

- Hereditary breast cancer: clinical, pathological and molecular characteristics [J]. *Breast Cancer (Auckl)*, 2014(8): 145-155.
- [3] CUDDINGTON B P, MOSSMAN K L. Oncolytic bovine herpesvirus type 1 as a broad spectrum cancer therapeutic [J]. *Curr Opin Virol*, 2015(13): 11-16.
- [4] FULLER M S, LEE C I, ELMORE J G. et al. An evidence-based update [J]. *Med Clin North Am*, 2015, 99(3): 451-468.
- [5] KO F N, WU T S, LIOU M J, et al. Vasorelaxation of rat thoracic aorta caused by osthole isolated from *Angelica pubescens* [J]. *Eur J Pharmacol*, 1992, 219(1): 29-34.
- [6] HUANG R L, CHEN C C, HUANG Y L, et al. Osthole increases glycosylation of hepatitis B surface antigen and suppresses the secretion of hepatitis B virus *in vitro* [J]. *Hepatology*, 1996, 24(3): 508-515.
- [7] LIU J H, ZSCHOCKE S, REININGER E, et al. Inhibitory effects of *Angelica pubescens* f. *biserrata* on 5-lipoxygenase and cyclooxygenase [J]. *Planta Med*, 1998, 64(6): 525-529.
- [8] WANG L, PENG Y, SHI K, et al. Osthole inhibits proliferation of human breast cancer cells by inducing cell cycle arrest and apoptosis [J]. *J Biomed Res*, 2015, 29(2): 132-138.
- [9] SHARMA C, NUSRI QEL-A, BEGUM S, et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis and inhibits invasion and migration of human cervical cancer cells [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(9): 4815-4822.
- [10] GIRARDINI J E, WALERYCH D, DEL SAL G. Cooperation of p53 mutations with other oncogenic alterations in cancer [J]. *Subcell Biochem*, 2014(85): 41-70.
- [11] LAINE A, WESTERMARCK J. Molecular pathways: harnessing E2F1 regulation for prosenescence therapy in p53-defective cancer cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(14): 3644-3650.
- [12] ZHANG C G, ZHU Q L, ZHOU Y, et al. N-Succinyl-chitosan nanoparticles coupled with low-density lipoprotein for targeted osthole-loaded delivery to low-density lipoprotein receptor-rich tumors [J]. *Int J Nanomedicine*, 2014, 9(1): 2919-2932.
- [13] TSAI C F, YEH W L, CHEN J H, et al. Osthole suppresses the migratory ability of human glioblastoma multiforme cells via inhibition of focal adhesion kinase-mediated matrix metalloproteinase-13 expression [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(3): 3889-3903.
- [14] JUHASZOVA M, ZOROV D B, KIM S H, et al. Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore [J]. *J Clin Invest*, 2004, 113(11): 1535-1549.
- [15] WEISS J N, KORGE P, HONDA H M, et al. Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease [J]. *Circ Res*, 2003, 93(4): 292-301.
- [16] LIN W, TONGYI S. Role of Bax/Bcl-2 family members in green tea polyphenol induced necroptosis of p53-deficient Hep3B cells [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(8): 8065-8075.
- [17] TIWARI M N, AGARWAL S, BHATNAGAR P, et al. Nicotine-encapsulated poly(lactic-co-glycolic) acid nanoparticles improve neuroprotective efficacy against MPTP-induced parkinsonism [J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 65(6): 704-718.
- [18] WANG L, PENG Y, SHI K, et al. Osthole inhibits proliferation of human breast cancer cells by inducing cell cycle arrest and apoptosis [J]. *J Biomed Res*, 2015, 29(2): 132-138.
- [19] ARZAB A, GRABARSKA A, KIELBUS M, et al. Osthole induces apoptosis, suppresses cell-cycle progression and proliferation of cancer cells [J]. *Anticancer Res*, 2014, 34(11): 6473-6480.

收稿日期: 2015-05-22

## 葫芦巴籽和桑叶提取混合物对胰岛素抵抗糖脂代谢紊乱大鼠模型的降血糖作用及其机制研究

匡荣<sup>1</sup>, 刘璐<sup>2</sup>, 刘艳<sup>3</sup>, 李敏杰<sup>3</sup>, 杜军<sup>3</sup>, 孙叶丹<sup>1</sup>, 瞿霖吉<sup>1</sup>, 陈超凤<sup>2\*</sup> (1.浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052; 2.浙江工业大学药学院, 杭州 310000; 3.安利(中国)研发中心有限公司, 上海 201203)

