

连梅颗粒对2型糖尿病GK大鼠的降糖作用

吴光超^{1,2}, 杨涛^{1,2}, 郑绍琴^{1,2}, 苏颖杭^{1,2}, 付琳^{1,2}, 王琪^{1,2}, 邓长生^{1,2},
徐志勇^{1,2}, 张红英^{1,2}, 宋健平^{2*}

(1. 广州中医药大学科技园产业园, 广东广州 510445; 2. 广州中医药大学, 广东广州 510006)

摘要: 目的 研究连梅颗粒对2型糖尿病GK大鼠的降糖作用。方法 40只GK大鼠灌胃高脂乳剂以建立自发性2型糖尿病模型, 选取血糖值 $\geq 11.1\text{ mmol/L}$ 者, 随机分为模型组、格列齐特片组(16.67 mg/kg)及连梅颗粒低、中、高剂量组($2.63, 5.26, 10.52\text{ g/kg}$), 每组8只, 另取8只SD大鼠作为正常组, 灌胃给药, 检测空腹血糖、糖化血红蛋白、糖耐量、血清胰岛素、胰岛素抵抗指数、胰岛素敏感性指数、血清氧化应激指标(SOD、MDA), 并观察胰腺病理组织学变化。结果 与模型组比较, 连梅颗粒各剂量组给药9周后空腹血糖降低($P<0.05$), 2 h糖耐量降低($P<0.05$), SOD活性升高($P<0.05$); 低、高剂量组糖化血红蛋白表达降低($P<0.05$); 中、高剂量组MDA水平降低($P<0.05$); 高剂量组胰岛素抵抗指数降低, 胰岛素敏感性指数升高($P<0.05$); 各剂量组胰岛细胞形态明显好转, 未出现细胞核密集现象。结论 连梅颗粒可明显降低GK大鼠空腹血糖、糖化血红蛋白, 并改善糖耐量减损, 其作用机制可能是通过抗氧化机制来保护胰岛细胞功能, 同时改善胰岛抵抗, 促进胰岛素释放。

关键词: 连梅颗粒; 2型糖尿病; GK大鼠; 降糖作用

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2021)01-0187-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2021.01.038

糖尿病是一种代谢性疾病, 其特征为血糖水平升高, 以2型糖尿病为主要类型, 其引起的并发症是糖尿病患者主要死因^[1], 2016年全球患者达到4.22亿, 而在我国就有1.1亿^[2]。2型糖尿病发病机制复杂, 胰岛素抵抗是其主要因素之一, 故改善胰岛素抵抗的药物研究备受关注。

Goto-Kakizaki(GK)大鼠为自发型2型糖尿病模型, 是由多基因缺陷和环境因素相互作用导致, 是国际公认较为理想模型^[3-4]。连梅颗粒是国医大师伍炳彩教授治疗2型糖尿病的经验方, 组方思路来源于《温病条辨》中的连梅汤, 由乌梅、麦冬、生地、黄连、山药、玄参、黄芪、苍术组成, 对气阴不足、虚火上炎型2型糖尿病有明显功效。本实验研究连梅颗粒对2型糖尿病模型GK大鼠的影响, 并探讨其作用机制, 以期为中医药相关治疗提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级自发性2型糖尿病GK大鼠, 雄性, 体质量 $130\sim 150\text{ g}$, 5~8周龄, 购自上海斯莱克试验动物有限责任公司, 单位生产许可证号SCXK(沪)2012-0002; SPF级SD大鼠, 雄性, 体质量 $130\sim 150\text{ g}$, 5~8周龄, 购自广州中医药大学实验动物中心, 动物生产许可证号SCXK(粤)2013-0034, 均饲养于广州中医药大学科技园产业园动物实验中心, 每笼4只。

1.2 药材 连梅颗粒浸膏(广东新南方青蒿药业有限公司, 批号130916, 1kg/袋, 每1g相当于2.605g生药),

以君药黄连中小檗碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀含量为评价指标, 确定最优水煎煮工艺为8味中药加10倍水量煎煮3次, 每次1h, 滤液在 80°C 下浓缩成相对密度为 $1.25\sim 1.30$ ^[5]。

