

# 黄芩-黄连调控 $\beta$ 细胞甜味受体通路对胰岛素分泌紊乱的改善作用

李涵艺<sup>1,2</sup>, 李 杰<sup>1,2</sup>, 陆荣欣<sup>1,2</sup>, 季亚男<sup>1,2</sup>, 宋秀道<sup>1,3</sup>, 宗 阳<sup>1,3</sup>, 周 梁<sup>1,3\*</sup>,  
江国荣<sup>1,3\*</sup>

(1. 南京中医药大学附属苏州市中医医院中药临床药学实验室, 江苏 苏州 215009; 2. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023; 3. 苏州市吴门医派研究院中药临床药学实验室, 江苏 苏州 215009)

**摘要:** **目的** 研究黄芩-黄连药对对胰岛素分泌的调节作用及其对甜味受体信号通路相关蛋白表达的影响。**方法** 体内实验, 采用高糖高脂饮食建立糖尿病前期大鼠模型, 黄芩-黄连药对干预 14 d 后进行口服糖耐量实验 (OGTT) 及测定 OGTT 各时间点血清胰岛素水平, 采用稳态模型法计算大鼠胰岛素抵抗 (IR) 指数; HPLC 测定血清中 3-脱氧葡萄糖醛酮 (3DG) 含量; 蛋白质印迹法检测大鼠胰腺组织甜味受体信号通路蛋白表达。体外实验, 采用 MTT 法检测大鼠血清对 INS-1 细胞活性的影响, 通过 3DG 诱导建立胰岛功能受损的 INS-1 细胞模型, 黄芩-黄连药对含药血清进行干预, 采用 ELISA 法检测 INS-1 细胞在低糖和高糖刺激下的胰岛素分泌量; 蛋白质印迹法检测 INS-1 细胞甜味受体信号通路蛋白表达。**结果** 体内实验, 与正常组比较, 模型组 FBG 值、FINS 值、IR 指数、糖负荷后各时间点血糖值均提高 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 糖负荷 30 min 血清胰岛素值降低 ( $P<0.01$ ), 糖负荷 60 min 血清胰岛素值升高 ( $P<0.01$ ), 血清 3DG 含量升高 ( $P<0.05$ ), 胰腺组织甜味受体信号通路 T1R2、T1R3、PLC $\beta$ 2 和 TRPM5 蛋白表达均降低 ( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 黄芩-黄连组上述指标均有改善 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。体外实验, 10% 和 20% 黄芩-黄连药对含药血清对 INS-1 细胞活性无明显影响 ( $P>0.05$ )。与正常组比较, 模型组细胞在低糖刺激下胰岛素分泌增加 ( $P<0.01$ ), 高糖刺激下减少 ( $P<0.05$ ), 细胞 T1R2、T1R3、PLC $\beta$ 2 和 TRPM5 蛋白表达均降低 ( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 黄芩-黄连组上述指标均有改善 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。**结论** 黄芩-黄连药对对胰岛素分泌紊乱的调节作用与其调控  $\beta$  细胞甜味受体信号通路有关。

**关键词:** 黄芩; 黄连; 甜味受体; 胰岛素; 糖尿病

**中图分类号:** R285.5

**文献标志码:** B

**文章编号:** 1001-1528(2024)05-1652-06

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.05.039

糖尿病前期 (impaired glucose regulation, IGR) 是发展为糖尿病必经且可逆的阶段, 表现为糖耐量受损和 (或) 空腹血糖异常。根据美国糖尿病协会标准推测我国 IGR 患病率约占总人口的三成, 若不加以任何干预, 20 年内将有超过九成的 IGR 人群最终会发展成糖尿病<sup>[1]</sup>。在经典医著中, 黄芩和黄连是中医治疗糖尿病最常用药对<sup>[2]</sup>。且文献研究发现, 黄芩-黄连配伍的方剂具有良好的降血糖、改善胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR)、保护修复损伤胰岛  $\beta$  细胞及促进胰岛素分泌的作用<sup>[3-7]</sup>。

胰腺甜味受体 (sweet taste receptors, STR) 除了存在于口腔感知味觉外, 在机体胰腺和胃肠道等组织中均有表达, 调控着胰岛素、胰高血糖素样肽-1 (glucagon-like peptide 1, GLP-1) 等激素的分泌<sup>[8-9]</sup>。研究发现剔除 STR 基因导致小鼠胰岛素分泌紊乱、糖耐量受损, 而 STR 被激

活后可以调控胰岛  $\beta$  细胞分泌胰岛素<sup>[10-11]</sup>。因此, 本研究探索了黄芩-黄连对改善糖尿病前期 (IGR) 症状、调节胰岛素分泌是否与其调控 STR 信号通路有关。

## 1 材料

1.1 动物 SPF 级 SD 雄性大鼠, 体质量 180~220 g, 购自昭衍 (苏州) 新药研究中心有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (苏) 2018-0006, 实验动物使用许可证号 SYXK (苏) 2017-0043]。本实验得到了苏州市中医医院地方伦理委员会的批准 (2019 伦动批 006)。