**摘要:** 目的 探讨葫芦巴籽和桑叶提取混合物(fenugreek seed and mulberry leaf extract, FSML)对胰岛素抵抗糖脂代谢紊乱模型大鼠的降血糖作用及其作用机制。方法 建立 2 个不同的胰岛素抵抗糖脂代谢紊乱大鼠模型, 测定大鼠血糖、血脂指标, 以及胰岛素受体底物蛋白 1(IRS1)、葡萄糖转运蛋白 4(GLUT4)、过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )蛋白的表达。结果 对模型 1, FSML 高、低剂量组均能明显降低模型大鼠的 0.5h 血糖值及 AUC(与模型组比较,  $P<0.01$ )。对模型 2, FSML 高剂量组能显著降低 0.5 h 血糖值及 AUC(与模型组比较,  $P<0.05$ )。Western blot 实验结果表明, FSML 高、低剂量组均能提高 GLUT4 和 PPAR $\gamma$  蛋白的表达(与模型组比较,  $P<0.05$ )。结论 FSML 具有降血糖作用, 其作用机制可能是上调 PPAR $\gamma$  蛋白的表达, 调节胰岛素信号通路, 增加 GLUT4 蛋白表达, 从而增加细胞的葡萄糖摄取, 减少外周胰岛素靶组织的胰岛素抵抗。

**关键词:** 葫芦巴籽提取物; 桑叶提取物; 胰岛素抵抗; 糖耐量; GLUT4; PPAR $\gamma$

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2016)05-0551-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.05.008

基金项目: 浙江省药品接触材料质量控制重点实验室(2014E1006)

作者简介: 匡荣, 男, 博士, 主任药师 Tel: (0571)86457970 E-mail: kuangrong@zjyj.org.cn \*通信作者: 陈超凤, 女, 硕士 Tel: 15669050725 E-mail: 250868850@qq.com

# Anti-hyperglycemic Effect of Fenugreek Seed and Mulberry Leaf Extract Formula on the Blood Glucose Levels of the Insulin Resistance and Metabolism Disorder Rats Models and the Mechanism

KUANG Rong<sup>1</sup>, LIU Lu<sup>2</sup>, LIU Yan<sup>3</sup>, LI Minjie<sup>3</sup>, DU Jun<sup>3</sup>, SUN Yedan<sup>1</sup>, QU Linji<sup>1</sup>, CHEN Chaofeng<sup>2\*</sup>  
(1. Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China; 2. College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310000, China; 3. Amway (China) R&D Center, Shanghai 201203, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To explore the function of fenugreek seed and mulberry leaf extract(FSML) on regulating the blood glucose level and its related molecular mechanism. **METHODS** Two rat models of dexamethasone(Model 1) and alloxan(Model 2) were established. The concentration of blood glucose, blood lipids and the protein expression levels of the IRS1, GLUT4 and PPAR $\gamma$  were tested to evaluate its hypoglycemic function. **RESULTS** In the Model 1, the FSML treatment groups at both two doses had a significant lower 0.5 h blood glucose level and AUC value compared to the Model group( $P<0.05$ ). In the Model 2, the high dose of FSML treatment group reduced the 0.5 h blood glucose level and AUC value when compared with the model group( $P<0.05$ ). The results of the Western blot test showed that two FSML treatments groups significantly increased the GLUT4 and PPAR $\gamma$  protein expression levels when compared with the model group( $P<0.05$ ) in Model 1. **CONCLUSION** This study demonstrates that the FSML has the potential anti-hyperglycemic effect and the possible mechanism is that FSML can regulate the insulin signal pathway through up-regulating the protein expression of PPAR  $\gamma$  and increase the protein expression of GLUT4, accordingly the cellular blood glucose uptake is increased and the insulin resistance in the muscular and adipocyte tissues is decreased.

**KEY WORDS:** fenugreek seed extract; mulberry leaf extract; IR; OGTT; GLUT4; PPAR $\gamma$

据文献报道, 2008年中国的2型糖尿病患者数已经达到9千万, 而糖尿病前期的人数已达到了1.5亿, 并且年龄越大, 糖尿病和糖尿病前期的人群比例就越大<sup>[1]</sup>; 2010年中国人群中糖尿病患者人数比重为11.6%, 约1.14亿, 糖尿病前期人群比重高达50.1%, 约4.93亿<sup>[2]</sup>。

糖尿病前期人群的血糖较正常人高但还未达到糖尿病的诊断标准, 且糖耐量受损, 是发生糖尿病和心血管病的高危人群, 如果采取适当的饮食和运动干预, 可以帮助控制血糖的进一步升高, 减低糖尿病发生风险。