1.3 试剂与药物 格列齐特片(广东华南药业集团有限公司, 批号131101; 葡萄糖(天津福晨化学试剂厂, 批号20120602。大鼠胰岛素检测试剂盒(天津博瑞康生物科技有限公司, 批号BRK-E80-8174061104); 大鼠糖化血红蛋白检测试剂盒(上海丽臣生物科技有限公司, 批号05/2015); 超氧化物歧化酶(批号20150615)、丙二醛(批号20150613试剂盒(南京建成生物工程研究所))。

1.4 仪器 电子天平(十万分之一, 型号JJ2000, 常熟市双杰测试仪器厂); 恒温水浴箱(型号HH-6, 江苏金坛市荣华仪器制造有限公司); 罗氏血糖仪及试纸(德国罗氏诊断有限公司); 酶标仪(型号ELX800UV, 美国Bio-Tek公司); 组织脱水机(型号TP1020)、石蜡包埋机(型号EG1160)、光学正立显微镜(型号DMLB)、轮转切片机(型号RM2135)(德国Leica公司)。

2 方法

2.1 造模 80只GK大鼠适应性饲养后, 每隔3周检测空腹血糖。12周后, 大鼠灌胃给予 10 mL/kg 高脂乳剂, 每天1次, 连续2周, 以诱导其自发性血糖升高。结果, 有40只 $\text{FBG} \geq 11.1\text{ mmol/L}$, 即符合2型糖尿病模型, 纳入

收稿日期: 2019-07-14

基金项目: 国家自然科学基金(81873218); 广州市科技计划项目(201807010007); 白云区科技计划项目(2016KJ007)

作者简介: 吴光超, 男, 硕士, 执业医师, 从事经方治疗重大疾病研究。E-mail: 401448470@qq.com

*通信作者: 宋健平, 男, 研究员, 博士生导师, 从事经方治疗重大疾病研究。Tel: (020) 87473318, E-mail: songjpz@sina.com

实验^[6]。

2.2 分组与给药 将“2.1”项下符合模标准的40只GK大鼠按随机数字表法分为5组，分别为模型组、格列齐特片组及连梅颗粒高、中、低剂量组，另取SD大鼠作为正常对照组，每组8只。模型组、正常组大鼠给予基础饲料喂养及等量纯净水灌胃，格列齐特片组灌胃给药剂量为16.67 mg/kg，连梅颗粒高、中、低剂量组灌胃给药剂量分别为10.52、5.26、2.63 g/kg，每天1次，连续9周。

2.3 指标检测 ①给药0、3、6、9周，大鼠禁食不禁水12 h后刀片划割尾静脉采微血，检测空腹血糖水平；②给药9周，大鼠禁食不禁水12 h后，取微血进行糖耐量试验(OGTT)，计算曲线下面积(AUC)；③OGTT测定完毕后，大鼠主动脉取血，酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清胰岛素(INS)水平，根据FBG、INS水平计算胰岛素抵抗指数(IRI)、胰岛素敏感指数(ISI)，公式分别为IRI=(FBG×INS)/22.5、ISI=1/(FBG×INS)；④ELISA检测血清糖化血红蛋白水平；⑤化学比色法检测血清超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)水平；⑥采全血后快

速剖取胰腺，固定于10%中性福尔马林溶液中，常规石蜡包埋，HE染色，正置显微成像系统观察胰岛细胞组织形态、体积、排列等情况。

2.4 统计学分析 通过SPSS 25.0软件进行处理，计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示，多组间比较采用单因素方差分析。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 一般症状 正常组大鼠体形、饮食、大小便均正常，较为活跃，毛色光泽；模型组大鼠体形较瘦，反应迟钝，毛色枯槁，有脱毛现象，明显出现多饮多尿症状；与模型组比较，给药组大鼠多饮多尿症状明显改善。