1.2 细胞 INS-1 细胞购自中国医学科学院基础医学院研究所, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基常规培养。

1.3 药物与试剂 黄芩 (产地山西, 批号 200118)、黄连 (产地四川, 批号 200601) 均购自苏州市春晖堂药业有限公司, 经苏州市中医医院沈多荣药师鉴定, 均为《中国药

**收稿日期:** 2023-08-11

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目 (81973740, 82004315, 82104722); 苏州市 2021 年度第三十二批科技发展计划项目 (SKJY2021129); 苏州市“科教兴卫”青年科技项目 (KJXW2019044)

**作者简介:** 李涵艺 (1999—), 女, 硕士生, 研究方向为临床中医学。Tel: 17801111873, E-mail: 20200776@njucm.edu.cn

\* **通信作者:** 周 梁 (1987—), 主管中药师, 研究方向为临床中医学。E-mail: zhouliangsz@yeah.net

江国荣 (1963—), 教授, 主任中药师, 硕士生导师, 研究方向为临床中医学。E-mail: szguorongjiang@163.com

典》项下规定的药材品种。RPMI-1640 培养基（货号 31800-014）购自美国 Gibco 公司；胎牛血清（货号 11011-8611）购自浙江天杭生物科技股份有限公司；脱脂奶粉（货号 6H2EH0106）购自内蒙古伊利实业集团股份有限公司；胰岛素 ELISA 试剂盒（货号 BYE80136）购自上海邦奕生物科技有限公司；T1R2 抗体（货号 NB110-74920）、T1R3 抗体（货号 NB100-98792）均购自美国 Novus Biologicals 公司；PLCβ2 抗体（货号 31449）购自美国 Signalway Antibody 公司；TRPM5 抗体（货号 ab154788）购自英国 Abcam 公司；β-actin 抗体（货号 420812NJ-I4202016）、Goat Anti-Rabbit IgG 二抗（货号 AT0097）、Goat Anti-Mouse IgG 二抗（货号 AT0098）均购自美国 Engibody 公司；C<sub>18</sub> 色谱柱（货号 E3223040）购自大连依利特分析仪器有限公司；HPLC 对照品均购自美国 Sigma 公司。

1.4 仪器 电子天平（瑞士梅特勒-托利多公司）；普通天平（美国双杰有限公司）；超低温冰箱（日本 SANYO 公司）；高速冷冻离心机（北京白洋医疗器械有限公司）；稳豪倍优型血糖仪（中国强生医疗器材有限公司）；Count star 细胞计数仪（上海睿钰生物科技有限公司）；5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱（美国 Kendro 公司）；酶标仪（美国 Molecular Devices 公司）；细胞培养皿（无锡耐思生命科技股份有限公司）；6、24、96 孔细胞培养板 [康宁生命科学（吴江）有限公司]；1100LC 高效液相色谱仪（DAD 检测器，美国 Agilent 公司）。

## 2 方法

### 2.1 体内实验

2.1.1 药液制备 黄芩和黄连按照半夏泻心汤全方中的比例（3：1）称取，药材用 4 倍量蒸馏水浸泡 30 min 后，以 6 倍量的蒸馏水加热回流提取 30 min，过滤收集煎液；再加 6 倍量的蒸馏水于药渣中，继续加热回流 30 min，过滤收集煎液，合并 2 次煎液，于旋转蒸发器中浓缩至实验用剂量，即生药量 1 g/mL。

2.1.2 黄芩-黄连药对水煎液的成分分析 用 HPLC 法测定黄芩-黄连药对水煎液中主要活性成分，流动相 0.1% 甲酸水-甲醇梯度洗脱；检测波长 275 nm；柱温 30 ℃；进样量 10 μL。

2.1.3 模型建立、分组及给药 结合文献 [12-13] 报道方法，大鼠自由进食高糖高脂饲料 10 周进行造模，根据空腹血糖和糖耐量值筛选出造模成功的 IGR 大鼠。将造模成功的 IGR 大鼠随机分为模型组和黄芩-黄连组，同时设置正常组，每组 7 只。正常组和模型组大鼠灌胃蒸馏水，黄芩-黄连组大鼠每天灌胃 10 mL/kg（按人与大鼠临床等效剂量换算所得）黄芩-黄连药对水煎液，连续灌胃 14 d。其中正常组自由进食标准饲料，而模型组和黄芩-黄连组大鼠自由进食高糖高脂饲料。

2.1.4 大鼠 IR 指数测定 给药结束后，大鼠禁食不禁水 18 h，尾静脉取血，用血糖试纸测定大鼠 FBG<sup>[12]</sup>；眼眶取

血，4 ℃、3 000 r/min 离心 10 min 分离血清，按照大鼠胰岛素试剂盒说明书检测大鼠 FINS 水平<sup>[12]</sup>；参照文献 [5] 报道方法，采用稳态模型法计算大鼠 IR 指数，公式为 IR 指数 = [FBG×FINS] /22.5。

