

# 十一味益肾降糖方对 2 型糖尿病模型大鼠血糖及肾组织 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路表达的影响

杨娜, 刘丰林

开封市中医院, 河南 开封 475001

**[摘要]** 目的: 探讨十一味益肾降糖方对 2 型糖尿病 (NIDDM) 大鼠的降血糖作用以及对肾脏 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路表达的影响。方法: 采用高糖高脂饲养联合注射链脲佐菌素 (STZ) 的方法制备 2 型糖尿病模型大鼠。60 只 SD 大鼠随机均分为 6 组, 即正常对照组、模型组、达格列净组和十一味益肾降糖方低、中、高剂量组, 每组 10 只。达格列净组每天灌胃达格列净片 1 mg/(kg·d), 十一味益肾降糖方低、中、高剂量组分别灌胃十一味益肾降糖方水煎液 2、4、16 g/(kg·d), 正常对照组和模型组灌胃等量的生理盐水, 每天给药 1 次, 连续给药 7 周。测定大鼠空腹血糖 (FBG) 水平、糖化血红蛋白 (HbA1c) 水平和空腹胰岛素 (FINS) 水平, 并计算胰岛素抵抗指数 (IRI)。采用 Western blot 法检测 Wnt4、 $\beta$ -catenin 蛋白的表达。结果: 与正常对照组比较, 模型组大鼠 FBG、HbA1c、FINS 水平升高, IRI 升高, Wnt4、 $\beta$ -catenin 蛋白的表达量均明显增多, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。给药后, 与模型组比较, 达格列净组、十一味益肾降糖方中、高剂量组大鼠 FBG、HbA1c、FINS 水平显著降低, IRI 显著降低, Wnt4、 $\beta$ -catenin 蛋白的表达量均明显减少, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与给药前比较, 达格列净组、十一味益肾降糖方高剂量组大鼠 FBG 水平显著降低, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与给药前比较, 达格列净组、十一味益肾降糖方中、高剂量组大鼠 HbA1c、FINS 水平显著降低, IRI 显著降低, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论: 十一味益肾降糖方可有效控制 2 型糖尿病大鼠的空腹血糖水平, 调节糖代谢, 能够抑制糖尿病大鼠肾脏 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的高表达。

**[关键词]** 十一味益肾降糖方; 2 型糖尿病; 血糖; Wnt/ $\beta$ -catenin; 动物实验; 大鼠

**[中图分类号]** R587.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0256-7415 (2018) 03-0014-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2018.03.004

## Effects of Shiyiwei Yishen Jiangtang Prescription on Expression of Blood Glucose and Wnt/ $\beta$ -catenin Signal Pathway in Kidney Tissue of Model Rats with Type 2 Diabetes

YANG Na, LIU Fenglin

**Abstract:** **Objective:** To discuss the hypoglycemic effect of Shiyiwei Yishen Jiangtang prescription on rats with type 2 diabetes (NIDDM) and its effect on expression of Wnt/ $\beta$ -catenin signal pathway in kidney. **Methods:** High-glucose and high-fat diet combined with injection of streptozotocin (STZ) was applied to establish NIDDM model rats. Divided 60 SD rats into 6 groups randomly, namely the normal control group, model group, dapagliflozin group, Shiyiwei Yishen Jiangtang prescription of low, middle and high dose groups, 10 rats in each group. Dapagliflozin group was given dapagliflozin tablets 1 mg/(kg·d) by gavage, Shiyiwei Yishen Jiangtang prescription of low, middle and high dose groups were given Shiyiwei Yishen Jiangtang prescription of 2, 4, 16 g/(kg·d) respectively by gavage, and the normal control group and model group were given equivalent normal saline by gavage, once a day, for 7 weeks successively. Measured the levels of fasting blood glucose (FBG), glycosylated hemoglobin (HbA1c) and fasting insulin (FINS) of rats, and calculated insulin resistance index (IRI). Western blot was induced to detect the expression of Wnt4 and  $\beta$ -catenin protein. **Results:** Comparing with those in the normal control group, the levels of FBG, HbA1c and FINS were increased, IRI was increased and the expression of Wnt4 and  $\beta$ -catenin protein was both significantly increased in the model group, differences being significant ( $P < 0.05$ ). After administration, comparing with those in the model group, the levels of FBG, HbA1c and FINS were distinctively decreased, IRI was significantly reduced and the expression of Wnt4 and  $\beta$ -catenin protein was both evidently decreased in dapagliflozin