3.2 连梅颗粒对大鼠空腹血糖的影响 给药前，与正常组比较，模型组大鼠空腹血糖升高($P<0.05$)；与模型组比较，各给药组大鼠空腹血糖无明显变化($P>0.05$)。给药6周后，与模型组比较，各给药组(除连梅颗粒低剂量组)大鼠空腹血糖降低($P<0.05$, $P<0.01$)。给药9周后，与模型组比较，各给药组大鼠空腹血糖降低($P<0.05$, $P<0.01$)。见表1。

表1 连梅颗粒对大鼠空腹血糖的影响($\bar{x}\pm s$, n=8)

组别	剂量	造模前	空腹血糖/(mmol·L ⁻¹)			
			0周	3周	6周	9周
正常组	—	5.38±0.32	6.13±1.01	4.69±0.71	5.63±0.37	5.51±0.32
模型组	—	6.59±0.93*	14.42±3.49*	14.22±2.61*	13.82±3.43*	14.78±5.03*
连梅颗粒低剂量组	2.63 g/kg	6.61±0.52*	13.66±2.33*	13.57±2.22	12.04±3.21	11.32±3.42#
连梅颗粒中剂量组	5.26 g/kg	7.37±0.67*	14.02±2.34*	12.14±2.41	10.57±1.71##	10.56±1.22##
连梅颗粒高剂量组	10.52 g/kg	6.84±1.53*	14.13±2.52*	12.13±1.87	10.76±1.88#	8.23±1.56##
格列齐特片组	16.67 mg/kg	7.24±1.02*	13.81±2.47*	11.31±2.82##	10.32±1.67##	8.12±2.67##

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

3.3 连梅颗粒对大鼠糖化血红蛋白水平的影响 给药9周后，与正常组比较，模型组大鼠糖化血红蛋白水平升高($P<0.01$)；与模型组比较，连梅颗粒低、高剂量组大鼠糖化血红蛋白水平降低($P<0.05$, $P<0.01$)，以高剂量组更明显。见表2。

3.4 OGTT试验 给药9周后，与模型组比较，各给药组对糖耐量减损的血糖升高有抑制作用($P<0.05$)，以连梅颗粒中剂量组、格列齐特片组更明显($P<0.01$)；格列齐特片组曲线下面积最小($P<0.01$)。见表3。

表2 连梅颗粒对大鼠糖化血红蛋白水平的影响($\bar{x}\pm s$, n=8)

组别	剂量	HbA1c/(ng·mL ⁻¹)
正常组	—	24.32±5.33
模型组	—	40.56±5.52*
连梅颗粒低剂量组	2.63 g/kg	33.89±3.54#
连梅颗粒中剂量组	5.26 g/kg	35.61±4.03
连梅颗粒高剂量组	10.52 g/kg	30.53±6.31##
格列齐特片组	16.67 mg/kg	34.56±3.21#

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

表3 各组OGTT试验结果($\bar{x}\pm s$, n=8)

组别	剂量	血糖/(mmol·L ⁻¹)				曲线下面积/(mmol·L ⁻¹ ·h)
		0 h	0.5 h	1 h	2 h	
正常组	—	5.52±0.31	6.02±0.41	6.52±0.56	5.41±0.32	12.01±0.78
模型组	—	14.78±5.03*	22.89±1.43*	22.61±1.64*	18.67±2.23*	41.53±2.67*
连梅颗粒低剂量组	2.63 g/kg	11.33±3.41#	21.50±0.78	21.89±1.22	16.78±2.54#	38.31±2.20#
连梅颗粒中剂量组	5.26 g/kg	10.56±1.22##	21.43±0.89#	20.67±1.42#	15.67±1.43##	36.67±1.67##
连梅颗粒高剂量组	10.52 g/kg	8.20±1.61##	21.67±1.02	21.02±0.56#	16.10±1.32##	36.67±1.56##
格列齐特片组	16.67 mg/kg	8.10±2.67##	21.10±1.89#	20.89±0.67#	15.67±1.31##	36.11±1.24##