2.1.5 大鼠血糖和血清胰岛素水平检测 给药结束后，大鼠禁食不禁水 18 h，灌胃 50% 葡萄糖（2 g/kg），分别在 0、30、60、120 min 尾静脉采血，用血糖试纸测定大鼠血糖值，其中 0 min 血糖值作为空腹血糖值<sup>[13]</sup>；眼眶取血，4 ℃、3 000 r/min 离心 10 min 分离血清，按照大鼠胰岛素试剂盒说明书检测大鼠血清胰岛素值，其中 0 min 血清胰岛素值作为空腹血清胰岛素值<sup>[13]</sup>。

2.1.6 HPLC 法检测大鼠血清中 3DG 含量 给药结束后，大鼠禁食不禁水 18 h，取腿部大动脉血，分离血清。用 HPLC 法测定血清中 3DG 含量，流动相为 50 mmol/L 磷酸盐溶液，激发波长 271 nm，发射波长 503 nm<sup>[14]</sup>。

2.1.7 蛋白质印迹法检测大鼠胰腺组织甜味受体信号通路蛋白表达 各组大鼠口服糖耐量实验结束后断髓解剖取材<sup>[15]</sup>。将各组大鼠胰腺组织剪块、称重后置于离心管中，加入 RIPA 裂解液制成组织匀浆，在 4 ℃冰箱中裂解 30 min 后，12 000 r/min 离心 10 min，吸取上清并测定总蛋白浓度，加入 5×loading buffer 混匀，沸水浴加热 10 min 使蛋白质变性。参照文献 [10] 报道方法进行上样、电泳以及转膜，用 5% 脱脂奶粉溶液常温封闭 2 h，加一抗 4 ℃孵育过夜，加二抗常温孵育 2 h，参照 ECL 试剂盒说明书使蛋白显影，拍摄保存。通过 Image J 软件计算各蛋白条带灰度值。

### 2.2 体外实验

2.2.1 含药血清制备 20 只正常 SD 雄性大鼠随机分为 2 组<sup>[16]</sup>，空白组灌胃蒸馏水，黄芩-黄连组灌胃每天 10 mL/kg 黄芩-黄连药对水煎液，连续 7 d。于第 7 天末次给药 2 h 后腹主动脉取血，静置 2 h 后 4 ℃、3 000 r/min 离心 15 min，分离血清。混合同组大鼠血清，56 ℃水浴灭活 30 min，无菌过滤分装后于-80 ℃保存备用。

2.2.2 细胞造模、分组与给药 取对数生长期 INS-1 细胞，用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基培养 24 h。设置不同组别，正常组加入含 10% 空白血清的 RPMI-1640 培养基培养 24 h，模型组加入含 300 μg/L 3DG 和 10% 空白血清的 RPMI-1640 培养基培养 24 h，黄芩-黄连对照组（仅 MTT 实验）分别加入含 5%、10%、20% 黄芩-黄连药对含药血清的 RPMI-1640 培养基培养 24 h，黄芩-黄连组（仅 ELISA、蛋白质印迹实验）加入含 300 μg/L 3DG 和 10% 黄芩-黄连药对含药血清的 RPMI 1640 培养基培养 24 h。

2.2.3 MTT 法检测 INS-1 细胞活性 取对数生长期 INS-1 细胞接种于 96 孔板中，每孔 1×10<sup>4</sup> 个细胞，按“2.2.2”项下分组处理，干预 24 h 后弃上清，每孔加入 200 μL 0.5 g/L MTT 溶液培养 4 h，弃上清，每孔加入 150 μL 二甲基亚砜，于摇床上振荡 10 min 后用酶标仪在 490 nm 波长处测定吸光度值<sup>[17]</sup>，计算细胞活性。

2.2.4 ELISA 法检测 INS-1 细胞胰岛素分泌量 取对数生长期 INS-1 细胞接种于 24 孔板中, 每孔  $2\times 10^5$  个细胞, 按“2.2.2”项下分组处理, 干预 24 h 后弃上清, 用无糖 KRB 缓冲液洗涤 2 次, 加含 5.6 mmol/L 葡萄糖的 KRB 缓冲液孵育 1.5 h 后弃上清, 再分别用低糖 (5.6 mmol/L) 和高糖 (25 mmol/L) KRB 缓冲液孵育 1.5 h 后收集上清。按照大鼠胰岛素酶联免疫分析试剂盒说明书检测胰岛素值, 计算胰岛素分泌量的差异倍数, 公式为差异倍数=每孔胰岛素值/正常组胰岛素均值<sup>[15]</sup>。

2.2.5 蛋白质印迹法检测 INS-1 细胞 STR 信号通路蛋白表达 取对数生长期 INS-1 细胞接种于 6 孔板中, 每孔  $4\times 10^5$  个细胞, 按“2.2.2”项下分组处理, 干预 24 h 后弃上清,