中医药是中国的瑰宝, 自古就有对应糖尿病和糖尿病前期的“消渴症”的论述, 运用中草药治疗消渴症的历史也由来已久。祖国医学用桑叶治疗消渴症的论述可见于《本草纲目》: “桑叶, 汁煎代茗, 能止消渴”、“灸熟煎饮, 代茶止渴”。从现代药理来看, 桑叶的主要活性成分天然1-脱氧野尻霉素(1-deoxynojirimycin, 1-DNJ), 是一种具有生物碱活性的物质, 能有效抑制 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性<sup>[3]</sup>。葫芦巴籽为豆科蝶形花亚科一年生草本植物葫芦巴的种子, 我国历代编修的本草著作中均收载有葫芦巴条目, 入肝、肾二经, 味苦、性温, 无毒, 具有补肾阳、祛寒湿之功效。葫芦巴籽的独特活性成分4-羟基异亮氨酸具有促进脂肪细胞和骨骼肌细胞的葡萄糖摄取的作用, 从而起到改善胰岛素抵抗的作用<sup>[4-5]</sup>。本实验研究葫芦巴

籽和桑叶提取混合物(fenugreek seed and mulberry leaf extract, FSML)对处于糖尿病前期的大鼠降血糖作用及其作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 受试物

受试物 FSML 配方由安利(中国)研发中心有限公司组方, 为褐色粉末, 由葫芦巴籽提取物和桑叶提取物组成, 人体推荐剂量为208 mg $\cdot$ d<sup>-1</sup>, 两者的配比2.2:3.0。其中, 葫芦巴籽为75%乙醇提取, 再经阳离子交换树脂浓缩其4-羟基异亮氨酸, 获得的葫芦巴提取物含约20%的4-羟基异亮氨酸。桑叶为水提, 再经阳离子交换层析柱进行洗脱以及大孔树脂柱对1-DNJ进行浓缩, 所获得的桑叶提取物中含约5%的1-DNJ。受试物用蒸馏水稀释成所需浓度悬浊液供试验用。

### 1.2 动物

SD大鼠98只, 雄, 体质量130~170 g, 由浙江省实验动物中心提供, 清洁级, 生产许可证号: SCXK(浙)2008-0038, 合格证: 0007749。实验动物使用许可证号: SCXK(浙)2008-0117。

### 1.3 试剂

血糖试纸(强生); 格列本脲片(天津太平洋制药有限公司, 批号: 20130218, 规格: 每片2.5 mg); 盐酸二甲双胍片(北京京丰制药有限公司, 批号: 20130101, 规格: 每片0.5 g); 地塞米松磷酸钠注射液(辰欣药业股份有限公司, 批号: 130411, 规

格: 5 mg·mL<sup>-1</sup>); 四氧嘧啶(美国 Sigma); TC, TG、HDL、LDL、HbA1c 试剂盒均购自 DiaSys Diagnostic Systems GmbH; 胰岛素 ELISA 试剂盒(南京建成生物工程研究所, 批号: 130809); PPAR $\gamma$ 、Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase $\alpha$ 、葡萄糖转运蛋白 4 (Glucose Transporter 4, GLUT4)均来自美国 Santa Cruz; IRS-1(BioVision); 其他试剂均为国产分析纯。

#### 1.4 方法

**1.4.1 动物实验** 模型 1: 地塞米松诱导胰岛素抵抗糖脂代谢紊乱模型。选取 54 只大鼠, 设正常对照组、模型组、阳性药对照组(2.5 mg·kg<sup>-1</sup> 格列苯脲), FSML 低剂量组(17.5 mg·kg<sup>-1</sup>), FSML 高剂量组(35 mg·kg<sup>-1</sup>)。除正常对照组为 10 只大鼠外, 其他各组均为 11 只大鼠。完成分组后, 按组别灌胃相应剂量的受试物或阳性对照药, 正常对照组不做处理。各组给予普通维持料饲养 1 周后, 除正常对照组外, 其余各组均更换为高能饲料(参照“国食药监保化[2012]107 号”的规定<sup>[6]</sup>), 喂饲 2 周后, 在热能饲料基础上腹腔注射地塞米松 0.8 mg·kg<sup>-1</sup>, 每日 1 次, 连续 11 d, 继续给予高能饲料喂饲 3 d。试验结束前 1 d, 各组动物禁食 3~4 h, 测定空腹血糖含量(fasting blood glucose, FBG), 空腹胰岛素(fasting insulin, FINS)的含量, 以及血清中的 TC、TG、HDL 和 LDL 的含量。并以 FBG 值作为 0 h 血糖值, 15~20 min 后各组经口给予葡萄糖 2.5 g·kg<sup>-1</sup>, 测定给葡萄糖后各组 0.5, 2 h 的血糖值。按下式计算血糖曲线下面积(AUC)和胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)。

$$AUC = 1/2 \times (0 \text{ h 血糖值} + 0.5 \text{ h 血糖值}) \times 0.5 + 1/2 \times (2 \text{ h 血糖值} + 0.5 \text{ h 血糖值}) \times 1.5$$
; 胰岛素抵抗指数(HOMA-IR) = 胰岛素 / 22.5e<sup>-ln 血糖</sup>。

