

# 金芪降糖片对糖尿病心血管并发症的治疗作用

赵有红<sup>1</sup>, 杨洋<sup>2</sup>, 谢治深<sup>2</sup>, 徐晓军<sup>2</sup>, 刘莉<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学第一附属医院,南京 210029; <sup>2</sup>中国药科大学天然药物国家重点实验室,南京 210009)

**摘要** 探讨金芪降糖片对糖尿病心血管并发症的治疗作用。将健康果蝇随机分为3组,分别给予正常饮食、10%高脂饮食、1%金芪降糖片+10%高脂饮食,2周后用试剂盒测量果蝇海藻糖、三酰甘油的浓度,高速电子倍增摄像机拍摄果蝇心管搏动视频测量心功能,定量PCR测量果蝇心管4ebp、pepck RNA表达量,Western blot测定磷酸化4EBP蛋白表达量。结果显示,高脂饮食可引起果蝇海藻糖、三酰甘油升高,并导致心功能损伤,而金芪降糖片治疗后可以明显降低糖脂水平及恢复心功能;同时与高脂组相比,受试药可提高心血管4ebpRNA表达量及降低pepck RNA表达量,降低果蝇磷酸化4EBP蛋白表达量。结果表明,受试药具有较好的降糖降脂及恢复心功能作用,且可能通过mTOR/4EBP信号通路发挥作用。

**关键词** 金芪降糖片;果蝇;糖尿病心;血管并发症;糖脂代谢;mTOR/4EBP

**中图分类号** R965    **文献标志码** A    **文章编号** 1000-5048(2016)03-0348-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20160317

**引用本文** 赵有红,杨洋,谢治深,等. 金芪降糖片对糖尿病心血管并发症的治疗作用[J]. 中国药科大学学报,2016,47(3):348–352.  
**Cite this article as:** ZHAO Youhong, YANG Yang, XIE Zhishen, et al. Protective effects of Jinqi Jiangtang tablets on diabetic complications of cardiovascular diseases in *Drosophila* [J]. *J China Pharm Univ*, 2016, 47(3):348–352.

## Protective effects of *Jinqi Jiangtang* tablets on diabetic complications of cardiovascular diseases in *Drosophila*

ZHAO Youhong<sup>1</sup>, YANG Yang<sup>2</sup>, XIE Zhishen<sup>2</sup>, XU Xiaojun<sup>2</sup>, LIU Li<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029;

<sup>2</sup>State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

**Abstract** This study was to investigate the protective effects of *Jinqi Jiangtang* tablets on diabetic complications of cardiovascular disease in *Drosophila*. The effects of *Jinqi Jiangtang* tablets on hypolipidemia and hypoglycemia by high fat diet(HFD) induced model organism *Drosophila* with the content of triglyceride and trehalose in *Drosophila* as indexes, were investigated. And the *Drosophila* heart function was detected by high speed EM-CCD; cell signaling pathways were detected by Western blot and RT-PCR. The results showed that high fat diet could induce the appearance of hyperglycemia and hyperlipidemia on *Drosophila* model. *Jinqi Jiangtang* tablets could significantly reduce triglyceride and trehalose and protect heart function of *Drosophila* induced by high fat diet. *Jinqi Jiangtang* tablets could also increase the expression of 4ebp mRNA, while decreasing p-4EBP protein and pepck mRNA expression. This study demonstrated that *Jinqi Jiangtang* tablets have a protective effect on HFD-induced dyslipidemic-diabetic and cardiac dysfunction, which may be related to mTOR/4EBP pathway.

**Key words** *Jinqi Jiangtang* tablets; *Drosophila*; diabetic complications of cardiovascular diseases; glucose and lipid metabolism; mTOR/4EBP

糖尿病是严重威胁人类生命及生活质量的一类疾病,其中2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)患者约占90%,而2型糖尿病最主要致死原

因为心血管并发症。金芪降糖片是以金银花、黄芪为主要成分的一种中药降血糖复方制剂,该方具有良好的降血糖、降血脂作用,在临床应用中收到较

好的效果<sup>[1]</sup>。然而目前鲜有金芪降糖片对糖尿病心血管并发症治疗的研究报道。本实验通过高脂诱导建立动物模型,观察金芪降糖片对高脂诱导的果蝇代谢紊乱的调节及心血管并发症的治疗作用,为临床用药提供实验依据。