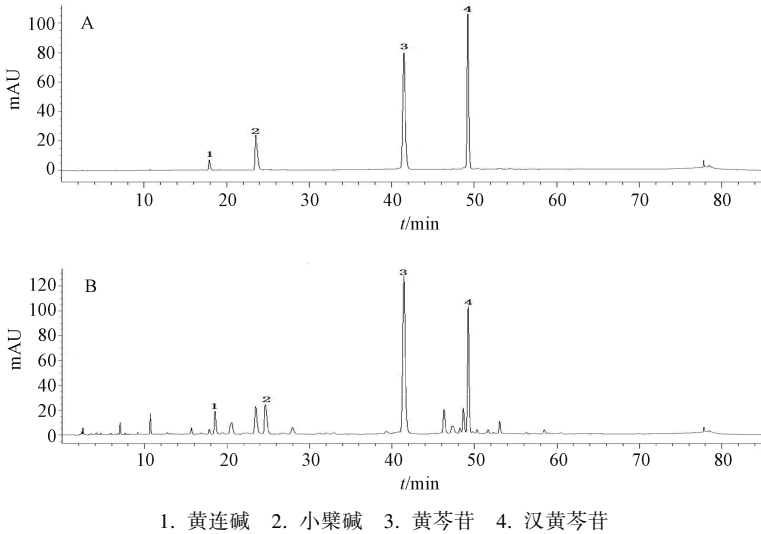
用提前预冷的 PBS 缓冲液洗涤 2 次, 消化并收集细胞, 加入含磷酸酶抑制剂和 PMSF 的 RIPA 裂解液<sup>[15]</sup>, 按照“2.1.7”项下方法进行蛋白质印迹实验。

2.3 统计学分析 通过 Graphpad Prism 8 软件进行处理, 计量资料以  $(\bar{x}\pm s)$  表示, 两组间比较采用配对  $t$  检验。 $P<0.05$  表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 体内实验

3.1.1 黄芩-黄连药对水煎液成分分析 如图 1 所示, 黄芩-黄连药对水煎液中主要活性成分为黄连碱、小檗碱、黄芩苷、汉黄芩苷。



1. 黄连碱 2. 小檗碱 3. 黄芩苷 4. 汉黄芩苷  
注: A 为黄连碱、小檗碱、黄芩苷、汉黄芩苷对照品的 HPLC 色谱图, B 为黄芩-黄连药对水煎液的 HPLC 色谱图。

图 1 黄芩-黄连药对水煎液的 HPLC 色谱图

3.1.2 黄芩-黄连药对对 IGR 大鼠 FBG、FINS 和 IR 指数的影响 如表 1 所示, 与正常组比较, 模型组大鼠 FBG、FINS、IR 均升高 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); 与模型组比较, 黄芩-黄连组大鼠 FBG、FINS、IR 均降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。

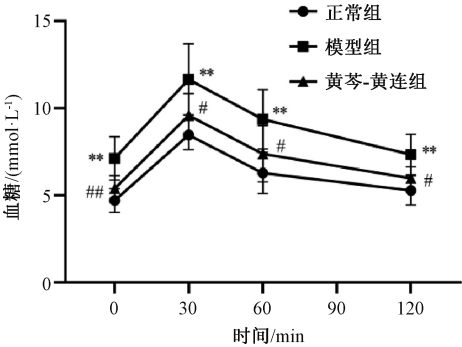
表 1 黄芩-黄连药对对 IGR 大鼠 FBG、FINS 和 IR 指数的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=7$ )

| 组别     | FBG/(mmol·L <sup>-1</sup> ) | FINS/(μg·mL <sup>-1</sup> ) | IR 指数       |
|--------|-----------------------------|-----------------------------|-------------|
| 正常组    | 4.70±0.68                   | 4.84±0.93                   | 1.01±0.22   |
| 模型组    | 7.13±1.25**                 | 6.06±0.99*                  | 1.91±0.41** |
| 黄芩-黄连组 | 5.40±0.74##                 | 4.97±0.72#                  | 1.18±0.14## |

注: 与正常组比较, \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ ; 与模型组比较, #  $P<0.05$ , ##  $P<0.01$ 。

3.1.3 黄芩-黄连药对对 IGR 大鼠血糖的影响 如图 2 所示, 与正常组比较, 模型组大鼠各个时间段血糖值均升高 ( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 黄芩-黄连组大鼠各个时间段血糖值均降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 表明黄芩-黄连药对能改善 IGR 大鼠的糖耐量。

3.1.4 黄芩-黄连药对对 IGR 大鼠血清胰岛素水平的影响

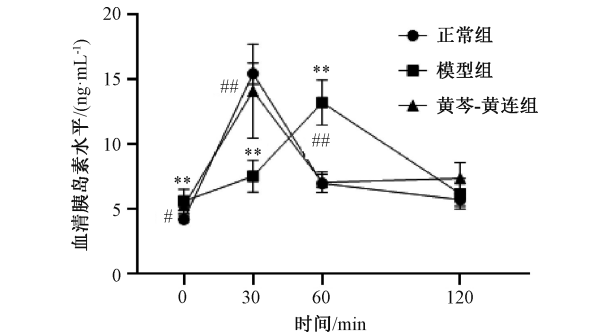


注: 与正常组比较, \*\*  $P<0.01$ ; 与模型组比较, #  $P<0.05$ , ##  $P<0.01$ 。

图 2 黄芩-黄连药对对 IGR 大鼠血糖的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=7$ )