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

3.5 连梅颗粒对大鼠血清INS水平及IRI、ISI的影响 正常组大鼠血清INS水平高于其他组($P<0.01$)；与模型组

比较，各给药组大鼠血清INS水平无明显变化($P>0.05$)，但连梅颗粒高剂量组、格列齐特片组IRI降低($P<0.05$,

$P<0.01$), ISI 升高 ($P<0.05$)。见表 4。

表 4 连梅颗粒对大鼠血清 INS 水平及 IRI、ISI 的影响 ($\bar{x}\pm s$, n=8)

组别	剂量	INS/(mU·mL ⁻¹)	IRI	ISI
正常组	—	21.04±4.18	5.16±1.18	-4.72±0.26
模型组	—	14.21±1.90*	9.47±3.66*	-5.30±0.42*
连梅颗粒低剂量组	2.63 g/kg	14.60±2.31	7.52±3.17	-5.04±0.45
连梅颗粒中剂量组	5.26 g/kg	15.53±3.58	7.39±2.07	-5.08±0.32
连梅颗粒高剂量组	10.52 g/kg	17.06±4.41	6.27±1.96#	-4.91±0.37#
格列齐特片组	16.67 mg/kg	17.27±2.98	6.07±1.76##	-4.87±0.31##

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

3.6 连梅颗粒对大鼠血清 SOD 活性及 MDA 水平的影响

与正常组比较, 模型组大鼠血清 SOD 活性降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 各给药组大鼠血清 SOD 活性升高

($P<0.01$)。与正常组比较, 模型组 MDA 水平升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 连梅颗粒中、高剂量组及格列齐特片组大鼠血清 MDA 水平降低 ($P<0.01$)。见表 5。

表 5 连梅颗粒对大鼠血清 SOD 活性及 MDA 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, n=8)

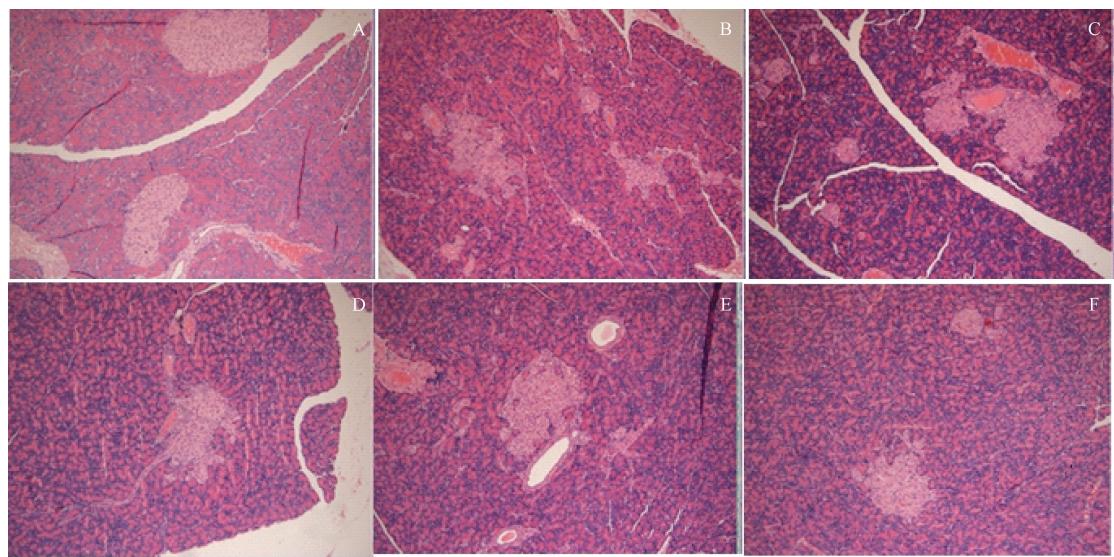
组别	剂量	SOD/(U·mL ⁻¹)	MDA/(nmol·mL ⁻¹)
正常组	—	135.43±2.88	5.63±0.54
模型组	—	123.02±6.99*	8.48±0.52*
连梅颗粒低剂量组	2.63 g/kg	130.50±3.10##	7.98±1.07
连梅颗粒中剂量组	5.26 g/kg	131.37±4.36##	6.92±0.56##
连梅颗粒高剂量组	10.52 g/kg	132.57±2.26##	6.92±0.74##
格列齐特片组	16.67 mg/kg	130.80±7.81##	7.53±0.49##