## 1 材 料

### 1.1 药品与试剂

金芪降糖片(天津中新药业集团股份有限公

司隆顺榕制药厂;批号 1108681);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(美国 Thermo 公司);磷酸化 4EBP1 (Thr37/46)免抗(美国 CST 公司);SYBR 荧光定量试剂盒(瑞士 Roche 公司);逆转录聚合酶链反应试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司);FlyNap(美国 Carolina 生物公司);Trizol(美国 Invitrogen 公司);脂肪酶、海藻糖酶、葡萄糖检测试剂盒(美国 Sigma 公司);三酰甘油检测试剂盒(上海科华生物工程股份有限公司)。引物序列见表 1。

**Table 1** Real-time PCR primers

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>pepck</i>	5'-CCATCTGCTGCCAACATC-3'	5'-ACTTGGCTCCGCCTAAAGGT-3'
<i>4ebp</i>	5'-CACCACTCCTGGAGGCACCAA-3'	5'-GAAGGGAGTACCGCGGAGTTC-3'
<i>rp49</i>	5'-GCTAAGCTGCGACAAA-3'	5'-TCCGGTGGCGACCATCTG-3'

### 1.2 仪 器

酶标仪(美国 BioTek 基因有限公司);BX53F 相差显微镜(日本 Olympus 公司);电子倍增摄像机 EM-CCD(英国 Andor 公司);电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);PTC-200 PCR 仪(美国 Peltier Thermal Cycler 公司)。

### 1.3 动 物

野生型健康果蝇(品系:Oregon-R strain, Stock 2376)由 Bloomington Drosophila Stock Center 提供;饲养条件:孵箱设置温度 37 ℃,一级光照 12 h、无光照 12 h 模拟昼夜交替,湿度 60%。

## 2 方 法

### 2.1 果蝇的分组和给药

同批繁殖野生型果蝇孵出后 8 h 内挑选出并随机平均分成 3 组,第 1 组作为正常对照组给予正常饮食(normal chow diet, NCD 组);第 2 组给予 10% 高脂饮食(high fat diet, HFD 组);第 3 组给予 1% 金芪降糖片 + 10% 高脂饮食(HFD + 1% JQ 组)。所有食物均 3 d 更换一次,饲养 2 周。

正常食物配方:使用布卢明顿标准化玉米粉食物<sup>[2]</sup>;10% 高脂食物配方:在正常食物基础上加入 0.1 g/mL 猪油固体,充分混匀;1% 金芪降糖片 + 10% 高脂饮食:10% 高脂食物中加入质量百分比为 1% 的金芪降糖片粉末并充分混匀。

### 2.2 果蝇三酰甘油(TG)及海藻糖含量测定<sup>[3]</sup>

每组随机 6 只果蝇,加入 PBST 500 μL,高速匀浆(30 s × 3)后离心,取上清液。取上清液测试

蛋白浓度,70 ℃ 变性 5 min 后用试剂盒测试上清液中葡萄糖的含量,加入海藻糖酶,37 ℃ 孵育 1 h 后将海藻糖分解为葡萄糖后再次测试葡萄糖含量,再次测得葡萄糖浓度减去初始葡萄糖浓度即表示海藻糖含量;上清液加入脂肪酶 37 ℃ 孵育过夜,用试剂盒测试三酰甘油含量。

### 2.3 蛋白免疫印迹分析检测 p-4EBP 蛋白表达

随机每组 5 只果蝇,用蛋白裂解液提取果蝇组织蛋白,5% SDS-PAGE 浓缩胶 + 12% SDS-PAGE 分离胶电泳,转移蛋白至硝酸纤维膜上,以 5% 脱脂奶封闭,加入磷酸化 4EBP 抗体(1:1 000)4 ℃ 孵育过夜。PBST 洗膜,加入相应二抗(1:1 000)孵育 2 h, PBST 洗膜,化学发光法显影,以 Tubulin 作为内参,进行半定量分析。