模型 2: 四氧嘧啶诱导胰岛素抵抗糖脂代谢紊乱模型。正常对照组同上, 另选取 44 只大鼠, 分为模型组, 阳性药对照组(333.3 mg·kg<sup>-1</sup> 二甲双胍), FSML 低剂量组(17.5 mg·kg<sup>-1</sup>), FSML 高剂量组(35 mg·kg<sup>-1</sup>, 相当于人体推荐剂量的 10 倍), 每组 11 只大鼠。完成分组后, 按组别灌胃相应剂量的受试物或阳性对照药, 正常对照组不做处理。各组给予普通维持料饲养 1 周后, 除正常对照组外, 其余各组均更换为高能饲料(参照“国食药监保化[2012]107 号”的规定), 喂饲 3 周后, 除正常对照组外其余均禁食 24 h 后(不禁水), 腹腔注射

四氧嘧啶 105 mg·kg<sup>-1</sup>。注射后继续给予高能饲料喂饲 3 d。试验结束前 1 d, 各组动物禁食 3~4 h, 测定 FBG, FINS 的含量, 以及血清中的 TC、TG、HDL 和 LDL 的含量。并以 FBG 值作为 0 h 血糖值, 15~20 min 后各组经口给予葡萄糖 2.5 g·kg<sup>-1</sup>, 测定给葡萄糖后各组 0.5, 2 h 的血糖。AUC 和 HOMA-IR 的计算同上。

**1.4.2 Western blot 实验** 实验结束后, 保留模型 1 实验各组大鼠的部分骨骼肌组织和脂肪组织, 每组取 3 只以上动物的组织进行实验, 测定骨骼肌组织中的胰岛素受体配基 1(insulin receptor substrate 1, IRS1), 胞浆 GLUT4 和胞膜 GLUT4 蛋白的含量, 以及脂肪组织中的 PPAR $\gamma$ , 胞浆 GLUT4 和胞膜 GLUT4 蛋白的含量。具体实验方案是: 将冻存的骨骼肌组织和脂肪组织用 RIPA 强裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, PH 7.4, 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, 1% Triton X-100, 1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, 100 mmol·L<sup>-1</sup> NaVO<sub>3</sub>, 1 mmol·L<sup>-1</sup> PMSF, 0.1% SDS, 1% 去氧胆酸钠, 另加蛋白酶抑制剂混合物)提取蛋白。上样 50  $\mu$ g 蛋白, 经 10% SDS-PAGE 电泳分离后转移至 PVDF 膜上, 4  $^{\circ}$ C、5% 脱脂奶粉-Tris 盐酸缓冲液(TBS)封闭, 将鼠抗 IRS1 多克隆抗体(1:1 500), GLUT4 多克隆抗体(1:1 000), PPAR $\gamma$  多克隆抗体(1:3 000)和鼠抗  $\beta$ -actin 和 GAPD 抗体, 加入含 5% 脱脂奶粉的 TBS 中, 室温下与 PVDF 膜结合孵育 1 h, 再与辣根过氧化物酶偶联的鼠抗 IgG(1:1 000)二抗室温下在含 5% 脱脂奶粉的 TBS 中结合孵育 30 min。抗原抗体结合物检测用化学发光增强底物试剂盒进行, 光带强度用 GAPDH 和  $\beta$ -actin 的强度比值表示。

#### 1.5 数据分析和统计

运用 SPSS 20 软件进行数据分析和统计, 统计方法运用单因素方差分析(one-way ANOVA), 检验方法运用 LSD 方法。

## 2 结果

### 2.1 FSML 对模型大鼠的血糖和空腹胰岛素的影响

按实验方案中的模型 1 的造模方法进行造模后, 模型组大鼠的 0.5 h 血糖值较正常对照组显著升高( $P < 0.05$ ), 而 0 h 和 2 h 血糖没有升高, 表明该造模方法主要是引起了大鼠的糖耐量减低(impaired glucose tolerance, IGT)。FSML 灌胃给药的 2 个剂量均能显著抑制模型大鼠的 0.5 h 血糖升高( $P < 0.05$ ), 并显著抑制了模型大鼠的

AUC( $P<0.05$ )。但 FSML 灌胃对空腹血糖和 2 h 血糖无明显作用, 对血清中的胰岛素水平也无明显影响。而阳性对照组经格列苯脲给药后, 0.5, 2 h 血糖值和 AUC 值均明显降低。结果见表 1。

按实验方案中的模型 2 的造模方法进行造模后, 模型组大鼠的 0, 0.5 和 2 h 的血糖值和 AUC 均较正常对照组显著升高, 表明该造模方法同时造成了大鼠的空腹血糖受损(impaired fasting glucose, IFG)和糖耐量减低(impaired glucose tolerance, IGT)。相较于模型对照组, FSML  $35 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  灌胃给药后, 能显著抑制模型大鼠的 0.5 h 血糖值和 AUC 水平, 而对血清中的胰岛素水平无明显影响。阳性对照组经二甲双胍给药后, 模型大鼠的 0.5, 2 h 血糖水平, AUC 和血清胰岛