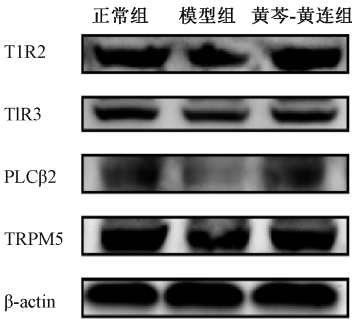
响 如图 3 所示, 与正常组比较, 模型组大鼠糖负荷 30 min 血清胰岛素水平降低 ( $P<0.01$ ), 糖负荷 60 min 血清胰岛素水平升高 ( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 黄芩-黄连组大鼠糖负荷 30 min 血清胰岛素水平升高 ( $P<0.01$ ), 糖负荷 60 min 血清胰岛素水平降低 ( $P<0.01$ ), 表明黄芩-黄连药对能恢复 IGR 大鼠的胰岛素分泌规律。

3.1.5 黄芩-黄连药对对 IGR 大鼠胰腺组织 STR 信号通路



注：与正常组比较，\*\*  $P < 0.01$ ；与模型组比较，#  $P < 0.05$ ，##  $P < 0.01$ 。

图 3 黄芩-黄连药对对 IGR 大鼠血清胰岛素水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 7$ )



注：与正常组比较，\*\*  $P < 0.01$ ；与模型组比较，#  $P < 0.05$ ，##  $P < 0.01$ 。

图 4 黄芩-黄连药对对 IGR 大鼠胰腺组织 T1R2、T1R3、PLCβ2 和 TRPM5 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 7$ )

模型。

3.2 体外实验

3.2.1 黄芩-黄连药对含药血清对 INS-1 细胞活性的影响 如表 2 所示，与正常组比较，10% 和 20% 黄芩-黄连药对含药血清对 INS-1 细胞活性无明显影响 ( $P > 0.05$ )，因此后续实验选用 10% 黄芩-黄连药对含药血清。

表 2 不同浓度黄芩-黄连药对含药血清对 INS-1 细胞活性的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 7$ )

| 组别               | 细胞活性        |
|------------------|-------------|
| 正常组              | 1.00±0.03   |
| 5% 黄芩-黄连药对含药血清组  | 0.91±0.08 * |
| 10% 黄芩-黄连药对含药血清组 | 0.96±0.04   |
| 20% 黄芩-黄连药对含药血清组 | 0.99±0.04   |

注：与正常组比较，\*  $P < 0.05$ 。

3.2.2 黄芩-黄连药对含药血清对胰岛功能受损的 INS-1 细胞胰岛素分泌的影响 如表 3 所示，与正常组比较，模型组 INS-1 细胞在 5.6 mmol/L 葡萄糖刺激下胰岛素分泌增加 ( $P < 0.01$ )，在 25 mmol/L 葡萄糖刺激下胰岛素分泌减少 ( $P < 0.05$ )；与模型组比较，黄芩-黄连组 INS-1 细胞在 5.6 mmol/L 葡萄糖刺激下胰岛素分泌减少 ( $P < 0.01$ )，在 25 mmol/L 葡萄糖刺激下胰岛素分泌增加 ( $P < 0.01$ )，表明黄芩-黄连药对含药血清能恢复胰岛功能受损的 INS-1 细胞的胰岛素分泌。

相关蛋白表达的影响 如图 4 所示，与正常组比较，模型组大鼠胰腺组织中 T1R2、T1R3、PLCβ2 和 TRPM5 蛋白表达均降低 ( $P < 0.01$ )；与模型组比较，黄芩-黄连组大鼠胰腺组织中 T1R2、T1R3、PLCβ2 和 TRPM5 蛋白表达均升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )，表明黄芩-黄连药对能恢复受损的 IGR 大鼠胰腺 STR 信号通路相关蛋白表达，其可能通过调控 STR 信号通路改善胰岛素分泌紊乱。

3.1.6 IGR 大鼠血清中 3DG 含量的变化 正常组大鼠血清 3DG 含量为 ( $8.74 \pm 5.33$ )  $\mu\text{g/L}$ ；模型组大鼠血清 3DG 含量增加 ( $P < 0.05$ )，为 ( $17.96 \pm 5.42$ )  $\mu\text{g/L}$ 。结合课题组前期研究发现 3-DG 是 IGR 的独立致病因素<sup>[18-20]</sup>，3DG 可能为 STR 信号通路的致病因子，3DG 含量可能影响 STR 信号通路蛋白表达。因此，后续体外实验使用 3DG 建立细胞