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

3.7 大鼠胰腺病理组织学

与正常组比较, 模型组大鼠胰岛细胞形态不规则, 与周围组织界限不清晰, 胰岛内出现胰岛细胞核密集现象, 但未见明显空泡性和细胞坏死现象(图 1A~1B); 与模型组比较, 连梅颗粒各剂量组大鼠胰岛形态基本规则, 边界稍清晰, 未见细胞核密集现象, 胰岛

细胞排列较整齐, 可见散在的胰岛细胞呈团状增殖, 而且高剂量组胰岛体积形态较规则, 胰岛细胞数目最多(图 1C~1E); 格列齐特片组大鼠胰岛形态明显好转, 但胰岛细胞数目较少(图 1F)。



注: A~F 分别为正常组、模型组、连梅颗粒低剂量组、连梅颗粒中剂量组、连梅颗粒高剂量组、格列齐特片组。

图 1 各组大鼠胰岛组织病理变化 (HE, ×100)

4 讨论

2 型糖尿病是由胰岛素分泌缺陷、胰岛素抵抗引起血糖升高的代谢性疾病, 其发生大多与遗传、环境因素相关^[7]。GK 大鼠属于自发型的 2 型糖尿病模型, 其发病机制与人类相似, 是 Goto 等^[8]用 Wistar 大鼠近交数代重复繁殖

而来。连梅颗粒是以连梅汤为基础化裁而来, 后者出自《温病条辨》暑温伏暑第 36 条, 云“暑邪深入少阴消渴者, 连梅汤主之”, 而消渴正是 2 型糖尿病主要症状之一, 原方中乌梅合黄连酸苦泄热, 乌梅合麦冬、生地、阿胶酸甘化阴, 用于治疗上有心火亢盛、下有肝肾阴亏之证, 伍炳彩

教授匠心独运，在其基础上去阿胶之温热，加玄参之凉润，合黄芪益气健脾、山药滋养脾阴、苍术运脾化津，全方共奏滋肾泄热、益气健脾生津之功效。

持续高血糖是糖尿病发病主要特点，临幊上常以糖化血红蛋白来反映患者近期血糖控制水平。本实验发现，不同剂量连梅颗粒均能够明显降低大鼠空腹血糖，以高剂量组降低 HbA1c 水平程度最大，并存在一定剂量依赖性。

国内外研究表明，胰岛 β 细胞功能损伤是导致糖耐量受损转变为糖尿病的根本因素，故控制血糖升高、促进胰岛 β 细胞增殖分化是治疗糖尿病的关键^[9-10]。本实验发现，模型组大鼠葡萄糖耐受能力、胰岛素水平、胰岛抵抗、敏感指数明显降低，符合 2 型糖尿病发病特点；给药 9 周后，与模型组比较，各给药组大鼠 INS 无明显变化，但 OGTT 实验结果显示各给药组能明显抑制血糖升高，其中连梅颗粒高剂量组、格列齐特片组还可明显降低胰岛素抵抗，提高胰岛素敏感。格列齐特片是临床常用口服降糖药，为 WHO 推荐的胰岛素促泌剂^[11]，而高剂量连梅颗粒也能促进胰岛素分泌，改善胰岛素抵抗，增加胰岛素敏感。