**[收稿日期]** 2017-09-01

**[作者简介]** 杨娜 (1982-), 女, 主管药师, 研究方向: 药物制剂。

group and Shiyiwei Yishen Jiangtang prescription of middle and high dose groups, differences being significant ( $P < 0.05$ ). Comparing with those before administration, the levels of FBG were distinctively decreased in dapagliflozin group and high-dose Shiyiwei Yishen Jiangtang prescription group, differences being significant ( $P < 0.05$ ). Comparing with those before administration, the levels of HbA1c and FINS were distinctively decreased, IRI was significantly reduced in dapagliflozin group and Shiyiwei Yishen Jiangtang prescription of middle and high dose groups, differences being significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Shiyiwei Yishen Jiangtang prescription can effectively control the levels of FBG in rats with type 2 diabetes, adjust glucose metabolism, and inhibit the high expression of Wnt/ $\beta$ -catenin signal pathway in the kidney of NIDDM rats.

**Keywords:** Shiyiwei Yishen Jiangtang prescription; Type 2 diabetes; Blood glucose; Wnt/ $\beta$ -catenin; Animal experiment; Rats

糖尿病的病因多种多样, 饮食不节、肾虚、情志失调均可导致发病, 其病机核心以燥热为害, 燥热耗损津液, 水精代谢失调, 气血循环阻滞, 痰浊内生, 体液暗耗而成消渴, 基本病机是阴虚燥热<sup>[1]</sup>。中医药防治糖尿病有着悠久的历史, 经过几千年的实践, 积累了大量宝贵的经验, 并逐渐形成了独特的学术体系<sup>[2]</sup>。在前人治疗糖尿病的基础上, 依据辨证论治的原则, 总结开发出十一味益肾降糖方, 该制剂由黄芪、生地黄、白术、山茱萸、益母草、山药等中药组成, 具有益气健脾、补肾降糖、利水消肿之功效, 是开封市中医院的院内制剂, 获得河南省食品药品监督管理局制剂批文(豫药制字 Z04020164), 治疗糖尿病、肾病具有较好疗效<sup>[3]</sup>。本研究探讨十一味益肾降糖方对 2 型糖尿病(NIDDM)大鼠的降血糖作用以及对肾脏 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路表达的影响, 现将结果报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** SD 大鼠 60 只, 雌雄各半, 体质量 ( $200 \pm 20$ )g, 购自北京维通利华动物实验中心, 许可证号: SCXK(京)2014-0016。在河南大学实验动物中心温度为 ( $23 \pm 2$ ) $^{\circ}\text{C}$ 、湿度为 ( $50 \pm 10$ )%、12 h 光照交替的环境中饲养, 动物实验通过动物伦理委员会的审批。

**1.2 药品与试剂** 十一味益肾降糖方由本院药剂科自制, 浓缩成 1.5 g 生药 /mL 水煎剂的浓度。达格列净片(AstraZeneca 公司), 链脲佐菌素(STZ, 美国 Sigma 公司产品, 批号: B64927); 糖化血红蛋白(HbA1c)测试盒(美国 Roche 公司); 胰岛素(FINS)酶联免疫(ELISA)法测试盒(瑞典 Mercodia 公司); Wnt/ $\beta$ -catenin 抗体(美国 Abcam 公司); 柠檬酸、柠檬酸三钠均购自天津化学试剂有限公司。

**1.3 实验仪器** TBA-40FR(ACCUTE)全自动生化分析仪(日本东芝公司); Microcl17 微量离心机(美国 Thermo 公司); Heraeus Biofuge Stratos 冷冻离心机(德国 Heraeus 公司); Power Wave 340 酶联免疫检测仪(美国 Bio-TeR 公司); 雅培安妥超越型血糖仪(美国 Abbott 公司)及安妥超越血糖试纸。

