

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 ≥ 11.1 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 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, 体重 130~150 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, 体重 130~150 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, 1 kg/袋, 每 1 g 相当于 2.605 g 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 1 h, 滤液在 80 ℃ 下浓缩成相对密度为 1.25~1.30^[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 FBG ≥ 11.1 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: songj pz@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 $IRI = (FBG \times INS) / 22.5$ 、 $ISI = 1 / (FBG \times INS)$ ；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	空腹血糖/(mmol·L ⁻¹)				
		造模前	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 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

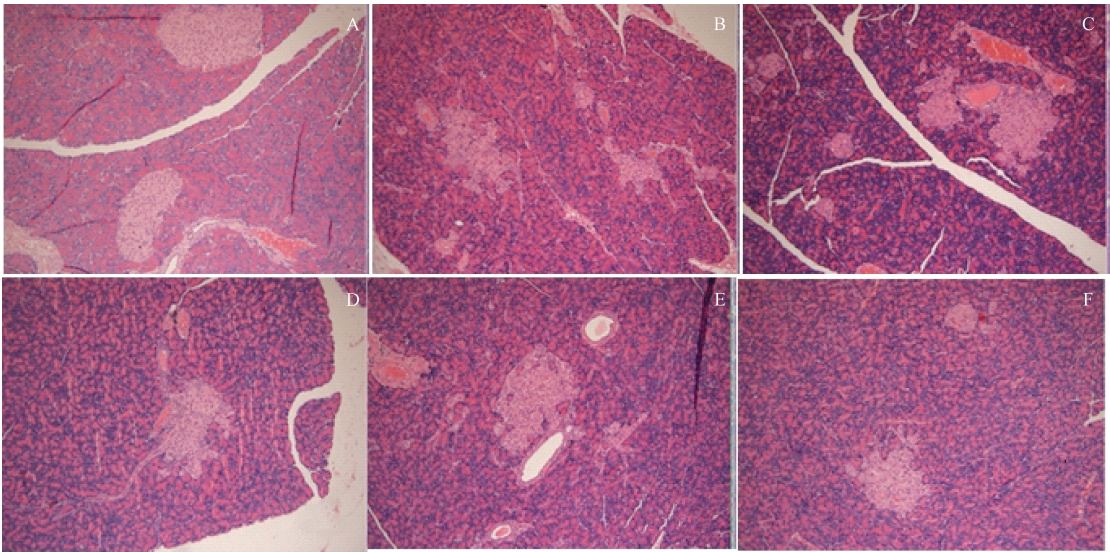
组别	剂量	SOD/(U·mL ⁻¹)	MDA/(nmol·mL ⁻¹)
正常组	—	135.43±2.88	5.63±0.54
模型组	—	123.02±6.99 [*]	8.48±0.52 [*]
连梅颗粒低剂量组	2.63 g/kg	130.50±3.10 ^{##}	7.98±1.07
连梅颗粒中剂量组	5.26 g/kg	131.37±4.36 ^{##}	6.92±0.56 ^{##}
连梅颗粒高剂量组	10.52 g/kg	132.57±2.26 ^{##}	6.92±0.74 ^{##}
格列齐特片组	16.67 mg/kg	130.80±7.81 ^{##}	7.53±0.49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

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 大鼠近交代数重复繁殖

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，临床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] 栗新燕, 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.