素均显著降低。结果见表 2。

## 2.2 FSML 对模型大鼠的血脂的影响

2 种造模方法均能引起大鼠的血清 TC、TG 和 LDL 水平的显著升高。说明 2 种造模方法均造成了大鼠的脂代谢异常。FSML 低剂量组能显著升高模型 2 大鼠的 HDL 水平(与模型组比较,  $P<0.05$ ), 除此之外, FSML 灌胃对两模型的其他指标无明显作用。结果见表 3~4。

## 2.3 FSML 降血糖的作用机制

FSML 的 2 个剂量给药后, 模型 1 大鼠的肌肉和脂肪组织中的 GLUT4 的蛋白表达水平均显著提高。FSML  $35 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  给药后, 模型 1 大鼠的脂肪组织中的 PPAR  $\gamma$  的蛋白表达水平也显著升高。结果见表 5 和图 1。

表 1 FSML 对地塞米松诱导胰岛素抵抗糖脂代谢紊乱模型大鼠的血糖和胰岛素水平的影响( $\bar{x}\pm s$ )

Tab. 1 The regulatory effect of FSML on the blood glucose and insulin levels in rat models with insulin resistance and glucose and lipids metabolism disturbance induced by Dexamethasone( $\bar{x}\pm s$ )

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	<i>n</i>	血糖值/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$			AUC	FINS/ $\text{mIU}\cdot\text{L}^{-1}$
			0 h	0.5 h	2 h		
正常对照组	/	10	5.3±1.2	7.5±1.4	5.7±0.4	13.1±1.6	2.94±0.68
模型组	/	11	4.7±0.5	9.2±1.4 <sup>1)</sup>	4.8±0.6 <sup>2)</sup>	14.0±1.3	3.06±0.51
FSML 组	17.5	11	4.5±0.9	6.0±1.1 <sup>3)</sup>	4.4±0.6	10.4±1.4 <sup>3)</sup>	3.15±0.22
	35.0	11	4.6±0.7	6.5±0.9 <sup>3)</sup>	4.6±0.8	11.2±1.3 <sup>3)</sup>	3.11±0.26
格列苯脲组	2.5	11	4.5±0.8	6.3±1.1 <sup>3)</sup>	3.2±0.8 <sup>3)</sup>	9.9±1.1 <sup>3)</sup>	3.06±0.32

注: 与正常对照组比较, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ ; 与模型组比较, <sup>3)</sup> $P<0.05$ 。

Note: Compared with control group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ ; compared with model group, <sup>3)</sup> $P<0.05$ 。

表 2 FSML 对四氧嘧啶诱导胰岛素抵抗糖脂代谢紊乱模型大鼠的血糖和胰岛素水平的影响( $\bar{x}\pm s$ )

Tab. 2 The regulatory effect of FSML on the blood glucose and insulin levels in rat models with insulin resistance and glucose and lipids metabolism disturbance induced by Alloxan( $\bar{x}\pm s$ )

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	<i>n</i>	血糖值/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$			AUC	FINS/ $\text{mIU}\cdot\text{L}^{-1}$
			0 h	0.5 h	2 h		
正常对照组	/	10	5.3±1.2	7.5±1.4	5.7±0.4	13.1±1.6	2.94±0.68
模型组	/	11	6.6±1.1 <sup>1)</sup>	10.4±1.8 <sup>2)</sup>	6.8±0.8 <sup>2)</sup>	17.2±2.5 <sup>2)</sup>	2.81±0.42
FSML 组	17.5	11	6.6±1.3	9.7±1.6	6.7±1.0	16.5±2.0	2.89±0.56
	35.0	11	6.2±0.8	9.1±1.3 <sup>3)</sup>	6.3±0.6	15.3±1.7 <sup>3)</sup>	2.66±0.44
二甲双胍组	333.3	11	6.6±1.4	7.3±0.6 <sup>4)</sup>	5.8±0.8 <sup>4)</sup>	13.3±1.2 <sup>4)</sup>	2.28±0.25 <sup>4)</sup>

注: 与正常对照组比较, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ ; 与模型组比较, <sup>3)</sup> $P<0.05$ , <sup>4)</sup> $P<0.01$ 。

Note: Compared with control group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ ; compared with model group, <sup>3)</sup> $P<0.05$ , <sup>4)</sup> $P<0.01$ 。

表 3 FSML 对地塞米松诱导胰岛素抵抗糖脂代谢紊乱模型大鼠的血脂的影响( $\bar{x}\pm s$ )

Tab. 3 The regulatory effect of FSML on the blood lipid levels in rat models with insulin resistance and glucose and lipids metabolism disturbance induced by dexamethasone( $\bar{x}\pm s$ )