### 2.4 果蝇心功能分析

2.4.1 果蝇成体心脏解剖 根据文献[4]配方提前配制果蝇人造缓冲液,使用前室温下充氧 20 ~ 30 min。FlyNap 麻醉果蝇 2 ~ 5 min, 将麻醉的果蝇背部朝下,黏贴在有一层凡士林的培养皿中,翅膀分开同时也固定在培养皿中。微型手术剪从果蝇腿下穿过,斜着剪去除头、脚和腹神经索。然后加入人造缓冲液,淹没果蝇。去除腹体节 A7-8,随后沿侧面将腹部的表皮剪开。镊子去除腹部表皮以及与其相连的内脏。用拉好的毛细管与真空泵相连吸取去除脂肪组织。心脏被暴露出来,并且跳动,重新换上新鲜的人造缓冲液。

2.4.2 果蝇活体心脏拍摄和数据分析<sup>[4]</sup> 高速 EM-CCD 摄像机拍摄连续 1 500 张图片生成果蝇

心跳视频, 使用 Image-J 软件分析果蝇心跳产生 M-mode 图, 计算心动周期(heart period, HP)、收缩间期(systolic interval, SI)和舒张间期(diastolic interval, DI)时长, 心管侧向舒张直径(diastolic diameter, DD)、收缩直径(systolic diameter, SD)及收缩幅度百分比(fractional shortening, FS), 以及心律不齐指数(arrhythmia index, AI)。

## 2.5 定量 PCR 检测果蝇心管 4ebp、pepck RNA 表达量

随机每组选取 20 只果蝇, 解剖后取心管组织, 样品总 RNA 提取采用 Trizol 提取方法。通过  $A_{260}/A_{280}$  测定 RNA 浓度和纯度, 取总 RNA 1  $\mu\text{g}$  逆转录成 cDNA。采用 SYBR 荧光法进行检测。PCR 结果用内参基因 rp49 进行校准, 计算  $\Delta\Delta\text{CT}$ , 对照组的基因表达设定为 1, 其他组的基因表达进行相应的转换。

## 2.6 统计学方法

所有数据由 GraphPad Prism 5.0 软件计算完成。多组均数间的比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)Turkey 法进行比较。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 3 结 果

### 3.1 对高脂饮食果蝇三酰甘油及海藻糖含量的影响

10% 高脂饮食 2 周后的 HFD 组果蝇平均海藻糖和三酰甘油含量较正常饮食的果蝇 NCD 组均明显升高( $P < 0.05$ ;  $P < 0.001$ ); 1% 金芪降糖片给药治疗 2 周后 HFD+1% JQ 组海藻糖较 HFD 组有所下降( $P < 0.05$ ), 三酰甘油含量明显下降( $P < 0.01$ ), 几乎达到正常水平, 见图 1。

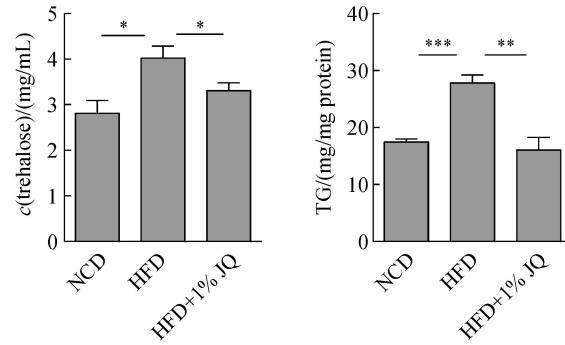
### 3.2 对高脂饮食果蝇磷酸化 4EBP 蛋白表达量的影响

10% 高脂饮食 2 周后 HFD 组果蝇磷酸化 4EBP 蛋白表达量较正常饮食组明显升高, 而金芪降糖片给药治疗后磷酸化 4EBP 蛋白表达量明显下降, 见图 2。

### 3.3 对高脂饮食果蝇心功能的影响

10% 高脂饮食 2 周后果蝇收缩直径与舒张直径均变长( $P < 0.01$ ;  $P < 0.01$ ), 收缩幅度百分比减小( $P < 0.05$ ), 收缩间期、舒张间期、心动周期延长( $P < 0.05$ ;  $P < 0.05$ ;  $P < 0.05$ ), 心律不齐指数变大