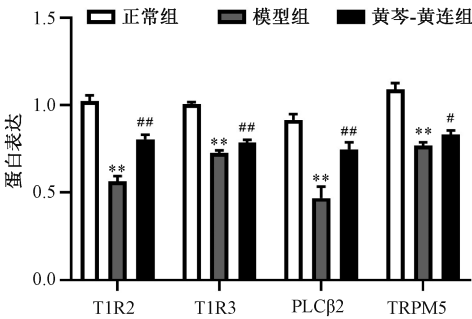


表 3 黄芩-黄连药对含药血清对 INS-1 细胞胰岛素分泌的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 7$ )

| 组别     | 胰岛素分泌 (差异倍数)   |               |
|--------|----------------|---------------|
|        | 5.6 mmol/L 葡萄糖 | 25 mmol/L 葡萄糖 |
| 正常组    | 1.00±0.11      | 1.00±0.05     |
| 模型组    | 1.51±0.10 **   | 0.92±0.06 *   |
| 黄芩-黄连组 | 1.09±0.21 ##   | 1.04±0.05 ##  |

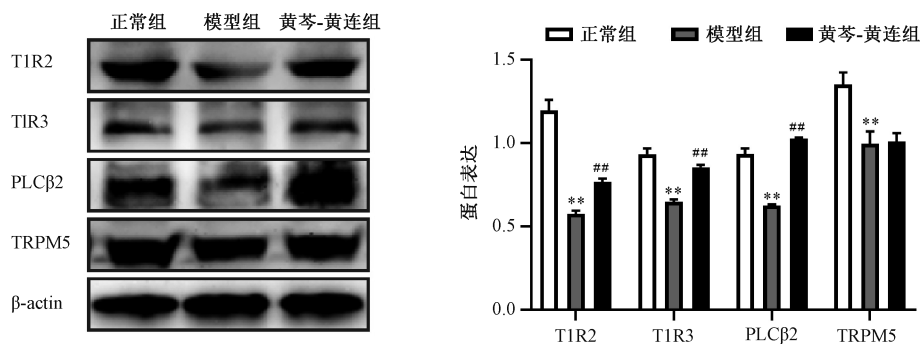
注：与正常组比较，\*  $P < 0.05$ ，\*\*  $P < 0.01$ ；与模型组比较，##  $P < 0.01$ 。

3.2.3 黄芩-黄连药对含药血清对胰岛功能受损的 INS-1 细胞 STR 信号通路蛋白表达的影响 如图 5 所示，与正常组比较，模型组 T1R2、T1R3、PLCβ2 和 TRPM5 蛋白表达均降低 ( $P < 0.01$ )；与模型组比较，黄芩-黄连组 T1R2、T1R3 和 PLCβ2 蛋白表达均升高 ( $P < 0.01$ )，TRPM5 蛋白表达有升高趋势，但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )，表明黄芩-黄连药对能恢复受损的 INS-1 细胞 STR 信号通路相关蛋白表达，可能通过调控 STR 信号通路改善胰岛素分泌紊乱现象。

4 讨论

3DG 是生成晚期糖基化终产物 (AGEs) 的中间体，课题组前期研究发现 3DG 是 IGR 的独立致病因素，可引起其胰岛 β 细胞功能紊乱。本研究通过喂养高糖高脂来建立 IGR 大鼠模型，发现模型大鼠血清中 3DG 含量高于正常组，故以 3DG 诱导建立胰岛功能受损的 INS-1 细胞模型。

半夏泻心汤被 IGR 中医药循证临床实践指南收录，临



注：与正常组比较，\*\*  $P < 0.01$ ；与模型组比较，##  $P < 0.01$ 。

**图 5 黄芩-黄连药对含药血清对 INS-1 细胞 T1R2、T1R3、PLCβ2 和 TRPM5 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 7$ )**

床疗效确切，具有改善糖尿病小鼠糖代谢、保护胰岛  $\beta$  细胞、促进胰岛素分泌的作用，但其作用机制研究滞后<sup>[21-23]</sup>。“药对”是中药治法方药配伍和效应机制研究的最小研究对象，同时黄芩-黄连药对相比单味药，其水煎液中黄芩苷、小檗碱含量更高，药效更优<sup>[24]</sup>。黄芩-黄连药对比比例主要为 3 : 2 ~ 1 : 3<sup>[25]</sup>，黄芩的活性成分能干预血糖、IR 及保护胰岛  $\beta$  细胞，进而抗糖尿病<sup>[26]</sup>。故本研究基于半夏泻心汤 3 : 1 的黄芩-黄连比例进行实验。高血糖、胰岛素抵抗及胰岛素分泌异常是 IGR 中相互影响的指标，黄芩-黄连药对具有良好的降血糖作用，能改善胰岛素抵抗，促进胰岛素分泌<sup>[27-28]</sup>。本研究体内实验验证了此结果，且 OGTT 各时间点的血糖与胰岛素分泌相一致。 $\beta$  细胞以胰岛的形式聚集， $\beta$  细胞之间的交流抑制基础胰岛素分泌，增强葡萄糖刺激的胰岛素分泌，从而有助于维持禁食和进食期间的葡萄糖稳态。在糖尿病发生发展过程中， $\beta$  细胞功能会呈现进行性下降<sup>[29]</sup>。体外实验发现，对于胰岛素分泌异常的细胞，黄芩-黄连药对能减少其低糖刺激下的胰岛素分泌，增加其高糖刺激下的胰岛素分泌，改善损伤的胰岛  $\beta$  细胞功能。