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	<i>n</i>	TC/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	TG/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	HDL/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	LDL/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$
正常对照组	/	10	1.02±0.12	0.58±0.03	0.67±0.06	0.30±0.06
模型组	/	11	2.46±0.59 <sup>1)</sup>	0.83±0.13 <sup>1)</sup>	0.67±0.06	1.60±0.36 <sup>1)</sup>
FSML 组	17.5	11	2.46±1.12	0.77±0.10	0.62±0.07	1.58±0.33
	35.0	11	2.82±1.42	0.89±0.15	0.68±0.09	1.65±0.57
格列苯脲	2.5	11	2.32±0.41	0.79±0.09	0.74±0.08 <sup>2)</sup>	1.54±0.35

注: 与正常对照组比较, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; 与模型组比较, <sup>2)</sup> $P<0.05$ 。

Note: Compared with control group, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; compared with model group, <sup>2)</sup> $P<0.05$ 。

表 4 FSML 对模型四氧嘧啶诱导胰岛素抵抗糖脂代谢紊乱模型大鼠的血脂的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 4 The regulatory effect of FSML on the blood lipid levels in rat models with insulin resistance and glucose and lipids metabolism disturbance induced by alloxan ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	n	TC/mmol·L <sup>-1</sup>	TG/mmol·L <sup>-1</sup>	HDL/mmol·L <sup>-1</sup>	LDL/mmol·L <sup>-1</sup>
正常对照组	/	10	1.02±0.12	0.58±0.03	0.67±0.06	0.30±0.06
模型组	/	11	2.45±0.74 <sup>1)</sup>	0.83±0.11 <sup>1)</sup>	0.71±0.04	1.76±0.76 <sup>1)</sup>
FSML 组	17.5	11	2.60±0.71	0.89±0.25	0.81±0.09 <sup>2)</sup>	1.82±0.59
	35.0	11	2.78±0.52	0.90±0.21	0.76±0.08	1.96±0.58
二甲双胍	333.3	11	2.79±0.43	1.01±0.22 <sup>2)</sup>	0.92±0.13 <sup>3)</sup>	1.77±0.41

注: 与正常对照组比较, <sup>1)</sup>P<0.01; 与模型组比较, <sup>2)</sup>P<0.05, <sup>3)</sup>P<0.01。

Note: Compared with control group, <sup>1)</sup>P<0.01; compared with model group, <sup>2)</sup>P<0.05, <sup>3)</sup>P<0.01.

表 5 FSML 对地塞米松诱导胰岛素抵抗糖脂代谢紊乱模型大鼠组织中的 IRS1, PPAR $\gamma$  和 GLUT4 蛋白表达的影响(n=6,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 5 The regulatory effect of FSML on the Protein expression of IRS1, PPAR $\gamma$  and GLUT4 in the liver tissues of the rat models with insulin resistance and glucose and lipids metabolism disturbance induced by Dexamethasone(n=6,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	肌肉组织		脂肪组织	
		IRS1/GAPDH	GLUT4/GAPDH	PPAR $\gamma$ / $\beta$ -actin	GLUT4/ $\beta$ -actin
正常对照组	/	1.76±0.44	1.28±0.11	0.26±0.03	1.48±0.17
模型组	/	0.87±0.20 <sup>1)</sup>	0.95±0.12 <sup>1)</sup>	0.32±0.03	0.62±0.05 <sup>2)</sup>
FSML 组	17.5	0.97±0.18	1.40±0.22 <sup>3)</sup>	0.30±0.01	0.84±0.09 <sup>3)</sup>
	35.0	1.08±0.19	1.50±0.11 <sup>4)</sup>	0.91±0.05 <sup>4)</sup>	1.77±0.22 <sup>4)</sup>
PC (格列苯脲)	2.5	1.49±0.37 <sup>3)</sup>	1.33±0.02 <sup>4)</sup>	0.92±0.07 <sup>4)</sup>	0.85±0.09 <sup>3)</sup>

注: 与正常对照组比较, <sup>1)</sup>P<0.05, <sup>2)</sup>P<0.01; 与模型组比较, <sup>3)</sup>P<0.05, <sup>4)</sup>P<0.01。

Note: Compared with control group, <sup>1)</sup>P<0.05, <sup>2)</sup>P<0.01; compared with model group, <sup>3)</sup>P<0.05, <sup>4)</sup>P<0.01.