**1.4 模型的建立、分组及干预** 60 只 SD 大鼠随机均分为 6 组, 即正常对照组、模型组、达格列净组与十一味益肾降糖方低、中、高剂量组, 每组 10 只。大鼠适应性喂养 1 周后, 除正常对照组给予普通颗粒饲料外, 其余 5 组大鼠给予高糖高脂饲料, 喂养 4 周后, 禁食 12 h 后腹腔注射 STZ 50 mg/kg, 1 周后空腹血糖(FBG)  $\geq 11.1$  mmol/L 为模型复制成功<sup>[4]</sup>。达格列净组每天灌胃达格列净片 1 mg/(kg·d), 十一味益肾降糖方低、中、高剂量组分别灌胃十一味益肾降糖方水煎液 2、4、16 g/(kg·d), 正常对照组和模型组灌胃等量的生理盐水, 每天给药 1 次, 连续给药 7 周。给药期间正常对照组大鼠仍以普通颗粒饲料喂养, 其余大鼠继续以高糖高脂饲料喂养。

**1.5 指标的测定** 分别于给药前及给药 7 周后, 各组大鼠禁食 12 h, 取全血,  $4^{\circ}\text{C}$  下 3 000 r/min 离心 10 min, 分离得血清和血浆, 分别测定大鼠 FBG 水平、HbA1c 水平和 FINS 水平, 采用以下公式计算胰岛素抵抗指数(IRI):  $\text{IRI} = \text{FBG} \times \text{FINS} / 22.5$ 。采用血糖仪和血糖试纸测定大鼠 FBG 水平; 采用全自动生化分析仪, 按照 HbA1c 测试盒说明书检测大鼠 HbA1c 水平; 采用酶联免疫检测仪, 按照 FINS 酶联免疫(ELISA)法测试盒说明书检测大鼠 FINS 水平。

**1.6 Western blot 法测定肾组织蛋白表达** 取肾皮层组织以 RIPA 裂解液提取蛋白, 再以 Lowry 法测定蛋白浓度。上述蛋白进行 10% 的 SDS-PAGE 电泳分离

后,在 200 mA 条件下转移到 PVDF 膜上(2 h),以 5%的脱脂奶粉封闭液封闭 1 h 后,加入 TBST 稀释的一抗(Wnt4 稀释比例为 1:1000;  $\beta$ -catenin 稀释比例为 1:1000; 内参  $\beta$ -actin 稀释比例为 1:5000),4℃ 摇床孵育过夜。再以荧光二抗(1:5000)37℃ 摇床避光孵育 1 h 后洗膜,用红外激光扫描仪拍照并分析荧光条带的灰度值,以目的条带与  $\beta$ -actin 灰度值的比值来表示蛋白表达量。显色后分析胶片中的 Western blot 荧光条带的灰度值<sup>[5]</sup>。

1.7 统计学方法 统计分析采用 SPSS17.0 统计软件,计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验,组内前后比较采用配对 *t* 检验。

## 2 结果

2.1 各组大鼠 FBG 水平比较 见表 1。与正常对照组比较,模型组大鼠 FBG 水平显著升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。给药后,与模型组比较,达格列净组、十一味益肾降糖方中、高剂量组大鼠 FBG 水平显著降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。与给药前比较,达格列净组、十一味益肾降糖方高剂量组大鼠 FBG 水平显著降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 1 各组大鼠 FBG 水平比较( $\bar{x} \pm s$ ) mmol/L

组别	n	FBG	
		给药前	给药后
正常对照组	10	5.14±0.32	5.12±8.29
模型组	10	19.75±1.89	20.16±2.12 <sup>①</sup>
达格列净组	10	19.81±1.92	12.89±1.85 <sup>②③</sup>
十一味益肾降糖方低剂量组	10	19.76±1.91	18.38±2.13
十一味益肾降糖方中剂量组	10	19.88±1.90	17.93±1.92 <sup>②</sup>
十一味益肾降糖方高剂量组	10	19.92±1.80	16.38±1.89 <sup>②③</sup>

与正常对照组比较,① $P < 0.05$ ;与模型组比较,② $P < 0.05$ ;与给药前比较,③ $P < 0.05$

2.2 各组大鼠 HbA1c 水平比较 见表 2。与正常对照组比较,模型组大鼠 HbA1c 水平升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。给药后,与模型组比较,达格列净组、十一味益肾降糖方中、高剂量组大鼠 HbA1c 水平显著降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。与给药前比较,达格列净组、十一味益肾降糖方中、高剂量组大鼠 HbA1c 水平显著降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