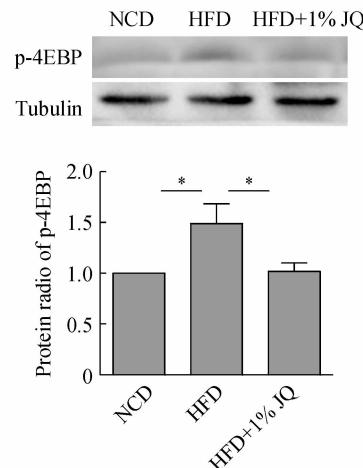
( $P < 0.05$ ); 1% 金芪降糖片给药治疗 2 周后收缩直径、舒张直径减小( $P < 0.05$ ;  $P < 0.001$ ), 收缩幅度百分比增加( $P < 0.001$ ), 收缩间期、舒张间期、心动周期缩短( $P < 0.01$ ;  $P < 0.05$ ;  $P < 0.01$ ), 心律不齐指数变小( $P < 0.05$ ), 见图 3。



**Figure 1** Jinqi Jiangtang tablets can significantly reduce trehalose and triglyceride (TG) of *Drosophila* which induced by high fat diet ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$

NCD: Control group with normal chow diet; HFD: High fat diet group with 10% lard; HFD+1% JQ: Jinqi Jiangtang tablets group with 10% lard and 1% Jinqi Jiangtang tablets



**Figure 2** Effects of HFD and Jinqi Jiangtang on expression of 4EBP determined by Western blot ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

\*  $P < 0.05$

### 3.4 对高脂饮食果蝇心管 4ebp、pepck RNA 表达量的影响

10% 高脂饮食 2 周后果蝇心管 4ebp RNA 含量明显下降( $P < 0.001$ ), 金芪降糖片给药治疗后 4ebp RNA 含量与高脂组比明显升高( $P < 0.001$ ); 而高脂组较正常饮食组 pepck RNA 表达量明显上升( $P < 0.05$ ), 给药后 pepck RNA 表达量明显下降( $P < 0.01$ ), 见图 4。