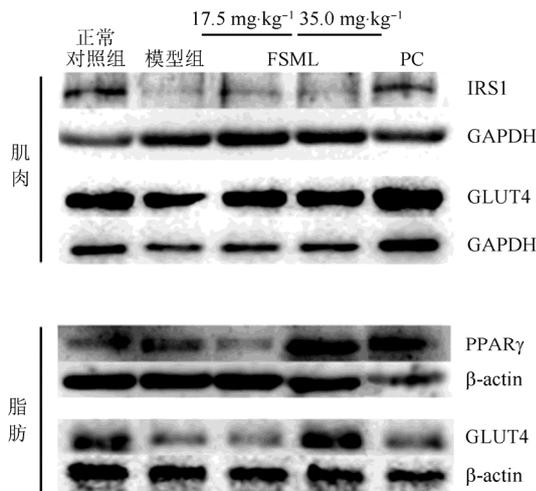


图 1 IRS1、GLUT4、PPAR $\gamma$  的蛋白表达检测图

Fig. 1 The expression levels of IRS1, GLUT4 and PPAR $\gamma$  by Western blot analysis

### 3 讨论

IRS1 是胰岛素信号传导系统关键的介导者之一。IRS1 主要分布在肝脏, 骨骼肌和脂肪等, 与外周胰岛素敏感性或胰岛素抵抗关系密切。研究表明, IRS1 的磷酸化在介导胰岛素信号通路方面起重要作用, 研究发现 IRS-1 的表达降低或酪氨酸磷酸化减弱与 IR 密切相关<sup>[7]</sup>。GLUT4 主要分布在

骨骼肌和脂肪组织中, 是人和啮齿动物的最主要的葡萄糖转运体, 它在上游信号因子的介导下, 可以从胞浆内转移到细胞膜上, 从而介导细胞对葡萄糖的摄入, GLUT4 数目的减少、内在活性的降低和转位的障碍, 均可导致 IR<sup>[8]</sup>。有研究<sup>[9]</sup>表明 IRS1 介导的胰岛素信号可经由活化磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K)通路而促进 GLUT4 从胞浆到胞膜的转移, 从而促进细胞对葡萄糖的摄入。本研究发现 FSML 给药可以显著增加模型大鼠的骨骼肌组织和脂肪组织中的 GLUT4 的蛋白表达, 表明 FSML 可能的作用机制是通过增加 GLUT4 的蛋白表达, 从而促进细胞的葡萄糖摄取来减轻胰岛素抵抗, 达到降低血糖的作用。本研究同时也检验了 IRS1 的蛋白含量, 但结果显示 FSML 不能显著增加模型大鼠骨骼肌组织中的 IRS1 的蛋白表达水平, 说明 GLUT4 的蛋白表达上调不是由 IRS1 的蛋白表达上调引起的, 但是否与 IRS1 的磷酸化有关还需要后续的研究工作来确证。

PPAR $\gamma$  主要表达于脂肪组织, 是脂肪组织内一个重要的核转录因子。近年来发现 PPAR $\gamma$  激活可以增强胰岛素的敏感性, 从而改善 IR 症状, 达到治疗 T2DM 的目的。临床上用于 T2DM 和 IR

治疗的噻唑烷二酮类药物即为 PPAR $\gamma$  人工合成配体, TZD 类药物能激活 PPAR $\gamma$ 。有研究表明<sup>[10]</sup>。PPAR $\gamma$  可以促进 PI3K 基因表达, 增强胰岛素敏感性, 还可以促进 GLUT4 基因表达, 促进对葡萄糖的摄取。胰岛素可活化 PPAR $\gamma$ , 大鼠脂肪细胞经胰岛素处理 30 min 后, 能使其磷酸化水平增加 3 倍, 显示 PPAR $\gamma$  活性升高<sup>[11]</sup>。本研究发现, 经 FSML 作用后, 大鼠脂肪组织中的 PPAR $\gamma$  和 GLUT4 的蛋白表达水平均有显著增加, 这也可能是 FSML 调控血糖的可能机制之一, 即通过上调 PPAR $\gamma$  的蛋白表达, 进一步增加 GLUT4 的蛋白表达水平, 从而促进细胞的葡萄糖摄取, 从而起到改善胰岛素抵抗, 降低血糖的功效。

本配方中的主要活性物质是桑叶提取物中的 1-DNJ 和葫芦巴籽提取物中的 4-羟基异亮氨酸。根据以往文献报道, 1-DNJ 是桑叶提取物发挥降糖作用的一种主要的活性物质, 它是一种  $\alpha$  糖苷酶抑制剂, 可以抑制食物中的淀粉转变成葡萄糖, 从而减少人体对葡萄糖的摄入<sup>[12]</sup>。也有文献报道, 1-DNJ 可以促进脂肪细胞的葡萄糖摄取<sup>[13]</sup>。4-羟基异亮氨酸是一种仅在葫芦巴籽中发现的化合物, 据文献报道<sup>[4]</sup>, 该活性物质能通过活化 PI3K 通路, 增加 GLUT4 从胞内向胞膜的转移, 刺激细胞的葡萄糖摄取。并能改善高糖环境诱导的 3T3-L1 脂肪细胞的胰岛素抵抗情况<sup>[5]</sup>。4-羟基异亮氨酸能通过增加 GLUT4 的蛋白表达, 促进 L6 骨骼肌细胞的葡萄糖摄取。另有研究<sup>[14-15]</sup>发现 4-羟基异亮氨酸表现出促胰岛素作用, 从而显示出对大鼠和狗的葡萄糖耐受性的改善作用。