2.3 各组大鼠 FINS、IRI 水平比较 见表 3。与正常对照组比较,模型组大鼠 FINS 水平升高,IRI 升高,

差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。给药后,与模型组比较,达格列净组、十一味益肾降糖方中、高剂量组大鼠 FINS 水平降低,IRI 显著降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。与给药前比较,达格列净组、十一味益肾降糖方中、高剂量组大鼠 FINS 水平降低,IRI 显著降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 2 各组大鼠 HbA1c 水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	HbA1c	
		给药前	给药后
正常对照组	10	3.78±0.42	3.84±0.40
模型组	10	8.53±0.74	8.66±0.37 <sup>①</sup>
达格列净组	10	8.57±0.80	6.16±0.58 <sup>②③</sup>
十一味益肾降糖方低剂量组	10	8.55±0.89	8.23±0.39
十一味益肾降糖方中剂量组	10	8.62±0.84	7.67±0.40 <sup>②③</sup>
十一味益肾降糖方高剂量组	10	8.58±0.79	7.12±0.36 <sup>②③</sup>

与正常对照组比较,① $P < 0.05$ ;与模型组比较,② $P < 0.05$ ;与给药前比较,③ $P < 0.05$

表 3 各组大鼠 FINS、IRI 水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	FINS(U/mL)		IRI	
		给药前	给药后	给药前	给药后
正常对照组	10	2.37±0.18	2.35±0.22	0.56±0.06	0.55±0.07
模型组	10	8.14±0.59	8.18±0.41 <sup>①</sup>	8.78±0.60	8.84±0.68 <sup>①</sup>
达格列净组	10	8.18±0.43	6.55±0.34 <sup>②③</sup>	8.72±0.65	6.64±0.49 <sup>②③</sup>
十一味益肾降糖方低剂量组	10	8.17±0.40	8.04±0.34	8.73±0.58	8.35±0.62
十一味益肾降糖方中剂量组	10	8.16±0.37	7.37±0.43 <sup>②③</sup>	8.74±0.63	7.78±0.55 <sup>②③</sup>
十一味益肾降糖方高剂量组	10	8.21±0.39	6.81±0.40 <sup>②③</sup>	8.74±0.63	7.16±0.44 <sup>②③</sup>

与正常对照组比较,① $P < 0.05$ ;与模型组比较,② $P < 0.05$ ;与给药前比较,③ $P < 0.05$

2.4 各组大鼠肾脏 Wnt4、 $\beta$ -catenin 蛋白表达比较 见表 4。与正常对照组比较,模型组大鼠 Wnt4、 $\beta$ -catenin 蛋白的表达量均明显增多,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。与模型组比较,达格列净组、十一味益肾降糖方中、高剂量组大鼠 Wnt4、 $\beta$ -catenin 蛋白的表达量均明显减少,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

糖尿病是临床常见的内分泌代谢疾病,发病率仅次于肿瘤和心血管疾病,其病因和发病机制异常复杂,并发症多且严重,死亡率高。糖尿病是当前威胁全球人类健康的最重要的非传染性疾病之一,根据国际糖尿病联盟统计,2011 年全球糖尿病患者人数已达 3.7 亿,其中 80% 在发展中国家,估计到 2030

表4 各组大鼠肾脏 Wnt4、 $\beta$ -catenin 蛋白表达比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	Wnt4	$\beta$ -catenin
正常对照组	10	0.055 $\pm$ 0.011	0.052 $\pm$ 0.020
模型组	10	0.156 $\pm$ 0.054 <sup>①</sup>	0.234 $\pm$ 0.089 <sup>①</sup>
达格列净组	10	0.068 $\pm$ 0.022 <sup>②</sup>	0.075 $\pm$ 0.027 <sup>②</sup>
十一味益肾降糖方低剂量组	10	0.139 $\pm$ 0.032	0.207 $\pm$ 0.046
十一味益肾降糖方中剂量组	10	0.105 $\pm$ 0.028 <sup>②</sup>	0.149 $\pm$ 0.039 <sup>②</sup>
十一味益肾降糖方高剂量组	10	0.087 $\pm$ 0.024 <sup>②</sup>	0.112 $\pm$ 0.036 <sup>②</sup>

