, et al. Lipid-rich diet enhances L-cell density in obese subjects and in mice through improved L-cell differentiation[J]. 2015, 4:1-11.
- [17] DUSAULCY R, HANDGRAAF S, SKARUPELOVA S, et al. Functional and Molecular Adaptations of Enteroendocrine L-Cells in Male Obese Mice Are Associated With Preservation of Pancreatic α -Cell Function and Prevention of Hyperglycemia[J]. 2016, 157(10): 3832-3843.
- [18] 王 艳,黄德强,罗志军.AMPK 对线粒体功能的调节[J]. *中国细胞生物学学报*. 2013,35(10):1434-1443.

(本文编辑 苏 维)