通过本实验的结果发现, 两者的混合物还能上调 PPAR $\gamma$  蛋白的表达, 调节胰岛素信号通路, 增加 GLUT4 蛋白表达, 从而增加细胞的葡萄糖摄取, 减少外周胰岛素靶组织的胰岛素抵抗。但遗憾的是对桑叶提取物的  $\alpha$  糖苷酶抑制剂缺乏验证。

本实验在以往研究的基础上, 将两者按一定配比混合, 通过 2 种不同机制的具有降血糖作用的中草药提取物的组合, 发挥更好的降血糖作用; 同时从分子学层面对降糖机制做了更深入的研究, 探索了组方对 IRS1、PPAR $\gamma$  和 GLUT4 的蛋白表达影响。

另外, 本试验采取的模式为糖脂代谢紊乱模型, 是一种糖尿病前期的模型, 探索根据此组方是否能将处于糖尿病前期的大鼠治愈或减缓其糖

尿病的进程。实验结果表明, 相比模型组, 该组方能明显减慢糖尿病的进展。

## REFERENCES

- [1] YANG W, LU J, WENG J, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China [J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(12): 1090-1101.
- [2] XU Y, WANG L, HE J, et al. Prevalence and control of diabetes in Chinese adults [J]. *JAMA*, 2013, 310(9): 948-958.
- [3] MARUO S, YAMASHITA H, MIYAZAKI K, et al. A novel and efficient method for enzymatic synthesis of high purity maltose using moranoline(1-deoxynojirimycin) [J]. *Biosci Biotech Biochem*, 1992, 56(9): 1406-1409.
- [4] JAISWAL N, MAURYA C K, VENKATESWARLU K, et al. 4-Hydroxyisoleucine stimulates glucose uptake by increasing surface GLUT4 level in skeletal muscle cells via phosphatidylinositol-3-kinase-dependent pathway [J]. *Eur J Nutr*, 2012, 51(7): 893-898.
- [5] YU H, WU M, LU F R, et al. Effect of *Trigonella foenum-graecum* 4-hydroxyisoleucine on high-glucose induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes of mice [J]. *Chin J Integr Tradit West Med(中国中西医结合杂志)*, 2013, 33(10): 1394-1398.
- [6] 《辅助降血糖功能评价方法》[M]. 国家食品药品监督管理局, 国食药监保化[2012]107 号.
- [7] FRITSCH L, WEIGERT C, HÄRING H U, et al. How insulin receptor substrate proteins regulate the metabolic capacity of the liver—implications for health and disease [J]. *Curr Med Chem*, 2008, 15(13): 1316-1329.
- [8] ROWLAND A F, FAZAKERLEY D J, JAMES D E. Mapping insulin/GLUT4 circuitry [J]. *Traffic*, 2011, 12(6): 672-81.
- [9] ASANO T, FUJISHIRO M, KUSHIYAMA A, et al. Role of phosphatidylinositol 3-kinase activation on insulin action and its alteration in diabetic conditions [J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(9): 1610-1616.
- [10] TRAYHURN P, WOOD I S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue [J]. *Br J Nutr*, 2004, 92(3): 347-355.
- [11] SHALEV A, SIEGRIST C A, YEN P M, et al. The peroxisome proliferator activated receptor  $\alpha$  and  $\gamma$  are the phosphoprotein: regulation by insulin [J]. *Endocrinology*, 1996, 137(10): 4499-4502.
- [12] LI L, LU J, LI Y J, et al. Screening of the components with hypoglycemic activity from mulberry leaves and its pharmacological study [J]. *Inf Tradit Chin Med(中医药信息)*, 2012, 29(5): 10-14.
- [13] LI Y G, JI D F, ZHONG S, et al. 1-deoxynojirimycin inhibits glucose absorption and accelerates glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetic mice [J]. *Sci Rep*, 2013(3):1377. Doi: 10.1038/srep01377.
- [14] SAUVAIRE Y, PETIT P, BROCA C, et al. 4-hydroxyisoleucine: a novel amino acid potentiator of insulin secretion [J]. *Diabetes*, 1998, 47(2): 206-210.
- [15] BROCA C, GROSS R, PETIT P, et al. 4-Hydroxyisoleucine: experimental evidence of its insulinotropic and antidiabetic properties [J]. *Am J Physiol*, 1999, 277(4 Pt 1): E617-623.

收稿日期: 2015-08-25