与正常对照组比较, ① $P < 0.05$ ; 与模型组比较, ② $P < 0.05$

年全球将有近 5.5 亿糖尿病患者<sup>[6]</sup>。

中医药是抗糖尿病药物开发的重要来源。已经有大量实验研究了中药或植物药及其有效成分对糖尿病及相关并发症的治疗作用<sup>[7]</sup>。中医理论认为人的机体与环境密切相关, 阴阳处于相对平衡状态, 但饮食不节、肾虚和情志失调等因素可导致五脏虚弱、积热伤津、郁火伤阴和肾精亏损等, 产生中医消渴的症状。中医药在治疗糖尿病方面具有药效温和, 作用持久, 缓解并发症的发生和发展, 不良反应少, 改善糖耐量等优点, 作用机理表现出多靶点、多向性、多层次特点, 具有不可比拟的优势, 因此, 从传统中医药中研究开发新型抗糖尿病中药制剂具有重要的意义和广阔的前景<sup>[7]</sup>。

糖尿病肾病发生时, 伴随足细胞 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路的激活、Wnt 信号活化及  $\beta$ -catenin 核易位表达的增加, 该机制参与了肾细胞损伤的进展。在该通路中 Wnt4 蛋白对肾小管的形成及肾脏纤维化导致的肾小球硬化及损伤具有重要意义。 $\beta$ -catenin 作为经典 Wnt 信号通路的核心蛋白, 参与细胞代谢的增殖、分化和凋亡过程, 具有介导细胞间黏附和参与基因表达的功能<sup>[8]</sup>。

十一味益肾降糖方是依据辨证论治的原则, 通过长期实验筛选总结开发出的中药复方, 该制剂由黄芪、生地黄、白术、山茱萸、益母草、山药等中药组成, 具有益气健脾、补肾降糖、利水消肿之功效, 方中黄芪、山药补中益气; 生地黄、山茱萸止咳生津养阴。诸味药合用, 可发挥健脾益气、清热养阴之功效。本研究发现, 十一味益肾降糖方中、高剂量组可

使 2 型糖尿病模型大鼠 FBG 和 HbA1c 水平与 FINS、IRI 降低 ( $P < 0.05$ ), 并具有一定的剂量依赖性。Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路介导了糖尿病肾损伤动物模型的肾脏纤维化, 作为细胞内重要的信号通路来调控系膜细胞功能。实验结果显示, 模型组大鼠肾脏 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路的表达明显升高, 由此验证该通路的激活参与了 2 型糖尿病模型大鼠肾损伤的病程进展。十一味益肾降糖方可在一定程度上抑制大鼠肾脏 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路的表达, 对 2 型糖尿病所诱发的肾脏损伤具有一定的保护作用。

综上所述, 十一味益肾降糖方具有降低 2 型糖尿病模型大鼠血糖的作用, 并通过改善胰岛素抵抗、增加胰岛素敏感性产生一定的保护作用, 具有一定的开发前景。

#### [参考文献]

- [1] 周羽, 王镁. 糖尿病中医病机研究进展[J]. 光明中医, 2014, 29(7): 1575-1576.
- [2] 仝小林, 刘铜华, 陈良. 中医药防治糖尿病及其并发症研究 20 年概况及展望[C]// 第九次全国中医糖尿病学术大会论文汇编, [出版地不详, 出版人不详], 2006.
- [3] 刘丰林, 杨娜, 胡素英. 十一味益肾降糖片质量标准研究[J]. 中医研究, 2011, 24(11): 24-26.
- [4] 陈蓉, 宓文佳, 苏洁, 等. 大花紫薇提取物对 STZ 致 II 型糖尿病小鼠的降糖作用研究[J]. 浙江中医药大学学报, 2014, 38(5): 517-520.
- [5] Huang Z, Feng Y. Exosomes derived from hypoxic colorectal cancer cells promote angiogenesis through wnt4-induced  $\beta$ -catenin signaling in endothelial cells[J]. Oncol Res, 2017, 25(5): 651-661.
- [6] 中华医学会糖尿病分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2013 年版)[J]. 中国糖尿病杂志, 2014, 22(8): 2-42.
- [7] 仝小林, 刘文科, 甄仲, 等. 糖尿病中医研究的历史、现状及展望[J]. 中国新药杂志, 2011, 20(21): 2044-2047.
- [8] 白璐, 霍贝贝, 郭倩, 等. Wnt/ $\beta$ -catenin 通路在糖尿病肾病大鼠的表达及化痰通络中药的干预作用[J]. 中草药, 2017, 48(5): 946-950.

(责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)