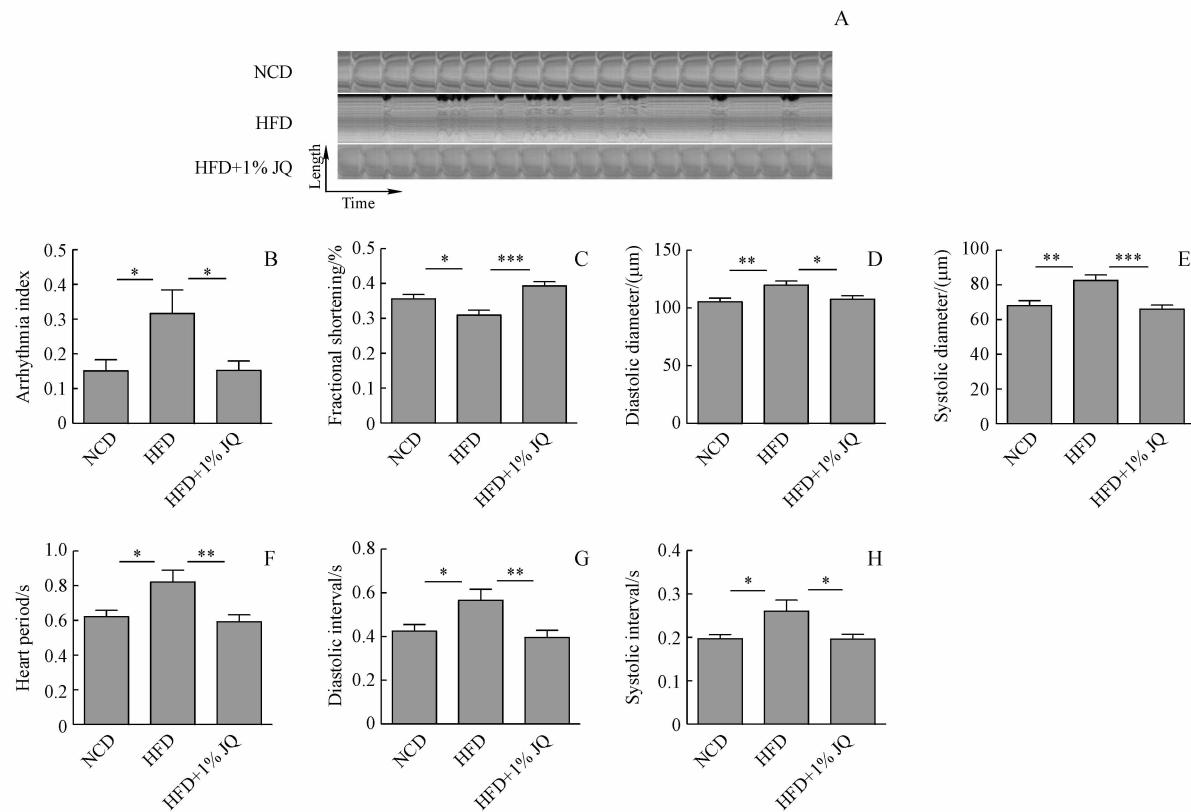


Figure 3 Jinqi Jiangtang tablets alleviates the impairment of cardiac function in *Drosophila* ( $\bar{x} \pm s, n > 20$ )

A: Representing M-mode (mechanical mode) traces showing the movement of the heart tube with edge (y axis) over time (x axis); B-H: Changes of arrhythmia index, fractional shortening, diastolic and systolic diameters, heart period, diastolic and systolic intervals of *Drosophila*

\* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001

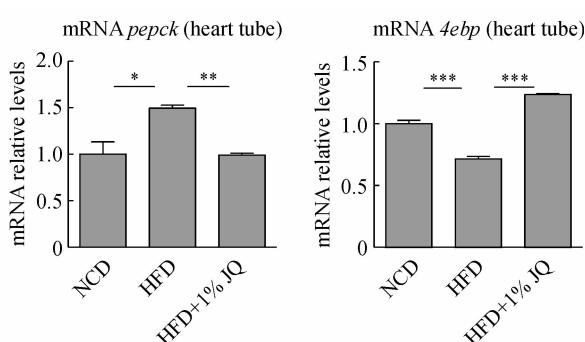


Figure 4 Effects of HFD and Jinqi Jiangtang tablets on expression of *4ebp* and *pepck* in heart tube determined by RT-PCR ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

\* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001

#### 4 讨 论

流行病学研究表明,肥胖、高热量饮食等是2型糖尿病发病的主要环境因素。2型糖尿病病人常伴有糖脂代谢紊乱,出现代谢异常表现为高血糖、高三酰甘油血症和高胆固醇血症等。金芪降糖片作为比较成熟的中药降血糖复方制剂,一直具有

良好的降血糖、降血脂作用,在糖尿病治疗中具有良好的改善胰岛素抵抗和纠正脂质代谢作用<sup>[5-6]</sup>。目前已有研究提示,金芪降糖片可以保护血管内皮<sup>[7]</sup>,还可以减轻糖尿病慢性肾损伤,其程度可能与降脂作用程度相关<sup>[8]</sup>;但是目前还未见金芪降糖片对糖尿病心血管并发症作用的研究。

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是一种非典型丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,进化上相对保守,可整合营养、能量及生长因子等多种细胞外信号,与细胞凋亡及自噬、蛋白质合成、免疫、细胞运动及代谢等密切相关<sup>[9]</sup>,真核细胞翻译起始因子4E结合蛋白1(4E binding protein1, 4EBP1)是mTOR的第一个下游底物,是一种翻译抑制因子,通过和eIF4E的mRNA帽结合亚单位的结合抑制翻译起始<sup>[10]</sup>。目前很多研究证明mTOR/4EBP在心衰发生发展中起到很重要的作用<sup>[11]</sup>,mTOR通路的激活与心衰发生密切相关<sup>[12]</sup>。

本研究发现金芪降糖片能改善心衰的同时改变mTOR/4EBP信号通路活性,可明显提高果蝇心

管内 *4ebp*、*pepckRNA* 表达量及降低全身磷酸化 4EBP 蛋白表达量,因此推测金芪降糖片改善糖脂代谢及保护心功能作用可能通过 mTOR/4EBP 相关信号通路实现。至于金芪降糖片如何影响 mTOR/4EBP 信号通路活性及如何改变心管内 mTOR/4EBP 信号通路的活性进而起作用还需要进一步研究。