STR 是由味觉受体第一家族中的 T1R2 和 T1R3 形成的二聚体，可通过干预  $G\beta\gamma$  亚基激活磷脂酶 C- $\beta 2$  (phospholipase C- $\beta 2$ , PLC $\beta 2$ ) 及阳离子通道 TRPM5，进而参与调控葡萄糖刺激的胰岛素分泌<sup>[10-11]</sup>。生理状态下， $\beta$  细胞 STRs 感应血糖，触发一个时间依赖的、可逆的信号通路，抑制胰岛素分泌。STRs 信号受损的小鼠胰岛在短期空腹血糖浓度下表现出胰岛素高分泌，同时  $\beta$  细胞 STRs 表达下调可引起餐后胰岛素分泌减少。3DG 会降低  $\beta$  细胞 STR 蛋白表达，损伤生理胰岛素分泌功能<sup>[15,30-32]</sup>。研究发现，糖尿病大鼠胰腺组织 STR 信号通路中的 T1R2、T1R3 和 TRPM5 蛋白表达量减少，黄芪多糖可以增加 2 型糖尿病大鼠胰腺 GLP-1 和 STR 信号分子表达，促进胰岛素分泌，减轻 2 型糖尿病大鼠症状<sup>[33]</sup>；葛根苓连汤通过调控苦味受体信号通路（包括 PLC $\beta 2$ 、TRPM5 蛋白表达）诱导小鼠 GLP-1 分泌<sup>[34]</sup>。由此推测黄芩-黄连药对有可能通过调控 STR 信号通路来达到干预血糖、胰岛素分泌的效果。本研究发现黄芩-黄连药对能够增加大鼠胰腺和 INS-1 细胞 STR 信号通路蛋白表达，提示黄芩-黄连药对可能通过调控胰岛

$\beta$  细胞甜味受体通路改善胰岛素分泌紊乱，为糖尿病防治药物的研发提供了新思路。

参考文献：

[ 1 ] Wang L M, Gao P, Zhang M, *et al.* Prevalence and ethnic pattern of diabetes and prediabetes in China in 2013[J]. *J Am Med Assoc*, 2017, 317(24): 2515-2523.

[ 2 ] 徐 君. 黄芩—黄连药对与肠道菌群的相互作用研究[D]. 南京：南京中医药大学，2014.

[ 3 ] 彭智平，张琳琳，刘起华，等. 干姜黄芩黄连人参汤饮片与煮散干预 2 型糖尿病 SD 大鼠的药效学初步分析[J]. *浙江中西医结合杂志*, 2015, 25(12): 1100-1102.

[ 4 ] 何百川，章清华，薛 超，等. 基于代谢组学对化浊解毒方治疗 2 型糖尿病大鼠的糖脂代谢研究[J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(5): 1897-1900.

[ 5 ] 崔 维. 半夏泻心汤对糖尿病大鼠胰岛素抵抗的影响[J]. *中医学报*, 2016, 31(7): 1008-1011.

[ 6 ] 周珊珊，艾中柱，王保华，等. 加味半夏泻心汤对 2 型糖尿病大鼠血糖、血脂及胰岛细胞功能的影响[J]. *湖北中医药大学学报*, 2017, 19(5): 13-17.

[ 7 ] 王修彬，张勇刚，迟雪洁，等. 黄连解毒汤调节糖脂代谢的药效学研究[J]. *山东中医杂志*, 2014, 33(6): 486-487.

[ 8 ] Park J H, Song D K. Sweet taste receptors as a tool for an amplifying pathway of glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic  $\beta$  cells [J]. *Pflugers Arch*, 2019, 471(4): 655-657.

[ 9 ] 田巧基，夏 凯，刘义凤，等. 功能糖通过甜味受体信号通路促进 GLP-1 的分泌[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(5): 108-116.

[ 10 ] Serrano J, Meshram N N, Mangala S M, *et al.* Saccharin stimulates insulin secretion dependent on sweet taste receptor-induced activation of PLC signaling axis [J]. *Biomedicines*, 2022, 10(1): 120.

[ 11 ] Yang L, Cui M, Liu B. Current progress in understanding the structure and function of sweet taste receptor [J]. *J Mol Neurosci*, 2020, 71(2): 234-244.

[ 12 ] Zhang M, Feng R, Yue J, *et al.* Effects of metformin and sitagliptin monotherapy on expression of intestinal and renal

sweet taste receptors and glucose transporters in a rat model of type 2 diabetes[J]. *Horm Metab Res*, 2020, 52(5): 329-335.