胰岛素是唯一有效的降糖激素，仅由胰岛 β 细胞合成分泌，文献 [12-13] 报道 β 细胞具有一定自我修复能力，但长期高血糖状态引发氧化应激功能失调会诱发其凋亡。血清 SOD 是一种能消除体内自由基的抗氧化酶，可有效消除活性氧、活性氮，从而减少细胞损伤；MDA 为脂质过氧化物的终产物，是反映体内脂质氧化损伤的敏感指标，本实验发现，与正常组比较，模型组大鼠 SOD 活性明显降低，MDA 水平明显升高，进一步验证氧化应激反应参与 2 型糖尿病形成。高血糖可刺激机体产生更多的自由基，从而诱发多价不饱和脂肪酸生成过氧化脂质，导致胰岛 β 细胞生物膜变性死亡^[14]，而连梅颗粒能提高 GK 大鼠血清 SOD 活性，降低 MDA 水平，从而减轻因氧化应激反应导致胰岛细胞损伤。HE 染色发现，不同剂量连梅颗粒均能抑制胰岛细胞凋亡，促进胰岛细胞增殖分化，对其有一定保护和修复功能。

综上所述，连梅颗粒可降低 2 型糖尿病 GK 大鼠空腹血糖、HbA1c 水平，改善糖耐量减损后血糖升高，并呈一定剂量依赖性，其作用机制可能是通过抗氧化机制来保护胰岛细胞功能，同时改善胰岛抵抗，促进胰岛素释放，但具体分子机制仍需作进一步研究。

参考文献：

[1] Lu J Q, Xia Q, Zhou Q. How to make insulin-producing pancre-

- atic β cells for diabetes treatment [J]. *Sci China Life Sci*, 2017, 60(3): 239-248.
- [2] 李 红, 时立新. 胰高血糖素样肽 1 受体激动剂在 2 型糖尿病中的治疗进展 [J]. 中华糖尿病杂志, 2016, 8(11): 658-661.
- [3] Li L Y, Wang X L, Bai L L, et al. The effects of sleeve gastrectomy on glucose metabolism and glucagon-like peptide 1 in Goto-Kakizaki rats [J]. *J Diabetes Res*, 2018, 2018: 1082561.
- [4] Janssen U, Phillips A O, Floege J. Rodent models of nephropathy associated with type II diabetes [J]. *J Nephrol*, 1999, 12(3): 159-172.
- [5] 肖 飞, 李其凤, 王振华, 等. 正交试验法优选连梅颗粒提取工艺 [J]. 中国处方药, 2016, 14(9): 1-2.
- [6] 耿春贤, 刘菊妍, 邹 琦, 等. 消渴丸中药组分对 GK 大鼠血脂、胰岛素和胰腺影响的实验研究 [J]. 世界中西医结合杂志, 2014, 9(8): 822-825.
- [7] 粟新燕, 邹晨辰, 周思宁, 等. 大连市社区居民 2 型糖尿病发病影响因素病例对照研究 [J]. 中国公共卫生, 2016, 32(11): 1459-1462.
- [8] Goto Y, Kakizaki M, Masaki N. Spontaneous diabetes produced by selective breeding of normal Wistar rats [J]. *Proc Jpn Acad*, 1975, 51(1): 80-85.
- [9] 庾璐婷, 杨孟奇, 王 彤, 等. 重组 Reg3 α 蛋白促进胰岛 β 细胞增殖活性及其机制的研究 [J]. 药物生物技术, 2014, 21(6): 487-493.
- [10] Ferrannini E, Gastaldelli A, Miyazaki Y, et al. β -Cell function in subjects spanning the range from normal glucose tolerance to overt diabetes: a new analysis [J]. *J Clin Endocrinol Metabol*, 2005, 90(1): 493-500.
- [11] 刘效云. 不同胰岛素促泌剂对胰岛 β 细胞分泌胰岛素的影响 [J]. 黑龙江医药, 2017, 30(4): 799-801.
- [12] Meier J J, Butler A E, Saisho Y, et al. β -cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of beta-cell mass in humans [J]. *Diabetes*, 2008, 57(6): 1584-1594.
- [13] Saisho Y, Tanaka K, Abe T, et al. Effect of obesity on declining beta cell function after diagnosis of type 2 diabetes: a possible link suggested by cross-sectional analysis [J]. *Endocrine J*, 2012, 59(3): 187-195.
- [14] 林细炳, 雷鸿耀, 郭 真, 等. 氧化应激与 2 型糖尿病患者并发脑梗死的相关性研究 [J]. 现代医院, 2017, 17(10): 1507-1509.