### 参考文献

- [1] Peng JL, Yin P, Wang B, et al. Efficacy and safety of *Jinqi Jiangtang* tablet in treatment of type 2 diabetes mellitus [J]. *Her Med* (医药导报), 2013, 32(6): 796–800.
- [2] Lakovaara S, Hackman W, Vepsalainen K. Malt as a culture medium for *Drosophila* species [J]. *Drosophila Inform Serv*, 1969, 44: 128.
- [3] Xu X, Gopalacharyulu P, Seppanen-Laakso T, et al. Insulin signaling regulates fatty acid catabolism at the level of CoA activation [J]. *PLoS Genetics*, 2012, 8(1): e1002478.
- [4] Ocorr K, Reeves NL, Wessells RJ, et al. KCNQ potassium channel mutations cause cardiac arrhythmias in *Drosophila* that mimic the effects of aging [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(10): 3943–3948.
- [5] Zhu J, Jin X, Rei J, et al. Protection effect of new technological *Jin Qi Jiang Tang* tablets on rat pancreatic islet cells [J]. *Acta Acad Med CPAF* (武警医学院学报), 2010, 19(6): 437–441.
- [6] Yang FY, Yu J, Luo G, et al. The effect of new technological *Jin Qi Jiang Tang* tablets on rat glucose and lipid metabolism [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2012, 23(3): 677–678.
- [7] Wang R, Wu J. Research progress on the effect of *Jinqi Jiangtang* tablet on protecting vascular endothelium diabetic nephropathy and insulin resistance [J]. *World Chin Med* (世界中医药), 2014, 9(2): 261–263.
- [8] Zheng N, Wei SJ. Protective effect of *Jin Qi Jiang Tang* tablets on kidney in diabetic rats [J]. *Tianjin J Tradit Chin Med* (天津中医药), 2014, 31(4): 226–230.
- [9] Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance [J]. *J Cell Sci*, 2009, 122(20): 3589–3594.
- [10] Harris TE, Lawrence JC Jr. TOR signaling [J]. *Sci STKE*, 2003, 2003(212): re 15.
- [11] Zhang HM, Fu J, Hamilton R, et al. The mammalian target of rapamycin modulates the immunoproteasome system in the heart [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 86: 158–167.
- [12] Johnson SC, Rabinovitch PS, Kaeberlein M. mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease [J]. *Nature*, 2013, 493(7432): 338–345.

### · 征订启事 ·

### 欢迎订阅 2016 年《中国药科大学学报》

《中国药科大学学报》是由国家教育部主管、中国药科大学主办的药学中文核心期刊,主要刊登合成药物化学、天然药物化学、生药学、中药学、药剂学、药物分析、药代动力学、药物生物技术、药理学、药事管理等学科的原创研究论著。

《中国药科大学学报》在药学界享有较高的学术声誉,目前已被国际上多家著名权威数据库(CA, IPA, SCOPUS, JST, IC, EMBASE/Excerpta Medica, CAS)等所收录,被国内权威数据库:中国科学引文核心数据库(CSCD 核心)、《中文核心期刊要目总览》(2014 年版)、中国科技论文统计源数据库等列为药学类核心期刊,屡获原国家新闻出版总署、教育部、科技部等各种优秀期刊奖。

2008 年,《中国药科大学学报》被评为中国精品科技期刊,2006、2008、2010 年连续 3 次被教育部评为中国高校精品科技期刊。据中国知网,中国学术期刊(光盘版)电子杂志社《中国学术期刊影响因子年报(2010 版)》公布的最新数据,《中国药科大学学报》复合影响因子为 1.171,位居中国药学学术期刊第 4 位。学术影响力极高,在高等院校、科研机构、制药企业、医院等单位拥有众多读者。

本刊为双月刊,128 页。国际标准开本,国内外公开发行。欢迎到当地邮局订阅,漏订者可直接与编辑部联系。

国内刊号:CN 32-1157/R ISSN:1000-5048

国内邮发代号:28-115 定 价:40 元/期,全年 240 元

地 址:南京市童家巷 24 号 邮政编码:210009

电 话:025-83271566 传 真:025-83271279

E-mail:xuebao@cpu.edu.cn http://www.zgykdxxb.cn