[13] 唐保露, 张旭, 袁萍, 等. 四君子颗粒对大鼠糖尿病前期的改善作用[J]. *中成药*, 2020, 42(3): 610-615.

[14] 江国荣, 张露蓉. 3-脱氧葡萄糖醛测定方法的建立及其在临床样本中的初步运用[J]. *中国医院药学杂志*, 2008, 28(10): 802-804.

[15] Song X D, Liang G Q, Shi M, *et al.* Acute exposure to 3-deoxyglucosone at high glucose levels impairs insulin secretion from  $\beta$ -cells by downregulating the sweet taste receptor signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(6): 5015-5022.

[16] 郭雨晴, 梁国强, 江国荣. 半夏泻心汤含药血清对 3-脱氧葡萄糖醛诱导的 L6 细胞糖摄取的影响[J]. *长春中医药大学学报*, 2020, 36(3): 458-460.

[17] 罗欢, 邹攀, 魏行云, 等. 核因子- $\kappa$ B 抑制剂联合核因子 E2 相关因子 2 抑制剂对人结肠癌 HCT116 细胞凋亡的作用机制研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2022, 38(2): 123-126.

[18] Zhou L, Song X D, Xu H, *et al.* Exogenous 3-deoxyglucosone-induced carbonyl and oxidative stress causes  $\beta$ -cells dysfunction by impairing gut permeability in rats[J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2018, 83(11): 1358-1368.

[19] Jiang G R, Zhang L R, Ji Q L, *et al.* Accumulation of plasma 3-deoxyglucosone impaired glucose regulation in Chinese seniors: Implication for senile diabetes? [J]. *Diabetes Metab Syndr*, 2012, 6(3): 140-145.

[20] Zhang L R, Zhou L, Song X D, *et al.* Involvement of exogenous 3-deoxyglucosone in  $\beta$ -cell dysfunction induces impaired glucose regulation[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(3): 2976-2984.

[21] 李杰, 杨海梅, 宋秀道, 等. 基于高通量测序研究半夏泻心汤对 3-脱氧葡萄糖醛致糖尿病前期大鼠肠道菌群的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2022, 38(2): 132-136.

[22] 方朝晖, 仝小林, 段俊国, 等. 糖尿病前期中医药循证临床实践指南[J]. *中医杂志*, 2017, 58(3): 268-272.

[23] 杜立娟, 吴倩, 倪青. 半夏泻心汤对糖尿病小鼠糖脂代谢及胰岛素分泌的影响[J]. *北京中医药*, 2021, 40(3): 246-249.

[24] 游丽娟, 伍旭明, 迟宗良. 黄连-黄芩药对配伍机理研究[J]. *中国中医药科技*, 2018, 25(5): 672-674.

[25] 崔祥, 尚尔鑫, 江曙, 等. 基于响应曲面法对黄芩-黄连配伍改善 2 型糖尿病糖脂代谢紊乱的相互作用研究[J]. *药学报*, 2018, 53(4): 630-635.

[26] 徐锋, 陈滕, 汪祖华, 等. 黄芩抗糖尿病作用与机制的近十年研究进展[J]. *环球中医药*, 2022, 15(2): 342-348.

[27] 周鹏, 华芳, 王茜. 黄芩-黄连药对有效成分防治 2 型糖尿病的实验研究进展[J]. *广东化工*, 2019, 46(13): 75-76.

[28] 张博荀. 基于“肠道菌群—黏膜屏障”研究“黄芩—黄连”药对治疗 T2DM 的疗效机制及配伍效应[D]. 成都: 成都中医药大学, 2020.

[29] Ferrannini E, Gastaldelli A, Iozzo P. Pathophysiology of prediabetes[J]. *Med Clin North Am*, 2011, 95: 327-339.

[30] Murovets V O, Bachmanov A A, Zolotarev V A. Impaired glucose metabolism in mice lacking the Tas1r3 taste receptor gene[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0130997.

[31] Smith K, Karimian A E, Lamoia T E, *et al.* T1R2 receptor-mediated glucose sensing in the upper intestine potentiates glucose absorption through activation of local regulatory pathways[J]. *Mol Metab*, 2018, 17(11): 98-111.

[32] Medina A, Nakagawa Y, Ma J, *et al.* Expression of the glucose-sensing receptor T1R3 in pancreatic islet: changes in the expression levels in various nutritional and metabolic states[J]. *Endocr J*, 2014, 61(8): 797-805.

[33] Yang Z M, Wang Y, Chen S Y. *Astragalus* polysaccharide alleviates type 2 diabetic rats by reversing the glucose transporters and sweet taste receptors/GLP-1/GLP-1 receptor signaling pathways in the intestine-pancreatic axis[J]. *J Funct Foods*, 2021, 76: 104310.

[34] Li J Y, Xu J, Hou R F, *et al.* Qing-Hua Granule induces GLP-1 secretion *via* bitter taste receptor in db/db mice[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 89: 10-17.